

Original Article



Evaluation of oxidative spoilage rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillet by using polylactic acid-nanocellulose composite film with probiotic bacteria (*Lactobacillus casei*)

Mehdi Alinia¹ , Seyed Rohollah Javadian^{1*} , Somayeh Bahram¹ , Adel Bale Tabar¹ 

1. Department of Fisheries, Qas.C., Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran.

Article history:

Received: 24 September 2024
Revised: 16 November 2024
Accepted: 22 November 2024
ePublished: 23 November 2024

*Corresponding author: Seyed Rohollah Javadian, Department of Fisheries, Qas.C., Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran.

E-mail: ro.javadian@gmail.com

Abstract

Polylactic acid (PLA) nanocellulose (NC) composite film and probiotic bacteria *Lactobacillus casei* (L. *casei*) were used in order to increase the shelf life of *Oncorhynchus mykiss* fillet at refrigerator temperature (4±1 °C). First, Then the packed fillets (with the mentioned films) and control (without film) were evaluated in terms of chemical (PV, TBA, TVB- N and pH) properties on days 0, 4, 8, 12 and 16. According to the results of the present study, with the increase in storage time, the survival of probiotic bacteria in the nanofilm decreased, and at the end of the storage period, its values were equal to 6.12 log CFU/g, but it was within the permissible range (6 log CFU/g). The results of the investigation of chemical factors showed that the amount of the mentioned indicators in the fillets packed with films was significantly lower than the control treatments (P<0.05). Also PLA-NC+ L.*casei* was significantly the lowest treatment in terms of the mentioned indicators compared to other treatments (P<0.05). According to the suggested acceptable limit for these indicators, they were able to be maintained until the end of the maintenance period. According to the results of this research, the use of PLA-NC+L *casei* film had a positive effect on improving the oxidative spoilage of *Oncorhynchus mykiss* fish fillets during 16 storage at refrigerator temperature, and it can also be a suitable method for the production of probiotic Fish.

Keywords: *Lactobacillus casei*, lipid oxidation, Cellulose nanofiber, Fish probiotic

Please cite this article as follows: Alinia M., Javadian S.R., Bahram S., Bale Tabar A. Evaluation of oxidative spoilage rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillet by using polylactic acid-nanocellulose composite film with probiotic bacteria (*Lactobacillus casei*). J Mar Bio, 2024; 16(3): 58–70. DOI:



Copyright © 2024 Journal of Marin Biology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cite

مقاله اصلی

بررسی فساد اکسیداتیو فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از فیلم مرکب پلی‌لاکتیک اسید-نانوسولوز به همراه باکتری پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس کازئی)

مهدی علی‌نیا^۱ , سیدروح‌اله جوادیان^{۱*} , سمیه بهرام^۱ , عادل بائی تبار^۱ 

۱. گروه شیلات، واحد قائم‌شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم‌شهر، ایران.

چکیده

به منظور افزایش زمان ماندگاری فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در دمای یخچال ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) از فیلم مرکب پلی‌لاکتیک اسید (PLA)، نانوسولوز (NC) به همراه باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی (*L. casei*) استفاده شد. فیله‌های بسته‌بندی شده با فیلم‌های مذکور به همراه تیمار شاهد (بدون فیلم) (عدد پراکسید، تیوباربیتوریک اسید، بازهای ازته فرار و pH) در روزهای ۰، ۴، ۸، ۱۲ و ۱۶ مورد ارزیابی شیمیایی قرار گرفت. براساس نتایج مطالعه حاضر، با افزایش زمان نگهداری، بقاء باکتری‌های پروبیوتیک در نانوفیلم کاهش یافت و در انتهای دوره نگهداری مقادیر آن برابر $6/12 \log \text{CFU/g}$ بود، اما از محدوده مجاز ($6 \log \text{CFU/g}$) برخوردار بود. نتایج بررسی فاکتورهای شیمیایی نشان داد که میزان شاخص‌های مذکور در فیله‌های بسته‌بندی شده با فیلم‌ها به طور معنی‌داری نسبت به تیمارهای شاهد کمتر بود ($P < 0/05$). همچنین PLA-NC+L به *casei* به طور معنی‌داری کمترین تیمار از نظر شاخص‌های ذکر شده نسبت به سایر تیمارها بود ($P < 0/05$). بنابر نتایج حاصل از این تحقیق، استفاده از فیلم PLA-NC+L به بهبود فساد اکسیداتیو فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در زمان نگهداری ۱۶ روز در دمای یخچال اثر مثبت داشت و همچنین می‌تواند روشی مناسب جهت تولید ماهی پروبیوتیک باشد.

واژگان کلیدی: لاکتوباسیلوس کازئی، اکسیداسیون لیپیدی، نانوالیاف سلولزی، ماهی پروبیوتیک

تاریخچه مقاله

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۷/۳

تاریخ ویرایش مقاله: ۱۴۰۳/۸/۲۶

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۹/۲

تاریخ انتشار مقاله: ۱۴۰۳/۹/۳

تمامی حقوق برای دانشگاه آزاد اهواز محفوظ است.

* نویسنده مسئول: سیدروح‌اله جوادیان، گروه شیلات، واحد قائم‌شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم‌شهر، ایران.

ایمیل: ro.javadian@gmail.com

استناد: علی‌نیا، مهدی؛ جوادیان، سیدروح‌اله؛ بهرام، سمیه؛ بائی تبار، عادل. بررسی فساد اکسیداتیو فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از فیلم مرکب پلی‌لاکتیک اسید-نانوسولوز به همراه باکتری پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس کازئی). مجله زیست‌شناسی دریا، پاییز ۱۴۰۳؛ ۱۶(۳): ۵۸-۷۰

مقدمه

قزل آلی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) نوعی ماهی از خانواده‌ی آزاد ماهیان (Salmonidae) است. همچنین کشور ایران رتبه نخست تولید ماهی قزل‌آلا در جهان را دارد. به طور کلی، حدود ۲/۸ میلیون تن قزل‌آلا در سال ۲۰۲۵ در جهان تولید خواهد شد. ایران یکی از مهمترین تولیدکنندگان قزل‌آلا در خاورمیانه است و سالانه حدود ۲۰۰ هزار تن قزل‌آلا تولید می‌کند (FAO, 2018).

گوشت ماهی تازه به دلیل pH بالای عضله ($pH > 6$)، حضور مقادیر بالای نیترژن غیر پروتئینی (NPN)، مقادیر بالای اسیدهای چرب غیر اشباع، حضور آنزیم‌های اتولیز کننده و... در مقایسه با سایر محصولات گوشتی، عمر ماندگاری کوتاهی دارند و جزء غذاهای بسیار آسیب پذیر محسوب می‌شوند (Karami et al, 2019). یکی از روش‌های نوین نگهداری غذا که به محیط زیست آسیبی نمی‌رساند، استفاده از تکنولوژی نگهدارنده‌های طبیعی می‌باشد. استفاده از فیلم‌ها و پوشش‌های زیست تخریب‌پذیر می‌تواند سدی در برابر رطوبت، بخار آب، گازها و مواد محلول می‌باشد و علاوه بر این ابزار مناسبی جهت افزودن طیف گسترده‌ای از مواد نگهدارنده نظیر: ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، رنگ‌ها و سایر ترکیبات فعال می‌باشند (Zabihollahi et al, 2020).

پلی لاکتیک اسید (PLA)، یک پلیمر زیست تخریب‌پذیری است که از سوی اداره غذا و داروی ایالات متحده در لیست محصولات Generally GRAS Recognized as Safe قرار داده شد و برای بسته‌بندی تمام مواد غذایی ایمن شناخته شده است (Rezaeigolestani et al, 2017; Shakour et al, 2021). PLA، علاوه بر داشتن ویژگی‌های مطلوبی مثل استحکام مکانیکی زیاد شفافیت و بازدارندگی در مقابل عبور نور فرابنفش، معایبی نیز از جمله شکنندگی، زیاد پایداری حرارتی کم و بازدارندگی ضعیف در مقابل رطوبت و اکسیژن دارد که کاربرد آن را به عنوان جایگزین پلیمرهای سنتزی در صنعت بسته‌بندی محدود کرده است (Heydari-Majd et al, 2019). لذا به منظور بهبود این خواص اصلاح‌کننده‌هایی مثل نانوذرات در ساختار آن به کار می‌رود استفاده از نانوتقویت‌کننده‌ها و تولید نانوکامپوزیت‌های پلیمری از روش‌های مؤثری است که برای تقویت خواص پلیمرها طی سال‌های اخیر رواج یافته است. سلولز ($C_6H_{10}O_5$) یکی از فراوان‌ترین (۷۰۰ بیلیون تن در هرسال) مواد آلی موجود روی کره زمین است و بطور گسترده از منابع مختلفی نظیر چوب، کتان، کف و باکتری‌ها تهیه می‌شود. پتانسیل کاربرد نانوفیبرهای سلولز بعنوان تقویت‌کننده مواد پلیمری، مسیر جدیدی را برای تولید و توسعه کامپوزیت‌های بهتر همراه با ایجاد ارزش افزوده فراهم می‌کند. نانوفیبرهای سلولز با قطر زیر ۱۰۰ نانومتر از دیواره سلولی منابع مختلف طبیعی (از قبیل چوب و پالپ پنبه) بوسیله تیمارهای شیمیایی، مکانیکی و یا ترکیبی از این تیمارها استخراج می‌شوند. بطور کلی خواص نانوذرات سلولز علاوه بر ماده اولیه می‌تواند تحت تاثیر عواملی نظیر روش آماده‌سازی و همچنین درجه و حالت هموژنیزاسیون آنها متغیر باشد (Jensen et al, 2015; Salimirad et al, 2022). نانوفیبرهای سلولز تاکنون به عنوان تقویت‌کننده در پلیمرهای مختلفی از قبیل کربوکسی متیل سلولز (Zabihollahi et al, 2020)، پلی لاکتیک اسید (Abdulkhani et al, 2014) و PLA-کیتوزان (Niu et al, 2018) به کار رفته‌اند که حاصل آن تقویت و بهبود ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی نانوکامپوزیت‌های تولیدی بوده است. علاوه بر این، ترکیب عوامل فعال زیستی مانند پروبیوتیک و پری‌بیوتیک در فیلم‌های نانوکامپوزیتی باعث بهبود عملکرد آنها می‌شود. به این نوع فیلم‌های نانوکامپوزیت "فیلم‌های نانوکامپوزیت زیست فعال" گفته می‌شود (Odila Pereira et al, 2016; Salimirad et al, 2022). در این راستا، باکتری‌های اسید لاکتیک و متابولیت‌های آنها در جهت بهبود ایمنی میکروبی و افزایش ماندگاری مواد غذایی تحت عنوان نگهدارنده‌های زیستی معرفی شده‌اند. باکتری‌های اسیدلاکتیک معمولاً به دلیل عملکردهای ضد میکروبی ناشی از فعالیت پپتیدهای کوچک و مقاوم به حرارت به نام باکتریوسین به عنوان ارگانیزم‌های محافظ غذایی در نظر گرفته می‌شوند (Espitia et al, 2016; Aymerich et al, 2019). علاوه بر این، کاربرد فیلم‌های خوراکی حاوی باکتری‌های لاکتیکی در ماتریس مواد غذایی از نظر انتقال این باکتری‌ها به مصرف‌کنندگان و تولید مواد ضد میکروبی و یا رقابت با میکروارگانیسم‌های عامل فساد و ایجاد پتانسیل ضد میکروبی بالا حائز اهمیت است (Mozaffarzogh et al, 2020; Pavli et al, 2018). از معمول‌ترین کشت میکروبی

که در تولید انواع فرآورده‌های پروبیوتیک به کار می‌روند می‌توان به باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی^۱ اشاره کرد (Atallah et al, 2016). لاکتوباسیلوس کازئی (*L. casei*) یکی از پروبیوتیک‌های مهم در فرآورده‌های غذایی است. این باکتری گرم مثبت، مزوفیل، میله‌ای شکل، میکرواُتروفیل، کاتالاز منفی و بدون اسپور بوده و بیشترین قابلیت بقا را در فرآورده‌های غذایی به آن نسبت می‌دهند. اسید لاکتیک تولید شده توسط لاکتوباسیلوس کازئی از نوع L+ است و به ونکومایسین مقاوم می‌باشد (Ghasemi et al, 2022). با توجه به تقاضای مصرف‌کنندگان جهت استفاده از مواد خوراکی با کیفیت بالا و نگرانی آنها به دلیل مشکلات ناشی از مصرف نگهدارنده‌های مصنوعی، ایده استفاده از فیلم‌های نانوکامپوزیت زیست فعال با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی بالا به عنوان جایگزینی مناسب قوت گرفته است. علاوه بر این در زمینه افزودن باکتری پروبیوتیک به صورت مستقیم به فیلم خوراکی و استفاده از آن به عنوان بسته‌بندی فعال در مواد غذایی پژوهش‌های اندکی صورت گرفته است و تاکنون مطالعه‌ای در ارتباط با افزودن پروبیوتیک *L. casei* به فیلم PLA حاوی نانو سلولز (NC) انجام نشده است. هدف از مطالعه حاضر در ابتدا، بررسی زنده ماندن *L. casei* در فیلم خوراکی NC-PLA طی مدت ماندگاری در یخچال و سپس بررسی تأثیر استفاده از نانو فیلم پروبیوتیک مذکور بر کیفیت و ماندگاری فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از گرانول‌های PLA (فکیور آلمان)، نانو فیبر سلولز (با متوسط قطر ۳۵ نانومتر و میانگین طول ۵ میکرومتر با خلوص ۹۹ درصد، نانو نوین پلیمر، ایران)، محیط کشت MRs broth و MRS agar (مرک آلمان) و سویه باکتری لاکتوباسیلوس کازئی (*L. casei*) (۱۶۰۸) (PTCC) (مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران) در تهیه فیلم‌ها استفاده گردید. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده، دارای درجه خلوص آزمایشگاهی بوده و از شرکت مرک (Darmstadt, Germany) خریداری شدند.

تهیه فیلم

L. casei در محیط کشت MRs broth به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. سلول‌های باکتریایی با سانتریفیوژ با شدت $\times 9000$ به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده و جمعیت باکتری از طریق کشت در محیط MRS agar (۲۴ ساعت، ۳۷ درجه سانتی‌گراد) برآورد شد (Soukoulis et al, 2014a). برای تهیه فیلم خالص PLA، از روش ریخته‌گری محلول^۲ (روش قالب ریزی) استفاده شد. برای این منظور بایستی محلول ۱ درصد PLA در کلروفرم (حلال) تهیه و به کمک دستگاه مگنت استیرر به مدت ۸ ساعت در دمای محیط هم زده تا گرانول‌های PLA بخوبی حل شوند. NC (۰ و ۱ درصد) به محلول مذکور اضافه و همچنین نمونه‌های فیلم بعد از تلقیح باکتری *L. casei* (تا رسیدن به مقدار نهایی 10^9 CFU/g) روی پلیت شیشه‌ای ریخته تا حلال (کلروفرم) در زیر هود شیمیایی طی ۲۴ ساعت تبخیر شد. بعد از این مرحله فیلم از روی قالب شیشه‌ای جدا و تا زمان استفاده در ظرف حاوی سیلیکاژل قرار داده شد (Erdohan et al, 2013).

زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک طی دوره نگهداری

در بازه‌های زمانی ۱۶ روزه، فیلم‌ها در شرایط اسپتیک از زیپ کیپ به ارلن‌های حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محلول بافر فسفات انتقال داده و به مدت ۲ ساعت در انکوباتور شیک‌دار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد تا باکتری‌ها فرصت آزاد شدن از فیلم را داشته باشند. رقت‌های مختلف از کل نمونه محلول ساخته و پس از کشت دادن به صورت پور پلیت در محیط کشت MRS آگار، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شدند (Soukoulis et al, 2014b).

تهیه ماهی

قزل‌آلای رنگین‌کماناز مرکز فروش ماهی در بابلسر خریداری و در مجاورت یخ به آزمایشگاه پژوهشکده اکولوژی خزر انتقال داده شد. پس از شستشوی اولیه، سر و دم زنی، خارج کردن امعاء و مجدداً شستشو شد و تعداد ۷۲ فیله به وزن ۵۰ تا ۱۰۰ گرم تهیه و جهت انتخاب تیمارها

¹ *Lactobacillus casei*

² Solvent Casting Method

آماده‌سازی شد. ۳ تیمار فیله فیلم‌های تولیدی شامل فیلم PLA، فیلم PLA-NC و PLA-NC-L.*casei* بسته بندی (were packed) و سپس به همراه تیمار شاهد در کیسه‌های زیپدار پلی اتیلنی قرار داده شدند. فیله‌های آماده شده به مدت ۱۶ روز در یخچال دمای 4 ± 1 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و در فواصل زمانی ۴ روز یک بار مورد ارزیابی شیمیایی قرار گرفتند.

اندازه‌گیری شاخص‌های شیمیایی

اندازه‌گیری عدد پراکسید

برای اندازه‌گیری شاخص پراکسید از روش *Javadian et al. (2017)* استفاده شد، که در آن نمونه روغن استخراج شده از نمونه ماهی را به دقت در ارن مایر ۲۵۰ میلی لیتری سر سمباده ای وزن نموده و حدود ۲۵ میلی لیتر از محلول اسید استیک کلروفرمی (نسبت کلروفرم به اسید استیک ۲: ۳) به محتویات ارن اضافه شد. سپس ۰/۵ میلی لیتر از محلول یدورپتاسیم اشباع، ۳۰ میلی لیتر از آب مقطر و ۰/۵ میلی لیتر محلول نشاسته یک درصد به مجموعه افزوده و مقدار ید آزاد شده با محلول تیوسولفات سدیم ۱ درصد نرمال تیترو گردید.

اندازه‌گیری تیوباربیتوریک اسید (TBA)

۰/۵ گرم نمونه گوشت ماهی با ۵ میلی لیتر از محلول تیوباربیتوریک اسید (شامل ۰/۳۷۵ پودر معرف تیوباربیتوریک اسید ۱۵ درصد تری کلرواستیک اسید و اسید کلریدریک ۰/۲۵ نرمال) آمیخته شد. محلول ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار گرفته تا رنگ صورتی بدست آید و در ادامه در ۷۰۰۰ برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردیده و جذب محلول بوسیله اسپکتروفتومتر در ۵۳۲ نانومتر خوانده و ثبت شد. میزان تیوباربیتوریک اسید به صورت میلی گرم مالون آلدهید بر کیلوگرم نمونه بیان گردید (*Bagheri et al, 2016*).

اندازه‌گیری مجموع بازهای نیتروژنی فرار (TVB-N)

اندازه‌گیری بازهای ازته فرار به روش کلدال انجام گرفت. بدین منظور ۱۰ گرم نمونه به همراه ۲ گرم اکسید منیزیم با افزودن ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر به بالن کلدال متصل شد و نمونه مورد نظر به محلول متشکل از اسیدبوریک ۲ درصد و ۲-۱ قطره متیل رد به عنوان شاخص وارد شد محلول زرد رنگ حاصله با اسید سولفوریک تا حاصل شدن رنگ ارغوانی تیترو شد و به صورت میلی گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه ماهی بیان شد (*Bahram et al, 2016*). میزان بازهای ازته فرار از رابطه ذیل محاسبه گردید.

$$\text{TVB-N} = \text{وزن نمونه} / 100 \times 1/4 \times \text{میزان اسید سولفوریک مصرفی}$$

اندازه‌گیری pH

بدین منظور ۵ گرم از نمونه به مدت ۱ دقیقه با ۴۵ میلی لیتر آب مقطر همگن شد و میزان pH با دستگاه pH سنج (Metrohm) ساخت کشور سوئیس، اندازه‌گیری شد (*Valipour et al, 2017*).

تجزیه و تحلیل آماری

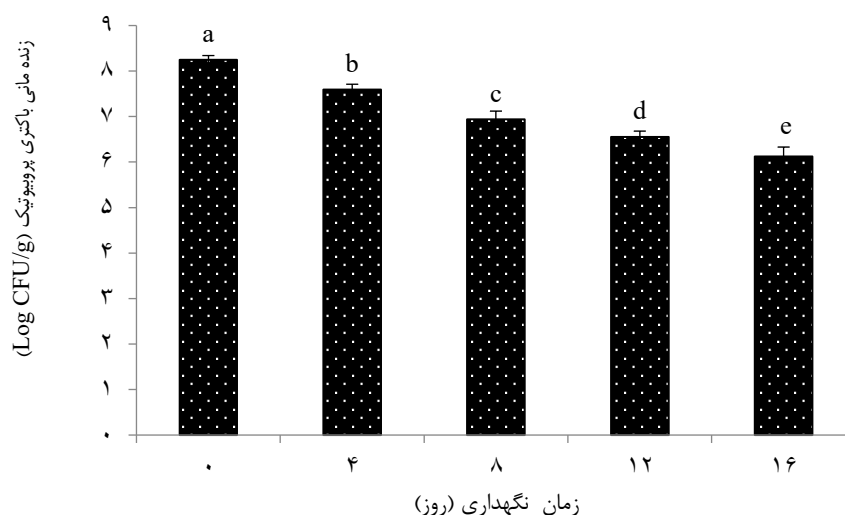
آزمون آماری با استفاده از طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی در ۴ تیمار و ۳ تکرار انجام و نتایج به صورت میانگین + انحراف معیار بیان گردید. تفاوت معنی‌داری ($P < 0.05$) بوسیله آنالیز آماری واریانس دو طرفه (Two way ANOVA) و تفاوت میانگین‌ها توسط آزمون دانکن ارزیابی شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۲۱ تجزیه و تحلیل شد.

نتایج

بقاء باکتری‌های پروبیوتیک در فیلم پلی لاکتیک اسید- نانوسلولز

بقاء باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی در فیلم پلی لاکتیک اسید- نانوسلولز نگهداری شده در دمای یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) در شکل ۱ ارائه شده است. براساس نتایج مطالعه حاضر، ارتباط معنی‌دار معکوسی بین بقاء باکتری‌های پروبیوتیک در فیلم در روز آغاز و پایان مطالعه

وجود داشت ($P < 0.05$). تعداد باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی از $\log \text{CFU/g}$ ۸/۲۵ در روز صفر مطالعه به $\log \text{CFU/g}$ ۶/۱۲ در پایان مطالعه (روز ۱۶) رسید.



شکل ۱: تغییرات باکتری‌های پروبیوتیک در فیلم نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد حروف غیرمشابه در یک روز نشان دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$)

تغییرات عدد پراکسید طی مدت نگهداری

نتایج مربوط به تغییرات عدد پراکسید در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج بدست آمده از آزمون عدد پراکسید نشان داد که تغییرات عدد پراکسید تحت تاثیر زمان و تیمار می‌باشد، به همین علت آنالیز آماری تاثیر زمان و تیمار بر مقادیر عدد پراکسید فیلها به طور جداگانه ارزیابی شد. با توجه به نتایج آنالیز آماری تیمارهای مختلف در روز صفر نگهداری اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند ($P > 0.05$). با افزایش زمان مقادیر عدد پراکسید در تمامی تیمارها افزایش یافت و این تغییرات در تیمار شاهد بیشتر بود ($P < 0.05$). با توجه به نتایج آنالیز آماری در اکثر روزها بیشترین مقادیر در تیمار شاهد، مشاهده شد. استفاده از فیلم پلی لاکتیک-نانوسولز سبب کند شدن روند افزایشی عدد پراکسید شد و افزودن باکتری پروبیوتیک به فیلم تاثیر مثبتی بر این روند داشت، به طوری که در روز ۱۶م نگهداری کمترین مقادیر عدد پراکسید در تیمار پلی لاکتیک اسید + نانو سلولز + لاکتوباسیلوس کازئی و بیشترین مقادیر در تیمار شاهد مشاهده شد ($P < 0.05$).

جدول ۱: مقادیر عدد پراکسید در تیمارهای مختلف طی مدت زمان نگهداری

تیمار				زمان نگهداری (روز)
PLA + NC + <i>L. casei</i>	PLA + NC	PLA	شاهد	
۰/۸۸±۰/۰۴ ^{Ac}	۰/۹۱±۰/۰۸ ^{Ac}	۰/۹۱±۰/۰۶ ^{Ac}	۰/۹۰±۰/۰۳ ^{Ad}	۰
۱/۹۴±۰/۰۵ ^{Cd}	۲/۶۵±۰/۱۹ ^{Cd}	۳/۰۱±۰/۰۹ ^{Bd}	۴/۲۶±۰/۲۴ ^{Ac}	۴
۳/۲۳±۰/۲۳ ^{Dc}	۴/۲۳±۰/۱۶ ^{Cc}	۵/۰۱±۰/۲۴ ^{Bc}	۷/۸۷±۰/۳۹ ^{Aa}	۸
۳/۷۴±۰/۲۹ ^{Cb}	۵/۷۸±۰/۲۹ ^{Bb}	۶/۰۶±۰/۲۷ ^{Bb}	۶/۶۴±۰/۳۷ ^{Ab}	۱۲
۴/۹۲±۰/۱۲ ^{Ca}	۶/۳۶±۰/۱۰ ^{Ca}	۶/۹۴±۰/۱۴ ^{Ba}	۸/۲۳±۰/۲۵ ^{Aa}	۱۶

(۱) همه اعداد بر حسب میلی اکسیژن/کیلوگرم چربی بیان شده است (میانگین ± انحراف از معیار)

(۲) اعداد در یک ستون با حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار دارند (a, b, c, ...)

(۳) اعداد در یک ردیف با حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار دارند (A, B, ...)

تغییرات عدد تیوباریوتیک اسید طی مدت نگهداری

نتایج مربوط به تغییرات عدد تیوباریوتیک اسید در جدول ۲ ارائه شده است. با توجه به نتایج آنالیز آماری تیمارهای مختلف در روز صفر نگهداری اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند ($P > 0.05$). با افزایش زمان مقادیر عدد تیوباریوتیک اسید در تمامی تیمارها افزایش یافت و این تغییرات در تیمار شاهد بیشتر بود ($P < 0.05$). با توجه به نتایج آنالیز آماری در اکثر روزها بیشترین مقادیر در تیمار شاهد، مشاهده شد. استفاده از فیلم پلی لاکتیک-نانوسلولز سبب کند شدن روند افزایشی تیوباریوتیک اسید شد و افزودن باکتری پروبیوتیک به فیلم تاثیر مثبتی بر این روند داشت، به طوریکه در روز ۱۶م نگهداری کمترین مقادیر عدد تیوباریوتیک اسید در تیمار پلی لاکتیک اسید + نانو سلولز + لاکتوباسیلوس کازئی و بیشترین مقادیر در تیمار شاهد مشاهده شد ($P < 0.05$).

جدول ۲: مقادیر عدد تیوباریوتیک اسید در تیمارهای مختلف طی مدت زمان نگهداری

تیمار	زمان نگهداری (روز)	شاهد	PLA	PLA + NC	PLA + NC + <i>L. casei</i>
۰	۰	۰/۳۵±۰/۰۴ ^{Ac}	۰/۳۵±۰/۰۵ ^{Ac}	۰/۴۰±۰/۰۴ ^{Ac}	۰/۳۹±۰/۰۵ ^{Ac}
۴	۴	۰/۸۵±۰/۰۶ ^{Ad}	۰/۸۲±۰/۰۳ ^{ABd}	۰/۷۶±۰/۰۳ ^{Bd}	۰/۵۸±۰/۰۱ ^{Cd}
۸	۸	۱/۹۶±۰/۰۸ ^{Ac}	۱/۴۸±۰/۰۶ ^{Bc}	۱/۰۵±۰/۰۶ ^{Cc}	۰/۸۳±۰/۰۳ ^{Dc}
۱۲	۱۲	۳/۵۴±۰/۰۸ ^{Ab}	۲/۶۶±۰/۱۵ ^{Bb}	۱/۹۶±۰/۱۶ ^{Cb}	۱/۳۲±۰/۰۹ ^{Db}
۱۶	۱۶	۴/۱۴±۰/۱۰ ^{Aa}	۳/۴۰±۰/۲۷ ^{Ba}	۲/۶۷±۰/۱۲ ^{Ca}	۱/۸۸±۰/۱۰ ^{Da}

(۱) همه اعداد بر حسب میلی گرم مالون دی آلدئید/ کیلوگرم چربی بیان شده است (میانگین ± انحراف از معیار)

(۲) اعداد در یک ستون با حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار دارند (a, b, c,...)

(۳) اعداد در یک ردیف با حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار دارند (A, B,...)

تغییرات بازهای نیتروژنی فرار طی مدت نگهداری

نتایج مربوط به بازهای نیتروژنی فرار در جدول ۳ ارائه شده است. با توجه به نتایج آنالیز آماری تیمارهای مختلف در روز صفر نگهداری اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند ($P > 0.05$). با افزایش زمان مقادیر بازهای نیتروژنی فرار در تمامی تیمارها افزایش یافت و این تغییرات در تیمار شاهد بیشتر بود ($P < 0.05$). با توجه به نتایج آنالیز آماری در اکثر روزها بیشترین مقادیر در تیمار شاهد، مشاهده شد. استفاده از فیلم پلی لاکتیک-نانوسلولز سبب کند شدن روند افزایشی بازهای نیتروژنی فرار شد و افزودن باکتری پروبیوتیک به فیلم تاثیر مثبتی بر این روند داشت، به طوریکه در روز ۱۶م نگهداری کمترین مقادیر بازهای نیتروژنی فرار در تیمار پلی لاکتیک اسید + نانو سلولز + لاکتوباسیلوس کازئی و بیشترین مقادیر در تیمار شاهد مشاهده شد ($P < 0.05$).

جدول ۳: مقادیر بازهای نیتروژنی فرار در تیمارهای مختلف طی مدت زمان نگهداری

تیمار	زمان نگهداری (روز)	شاهد	PLA	PLA + NC	PLA + NC + <i>L. casei</i>
۰	۰	۱۲/۳۷±۰/۸۱ ^{Ac}	۱۲/۵۳±۰/۵۳ ^{Ac}	۱۲/۶۶±۰/۶۷ ^{Ac}	۱۲/۸۳±۰/۷۵ ^{Ac}
۴	۴	۲۰/۸۴±۱/۳ ^{Ad}	۱۸/۳۶±۰/۵۷ ^{Bd}	۱۶/۸۱±۰/۷۵ ^{Cd}	۱۷/۵۱±۰/۵۶ ^{BCd}
۸	۸	۳۰/۸۹±۲/۰۳ ^{Ac}	۲۹/۰۳±۱/۱۷ ^{Ac}	۲۸/۴۹±۰/۶۳ ^{Ac}	۲۴/۲۲±۰/۹۸ ^{Bc}
۱۲	۱۲	۴۹/۲۰±۱/۱۵ ^{Ab}	۳۶/۱۱±۱/۶۳ ^{Bb}	۳۳/۳۸±۱/۱۹ ^{Cb}	۲۸/۶۸±۰/۶۰ ^{Db}
۱۶	۱۶	۵۶/۸۶±۲/۰۵ ^{Aa}	۴۵/۵۳±۰/۷۴ ^{Ba}	۴۱/۵۶±۰/۸۸ ^{Ca}	۳۱/۳۶±۰/۳۲ ^{Da}

(۱) همه اعداد بر حسب میلی گرم/ صد گرم بیان شده است (میانگین ± انحراف از معیار)

(۲) اعداد در یک ستون با حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار دارند (a, b, c,...)

(۳) اعداد در یک ردیف با حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار دارند (A, B,...)

تغییرات pH طی مدت نگهداری

نتایج مربوط به تغییرات pH در جدول ۴ ارائه شده است. با توجه به نتایج آنالیز آماری تیمارهای مختلف در روز صفر نگهداری اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند ($P > 0.05$). با افزایش زمان مقادیر pH در تیمارهای مختلف روند کاهشی افزایشی داشت و بیشترین مقادیر در تمامی تیمارها در انتهای دوره نگهداری مشاهده شد ($P < 0.05$). با توجه به نتایج آنالیز آماری در اکثر روزها بیشترین مقادیر در تیمار شاهد، مشاهده شد. استفاده از فیلم پلی لاکتیک-نانوسلولز سبب کند شدن روند افزایشی pH شد و افزودن باکتری پروبیوتیک به فیلم تاثیر مثبتی بر این روند داشت، به طوریکه در روز ۱۶م نگهداری کمترین مقادیر pH در تیمار پلی لاکتیک اسید + نانو سلولز + لاکتوباسیلوس کازئی و بیشترین مقادیر در تیمار شاهد مشاهده شد ($P < 0.05$).

جدول ۴: مقادیر pH در تیمارهای مختلف طی مدت زمان نگهداری

تیمار	زمان نگهداری (روز)	شاهد	PLA	PLA + NC	PLA + NC + <i>L. casei</i>
	۰	۶/۵۳±۰/۰۶ ^{Ad}	۶/۵۰±۰/۰۲ ^{Ac}	۶/۵۰±۰/۰۶ ^{Ac}	۶/۵۲±۰/۰۵ ^{Ac}
	۴	۷/۰۲±۰/۰۷ ^{Ab}	۶/۳۷±۰/۰۲ ^{Bd}	۶/۳۷±۰/۰۳ ^{Bd}	۶/۳۸±۰/۰۴ ^{Bc}
	۸	۶/۵۸±۰/۰۱ ^{Ac}	۶/۴۸±۰/۰۴ ^{Bc}	۶/۴۸±۰/۰۲ ^{Bc}	۶/۴۰±۰/۰۳ ^{Cd}
	۱۲	۷/۰۶±۰/۰۵ ^{Ab}	۶/۹۲±۰/۰۶ ^{Bb}	۶/۷۸±۰/۰۳ ^{Cb}	۶/۵۹±۰/۰۱ ^{Db}
	۱۶	۷/۲۳±۰/۰۵ ^{Aa}	۷/۰۶±۰/۰۳ ^{Ba}	۶/۹۳±۰/۰۶ ^{Ca}	۶/۷۹±۰/۰۵ ^{Da}

(۱) همه اعداد بر حسب میانگین ± انحراف از معیار بیان شده است.

(۲) اعداد در یک ستون با حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار دارند (a, b, c, ...)

(۳) اعداد در یک ردیف با حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار دارند (A, B, ...)

بحث و نتیجه‌گیری

بقاء باکتری‌های پروبیوتیک در فیلم نانوکامپوزیت

شرایط اصلی برای تضمین اثربخشی فیلم‌های فعال پروبیوتیکی، اطمینان از بقاء و عملکرد میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک‌های گنجانده شده در ماتریس زیست پلیمرها، می‌باشد (La Stora et al, 2020). براساس نتایج مطالعه حاضر، با افزایش زمان نگهداری، بقاء باکتری‌های پروبیوتیک در فیلم کاهش یافت. به طوریکه تعداد باکتری‌های *L. casei* از $\log \text{CFU/g}$ ۸/۲۵ در روز صفر مطالعه به $\log \text{CFU/g}$ ۶/۱۲ در پایان مطالعه (روز ۱۶) رسید. بر طبق قانون تصویب شده سازمان خواروبار و کشاورزی ملل متحد (FAO ۲۰۱۸) تعداد باکتری پروبیوتیک در سطح فیلم باید حداقل $\log \text{CFU/g}$ ۶ باشد، که در این مطالعه تا انتهای دوره نگهداری از مقادیر مجاز برخوردار بود. در واقع طی دوره نگهداری باکتری پروبیوتیک به میزان $\log \text{CFU/g}$ ۲ کاهش یافت. بنابراین به نظر می‌رسد، فیلم PLA-نانوسلولز، می‌تواند حامل خوبی برای سلول‌های زنده پروبیوتیکی باشد. مطالعات اخیر نشان داده‌اند، تعداد باکتری‌های پروبیوتیک در فیلم‌های بر پایه پروتئینی و پلی‌ساکاریدی در طی نگهداری در دمای یخچال $\log \text{CFU/g}$ ۱-۲ کاهش می‌یابد (Ebrahimi et al, 2018; Mozaffarzogh et al, 2020; Salimirad et al, 2022). در مطالعه Ebrahimi et al. (2018) مدت زمان بقاء باکتری‌های پروبیوتیک مختلف نظیر لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در فیلم کربوکسی‌متیل سلولز بررسی و نشان داده‌اند پس از ۴۲ روز باکتری‌ها به میزان قابل توجهی در سطح فیلم باقی مانده‌اند.

این نتایج با نتایج Mozaffarzogh et al. (2020) هم خوانی داشت، آنها نیز اعلام نمودند مقادیر زنده‌مانی باکتری‌های لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس روتری، لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس رامنوسوس و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در فیلم‌های کربوکسی‌متیل سلولز

سدیم کازئینات طی دوره نگهداری به میزان تقریبی $2 \log \text{CFU/g}$ کاهش یافت و این کاهش در باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم بیشتر از سایر باکتری‌ها بود و در تمامی تیمارها از محدوده مجاز برخوردار بود.

بررسی مقادیر عدد پراکسید

مطابق نتایج، مقادیر عدد پراکسید در تیمارهای طی مدت نگهداری افزایش یافت، در بین تیمارهای مورد مطالعه تیمار شاهد بیشترین افزایش در عدد پراکسید را نشان داد. همچنین در تیمار شاهد تا روز هشتم نگهداری روند افزایشی، سپس در روز ۱۲ام کاهش و مجدداً افزایش یافت به طوریکه در روز ۱۶ام نگهداری مقادیر عدد پراکسید در تیمار شاهد برابر با $8/23$ میلی‌اکی والان/کیلوگرم چربی بود. در مرحله اول اکسیداسیون، پراکسید افزایش می‌یابد، در این زمان سرعت تولید هیدروپراکسید بالاتر از سرعت تجزیه آن می‌باشد، پس از آن، مقدار پراکسید در نتیجه در دسترس بودن کمتر بستر و ناپایداری مولکول‌های پراکسید کاهش می‌یابد (Bahram et al, 2016). با افزایش زمان نگهداری مقادیر عدد پراکسید در تیمارهای حاوی فیلم PLA کمتر از تیمار شاهد بود. فیلم‌های خوراکی که روی سطح فیله ماهی به کار می‌روند به صورت یک مانع بین گوشت ماهی و محیط اطراف عمل کرده و نفوذ اکسیژن به سطح فیله ماهی را کم کرده و از سرعت اکسیداسیون اولیه چربی‌ها و متعاقب آن با اهدای یک اتم هیدروژن یا الکترون آزاد باعث تشکیل ترکیبات پایدار از هیدروپراکسیدها و یا با شلاته کردن یون‌های فلزی و فرونشاندن اکسیژن یگانه با حذف پراکسید، باعث جلوگیری از فساد می‌شود (Shahosseini et al, 2021). افزودن نانوسلولز نیز سبب بهبود نتایج شد، علت این امر خاصیت آنتی‌اکسیدانی NCها می‌باشد که با محافظت فیله ماهی قزل آلا در برابر اکسیداسیون لیبید، سبب افزایش ماندگاری آن می‌شود. در مجموع بهترین نتایج در ارتباط با روند افزایشی عدد پراکسید، در تیمار $L. casei + NC + PLA$ مشاهده شد روز ۱۶ام نگهداری مقادیر عدد پراکسید در این تیمار برابر با $4/92$ میلی‌اکی والان/کیلوگرم چربی بود. علت پایین‌تر بودن مقادیر عدد پراکسید در تیمارهای حاوی $L. casei$ ممکن است به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی باکتری پروبیوتیک باشد، بر اساس مطالعات مشخص شده است که این باکتری‌ها می‌تواند در برابر گونه‌های فعال اکسیژن از جمله رادیکال‌های پراکسید، آنیون‌های سوپراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل مقاومت کند. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که پروبیوتیک‌ها، مانند لاکتوباسیلوس‌ها، دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عالی می‌باشد که سبب محافظت در برابر استرس اکسیداتیو می‌شوند (Feng and Wang, 2020; Salimirad et al, 2022). میزان مجاز پراکسید در فرآورده‌های گوشتی و دریایی برای مصرف انسانی ۵ است (Yanar, 2007). بر این اساس تیمار $L. casei + NC + PLA$ تا انتهای دوره نگهداری از محدوده مجاز برخوردار بود.

این نتایج با نتایج، Khanjani et al. (2023) هم خوانی داشت، آنها نیز اعلام نمودند فیلم‌های مرکب حاوی نانو سلولز به همراه باکتری پروبیوتیک روند افزایشی عدد پراکسید را نسبت به تیمار شاهد و فیلم خالص کندتر نمود. همچنین Salimirad et al. (2022) اعلام نمودند فیلم‌های نانوسلولز-نانو کیتوزان-ژلاتین حاوی لاکتوباسیلوس کازئی و باسیلوس کوآگولانس روند افزایشی عدد پراکسید را نسبت به تیمار شاهد و فیلم خالص کندتر نمود.

تغییرات عدد تیوباریوتیک اسید طی مدت نگهداری

مقادیر عدد تیوباریوتیک اسید به طور قابل توجهی با افزایش زمان نگهداری در همه نمونه‌ها افزایش یافت و مقادیر آن در تیمار شاهد در تمامی زمان‌های نگهداری بالاتر از سایر تیمارها بود و در انتهای دوره نگهداری (روز ۱۶ام) عدد تیوباریوتیک اسید در تیمار شاهد برابر با $4/14$ میلی گرم مالون‌دی‌ل‌دئید/کیلوگرم چربی و برای تیمار PLA برابر با $3/40$ میلی گرم مالون‌دی‌ل‌دئید/کیلوگرم چربی و برای تیمار $NC + PLA$ برابر با $2/67$ میلی گرم مالون‌دی‌ل‌دئید/کیلوگرم چربی و برای تیمار $L. casei + NC + PLA$ برابر با $1/88$ میلی گرم مالون‌دی‌ل‌دئید/کیلوگرم چربی بود، افزایش تیوباریوتیک اسید با آب زدایی نسبی ماهی و افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع با واکنش رادیکال آزاد از طریق حمله اکسیژن به باندهای دوگانه در اسیدهای چرب غیراشباع آغاز می‌گردد و فیلم‌های خوراکی با ممانعت از ورود اکسیژن همانند سد میان سطح ماهی و محیط اطراف آن عمل نموده و موجب کاهش نفوذ اکسیژن به سطح فیله و کاهش اکسیداسیون می‌شود (Esmaeili et al, 2020) و علاوه بر این کمتر بودن مقادیر تیوباریوتیک اسید پس افزودن باکتری پروبیوتیک به علت خاصیت آنتی‌اکسیدانی پروبیوتیک‌هاست که

سبب افزایش ویژگی ممانعت‌کنندگی نفوذ اکسیژن به داخل فیلم‌های پروبیوتیک می‌شود (Mozaffarzogh *et al*, 2020). پیشنهاد شده که حداکثر میزان قابل قبول تیوباریتوریک اسید برای کیفیت مطلوب آبی ۲ میلی گرم مالون دی‌آلدهید/کیلوگرم نمونه است (Campo *et al*, 2006). بر این اساس تیمار $L. casei$ + NC + PLA تا انتهای دوره نگهداری از محدوده مجاز برخوردار بود. Khorami *et al*. (2024) نیز گزارش کردند که افزودن فوکوئیدان به پوشش دو لایه کیتوزان-آلژینات منجر به افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی این پوشش و تأثیر مثبت آن بر تغییرات عدد تیوباریتوریک اسید در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان طی دوره نگهداری می‌شود.

بررسی مقادیر بازهای نیتروژنی فرار

مقادیر بازهای نیتروژنی فرار به طور قابل توجهی با افزایش زمان نگهداری در همه نمونه‌ها افزایش یافت و مقادیر آن در تیمار شاهد در تمامی زمان‌های نگهداری بالاتر از سایر تیمارها بود و در انتهای دوره نگهداری (روز ۱۶) مقادیر بازهای نیتروژنی فرار در تیمار شاهد برابر با ۵۶/۸۶ گرم/صدگرم و برای تیمار PLA برابر با ۴۵/۵۳ گرم/صدگرم و برای تیمار $NC + PLA$ برابر با ۴۱/۵۳ گرم/صدگرم و برای تیمار $PLA + NC$ لاکتوباسیلوس برابر با ۳۱/۳۶ گرم/صدگرم بود. آنزیم‌های درونی خود ماهی باعث تولید بازهای ازته فرار شده که نشانگر میزان فساد، تجزیه و شکستن پروتئین‌هاست در واقع استفاده از فیلم خوراکی سبب کاهش سریع جمعیت باکتریایی یا کاهش ظرفیت باکتری‌ها برای تخمیر اکسیداتیو ترکیبات نیتروژنی غیر پروتئینی (یا هر دو) می‌شوند و همچنین باکتری پروبیوتیک سبب هم افزایش خاصیت ضد میکروبی فیلم خوراکی شده و در مجموع روند افزایشی بازهای نیتروژنی فرار به طور مناسب‌تری مهار نمود (Alizadeh *et al*, 2019). سطح استاندارد میزان کل بازهای نیتروژنی فرار به عنوان یکی از مهمترین شاخص‌های تشخیص تازگی ماهی، ۳۵-۳۰ میلی گرم برگرم تعیین شده است (Shahosseini *et al*, 2021). بر این اساس تیمار $L. casei$ + NC + PLA تا انتهای دوره نگهداری از محدوده مجاز برخوردار بود. نتایج مشابهی توسط Jafari *et al*. (2025) در مطالعه‌ای که تأثیر پوشش مرکب حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس بر مقادیر بازهای نیتروژنی فرار فیله فیل ماهی را بررسی کردند، گزارش شد. آن‌ها بیان کردند که پروتئین هیدرولیز شده به دلیل خاصیت ضد میکروبی قوی، توانست افزایش مقادیر بازهای نیتروژنی فرار را در فیل ماهی مهار کند. علاوه بر این، افزایش غلظت پروتئین هیدرولیز شده در پوشش، تأثیر مثبت و معنی‌داری بر کاهش روند تغییرات بازهای نیتروژنی فرار داشت. همچنین Salimirad *et al*. (2022) اعلام نمودند، فیلم‌های نانوسلولز-نانو کیتوزان-ژلاتین حاوی لاکتوباسیلوس کارئی و باسیلوس کوآگولانس روند افزایشی بازهای نیتروژنی فرار را نسبت به تیمار شاهد و فیلم خالص کندتر نمود.

بررسی مقادیر pH

در مطالعه حاضر روند تغییرات pH در ابتدای دوره کاهشی بود و سپس تا انتهای دوره روند افزایش مشاهده شد. کاهش ابتدایی در میزان pH ممکن است به علت فعالیت باکتری‌های اسید لاکتیک و اسیدی کردن محیط باشد. افزایش pH در طی دوره نگهداری را می‌توان به فعالیت آنزیم‌های اتولیتیک و باکتری‌های پروتئولیتیک فاسد کننده ماهی نسبت داد (Shakour *et al*, 2021). در انتهای دوره نگهداری مقادیر آن در تیمار شاهد بالاتر از سایر تیمارها بود و در روز ۱۶م مقادیر pH در تیمار شاهد برابر با ۷/۲۳ و برای تیمار PLA برابر با ۷/۰۶ و برای تیمار $NC + PLA$ برابر با ۶/۹۳ و برای تیمار $NC + PLA$ + لاکتوباسیلوس برابر با ۶/۷۹ بود، بر اساس نتایج استفاده از فیلم‌های پروبیوتیکی، فعالیت پروتئازهای درونی را کاهش می‌دهد که بدین ترتیب تولید بازهای نیتروژنی قرار مثل آمونیاک و تری متیل آمین حاصل از آنزیم‌های میکروبی یا درونی خود ماهی کاهش پیدا می‌کند (Yu *et al*, 2017; Yasin *et al*, 2020). حداکثر pH برای محصولات قابل مصرف ۷ عنوان شده است (Codex, 2003). بر این اساس تیمارهای $NC + PLA$ و $L. casei$ + NC + PLA تا انتهای دوره نگهداری از محدوده مجاز برخوردار بود. این نتایج با نتایج Alizadeh *et al*. (2019) در ارتباط با مقادیر pH ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و نتایج Yasin *et al*. (2020) در ارتباط با تأثیر فیلم آگار به همراه باکتری‌های پروبیوتیک، ساکارومیسس سرویزیه و لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس بر مقادیر pH فیله تیلاپیا هم خوانی دارد.

توسعه‌ی مداوم غذاهای فراسودمند، پاسخ علم و صنعت در برابر افزایش آگاهی مردم و مصرف‌کنندگان در مورد اثر سلامتی بخشی و نقش مواد غذایی در بهبود کیفیت زندگی می‌باشد. در این بین مواد غذایی حاوی پروبیوتیک مورد توجه واقع شده است. پروبیوتیک‌ها احتمالا نشان دهنده‌ی نمونه‌ی اولیه‌ی مواد غذایی فراسودمند هستند و به عنوان مکمل میکروبی زنده که اثرات سودمند بر روی تعادل فلور میکروبی میزبان دارند تعریف شده‌اند. باکتری‌های پروبیوتیک به شرطی قادرند اثرات مفید خود را بر سلامت مصرف‌کننده بگذارند که به تعداد (10^7 CFU/g) و زنده به روده بزرگ برسند. به همین دلیل از دغدغه‌های اصلی تولیدکنندگان این محصولات، زنده ماندن این باکتری‌ها طی زمان نگهداری محصول و همچنین بقای این پروبیوتیک‌ها در مواجهه با اسید معده و املاح قلیایی صفر در ابتدای روده باریک می‌باشد. طیف گسترده‌ای از عوامل مضر به دلیل پردازش مواد غذایی (تنش‌های اسمزی، مکانیکی و اسیدی) و ذخیره سازی (سطح اکسیژن، پراکسید هیدروژن و بخار آب) برای کاهش زنده ماندن پروبیوتیک‌ها یافت شده است. یکی از جدیدترین رویکردها برای بهبود بقای پروبیوتیک‌ها، افزودن آنها در فیلم‌های خوراکی است. همچنین امروزه استفاده از فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر به منظور افزایش زمان نگهداری مواد غذایی به دلیل رشد میکروبی بر سطح ماده غذایی و ایجاد فساد و کاهش کیفیت مورد توجه قرار گرفته است. ماهی و فرآورده‌های شیلاتی محیط مناسبی برای رشد میکروارگانیسم‌های پاتوژن و خطرناک برای انسان می‌باشند، از این رو ایمنی محصولات شیلاتی بسیار حائز اهمیت است. در مجموع در تحقیق حاضر به بررسی فساد اکسیداتیو فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان با استفاده از فیلم مرکب پلی لاکتیک اسید-نانوسلولز به همراه باکتری پروبیوتیک (لاکتو باسیلوس کازئی) پرداخته شد. بنابر نتایج حاصل از این تحقیق، استفاده از فیلم PLA-NC+L. casei بر بهبود فساد اکسیداتیو فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در زمان نگهداری در دمای یخچال اثر مثبت داشت و همچنین می‌تواند روشی مناسب جهت تولید ماهی پروبیوتیک نیز باشد.

References

1. **Abdulkhani, A., Hosseinzadeh, J., Ashori, A., Dadashi, S. and Takzare, Z., 2014.** Preparation and characterization of modified cellulose nanofibers reinforced polylactic acid nanocomposite. *Polymer Testing*, 35: 73-79.
2. **Alizadeh, S., Jafarpour, S.A., Yeganeh, S. and Safari, R., 2019.** Evaluation of the Effects of Edible Coating of Sodium Alginate and Whey Protein Containing *Lactic acid* Bacteria of *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus plantarum* Separately on Quality and Microbial Indices of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fillet. *Journal of Fisheries Science and Technology*, 8(3):145-154.
3. **Atallah, A. A., 2016.** The production of bio-yoghurt with probiotic bacteria, Royal jelly and Bee pollen grains. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 6 (3): 495-510.
4. **Aymerich, T., Rodríguez, M., Garriga, M. and Bover-Cid, S., 2019.** Assessment of the bioprotective potential of *lactic acid* bacteria against *Listeria monocytogenes* on vacuum-packed cold-smoked salmon stored at 8° C. *Food microbiology*, 83: 64-70.
5. **Bagheri, R., Izadi Amoli, R., Tabari Shahndash, N. and Shahosseini, S. R., 2016.** Comparing the effect of encapsulated and unencapsulated fennel extracts on the shelf life of minced common kilka (*Clupeonella cultriventris caspia*) and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in the mince. *Food science and nutrition*, 4(2): 216-222.
6. **Bahram, S., Rezaei, M. Soltani, M., Kamali, A., Abdollahi, M., Khezri Ahmadabad, M. and Nemati, M., 2016.** Effect of Whey Protein concentrate coating cinnamon oil on quality and shelf life of refrigerator beluga sturgeon (*Huso huso*). *Journal of Food Quality*, 39: 743-749.

7. Campo, M.M., Nute, G.R., Hughes, S.I., Enser, M., Wood, J.D. and Richardson, R.I., 2006. Flavour perception of oxidation in beef. *Meat Science*, 72: 303–311.
8. Codex., 2003. Code of practice for fish and fishery products (cac/rcp 52-2003).
9. Ebrahimi, B., Mohammadi, R., Rouhi, M., Mortazavian, A. M., Shojacee-Aliabadi, S. and Koushki, M. R., 2018. Survival of probiotic bacteria in carboxymethyl cellulose-based edible film and assessment of quality parameters. *LWT - Food Science and Technology*, 87: 54–60.
10. Erdohan, Z. Ö., Çam, B. and Turhan, K. N., 2013. Characterization of antimicrobial polylactic acid based films. *Journal of Food Engineering*, 119 (2): 308- 315.
11. Esmaili, M., Ariaei, P. Nasiraie, L.R. and Yousefpour. M., 2020. Comparison of coating and nano-coating of chitosan- *Lepidium sativum* seed gum composites on quality and shelf life of beef. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15: 341-352.
12. Espitia, P. J. P., Batista, R. A., Azeredo, H. M. C. and Otoni, C. G., 2016. Probiotics and their potential applications in active edible films and coatings. *Food Research International*, 90:42–52.
13. FAO., 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018-Meeting the sustainable development goals. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
14. Feng, T. and Wang. J., 2020. Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: a systematic review. *Gut Microbes*, 12:1-15.
15. Ghasemi, Z.H., Alizadeh Khaled-Abad, M., Almasi, H. and Nikoo, M., 2022. Carboxymethyl cellulose based bioactive edible films with *Lactobacillus casei* and fish protein hydrolysates. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 17 (6): 85-102.
16. Heydari-Majd, M., Ghanbarzadeh, B., Shahidi-Noghabi, M., Najafi, M. A. and Mohammadyar, H., 2019. A new active nanocomposite film based on PLA/ZnO nanoparticle/essential oils for the preservation of refrigerated *Otolithes ruber* fillets. *Food Packaging and Shelf Life*, 19: 94–103.
17. Jafari, K., Jafarian, S., Javadian, S.R., Mahdavi, S.K., Bahram, S., 2025. Edible coatings of chitosan and fucoidan with crucian carp protein hydrolysate to extend shelf life of beluga sturgeon fillets. *Heliyon*, 11 (4): e42296.
18. Javadian, S. R., Shahoseini, S. R. and Ariaei, P., 2017. The effects of liposomal encapsulated thyme extract on the quality of fish mince and *Escherichia coli* O157: H7 inhibition during refrigerated storage. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 26 (1): 115-123.
19. Jensen, A., Lim, L. T., Barbut, S. and Marcone, M., 2015. Development and characterization of soy protein films incorporated with cellulose fibers using a hot surface casting technique. *LWT-Food Science and Technology*, 60(1): 162-170.
20. Karami, N., Kamkar, A., Shahbazi, Y. and Misaghi, A., 2019. Edible films based on chitosan-flaxseed mucilage: in vitro antimicrobial and antioxidant properties and their application on survival of food-borne pathogenic bacteria in raw minced trout fillets. *Pharmaceutical and Biomedical Research*, 5 (2) :10-16.
21. Khanjani, M., Ariaei, P., Najafian, L., 2023. Investigating the effect of polylactic acid-nanocellulose composite film along with *Lactobacillus casei* on the quality and shelf life of

- beluga sturgeon (*Huso huso*) fillet. Journal of Food Measurement and Characterization, 17: 4161–4174.
22. Khorami, F., Babaei, S., Valizadeh, S., Naseri, M., Golmakani, M.T., 2024. Bilayer coatings for extension of the shelf life of fish fillets: Incorporating seaweed sulfated polysaccharides in chitosan-alginate LbL structures. Food Science & Nutrition, 12:2511–2522.
23. La Storia, A., Di Giuseppe, F. A., Volpe, S., Oliviero, V., Villani, F. and Torrieri, E., 2020. Physical properties and antimicrobial activity of bioactive film based on whey protein and *Lactobacillus curvatus* 54M16 producer of bacteriocins. Food Hydrocolloids, 10:59-72.
24. Mozaffarzogh, M., Misaghi, A., Shahbazi, Y. and Kamkar, A., 2020. Evaluation of probiotic carboxymethyl cellulose-sodium caseinate films and their application in extending shelf life quality of fresh trout fillets. LWT-Food Science and Technology, 126: 109-125.
25. Niu, Y., Liu, Y., Song, J., Han, H. and Pan, B., 2018. Rosin modified cellulose nanofiber as a reinforcing and co-antimicrobial agents in polylactic acid /chitosan composite film for food packaging. Carbohydrate Polymers, 183: 102–109.
26. Odila Pereira, J., Soares, S., Sousa, A.R., Madureira, A., Gomes, M., Pintado, K., 2016. Edible films as carrier for lactic acid bacteria. LWT - Food Sci. Technol, 73: 543–550.
27. Pavli, F., Tassou, C., Nychas, G. J. E. and Chorianopoulos, N., 2018. Probiotic incorporation in edible films and coatings: Bioactive solution for functional foods. International Journal of Molecular Sciences, 19:1–17.
28. Rezaeigolestani, M., Misaghi, A., Khanjari, A., Basti, A. A., Abdulkhani, A. and Fayazfar, S., 2017. Antimicrobial evaluation of novel poly-lactic acid based nanocomposites incorporated with bioactive compounds in-vitro and in refrigerated vacuum-packed cooked sausages. International Journal of Food Microbiology, 260: 1-10.
29. Salimiraad, S., Safaeian, S., Akhondzadeh Basti, A., Khanjari, A. and Mousavi Nadoushan, R., 2022. Characterization of novel probiotic nanocomposite films based on nano chitosan/ nano cellulose/ gelatin for the preservation of fresh chicken fillets. LWT - Food Science and Technology, 162 : 113-129.
30. Shahosseini, S.R., Safari, R. and Javadian, S.R., 2021. Evaluation antioxidant effects of Pullulan edible coating with watercress extract (*Nasturtium officinale*) on the chemical corruption of fresh beluga sturgeon fillet during storage in a refrigerator. Iranian Scientific Fisheries Journal, 30 (2): 123-146.
31. Shakour, N., Khoshkhoo, Z., Akhondzadeh Basti, A., Khanjari, A. and Mahasti Shotorbani, P., 2021. Investigating the properties of PLA-nanochitosan composite films containing Ziziphora Clinopodioides essential oil and their impacts on oxidative spoilage of *Oncorhynchus mykiss* fillets. Food Science & Nutrition, 21: 1–13.
32. Soukoulis, C., Behboudi-Jobbehdar, S., Yonekura, L., Parmenter, C. and Fisk, I. D., 2014a. Stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG in prebiotic edible films. Food Chemistry, 159: 302–308.

33. Soukoulis, C., Yonekura, L., Gan, H.H., Behboudi-Jobbekhdar, S., Parmenter, C. and Fisk, I., 2014b. Probiotic edible films as a new strategy for developing functional bakery products: The case of pan bread. *Food Hydrocolloids*, 39: 231-242.
34. Valipour Kootenaie, F., Ariaie, P., Khademi Shurmasti, D. and Nemati, M., 2017. Effect of chitosan edible coating enriched with eucalyptus essential oil and α -tocopherol on silver carp fillets quality during refrigerated storage. *Journal of Food Safety*, 37(1): 122-139.
35. Yanar, Y., 2007. Quality Changes of Hot Smoked Catfish (*Clarias Gariepinus*) During Refrigerated storage. *Journal of Muscle Foods*, 18: 391-400.
36. Yasin, R., Samiullah, K. and Fazal, R.M., 2020. Combined effect of probiotics on prolonging the shelf life of GIFT tilapia fillets. *Aquaculture Research*, 14:1-12.
37. Yu, D., Jiang, Q., Xu, Y. and Xia, W., 2017. The shelf life extension of refrigerated grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets by chitosan coating combined with glycerol monolaurate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101: 448-454.
38. Zabihollahi, N., Alizadeh, A., Almasi, H., Hanifian, S. and Hamishekar, H., 2020. Development and characterization of carboxymethyl cellulose based probiotic nanocomposite film containing cellulose nanofiber and inulin for chicken fillet shelf life extension. *International Journal of Biological Macromolecules*, 160: 409-417.