# اثر استفاده از فیلم‌های سدیم کازئینات حاوی باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی بر کنترل باکتری لیستریا منوسایتوژنز تلقیح شده در فیله ماهی فیتوفاگ

**سید مهدی اجاق[a*]، بهاره شعبانپور[b]، معظمه کردجزی[c]، اسماعیل عبداله زاده[d]، مریم قره ئی[e]**

[a] *دانشیار گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران*
[b] *استاد گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران*
[c] *استادیار گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران*
[d] *دانشجوی دکتری فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران*
[e] *کارشناسی ارشد فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران*

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۱۰/۱۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۳/۲۴



## چکیده

**مقدمه:** فیلم های خوراکی با پایه کازئین به دلیل کیفیت بالای تغذیه ای پتانسیل مناسب جهت محافظت از فرآورده های غـذایی را دارنـد. هدف از این تحقیق، تهیه فیلم سدیم کازئینات حاوی باکتری های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی و سـنجش فعالیـت بازدارندگی علیه لیستریا مونوسیتوژنز تلقیح شده به فیله ماهی فیتوفاگ می باشد.

**مواد و روش‌ها:** باکتری های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کـازئی درحالـت محلـول بـه فـیلم سـدیم کازئینـات قبـل از قالب‌گیری افزوده شدند و در انکوباتور ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک گردید. اثر فیلم حاوی باکتری ها در کنتـرل لیسـتریا مونوسیتوژنز و میزان pH ماهی پوشش داده شده با فیلم حاوی باکتری ها، طی ۹ روز در فواصل زمانی۹۶ ساعت و زنده مـانی بـاکتری هـا طی مدت ۱۲ روز در محیط کشت و فیله ماهی در فواصل زمانی ۹۶ سـاعت بررسـی شـدند. همچنـین اثـر بـاکتری‌هـای تلقـیح شـده بـر خصوصیات فیزیکی و مکانیکی فیلم نیز مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته ها:** زنده مانی باکتری های اسید لاکتیک در فیله طی زمان نگهداری افزایش یافت. هـر دو بـاکتری سـبب کـاهش تعـداد بـاکتری لیستریا نسبت به نمونه شاهد گردیدند. باکتری های اسید لاکتیک بر درصد حلالیت، رطوبت، شاخص L و اختلاف رنگی تـاثیر معنـی داری داشته، اما بر مقاومت کششی و درصد افزایش طول در لحظه پاره شدن، تاثیر معنی داری ایجاد نکردند.

**نتیجه گیری:** با توجه به فعالیت ضد میکروبی باکتری های مذکور، نتایج آزمون نشان می دهد کـه تلقـیح بـاکتری‌هـای LAB بـه فـیلم می‌تواند به عنوان یک ابزار مفید جهت کنترل پاتوژن های غذایی مطرح باشد.

***واژه‌های کلیدی:*** *باکتری‌های اسید لاکتیک، فیلم خوراکی، لیستریا منوسایتوژنز*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: mahdi_ojagh@yahoo.com

## مقدمه

آلودگی مواد غذایی با پاتوژن‌ها یکی از مهمترین دلایل بروز مسمومیت غذایی می‌باشد (Gram & Dalgaard, 2002). یکی از روش‌های نوین نگهداری غذا که به محیط زیست آسیبی نمی‌رساند، استفاده از تکنولوژی نگهداری زیستی می‌باشد. در حال حاضر باکتری‌های اسید لاکتیک و باکتریوسین‌های آن ها نقش مهمی در نگهداری زیستی مواد غذایی ایفا می‌کنند (Bondi *et al*., 2009). استفاده از فیلم‌ها و پوشش‌های زیستی می‌تواند سدی در برابر رطوبت، بخار آب، گازها و مواد محلول باشد و علاوه بر این ابزار مناسبی جهت افزودن طیف گسترده‌ای از مواد نگهدارنده نظیر: ترکیبات آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی، رنگ‌ها و سایر ترکیبات فعال باشند (Bourtoom & Chinnan, 2008).

باکتری‌های اسید لاکتیک به‌واسطه تولید متابولیت‌هایی با خاصیت آنتاگونیستی، نظیر اسید های آلی (استیک اسید، اسید لاکتیک، بنزوئیک اسید)، پراکسید هیدروژن، دی استیل، دی اکسید کربن و باکتریوسین قابلیت بالایی جهت استفاده در فیلم‌های غذایی دارند (Crandall *et al*., 2012; Cizeikiene *et al*., 2013). باکتری لیستریا منوسایتوژنز مهمترین عامل بیماری‌زای مواد غذایی است. این باکتری در محیط‌های مختلف یافت شده و قدرت تحمل سطوح بالایی از نمک و رشد در دمای یخچال را دارد (Crandall *et al*., 2012).

بررسی باکتری‌های تولید کننده باکتریوسین برای محافظت مواد غذایی از آلودگی لیستریا مونوسیتوژنز به عنوان کشت‌های محافظ زیستی، توسط Berjeaud (۲۰۰۷) صورت گرفت. لاکتوباسیلوس ساکی ۲۵۱۲ برای مهار رشد باکتری لیستریا در تکه‌های ژامبون پخته شده با استفاده از آزمون چالش مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش‌های کشت توسط لاکتوباسیلوس ساکی ۲۵۱۲و همچنین لاکتوباسیلوس کورواتوس ۲۷۱۱، مانع رشد لیستریا شد.

Chen و همکاران (۲۰۱۰) پوشش‌های ضد میکروبی موثر با نمک‌های آلی در کنترل لیستریا مونوسیتوژنز در فیله‌های سالمون دودی را مطالعه کردند. فرمولاسیون در مدل خانگی شامل سدیم لاکتات وسدیم دی استات و یکسری پوشش‌های خوراکی بود. آن‌ها گزارش کردند که پوشش آلژینات حاوی اسیدهای آلی تاثیر بیشتری بر بازدارندگی از رشد لیستریا مونویستوژنز داشت.

تاکنون مطالعه ای در خصوص فعالیت ضد لیستریایی فیلم حاوی باکتری‌های LAB در محصولات شیلاتی گزارش نشده است. در پژوهش حاضر اثر باکتری‌های اسیدلاکتیک نوع لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی در فیلم سدیم کازئینات علیه باکتری لیستریا منوسایتوژنز در محیط کشت و فیله ماهی فیتوفاگ در دمای یخچال بررسی گردید.

## مواد و روش ها

### - تهیه فیلم خوراکی سدیم کازئینات

در این بررسی ابتدا فیلم خوراکی سدیم کازئینات تهیه شد. بدین صورت که ۴ درصد نسبت وزنی/حجمی از پودر سدیم کازئینات در آب مقطر هموژن گردید سپس تا دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شد. در مرحله بعد در دستگاه هموژنایزر به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۰۰۰ قرار گرفت. میزان گلیسرول اضافه شده به فیلم و نسبت پروتئین به نرم کننده ۰/۴٪ بود. برای تهیه فیلم زیست فعال در پایان مرحله هواگیری، باکتری را به محلول فیلم به میزان $10^5$ cfu/ml تلقیح کردیم. برای این منظور ابتدا ۲۴ ساعت قبل از تهیه فیلم باکتری‌های اسید لاکتیک را به محیط BHI اتوکلاو شده تزریق و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در داخل انکوباتور قرار داده شد. سپس با دور ۶۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شده و با دستگاه اسپکتوفوتومتر در طول موج۶۰۰ نامومتر میزان جذب نوری (OD) بین ۰/۰۸-۰/۱ تنظیم شد. از این مایع جهت تلقیح به محلول فیلم استفاده شد در انتها محلول فیلم هموژن شده در قالب‌های مورد نظر ریخته و در انکوباتور۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک گردید (Arrieta *et al*., 2013).

### - اندازه‌گیری pH

۵ گرم از هر نمونه بافت هموژن شده به ۴۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه به کمک یک هموژنایزر مخلوط گردید، سپس pH نمونه‌ها با pH متر دیجیتالی اندازه‌گیری شد.

- **اندازه گیری خصوصیات فیزیکی فیلم‌ها**

سنجش میزان نفوذپذیری فیلم‌ها نسبت به بخار آب مطابق روش شماره E96 مصوب آ.اس.تی.ام صورت گرفت (ASTM, 2002). درون سلول‌های اندازه‌گیری نفوذپذیری آب ریخته و سپس سطح سلول بوسیله فیلم با استفاده از گریس پوشانده شد و سلول‌ها درون دسیکاتور حاوی سیلیکاژل قرار گرفتند. آب در دمای ۲۵درجه سانتیگراد، رطوبت ۱۰۰ ٪ ایجاد می‌کند. اختلاف رطوبت در دو سمت روکش در دمای ۲۵ درجه پاسکال اختلاف فشار بخاری معادل $۲/۳۳۷\times۱۰^{۳}$ ایجاد می کند. تغییرات وزن سلول‌ها طی زمان با استفاده از یک ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد. در تمام نمونه‌ها با رسم منحنی تغییرات وزن سلول نسبت به زمان، یک خط راست $R۲ <۰/۹۹$ حاصل شد. نرخ انتقال بخار آب بر حسب ( ۲- متر ۱- ثانیه گرم) معادل با شیب خطوط حاصله تقسیم بر سطح سلول (۰/۰۰۲۸۷ متر مربع) بود و از رابطه ۳ حاصل شد (ASTM, 2002).

رابطه ۳ سطح سلول/شیب خط= نرخ انتقال بخار آب

از ضرب نمودن نرخ انتقال بخار آب در ضخامت روکش‌ها و تقسیم آن بر اختلاف فشار موجود در دو سمت روکش میزان نفوذپذیری بخار آب به دست آمد و به صورت ۱- پاسکال ۱- متر ۱- ثانیه گرم ($g\ s^{-1}\ m^{-1}\ Pas^{-1}$) گزارش شد.

- **اندازه گیری خواص مکانیکی فیلم ها**

آزمایشات کشش با استفاده از دستگاه تست مکانیکال Instron universal (Model 200, HIWA, Iran) testing machine انجام گرفت. قبل از انجام آزمایش‌های کشش تمامی نمونه ها از نظر رطوبتی تعدیل گردیدند. فیلم‌ها به شکل مستطیل به ابعاد ۱۰× ۲/۵ سانتی‌متر مربع بریده شدند. فاصله بین دو فک دستگاه ۵ سانتیمتر و سرعت حرکت فک‌ها۵۰ میلی‌متر بر دقیقه انتخاب شد. فاکتورهایی شامل مقاومت کششی، درصد کرنش در نقطه شکست (تغییر طول نمونه تقسیم بر طول اولیه ضرب در ۱۰۰) مطابق روش شماره D882-01 مصوب از آ.اس.تی.ام روی منحنی‌های نیرو بر حسب تغییر شکل به دست آمدند (ASTM, 2002).

- **سنجش میزان حلالیت در آب**

وزن اولیه نمونه‌های فیلم (۴×۴) پس از خشک شدن در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد تعیین شد و سپس فیلم ها در ظروف حاوی ۵۰ سی‌سی آب مقطر قرار گرفتند. ظروف به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور شیکردار و در دمای ۲۸ درجه قرار داده شده و با سرعت ۲۰۰ دور دردقیقه تکان داده شدند. پس از این مدت نمونه‌ها بوسیله کاغذهای صافی که قبلا خشک شده بود فیلتر و مجدداً در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد خشک گردیدند. میزان حلالیت فیلم‌ها به کمک رابطه ۴ محاسبه گردید (Hosseini *et al*., 2009).

رابطه ۴

۱۰۰× وزن ماده خشک اولیه موجود در فیلم /( وزن فیلم خشک پس از غوطه‌وری- وزن ماده خشک اولیه)= درصد حلالیت

- **سنجش رنگ سطحی و شفافیت فیلم‌ها**

نمونه‌های فیلم به منظور سنجش رنگ روی کاشی استاندارد سفید رنگ قرار داده شد و سه فاکتور $a^*$، $b^*$ و $L^*$ نشان داده شده توسط دستگاه رنگ‌سنج یادداشت گردید. برای محاسبه اختلاف رنگ نمونه‌ها با پلیت سفید، داده‌های به دست آمده برای سه فاکتور فوق مربوط به مرجع و نیز سه فاکتور $a^*$، $b^*$ و $L^*$ مربوط به هر نمونه در رابطه قرار داده شد (Ojagh *et al*., 2010).

رابطه ۵

$$\text{اختلاف رنگ فیلم‌ها}=\sqrt{(L^*-L)^2+(a^*-a)^2+(b^*-b)^2}$$

به منظور سنجش میزان شفافیت فیلم ها و عبور نور نمونه های فیلم به ابعاد۴۰×۹ میلیمتر در درون سلول های اسپکتروفتومتری قرار گرفت و در طول موج های ۸۰۰- ۲۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسکن گردید. همچنین به منظور محاسبه میزان شفافیت فیلم ها از رابطه ۶ استفاده گردید.

رابطه ۶ ضخامت فیلم / میزان جذب در ۶۰۰ نانومتر = شفافیت فیلم

- **سنجش میزان رطوبت فیلم‌ها**

نمونه‌های فیلم با وزن مشخص درون پلیت‌های

شیشه‌ای که از قبل به تعادل رطوبتی رسیده و توزین شده بودند قرار گرفت. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد خشک گردید. نمونه همراه با پلیت پس از این مدت خارج شده و پس از سرد شدن در دسیکاتور مجدداً توزین گردید. محتوای رطوبت روکش‌ها بر پایه وزن مرطوب از رابطه ۷ محاسبه گردید (Ojagh *et al*., 2010).

رابطه ۷ وزن نمونه مرطوب /۱۰۰×وزن آب = درصد رطوبت بر مبنای وزن مرطوب

**- آماده سازی مایع تلقیح**

آمپول‌های لیوفیلیزه سویه‌های باکتریایی (لیستریامونوسیتوژنز ATCC19117، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس PTCC39392 و لاکتوباسیلوس کازئی DSM20079) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شد. پس از کشت باکتری در محیط براث (دمای ۳۷ درجه، BHI) به مدت زمان۲۰ساعت، شمارش تعداد باکتری‌ها با روش جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر پس از ۵ دقیقه سانتریفیوژ (۶۰۰۰ دور در دقیقه) و تایید نتایج، با کشت سطحی روی پلیت کانت آگار صورت گرفت (Fazlara *et al*., 2012; Ghanbari *et al*., 2011).

**- بررسی خصوصیات ضد لیستریایی فیلم‌های تولیدی و زنده مانی باکتری‌های اسید لاکتیک**

بررسی زنده‌مانی باکتری‌های اسیدلاکتیک در فیلم‌های زیست فعال به روش کونچامیر و همکاران، ۲۰۱۱ انجام گرفت (Concha-Meyer *et al*, 2011). جهت سنجش فعالیت ضد لیستریایی ابتدا باکتری لیستریا به صورت چمنی بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت شد (۱۰۰ میکرولیتر از استوک بر روی محیط کشت ترزیق گردید). به دنبال آن فیلم حاوی باکتری‌های اسیدوفیلوس و کازئی را هر کدام روی پلیت باکتری لیستریای کشت داده شده قرار داده و نمونه ها در دمای یخچال (۴ درجه سانتی گراد) برای مدت ۱۲ روز نگهداری شد. برای هر دوره زمانی ۳ روزه پلیت حاوی فیلم برداشته شده، و به همراه محیط کشت در سرم فیزیولوژی رقت‌های سریالی تهیه شد. تعداد باکتری‌های LAB با کشت سطحی ۰/۱ میلی متر و ۱ سی‌سی از رقت‌های مختلف در محیط‌کشت MRS agar و انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۶ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. تعداد باکتری های لیستریا نیز بر روی محیط اختصاصی پالکام مورد سنجش قرار گرفت. در آزمایش دیگر فیله ها در ابعاد ۱×۴× ۳ سانتی‌متر برش داده شدند و روی سطح فیله باکتری لیستریا با کشت چمنی تلقیح گردید، سپس فیلم‌های حاوی باکتری لیستریا روی سطح فیله قرار داه شد و فیله داخل پلیت‌ها با کیسه‌های غیر قابل نفوذ به هوا در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹ روز قرار گرفته و هر ۳ روز میزان زنده مانی باکتری با تهیه رقت سریالی از گوشت، فیلم و کشت سطحی روی محیط‌کشت MRS agar و انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۶ ساعت آزمایش شد.

**- تجزیه و تحلیل آماری**

تجزیه وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS صورت گرفت. برای این منظور ابتدا از نرمال بودن یا نبودن داده‌ها به وسیله آزمون کولموگروف- اسمیرنف اطمینان حاصل شد. جهت مقایسه ویژگی‌های فیلم و آزمون های میکروبی از تجزیه واریانس یکطرفه و آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ درصد استفاده گردید.

## یافته‌ها

نتایج بررسی زنده مانی باکتری‌های اسید لاکتیک در فیله ماهی فیتوفاگ نگهداری شده در یخچال در جدول ۱ آمده است.

همانطورکه درجدول بالا مشاهده می‌شود، جمعیت اولیه باکتری کازئی در فیله ماهی فیتوفاگ در روز صفر از $Logcfu/cm^2$ ۴/۵ به ۱۳/۰۴ در روز سوم افزایش یافت و سپس در روز ششم افزایش معنی‌داری داشت و در روز نهم کاهش محسوسی پیدا کرد. در روز صفر در تیمار اسیدوفیلوس جمعیت اولیه باکتری از $Logcfu/cm^2$ ۵/۷ به ۱۱/۰۱ افزایش داشته و در روز ششم و نهم نیز افزایش پیدا کرد.

نتایج بررسی آنتاگونیستی باکتری‌های اسید لاکتیک، علیه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در محیط کشت نگهداری شده در دمای یخچال در جدول ۲ قرار گرفته است.

همانطورکه در جدول ۲ مشاهده می شود در روز سوم تعداد باکتری لیستریا بین دو تیمار کازئی و اسیدوفیلوس با تیمار کنترل تفاوت داشت ولی معنی‌دار نبود. در روز ششم جمعیت لیستریا در هر سه تیمار به طور معنی‌داری با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشتند. در روز نهم جمعیت باکتری لیستریا در تیمار اسیدوفیلوس به طور معنی‌داری نسبت به جمعیت باکتری در تیمارهای کازئی و شاهد کمتر بود. جمعیت باکتری لیستریا در هر سه تیمار در روز ششم نگهداری در محیط کشت اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۲). در فیله ماهی فیتوفاگ در روز سوم در تیمارکازئی تعداد کمتری باکتری لیستریا نسبت به تیمارهای دیگر مشاهده شد.

نتایج بررسی آنتاگونیستی باکتری های اسید لاکتیک علیه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در فیله ماهی فیتوفاگ نگهداری شده در دمای یخچال در جدول ۳ می باشد.

همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود جمعیت باکتری لیستریا در روز سوم در تیمار کازئی به طور معنی‌داری کمتر از دو تیمار دیگر بود. همچنین در روز سوم نگهداری بین دو تیمار اسیدوفیلوس و شاهد اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، هرچند تعداد باکتری ها در تیمار شاهد بیشتر از تیمار اسیدوفیلوس است اما این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود. در روز ششم و نهم نگهداری اختلاف معنی‌داری بین تیمارها وجود نداشت.

**- تغییرات pH فیله ماهی**

همانطور که در جدول ۴ مشاهده می شود pH فیله ماهی فیتوفاگ در روز صفر در تمام تیمارها برابر ۷ بود. از روز صفر تا روز ششم در همه تیمارها مقدار pH کاهش پیدا کرد ولی معنی دار نبود. سپس در روز نهم در هر سه تیمار نسبت به روز سوم و ششم افزایش پیدا کرد. خواص مکانیکی و فیزیکی فیلم‌ها (درصد رطوبت، درصد حلالیت، نفوذپذیری به بخار آب) در جدول ۵ آمده است.

**جدول ۱- زنده مانی باکتری های لاکتوباسیلوس کازئی ولاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در تیمارهای مختلف طی نگهداری در فیله ماهی فیتوفاگ**

| نوع فیلم/ زمان | ۰ | ۳ | ٦ | ۹ | ۱۲ |
|---|---|---|---|---|---|
| کازئی | ۴/۵±۰/۱۰ c | ۱۳/۰۴±۲/۰۶ b | ۱۵/۶۵±۰/۱۷ a | ۱۵/۱۵±۰/۹۴ a | ۱۵/۳۵±۰/۵۴a |
| اسیدوفیلوس | ۵/۷±۰/۴۸ d | ۱۱/۰۱±۱/۲ c | ۱۴/۸۱±۱/۷۶ b | ۱۶/۳۱±۰/۷۷ a | ۱۶/۶۱±۰/۲۷a |

*حروف مختلف درهر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ( $p< ۰/۰۵$)

**جدول ۲- میانگین تغییرات لود باکتری لیستریا مونوسیتوژنز برای تیمارهای مختلف طی نگهداری در محیط کشت**

| نوع فیلم/زمان | ۰ | ۳ | ٦ | ۹ |
|---|---|---|---|---|
| شاهد | ۳/۳۸۵±۰/۶۵a | ۵/۲۵±۰/۴۵a | ۸/۱۹±۰/۱۱a | ۸/۹۵±۰/۷a |
| کازئی | ۳/۳۸۵±۰/۶۵a | ۴/۹۴±۰/۴۵a | ۶/۴۱±۰/۱۱ b | ۸/۸۷±۰/۷ a |
| اسیدوفیلوس | ۳/۳۸۵±۰/۶۵a | ۴/۴۷±۰/۴۵a | ۷/۴۸±۰/۱۲ c | ۷/۸۶±۰/۷b |

*حروف مختلف درهر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ( $p< ۰/۰۵$)

**جدول ۳- میانگین تغییرات لود باکتری لیستریا مونوسیتوژنز برای تیمارهای مختلف در فیله ماهی فیتوفاگ**

| نوع فیلم | ۰ | ۳ | ٦ | ۹ |
|---|---|---|---|---|
| شاهد | ۵/۵۶±۰/۰۴a | ۶/۲۱±۰/۲۸a | ۴/۷۱±۰/۸۱a | ۴/۴۸±۰/۷۵a |
| کازئی | ۵/۵۶±۰/۰۴a | ۴/۲۴±۱/۶۵b | ۵/۶۱±۰/۱۰a | ۵/۴۸±۰/۳۵a |
| اسیدوفیلوس | ۵/۲۹±۰/۰۴a | ۵/۸۴±۰/۱۳ab | ۵/۷۴±۰/۱۱ a | ۵/۶۶±۰/۲۸a |

*حروف مختلف در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ( $p< ۰/۰۵$)

**جدول ٤- pH فیله ماهی فیتوفاگ تلقیح شده با باکتری لیستریا و پوشانده شده با فیلم های مختلف**

| نوع فیلم/زمان | ۰ | ۳ | ٦ | ۹ |
|---|---|---|---|---|
| شاهد | ۷±۰/۰۰ a | ۶/۴۰۰±۰/۰۸۵۳a | ۶/۲۸۵±۰/۲۴۶a | ۶/۹۶۵±۰/۲۵۹a |
| کازئی | ۷±۰/۰۰ a | ۶/۳۹±۰/۰۸۵۳a | ۶/۱۸±۰/۲۴۶ a | ۷/۰۶±۰/۲۵۹ a |
| اسیدوفیلوس | ۷±۰/۰۰ a | ۶/۳۱۵±۰/ ۰۸۵۳a | ۶/۱۳۵±۰/۲۴۶a | ۶/۴۳۰±۰/۲۵۹a |

* حروف مختلف در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ( p< ۰/۰۵)

**جدول ٥- خواص فیزیکی و مکانیکی فیلم سدیم کازئینات**

| نوع فیلم | ضخامت (میلی متر) | رطوبت (درصد) | حلالیت (درصد) | نفوذپذیری به بخار آب | مقاومت کششی (مگا پاسکال) | افزایش طول (درصد) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| شاهد | ۰/۱۰۷±۰/۰۰۶۴۵ a | ۳۳/۷۴±۱/۱۵۶ a | ۴۸/۰۶۱۲±۱/۳۰۵ a | ۲/۰۵۹±۰/۱۱ a | ۲/۵۷±۰/۴۹ a | ۲۰۱/۴۴±۲۲/۴۲ a |
| کازئی | ۰/۱۲۱±۰/۰۰۶۴۵ ab | ۳۲/۳۹±۰/۶۵ ab | ۲۹/۵۸±۴/۸۳ b | ۲/۰۷۶±۰/۴۸۳ a | ۲/۱۲±۰/۰۵ ab | ۱۵۳/۸۰±۲۱/۹۶ b |
| اسیدوفیلوس | ۰/۱۲۶±۰/۰۰۶۴۵ ab | ۳۱/۰۶۳±۱/۱۵۲ b | ۳۴/۰۲۵±۴/۷۴ b | ۱/۶۵±۰/۱۶۲ a | ۱/۹۶±۰/۱۸ a | ۱۲۹/۷۵±۱۶/۳۹ b |

* حروف مختلف در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ( p< ۰/۰۵)

درصد رطوبت و درصد حلالیت فیلم شاهد از فیلم‌های زیستی بیشتر و اختلاف معنی‌داری داشتند، ولی بین فیلم‌های حاوی کازئی و اسیدوفیلوس اختلاف معنی‌داری دیده نشد. میزان نفوذپذیری به بخار آب در سه تیمار با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نداشتند و در فیلم اسیدوفیلوس میزان نفوذپذیری کمتر از دو تیمار بود. نتایج نشان می‌دهد که مقاومت کششی بین فیلم شاهد و فیلم حاوی باکتری کازئی اختلاف معنی‌داری داشت. درصد افزایش طول در لحظه پاره شدن بین دو فیلم حاوی باکتری اختلاف معنی‌داری نداشت ولی بین شاهد و دو فیلم حاوی باکتری اختلاف معنی‌داری وجود داشت. درصد رطوبت و حلالیت فیلم سدیم کازئینات با افزودن باکتری‌های اسیدلاکتیک تغییرکرد.

رنگ سطحی، نفوذپذیری نسبت به نور و شفافیت فیلم‌ها در جدول ۶ قرار گرفته است.

با توجه به جدول ۶، در حالت کلی فیلم‌های تولیدی ظاهری زرد رنگ و نیمه شفاف داشتند. شاخص $L^*$ یا روشنی فیلم سدیم کازئینات شاهد در مقایسه با فیلم‌های گنجانده شده با باکتری کازئی و اسیدوفیلوس اختلاف معنی‌داری داشت. افزودن باکتری‌های اسیدلاکتیک در پارامترهای $a^*$ و $b^*$ تغییری ایجاد نکرد. همچنین، اثر افزودن باکتری بر اختلاف رنگی فیلم معنی‌دار بود. نفوذپذیری فیلم‌های تولیدی نسبت به نور در طول موج‌های بین ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر در نمودار ۱ و همچنین شفافیت فیلم‌ها در جدول ۷ نشان داده شده است. افزودن باکتری کازئی موجب افزایش نفوذپذیری فیلم سدیم کازئینات در طول موج‌های بین ۴۰۰- ۳۰۰ نانومتر گردید. از لحاظ میزان شفافیت در بین فیلم‌های مختلف اختلاف معنی داری وجود ندارد.

## بحث

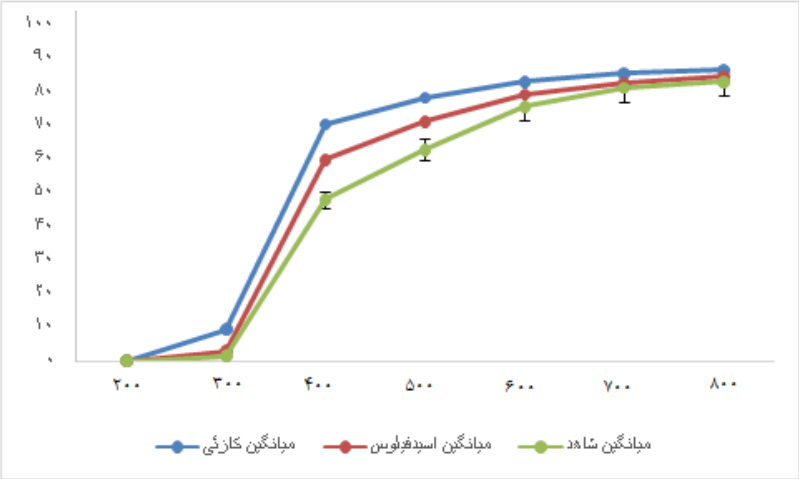
لیستریوزیس بیماری است که بوسیله باکتری لیستریا مونوسیتوژنز ایجاد می شود و موجب نرخ مرگ و میر بالایی در افرادی که دچار ضعف ایمنی هستند، می شود. همچنین این بیماری موجب سقط جنین و یا تولد زودرس در زنان باردار می‌شود (Crandall *et al*., 2012).

با توجه به فعالیت ضد میکروبی باکتری های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی در فیلم سدیم کازئینات، نتایج آزمون اشاره بر زنده مانی باکتری‌ها در طی مدت نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد داشت و بازدارندگی قابل ملاحظه‌ی بر باکتری لیستریا در محیط کشت مشاهده شد. همچنین، باکتری‌های اسید لاکتیک بر پارامترهای a و b و نفوذ پذیری به بخار آب، شفافیت و مقاومت کششی تغییری ایجاد نکردند، ولی بر روی پارامترهای مثل $L^*$، اختلاف رنگی، درصد حلالیت و درصد رطوبت تاثیر گذار بودند. جهت افزایش فعالیت ضد باکتریایی فیلم های زیست تخریب پذیر، ضروریست که شرایط را به نحوی تغییر داد که بیشترین تولید باکتریوسین در فیلم های تولیدی رخ دهد.

**جدول ٦- ویژگی‌های رنگ سطحی فیلم ها**

| نوع فیلم | $L^*$ | $a^*$ | $b^*$ | ΔE | abc |
|---|---|---|---|---|---|
| شاهد | ۷۸/۳۶ ±۲/۲۱ $^{b}$ | ۴/۳۸ ±۰/۷۳ $^{a}$ | ۲/۰۶ ±۰/۶۸ $^{a}$ | ۱۶/۹۲ ±۲/۳۵ $^{a}$ | ۰/۷۸۶±۰/۰۱ $^{a}$ |
| کازئی | ۸۱/۵۲ ±۰/۸۲ $^{a}$ | ۳/۹ ±۰/۵۷ $^{a}$ | ۱/۹۲ ±۰/۴۴ $^{a}$ | ۱۳/۷۵ ±۰/۸۷ $^{b}$ | ۰/۷۹±۰/ ۱۱ $^{a}$ |
| اسیدوفیلوس | ۷۹/۸۴ ±۱/۳۱ $^{ab}$ | ۳/۹ ±۰/۵۷ $^{a}$ | ۱/۵۸ ±۱/۳۴ $^{a}$ | ۱۵/۳۸ ±۱/۲۶ $^{ab}$ | ۰/۷۶±۰/۳۸ $^{a}$ |

حروف کوچک در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ( $p<$ ۰/۰۵)




**نمودار ۱- میزان عبور نور در فیلم‌های سدیم کازئینات حاوی باکتری های اسیدلاکتیک**

مطابق با جدول ۱، زنده‌مانی باکتری‌های اسیدلاکتیک نسبت به روز اول افزایش پیدا کرد. در مطالعه Concha-Meyer و همکاران (۲۰۱۱)، در نمونه‌های گوشت، سطح اولیه باکتری‌های اسید لاکتیک در فیلم $10^{6}$ log cfu/cm بود و در طول نگهداری به $10^{7}$ افزایش یافت. López de Lacey و همکاران (۲۰۱۲) گزارش نمودند که زنده مانی باکتری بیفیدرو باکتریوم در فیلم ژلاتین با اعمال فشار بالا در ماهی هیک، در پایان نگهداری تا کمتر از ۲ سیکل لگاریتمی کاهش یافت.

در نتایج Crandall و همکاران (۲۰۱۲)، باکتری‌های اسید لاکتیک قادر بودند تعداد باکتری‌های لیستریا مونوسیتونژ تلقیح شده به سوسیس (فاقد لاکتات/دی استات) را بعد از ۸ هفته نگهداری در یخچال کاهش دهند (۰/۶ لوگ کاهش در مقایسه با شاهد که فقط لیستریا بود) و زمانی که عصاره خارج سلولی باکتری‌های اسید لاکتیک به باکتری‌های اسید لاکتیک اضافه شدند حتی بازدارندگی بیشتری مشاهده گردید (۱/۲ لوگ کاهش در مقایسه با شاهد که فقط لیستریا بود). در سوسیس‌های حاوی لاکتات/دی استات و باکتری‌های اسیدلاکتیک به همراه عصاره خارج سلولی تاثیر بیشتری در کاهش لیستریا در ۸ هفته نگهداری در دمای یخچال مشاهده شد (به ترتیب ۲ و۳/۳ لوگ کاهش داشت). تفاوت آماری معنی‌داری بین نتایج لاکتات/دی استات برای باکتری‌های اسیدلاکتیک و عصاره خارج سلولی مشاهده نشد. در بررسی Berjeaud (۲۰۰۷)، در تکه‌های ژامبون پخته شده باکتری لاکتوباسیلوس ساکی۲۵۱۲، توانست رشد باکتری لیستریا را مهار کند. در ادامه آزمایش، کشت در محیط BHI 5L200 نشان داد که رشد لیستریا توسط *L. sakei* 2512 و همچنین *L. curvatus* 2711 باز داشته شد و *L. innocua* 8811 توسط L. sakei 2512 از ۶ تا ۶۰ روز مهار شد. L. sakei 2512 نماینده خوبی به عنوان کشت محافظ زیستی در جلوگیری از لیستریا در آلودگی‌های گوشت پس از تولید می باشد. آلودگی‌های قارچی یکی از مهمترین ضررهای اقتصادی در سرتاسر جهان در صنعت غذا و کشاورزی است. در مطالعه Rollán و همکاران (۲۰۱۳)، ۹۱ سویه باکتری اسید لاکتیک از

منابع مختلف برای بررسی فعالیت ضد قارچی جدا شدند. از کل باکتری های اسید لاکتیک،۱۰ سویه با اثر بازدارندگی بالا (۸۰٪) بر همه سویه های قارچ انتخاب شدند. این ۱۰ سویه فعالیت ضد قارچی علیه تمام قارچ های فاسد کننده را نشان دادند که فعالیت بازدارندگی آن ها مربوط به اسیدهای آلی و پپتید های ضد قارچی می باشد.

در مطالعه Tsakalidou و همکاران (۲۰۰۹)، ۶۳۵ سویه باکتری اسید لاکتیک با منشا غذایی برای کاربرد بالقوه به عنوان کشت محافظ در مرغ را بررسی کردند. دو سویه از آن ها در شرایط آزمایشگاهی علیه باکتری های گرم مثبت شاخص، به طور عمده لیستریا و گونه بروکوتریکس مشهود بودند، در حالی که هیچ فعالیت ضد باکتری علیه باکتری های گرم منفی آزمایش شده مشاهده نگردید. سویه های انتروکوکوس فاسیئوم PCD71، لاکتوباسیلوس فرمنتئوم ACA-DC179 انتخاب شده و در گوشت جوجه خام به عنوان کشت محافظ علیه لیستریا و سالمونلا به کاربرده شدند. کاهش رشد معنی داری برای این باکتری های پاتوژن مشاهده شد که بیشتر روی سالمونلا مشهود بود.

در مطالعه Bondi و همکاران (۲۰۰۹)، توانایی بقا و تکثیر لیستریا مونوسیتوژنز NCTC10888 در فیلم زیستی حاوی باکتری اسید لاکتیک حتی با تفاوت در بین سویه باکتری‌های اسید لاکتیک گزارش شد. لاکتوباسیل پلانتارئوم d۳۵ بیشترین اثر در کاهش لیستریا در پایان مدت آزمایش (۱۰روز) در مقایسه با شاهد نشان داد. توانایی کاهش لیستریا در طول دو روز اول انکوباسیون ۱/۳ لوگ بود. این واقعیت مرتبط با تولید باکتریوسین می باشد. اگرچه کاهش پاتوژن در سلول ها در پایان مدت آزمایش مشاهده شد و این نتیجه به کاهش pH (به مقدار ۵/۱) به دلیل تولید اسیدهای آلی توسط لاکتوباسیل ها و رقابت غذایی نسبت داده شد.

در مطالعه Chiralt و همکاران (۲۰۱۳)، فعالیت ضدمیکروبی قابل توجهی علیه لیستریا اینکوا در فیلم های پلی ساکاریدی مشاهده شد، در صورتی که در فیلم های پروتئینی مشاهده نگردید. فیلم آلژینات گنجانده شده با دو سویه از باکتری اسید لاکتیک و نایسین در بسته بندی سالمون دودی، اثر بازدارندگی طی مدت ۲۸ روز نشان داد.

Cizeikiene و همکاران (۲۰۱۳)، نشان دادند در محیط‌کشت آگار، باکتری‌های اسید لاکتیک از رشد باکتری‌های پاتوژن مثل باسیلوس، سودوموناس، لیستریا و اشرشیا جلوگیری کردند. سه سویه از این باکتری‌ها روی نان اسپری شده و در بسته‌های پلی اتیلن نگهداری گشتند، نتایج نشان داد این باکتری‌ها از رشد قارچ ها تا ۸ روز جلوگیری کردند.

pH می تواند تحت تأثیر عوامل مختلفی مانند گونه، ناحیه صید، تغذیه ماهی، دما و شرایط نگهداری باشد (Pacheco-Aguilar *et al*., 2000). تغییرات مقادیر pH در تیمارها در مدت نگهداری در یخچال در جدول ۴ نشان داده شده است. در ابتدای دوره مقدار pH تیمارها ۷ بود که در میانه دوره کاهش و در انتهای دوره افزایش داشت که با مشاهدات Manju و همکاران (۲۰۰۷) و Fan و همکاران (۲۰۰۹) مشابه بود. کاهش اولیه ممکن است به این دلیل باشد که پس از مرگ ماهی گلیکوژن موجود در داخل سلول ها در شرایط بی هوازی شکسته شده و اسید لاکتیک تولید می گردد که باعث کاهش اسیدیته عضلات می شود، دلیل افزایش آن می‌تواند تولید ترکیبات فرار ناشی از فعالیت باکتری ها مانند آمونیاک و تری متیل آمین باشد. البته این تغییرات می تواند باعث صدمه به ساختار پروتئینی محصول و کاهش میزان آب موجود در آن شود (Fan *et al*., 2009). اما از آنجا که تغییرات pH معنی دار نبود، احتمال چنین صدمه‌ای در تحقیق حاضر خیلی ضعیف می باشد.

حلالیت یک ویژگی مهم در فیلم‌های زیست تخریب پذیر است زیرا می‌تواند میزان مقاومت فیلم نسبت به آب، مخصوصا در محیط‌های حاوی رطوبت مثل مواد غذایی گوشتی (Siripatrawan *et al*., 2010; Bourtoom & Chinnan, 2008) و همچنین سرعت آزاد شدن ترکیبات ضد اکسیداسیونی و ضد میکروبی فیلم را زمانی که در تماس با سطح ماده‌ی غذایی است، تعیین کند (Gómez-Estaca *et al*., 2010).

نفوذپذیری فیلم های بیوپلیمری بستگی به فاکتورهای زیادی دارد، از جمله ضریب حلالیت، یکپارچگی ماتریس فیلم، آب گریزی، میزان انتشار، نسبت بین کریستال و مناطق بی شکل، ضخامت، تحرک زنجیره پلیمری و تعامل

گروه‌های عملکردی از پلیمرها دارد. در تحقیق حاضر، باکتری‌های اسید لاکتیک تفاوت معنی داری بر نفوذپذیری فیلم سدیم کازئینات نداشتند که مطابق با نتایج Concha-Meyer و همکاران (۲۰۱۰) می‌باشد. در مطالعه Kanmani و Taik Lim (۲۰۱۳)، افزودن سلول‌های پروبیوتیک در فیلم‌های پولان منجر به کاهش نفوذپذیری به بخار آب گردید. سلول‌های پروبیوتیک در فیلم‌های حاوی نشاسته بر نفوذپذیری به بخار آب فیلم ها اثرگذار بودند. پروبیوتیک‌ها در ماتریس فیلم به عنوان ذرات ناپیوسته، مانع از حرکت زنجیرهای پلیمری می‌شوند. در مطالعه Rezvani و همکاران (۲۰۱۳)، افزودن گلیسیرین در فیلم سدیم کازئینات، مقدار نفوذپذیری به بخار آب را افزایش داد که به دلیل افزایش فضای خالی برای حرکت زنجیره، کاهش انعطاف پذیری و افزایش حرکت مولکول‌ها در فیلم می‌باشد. در این تحقیق، افزودن باکتری بر مقاومت کششی تغییری ایجاد نکرد ولی بر درصد افزایش طول تاثیر داشت. در مطالعه Kanmani و Taik Lim (۲۰۱۳)، افزودن سلول‌های پروبیوتیک در فیلم‌های پولان خالص منجر به کاهش معنی‌داری در مقاومت کششی شد. این نتایج مغایر است با نتایج Gialamas و همکاران (۲۰۱۰) که در آن افزودن سلول های باکتریایی به فیلم های سدیم کازئینات با نرم‌کنندگی سوربیتول، هیچ تاثیری بر خصوصیات مکانیکی فیلم نداشت.

## نتیجه‌گیری

یکی از عوامل مهم اثرگذار بر ظاهر کلی محصول و پذیرش مصرف‌کنندگان، رنگ بسته‌بندی می‌باشد (Bourtoom & Chinnan, 2008). رنگ فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر اهمیت زیادی در کاربرد آن‌ها در صنعت بسته‌بندی دارد و یکی از عوامل مهم در تعیین کیفیت فیلم تهیه شده به شمار می‌آید (Almasi et al, 2010). در این تحقیق، باکتری های اسید لاکتیک، شاخص $L^*$ و اختلاف رنگی را تحت تاثیر قرار دادند، ولی افزودن باکتری تغییری در پارامترهای a و b نداشت. افزودن باکتری بر شفافیت فیلم سدیم کازئینات تاثیری نداشت.

## منابع


Almasi, H., Ghanbarzadeh, B. & Entezami, A. A. (2010). Physicochemical properties of starch–CMC–nanoclay biodegradable films. International Journal of Biological Macromolecules, 46, 1-5.

Arrieta, M. P., Peltzer, M. A., Garrigós, M. D. C. & Jiménez, A. (2013). Structure and mechanical properties of sodium and calcium caseinate edible active films with carvacrol. Journal of Food Engineering, 114, 486–494.

ASTM. (2002). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Annual book of ASTM Standards. Designation D882-02. Philadelphia: American Society for Testing Materials.

Berjeaud, J. M. (2007). Characterization of new bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated using a medium designed to simulate inhibition of Listeria by Lactobacillus sakei 2512 on meat. International Journal of Food Microbiology, 113, 67-74.

Bondi, M., Anacarso, I., Iseppi, R., Sabia, C., Messi, P., Niederhäusern, S. D. & Guerrieri, E. (2009). Use of lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of Listeria monocytogenesin a small-scale model. Food Control, 20, 861–865.

Bourtoom, T. & Chinnan, M. S. (2008). Preparation and properties of rice starch-chitosan blend biodegradable film. LWT-Food Science and Technology, 41, 1633-1641.

Chen, H., Neetoo, H. & Juck, G. (2010). Application of an active alginate coating to control the growth of Listeria monocytogenes on poached and deli turkey products. International Journal of Food Microbiology, 142, 302-308.

Chiralt, A., Iván Quintero Saavedra, J. & Sánchez-González, L. (2013). Physical properties and antilisterial activity of bioactive edible films containing Lactobacillus plantarum. Food Hydrocolloids, 33, 92-98.

Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., Paskevicius, A. & Bartkiene, E. (2013). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. Food Control, 31, 539-545.

Concha-Meyer, A., Schöbitz, R., Brito, C. & Fuentes, R. (2011). Lactic acid bacteria in an alginate film inhibit Listeria monocytogenes growth on smoked salmon. Food Control, 22, 485-489.

Crandall, P. G., Ricke, S. C., O'Bryan, C. A., Eggleton, M. & Koo, O. K. (2012). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria

against Listeria monocytogenes on frankfurters formulated with and without lactate/diacetate. Meat Science, 92: 533–537.

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

Fazlara, A., Sadeghi, A. & Rostami Soleimani, P. (2012). Study of antimicrobial effect of cumin oil on the Listeria monocytogenes bacteria in Iranian white cheese. Journal of Food Science, 35, 35-44.

Ghanbari, M., Rezaei, M., Soltani, M. & Shahhosseini, Gh. (2011). Effect of Lactobacillus casei inoculationa, as a biological preservatives on chemical and biological quality of smoked Rutilus frisiikutum product. Journal of Food Science, 33, 27-34.

Gialamas, H., Zinoviadou, K. G., Biliaderis, C. G. & Koutsoumanis, K. P. (2010). Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of Lactobacillus sakei into sodium-caseinate films for controlling Listeria monocytogenes in foods. Food Research International, 43, 2402-2408.

Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., López-Caballero, M., Gómez-Guillén, M. & Montero, P. (2010). Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. Food microbiology, 27, 889-896.

Gram, L. & Dalgaard, P. (2002). Fish spoilage bacteria- problems and solutions. Current Opinion in Biotechnology, 13, 262-266.

Hosseini, M. H., Razavi, S. H. & Mousavi, M. A. (2009). Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils. Journal of Food Processing and Preservation, 33, 727-743.

Kanmani, P. & Taik Lim, S. (2013). Development and characterization of novel probiotic-residing pullulan/starch edible films. Food Chemistry, 141, 1041-1049.

López de Lacey, A., López Caballero, M. E., Gómez Estaca, J., Gómez Guillén, M. C. & Montero García, P. (2012). Functionality of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum incorporated to edible coatings and films. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 16, 277-282.

Manju, S., Leema, J., Srinivasa Gopal, T. K., Ravishankar, C. N. & Jose, L. (2007). Effects of sodium acetate dip treatment and vacuum-packaging on chemical, microbiological, textural and sensory changes of Pearlspot (Etroplus suratensis) during chill storage. Food Chem, 102, 27- 32.

Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H. & Hosseini, S. M. H. (2010). Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. Food Chemistry, 122, 161-166.

Pacheco-Aguilar, R., Lugo-Sanchez, M. E. & Robles-Burgueno, M. R. (2000). Postmortem biochemical and functional characteristic of Monterey sardine muscle stored at 0 °C. Journal of Food Science, 65, 40–47.

Rezvani, E., Schleining, G., Sümen, G. & Taherian, A. R. (2013). Assessment of physical and mechanical properties of sodium caseinate and stearic acid based film-forming emulsions and edible films. Journal of Food Engineering, 116, 598–605.

Rollán, G., Fontde Valdez, G., Torres, M. J. & Gerez, C. L. (2013). Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. Biological Control, 64, 231-237.

Siripatrawan, U. & Harte, B. R. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. Food Hydrocolloids, 24, 770-775.

Tsakalidou, E. (2009). Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against Listeria monocytogenes and Salmonella enteritidis. International Journal of Food Microbiology, 130, 219-226.