دوره شانزدهم ـ شماره ۳ ـ پاییز ۱۳۹۹
DOI: 10.22055/ivj.2019.173120.2121

# مطالعه‌ی اثر افزودن کامپوزیت‌های زئولیت/کیتوزان و زئولیت/نانوکیتوزان به جیره‌ی غذائی ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بر کیفیت فیله در شرایط انجماد

پرویز حسن‌زاده[۱*]، افروز اولادی[۲]، نجمه شیخ‌زاده[۳]، رزاق محمودی[۴]، علی خانی‌اوشانی[۵] و شلاله موسوی[۱]

[۱] استادیار گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
[۲] دانش‌آموخته‌ی دکترای عمومی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
[۳] دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
[۴] استاد مرکز تحقیقات میکروبیولوژی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
[۵] دانش‌آموخته‌ی دکترای شیلات، دانشکده شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۶ تاریخ پذیرش: ۹۸/۷/۱۳

## چکیده

در سال‌های اخیر استفاده از مواد طبیعی به شکل نانوذرات در جیره‌ی غذایی آبزیان با هدف افزایش رشد و تأثیرات ایمنی و افزایش مقاومت در برابر بیماری‌ها و بهبود کیفیت فیله متداول گشته است. در این مطالعه نیز برای نخستین بار تأثیر کامپوزیت زئولیت/کیتوزان و زئولیت/نانوکیتوزان در جیره‌ی ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان بر کیفیت فیله مدنظر قرار گرفت. بدین منظور، شش گروه خوراک حاوی کامپوزیت‌های زئولیت/نانوکیتوزان و زئولیت/کیتوزان به صورت زیر تهیه شد: گروه کنترل (فاقد هر گونه افزودنی)، گروه Z (۱۴/۲۸ گرم در کیلوگرم زئولیت)، گروه Ch0/5% (۰/۵ گرم در کیلوگرم کیتوزان بارگذاری شده در ۱۴/۲۸ گرم در کیلوگرم زئولیت)، گروه Ch5% (۵ گرم در کیلوگرم کیتوزان بارگذاری شده در ۱۴/۲۸ گرم در کیلوگرم زئولیت)، گروه NCh0/5% (۰/۵ گرم در کیلوگرم نانوکیتوزان بارگذاری شده در ۱۴/۲۸ گرم در کیلوگرم زئولیت) و گروه NCh5% (۵ گرم در کیلوگرم کیتوزان بارگذاری شده در ۱۴/۲۸ گرم در کیلوگرم زئولیت). خوراک‌های تهیه شده به مدت ۶۰ روز به ماهی‌های با میانگین وزن ۵۰ گرم، خورانده شدند. در روز ۶۰، ماهی‌ها وزن کشی شده و فاکتورهای رشد مورد بررسی قرار گرفتند. سپس پارامترهای میکروبی و شیمیایی طی دوره‌ی سه ماهه و در دمای نگهداری انجماد ۱۸- درجه‌ی سانتی‌گراد در فیله هر ماهی مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد که کارایی رشد در تمام گروه‌های تیمار بهبود یافت اما رشد باکتریایی تغییری نیافت. محصول پراکسیداسیون لیپیدی و شاخص پراکسید در فیله‌های مربوط به گروه NCh5% نیز به طور معنی‌داری کاهش یافت. این مطالعه نشان داد که افزودن کامپوزیت زئولیت/نانوکیتوزان به میزان ۵ گرم در کیلوگرم خوراک قادر به بهبود کیفیت فیله از نظر خصوصیات شیمیایی می‌باشد.

**کلمات کلیدی:** قزل‌آلای‌رنگین‌کمان، فیله، کامپوزیت، زئولیت، نانوکیتوزان

*نویسنده مسئول : پرویز حسن‌زاده، استادیار گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز

E-mail: hassanzadeh@tabrizu.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

**مقدمه**

با توجه به اهمیت ماهی در جیره‌ی غذایی انسان و از طرفی فسادپذیری بالای آن، نیاز به روش‌های مناسب جهت افزایش ماندگاری فیله‌ی ماهی می‌باشد (Suprayitno, 2018). از روش‌های معمول در ذخیره‌سازی طولانی مدت ماهی می‌توان به انجماد، کنسروکردن، دودی کردن و نمک سودکردن اشاره نمود. پوشش‌دهی فیله‌ی ماهی با برخی ترکیبات طبیعی نیز در سال‌های اخیر مدنظر قرار گرفته است. استفاده از ترکیبات طبیعی در جیره‌ی پرورش ماهی نیز می‌تواند در افزایش کیفیت فیله‌ی ماهی مؤثر باشد (Fan et al, 2009).

زئولیت‌ها چهارچوب‌های آلومینوسیلیکاتی هستند که بر مبنای یک شبکه‌ی سه بعدی بی‌نهایت وسیع از چهار ضلعی‌های ALO4 و SiO4 که به وسیله‌ی اشتراک تمام اکسیژن‌هایشان به یکدیگر متصل هستند، ساخته شده‌اند. زئولیت‌ها قادر به جذب ۳۰ درصدی گازهایی مانند نیتروژن و آمونیاک نسبت به وزن خشک خود بوده و همچنین تا ۷۰ درصد آب را نیز جذب می‌نمایند. شواهدی از اثرات زئولیت‌ها در بهبود رشد، تقویت سیستم ایمنی، تحریک اشتها و افزایش هضم مواد غذایی و کاهش اثرات توکسیک آفلاتوکسین‌ها و کاهش رشد میکروب‌ها وجود دارد (Khodanazary et al, 2013). در زمینه‌ی اثرات زئولیت بر رشد در گونه‌های مختلف ماهی نیز مطالعات زیادی وجود دارد. به عنوان مثال، Paritova و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که جیره‌ی مکمل شده با زئولیت اثرات مثبتی بر ترکیبات شیمیایی و خصوصیات فیزیکی و بیوشیمیایی گوشت قزل‌آلای‌رنگین‌کمان دارد.

کیتوزان یک پلیمر پلی‌ساکاریدی کاتیونی است که در اثر استیل‌زدائی کیتین حاصل از پوسته‌ی سخت‌پوستانی مانند خرچنگ‌ها و میگو، حشرات، دیواره‌ی سلولی قارچ‌ها و مخمرها با روش‌های شیمیایی و آنزیمی و میکروبیولوژیکی تهیه می‌شود (Paul & Sharmila Jesline, 2013). تأخیر در رشد میکروبی، جلوگیری از کاهش وزن محصول، جلوگیری از رشد قارچی، حفظ رطوبت محصول و حفظ خواص ارگانولپتیکی از مزایای استفاده از کیتوزان در صنایع غذایی می‌باشد (Shahidi & Abuzaytoun, 2005). از طرفی نانوکیتوزان یک ماده‌ی طبیعی با خواص فیزیکی و شیمیایی عالی است که با محیط زیست سازگاری بالا داشته و به عنوان یک حامل دارو با آزادسازی کنترل شده استفاده می‌شود (Huang et al, 2009; MD et al, 2013). Wang و همکاران در سال ۲۰۱۵ تأثیرات نانو ذرات کیتوزان موجود در رژیم غذایی را بر نرخ بقا، رشد و کیفیت گوشت ماهی تیلاپیای نیل مورد بررسی قرار دادند و اثرات مثبت آن را در عملکرد رشد و کیفیت گوشت ماهی تأیید کردند.

مطالعات کمی اثرات مفید کامپوزیت‌های مختلف را در گونه‌های ماهی نشان داده است. به عنوان مثال کامپوزیت آلژینات-کیتوزان-PLGA محصورکننده‌ی آنتی‌ژن‌های آئروموناس هیدروفیلا، باعث افزایش ایمنی در کپور هندی بزرگ شده است (Behra & Swain, 2013). مطالعات اخیر نشان داده است که کامپوزیت‌های نانوکیتوزان نقره، عامل ضدباکتری بالقوه برای کنترل علیه باکتری‌های پاتوژن (ادواردزیلا تاردا و ویبریو سالمونیسیدا) ماهی بود (Dananjaya, 2014; Dananjaya, 2016).

با توجه با اثرات مثبت زئولیت، کیتوزان و نانوکیتوزان در گونه‌های مختلف ماهی، در مطالعات قبلی کامپوزیت-های کیتوزان/زئولیت و نانوکیتوزان/زئولیت ساخته شدند تا اثرات ترکیبی این مواد در کنار هم در قالب کامپوزیت مورد بررسی قرار گیرد (Sheikhzadeh et al, 2017، Hamidian et al, 2018;). این مطالعات نشان دادند که کامپوزیت‌های ساخته شده قادر به بهبود راندمان رشد، فاکتورهای بیوشیمیایی سرم و فعالیت آنزیم‌های گوارشی در ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان هستند. اما در خصوص اثرات این کامپوزیت‌های خوراکی بر کیفیت و ماندگاری فیله‌ی ماهی اطلاعاتی در دسترس نیست. بنابراین در این مطالعه اثرات

مقایسه‌ای کامپوزیت کیتوزان/زئولیت و نانوکیتوزان/زئولیت روی شاخص‌های رشد و کیفیت و ماندگاری گوشت با انجام آزمایش‌های مربوطه از نظر کیفیت میکروبی، شیمیایی و حسی فیله‌ی گوشت ماهی طی دوره‌ی زمانی سه ماهه در دمای نگهداری انجماد ۱۸- درجه‌ی سانتی‌گراد انجام گرفت.

## مواد و روش کار

برای تهیه نمودن نانوکیتوزان، ابتدا ۰/۲۶ گرم کیتوزان (سیگما) را در ۲۰ میلی‌لیتر محلول استیک اسید (۰/۵ درصد رقیق) حل، سپس ۱۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید. در مرحله‌ی بعد محلول سدیم‌تری‌پلی‌فسفات (۴/۹۵ میلی‌لیتر، ۵۴/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) درون محلول کیتوزان چکانده شد و امولسیونی شیری به دست آمد که تحت عنوان نانوکیتوزان نامیده شد. در مرحله‌ی بعد برای تهیه هیبرید کامپوزیت دوتایی نانوکیتوزان / زئولیت، امولسیون نانو ذرات کیتوزان (به میزان ۵/۰ و ۵ گرم) با زئولیت (به میزان ۱۴/۲۸ گرم) هم‌زده شد و سپس تحت تابش با دستگاه اولتراسوند (Sonica 2200MH S3، ایتالیا) به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت (Bangun et al, 2018). میزان زنولیت نیز از حداکثر میزان بارگذاری با کیتوزان و نانوکیتوزان به دست آمد.

برای تهیه نمودن کامپوزیت زئولیت/کیتوزان نیز ۰/۵ و ۵ گرم کیتوزان در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شده و به مدت یک ساعت در دمای اتاق هم زده شد. ۱۴/۲۸ گرم زئولیت نیز در همین مقدار آب مقطر حل شد و پس از اتوکلاو به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق خنک گردید. محلول حاوی کیتوزان و زئولیت با هم مخلوط شده و به مدت ۲۴ ساعت هم زده شد. در انتها محلول‌های حاصله سانتریوفوژ شده و خشک گردید.

مطالعه‌ی حاضر در یک مزرعه‌ی پرورش ماهی قزل-آلای‌رنگین‌کمان در شهر فیروزکوه انجام شد. ماهی‌ها با میانگین وزن ۵۰ گرم به مدت ۱۰ روز با جیره‌ی پایه (شرکت فرادانه، اصفهان) سازگار شدند و در ۱۸ عدد تانک سیمانی به ابعاد ۱/۸ × ۰/۲۲ × ۰/۳۵ متر مکعب دارای سیستم جریانی حاوی آب چاه هوادهی‌شده، نگهداری شدند. دمای آب، اکسیژن محلول در آب، میزان آمونیاک، میزان نیتریت و pH آب به ترتیب، ۱۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۸ ppm، ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر و ۷/۸ بود. کامپوزیت‌های کیتوزان/زئولیت و نانوکیتوزان/زئولیت ساخته شده به جیره‌ی پایه ماهیان اضافه گردید. گروه‌های مورد مطالعه به صورت زیر تقسیم‌بندی گردید:

گروه کنترل (فاقد هر گونه افزودنی)، گروه Z (۱۴/۲۸ گرم در کیلوگرم زئولیت)، گروه Ch0.5% (۰/۵ گرم در کیلوگرم کیتوزان بارگذاری شده در ۱۴/۲۸ گرم در کیلوگرم زئولیت)، گروه Ch5% (۵ گرم در کیلوگرم کیتوزان بارگذاری شده در ۱۴/۲۸ گرم در کیلوگرم زئولیت)، گروه NCh0.5% (۰/۵ گرم در کیلوگرم نانوکیتوزان بارگذاری شده در ۱۴/۲۸ گرم در کیلوگرم زئولیت) گروه NCh5% (۵ گرم در کیلوگرم کیتوزان بارگذاری شده در ۱۴/۲۸ گرم در کیلوگرم زئولیت).

کامپوزیت‌های ساخته شده با اسپری کردن ۲۰ میلی‌لیتر روغن ماهی به ازای هر کیلوگرم جیره، به خوراک پایه اضافه گردید. جیره‌ی کنترل صرفاً با اسپری کردن ۲۰ میلی‌لیتر روغن ماهی به ازای هر کیلوگرم جیره‌ی پایه، آماده شد. جیره‌های آزمایشی در گروه‌های مختلف به مدت ۶۰ روز در تغذیه‌ی ماهیان مورد استفاده قرار گرفت.

تمامی ماهی‌های موجود در هر تانک در روز صفر و روز ۶۰ صید شده و پس از بی‌هوشی با عصاره‌ی گل میخک (۵۰ میکرولیتر در لیتر) وزن کشی شدند. ضریب تبدیل غذایی و میزان رشد مخصوص برای هر مخزن با فرمول زیر محاسبه گردید:

FCR = مقدار افزایش وزن / مقدار کل غذای مصرفی

SGR= ۱۰۰(Inوزن نهایی-وزن ابتدایی)/تعداد روزهای غذادهی

در روز ۶۰ مطالعه، فیله‌ی هر ماهی به صورت جداگانه و تحت شرایط بهداشتی جدا شده و در کیسه‌های زیپ پک بسته‌بندی شده و پس از انجماد اولیه در دمای ۱۸- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند و طی دوره‌ی سه ماهه (فواصل

ماه‌های صفر، ۱، ۲ و ۳) تحت آزمایش‌های میکروبی، شیمیایی و حسی به صورت زیر قرار گرفتند.

انجام آزمایشات باکتریایی مطابق روش Speck و همکاران در سال ۱۹۹۲ انجام گرفت. ابتدا از هر نمونه ۲۵ گرم با مقدار ۲۲۵ میلی‌لیتر آب پپتونه ۰/۱ درصد استریل درون زیپ پک ریخته و به مدت ۳۰ ثانیه درون پالسی فایر قرار گرفت تا یکنواخت شود. محلول حاصل به عنوان رقت ۱/۱۰ در نظر گرفته شد. سپس رقت‌های ۱/۱۰۰، ۱/۱۰۰۰، ۱/۱۰۰۰۰ هم تهیه شد. برای هر رقت ۲ تکرار در پلیت کانت آگار کشت داده شد. پلیت‌های مربوط به شمارش باکتری‌های ساکروفیل (سرمادوست) درون یخچال ۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از یک هفته شمارش انجام گرفت. پلیت‌های مورد نظر برای اندازه‌گیری باکتری-های مزوفیل درون انکوباتور ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت و در دو نوبت (یک نوبت ۲۴ ساعت بعد و یک نوبت ۴۸ ساعت بعد) مورد شمارش قرار گرفت.

میزان اکسیداسیون چربی در نمونه‌ها به روش Pikul و همکاران در سال ۱۹۸۹ و با اندازه‌گیری مقادیر تیوبابیتوریک اسید انجام گرفت و پس از خنک شدن نمونه‌ها میزان جذب نوری توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۲ در برابر محلول شاهد (۵ میلی‌لیتر اسید پرکلریک ۴ درصد و ۵ میلی‌لیتر از محلول TBA۰/۰۲میلی‌مول) قرائت شده و بدین ترتیب میزان TBA بر اساس میلی‌گرم مالون دی آلدهید در هر کیلوگرم نمونه محاسبه گردید.

اندازه‌گیری مقدار پراکسید از طریق تیتراسیون ید آزاد شده از یدید پتاسیم با استفاده از محلول تیوسولفات سدیم مطابق روش Ergan و Krik در سال ۱۹۸۱ انجام گرفت. ابتدا مقدار ۰/۱ گرم چربی داخل یک فلاسک شیشه‌ای ۲۵۰ میلی‌لیتری درب‌دار ریخته شد. چربی در ۲۵ میلی‌لیتر حلال (مخلوطی از کلروفرم‌اسید استیک) حل گردید. سپس، مقدار ۱ میلی‌لیتر محلول اشباع یدید پتاسیم به آن اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در محیط تاریک قرار داده شد. بعد از طی این زمان، مقدار ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱ میلی‌لیتر از محلول ۱/۵درصد نشاسته به آن اضافه گردید و تکان داده شد. نمونه سپس با استفاده از Na2S2O3 ۰/۰۱نرمال تا ناپدید شدن رنگ آبی توسط بورت دیجیتالی تیتر گردید. همزمان یک تست بدون چربی نیز انجام گرفت و میزان پراکسید از رابطه زیر محاسبه گردید:

میلی اکی والان گرم ید آزاد PV=(1000(V1-V2)N)/W به ازای یک کیلوگرم چربی

V1 حجم (میلی‌لیتر) محلول تیوسولفات سدیم مصرفی، V2 حجم تیوسولفات سدیم مصرفی در آزمایش بدون چربی، W وزن (گرم) چربی مصرفی و N نرمالیته محلول تیوسولفات سدیم می‌باشند.

برای اندازه‌گیری pH، از روش Speck و همکاران در سال ۱۹۹۲ استفاده گردید. بدین منظور مقدار ۱۰ گرم از هر نمونه با ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط گردید و در دستگاه پالسی‌فایر به مدت ۳۰ ثانیه هموژن شد. سپس با وارد کردن الکترود pH متر به مخلوط حاصله، pH تمام نمونه‌ها به طور جداگانه اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (Version 21) انجام شد و مقایسه میانگین با Repeated Measure (ANOVA) صورت گرفت.

## نتایج

وزن نهایی در تمام گروه‌های تیمار به غیر از گروه Nch 0/5% نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری را نشان داد. بالاترین میزان طول نهایی نیز در گروه Z دیده شد که نسبت به گروه‌های دیگر معنی‌دار نبود. از طرف دیگر ضریب تبدیل غذایی نیز در تمام گروه‌های تیمار افزایش یافت. نرخ رشد ویژه نیز الگویی مشابه را نشان داد به طوری که در تمام گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری دیده شد (Table 1).

**Table 1. Growth indices of rainbow trout fed with zeolite / chitosan and zeolite / nanocytosan composites for 60 days**

| Group | Initial weight (g) | Initial length (cm) | Final length (cm) | Final weight (g) | Feed conversion ratio | Specific growth rate |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **C** | 49.90 ± 0.37 | 16.18 ± 0.03 | 24.84±0.51[ab] | 142.40 ± 7.03[a] | 1.79 ± 0.11[a] | 9.16 ± 0.10[a] |
| **Z** | 50.30 ± 0.44 | 16.30 ± 0.04 | 25.44± 0.31[b] | 161.33 ±2.39[ab] | 1.20 ± 0.07[b] | 9.60 ± 0.02[b] |
| **Ch0.5%** | 50.20 ± 0.55 | 16.22 ± 0.03 | 24.97±0.28[ab] | 160.18 ± 4.22[b] | 1.29 ± 0.11[b] | 9.59 ± 0.06[b] |
| **Ch5%** | 50.10± 0.40 | 16.25 ± 0.02 | 24.94±0.28[ab] | 161.75 ± 6.08[b] | 1.19 ± 0.11[b] | 9.61 ± 0.08[b] |
| **NCh0.5%** | 50.10 ± 0.58 | 16.23 ± 0.05 | 24.90±0.27[ab] | 158.01 ±4.71[ab] | 1.25 ± 0.05[b] | 9.54 ± 0.11[b] |
| **NCh5%** | 50.10 ± 0.48 | 16.13 ± 0.03 | 24.97±0.29[ab] | 160.16 ± 5.57[b] | 1.19 ± 0.01[b] | 9.58 ± 0.03[b] |

Data superscripted by different letters are significantly different (P<0.05).

**نتایج ارزیابی میکروبی**

میانگین لگاریتم شمارش باکتری‌های مزوفیل و باکتری‌های سرمادوست در گروه‌های مختلف در زمان نگهداری در شرایط انجماد (۱۸- درجه‌ی سانتی‌گراد) در Fig1,2 نشان داده شده است. نتایج نشان داد که در طول مدت نگهداری نمونه‌ها در حالت انجماد، بار میکروبی در تمام نمونه‌ها افزایش یافت و استفاده از جیره‌های تیمار در مقایسه با جیره‌ی کنترل تأثیری در مهار رشد باکتری‌ها در شرایط انجماد نداشت. در روز صفر، لگاریتم تعداد باکتری‌های مزوفیل در گرم در تیمارهای مختلف حدودا برابر ۳/۸ بود. در ماه سوم، این میزان در گروه کنترل C به ۸ رسید که تفاوت چشم‌گیری با سایر گروه‌ها نداشت (Fig 1).

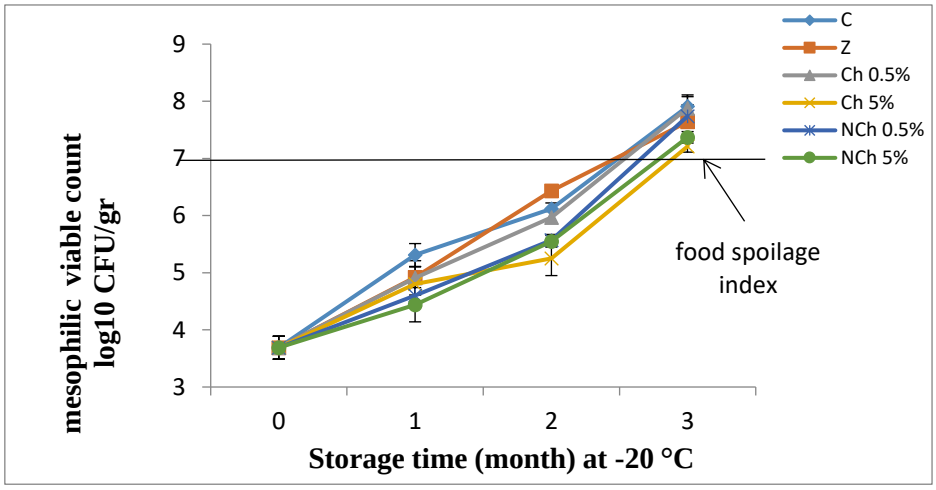


**Fig 1. Mesophilic bacterial count (Log CFU/g) of rainbow trout fillet in different treatment groups during various storage times.**

در مورد باکتری‌های سرمادوست نیز در روز صفر، لگاریتم تعداد باکتری‌ها در گرم (Log CFU/gr) حدودا برابر ۵ بود که در ماه سوم این میزان در گروه کنترل به ۸/۵ رسید که باز هم تفاوت معنی‌داری با سایر گروه‌ها نداشت (Fig 2).

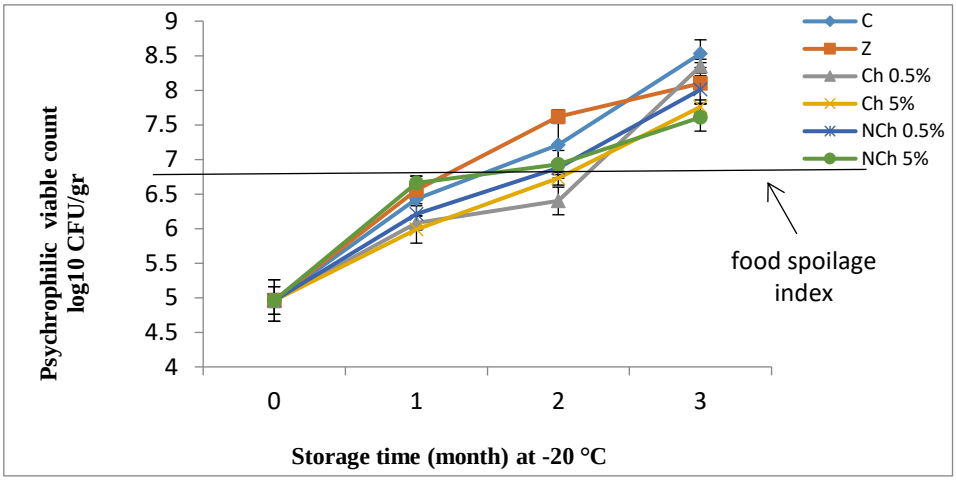


**Fig 2. Psychrophilic bacterial count (Log CFU/g) of rainbow trout fillet in different treatment groups during various storage times.**

**میزان TBA**

بر اساس نتایج حاصل از اکسیداسیون چربی در Fig 3 که بر حسب میلی‌گرم مالون‌دی آلدئید در هر کیلوگرم فیله‌ی ماهی قزل‌آلا در تیمارهای مختلف می‌باشد، با افزایش مدت زمان نگهداری، میزان TBA در تمام گروه‌های مورد مطالعه افزایش یافت، اما در کل، در ماه سوم نگهداری اختلاف معنی‌داری در میزان پراکسیداسیون لیپیدی در گروه Nch5% در مقایسه با سایر گروه‌ها مشاهده شد (Fig 3).

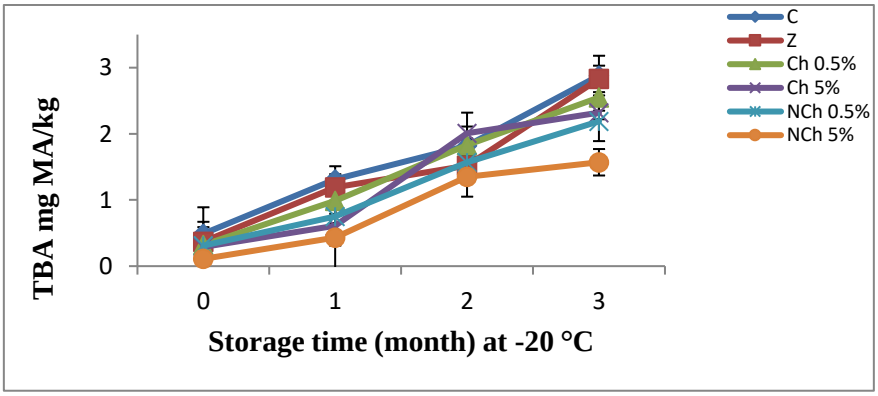


**Fig 3. Thiobarbituric acid value of rainbow trout fillet in different treatment groups during various storage times**

**اندازه‌گیری میزان پراکسید**

مقدار پراکسید در واقع بیانگر محتوای اکسیژن فعال در قالب میلی‌اکی‌والان گرم ید آزاد به ازای یک کیلوگرم چربی می‌باشد. در حالت کلی با افزایش زمان نگهداری میزان پراکسید در گروه‌های مورد مطالعه افزایش یافت اما در ماه دوم و سوم نگهداری اختلاف معنی داری در میزان پراکسید در گروه Nch5% در مقایسه با سایر گروه‌های مورد مطالعه مشاهده شد (Fig 4).

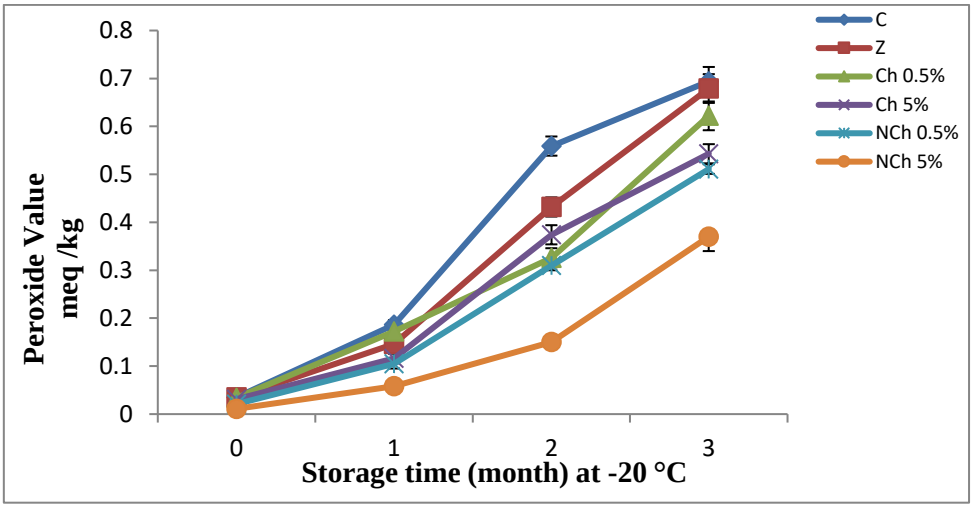


**Fig 4. Peroxide value of rainbow trout fillet in different treatment groups during various storage times.**

**اندازه‌گیری میزان pH**

تغییرات مربوط به میزان pH در تیمارهای مختلف در Fig 5 نشان داده شده است. بر اساس نتایج میزان pH در ماه‌های مختلف میان گروه‌های تیمار و کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت.

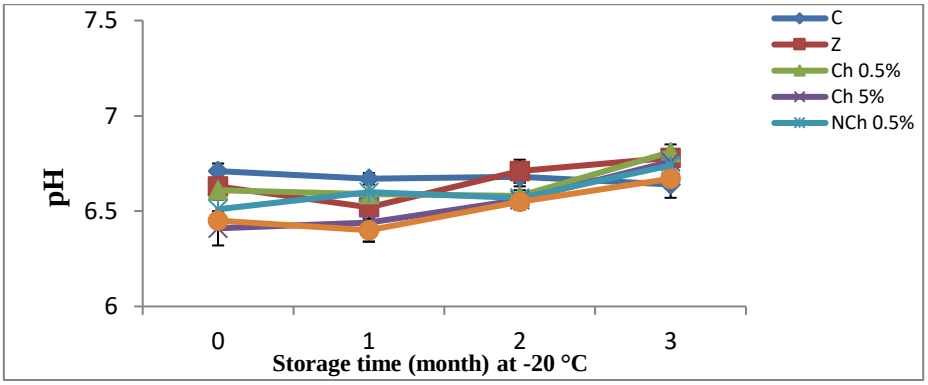


**Fig 5. pH value of rainbow trout fillet in different treatment groups during various storage times.**

**بحث**

این تحقیق با هدف بررسی اثرات کامپوزیت‌های زئولیت/کیتوزان و زئولیت/نانوکیتوزان در جیره‌ی غذایی بر رشد و کیفیت فیله‌ی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شد. نتایج نشان دادند که استفاده از این کامپوزیت‌ها و همچنین زئولیت خالی در جیره‌ی غذایی ماهی‌ها به مدت ۶۰ روز، توانستند میزان کارایی رشد را در مقایسه با گروه کنترل افزایش دهند. اثرات مثبت زئولیت روی رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان دو ساله که با جیره حاوی یک تا چهار درصد زئولیت به مدت ۶۳ روز تغذیه شد، نشان داده شد (Paritova et al, 2013). افزایش وزن و طول نهایی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره حاوی یک درصد زئولیت به مدت ۱۵۰ روز گزارش شده است (Obradivic et al, 2006). در مطالعات قبلی سطوح مختلفی از مکمل‌ها در حدود یک تا ده درصد استفاده شده است. به عنوان مثال Hua و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که جیره‌ی حاوی ۰/۲ کیتوزان، منجر به افزایش

فعالیت آمیلاز روده و متعاقب آن بهبود رشد در ماهی فوگو می‌گردد. Zaki و همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارش کردند که تغذیه‌ی ماهی خاردار (*Dicentrachus labrax*) با جیره حاوی ۰/۵ درصد کیتوزان شاخص‌های رشد این ماهی را افزایش می‌دهد. این در حالی است که اضافه کردن ۰/۵ درصد کیتوزان به جیره‌ی غذایی ماهی تیلاپیا، اثر قابل توجهی بر شاخص‌های رشد ماهی نداشت. در تضاد بودن دوز مطلوب، ممکن است از تفاوت در گونه‌های ماهی و مدت زمان غذادهی منشاء گیرد. اگر چه در مطالعه‌ی حاضر بهترین رشد در ماهی‌های تحت تغذیه با کامپوزیت‌های حاوی ۵ گرم در کیلوگرم کیتوزان و نانوکیتوزان مشاهده شد اما حتی در دوز پائین‌تر (۰/۵گرم) نیز افزایش کارایی رشد دیده شد که این اثرات می‌تواند ناشی از کاهش باکتری‌های پاتوژن و افزایش باکتری‌های مفید در روده‌ی ماهیان تیمار شده باشد. علاوه بر این برخی جیره‌ها می‌توانند آنزیم‌های گوارشی مختلف را بهبود بخشند که در نتیجه ممکن است ماهی شاخص‌های رشد بهتری را نشان دهد (Heidarieh et al, 2012).

نتایج مطالعات میکروبی نشان داد که در طول نگهداری نمونه‌ها در حالت انجماد، بار میکروبی در تمامی نمونه‌ها افزایش یافت و استفاده از کامپوزیت‌ها در جیره تأثیر چشم‌گیری در مهار رشد باکتری‌ها در شرایط انجماد نداشت. در کل مطالعه‌ای در خصوص اثرات ترکیبات طبیعی موجود در جیره‌ی ماهی بر میزان بار میکروبی فیله وجود ندارد اما در زمان پوشش‌دهی مستقیم گوشت سفید (مرغ و ماهی) و قرمز با کیتوزان و نانوکیتوزان، اثرات مثبت این ترکیبات در مهار رشد باکتری‌ها در شرایط انجماد دیده شد. به عنوان مثال، در بررسی انجام گرفته توسط Tsai و همکاران در سال ۲۰۰۲، اثر پوشش کیتوزان در ماهی سالمون نگهداری شده در شرایط سرما نشان داد که شمارش باکتری‌های مزوفیل هوازی و سرمادوست در نمونه‌های با پوشش، حدود یک الی دو سیکل لگاریتمی کم‌تر از نمونه‌های کنترل بود. Yingyuad و همکاران (۲۰۰۶) و Fan و همکاران (۲۰۰۹) نیز در استفاده از پوشش کیتوزان ۲ درصد به ترتیب در گوشت خوک و ماهی کپور به نتایج مشابهی دست یافتند. در مطالعه‌ی Hassanzadeh و همکاران (۲۰۱۱) استفاده از پوشش حاوی کیتوزان برای گوشت مرغ در دمای یخچال به مدت ۲۱ روز سبب کاهش سرعت رشد باکتری‌های مزوفیل و سرمادوست در مقایسه با گروه کنترل بود. مطالعه‌ی Zarei و همکاران در سال ۲۰۱۵ نیز بیان‌گر اثرات مثبت پوشش دهی فیله‌ی ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmicthys molitrix*) با محلول نانوکیتوزان جهت کنترل میکروبی بود. در کل به نظر می‌رسد که در مطالعه‌ی حاضر علت عدم تأثیر کامپوزیت‌ها در مهار رشد باکتری‌ها به دلیل ورود غلظت کم این مواد از طریق خوراکی به داخل عضلات ماهی می‌باشد. اگر چه در مطالعاتی که به طور مستقیم از پوشش حاوی کیتوزان و نانوکیتوزان برای مواد غذایی استفاده شد تأثیر معنی‌داری در مهار رشد باکتری‌های مزوفیل و سرمادوست مشاهده شد.

در بررسی خصوصیات شیمیایی فیله، میزان پراکسید در گروه دریافت‌کننده Nch 5% در مقایسه با سایر گروه‌های مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری را نشان داد. در مطالعات قبلی نیز استفاده از پوشش‌های حاوی کیتوزان سبب جلوگیری از افزایش تصاعدی شاخص پراکسید در نمونه‌های گوشت گردید (Duan et al, 2009, Fan et al, 2009). از طرفی Wang و Li در سال ۲۰۱۱ در مطالعه‌ای که بر روی ۳ گروه ماهی تیلاپیا انجام دادند مشاهده کردند در گروهی که جیره حاوی نانوکیتوزان دریافت کرده بودند میزان چربی خام به طور معنی‌داری کم‌تر از گروه کنترل و گروهی که جیره‌ی کیتوزان دریافت کرده بودند، است. حساسیت گوشت نسبت به اکسیداسیون چربی‌ها و افزایش میزان TBA بستگی به فاکتورهای مختلفی از جمله گونه‌ی حیوان، موقعیت تشریحی عضلات، مدت زمان نگهداری، روش‌های بسته‌بندی و اضافه کردن آنتی‌اکسیدان‌ها دارد. اگر چه رادیکال‌های آزاد به عنوان عامل تشدیدکننده‌ی اکسیداسیون چربی در گوشت شناخته شده‌اند، اما میزان چربی و ترکیب اسید چرب نیز اهمیت زیادی در

اکسیداسیون چربی در گوشت در طول مدت نگهداری دارد (Fan et al, 2009). در مطالعه‌ی حاضر، میزان پراکسیداسیون لیپیدی نیز الگوی مشابه‌ای را نشان داد به طوری که در گروه تغذیه شده با Nch5% کم‌ترین میزان پراکسیداسیون در مقایسه با سایر گروه‌ها دیده شد. به طور مشابه در مطالعه انجام شده توسط Sheikhzadeh و همکاران در سال ۲۰۱۷ میزان پراکسیداسیون لیپیدی در خون ماهیانی که با دوزهای متفاوتی از کامپوزیت‌های کیتوزان/زئولیت و نانوکیتوزان/زئولیت تغذیه شده بودند به طور معنی‌داری کم‌تر از ماهیانی بود که با جیره‌ی کنترل و زئولیت تغذیه شده بودند. به موازات آن، ماهیانی که با کامپوزیت‌های نانوکیتوزان تغذیه شده بودند میزان پراکسیداسیون لیپیدی کم‌تر و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری را نشان دادند. نکته مهم آن که مصرف نانوذرات در موجودات زنده و حضور این ترکیبات به مدت طولانی سبب افزایش دسترسی زیستی آن‌ها می‌گردد (Abdel-Tawwab et al, 2019). بنابراین استفاده از ماده‌ی پایه‌ی زئولیت با خاصیت کند رهش کردن نانوذره کیتوزان از طرفی سبب افزایش مدت دسترسی به نانوکیتوزان گشته و از طرف دیگر سبب کاهش مسمومیت‌زایی نانوذرات (Luis et al, 2019) می‌گردد. از آن جا که نمونه‌ها در طی زمان آزمایش در دمای انجماد نگهداری می‌شدند، تغییرات pH محسوس نبود. اگر چه افزایش اندکی خصوصاً در نمونه‌ی کنترل مشاهده شد اما معنی‌دار نبود. اگر چه در تحقیقاتی که قبلاً انجام شده است تأثیر استفاده از پوشش‌های حاوی کیتوزان در طول مدت نگهداری مواد غذایی در کاهش و ثابت ماندن pH مؤثر بود. Vasconez و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند استفاده از پوشش کیتوزان در نمونه‌های گوشت باعث کاهش میزان pH و ثابت ماندن آن در طول مدت نگهداری نسبت به نمونه‌های بدون پوشش می‌گردد. این امر ممکن است مربوط به پوشش اسیدی کیتوزان (۴/۵۸–۴/۶۳) در سطح گوشت و خصوصیات مهار رشد میکروبی آن باشد. همچنین بین بار میکروبی و میزان pH نمونه‌ها ارتباط معنی‌داری مشاهده گردید که بیان‌گر افزایش بار میکروبی و متعاقباً افزایش pH می‌باشد. در مطالعات قبلی، محققین علت کاهش تغییرات ارگانولپتیکی در نمونه‌های حاوی پوشش کیتوزان نسبت به گروه‌های بدون پوشش را مربوط به خواص ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی و خاصیت ممانعت از نفوذ اکسیژن مربوط دانسته و نتایج بررسی‌های حسی را به نتایج آنالیز خصوصیات شیمیایی و میکروبی مرتبط نمودند.

در کل در مطالعه‌ی حاضر هر چند خصوصیات میکروبی مورد مطالعه تغییری را در گروه‌های مختلف نشان نداد اما از میزان خصوصیات شیمیایی مورد بررسی، تنها میزان اکسیداسیون لیپیدی و شاخص پراکسید در گروه دریافت کننده Nch5% کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان داد.

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه تبریز جهت تأمین مالی این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

## تعارض منافع

نویسندگان این مقاله هیچ تعارض منافعی ندارند.

## منابع مالی

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تبریز انجام گرفته است.

## منابع


Abdel-Tawwab, M., Razek, N. A., & Abdel-Rahman, A. M. (2019) Immunostimulatory effect of dietary chitosan nanoparticles on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), *Fish and Shellfish immunology 88*: 254-258.

Bangun, H., Tandiono, S., & Arianto, A. (2018) Preparation and evaluation of chitosan-tripolyphosphate nanoparticles suspension as an antibacterial agent. *Journal of Applied Pharmaceutical Science 8*(12): 147-156.

Behra, T., & Swain, p. (2013). Alginate-chitosan-PLGA composite microspheres induce both innate and adaptive immune response through parental immunization in fish. *Fish and Shellfish Immunology 35*(3): 785-791.

Dananjaya, S. H. S.; Godahewa, G. L.; Lee, Y.; Cho, J., & DeZoysa, M. (2014). Chitosan silver nano composites (CagNCs) as antibacterial agent againts fish pathogenic *Edwardsiella tarda*. *Journal of Veterinary Clinics 6*(31): 502-506.

Dananjaya, S. H. S.; Godahewa, G. I.; Jayasooriya, R. G. P. T., & Lee, J. (2016). Antimicrobial effect of chitosan silver nano composites (CagNCs) on fish pathogenic *Aliivibrio(vibrio) salmonicida*. *Aquaculture 450:* 422-430.

Duan, J.; Park, S. I.; Daeschel, M. A., & Zhao, Y. (2007). Antimicrobial chitosan-lysozyme (CL) films and coating for enhancing microbial safety of *Mozzarella cheese*. *Journal of Food Science 72*(9): 355-362.

Ergan, H. R. S., & Krik Sawyer, R. (1981). Pearson's Chemical analysis of Food. (8th Edition). Churchill Livingston. London. Pp: 531-536.

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.

Hamidian, G., Zirak, K., Sheikhzadeh, N., Oushani, A. K., Shabanzadeh, S., & Divband, B. (2018). Intestinal histology and stereology in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) administrated with nanochitosan/zeolite and chitosan/zeolite composites. *Aquaculture Research 49*(5): 1803-1815.

Hassanzadeh, P.; Tajik, H., & Razavi Rohani, M. (2011). Application of chitosan edible coating containing grape seed extract on the quality and shelf life of refrigerated chicken meat. *Journal of Food Industry Research 21*(4): 467-482.

Heidarieh, M.; Mirvaghefi, A. R.; Akbari, M.; Farahmand, H.; Shekhzadeh, N.; Shahbazfar, A. A.et al. (2012). Effect of dietary ergosan on growth performance,digestive enzyme,intestinal histology,hematological paramenters and body composition of *rainbow trout*. *Fish Physiology and Biochemistry 38*(4): 1169-1174.

Hua, X. M.; Zhou, H. Q.; Zhang, Y. F., & Zhou, H. (2005). Effect of dietary suplemental chitosan and probiotics on growth and some digestive enzyme activities in *juvenile Fugu obscurus*. *Acta Hydrobiologica Sinica 29*: 299-305.

Huang, K. S.; sheu, Y. R., & Chao, I. C. (2009). preparation and properties of Nanochitosan. *Polymer-plastic Technoligy And Engineering 12*: 1239-1243.

Khodanazary, A.; Boldaji, F.; Tatar, A., & Dastar, B. (2013). Effects of Dietary Zeolite and Perlite Supplementations on Growth and Nutrient Utilization Performance, and Some Serum Variables in Common Carp, (Cyprinus carpio). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 13*(3): 495-501.

Kim, S. Y.; Jeong, S. M.; Park, W. P.; Nam, K. C.; Ahn, D. U., & Lee, S. C. (2006). Effects of heating conditions of grape seeds on the antioxidant activity of grape seed extracts. *Food chemistry 97*(3): 472-479.

Luis, A. I. S., Ramos Campos, E. V., De Oliveira, J. L., & Fraceto, L. F. (2019) Trends in aquaculture sciences: from now to use of nanotechnology for disease control. *Reviews in Aquaculture 11*: 119-132.

Md, S.; Khan, R. A.; Mustafa, G.; Chuttani, K.; Baboota, S.; Shahni, J. K., & Ali, J. (2013). Bromocriptine Loaded chitosan nanoparticles intended for direct nose to brain. pharmacodynamic, pharmacokinetic and Scintigraphy study in mice model.European. *Journal of Pharmaceutical Science 48*(3): 393-405.

Obradovic, S.; Adamovic, M.; Vukasinovic, M.; Jovanovic, R., & Levic, J. (2006). The application effects of natural zeolite in feed and water on production results of *Oncorhynchus Mykiss (Walbaum)*. *Romanian Biotechnological Letters 11*(6): 3005-3013.

Paritova, A.; Sarsembayeva, N.; Łozowicka, B.; Maulanov, A.; Kuzembekova, G.; Abzhalieva, A., & Kaczyński, P. (2013). The influence of chankanay zeolites as feed additives on the chemical biochemical and histological profile of the rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Aquaculture Research and Development* 5(1): 1-8.

Paul, J. P., & Sharmila Jesline, J. W. (2013). Development of chitosan based active film to extend the shelf life of minimally processed Fish. *International Journal of Research in Engineering and Technology 1*(5): 15-22.

Pikul, J.; Leszczynski, D. E., & Kummerow, F. A. (1989). Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. *Journal of. Agricultural and Food Chemistry 37*(5): 1309-1313.

Shahidi, F., & Abuzaytoun, R. (2005). Chitin,Chitosan, and Co-products: chemistry, production,application and health effects. *Advances in food and Nutrition Research 49:* 93-135.

Sheikhzadeh, N.; Kuchaki, M.; Mehregan, M.; Tayefi Nasrabadi, H.; Divband, B.; Khataminan, M.; Khani Oushani, A., & Shabanzadeh, S. (2017). Influence of nanochitosan/zeolite composite on growth performance, digestive enzymes and serum biochemical parameters in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Aquaculture Research 48*(12): 5955-5964.

Speck, M. L. (1992) Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 3rd ed. American Public Health Association, Washington, DC.

Suprayitno, E. (2018). The influence of fish mortality on the freshness of fish. *International Journal of research granthaalayah 6*(2): 2394-3629

Tsai, G. J.; Su, W. H., & Chen, H. C. L. (2002). Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatment and applications of fish preservation. *Fisheries Science 68*(1): 170-177

Vasconez, M. B.; Flores, S. K.; Campson, C. A.; Alvarado, J., & Gerschenson, L. N. (2009). Antimicrobial activity and physical properties of chitosan-tapioca starch based edible films and coating. *Food research international 42*(7): 762-769.

Wang, Y., & Li, J. (2011). Effects of chitosan nanoparticles on survival,growth and meat quality of tilapia,*Oreochromis nilotica*. *Nanotoxicology 5*(3): 425-431.

Wang, Y.; Liu, L.; Zhou, J., & Ruan, X. (2015). Effect of chitosan nanoparticles coating on the quality changes of postharvest whiteleg shrimp, Litopenaeus vannamei,during storage at 4 C. *Food and Bioprocess Technoligy 8*(4): 907-915.

Yingyuad, S.; Ruamsin, S.; Reekprkhon, D.; Douglas, S.; Pongamphai, S., & Siripatrawan, U. (2006). Effect of chitosan coating and vacuum packaging on the quality of refrigerated grilled pork. *Packaging Technology and Science 19*(3): 149-157.

Zaki, M. A., Salem, M., Gaber, M., & Nour, A. M. (2015). Effect of Chitosan Supplemented Diet on Survival, Growth, Feed Utilization, Body Composition & Histology of Sea Bass (Dicentrarchus labrax). *World Journal of Engineering and Technology 3*: 38-47.

Zarei, M., Ramezani, Z., Tavasoly, S. E., & Chadorbaf, M. (2015). Coating effects of orange and pomegranate peel extracts combined with chitosan nanoparticles on the quality of refrigerated silver carp fillets. *Food processing and Preservation 39*: 2180-2187.

Vol. 16, No. 3, Autumn, 2020
DOI: 10.22055/ivj.2019.173120.2121

# Study the effects of administrating zeolite/chitosan and zeolite/nano chitosan composites in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diet on the quality of the frozen fillet

Parviz Hassanzadeh[1*], Afrouz Oladi[2], Najmeh Sheikhzadeh[3], Razzagh Mahmoudi[4], Ali Khani Oushani[5] and Shalaleh Mousavi[1]

[1] Assistant Professor, Department of Food Hygiene and Aquatic Animals, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2] DVM Graduated, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[3] Associate Professor, Department of Food Hygiene and Aquatic Animals, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[4] Professor, Medical Microbiology Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
[5] PhD Graduated of Fisheries, Faculty of Fisheries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 25.02.2019 Accepted: 05.10.2019

**Abstract**

In recent years, the use of natural substances in nanoparticle forms in the aquatic animal diet is routine to improve the growth performance, immune system, disease resistance and fillet quality. In this study for the first time, the effects of zeolite/chitosan and zeolite/nanochitosan composites in rainbow trout diet on fillet quality were evaluated. Therefore, six treatment diets including zeolite/chitosan and zeolite/nanochitosan composites were prepared as follows: control group (without any additives), Z group (with 14.28 g $kg^{-1}$ zeolite), Ch0.5% group (with 0.5 g $kg^{-1}$ chitosan loaded in 14.28 g $kg^{-1}$ zeolite), Ch5% group (with 5 g $kg^{-1}$ chitosan loaded in 14.28 g $kg^{-1}$ zeolite), NCh0.5% group (with 0.5 g $kg^{-1}$ nanochitosan loaded in 14.28 g $kg^{-1}$ zeolite) and NCh5% group (with 5 g $kg^{-1}$ nanochitosan loaded in 14.28 g $kg^{-1}$ zeolite). Prepared diets were fed to rainbow trout with a mean weight 50 g for 60 days. On day 60, fish were weighed, and growth parameters were evaluated. Then, microbiological and chemical parameters during three months period in freezing storage temperature (-18) were studied. Results showed that growth performance was enhanced in all treatment groups, but bacterial growth did not change by experimental diets. Meanwhile, lipid peroxidation product and peroxide value significantly decrease in fish fillet administrated with NCh5% diet. This study showed that the administration of zeolit/nanochitosan composite at 5g/kg to rainbow trout diet could improve the fish fillet in terms of chemical characteristics.

**Keywords**: Rainbow trout, Fillet, Composite, Zeolit, Nanochitosan

* **Corresponding Author**: Parviz Hassanzadeh, Assistant Professor, Department of Food Hygiene and Aquatic Animals, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran, E-mail: hassanzadeh@tabrizu.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).