Journal of Agricultural, Environmental and Veterinary Sciences
Volume (6), Issue (5) : 30 Dec 2022
P: 46 - 60

AJSRP
ISSN: 2522-3364

مجلة العلوم الزراعية والبيئية والبيطرية
المجلد (6)، العدد (5) : 30 ديسمبر 2022م
ص: 46 - 60

Effect of Adding Fungal Chitosan on Sensory Properties, Microbiological Quality and Shelf life of Pan Bread

Lugain Fahad Al-Saikhan
Ahmed A. Al-Hassan
Sahar Hassan Salah
Mohamed Gadallah El-Sayed
College of Agriculture & Veterinary Medicine || Qassim University || KSA

Abstract: This research aims to study the effect of adding fungal chitosan as a natural preservative at different concentrations (zero, 0.5, 1 and 1.5%) on the moisture content, texture, sensory properties, and microbiological quality in pan bread during storage at room temperature (22 ± 3°C). The results show that the addition of fungal chitosan led to a significant decrease in the specific volume of the bread. It was also found that adding fungal chitosan had no significant effect on the sensory characteristics and general acceptance of the bread, except for the crust color which becomes darker in higher fungal chitosan concentrations, whereas the moisture loss rate decreased as the chitosan percentage increased. It was found that (1 and 1.5%) chitosan had the highest effect of preservation and no record of microbial growth during the storage period until five days at room temperature, which concludes that the fungal chitosan was effective as a natural preservative in the bread. In conclusion, the study results demonstrate that it is possible to prepare bread with addition up to 1% of fungal chitosan as a natural safe preservative, and it can be a successful application in bakery and particularly in bread industry as a replacement of synthetic preservatives.

Keywords: Natural preservative, anti-microbial, microbial spoilage, Bread mold, total quality.

تأثير إضافة الكيتوزان الفطري على الصفات الحسية والجودة الميكروبية وفترة صلاحية خبز القوالب

لجين فهد الصيخان
أحمد بن علي الحسن
سحر حسن صلاح
محمد جاد الله السيد
كلية الزراعة والطب البيطري || جامعة القصيم || المملكة العربية السعودية

المستخلص: يهدف هذا البحث إلى دراسة تأثير إضافة الكيتوزان الفطري بتركيزات مختلفة (0، 0.5، 1، و1.5%) كمادة حافظة طبيعية على نسبة الرطوبة، والقوام، والقبول الحسي، والمحتوى الميكروبي، ومدى ظهور العفن الطبيعي لخبز القوالب أثناء التخزين على درجة حرارة الغرفة (22 ± 3 oم). أظهرت النتائج أن إضافة الكيتوزان الفطري أدت إلى انخفاض معنوي في الحجم النوعي للخبز المضاف إليه الكيتوزان مقارنة بالعينة الضابطة. كما لم يكن لإضافة الكيتوزان الفطري تأثير معنوي على الصفات الحسية والقبول العام لخبز القوالب فيما عدا لون القشرة الخارجية والتي تصبح داكنة اللون مع زيادة الكمية المضافة من الكيتوزان الفطري. وحدث انخفاض في

معدل فقد رطوبة عينات الخبز كلما زادت نسبة الكيتوزان المضافة وذلك حتى اليوم الخامس من التخزين. ووجد أن الكيتوزان الفطري له تأثير فعال وواضح كمادة حافظة طبيعية للخبز خاصة بزيادة الكمية المضافة منه فقد كان لمعاملتي (1 و1.5%) كيتوزان أعلى تأثير للحفظ ولم يسجل أي نمو ميكروبية طوال فترة التخزين الممتدة إلى خمسة أيام في الجو العادي. أتضح من نتائج هذه الدراسة إمكانية إعداد الخبز المضاف إليه نسبة تصل إلى 1% من الكيتوزان الفطري كمادة حافظة آمنه طبيعية دون إخلال في صفات الجودة والقبول الحسي للخبز، وبذلك يمكن أن يكون تطبيقًا ناجحًا في صناعة المخبوزات والخبز تحديدًا، وإحلاله بدلًا من المواد الحافظة الصناعية.

الكلمات المفتاحية: مادة حافظة طبيعية، الفعالية المضادة للأحياء الدقيقة، الفساد الميكروبي، عفن الخبز، الجودة الكلية.

المقدمة:

يعتبر الخبز أحد أكثر المنتجات الغذائية استهلاكًا حول العالم حيث يقدر إنتاجه عالميًا بحوالي 100 مليون طن سنويًا، ولكن في الوقت نفسه فإن الخبز هو أحد أكبر مصادر المخلفات الغذائية على مستوى العالم؛ محدثًا بذلك خسارة اقتصادية كبيرة، فمخلفات الخبز تعد مكونًا رئيسيًا في مشكلة هدر الغذاء (Melikoglu and Webb, 2013; Narisetty *et al.*, 2022). قدرت المؤسسة العامة للحبوب في المملكة العربية السعودية أن كمية الخبز المهدرة تساوي 764 ألف طن سنويًا، هذا ما يعادل حوالي 25% من إجمالي الأغذية المفقودة والمهدرة على مستوى المملكة، كذلك قُدرت مساهمة الفرد بهدر الخبز بمقدار 23 كجم /سنة، هذه الخسائر الاقتصادية تقارب نحو 760 مليون ريال سعودي سنويًا ناتجة عن المهدر من الخبز فقط (المؤسسة العامة للحبوب، 2019).

يعد الخبز منتج ذو فترة صلاحية قصيرة نتيجة لتجلد الخبز، والفساد الميكروبي. وعليه فإن تقبل المستهلكين للخبز المتجلد منخفض نظرًا لانخفاض الجودة الحسية (Gray and Bemiller, 2003). يعتبر نمو الأعفان من أهم العوامل المؤدية لفساد منتجات المخابز خاصة الخبز، يحدث هذا غالبًا بسبب نمو أنواع معينة من الأعفان مثل: *Aspergillus*، و*Fusarium*، و*Penicillium*. بالإضافة إلى الخسائر الاقتصادية غير المحدودة الناتجة عن ظهور العفن فإن السموم الفطرية الناتجة عنه تؤدي إلى مشاكل بالصحة العامة، وهذا ما يجعل العفن مصدر قلق. يعتبر الفساد البكتيري أقل شيوعًا من الفساد بالفطريات، والذي ينتج عن نمو أنواع *Bacillus*. بينما نمو الخمائر يعد السبب الأقل شيوعًا لفساد الخبز بالأحياء الدقيقة (Wang *et al.*, 2017).

يحدث العفن في الخبز غالبًا بسبب تلوث ما بعد الإنتاج، وبالتالي فإن استخدام المواد الحافظة هي الاستراتيجية الأكثر شيوعًا والتي تتبناها صناعة الخبز (Legan, 1993). تلعب المواد الحافظة الاصطناعية دورًا مهمًا في حفظ جودة الغذاء بالصناعات الغذائية، وكذلك منع نمو الأحياء الدقيقة الممرضة والمسببة للفساد، إلا أنه يعاب عليها الآثار الثانوية الناتجة عنها والضارة بالصحة. تعمل صناعة الخبز على تقليل عدد المضافات والمواد الحافظة الاصطناعية في الخبز، وذلك لإنتاج خبز طبيعي وصحي قدر الإمكان (Axel *et al.*, 2017).

من هذا المنطلق فقد اقتُرح استخدام الكيتوزان كمادة طبيعية حافظة للأغذية وذات خواص وظيفية، فالكيتوزان بوليمر حيوي طبيعي أثبت فاعليته في تأخير ظهور العفن على الخبز، كذلك أوجدت إضافته للمخبوزات فرصة للجمع بين دوره كمادة حافظة مضادة للأحياء الدقيقة مع دوره الوظيفي المفيد والمعزز للصحة. حيث أن الأغذية المدعمة مناسبة جدًا للعمل كناقلات للمكونات ذات الأهمية الغذائية والعلاجية، تم تدعيم الخبز بالعديد من المكونات الوظيفية من أجل زيادة القيمة الغذائية أو لتحسين قبول المستهلكين للمنتج كذلك تم بالفعل تصنيع خبز مضاف له الكيتوزان وتقييم تأثيراته كمضاد للأكسدة، وخافض للكوليسترول الضار LDL (Ausar *et al.*, 2003; Kerch *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2002b).

الكيتوزان بوليمر متعدد الخواص البيولوجية. فهو متوافق حيويًا، وقابل للتحلل الحيوي، وآمن وغير سام، وموقف للنزيف، ومضاد للفطريات، وذو نشاط مضاد للأورام (Dutta *et al.*, 2004)، وهو معروف بنشاطه المضاد

للأحياء الدقيقة (Rabea *et al.*, 2003). في صناعة الأغذية يتميز الكيتوزان عن بقية البوليمرات الاصطناعية، فهو مدرج كمضاف غذائي في اليابان (MHLW, 2020)، وكوريا (MFDS, 2020)، كذلك وفقًا لوزارة سلامة الغذاء والدواء الكورية فالكيتوزان معترف به كمادة مضافة وظيفية في لائحة معايير إنتاج الأغذية الوظيفية (MFDS, 2016b). وقد أُعترف بدوره المساعد في الحفاظ على مستوى صحي لكوليسترول الدم (MFDS, 2016a)، وإلى جانب عدم سمية الكيتوزان تجاه خلايا الثدييات، فإن استعماله كعامل مضاد للأحياء الدقيقة فتح الأفق للعديد من تطبيقاته في صناعة الأغذية، والتي هدفت لتحسين جودة الطعام وإطالة فترة الصلاحية (Gutiérrez, 2017).

تجاريًا اعتمد على الكيتين والكيتوزان المستخرجان من مخلفات قشور الجمبري وسرطان البحر لفترة طويلة. ولكن اكتشاف بوليمرات الكيتوزان في جدران خلايا الأعفان فتح الأفق لمزيد من الأبحاث والتطبيقات بسبب كون الكيتوزان الفطري آمن صحيًا وخالي من المواد المسببة للحساسية، كذلك سيخفض من التكاليف والمخلفات الناتجة عن استخلاصه (Chien *et al.*, 2016; Batista *et al.*, 2022). أيضًا قد تختلف منتجات الكيتين والكيتوزان القشرية في الخصائص الفيزيائية والكيميائية، بينما الكيتين والكيتوزان الفطري لهما خصائص متسقة نسبيًا؛ ذلك بسبب ظروف إنتاج العفن، علاوة على ذلك فإن المواد خام لاستخراج الكيتوزان الفطري تعد مخلفات مستقرة غير محدودة بقيود جغرافية أو موسمية (Abo Elsoud and El Kady, 2019).

العفن *Aspergillus niger* هو أحد مصادر الكيتوزان الفطري، حيث ذكر أن 42% من مكونات جدار الخلية عبارة عن الكيتين (Knorr, 1991)، ففي حين أن إنتاج حامض الستريك من عفن *Aspergillus niger* يخلف ما يقارب 80,000 طن من مخلفات الأعفان سنويًا (Ali *et al.*, 2002)، فأن هذه المخلفات الفطرية تكون مصدرًا طبيعيًا مجانيًا للكيتين والكيتوزان. في عام 2011 أعترف بالكيتوزان المستخلص من العفن *Aspergillus niger* بأنه آمن عمومًا (GRAS) لاستعماله كمضاف غذائي ثانوي بموجب اللائحة الصادرة عن إدارة الغذاء والدواء الأمريكية (FDA, 2011).

لهذا فإن إحلال الكيتوزان الفطري بديلًا عن سابقه المستخلص من القشريات يحدث فجوة بحثية، حيث أن نتائج التقارير التي تعنى بتأثيرات الكيتوزان على الأغذية تظهر تباينًا طفيفًا، وقد يعزى هذا التباين إلى: الاختلافات في خواص الكيتوزان المستخدم نفسه، ونوعية الغذاء المضاف له، وآلية تطبيق الكيتوزان (Hu and Gänzle, 2018).

ومما سبق يظهر الهدف من إجراء هذا البحث هو دراسة إمكانية إضافة نسب مختلفة من الكيتوزان الفطري (0.5، 1.0، 1.5%) كمادة حافظة طبيعية ذات دور وظيفي لعينات خبز القوالب مع المقارنة ببعض المواد الحافظة الكيميائية الشائع استخدامها لحفظ الخبز والمخبوزات مثل بروبيونات الكالسيوم وحمض الأسكوربيك. مع دراسة تأثير الكيتوزان الفطري على كل من المحتوى الرطوبي، الحجم النوعي، صفات القوام، القبول الحسي ومعدل صلاحية الخبز والمعايير الميكروبية خلال تخزينه في الجو العادي لمدة تصل الى 5 أيام.

مواد البحث وطرائقه:

المواد:

تم الحصول على كل من دقيق القمح الفاخر (استخلاص 70%)، السكر، الزبدة، الخميرة، الملح، المستخدمة لتصنيع الخبز من السوق المحلي في مدينة عنيزة، منطقة القصيم. كما تم الحصول على الكيتوزان الفطري الغذائي (Food Grade)، بوزن جزيئي منخفض (LMW)= 15-30 كيلو دالتون، ودرجة نزع أسيتيل 98.21% (DD)=، ولزوجة= 17mpa، من شركة (Qingdao Chibio Biotech Co., Ltd., China).

طرائق البحث:

1- إعداد عينات خبز القوالب المختلفة:

أعدت عينات خبز القوالب Pan bread وفقاً للمكونات والطريقة التي ذكرها Kerch وآخرون (2010) على أساس 100% دقيق، 7.7% سكر، 4.7% زبد، 3% خميرة، 1.6% ملح، 60% ماء ولم تضف أي مادة حافظة للعينة الضابطة. كما تم تصنيع عينات الخبز المحتوي على الكيتوزان الفطري كما في العينة الضابطة مع إضافة نسب مختلفة من مسحوق الكيتوزان الفطري (0.5، 1، و1.5%) من وزن الدقيق والمذابة في محلول مخفف من حمض الأسكوربيك، كذلك تم تصنيع عينات أخرى من الخبز بغرض المقارنة في التحاليل الميكروبية تحتوي على مواد حافظة صناعية مثل (0.3% بروبيونات الكالسيوم، و0.7% حمض الأسكوربيك). واتبعت الطريقة المباشرة Straight dough method لصناعة العجينة وفقًا لما ذكر في (AACC, 2000)، ثم قسمت العجينة لقطع متساوية بوزن 170 جم ووضعت في القوالب المخصصة للخبز (14.7 x 8.9 x 6.4 سم)، وبعد التخمير لمدة حوالي ساعة على درجة حرارة 35- 33 °م ورطوبة نسبية 80-85% في المخمر الكهربائي، تم الخبز في الفرن الكهربائي على درجة حرارة 240 °م لمدة 12 دقيقة. أخرجت عينات الخبز من القوالب لتبرد على درجة حرارة الغرفة لمدة 40 دقيقة، ثم عبأت في أكياس بلاستيك محكمة الغلق ثم خزنت لمدة خمسة أيام على درجة حرارة الغرفة (3±22°C).

2- تحضير محاليل الكيتوزان الفطري:

تم تحضير محاليل الكيتوزان وفقًا لما ذكره Lee وآخرون (2002b) مع بعض التعديلات، فقد تم إذابة مسحوق الكيتوزان الفطري في محلول مخفف من حمض الأسكوربيك (حُضر بإذابة بما يعادل 0.7% من وزن الدقيق حمض الأسكوربيك في ماء مقطر)، والتسخين في حمام مائي على درجة حرارة 60 °م حتى الذوبان، وضُبطت درجة pH بعد تمام الذوبان والتبريد عند (6.1 pH)، كما ضُبطت درجة pH كذلك للماء المقطر المستعمل في العجن لباقي المعاملات عند نفس الدرجة، ثم تمت إذابة كميات الكيتوزان والمضافة بالنسب 0.5، 1، و1.5% من الوزن الإجمالي للدقيق. أما بالنسبة لكمية الماء المضاف إلى العجين، فقد تم توحيد كمية الماء في جميع المعاملات وذلك بطرح الكمية المضافة لمحلول الكيتوزان من كمية الماء الكلية.

3- تقدير الصفات الطبيعية لعينات خبز القوالب:

تم تقدير الوزن لعينات خبز القوالب بالجم بعد الخبيز والتبريد مباشرة، كما تم تقدير الحجم بالسم^3 وفقًا لطريقة الإحلال بإزاحة الحبوب (الدخن)، وذلك لحساب الحجم النوعي للخبز (سم^3/جم) بقسمة الحجم (سم^3) على الوزن (جم) وفقاً للطريقة المذكورة في (AACC, 2000).

4- تقدير محتوى الرطوبة لعينات خبز القوالب:

تم تقدير محتوى الرطوبة لعينات خبز القوالب المحتوية على الكيتوزان الفطري والمخزنة على درجة حرارة الغرفة في اليوم 1 و3 و5 من التخزين، وذلك عن طريق تجفيف وزن 10 جم من عينات الخبز في الفرن على درجة حرارة 105 °م لمدة 3 ساعات حتى ثبات الوزن وذلك حسب الطريقة المذكورة في (AACC, 2000).

5- تحليل القوام لعينات خبز القوالب:

تم تقدير صفة القوام (Firmness) لعينات الخبز المخزنة على درجة حرارة الغرفة في اليوم 1 و3 و5 بعد التصنيع، وذلك للدلالة على معدل التجلد الذي يحدث في الخبز خلال فترة التخزين، وذلك باستخدام جهاز محلل القوام من نوع Texture analyzer TA-XT-Plus (Stable Microsystems, UK)، وفقًا للطريقة (74-09.01) المذكورة في (AACC, 1999)، وقد استعملت خلية التحميل 5 كغ، ومسبار (P/25)، والذي يضغط على العينة بنسبة 40% من

ارتفاعها. وقد تم تقطيع شرائح الخبز بسمك 25 مم يدويًا وأجري الاختبار على شريحة واحدة في كل مرة، لأخذ متوسط 6 قراءات لكل معاملة.

6- تقدير الجودة الميكروبية لعينات خبز القوالب:

تم تحضير التخفيفات لعينات الخبز بوزن 10 جرام من عينات الخبز وتجنيسه مع 90 مل من محلول التخفيف، وبعد ذلك سحب من التخفيف السابق 1 مل ويضاف إلى 9 مل من محلول التخفيف، وذلك لتحضير التخفيفات التسلسلية من (10^{-2} - 10^{-6})، ثم صب 1 مل من كل تخفيف على سطح طبق بتري باستخدام طريقة صب الأطباق في اليوم 1 و3 و5 من التخزين، كما وصفاها Harrigan وMcCance (1976). وذلك لعد الخمائر والأعفان كالتالي: بصب 1 مل من التخفيف الثاني والثالث لعينة الخبز في طبق بتري متبوع بإضافة 10-15 مل من وسط Yeast Mold Agar. ثم بعد ذلك تم تحضين أطباق بتري مقلوبة عند 25 °م لمدة 3-7 أيام.

كذلك تم إجراء العد الكلي للبكتيريا كالتالي: صب 1 مل من التخفيف الرابع والخامس والسادس لعينة الخبز في طبق بتري متبوع بإضافة 10-15 مل من وسط Nutrient Agar. وحضنت أطباق بتري مقلوبة على درجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة.

7- الفحص البصري لعينات خبز القوالب:

أُجري الفحص البصري لعينات الخبز خلال فترة التخزين حيث خزنت شرائح من عينات الخبز في أكياس بلاستيكية على درجة حرارة الغرفة (3±22°C) وسجلت الملاحظات عن مدى ظهور ونمو الأحياء الدقيقة (خاصة نمو الأعفان) على سطح شرائح الخبز خلال فترة التخزين وحتى اليوم السابع من التخزين.

8- التقييم الحسي لعينات خبز القوالب:

أُجري التقييم الحسي لعينات خبز القوالب المحتوية على الكيتوزان الفطري وذلك بعد الانضاج الحراري والتبريد كما في الطريقة التي ذكرها (Ayo and Nkama, 2004)، مع بعض التغييرات. وأُجري التقييم الحسي بواسطة 17 من المحكمين ذوي الخبرة بالصفات الحسية الجيدة لخبز القوالب في قسم علوم الأغذية وتغذية الإنسان بكلية الزراعة والطب البيطري بجامعة القصيم. وتم تقييم كل من: المظهر الخارجي، الطعم، الرائحة، قوام اللبابة، لون القشرة والقبول العام. على مقياس (Hedonic scale) من 1 الى 9 نقاط، حيث تشير الدرجة 9 إلى أن العينة مقبولة جداً وتشير الدرجة 1 إلى أنها غير مقبولة.

9- التحليل الإحصائي:

تم إجراء التحليل الإحصائي للنتائج المتحصل عليها بواسطة برنامج التحليل الإحصائي IBM SPSS Statistics (27)، بواقع ثلاث مكررات لكل معاملة، ماعدا اختبار التقييم الحسي والذي احتوى على 17 تكرار، واختبار تقدير القوام المتكون من 6 مكررات. وتم تحليل البيانات المتحصل عليها باستخدام اختبار one-way ANOVA، وأُجري توكي كاختبار لاحق (Tukey post hoc test) عند مستوى معنوية ($p \leq 0.05$).

النتائج والمناقشة:

1. تأثير إضافة الكيتوزان الفطري على الصفات الطبيعية لخبز القوالب:

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي لصفة الوزن في **الجدول (1)** عدم وجود فروق معنوية بين قيم الوزن لجميع المعاملات تحت الدراسة ($p > 0.05$). بينما أظهرت النتائج وجود فروق معنوية بين قيم الحجم ($p \leq 0.05$) لعينة الخبز الضابطة وعينات الخبز المحتوية على نسب مختلفة من الكيتوزان الفطري، فقد سجلت العينة الضابطة

أعلى قيمة للحجم (514.33 سم٣) مقارنة بباقي العينات تحت الدراسة، والتي سجلت تناقصًا بقيم الحجم مع زيادة نسبة الكيتوزان المضافة (0.5-1-1.5%)، حيث بلغت قيمها (467-445.33-435 سم٣) على التوالي. كذلك أظهرت نتائج التحليل الإحصائي لقيم الحجم النوعي لعينات الخبز المحتوية على نسب مختلفة من الكيتوزان الفطري الموضحة **بالجدول (1)**. أن إضافة الكيتوزان الفطري أدت إلى انخفاض معنوي في الحجم النوعي للخبز المضاف إليه الكيتوزان مقارنة بالعينة الضابطة ($p \leq 0.05$)، حيث سجلت عينة الخبز الضابطة أعلى قيمة في الحجم النوعي (3.28 سم^3/جم). بينما كانت قيم الحجم النوعي لعينات الخبز المحتوية على نسبة 0.5-1% من الكيتوزان (2.92-2.77 سم^3/جم) على التوالي، وسجلت عينة الخبز المحتوية 1.5% كيتوزان أقل قيمة للحجم النوعي وكانت (2.71 سم^3/جم). قد يعود هذا الانخفاض في الحجم النوعي لتأثير الكيتوزان كمادة مضادة للأحياء الدقيقة على نشاط الخميرة إلا أن هذا التأثير لم يمنع نمو الخميرة بشكل كبير نظرًا لقصر وقت التخمير الفعلي وانخفاض نسبة الكيتوزان المضافة. ففي دراسة أجرها Lee وآخرون (2002b) لفهم تأثير الكيتوزان المثبط على عدد من الأحياء الدقيقة ومنها الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* نتج عنها بدأ التأثير المثبط للكيتوزان بالوزن الجزيئي 30 كيلو دالتون في الظهور بعد 3 ساعات من التحضين، بينما ظهر التأثير المثبط لنمو الخميرة في الكيتوزان 120 كيلو دالتون ولكن بدرجة منخفضة، وعليه يعتقد الباحثون أن الكيتوزان لن يمنع نمو الخميرة بشكل كبير خلال وقت تخمير عجينة الخبز. كذلك ذكرت دراسة Lafarga وآخرون (2013) أن استبدال الدقيق بالكيتوزان بنسب >4% تؤدي إلى تثبيط كامل في نشاط الخميرة، ألا أنه عند خفض نسبة الاستبدال إلى 1% فأن نشاط الخميرة قد انخفض ولم يثبط بشكل كامل. وأيضًا أدى الاستبدال بنسبة 1% إلى انخفاض معنوي في الحجم النوعي للخبز. في دراسة (سليمان وآخرون، 2011) يرى الباحثون أن هذا الانخفاض في الحجم النوعي قد يعود لمقدرة الكيتوزان العالية على الارتباط في الماء، هذا ما يجعله غير متوفر بشكل كاف لتكوين الشبكة الجلوتينية. كذلك قد يفسر هذا الانخفاض في الحجم النوعي بتأثير الكيتوزان الذي يعد من الألياف الغذائية ففي دراسة أجراها Ghoshal وMehta (2019) ذكرت بأن الحجم النوعي للخبز سجل انخفاض معنوي عند إضافة الكيتوزان بتراكيز >0.5%، وأن الحجم النوعي تناقص خطيًا مع ازدياد تركيز الكيتوزان المضاف إلى الخبز، وعزى ذلك لتأثير الكيتوزان الذي يعد من الألياف الغذائية والتي قد يكون لها تأثير سلبي على الحجم النوعي للخبز.

الجدول (1): نتائج الصفات الطبيعية لعينات الخبز المحتوية على نسب من الكيتوزان الفطري.

المعاملات	الوزن (جم)	الحجم (سم٣)	الحجم النوعي (سم٣/جم)
العينة الضابطة	1.38±156.65 [a]	4.7±514.33 [a]	**0.04±3.28 [a]**
كيتوزان 0.5%	0.32±159.68 [a]	8.5±467 [b]	**0.06±2.92 [b]**
كيتوزان 1%	1.16±160.74 [a]	5.7±445.33 [bc]	**0.05±2.77 [bc]**
كيتوزان 1.5%	0.29±160.5 [a]	2.89±435 [c]	**0.02±2.71 [c]**

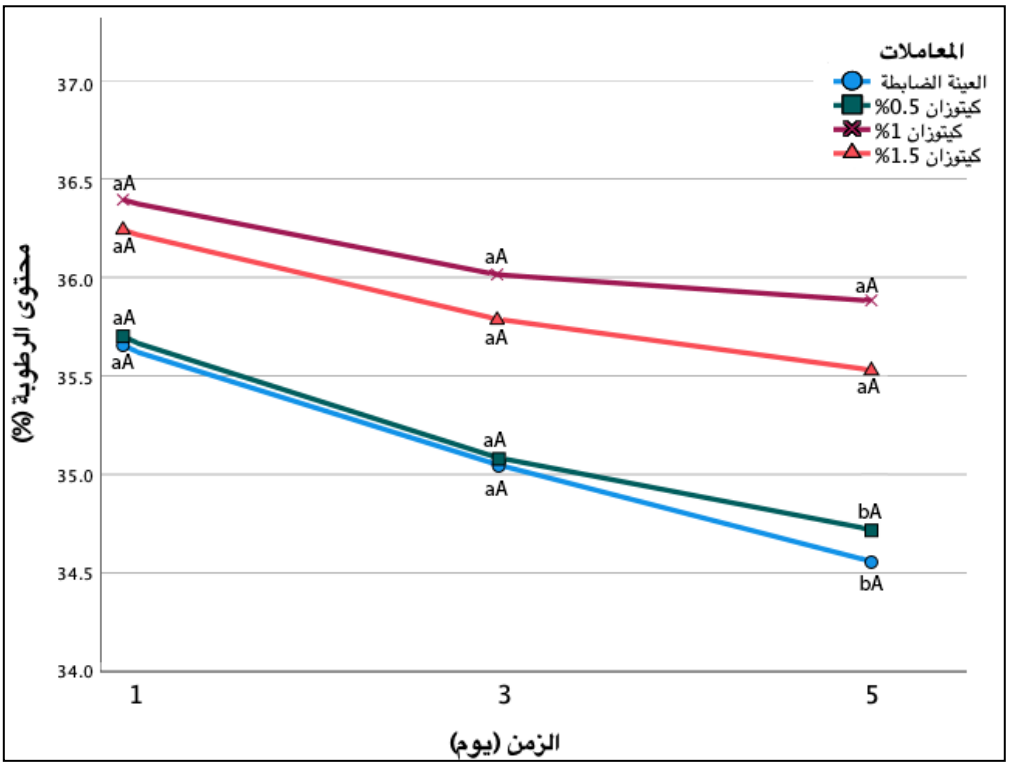
البيانات معبر عنها بالمتوسط ± SE الخطأ القياسي، عدد المكررات = 3

البيانات المتبوعة بنفس الحروف الصغيرة داخل نفس العمود لا يوجد بينها اختلافات معنوي ($p \leq 0.05$).

2. تأثير إضافة الكيتوزان الفطري على محتوى الرطوبة في خبز القوالب:

يعتبر المحتوى الرطوبي من المعايير الهامة في تحديد جودة الخبز، فقد تم دراسة تأثير اضافة نسب مختلفة من الكيتوزان الفطري (0.5-1-1.5%) على نسبة رطوبة الخبز مقارنة بالعينة الضابطة، خلال اليوم الأول والثالث والخامس بعد التصنيع.

يوضح الشكل (1) أهم التغيرات في محتوى الرطوبة لمعاملات الخبز تحت الدراسة، لم تظهر معاملات الخبز أي فروق معنوية ($p > 0.05$) في اليوم الأول والثالث من التخزين، ولكن أظهرت النتائج انخفاض معدل الفقد في الرطوبة كلما زادت نسبة الكيتوزان المضافة، حيث لوحظ في اليوم الخامس من التخزين انخفاض نسبة رطوبة العينة الضابطة والعينة المحتوية على كيتوزان 0.5% إلى (34.57-34.72%) على التوالي، محدثًا فروقًا معنوية ($p \leq 0.05$) بينهما وبين العينات المحتوية على كيتوزان 1-1.5% بالقيم (35.88-35.53%) علي التوالي في نفس اليوم. وبذلك تظهر فعالية إضافة الكيتوزان في خفض معدل فقد الرطوبة للخبز خلال التخزين مقارنة بالعينة الضابطة، هذه الظاهرة قد تكون ناتجة عن القدرة العالية للكيتوزان على الاحتفاظ بالرطوبة، مما قد تؤدي إلى تأخير تجلد الخبز، وبالتالي يطيل من فترة التخزين (Kim, 2004).



الشكل (1): نتائج محتوى الرطوبة (%) لعينات الخبز المحتوية على نسب من الكيتوزان الفطري.

3. تأثير إضافة الكيتوزان الفطري على قوام خبز القوالب:

تعتبر الصلابة مؤشرًا مهمًا لتحديد مدة صلاحية الخبز للاستهلاك؛ تتغير صلابة الخبز خلال فترة التخزين نتيجة لفقدان المرونة (Ulziijargal *et al.*, 2013). تم تقدير صلابة القوام لعينات الخبز المضاف لها الكيتوزان الفطري ومقارنته بالعينة الضابطة في الأول وحتى الخامس من التخزين. تشير النتائج المدونة **بالجدول (2)** أن قيم الصلابة في العينة الضابطة كانت الأقل بمتوسط (572.86 جم) في يوم الأول من التخزين، كما يلاحظ وجود فروق دالة إحصائيًا عند مستوى معنوية ($p \leq 0.05$) بين جميع المعاملات تحت الدراسة، حيث سُجلت زيادة في قيم الصلابة مع

زيادة النسبة المضافة من الكيتوزان الفطري. ألا أن هذه الزيادة في صلابة عينات خبز الكيتوزان لم تكن ذات تأثير على القبول الحسي لخبز الكيتوزان في جميع نسبه ولم تظهر فروق معنوية بينها وبين العينة الضابطة، كما هو الملاحظ في نتائج التقييم الحسي الشكل (2). يلاحظ كذلك تقلص هذا الفرق بين المعاملات مع زيادة فترة التخزين والممتدة إلى خمسة أيام، فقد ازدادت الصلابة في العينة الضابطة للخبز بشكل أكبر، بينما كانت درجة التغيير في الصلابة أقل عند إضافة الكيتوزان الفطري، حيث لم تسجل أي فروق معنوية بين العينة الضابطة ومعاملات الكيتوزان (0.5-1%) في اليوم الخامس من التخزين، وسجلت فروق معنوية بينها وبين 1.5% كيتوزان.

تتوافق هذه النتيجة مع النتائج التي تحصل عليها (Lee *et al.*, 2002a)، حيث ذكرت الدراسة أن إضافة الكيتوزان ذو الوزن الجزيئي العالي يؤثر في قوام الخبز. حيث تزداد صلابة الخبز بزيادة الوزن الجزيئي للكيتوزان المضاف عند بداية التخزين. وكانت درجة التغير في الصلابة أقل عند إضافة الكيتوزان خاصة بعد 4 أيام، حينها كلما زاد الوزن الجزيئي المضاف للكيتوزان انخفض معدل تغير الصلابة. بينما ازدادت الصلابة في العينة الضابطة بشكل أكبر كلما طالت فترة التخزين. ذُكر أنه نتيجة لذلك فأن إضافة الكيتوزان قد تأخر تجلد الخبز إلى حد ما. اختلفت نتائج الدراسة مع ما ذكره Ghoshal وMehta (2019) فقد أفادا أن صلابة الخبز ازدادت معنويًا بزيادة وقت التخزين ومع ازدياد نسب الكيتوزان المضافة. وقد يعود هذا لاختلاف طريقته بإضافة الكيتوزان عن الدراسة الحالية، ذلك كون الباحث أضاف الكيتوزان لدراسة أثره كأليلياف غذائية، فقد خُلط جافًا مع الدقيق ولم يتم إذابته مسبقًا، أما في الدراسة الحالية فقد اعتمد تذويب الكيتوزان مسبقًا قبل إضافته إلى العجين.

الجدول (2): نتائج القوام (جم) Firmness لعينات الخبز المحتوية على نسب من الكيتوزان الفطري.

المعاملات	القوام (جم) Firmness		
	اليوم الأول	اليوم الثالث	اليوم الخامس
العينة الضابطة	30.89±572.86 aA	35.66±914.89 aB	**59.04±1363.36 aC**
كيتوزان 0.5%	57.96±775.87 bA	45.34±1194.11 bB	**47.02±1405.29 aC**
كيتوزان 1%	36.4±966.37 cA	50.96±1236.28 bcB	**53.95±1512.75 abC**
كيتوزان 1.5%	42.13±985.53 cA	72.68±1414.8 cB	**56.08±1624.35 bB**

البيانات معبر عنها بالمتوسط ± SE الخطأ القياسي، عدد المكررات = 6

البيانات المتبوعة بنفس الحروف الصغيرة داخل نفس العمود لا يوجد بينها اختلافات معنوي ($p\leq0.05$).

البيانات المتبوعة بنفس الحروف الكبيرة داخل نفس الصف لا يوجد بينهم اختلافات معنوية ($p\leq0.05$).

4. تأثير إضافة الكيتوزان الفطري على الجودة الميكروبية لخبز القوالب:

تم تخزين الخبز المحضر بإضافة الكيتوزان الفطري بالنسب (0.5-1-1.5%)، والخبز المحضر بإضافة بروبيونات الكالسيوم والمستعملة تجاريًا بنسبة (0.3%)، والخبز المحضر بإضافة 0.7% حمض الأسكوربيك في درجة حرارة الغرفة لمدة خمسة أيام لقياس للكشف عن الجودة الميكروبية عن طريق اختبار تقدير أعداد الأعفان والخميرة والعد الكلي للبكتيريا مقارنة بالعينة الضابطة.

تم إجراء العد للأعفان والخميرة في التخفيف 10^2 و10^3 لعينات الخبز تحت الدراسة والمخزنة في درجة حرارة الغرفة (3±22°C)، لم يظهر أي نمو للأعفان والخميرة على أطباق اليوم الأول والثالث والخامس من التخزين،

وهذا يتفق مع نتائج الكشف البصري في الجدول (4)، فكما يظهر فيه لم يتم رصد أي نمو فطري على سطح شرائح الخبز إلا في اليوم السادس من الملاحظة.

توضح نتائج العد الكلي للبكتيريا زيادة أعداد البكتريا حتى اليوم الخامس من التخزين على درجة حرارة الغرفة وذلك لكل من العينة الضابطة وعينة الخبز المحتوي على حمض الأسكوربيك الجدول (3)، حيث كانت الزيادة معنوية ($p\leq0.05$) فقد بلغت الزيادة في اليوم الخامس للعينة الضابطة (1.13 $\log_{10}$ cfu/g)، وللخبز المحتوي على حمض الأسكوربيك (1.13 $\log_{10}$ cfu/g)، هذا ما ينفي التأثير الحافظ لحمض الأسكوربيك المستعمل في تذويب الكيتوزان. في حين انخفضت الأعداد الكلية للميكروبات في عينة الخبز المضاف إليه 0.5% كيتوزان باليوم الخامس من التخزين حيث بلغ الانخفاض (0.68 $\log_{10}$ cfu/g) وكان الانخفاض معنوي. أما بالنسبة لبروبيونات الكالسيوم فقد كان ذو تأثير حافظ حيث لم يسجل أي مستعمرات في اليوم الأول، وسجل نمو المستعمرات القابلة للحياة في اليوم الثالث عند (4.93 $\log_{10}$ cfu/g)، ثم في اليوم الخامس لم يسجل أي نمو. ازداد التأثير المضاد للبكتيريا بزيادة الكمية المضافة من الكيتوزان، فقد كان لمعاملتي (1-1.5%) كيتوزان تأثير الحفظ الأكبر، ولم يسجل أي نمو للمستعمرات طوال فترة التخزين الممتدة إلى خمسة أيام.

تتفق هذه النتائج مع دراسات أخرى أفادت بتحسن التأثير الحافظ للكيتوزان على الخبز مع زيادة الكمية المضافة من الكيتوزان (Kim, 2004; Lee *et al.*, 2002b).

جدول (3): نتائج العد الكلي للبكتيريا (log cfu/g) لعينات الخبز تحت الدراسة.

المعاملات	العد الكلي للبكتيريا (log cfu/g)		
	اليوم الأول	اليوم الثالث	اليوم الخامس
العينة الضابطة	0.13±4.82 ^{abA}	0.27±4.93 ^{aA}	**0.23±5.95 ^{aB}**
حمض الأسكوربيك	0.04±4.54 ^{bA}	0.26±4.52 ^{aAB}	**0.09±5.67 ^{aB}**
بروبيونات الكالسيوم	ND	0.01±4.93 ^{aA}	**ND**
كيتوزان 0.5%	0.04±5.07 ^{aA}	0.25±5.2 ^{aA}	**0.05±4.39 ^{bB}**
كيتوزان 1%	ND	ND	**ND**
كيتوزان 1.5%	ND	ND	**ND**

البيانات معبر عنها بالمتوسط ± SE الخطأ القياسي، عدد المكررات = 3

البيانات المتبوعة بنفس الحروف الصغيرة داخل نفس العمود لا يوجد بينها اختلافات معنوي ($p\leq0.05$).

البيانات المتبوعة بنفس الحروف الكبيرة داخل نفس الصف لا يوجد بينهم اختلافات معنوية ($p\leq0.05$).

ND لم تظهر أي نموات حتى التخفيف السادس.

5. الفحص البصري لعينات الخبز المضاف له نسب مختلفة من الكيتوزان الفطري:

الفساد الفطري هو سبب أساسي للخسائر الاقتصادية الكبيرة في منتجات المخابز وخاصة الخبز بأنواعه المختلفة، ويمكن اعتباره أيضًا مصدرًا للسموم الفطرية التي قد تؤدي إلى مشاكل في الصحة العامة (Legan, 1993). تتضح نتائج الفحص البصري لحالة ظهور ونمو العفن على شرائح الخبز أثناء التخزين في درجة حرارة الغرفة (3±22°C) لمدة سبعة أيام في **الجدول (4).**

كما يظهر في **الجدول (4)** تم تأكيد ظهور العفن بصريًا بداية من اليوم السادس من التخزين بكل من العينة الضابطة ومعاملة حمض الأسكوربيك، وبذلك ليس لحمض الأسكوربيك المستعمل في تذويب الكيتوزان الفطري تأثير مضاد لنمو العفن عند (pH 6.1). بينما كان للكيتوزان الفطري تأثير مضاد لنمو العفن على الخبز بجميع النسب تحت الدراسة (1.5-1-0.5%)، حيث لم يلاحظ أي ظهور للعفن طوال مدة الملاحظة وحتى بعد اليوم السابع من التخزين في معاملات الكيتوزان الفطري ومعاملة بروبيونات الكالسيوم.

كشفت دراسة Rakkhumkaew وPengsuk (2018) عن الخصائص المثبطة لنمو العفن الطبيعي للكيتوزان وأوليجوسكريدات الكيتوزان (COS) بنسبة 1% في الخبز، حيث أظهرت عينة الكيتوزان وCOS تأثيرًا مثبطًا لنمو العفن ولم يظهر أي نمو حتى بعد اليوم الرابع من التحضين، في حين أن العينة الضابطة أظهرت نمو أكبر للعفن على القشرة وسطح الشريحة. كذلك تتفق النتائج مع ما توصلت إليه دراسة Kim (2004) وذلك بأن التأثير المثبط لنمو العفن يزداد بزيادة التركيز المضاف من الكيتوزان.

جدول (4): نتائج ظهور العفن بالفحص البصري لعينات الخبز المضاف لها نسب مختلفة من الكيتوزان الفطري.

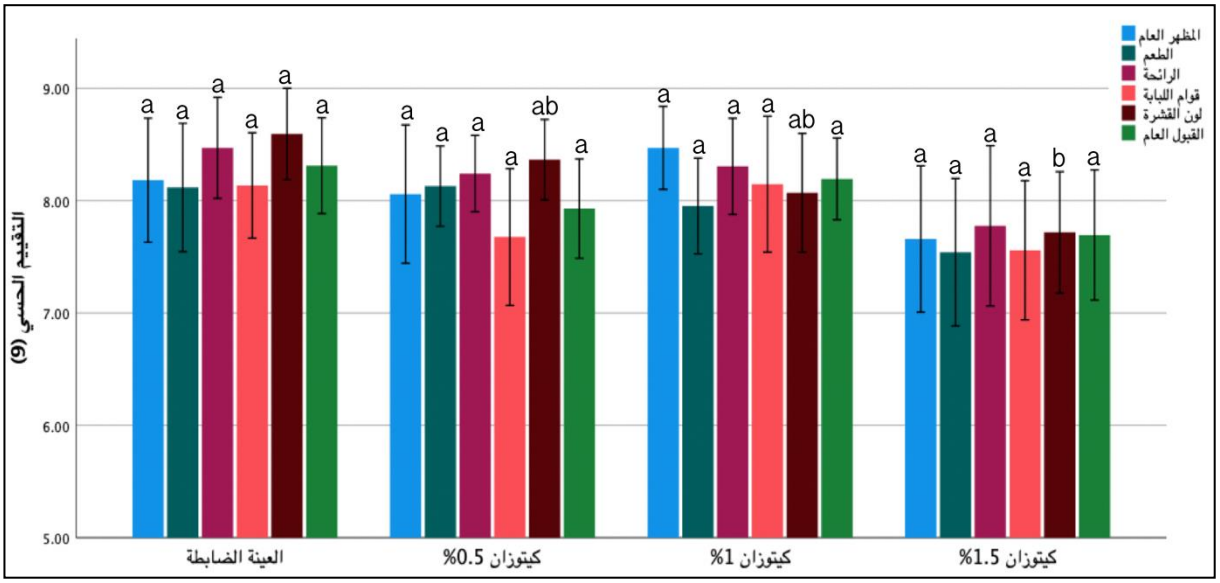
الزمن (يوم)	المعاملات					
	العينة الضابطة	حمض الأسكوربيك	بروبيونات الكالسيوم	كيتوزان 0.5%	كيتوزان 1%	كيتوزان 1.5%
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	+	+	-	-	-	-
7	+	+	-	-	-	-

(-) لم يظهر أي نمو للعفن، (+) بدأ نمو العفن بالظهور.

6. تأثير إضافة الكيتوزان الفطري على التقييم الحسي لخبز القوالب

يعد التقييم الحسي أحد أكثر المقاييس شيوعًا وفائدة والتي تعطي دلالة قوية ومباشرة في تقييم جودة ومدى قبول المنتجات الغذائية(Elía, 2011) . يتضح من **الشكل (2)** أنه لم يكن لإضافة الكيتوزان الفطري بنسب مختلفة (1.5-1-0.5%) إلى خبز القوالب تأثير معنوي ($p>0.05$) على التقييم الحسي للصفات التالية: المظهر العام وقوام اللبابة والطعم والرائحة والقبول العام لخبز القوالب. بينما أظهر التحكيم الحسي انخفاض في تفضيل لون القشرة الخارجية بزيادة الكمية المضافة من الكيتوزان الفطري إلا أن هذا الانخفاض لم يكن معنويًا في خبز الكيتوزان 0.5 و1% واللذان سجلا (8.36 و8.07) على التوالي، بينما كان الانخفاض معنويًا ($p \leq 0.05$) عند إضافة الكيتوزان للخبز بنسبة 1.5%، حيث سجلت العينة أدنى قيمة (7.72)، مقارنة بالعينة الضابطة والتي سجلت القيمة الأعلى عند (8.59).

قد يفسر نتائج اللون في القشرة ما ذكرته دراسة Kerch وآخرون (2010) والتي أظهرت تأثر القشرة الخارجية في الخبز بسبب إضافة الكيتوزان، حيث تكونت قشرة ذات لون أغمق وأكثر بنية، وأن هذا قد يكون بسبب زيادة كثافة تفاعل ميلارد، فقد نتج عن وجود الكيتوزان محتوى رطوبي أعلى في القشرة، مما قد يساهم في زيادة كثافة تفاعل ميلارد ودكانة لون القشرة، وبذلك فقد يجمع خبز الكيتوزان بين الخصائص المفيدة والمعززة للصحة في كل من الكيتوزان ونواتج تفاعل ميلارد المختلفة.



الشكل (2): نتائج التقييم الحسي لعينات الخبز المحتوية على نسب مختلفة من الكيتوزان الفطري.

الاستنتاجات:

في هذه الدراسة تم تقييم أثر الكيتوزان الفطري كمادة حافظة طبيعية مضادة للأحياء الدقيقة على إطالة فترة صلاحية الخبز وتأخير ظهور العفن مع الاحتفاظ بصفات الجودة الفيزيوكيميائية والقبول الحسي للخبز. أدت إضافة الكيتوزان الفطري إلى انخفاض معنوي في الحجم النوعي للخبز مقارنة بالعينة الضابطة، ولكن لم يكن لذلك تأثير كبير على الجودة الحسية للخبز أو مدى قبوله. لكن زيادة نسبة الكيتوزان إلى 1.5% أدت إلى انخفاض معنوي في التقييم الحسي للون قشرة الخبز. أنخفض معدل الفقد في الرطوبة كلما زادت نسبة الكيتوزان الفطري المضافة، ذلك قد يؤدي إلى تأخير حدوث التجلد. ازدادت الصلابة في اليوم الأول بزيادة نسبة الكيتوزان الفطري المضافة مقارنة بالعينة الضابطة، لكن لم تأثر هذه الزيادة على التقييم الحسي للقوام، وخلال التخزين ازدادت صلابة العينة الضابطة للخبز بشكل أكبر، بينما كان معدل التغيير في الصلابة أقل عند إضافة الكيتوزان الفطري، ولم تسجل أي فروق معنوية بين العينة الضابطة ومعاملات الكيتوزان (0.5-1%) في اليوم 5 من التخزين. بينت نتائج التحليل الميكروبي لعينات الخبز أن تأثير الحفظ كان الأفضل في عينتي 1-1.5% كيتوزان فطري فلم يظهر أن نمو للمستعرات خلال مدة التخزين الممتدة إلى خمسة أيام. بينما ظهر التأثير المثبط لنمو العفن الطبيعي عند إضافة الكيتوزان الفطري بجميع النسب 0.5-1-1.5% وإضافة بروبيونات الكالسيوم على حد سواء، ولم يتم رصد ظهور أي نمو للعفن طوال فترة الملاحظة والممتدة إلى سبع أيام. وبذلك توصي الدراسة بإمكانية إضافة الكيتوزان الفطري كمادة حافظة طبيعية للخبز بنسبة 1% ليكون تطبيقًا ناجحًا في صناعة الخبز، دون إخلال كبير في جودة الخبز أو القبول الحسي، وإمكانية إحلاله بدلًا عن المواد الحافظة الصناعية.

التوصيات:

الخبز والمخبوزات جزء أساسي من الغذاء اليومي، يومًا بعد يوم يزداد وعي المستهلكين بشأن جودة الغذاء فالتوجه للأغذية الطبيعية مع الحد الأدنى من المضافات الكيميائية متزايد، هذا ما يدفع العاملين في صناعة الأغذية إلى البحث عن حلول وإيجاد البدائل. تعتبر العديد من المركبات الطبيعية مضادات ميكروبية، ولكن للعاملين في صناعة المخبوزات استخدام مجموعة محدودة منها فقط، ويمكن اعتبار الكيتوزان الفطري مثال على ذلك، حيث يمكن بإضافته تمديد فترة صلاحية الخبز والمخبوزات مع تحقيق متطلبات السوق والمستهلكين في خفض المواد المضافة الاصطناعية.

وفي ختام هذا البحث توصي الدراسة بما يلي:

1. تقليل استهلاك المواد الحافظة الكيميائية والمواد المضافة الاصطناعية عمومًا، واستبدالها ببدائل حافظة طبيعية كالكيتوزان الفطري في صناعة المخابز والخبز تحديدًا، لما يمتاز به من فاعلية قوية في تمديد فترة الصلاحية الخبز مع تقديم خبز وظيفي في نفس الوقت.
2. التوصية بإمكانية إعداد خبز يحتوي على نسبة 1% من الكيتوزان الفطري كمادة حافظة طبيعية دون حدوث اختلافات كبيرة في الجودة الفيزيوكيميائية والقبول الحسي للخبز، وإن إضافة الكيتوزان الفطري كمادة حافظة طبيعية للخبز بنسبة 1% يمكن أن يكون تطبيقًا ناجحًا في صناعة الأغذية.
3. الدعوة إلى مزيد من الدراسات حول إضافة الكيتوزان الفطري للخبز لمعرفة تأثيراته الصحية وتأثيراته الوظيفية المختلفة، والتوسع في دراسة فوائد الخبز المحتوي على الكيتوزان الفطري كمنتج وظيفي.
4. تقييم تأثير استخدام الكيتوزان الفطري كطلاءات وأغلفة صالحة للأكل بدلاً من إضافته لخلطة الخبز على جودة الخبز الكلية.
5. الدعوة للإنتاج المحلي للكيتوزان الفطري والاستفادة من المخلفات الفطرية لتحقيق متطلبات السوق العربي منه وإنتاج منتج مزدهر في العديد من القطاعات، ودعم الباحثين والباحثات العرب الناشئين في سهولة الوصول إليه.

المراجع:

- المؤسسة العامة للحبوب. (2019). خط الأساس: مؤشر الفقد والهدر في الغذاء بالمملكة العربية السعودية. المؤسسة العامة للحبوب. المملكة العربية السعودية.
- سليمان، ضحى داود والعبادي، إيناس مظفر وموسى، مكارم علي. (2011). تأثير إضافة الكايتوسان على الصفات الريولوجية والحسية والخزنية لخبز اللوف. مجلة ديالي للعلوم الزراعية، 3(2)، 722–732.
- A.A.C.C. (1999). Approved methods of the American Association of Cereal Chemists International. Method 74-09.01. Published by American Association of Cereal Chemists. St. Paul, MN, USA.
- A.A.C.C. (2000). Approved methods of the American Association of Cereal Chemists. Published by American Association of Cereal Chemists. 10th ed. St. Paul, MN, U.S.A.
- Abo Elsoud, M. M., and El Kady, E. M. (2019). Current trends in fungal biosynthesis of chitin and chitosan. Bulletin of the National Research Centre, 43(59), 1–12. https://doi.org/10.1186/s42269-019-0105-y

- Ali, S., Ul-Haq, I., Qadeer, M. A., and Iqbal, J. (2002). Production of citric acid by Aspergillus niger using cane molasses in a stirred fermentor. Electronic Journal of Biotechnology, 5(3), 258–271. https://doi.org/10.2225/vol5-issue3-fulltext-3
- Ausar, S. F., Morcillo, M., León, A. E., Ribotta, P. D., Masih, R., Vilaro Mainero, M., Amigone, J. L., Rubin, G., Lescano, C., Castagna, L. F., Beltramo, D. M., Diaz, G., and Bianco, I. D. (2003). Improvement of HDL- and LDL-cholesterol levels in diabetic subjects by feeding bread containing chitosan. Journal of Medicinal Food, 6(4), 397–399. https://doi.org/10.1089/109662003772519985
- Axel, C., Zannini, E., and Arendt, E. K. (2017). Mold spoilage of bread and its biopreservation: A review of current strategies for bread shelf life extension. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 57(16), 3528–3542. https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1147417
- Ayo, J., and Nkama, I. (2004). Effect of acha (digitaria exilis) grain flour on the physico-chemical and sensory properties of bread. International Journal of Food Properties, 7(3), 561–569. https://doi.org/10.1081/JFP-200032971
- Batista, A. C., de Souza Paiva, W., and de Souza Neto, F. E. (2022). Chitosan. In J. M. Oliveira, H. Radhouani, and R. L. Reis (Eds.), Polysaccharides of Microbial Origin: Biomedical Applications (pp. 229–246). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-42215-8_14
- Chien, R. C., Yen, M. T., and Mau, J. L. (2016). Antimicrobial and antitumor activities of chitosan from shiitake stipes, compared to commercial chitosan from crab shells. Carbohydrate Polymers, 138, 259–264. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.061
- Dutta, P. K., Dutta, J., & Tripathi, V. S. (2004). Chitin and Chitosan: Chemistry, properties and applications. Journal of Scientific and Industrial Research, 63(1), 20–31.
- Elía, M. (2011). A procedure for sensory evaluation of bread: Protocol developed by a trained panel. Journal of Sensory Studies, 26(4), 269–277. https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.2011.00342.x
- FDA. (2011). Generally Recognized as Safe (GRAS) substance under the US FDA regulation. US Food and Drug Administration, GRAS NOTICE No. 397, FDA response letter.
- Ghoshal, G., and Mehta, S. (2019). Effect of chitosan on physicochemical and rheological attributes of bread. Food Science and Technology International, 25(3), 198–211. https://doi.org/10.1177/1082013218814285
- Gray, J. A., and Bemiller, J. N. (2003). Bread staling: Molecular basis and control. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2(1), 1–21. https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00011.x
- Gutiérrez, T. J. (2017). Chitosan Applications for the Food Industry. Chitosan, 183–232. https://doi.org/10.1002/9781119364849.ch8
- Harrigan, W. F., and McCance, M. E. (1976). Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic Press Inc.(London) Ltd.

- Hu, Z., and Gänzle, M. G. (2018). Challenges and opportunities related to the use of chitosan as a food preservative. Journal of Applied Microbiology, 126(5), 1318–1331. https://doi.org/10.1111/jam.14131
- Kerch, G., Rustichelli, F., Ausili, P., Zicans, J., Meri, R. M., and Glonin, A. (2008). Effect of chitosan on physical and chemical processes during bread baking and staling. European Food Research and Technology, 226(6), 1459–1464. https://doi.org/10.1007/s00217-007-0677-x
- Kerch, G., Zicans, J., and Meri, R. M. (2010). The effect of chitosan oligosaccharides on bread staling. Journal of Cereal Science, 52(3), 491–495. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2010.08.007
- Kim, J. (2004). Effect of Chitosan Addition on the Shelf-Life of Bread. The Korean Journal of Food and Nutrition, 17(4), 388–392.
- Knorr, D. (1991). Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. Food Technology. 45, 114-122.
- Lafarga, T., Gallagher, E., Walsh, D., Valverde, J., and Hayes, M. (2013). Chitosan-Containing Bread Made Using Marine Shellfishery Byproducts: Functional, Bioactive, and Quality Assessment of the End Product. J Agric Food Chem, 61, 8790–8796.
- Lee, H. Y., Kim, S. M., Kim, Y. J., Youn, S. K., Choi, J. S., Park, S. M., and Ahn, D. H. (2002a). Changes of Quality Characteristics on the Bread added Chitosan. Korean Journal of Food Science and Technology., 34(January), 449–453.
- Lee, H. Y., Kim, S. M., Kim, Y. J., Youn, S. K., Choi, J. S., Park, S. M., and Ahn, D. H. (2002b). Effect of Addition of Chitosan on Improvement for Shelf Life of Bread. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 31(3), 445–450. https://doi.org/10.3746/jkfn.2002.31.3.445
- Legan, J. D. (1993). Mould spoilage of bread: the problem and some solutions. International Biodeterioration and Biodegradation, 32(1–3), 33–53. https://doi.org/10.1016/0964-8305(93)90038-4
- Melikoglu, M., and Webb, C. (2013). Use of waste bread to produce fermentation products. In Food Industry Wastes (First Edit). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391921-2.00004-4
- MFDS. (2016a). Health Functional Food Code. Ministry of Food and Drug Safety, Korea.
- MFDS. (2016b). Ministry of Food and Drug Safety White Paper. Ministry of Food and Drug Safety, Korea.
- MFDS. (2020). Food additives code. Ministry of Food and Drug Safety, Korea, 59(7).
- MHLW. (2020). Additive code. Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan. https://www.mhlw.go.jp/topics/yunyu/tetsuzuki-fains/dl/2-08.pdf
- Narisetty, V., Nagarajan, S., Gadkari, S., Ranade, V. V, Zhang, J., Patchigolla, K., Bhatnagar, A., Kumar Awasthi, M., Pandey, A., and Kumar, V. (2022). Process optimization for recycling of bread waste into

bioethanol and biomethane: A circular economy approach. Energy Conversion and Management, 266, 115784. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enconman.2022.115784

- Rabea, E. I., Badawy, M. E. T., Stevens, C. V., Smagghe, G., & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. Biomacromolecules, 4(6), 1457–1465. https://doi.org/10.1021/bm034130m
- Rakkhumkaew, N., and Pengsuk, C. (2018). Chitosan and chitooligosaccharides from shrimp shell waste: characterization, antimicrobial and shelf life extension in bread. Food Science and Biotechnology, 27(4), 1201–1208. https://doi.org/10.1007/s10068-018-0332-2
- Ulziijargal, E., Yang, J. H., Lin, L. Y., Chen, C. P., and Mau, J. L. (2013). Quality of bread supplemented with mushroom mycelia. Food Chemistry, 138(1), 70–76. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.051
- Wang, Y., Zhang, W., & Fu, L. (2017). Food Spoilage Microorganisms: ecology and control. CRC Press.