

# بررسی اثرات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره اناریجه در افزایش عمر ماندگاری ماهی کیلکای چرخ شده تلقیح شده با لیستریا مونوسیتوژنز

الهام شکوه صارمی<sup>۱</sup>، محمد باقر حبیبی نجفی<sup>۲\*</sup>، محمد حسین حداد خداپرست<sup>۳</sup> معصومه بحرینی<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی دکتری میکروبیولوژی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۳- گروه زیست شناسی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۶/۰۷

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۲۵

## چکیده

در این پژوهش اثرات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره هیدروالکلی اناریجه در افزایش عمر ماندگاری ماهی کیلکای چرخ شده تلقیح شده با لیستریا مونوسیتوژنز مورد بررسی قرار گرفت. عصاره گیاه اناریجه با روش اولتراسوند استخراج شد. فعالیت آنتی اکسیدانی غلظت های مختلف عصاره ۵۰۰ تا ۲۰۰۰ ppm روش مهار رادیکال های آزاد DPPH و روش بیرنگ شدن بتاکاروتن اندازه گیری شد. همچنین نمونه ها از نظر رشد لیستریا مونوسیتوژنز تلقیح شده و شمارش کلی در دماهای ۴، ۱۰ و ۱۲- درجه سانتیگراد مقایسه شدند. نتایج نشان داد در هر دو روش با افزایش غلظت عصاره فعالیت آنتی اکسیدانی افزایش می یابد که به دلیل افزایش میزان ترکیبات فنولی است. ترکیبات فنولی عصاره دارای خاصیت آنتی اکسیدانی و فعالیت ضد میکروبی بودند. اثرات آنتی اکسیدانی عصاره ها با اندازه گیری شاخص های عدد پراکسید، عدد اسید تیوباریتوریک و مقادیر بازهای نیتروژنی فرار مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد عصاره اناریجه از اکسیداسیون چربی و رشد میکروب ها در ماهی کیلکای چرخ شده جلوگیری کرد. مقادیر بدست آمده این شاخص ها برای نمونه حاوی لاکتات سدیم بیشتر از نمونه های حاوی عصاره بود. عصاره اناریجه دارای اثرات ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی است و بر روی طعم غذا و رایحه ماهی موثر است. گیاه اناریجه پتانسیل جایگزین شدن به عنوان یک آنتی اکسیدان و ضد میکروب طبیعی در صنعت غذا را دارا است.

واژه های کلیدی: اناریجه، عصاره، کیلکا، آنتی اکسیدان، ضد میکروب

\*مسئول مکاتبات: [habibi@um.ac.ir](mailto:habibi@um.ac.ir)

## ۱- مقدمه

تقاضای مصرف کنندگان برای غذاهای مغذی، آماده به مصرف، دارای عمر ماندگاری طولانی و عاری از افزودنی های سنتزی منجر به تحقیقات گسترده ای در صنعت غذا و در جهت بدست آوردن غذاهای ایمن و سالم شده است. وجود اسیدهای چرب چند غیراشباع<sup>۱</sup> در ماهی برای سلامتی سودمند است (۱۲). ماهیان چرب منبع غنی از امگا ۳ هستند. ماهی کیلکا معروفترین ماهی کوچک در دریای خزر است. ماهی کیلکای معمولی (C.c. caspia) متداولترین گونه صید شده کیلکا در جنوب دریای خزر می باشد (۲۱). وجود اسیدهای چرب چند غیراشباع در ماهی منجر به کاهش کیفیت ماهی به دلیل اکسایش می شود. لذا لازم است به منظور کاهش توسعه اکسایش، رنسدیتی<sup>۲</sup> توسعه بوهای نامطبوع، کاهش ارزش تغذیه ای و نهایتاً کاهش بازارپسندی محصول روش های محافظت محصول انجام شود (۲۵). روش های گوناگونی برای به تاخیر انداختن و یا جلوگیری از اکسیداسیون وجود دارد که از آن جمله می توان به فریز کردن (۱۱) و افزودن آنتی اکسیدان ها می باشد (۴۸). افزایش تقاضای مصرف کنندگان به غذاهایی که حداقل فرآیند بر روی آن ها انجام شده باشد و کمترین مقادیر نگهدارنده های ضد میکروبی مصنوعی در آن ها بکار رفته باشد منجر به استفاده از اسانس ها و عصاره های گیاهی دارای خاصیت ضد میکروبی در صنعت غذا شد (۱۰). این ترکیبات با اثر بر مکانیسم دیواره فسفولیپیدی میکروارگانیسم ها و همچنین سیستم آنزیمی و مواد ژنتیکی باکتری ها باعث از بین رفتن باکتری ها و اعمال اثرات ضدباکتریایی در محصولات غذایی می شوند (۱۳). اناریجه<sup>۳</sup> نام علمی *Pimpinella affinis* Ledeb است یکساله و در مطالعات بسیار آزمایشگاهی خواص آن ثابت شده است (۳۶). در این مطالعه سعی بر آن شد تا اثر عصاره اناریجه بر واکنش های فساد میکروبی و شیمیایی طی

دوره نگهداری در ماهی کیلکای چرخ شده مورد بررسی قرار بگیرد.

## ۲- مواد و روش ها

## ۱-۲- مواد

مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش از شرکت مرک آلمان و سیگما آلدریج خریداری شدند و از ماهی کیلکا با نام علمی *Clupeonella cultriventris caspia* استفاده گردید. مقدار ۵۰ کیلوگرم ماهی کیلکا از مرکز ملی تحقیقات فراوری آذربایجان واقع در شهرستان انزلی تهیه شد. گیاه اناریجه بعد از جمع آوری از رویشگاه های طبیعی این گیاه در استان مازندران توسط بخش گیاهشناسی دانشگاه ساری مورد تایید قرار گرفت. سپس در محیط خشک و تاریک به دور از نور خورشید و در جریان هوا خشک شد و با آسیاب بصورت پودر درآمد و توسط الک با مش ۸۰ (۸۰۰ میکرون) الک شد و برای عصاره گیری استفاده شد.

## ۲-۲- روش ها

بلافاصله پس از انتقال ماهی ها به آزمایشگاه، ترکیبات شیمیایی ماهی، شامل رطوبت، خاکستر، پروتئین و چربی با استفاده از روش استاندارد AOAC (۷) انجام شد. استخراج عصاره اناریجه با روش آلبو و همکاران (۵) و با استفاده از حمام اولتراسوند به مدت ۳۰ دقیقه و دمای ۳۵ درجه سانتیگراد و فرکانس ۳۵ کیلو هرتز انجام شد. تریبات فنولی عصاره با استفاده از روش طیف سنجی با معرف فولین سیوکالتیو اندازه گیری شد (۱۷). قدرت آنتی اکسیدانی عصاره با روش مهار رادیکال آزاد DPPH (۱۸) و بیرنگ شدن بتاکاروتن:لینولئیک اسید (۶) ارزیابی شد.

## ۳-۲- تهیه ماهی کیلکای چرخ شده و تیمار با عصاره

سر، دم، پوست، باله و استخوان پشتی نمونه ها جدا و قسمتهای خوراکی ماهی انتخاب شد و با استفاده از چرخ گوشت (پارس

<sup>1</sup>- Poly unsaturated fatty acid (PUFA)

<sup>2</sup>-Rancidity

<sup>3</sup>-Pimpinella

های شمارش باکتری های های لیستریا مونوسیژنوز و شمارش کلی میکروارگانسیم ها به ترتیب مطابق با روش ICMSF (۲۶) انجام شد. عدد پراکسید، عدد TBA و بازهای از ته فرار نیز مطابق با روش AOCs شماره (Cd 8-53) ، (Cd 19-90) (۸) و روش جن و همکاران (۲۸) انجام شد.

#### ۲-۴- تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل نتایج بدست آمده از آزمایشات تعیین قدرت آنتی اکسیدانی عصاره، شمارش میکروبی، عدد پراکسید، عدد اسید تیوباریتوریک و بازهای نیتروژنی فرار نمونه های مختلف ماهی در قالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی صورت گرفت. تجزیه و تحلیل داده ها با نرم افزار SPSS بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ و رسم نمودارها با نرم افزار Microsoft excel نسخه ۲۰۱۳ انجام شد. به منظور کاهش خطا کلیه آزمایشات در سه تکرار انجام شد.

#### ۳- نتایج و بحث

##### ۳-۱- ترکیب شیمیایی ماهی کیلکای اولیه

ماهی منبع با ارزشی از ترکیبات پروتئینی است. مصرف منظم ماهی از افسردگی، بیماری های قلبی و سایر بیماری ها جلوگیری می کند (۵۲). مقادیر مربوط به تجزیه تقریبی ماهی کیلکا در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. ترکیب شیمیایی ماهی کیلکای اولیه (وزن مرطوب %)

رطوبت	چربی	پروتئین	خاکستر
۷۲/۰±۰/۸/۰۴	۸/۰±۲/۴۲	۱۶/۰±۶/۱۳	۳/۰±۱۲/۱۱

کیلکا را به ترتیب ۷۵، ۶/۵ و ۱۵/۵ درصد به ترتیب برای رطوبت، چربی، پروتئین و خاکستر اعلام نمودند. پیرستانی و همکاران (۳۸) نیز در پژوهشی مشابه ترکیبات تشکیل دهنده ماهی کیلکا را به ترتیب ۷۰/۸ و ۱۰/۲ گزارش نمودند. پیرستانی و همکاران (۳۹) مقادیر چربی در ماهی کیلکای

خزر- ایران) چرخ شدند. سپس ماهی های چرخ شده به نسبت ۱:۳ (محلول: ماهی) به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۰/۳٪  $\text{NaHCO}_3$  با دمای ۱۰ درجه سانتیگراد غوطه ور شدند. سپس با دست فشرده شدند تا آب اضافی آن ها خارج شود (۳). سوسپانسیون میکروبی لیستریا مونوسیژنوز با کدورت ۰/۵ مک فارلند به نمونه های ماهی چرخ شده افزوده شد. هر تیمار حاوی ۱۰۰ گرم گوشت چرخ شده ماهی می باشد. از نمونه های آلوده مذکور به منظور کنترل غلظت میکروب ها کشت به عمل آمد. پس از آن، بهترین عصاره از نظر خاصیت ضد میکروبی در سه غلظت ۸، ۹ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر (حداقل غلظت مانع کننده و دو غلظت بالاتر) به نمونه های ماهی چرخ شده افزوده شد. برای نمونه کنترل از لاکتات سدیم ۶۰٪ به میزان ۱۸ میلی گرم بر کیلوگرم استفاده شد.

##### ۲-۴- بسته بندی و نگهداری ماهی های چرخ شده

نمونه ها در شرایط استریل و در بسته های پلی اتیلنی قرار گرفتند و در سه دمای ۴، ۱۰ و ۱۲-درجه سانتیگراد نگهداری شدند. در زمان های ۰، ۱۵، ۳۰، ۴۵ روز نگهداری، شاخص های شیمیایی عدد پراکسید، عدد اسید تیوباریتوریک، مجموع بازهای از ته فرار و آزمون های میکروبی شمارش انواع میکروارگانسیم و شمارش کلی میکروارگانسیم ها اندازه گیری شد. کلیه آزمایشات در سه تکرار انجام شد. آزمون

بیش از ۸ درصد از ترکیب ماهی از چربی و اسیدهای چرب غیر اشباع تشکیل شده است که آن را مستعد اکسیداسیون کرده است. همچنین میزان پروتئین در ماهی بالا است که شرایط را برای فعالیت باکتری های پروتئولیتیک مناسب نموده است (۲۹). خانی پور و همکاران (۲۹) ترکیبات شیمیایی ماهی

۳-۲- ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ترکیبات فنولی متابولیت‌های ثانویه آروماتیک گیاهی با تاثیرات بیولوژیکی متعدد همچون فعالیت آنتی اکسیدانی و فعالیت ضدباکتریایی هستند. مقدار کل ترکیبات فنولی عصاره اناریجه در این پژوهش ۱۸۳۶/۶۹ (mgGA/۱۰۰gE) بود که با نتایج تارون و همکاران (۵۰) مطابقت داشت. نتایج مربوط به فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره در جدول ۲ نشان داده شده است. با افزایش غلظت عصاره، فعالیت آنتی اکسیدانی آن در هر دو روش افزایش یافت و اختلاف معنی دار آماری ( $P < 0.05$ ) بین غلظت‌های مختلف مشاهده شد. آنتی اکسیدان‌ها با مقاومت به اکسایش را افزایش می‌دهند. عصاره گیاه اناریجه حاوی ترکیبات فنولی است که این ترکیبات با خاصیت جاروب کنندگی رادیکال‌های آزاد اثرات آنتی اکسیدانی خود را اعمال می‌کنند (۵۰).

معمولی را به ترتیب ۱۰/۲ و ۴٪ گزارش نمودند. ماهی کیلکای مورد مطالعه در این پژوهش در دسته ماهیان پرچرب قرار می‌گیرد. پیرستانی و همکاران (۳۹) محتوی پروتئینی ماهی از عوامل مهم موثر و تاثیر گذار بر کیفیت و بافت ماهی است. ماهیچه‌های ماهی که حاوی مقادیر کمی پروتئین است ظرفیت کمی برای نگهداری آب بعد از پخت دارد که در نتیجه منجر به از بین رفتن ساختار ماهی بعد از پخت می‌شود (۲). همانطور که مشاهده می‌شود ماهی به دلیل دارا بودن مقادیر بالای رطوبت، پروتئین و چربی مکان مناسبی برای رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. دلیل اختلاف جزئی در مقادیر تجزیه تقریبی ممکن است به دلیل اختلاف در گونه مورد بررسی، جنسیت ماهی، تغذیه، فاکتورهای ژنتیکی، سن ماهی، ویژگی‌های آب از قبیل درجه حرارت، شوری و محل جغرافیایی، فصل صید و تفاوت در روش‌های تجزیه ای باشد (۴۴).

جدول ۲. فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها در غلظت‌های مختلف

روش	۵۰۰	۱۰۰۰	۱۵۰۰	۲۰۰۰
B-Caroten	۲۸/۴۹a	۳۸/۹۸b	۵۲/۲۱c	۶۹/۱۵d
DPPH	۳۶/۲۷a	۵۶/۷۹b	۷۴/۹۸c	۸۱/۷۴d

حروف غیر مشابه در هر سطر نشان‌دهنده اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد است.

عصاره همگی عوامل دارای تاثیر معنی دار آماری بر تعداد میکروارگانیسم‌ها، عدد پراکسید، عدد TBA و بازهای ازته فرار بوده اند. همچنین اثر متقابل فاکتورهای غلظت\*روز و غلظت\*دما بجز تعداد میکروارگانیسم بر سایر عوامل مورد بررسی تاثیر معنی دار آماری داشته است.

۳-۳- اثر متغیرهای مختلف بر خصوصیات شیمیایی و میکروبی ماهی حاوی لیستریامونوسیتوزنز  
نتایج تاثیر سطوح مختلف دما، زمان نگهداری، غلظت عصاره و اثر متقابل فاکتورها بر خصوصیات شیمیایی و میکروبی نمونه‌های تیمار شده با لیستریامونوسیتوزنز در جدول ۳ نشان داده شده است. مشاهده می‌شود زمان نگهداری، دما و غلظت

جدول ۳. تجزیه واریانس اثر متغیرهای مختلف بر خصوصیات شیمیایی و میکروبی ماهی حاوی لیستریامونوسیتوژنز

بازهای ازته فرار (mgN2/100grmeat)	عدد TBA mg MA/kg (Oil)	عدد پراکسید (meqO2/kgOil)	شمارش کلی میکروارگانیزم (CFU/gr)	تعداد لیستریامونوسیتوژنز (CFU/gr)	درجه آزادی	
۲۱۸۳/۲۸*	۷/۶۶*	۸/۴۵*	۱۴۹/۷۵*	۱۳۹/۷۹*	۳	روز
۱۲۵۷/۲۶*	۰/۵۱*	۳/۵۵*	۲۲۱/۱۸*	۱۹۹/۸۴*	۲	دما
۴۸۷/۱۱*	۰/۷۲*	۲/۶*	۲۶/۷۶*	۲۶/۵۳*	۳	غلظت
۸۸/۰۵*	۰/۲۹*	۰/۵۳*	۶/۲۶*	۶/۶۷ns	۹	غلظت*روز
۴۶/۷۱*	۰/۱۴*	۰/۲۱*	۷/۴۰*	۷/۱۲ns	۶	غلظت*دما
۱۶/۰۷	۰/۰۴	۰/۰۷	۰/۵۶	۳/۴۱	۱۲۰	خطا

\*اختلاف معنی دار در سطح ۵٪، ns اختلاف معنی دار نیست.

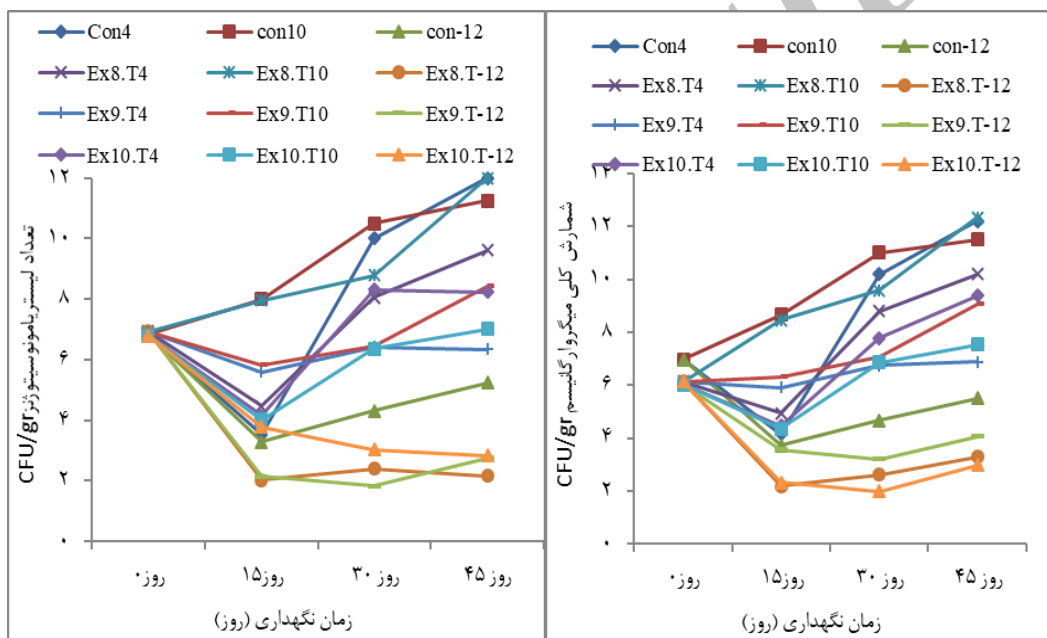
### ۳-۴- شمارش میکروبی

یابد. ضد میکروب ها اصلی ترین مواد مورد استفاده برای کاهش فساد در مواد غذایی هستند. مواد ضد میکروبی سنتزی علاوه بر هزینه بالا، مشکل مقاوم شدن عوامل میکروبی را نیز در پی دارند (۲۹). در نمونه های حاوی عصاره، با افزایش غلظت عصاره رشد میکروارگانیزم ها کاهش یافت. این نتایج با نتایج پزشکی و همکاران (۳۷) مطابقت دارد. مکانیزم اثرات کشندگی و ممانعت کنندگی عصاره بر روی باکتری لیستریا مونوسیتوژنز بخوبی مشخص نیست (۳۷). این نتایج با نتایج عبدالله زاده و همکاران (۱) مطابقت داشت. آن ها ضمن بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس آویشن در دو غلظت ۰/۴ و ۰/۸ درصد بر رشد لیستریا مونوسیتوژنز اعلام نمودند که با افزایش غلظت عصاره میزان رشد باکتری کاهش می یابد. این نتایج با نتایج دیجان و همکاران (۴۹) در مورد تاثیر عصاره های گیاهی بر رشد میکروارگانیزم ها در گوشت و همچنین با نتایج لی و همکاران (۱۶) در مورد تاثیر عصاره رزماری و پلی فنول های چای بر رشد باکتری ها مطابقت دارد که هر دوی آن ها به اتفاق اعلام نمودند ترکیبات فنولی عصاره ها از رشد میکروارگانیزم ها جلوگیری می نمایند. خواص

ماهی از غذاهای پروتئینی فسادپذیر است. زمانیکه ماهی در دمای کمتر از ۱۰ درجه سانتیگراد نگهداری می شود بعد از ۴۰ ساعت فاسد می شود. فریز کردن موجب جلوگیری از فساد ماهی نمی شود زیرا فعالیت های اتولیتیک و تغییرات شیمیایی در ماهی بلافاصله بعد از صید اتفاق می افتد (۲۷). فعالیت میکروارگانیزم ها در ماهی منجر به بروز بوهای نامطبوع، تخریب بافت و ظاهر ماهی می شوند (۴۱). شکل ۱. تعداد میکروارگانیزم رشد کرده طی دوره نگهداری در نمونه های مختلف را نشان می دهد. لیستریامونوسیتوژنز یکی از میکروارگانیزم های بیماریزای مهم است که ۳۰ درصد مرگ و میر در دنیا ناشی از بیماری های لیستریایی است (۱۴). نتایج نشان داد که با افزایش زمان نگهداری، تعداد نهایی باکتری و شمارش کلی میکروب در تمام نمونه های مورد بررسی روند افزایشی داشته است. این نتایج با نتایج بررسی دیسای و همکاران (۱۵) مطابقت دارد. در پژوهش آن ها نشان دادند در نمونه کنترل همواره روند رشد لیستریا مونوسیتوژنز افزایشی بوده و با افزایش غلظت عصاره رشد لیستریایی کاهش می

میکروارگانسیم های رشد کرده کاهش می یابد. عصاره هیدروالکلی اناریجه به سبب دارا بودن ترکیبات قطبی و غیر قطبی توانایی حل شدن در آب و چربی موجود در ماهی را دارد. در دمای های زیر صفر درجه سانتیگراد رطوبت موجود در ماهی به شکل منجمد وجود دارد. لذا بخش اعظم عصاره با میکروارگانسیم ها درگیر می شود و اثرات آنتی باکتریایی خود را اعمال می کند. بنابراین در دمای ۱۲- درجه سانتیگراد سرعت رشد میکروارگانسیم ها در نمونه های حاوی عصاره کمتر بود.

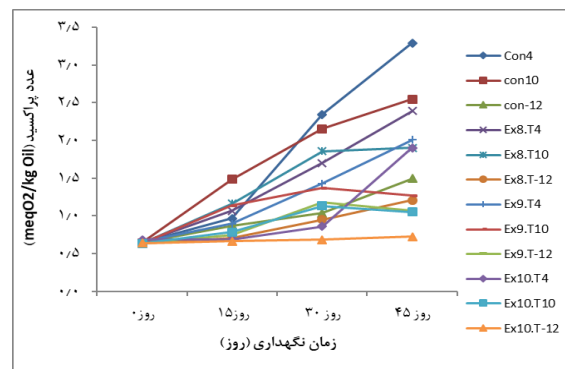
بازدارندگی از رشد میکروبها مربوط به ترکیبات فنولی عصاره ها است که محلول درحلالهای قطبی می باشد. در مطالعات اخیر اثرات آنتی میکروبی ترکیبات فنولی، ترین ها و تری ترپنوئیدها در عصاره های گیاهی به اثبات رسیده است (۳۶). تخریب دیواره سلولی منجر به نشت محتویات سلولی به بیرون و در نتیجه مرگ سلول می شود (۱۳). همچنین مشاهده شد که با کاهش دما تعداد میکروارگانسیم های رشد کرده کاهش می یابد. کاهش دما منجر به کند شدن واکنش های ایجاد کننده فساد میکروبی در ماهی می شود و در نتیجه تعداد



شکل ۱. میانگین تغییرات رشد لیستریامونوسیتوژنز و شمارش کلی میکروب

### ۳-۵- اکسیداسیون چربی

گوشت ماهی سیستم پیچیده و محیط مناسب برای اکسایش سریع چربی است. اکسیداسیون چربی دلیل اصلی از بین رفتن کیفیت ماهی در دوره نگهداری است که منجر به تخریب ویتامین ها، رنگ رفتگی ماهی و از دست رفتن اسیدهای چرب ضروری می شود. تمام این تغییرات منجر به کاهش ارزش تغذیه‌ای ماهی می شوند (۳۳). چربی موجود در ماهی (اسیدهای چرب چند غیر اشباع در ماهی (ایکوزاپنتانوئیک اسید و دوکوزاهگزانوئید اسید) در طی دوره نگهداری مستعد اکسیداسیون است که یکی از دلایل مهم فساد محصولات ماهی و شکل گیری ترکیبات سمی و کاهش ارزش تغذیه‌ای ماهی است. حساسیت بالای ماهی همچنین به دلیل وجود عناصر آهن، مس و همچنین رنگدانه های هموگلوبین و میوگلوبین در ماهی است. مقادیر بالای اکسیژن فرآیند تغییرات اکسیداتیو در ماده غذایی را تسریع نموده و موجب تاثیر منفی بر کیفیت گوشت می شود (۴۲). شکل ۲. تغییرات عدد پراکسید نمونه های حاوی لیستریا مونوسیتوزنز طی دوره نگهداری را نشان می دهد. مشاهده می شود در تمام نمونه های مورد بررسی روند تغییرات عدد پراکسید افزایشی است (۴۳).



شکل ۲. میانگین تغییرات عدد پراکسید در نمونه های تیمار شده با لیستریا مونوسیتوزنز

ناگهانی عدد پراکسید ممکن است به دلیل واکنش های ثانویه اکسیداسیون و تولید کربونیل ها و ترکیبات فرار باشد. فرآیند اکسیداسیون چربی فرآیند چند وجهی پیچیده متشکل از چندین واکنش متفاوت است که منجر به تغییرات فیزیکی و شیمیایی بسیاری می شود (۱۵). همچنین از نتایج برمی آید که نمونه شاهد (حاوی لاکتات سدیم) بالاترین میزان رشد میکروبی را داشته است و با افزایش غلظت عصاره از ۸ به ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره اکسیداسیون چربی کاهش یافت که منجر به کاهش مقادیر پراکسید و مالون آلدئید تولید شده در نمونه های حاوی عصاره شد. این نتایج با نتایج مقصود و همکاران (۳۳) مطابقت دارد. آن ها اثرات آنتی اکسیدانی عصاره هسته خرما بر اکسیداسیون ماهی خرد شده را مورد بررسی قرار دادند. روند تغییرات عدد پراکسید در نمونه شاهد افزایشی بود و بعد از روز ۸ نگهداری مقدار عدد پراکسید ماهی به ۱۸ رسید و سپس کاهش یافت. دلیل اصلی کمتر بودن عدد پراکسید در نمونه های حاوی عصاره را کاهش تولید هیدروپراکسیدها اعلام نمودند که در نتیجه وجود ترکیبات فنولی عصاره اتفاق می افتد. نوع ماهی در پژوهش آن ها از نوع اسقومری (خال خالی) بود که با نوع ماهی پژوهش ما متفاوت است که می تواند دلیلی برای تفاوت عدد پراکسید در دو نمونه شاهد باشد. عدد تیوباربتوریک اسید بطور گسترده برای توصیف اکسیداسیون چربی در حضور واکنشگر TBA و ترکیبات حاصل از تجزیه محصولات اولیه اکسیداسیون یعنی آلدئیدها و کتون ها (محصولات ثانویه) انجام می شود (۳۴). در واقع اندازه گیری عدد پراکسید روشی واقعی برای پی بردن به میزان اکسیداسیون در روغن های حاوی مقادیر بالای اسیدهای چرب غیر اشباع محسوب نمی شود، زیرا محصولات اولیه اکسیداسیون ناپایدارند و به سرعت به محصولات ثانویه اکسیداسیون تبدیل می شوند. لذا لازم است در کنار اندازه گیری عدد پراکسید از سایر روش های شاخص اندازه گیری اکسیداسیون استفاده شود (۴۵). تغییرات عدد اسید تیوباربتوریک در شکل ۳ نشان داده شده است.

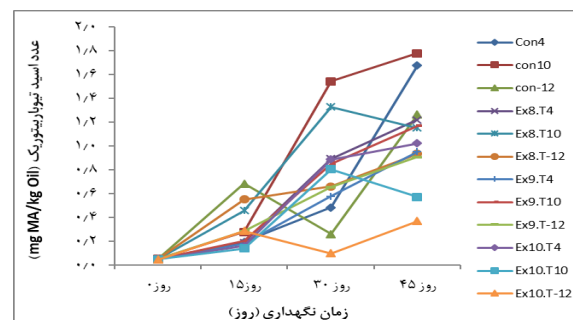
با افزایش زمان نگهداری هیدروپراکسیدها به محصولات ثانویه اکسیداسیون تبدیل می شوند. به عبارت دیگر کاهش

با افزایش غلظت عصاره عدد TBA در نمونه‌های مختلف کاهش یافت. در نتیجه کاهش تشکیل هیدروپراکسیدها تولید محصولات ثانویه اکسیداسیون نیز به تاخیر افتاد. این نتایج با نتایج مقصود و بنجاکول (۳۳) مطابقت دارد. مواد فنولی موجود در عصاره اناریجه اضافه شده به گوشت ماهی توانایی جلوگیری از تشکیل TBARS را دارا هستند (۹). با افزایش غلظت عصاره مقادیر ترکیبات فنولی بازدارنده اکسیداسیون افزایش می‌یابد. همچنین این ترکیبات فنولی می‌توانند به عنوان سینرژیست عمل کنند و اثر آنتی‌اکسیدانی را شدت ببخشند (۳۳).

### ۳-۶- بازهای ازته فرار

یکی از شاخص‌های شیمیایی تعیین‌کننده فساد غذاهای دریایی مقادیر بازهای نیتروژنی فرار (TVB-N) می‌باشد و یک اصطلاح کلی برای مجموع تری‌متیل‌آمین (که بوسيله باکتری‌های عامل فساد تولید می‌شوند)، دی‌متیل‌آمین (که بوسيله آنزیم‌های خودبخودی موجود در گوشت طی نگهداری سرد ایجاد می‌شوند)، آمونیاک (که در نتیجه دامیناسیون آمینواسیدها و کاتابولیسم نوکلوتیدها ایجاد می‌شود) و دیگر ترکیبات فرار که در ترکیبات آن‌ها نیتروژن وجود دارد و در نتیجه فساد غذاهای دریایی تولید می‌شوند، می‌باشد (۳۲). آنزیم‌های موجود در گوشت و فعالیت‌های باکتری‌های موجود در گوشت هر دو بر روی مقدار بازهای نیتروژنی فرار موثرند (۴۰). شکل ۴ بازهای ازته فرار نمونه‌های مختلف را نشان می‌دهد. مشاهده می‌شود در تمام نمونه‌های مورد بررسی با روند افزایشی در تولید بازهای ازته فرار روبرو هستیم. در ابتدای دوره نگهداری جمعیت باکتریایی در فاز پایه قرار داشت و با سرعت کمی رشد نمودند لذا مقدار بازهای ازته فرار با گذشت زمان تولید بازهای ازته با سرعت

روند تغییرات عدد اسیدتیوباریتوریک برای تمام نمونه‌ها افزایشی بود توکر و همکاران (۱۱) و تنها در چند نمونه کاهش مشاهده شد. این نتایج همراستا با نتایج سیف زاده و همکاران (۴۷) می‌باشد. کاهش عدد TBA در پایان دوره نگهداری به دلیل از دست رفتن ترکیبات با وزن مولکولی پایین که در نتیجه تجزیه محصولات پیشرفته اکسیداسیون ایجاد می‌شوند، می‌باشد (۳۴). همچنین ممکن است به دلیل واکنش بین مالون‌آلدئید و آمینواسیدهای موجود در ماهی که منجر به تشکیل ترکیبات کربونیل می‌شود عدد TBA در ماهی ابتدا افزایش و سپس کاهش یابد. اسپرمولر و همکاران (۴۵) میزان ۷-۸ میلی‌گرم مالون‌آلدئید بر کیلوگرم روغن را بالاترین حد قابل قبول برای تازگی ماهی دانستند. مشاهده می‌شود که در تمام نمونه‌های حاوی عصاره عدد TBA در محدوده قابل قبول قرار دارد. نمونه شاهد بالاترین میزان عدد TBA را داشت و در نمونه‌های حاوی عصاره اناریجه مقادیر عدد TBA کمتر بود. این نتایج با نتایج تیان سیلاکول و همکاران (۴۳) و فهیم دزیان و همکاران (۱۹) مطابقت داشت. در پژوهش آن‌ها همواره نمونه شاهد بالاترین عدد اسیدتیوباریتوریک را داشت. بنجاکول و همکاران (۳۳)، سانجس آلنسو و بردریاس (۴۵) اعلام نمودند مقادیر TBA برای نمونه‌های حاوی آنتی‌اکسیدان بسیار کمتر از نمونه شاهد است. گوکوگلو و همکاران (۲۲) نشان دادند که در نمونه‌های ماهی حاوی کاتچین و سس انار اکسیداسیون چربی بسیار کمتر است.



شکل ۳. میانگین تغییرات عدد اسید تیوباریتوریک در نمونه

های تیمار شده با لیستریا مونوسیژنوز



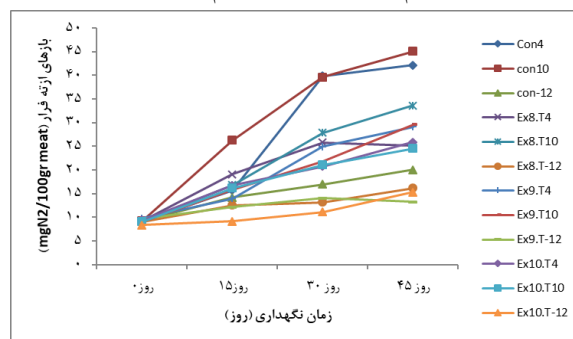
#### ۴- نتیجه گیری

در این پژوهش اثرات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره هیدروالکلی اناریچه در افزایش عمر ماندگاری ماهی کيلکای چرخ شده تلقیح شده با لیستریا مونوسیژنز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد عصاره گیاه اناریچه به دلیل دارا بودن ترکیبات فنولی دارای خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی است. ترکیبات فنولی موجود در عصاره با اثر بر رادیکال های آزاد و همچنین تخریب دیواره سلولی میکروارگانیسم ها اثرات نگهدارنده خود را اعمال می کند و قادر است عمر ماندگاری ماهی کيلکای چرخ شده را افزایش دهد.

#### ۵- منابع

1. Abdollahzadeh, E. Rezaei, M. and Hosseini, H. 2014. Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control*, (35): 177-183.
2. Afkhami, M. Mokhlesi, A. Darvish Bastami, K. Khoshnood, R. Eshaghi, N. and Ehsanpour, M. 2011. Survey of some chemical composition and fatty acids in cultured common carp (*Cyprinus carpio*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), Noshahr. *World journal of fish and marine sciences*, 3(6):533-538.
3. Aguilera, J.M. Francke, A. Figueroa, G. Bornhardt, C. and Cifuentes A. 1992. Preservation of minced pelagic fish by combined methods. *International journal of food science and technology*, (21):171-177.
4. Ahmadi, M. Razavilar, V. Motallebi, A. Esmailzadehkenari, R. and Khanipour, A. 2014. Effects of Hydroalcoholic and Water Extracts of Nettle Leaf (*Urtica dioica* L.) on Chemical Properties

افزایش یافت (۲۳). این نتایج با نتایج محمودزاده و همکاران (۲۴) مطابقت دارد. مقدار قابل قبول بازهای ازته فرار ۲۵ میلی گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم ماهی گزارش شده است (۳۵). احمدی و همکاران (۴) مقادیر بازهای نیتروژنی ماهی کيلکای خرد شده را افزایشی و در روز ۲۸ نگهداری حدود ۱۵ میلی گرم نیتروژن بر ۱۰۰ گرم نمونه بیان نمودند.



شکل ۴. میانگین تغییرات بازهای ازته فرار در نمونه های تیمار شده با لیستریا مونوسیژنز

بیشترین میزان تولید بازهای ازته فرار در نمونه شاهد مشاهده شد. کاهش رشد میکروارگانیسم ها در نمونه های حاوی عصاره منجر به کاهش تولید بازهای ازته فرار شد. این نتایج با نتایج فن و همکاران (۲۰) مطابقت دارد. مطابق با نتایج آنها افزودن عصاره های گیاهی به ماهی می تواند به کاهش رشد جمعیت باکتریایی و یا کاهش ظرفیت باکتری ها برای دآمیناسیون اکسیداتیو نیتروژن غیر پروتئینی ترکیبات و یا هر دوی آن ها منجر شود که به دلیل وجود ترکیبات فنولی در عصاره است. در نمونه های حاوی عصاره، با افزایش غلظت عصاره تولید بازهای ازته فرار کاهش یافت. نمونه های حاوی عصاره با کاهش رشد میکروارگانیسم ها به طور مستقیم بر تولید بازهای ازته فرار نقش داشتند. در دمای  $12^{\circ}\text{C}$  - نسبت به دو دمای ۴ و ۱۰ درجه سانتیگراد بازهای ازته فرار کمتری تولید شد. در دماهای زیر صفر آب به صورت منجمد وجود دارد. کاهش فعالیت آبی در دمای  $12^{\circ}\text{C}$  - منجر به کاهش فعالیت میکروارگانیسم ها شد که خود کاهش تولید بازهای نیتروژنی فرار را در پی داشت (۳۱).

14. Dadkhah, H. Bassami, M. R. Hashemi, S. Shahraz, F. Hosseini, H. and Karatzas, K.A.G. 2012. Evaluation and comparison of SYBR Green I Real-Time PCR and TaqMan Real-Time PCR methods for quantitative assay of *Listeria monocytogenes* in nutrient broth and milk. *African journal of microbiology research*, (6): 1908-1917.
15. Desai, M.A. Soni, K. A. Nannapaneni, R. Schilling, M. W. and Silva, J. L. 2012. Reduction of *Listeria monocytogenes* in raw catfish fillets by essential oils and phenolic constituent carvacrol. *Journal of food science*, (77): 516-522.
16. Djenane, D. Escalante, A.S. Beltran, J.A. and Roncales, P. 2003. The shelf-life, acid and antioxidants and stored under modified atmospheres. *International journal of food microbiology*, (20): 1-7.
17. Donald S. Prenzler, P. D. Autolovich, M. and Robards, K. 2001. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food chemistry*, (73): 73-84.
18. Esmailzadeh Kenari, R. Mohsenzadeh F. and Raftani Amiri Z. 2014. Antioxidant activity and total phenolic compounds of Dezful sesame cake extracts obtained by classical and ultrasound-assisted extraction methods. *Food science and nutrition*, 2(4): 426-435.
19. Fahimdezhban, Y. Motallebi, A. A. Hosseini, E. Khanipour, A.A. and Soltani, M. 2014. Comparison of effect of *Zataria multiflora* and *Rosmarinus officinalis* extracts on quality of minced frozen silver carp. *Iranian journal of fishery science*, 13(1): 20-29.
20. Fan, W. J. Chi, Y. L. and Zhang, S. 2008. The use of a tea polyphenol dip to extend the shelf life of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) during storage in ice. *Food Chemistry*, (108): 148-153.
21. Fazli, H. 2011. Some environmental factors effects on species composition, catch and CPUE of Kilka in the of Superchilled Minced Meat of Common Kilka (*Clupeonella cultriventris caspia*). *Journal of food quality hazard control*, (1): 85-88.
5. Albu, S. Joyce, E. Paniwnyk, L. Lorimer, P. and Mason, J. 2004. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonic sonochemistry*, (11): 261-265.
6. Amarowicz, R. Pegg, R. B. Rahimi-Moghaddam, P. Barl, B. and Weil, J.A. 2004. Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food chemistry*, (84): 551-562.
7. AOAC. 1995. Official methods of analysis (16th ed.). Arlington, VA, USA: AOAC.
8. AOCS. 1990 Official Methods and Recommended Practices of American Oil Chemists' Society, edited by David Firestone, Vol. 1., Method Cd 8-53. 15th ed. Washington, DC.
9. Arun, K.D. Rajkumar, V. 2011. Antioxidant effect of curry leaf (*Murraya koenigii*) powder on quality of ground and cooked goat meat. *International food research journal*, 18(2): 563-569.
10. Bakkali, F. Averbeck, S. Averbeck, D. and Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils - a review. *Food Chemical Toxicology*, (46): 446-475.
11. Benjakul, S. and Visessanguan, W. 2011. Impacts of freezing and frozen storage on quality changes of seafoods. *Physicochemical aspects of food engineering and processing*. CRC Press, 283-306.
12. Berra, B. Montorfano, G. Negroni, M. Corsetto, P. and Rizzo, A.M. 2009. Biomarkers of long-chain PUFA  $\omega$ -3 fatty acids and the human nutritional status. *Lipid Technology*, (21): 32-35.
13. Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *Journal of food protection*, (94): 223-53.

31. Li, T. Li, J. Hu, W. Zhang, X. Li, X. and Zhao, J. 2012. Shelf-life extension of crucian carp (*Carassius auratus*) using natural preservatives during chilled storage. *Journal of food chemistry*, (135):140-145.
32. Mahmoudzadeh, M. Khaksar, B. Motallebi, A. Hosseini, H. Ahmadi, H. Hosseini, M. and Farzaneh, M. 2012. Freezing effects on changes in 18°C quality raw burger made from *Saurida undosquamis* uncoated. *Journal of food science and nutrition*, 7(1):23-30.
33. Maqsood, S. Benjakul, S. Abushelaibi, A. and Alam A. 2014. Phenolic Compounds and Plant Phenolic Extracts as Natural Antioxidants in Prevention of Lipid Oxidation in Seafood: A Detailed Review. *Comprehensive reviews in food science and technology*, (13):1125-1140.
34. Nawar, W.W. 1996. Lipids. In: Fennema, O.R, editor. *Food chem.* 3rd ed. New York: Marcel Dekker. 225-320.
35. Ojagh, S. M. Rezaei, M. Razavi, S. H. and Hosseini, S.M.H. 2010. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*, (120): 193-198.
36. Özbek, H. Güvenalp, Z. Kuruüzüm-Uz, A. Kazaz, C. and Demirezer, L. O. 2016. Phenylpropanoids, Sesquiterpenoids and Flavonoids from *Pimpinella tragium* Vill. subsp. *lithophila* (Schischkin) Tutin, Record of natural products journal, 10(2):207-213.
37. Pezeshk, S. Hosseini, H. Rezaei M. and Khaksar, R. 2013. Evaluation of shelf life of live and gutted fish treated with a shallot extract. *Journal of food processing and preservation*, (37):970-976.
38. Pirestani, S. Ali Sahari, M. Barzegar, M. and Seyfabadi, S. J. 2009. Chemical compositions and minerals of some commercially important fish species from the South Caspian Sea. *International food research journal*, (16): 39-44.
39. Pirestani, S. Sahari, M. A. and Barzegar, M. 2010. Fatty acid changes during Caspian Sea. *International Journal of Natural Resource and Marine Science*, 1(2):157-164.
22. Gokoglu, N. Yerlikaya, P. Kadir Topuz, O. and Aydan Buyukbenli, H. 2012. Effects of Plant Extracts on Lipid Oxidation in Fish Croquette during Frozen Storage. *Food science and biotechnology*, 21(6):1641-1645.
23. Gram, L. and Huss, H. 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *International journal food microbiology*, (33):589-595.
24. Huber, G.M. Rupasinghe, H.P.V. and Shahidi, F. 2009. Inhibition of oxidation of  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids and fish oil by quercetin glycosides. *Food Chemistry*, (117): 290-295.
25. ICMSF 1982. International Commission of Microbiological Specifications for Foods. *Microorganisms in foods. Their significance and methods of enumeration.* 2nd ed. University of Toronto Press. 436.
26. James, M. Jay-Martin J. and Loessner-david, A. 2005. *Modern food microbiology.* Volume 1.
27. Jeon, Y. J. Kamil, J. Y. and Shahidi, F. 2002. Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and atlantic cod. *Journal of agriculture of food Chemistry*, (50): 5167-5178.
28. Kaur, T. Gupta, R. Vaiphel, K. Kapoor, R. Gupta, N.M. Khanduja. K.L. 2007. *International journal of radiation oncology*, 1-9.
29. Khanipour, A. A. Jorjani, S. and Soltani, M. 2014. Chemical, sensory and microbial quality changes of breaded kilka (*Clupeonella cultriventris*) with tempura batter in production stage and during frozen storage. *International food research journal*, 21(6):2421-2430.
30. Leroi, F. Joffraud, J.J. and Chevalier, F. 2000. Effect of salt and smoke on the microbiological quality of cold-smoked salmon during storage at 5°C as estimated by the factorial design method. *Journal of food protection*, 63(4):502-508.

- Journal of pharmacy research. (7): 817-822.
49. Thiansilakul, Y. Benjakul, S. and Richards, M.P. 2013. Effect of phenolic compounds in combination with modified atmospheric packaging on inhibition of quality losses of refrigerated Eastern little tuna slices. *LWT - food science and technology journal*, (50):146-152
  50. Tokur, B. Ozkutuk, S. Atici, E. Ozyurt, G. and Ozyurt, C.E. 2006. Chemical and sensory quality changes of fish fingers, made from mirror carp (*Cyprinus carpio* L.), during frozen storage (-18°C). *Food Chemistry*, (99): 335-341.
  51. Weber, J. Bochi, V. C. Ribeiro, C. P. Victorio, A.M. and Emanuelli, T. 2008. Effect of different cooking methods on the oxidation, proximate and fatty acid composition of silver catfish (*Rhastropomus*) filets. *Food Chemistry*, (106): 140-146.
  40. Razavi Shirzi, H. 2007. *Seafood technology, principles of handling and processing* (1). Pars negar Press.
  41. Sahoo, J. Kawasra, R. K. and Hooda, S. 2004. Studies on  $\alpha$ -tocopherol acetate as an antioxidant in chicken mince on its quality during refrigerated storage. *Journal of food science and technology*, (41):240-243.
  42. Sanchez Alonso I. Jimenez Escrig, A. Saura Calixto, F. and Borderias, J. 2008. Antioxidant protection of white grape pomace on restructured fish products during frozen storage. *LWT - food science and technology journal*, (41):42-50.
  43. Schormüller, J. 1968. *Manual of Food Chemistry*. Teil Springer-Verlag, Berlin, Germany. 1482-1537.
  44. Seifzadeh, M. Motallebi, A. A. and Mazloumi, M.T. 2012. Evaluation of fat quality in packaged common kilka fish soaked in whey protein compared with sodium alginate. *Scholarly journal of agriculture science*, 2(2)26-31. Sabah Abbas, M. 2014. Isolation of bacteria from fish. *International journal of advanced research*, 2(3): 274-279.
  45. Sallam, K. I. Ahmed, A. M. Elgazzar, M. M. and Eldaly, E.A. 2007. Chemical quality and sensory attributes of marinated Pacific saury (*Cololabis saira*) during vacuum-packaged storage at 4°C. *Food Chemistry*, (102): 1061-1070.
  46. Shahidi, F. and Zhong, Y. 2005. Lipid oxidation measurement methods. Canada. 357-386.
  47. Smith-Palmer, A. Stewart, J. and Fyfe, L. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in applied microbiology*, (26)118-22.
  48. Tharun, G. and Kumar Pindi, P. 2013. Evaluation of antioxidant potential and antimicrobial activity of successive extracts of *Pimpinella tirupatiensis*.