شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۶۸، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۹/۱۰

ص ۵۷۷-۵۸۷

بررسی تأثیر نانوذرهٔ کیتوزان و عصارهٔ آویشن شیرازی نانوکپسوله‌شده در فساد میکروبی فیلهٔ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*) تلقیح‌شده با لیستریا منوسایتوژنز (*Listeria monocytogenese*)

❖ **حسین علی سلمان‌پور احمدی*:** .دانشجوی کارشناسی ارشد دانشکدهٔ علوم دامی و شیلات – دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

❖ **حامد منوچهری:** استادیار گروه شیلات– دانشکدهٔ دامپزشکی– دانشگاه آزاد اسلامی بابل

❖ **رضا صفری:** مربی پژوهشی بخش میکروبیولوژی غذایی– پژوهشکدهٔ اکولوژی دریای خزر

چکیده

غذاهای دریایی، به‌منزلهٔ منبع پروتئینی باارزش برای انسان‌ها، در رژیم غذایی سالم نقش مهمی را ایفا می‌کنند؛ با توجه به امکان آلودگی ماهی از لحظهٔ برداشت تا مصرف با میکروارگانیسم‌های مختلف، روش‌های متفاوتی برای جلوگیری از فساد آن‌ها به کار می‌رود. هدف تحقیق حاضر بررسی استفاده از عصارهٔ آویشن و کیتوزان نانوکپسوله‌شده برای مهار رشد باکتری لیستریا منوسایتوژنز در گوشت فیله‌شدهٔ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در زمان نگهداری در یخچال است. به نمونه‌های فیله‌شدهٔ گوشت ماهی CFU/g 103×1 باکتری لیستریا منوسایتوژنز تلقیح شد؛ سپس، نمونه‌ها در معرض عصارهٔ آویشن در دو سطح ۰/۸ و ۱/۲ و نانوذرهٔ کیتوزان در دو سطح ۰/۱۵ و ۰/۲۵ (v/w٪) به همراه یک گروه شاهد در قالب ۵ تیمار قرار گرفتند. تمامی تیمارها و گروه شاهد به مدت ۱۶ روز در دمای یخچال نگهداری شدند. هر چهار روز یک بار میزان تعداد کل باکتری‌ها، تعداد باکتری‌های سرمادوست و تعداد باکتری لیستریا منوسایتوژنز اندازه‌گیری شد.کمترین تعداد کل باکتری‌ها، تعداد باکتری‌های سرماگرا و تعداد باکتری‌های لیستریا منوسایتوژنز در روز پایان آزمایش در تیمار کیتوزان ۰/۲۵٪ مشاهده شد و بیشترین آن در تیمار شاهد مشاهده شد ($P<0/05$). نتایج نشان داد با گذر زمان از کارایی نگهدارنده‌ها علیه رشد باکتری لیستریا منوسایتوژنز کاسته می‌شود. استفاده از فرم نانوکپسولهٔ آویشن و کیتوزان به طور معنی‌داری از رشد باکتری لیستریا منوسایتوژنز جلوگیری کرد همچنین، کیتوزان بهتر از عصارهٔ آویشن باعث مهار لیستریا منوسایتوژنز شد.

واژگان کلیدی: عصارهٔ آویشن، کیتوزان، لیستریا منوسایتوژنز، ماهی قزل‌آلا، نانوکپسول.

* نویسندهٔ مسئول تلفن ۰۹۱۱۱۱۸۸۸۵۶

Email: salmanpour2013@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir

۱. مقدمه

افزایش جمعیت و کمبود مواد غذایی، به‌خصوص منابع پروتئینی با کیفیت بالا، سبب شده است تا در چند دههٔ اخیر توجه خاصی به منابع خوراکی دریایی صورت پذیرد. از طرف دیگر، آبزیان به دلیل pH بالای عضله (pH>6) پس از جمود نعشی، حضور مقادیر بالای ترکیبات ازتهٔ غیر پروتئینی، مقادیر بالای اسیدهای چرب غیر اشباع و حضور آنزیم‌های اتولیزکننده جزو غذاهای بسیار آسیب‌پذیرند (Gram and Huss, 1996) و زمان ماندگاری کوتاه‌تری دارند (Goulas and Kontominas, 2007) و سریع‌تر تحت تأثیر فساد میکروبی قرار می‌گیرند.

لیستریوز ناشی از مصرف غذا بیماری نادر و خطرناکی است که به وسیلهٔ باکتری لیستریا منوسایتوژنز ایجاد می‌شود (Chen et al., 2010). لیستریا منوسایتوژنز باسیل کوتاه، گرم مثبت، بدون اسپور، هوازی اختیاری، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت و سرماگراست که در دمای ۲۰–۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد متحرک و در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد بدون تحرک است (Vázquez-Boland et al., 2001). با وجود این‌که تعداد عفونت‌های غذایی گزارش‌شده ناشی از لیستریا منوسایتوژنز نسبت به عفونت با دیگر باکتری‌ها کمتر است، اما میزان خطرآفرینی این باکتری بسیار بالاتر است.

تاکنون روش‌های متفاوتی مثل سردسازی محصول بلافاصله پس از صید (Özyurt et al., 2009)، انجماد (Aubourg et al., 2005)، بسته‌بندی در خلأ و اتمسفر اصلاح‌شده (Özogul et al., 2004)، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و مصنوعی (Banerjee, 2006)، به‌کارگیری اسانس‌ها (Frangos et al., 2010)، روکش‌دار کردن (Fan et al., 2009) همچنین، اثر ترکیبی روکش غذایی و اسانس (Ojagh et al., 2010) برای افزایش ماندگاری محصولات دریایی و حفظ کیفیت ماهی به کار گرفته شده است.

یکی از مواد طبیعی نگهدارنده عصارهٔ گیاه آویشن است (Mexis et Kykkidou et al., 2009 ; al., 2009). گیاه آویشن شیرازی به دلیل داشتن ترکیبات منوترپنی فنلی همچون کارواکرول، تیمول و پارسیمین یکی از مؤثرترین مواد ضد میکروبی به شمار می‌رود (Saei-Dehkordi et al., 2010). یکی دیگر از نگهدارنده‌های طبیعی کیتوزان است. کیتوزان به طور وسیع به‌منزلهٔ آنتی‌باکتری طبیعی مؤثر علیه بسیاری از میکروب‌های بیماری‌زای غذایی استفاده می‌شود.

این امر به اثبات رسیده که کارایی ضد میکروبی مواد نگهدارنده به مقدار زیادی به علت واکنش با محتویات مادهٔ غذایی مانند پروتئین‌ها، لیپیدها، آنزیم‌ها و یون‌ها کاهش می‌یابد؛ از این رو، بسیاری از محققان روش‌های انتقالی را برای مواد ضد میکروبی معرفی کرده‌اند تا آزادسازی پایدار را برای این مواد فراهم کند و تأثیر محتویات غذا را در این مواد به حداقل خود کاهش دهد. ریزپوشانی روشی برای بسته‌بندی مواد در اندازهٔ ذرات بسیار ریز است. در این روش مواد اولیهٔ فعال (مواد هسته) مانند کیتوزان از طریق مواد پوششی (دیواره) پوشانده می‌شوند. از نظر اقتصادی در فرم آزاد نیاز به غلظت‌های بالاتر است و در نتیجه قیمت تمام‌شدهٔ مادهٔ نگهدارنده بیشتر خواهد بود؛ از آن‌جا که فرم نانو دارای

Archive of SID

www.SID.ir

واکنش‌پذیری بسیار بالایی است می‌توان با کمترین غلظت به نتایج مطلوب رسید.

با توجه به این‌که تاکنون مطالعه‌ای در زمینهٔ تأثیرات کیتوزان و عصارهٔ آویشن شیرازی نانوکپسوله در ماندگاری فیلهٔ ماهی گزارش نشده است، بنابراین، این مطالعه با هدف بررسی ارزیابی رفتار لیستریا منوسایتوژنز در فیلهٔ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان حاوی کیتوزان و آویشن شیرازی نانوکپسوله انجام شد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. تهیهٔ عصارهٔ آویشن

پس از تهیهٔ برگ خشک‌شدهٔ گیاه آویشن شیرازی، عصاره‌گیری با اتانول ۷۰ درصد انجام شد (Cristóbal-Alejo et al., 2006).

۲.۲. نانو کردن

عصارهٔ آویشن شیرازی با استفاده از دستگاه اسپری درایر (Labplant, USA) که دمای ورودی آن ۱۱۰ درجهٔ سانتی‌گراد و دمای خروجی نیز ۸۵ درجهٔ سانتی‌گراد تنظیم شده بود خشک شد. ماده‌ای که برای انکپسوله کردن آویشن استفاده شد لیپوزوم بود که به روش Bozorgnejad et al., 2012 تهیه شد؛ سپس، به مدت ۳۰ دقیقه با اسید لینولئیک به مقدار ۰/۱۳۰ درصد (به‌منزلهٔ سورفاکتانت) در دمای ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد شیک شد (pH =۴/۵) (pH با استفاده از اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال تنظیم شد). پس از اتمام زمان شیک شدن در دمای ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد، آویشن به مخلوط لیپوزوم و سورفاکتانت اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در دمای محیط شیک شدند. مخلوط مذکور در دستگاه اسپری درایر با سرعت ۵/۲۶ میلی‌لیتر در دقیقه با ۱۰۰ درصد هوادهی، دمای ورودی ۱۰۵ درجه و دمای خروجی ۶۸ درجه خشک شد (Mozafari, 2006). نسبت لیپوزوم به آویشن ۴ به ۱ بود.

برای تهیهٔ نانوذرات کیتوزان (سیگما- آلدریچ، وزن مولکولی مدیوم- درجهٔ داستیلاسیون ۷۵۰)، پس از تهیهٔ سوسپانسیون آبی از کیتوزان، از دستگاه اولتراسوند به مدت ۵ دقیقه به منظور تولید نانوذرهٔ کیتوزان استفاده شد و پس از اضافه کردن اسید لینولئیک عمل اسپری درایر انجام گرفت. برای اپتیمم کردن شرایط سونیکاسیون، از آمپلی تود ۱۰۰، فرکانس ۴۰ کیلوهرتز و زمان ۵ دقیقه استفاده شد تا واکنش به بهترین نحو صورت گیرد. شایان ذکر است که کیتوزان به دو فرم محلول در اسید و محلول در آب وجود دارد که در این تحقیق از شکل محلول در آب استفاده شد.

۳.۲. تهیهٔ ماهی

۱۵ قطعه ماهی قزل‌آلا به وزن ۲۰±۶۰۰ گرم از مزرعهٔ پرورش ماهی قزل‌آلا واقع در شهرستان ساری تهیه شد. ماهی‌ها در آزمایشگاه (آزمایشگاه خوراک دام، طیور و آبزیان شهرستان ساری) با آب مقطر کاملاً شسته و فیله شدند.

۴.۲. آماده‌سازی باکتری لیستریا منوسایتوژنز برای تلقیح

سویهٔ استاندارد و لیوفیلیزهٔ باکتری ۱۱۶۳ *Listeria monocytogenes* PTCC از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. آمپول‌های لیوفیلیزه

Archive of SID

www.SID.ir

نخست، در شرایط استریل باز شد سپس، به محیط کشت مایع TSB (Tryptic soy broth) انتقال یافت و به مدت ۴۸ ساعت در ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شد. محیط کشت حاوی باکتری به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی با محلول رینگر جانشین شد. به منظور جداسازی کامل محیط کشت، باکتری‌های محلول حاصل دوباره به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. تعداد باکتری‌ها در مایع زیرین با روش کدورت‌سنجی در طول موج ۵۷۰ نانومتر به دست آمد؛ به طوری که جذب نوری ۰/۰۸ تا ۰/۱ تقریباً معادل ۱×۱۰۸ باکتری در هر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد (Debbarma et al., 2013). به منظور دستیابی به این محدودهٔ جذب نوری، رقیق‌سازی با رینگر استریل صورت می‌گرفت و به منظور تأیید نتایج، شمارش باکتریایی به روش کشت سطحی روی محیط لیستریاکروم آگار (۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد) انجام پذیرفت. در پایان به فیله‌های ماهی قزل‌آلا تعداد ۱×۱۰^{۳} عدد باکتری در گرم به همراه دوزهای مختلف آویشن و کیتوزان اضافه شد. دوزهای آویشن و کیتوزان بر اساس مقدار تعیین‌شده در ۱۰۰ گرم فیله محاسبه شدند؛ سپس، نمونه‌ها ماساژ داده شدند تا از اختلاط کامل باکتری با فیلهٔ ماهی اطمینان حاصل شود. نمونه‌ها پس از اضافه کردن مواد فوق به صورت معمولی بسته‌بندی (زیپ پک) و در دمای ۴ درجه قرار داده شدند. تیمارها طی نگهداری در یخچال در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد، هر ۴ روز یک بار از نظر میکروبی (تعیین کل باکتری‌های قابل رؤیت (TVC)[1]، تعداد کل باکتری‌های سرمادوست (PTC)[2]، و تعداد کل باکتری لیستریا منوسایتوژنز) ارزیابی شدند.

در مجموع ۷۵ نمونه در قالب ۵ تیمار و ۳ تکرار برای ۵ زمان به صورت تیمار ۱: ۰/۸ درصد آویشن (v/w)، تیمار ۲: ۱/۲ درصد آویشن، تیمار ۳: ۰/۱۵ درصد کیتوزان، تیمار ۴: ۰/۲۵ درصد کیتوزان و تیمار ۵: شاهد آماده شدند. انتخاب دوزها بر اساس مطالعات انجام‌شده صورت گرفت و تیمارها به صورت منفرد استفاده شدند. آویشن به لحاظ فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کیتوزان نیز به دلیل تأثیرات ضد میکروبی حائز اهمیت‌اند.

۵.۲. شمارش باکتری‌ها

برای شمارش باکتری‌ها نخست از هر فیلهٔ ماهی با استفاده از تیغ اسکارپل و پنس استریل‌شده در حضور چراغ الکلی و بشر حاوی الکل ۱۰ گرم نمونه برداشته شد و در ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل ۰/۸۵٪ قرار داده شد و به مدت ۶۰ ثانیه در مخلوط‌کن آزمایشگاهی هموژن شد. برای تعیین TVC از نمونه‌های تهیه‌شده از محیط کشت تریپتیک سوی آگار (Tryptic Soy Agar) به صورت کشت سطحی استفاده شد (AOAC, 2005). پلیت‌های کشت‌داده‌شده مربوط به کل باکتری‌ها بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد شمارش شدند. برای شمارش PTC از نمونه‌های تهیه‌شده، از محیط تریپتیک سوی آگار (TSA) استفاده شد. پلیت‌های مربوط به باکتری‌های سرمادوست بعد از ۱۰ روز انکوباسیون در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد شمارش شدند (MacFaddin, 2000). برای شمارش لیستریا منوسایتوژنز از محیط

1. Total viable counts
2. Psychrotrophic counts

Archive of SID

www.SID.ir

انتخـابی CHROMagartm Listeria supplement (محیط کشت کروموژنیک، شرکت میکروبیولوژی کروم آگار فرانسه) استفاده شد. نمونهٔ رقیق‌شده بر روی محیط کشت، کشت سطحی داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد. بـاکتری لیستریا منوسایتوژنز بر روی این محیط کلنـی‌هـایی بـه رنگ آبی با هالهٔ سفید تشکیل می‌دهد.

۶.۲. تجزیه و تحلیل آماری

همهٔ آزمایش‌ها در سه تکرار صـورت گرفـت. تجزیـه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 19 تحت برنامهٔ ویندوز انجام گرفت. از طـرح آزمـایش کـاملاً تصـادفی استفاده شد. به منظور بررسـی وجـود یـا نبـود اخـتلاف معنادار بین تیمارها همچنین در هر تیمار در طـول مـدت نگهداری در یخچـال در دمـای ۴ درجـهٔ سـانتی‌گـراد از تجزیهٔ واریانس یـک‌طرفـه و آزمـون دانکـن بـا حـداقل معناداری در سطح ۵٪ استفاده شد. به منظور مقایسهٔ بـین تیمارها به طور مجزا از آزمون t نیز استفاده شد.

۳. نتایج

۱.۳. شمارش تعداد کلی باکتری‌ها (TVC)

تعـداد بـاکتری‌هـای هـوازی مزوفیـل در روز صـفر نگهداری در تیمارهـای مختلـف تفـاوت معنـی‌داری نداشت و در تمامی نمونـه‌گیـری‌هـای بعـدی تعـداد باکتری‌های کل در تیمارهای حاوی نگهدارنـده کمتـر از تیمار شاهد بود ($P<۰/۰۵$) به طوری که، در پایـان دورهٔ آزمایش کمترین تعداد باکتری در تیمار کیتـوزان ۰/۲۵٪ مشاهده شد.

جدول ۱. تغییرات تعداد کل باکتری‌ها در فیلهٔ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای مختلف طی زمان در یخچال (۴±۱°C)

تیمار	مدت زمان نگهداری (روز)				
	۰	۴	۸	۱۲	۱۶
شاهد	a۴/۵۶±۰/۰۸*	d۶/۶۰±۰/۱۰	dV/۹۶±۰/۰۴	d۹/۵۲±۰/۲۰	d۱۰/۹۸±۰/۰۱
آویشن ۰/۸٪	a۴/۱۵±۰/۰۴	c۵/۷۰±۰/۰۴	c۶/۵۳±۰/۱۶	c۷/۴۹±۰/۰۶	c۸/۹۲±۰/۰۵
آویشن ۱/۲٪	a۴/۱۵±۰/۰۵	b۴/۹۲±۰/۰۸	b۵/۹۱±۰/۰۴	b۶/۹۸±۰/۰۲	b۸/۸۲±۰/۰۲
کیتوزان ۰/۱۵٪	a۴/۳۰±۰/۰۸	a۴/۷۷±۰/۰۶	a۵/۶۹±۰/۰۵	a۶/۷۴±۰/۱۰	a۷/۹۶±۰/۰۴
کیتوزان ۰/۲۵٪	a۴/۱۵±۰/۰۴	a۴/۸۲±۰/۰۱	a۵/۷۷±۰/۰۷	a۶/۷۱±۰/۰۷	a۷/۷۵±۰/۰۱

*مقادیر داده‌شده به صورت میانگین ± انحراف معیار است.

حروف انگلیسی غیر یکسان بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون است.

۲.۳. شمارش تعداد بـاکتری‌هـای سـرماگرا (PTC)

تعداد باکتری‌های سرماگرا در روز صفر نگهـداری در تیمارهای مختلـف تفـاوت معنـی‌داری نداشـت و در تمامی نمونـه‌گیـری‌هـای بعـدی تعـداد بـاکتری‌هـای سـرماگرا در تیمارهای حاوی نگهدارنده کمتر از تیمار شاهد بود ($P<۰/۰۵$)؛ به طوری که، در روز ۴، تعـداد بـاکتری‌هـای سـرماگرا در تیمـار کیتـوزان ۰/۱۵٪ و

Archive of SID

www.SID.ir

کیتوزان ۰/۲۵٪ کمتـرین بـود، در روز ۸، بـین تعـداد باکتری‌های سرماگرا در تیمارهای حـاوی نگهدارنـده تفاوت معنـی‌داری مشـاهده نشـد (P>۰/۰۵)، امـا در روزهای ۱۲ و ۱۶ آزمایش تعداد باکتری های سرماگرا در تیمارهـــای کیتـــوزان ۰/۱۵٪ و کیتـــوزان ۰/۲۵٪ کمترین بود.

جدول ۲. تغییرات تعداد باکتری‌های سرماگرا در فیلهٔ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای مختلف طی زمان در یخچال (۴±۱°C)

تیمار	مدت زمان نگهداری (روز)				
	۰	۴	۸	۱۲	۱۶
شاهد	a۴/۲۴±۰/۰۴*	d۵/۹۴±۰/۰۴	b۷/۸۴±۰/۰۵	d۹/۴۶±۰/۱۰	c۱۰/۷۴±۰/۰۷
آویشن ۰/۸٪	a۳/۹۵±۰/۰۳	c۵/۳۵±۰/۰۵	a۵/۷۸±۰/۰۸	c۶/۸۳±۰/۰۴	b۸/۶۹±۰/۰۷
آویشن ۱/۲٪	a۴/۰۰±۰/۰۲	b۴/۸۲±۰/۰۵	a۵/۷۸±۰/۰۸	b۶/۸۳±۰/۰۴	b۸/۶۹±۰/۰۷
کیتوزان ۰/۱۵٪	a۴/۱۰±۰/۰۶	a۴/۶۴±۰/۰۱	a۵/۵۲±۰/۰۲	a۶/۶۶±۰/۰۲	a۷/۸۳±۰/۰۴
کیتوزان ۰/۲۵٪	a۴/۲۰±۰/۰۴	a۴/۶۳±۰/۰۳	a۵/۶۷±۰/۰۷	a۶/۶۰±۰/۰۷	a۷/۸۳±۰/۰۵

*مقادیر داده‌شده به صورت میانگین ± انحراف معیار است.

حروف انگلیسی غیر یکسان بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون است.

۳.۳. شمارش تعـداد بـاکتری‌هـای لیسـتریا منوسایتوژنز

تعداد باکتری‌های لیستریا منوسـایتوژنز در روز صـفر نگهداری در تیمارهـای مختلـف تفـاوت معنـی داری نداشـت و در تمـامی نمونـه‌گیـری‌هـای بعـدی در تیمارهای حاوی نگهدارنده کمتر از تیمار شـاهد بـود (P<۰/۰۵).

جدول ۳. تغییرات تعداد باکتری‌های لیستریا منوسایتوژنز در فیلهٔ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای مختلف طی زمان در یخچال (۴±۱°C)

تیمار	مدت زمان نگهداری (روز)				
	۰	۴	۸	۱۲	۱۶
شاهد	a۲/۹۱±۰/۰۲*	d۵/۷۸±۰/۰۴	d۷/۴۹±۰/۱۲	d۸/۸۲±۰/۱۲	d۱۰/۸۵±۰/۰۴
آویشن ۰/۸٪	a۲/۸۷±۰/۰۳	c۴/۹۲±۰/۰۶	c۶/۹۱±۰/۰۲	c۷/۶۱±۰/۱۰	c۸/۷۸±۰/۰۲
آویشن ۱/۲٪	a۲/۹۳±۰/۰۳	c۴/۸۸±۰/۰۸	b۶/۷۸±۰/۰۸	c۷/۵۵±۰/۰۳	b۸/۷۸±۰/۰۲
کیتوزان ۰/۱۵٪	a۲/۰۹±۰/۰۲	b۴/۷۸±۰/۰۲	b۶/۶۸±۰/۰۶	b۷/۳۴±۰/۰۲	b۸/۷۱±۰/۰۵
کیتوزان ۰/۲۵٪	a۲/۹۲±۰/۰۵	a۴/۶۵±۰/۰۱	a۶/۵۷±۰/۰۸	a۷/۱۹±۰/۰۸	a۸/۵۸±۰/۰۱

*مقادیر داده‌شده به صورت میانگین ± انحراف معیار است.

حروف انگلیسی غیر یکسان بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون است.

Archive of SID

www.SID.ir

۴. بحث و نتیجه‌گیری

استفاده از مواد مؤثرهٔ گیاهان دارویی به صورت نانوکپسول باعث کاهش واکنش مادهٔ فعال (مادهٔ مؤثرهٔ گیاهی) با محیط اطراف، مانند آب و اکسیژن، می‌شود و شدت انتقال یا تبخیر به محیط بیرونی را تقلیل می‌دهد. کپسوله کردن موجب می‌شود که آزادسازی تا زمان مورد نظر و ایجاد محرک مورد نظر، برای شکست کپسول، به تأخیر بیفتد و پس از شروع آزادسازی مواد مؤثره به صورت یکنواخت در همهٔ مخلوط پخش شوند (Zhang et al., 2004). هنگامی که ماده تحت تأثیر فرایند کپسوله کردن قرار می‌گیرد در حقیقت با پوششی که چند برابر هسته است پوشانده می‌شود. به هنگام استفاده از این پوشش در مواد غذایی، تحت تأثیر آنزیم‌های داخلی و تغییرات محیطی نظیر تغییرات pH، دیوارهٔ پوشش باز و مادهٔ هسته به‌آرامی آزاد می‌شود؛ از این رو، زمان تأثیر آن بیشتر می‌شود و به عبارت دیگر، فرایند کپسوله کردن به پایداری هسته کمک می‌کند.

تعداد کل باکتری‌های فیلهٔ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان طی دورهٔ نگهداری (۱۶ روز) در جدول ۱ آورده شده است. بهترین عملکرد تا پایان دورهٔ آزمایش در تیمار کیتوزان ۰/۲۵٪ دیده شد (۷/۷۵±۰/۰۱logCFU/g). حداکثر محدودهٔ پیشنهادی (MRL)[1] برای TVC در ماهی ۷ logCFU/g عنوان شده است (ICMSF, 1986). بار باکتریایی تیمار شاهد تا روز ۴ کمتر از حد مجاز تعیین‌شده برای ماهی خام بود؛ در حالی که، بار باکتریایی در تیمارهای حاوی نگهدارندهٔ طبیعی، صرف نظر از آویشن ۰/۸٪، تا روز ۱۲ کمتر از این حد بود که با نتایج آزمایش‌هایی مانند نتایج مطالعهٔ حاضر با نتایج مطالعهٔ انجام‌شده دربارهٔ فیلهٔ نیمه‌سرخ‌شدهٔ کفال با پوشش عصارهٔ آویشن ۲/۵ و ۵٪ (Yasin and Abou-Taleb, 2007) و فیلهٔ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با پوشش آلژینات سدیم حاوی ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد اسانس آویشن شیرازی مشابهت دارد (Hamzeh and Rezaei, 2011). تیمول و کارواکرول، که اجزای اصلی گیاه آویشن را تشکیل می‌دهند، تأثیرات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی خوبی دارند، اما هنوز مکانیسم عمل عصاره‌ها و اسانس گیاهان مختلف مشخص نشده است. برخی از محققان بر این عقیده‌اند که ترکیبات موجود در عصاره‌ها با تغییر در ساختار غشای سلولی باکتری‌ها باعث تراوش آنزیم‌ها و مواد مغذی مختلف می‌شوند (Cox et al., 2000). کیتوزان با داشتن طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های ضد میکروبی بازده مهاری متفاوتی در برابر قارچ، باکتری گرم مثبت و منفی نشان می‌دهد (Zheng and Zhu, 2003). فعالیت ضد باکتری مرحلهٔ پیچیده‌ای است که بین باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، به علت مشخصات سطح سلولی، تفاوت دارد. گزارش شده است که کیتوزان عموماً اثر باکتری‌کشی قوی‌تری در باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی دارد. خاصیت آنتی‌میکروبی کیتوزان به دلیل نیروهای الکترواستاتیک بین گروه‌های آمینهٔ پروتونه‌شده (NH_3^+) و اثر مخرب آن در گروه‌های فسفریل در ترکیبات فسفولیپیدی دیوارهٔ سلولی باکتری است (Briandet et al., 1999). همان طور که، در تحقیق حاضر کیتوزان اثر مهارکنندگی خوبی در باکتری گرم مثبت لیستریا منوسایتوژنز نشان داد.

1. Maximal Recommended Limit

Archive of SID

www.SID.ir

عوامل فساد در فرآورده‌های دریایی عمدتاً باکتری‌های سرمادوست‌اند. این باکتری‌ها قادرند در صفر درجه و بیشتر فعالیت کنند و پس از گذراندن مرحلهٔ سکون یا فاز تأخیری و مطابقت با محیط به‌سرعت وارد فاز لگاریتمی شوند و در شرایط بی‌هوازی تکثیر پیدا کنند (Huss, 1995). از ویژگی‌های مهم باکتری‌های سرمادوست دارا بودن آنزیم پروتئولیتیک و لیپولیتیک قوی و سرعت تکثیر آن‌ها در زمان کوتاه است (Ibrahim Sallam, 2007). بیشترین حد پیشنهادشده (MRL) برای PTC در ماهی ۷ logCFU/g است (ICMSF, 1986).

تغییرات PTC گوشت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان طی دورهٔ نگهداری (۱۶ روز) در جدول ۲ آورده شده است. میزان PTC اولیهٔ گوشت فیله‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در این تحقیق در تمامی تیمارها تقریباً برابر ۰/۱۱±۴/۲۳ بود که می‌تواند نشانهٔ تازگی ماهی باشد. الگوی افزایش مقادیر PTC مشابه با الگوی تغییرات TPC است و طبق نتایج، میزان PTC در تمامی تیمارها طی زمان روندی افزایشی داشت؛ یعنی در روز صفر کمترین و در روز ۱۶ بیشترین مقدار را داشت؛ همچنین، اختلاف معنی‌دار بین زمان‌های مختلف آزمایش‌ها مشاهده شد (P<۰/۰۵). در روز ۸ آزمایش میزان PTC در تیمار شاهد از حد ۷ logCFU/g گذشته بود و در آخرین روز انجام آزمایش (روز ۱۶) تیمار شاهد دارای بیشترین میزان PTC (۰/۰۷±۱۰/۷۳ logCFU/g) بود. این نشان می‌دهد که عمر ماندگاری فیله‌ها در تیمار شاهد در دمای یخچال از نظر شاخص PTC بین ۴ تا ۸ روز است. بهترین عملکرد تا پایان دورهٔ آزمایش در تیمار کیتوزان ۰/۲۵٪ و ۰/۱۵٪ مشاهده شد (P<۰/۰۵).

افزودن عصارهٔ آویشن به میزان ۰/۸ و ۱/۲ درصد اثر ضد لیستریایی خوبی داشت. مطالعات آزمایشگاهی نشان‌دهندهٔ خاصیت ضد لیستریایی در آویشن بوده است (RasooliFriedman et al., 2002 ; et al., 2006). همچنین، این نتایج با یافته‌های Singh et al., (2003) که اسانس ۰/۵ درصد آویشن به طور معنی‌داری از تکثیر لیستریا در پنیر و هاد داگ جلوگیری کرد و یافته‌های Solomakos (2007) et al., دربارهٔ گوشت گاو مشابهت دارد (Singh et al., 2003; Solomakos et al., 2008)، اما با نتایج Abdollahzadeh et al., (2011) که استفاده از عصاره خاصیت باکتری‌کشی داشت مغایرت دارد (Abdollahzadeh et al., 2011). تیمارهای حاوی کیتوزان تأثیر مهاری قوی‌تری (P<۰/۰۵) علیه لیستریا منوسایتوژنز داشتند و در این تحقیق نقش کیتوزان در مهار باکتری نسبت به آویشن مؤثرتر بوده است به طوری که بهترین عملکرد در تیمار ۰/۲۵٪ کیتوزان مشاهده شد.

از میان ۵ تیمار به‌کاررفته، بهترین دوز پیشنهادی ۰/۲۵ درصد کیتوزان است. با این حال، برای تحقیق نتایج دقیق عصاره‌ها در دماهای مختلف نگهداری مطالعات بیشتری باید صورت بگیرد. با توجه به نتایج این تحقیق و به منظور دستاوردهایی باارزش‌تر، پیشنهاد می‌شود اثر استفادهٔ هم‌زمان از عصارهٔ آویشن شیرازی و کیتوزان بررسی شود.

Archive of SID

www.SID.ir

References

[1]. Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., Rezaei, M., Hosseini, M., Safari, R., 2011. Effects of nisin and thyme essential oil, individually and in combination, on inoculated populations of Listeria monocytogenesin minced silver carp. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology 6, 13-20.

[2]. AOAC, 2005. Official Method of Analysis. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists.

[3]. Aubourg, S.P., Piñeiro, C., Gallardo, J.M., Barros-Velazquez, J., 2005. Biochemical changes and quality loss during chilled storage of farmed turbot (< i> Psetta maxima</i>). Food Chemistry 90, 445-452.

[4]. Banerjee, S., 2006. Inhibition of mackerel (Scomber scombrus) muscle lipoxygenase by green tea polyphenols. Food research international 39, 486-491.

[5]. Bozorgnejad, A., Baghi, F., Zamanpour niavaran, A., Akbarzadeh, A., Arjmand, M., 2012. Nanocarrier Liposome Production from Lecithin and Cisplatin Loading on it New Cellular & Molecular Biotechnology Journal 2, 91-96.

[6]. Briandet, R., Meylheuc, T., Maher, C., Bellon-Fontaine, M.N., 1999. Listeria monocytogenes Scott A: cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. Applied and environmental microbiology 65, 5328-5333.

[7]. Chen, B.-Y., Pyla, R., Kim, T.-J., Silva, J.L., Jung, Y.-S., 2010. Prevalence and contamination patterns of Listeria monocytogenes in catfish processing environment and fresh fillets. Food microbiology 27, 645-652.

[8]. Cox, S., Mann, C., Markham, J., Bell, H., Gustafson, J., Warmington, J., Wyllie, S., 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil). Journal of applied microbiology 88, 170-175.

[9]. Cristóbal-Alejo, J., Tun-Suárez, J., Moguel-Catzin, S., 2006. In vitro sensitivity of Meloidogyne incognita to extracts from native Yucatecan plants. Nematropica 36, 89-98.

[10]. Debbarma, J., Kishore, P., Nayak, B.B., Kannuchamy, N., Gudipati, V., 2013. ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF GINGER, EUCALYPTUS AND SWEET ORANGE PEEL ESSENTIAL OILS ON FISH-BORNE BACTERIA. Journal of Food Processing and Preservation 37, 1022-1030.

[11]. 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.

[12]. Frangos, L., Pyrgotou, N., Giatrakou, V., Ntzimani, A., Savvaidis, I., 2010. Combined effects of salting, oregano oil and vacuum-packaging on the shelf-life of refrigerated trout fillets. Food microbiology 27, 115-121.

[13]. Friedman, M., Henika, P.R., Mandrell, R.E., 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against Campylobacter jejuni, Escherichia coli, Listeria monocytogenes, and Salmonella enterica. Journal of Food Protection® 65, 1545-1560.

Archive of SID

www.SID.ir

[14]. Goulas, A.E., Kontominas, M.G., 2007. Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (Sparus aurata): Biochemical and sensory attributes. Food Chemistry 100, 287-296.

[15]. Gram, L., Huss, H.H., 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. International journal of food microbiology 33, 121-137.

[16]. Hamzeh, A., Rezaei, M., 2011. Antioxidant and antibacterial effects of sodium alginate coating enriched with thyme essential oil on rainbow trout fillets during refrigerated storage. Iranian Journal of Nutrition Science & Food Technology 22, 11-20.

[17]. Huss, H.H., 1995. Quality and quality changes in fresh fish. FAO fisheries technical paper.

[18]. Ibrahim Sallam, K., 2007. Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. Food control 18, 566-575.

[19]. Kykkidou, S., Giatrakou, V., Papavergou, A., Kontominas, M., Savvaidis, I., 2009. Effect of thyme essential oil and packaging treatments on fresh Mediterranean swordfish fillets during storage at 4 C. Food Chemistry 115, 169-175.

[20]. Mexis, S., Chouliara, E., Kontominas, M., 2009. Combined effect of an oxygen absorber and oregano essential oil on shelf life extension of rainbow trout fillets stored at 4 C. Food microbiology 26, 598-605.

[21]. Mozafari, M.R., 2006. Bioactive entrapment and targeting using nanocarrier technologies: an introduction. In: (Eds.), Nanocarrier technologies. Springer, pp. 1-16.

[22]. Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H., 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.

[23]. Özogul, F., Polat, A., Özogul, Y., 2004. The effects of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (Sardina pilchardus). Food Chemistry 85, 49-57.

[24]. Özyurt, G., Kuley, E., Özkütük, S., Özogul, F., 2009. Sensory, microbiological and chemical assessment of the freshness of red mullet (Mullus barbatus) and goldband goatfish (Upeneus moluccensis) during storage in ice. Food Chemistry 114, 505-510.

[25]. Rasooli, I., Rezaei, M.B., Allameh, A., 2006. Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on Listeria monocytogenes. International journal of infectious diseases 10, 236-241.

[26]. Saei-Dehkordi, S.S., Tajik, H., Moradi, M., Khalighi-Sigaroodi, F., 2010. Chemical composition of essential oils in Zataria multiflora Boiss. from different parts of Iran and their radical scavenging and antimicrobial activity. Food and Chemical Toxicology 48, 1562-1567.

[27]. Singh, A., Singh, R., Bhunia, A., Singh, N., 2003. Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against Listeria monocytogenes in hotdogs. LWT-Food Science and Technology 36, 787-794.

[28]. Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P., Botsoglou, N., 2008. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against Listeria monocytogenes in minced beef during refrigerated storage. Food microbiology 25, 120-127.

Archive of SID

www.SID.ir

[29]. Vázquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., Kreft, J., 2001. Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants. Clinical microbiology reviews 14, 584-640.

[30]. Yasin, N.M., Abou-Taleb, M., 2007. Antioxidant and antimicrobial effects of marjoram and thyme in coated refrigerated semi fried mullet fish fillets. World Journal of Dairy & Food Sciences 2, 01-09.

[31]. Zhang, X., Fan, Y., Tao, X., Yick, K., 2004. Fabrication and properties of microcapsules and nanocapsules containing n-octadecane. Materials Chemistry and Physics 88, 300-307.

[32]. Zheng, L.-Y., Zhu, J.-F., 2003. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. Carbohydrate Polymers 54, 527-530.

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir