Archive of SID

فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال چهارم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۵

کارآیی مواد زیست‌فعال تولیدی از باکتری *Lactococcus lactis* همراه با اسانس‌های گیاهی، نمک و اسید استیک جهت کنترل *Listeria monocytogenes* در مدل مایع و گوشت چرخ شده *Hypophthalmichthys molitrix*

سید مهدی اجاق[۱*]، اسماعیل عبداله‌زاده[۲]، بهاره شعبانپور[۳]، معظمه کردجزی[۴]، رویا خسروی قلعه[۵]

تاریخ دریافت: شهریور ۹۵ تاریخ پذیرش: آذر ۹۵

چکیده

استفاده از تکنولوژی نگهداری زیستی به کاهش استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی برای تولید غذاهای طبیعی با حفظ خواص ارگانولپتیکی کمک می‌کند. در این پژوهش، تغییرات میکروبی و کیفیت حسی گوشت چرخ شده ماهی فیتوفاگ تحت تاثیر اسانس‌های مرزنجوش، پونه کوهی و شوید، نایسین و اسید استیک طی نگهداری در یخچال به مدت ۱۲ روز مورد بررسی قرار گرفتند. تیماربندی‌ها شامل تیمار شاهد، گوشت تلقیح شده با اسانس‌های پونه کوهی، مرزنجوش و شوید در غلظت‌های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ درصد، نمک، نایسین و تیمارهای ترکیبی (مرزنجوش- پونه کوهی، پونه کوهی- اسید استیک و مرزنجوش- اسید استیک) بودند. با توجه به نتایج، مرزنجوش بیشترین قطر هاله عدم رشد و تاثیر را روی *Listeria monocytogenes* از خود نشان داد. همچنین میزان MIC این اسانس ۲/۵µL/mL و MBC در حد ۳/۷۵µL/mL گزارش شد. شاخص حسی کلیه نمونه‌ها طی نگهداری، کاهش پیدا کردند که در نمونه شاهد بیشتر از نمونه‌های تیمار شده با اسانس بود. در آزمایش کدورت‌سنجی، اثر تیمار و زمان معنی‌دار بود و همه تیمارها نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری نشان دادند. کمترین کدورت مربوط به اسید استیک و بیشترین کدورت مربوط به تیمار شاهد بود. بنابراین، کاربرد توام نایسین با اسانس‌های گیاهی برای تامین ایمنی غذایی، مطلوب و مناسب است.

واژگان کلیدی: Lactococcus lactis، Listeria monocytogene، اسانس‌های *گیاهی، فیتوفاگ، خواص ضدمیکروبی.*

۱- دانشیار گروه شیلات، دانشکده شیلات و منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۲- دکتری فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۳- استاد گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۴- استادیار گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۵- کارشناس ارشد فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
* نویسنده مسئول: mahdi_ojagh@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

یکی از مهم‌ترین پیشرفت‌ها در سال‌های اخیر تهیه فرآورده‌های دارای ارزش افزوده از ماهیان کم‌مصرف است. این فرآورده‌ها در تعریف، به مجموعه محصولاتی گفته می‌شود که به کمک انواع مختلف فرآوری انسانی یا مکانیکی از ماده غذایی اولیه تهیه می‌شوند و از نظر ظاهر، بافت، طعم و بو با مواد اولیه خود متفاوت هستند و در عین حال ارزش تغذیه‌ای بالایی دارند (موسوی‌نسب و همکاران، ۱۳۸۷).

ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) از مهم‌ترین گونه‌های آب شیرین است که به علت هزینه تولید پایین، رشد سریع و مقاومت در برابر بیماری و استرس به میزان زیادی در سیستم پرورش توأم ماهیان پرورش می‌یابد (Siddaiah et al., 2001; Luo et al., 2008). این ماهی در رقابت با ماهیان خوش خوراک‌تر، به دلیل وجود استخوان‌های زیاد در قسمت خوراکی (Barrera et al., 2002) کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرد، بنابراین تولید فرآورده‌های متنوع از این ماهی برای ترویج مصرف آن ضروری به نظر می‌رسد (شعبانپور و همکاران، ۱۳۸۶).

ترکیب، ساختار و گروه‌های عاملی اسانس‌ها نقش مهمی در فعالیت ضدباکتریایی آن‌ها ایفا می‌کند. خواص ضدباکتریایی اسانس‌ها عمدتا به ترکیبات فنولی آن‌ها مربوط است. اسانس‌هایی که خواص ضدباکتریایی قوی علیه عوامل بیماری‌زای غذایی دارند، حاوی مقادیر زیادی کارواکرول[1] تیمول[2] و ائوژنول[3] هستند (Bagamboula et al., 2004).

Listeria monocytogenes یک باکتری گرم مثبت، فاقد اسپور و به شکل کروی یا میله‌ای است که موجب بروز لیستریوزیس در انسان و حیوان می‌شود (Okutani et al., 2004). این باکتری سبب بروز عوارض وخیمی از قبیل مننژیت، سقط جنین و عفونت کشنده در نوزادان، سالمندان، زنان باردار یا افراد با ضعف سیستم ایمنی می‌شود (Gandhi and Chikindas, 2007).

باکتری‌های اسید لاکتیک (Lactic Acid Bacteria) به طور طبیعی در مواد خام مثل شیر، گوشت و حتی در دستگاه گوارش حیوانات و انسان‌ها نیز وجود دارد (Tserovska et al., 2002). این باکتری‌ها تولید اسیدهای آلی،

1- Carvacrol
2- Thymol
3- Eugenol

www.SID.ir

Archive of SID

پراکسید هیدروژن، دی‌استیل، ترکیبات ضدقارچی مثل اسیدهای چرب و موادی به نام باکتریوسین را به عهده دارند (Savadogo, 2006). باکتریوسین‌ها ترکیبات پروتئینی با خاصیت ضدمیکروبی هستند که باعث جلوگیری از رشد سویه‌های حساس می‌شوند (Savadogo et al., 2004). در این زمینه، لاکتوباسیلوس‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. این باکتری‌ها با تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی نقش مهمی در کنترل میکروفلورهای ناخواسته و نامطلوب در روده داشته، قادر به جلوگیری از افزایش باکتری‌های بیماری‌زا هستند. باکتریوسین‌ها می‌توانند به عنوان مواد نگهدارنده زیستی طبیعی مطرح باشند (Oyetayo, 2004).

هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی کیفی و حسی گوشت چرخ شده (مینس) ماهی فیتوفاگ تحت تاثیر اسانس‌های شوید، پونه و مرزنجوش همراه با مواد زیست‌فعال تولیدی از باکتری *Lactococcus lactis*، نمک و اسید استیک برای مهار *L. monocytogenes* است.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی ماهی و تولید مینس

حدود ۲۰ قطعه ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) پرورشی به صورت تازه از بازار ماهی شهر گرگان خریداری و با یخ به آزمایشگاه فرآوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شد. ماهیان پس از شستشو با آب، به ترتیب تحت مراحل جداکردن سر و دم، تخلیه امعاء و احشا، پوست‌گیری و فیله کردن با روش دستی، قرار گرفتند. فیله‌ها پس از شستشو، به کمک دستگاه چرخ گوشت (MFW 1550، Bosch، آلمان) با قطر منافذ سه میلی‌متری چرخ شد و مینس ماهی تولید شد (Abdollahzadeh et al., 2014).

ارزیابی حسی

ارزیابی حسی مینس ماهی همراه با اسانس پونه کوهی (*Origanum vulgare*)، مرزنجوش (*Origanum majorana*) و شوید (*Anethum graveolens*) در غلظت‌های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ درصد با کمک یک گروه ۵ نفره انجام شد. نمونه‌های گیاهی مورد نظر در آب جوش قرار گرفته، به مدت ۱۰ دقیقه پخته شد و به صورت گرم در اختیار گروه قرار داده شد. برای کنترل ارزیابی حسی نمونه‌ها، از کدگذاری با عدد تصادفی استفاده شد. اعضای

www.SID.ir

Archive of SID

پانل ویژگی‌های رنگ، بو و پذیرش کلی را با استفاده از مقیاس ۹ نقطه (۱ غیر قابل قبول، ۹ بسیار قابل قبول) بررسی کردند. نمونه‌ها با نمرات زیر ۵ غیرقابل قبول تلقی می‌شد. ارزیابی حسی هر سه روز، از روز ۰ تا پایان ۱۲ روز نگهداری در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد (Abdollahzadeh et al., 2014).

تعیین میزان تلقیح باکتریایی

برای تعیین میزان تلقیح باکتری *Lactococcus lactis*، باکتری منجمد داخل میکروتیوپ اپندورف به محیط آبگوشت BHI[1] منتقل و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. سپس از کشت ۲۴ ساعته مقادیر مختلفی نمونه به لوله‌های کووت حاوی ۵ میلی‌لیتر آبگوشت BHI استریل اضافه شد و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Libra S12، Biochrom، انگلستان) جذب نوری آن‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین شد. کدورت سوسپانسیون حاصل باید به میزانی باشد که جذب نوری آن در این طول موج ۰/۰۸ تا ۰/۱ باشد که این کدورت معادل تقریبا ۱×۱۰^{۸} باکتری در هر میلی‌لیتر است (Abdollahzadeh et al., 2014). از این مایع تلقیح هم برای آزمایش‌های تشخیص حساسیت و هم به منظور تلقیح به گوشت چرخ شده ماهی استفاده شد.

روش انتشار دیسک

در این روش دیسک‌های بلانک استریل به مدت ۵ دقیقه در اسانس‌های پونه، مرزنجوش و شوید قرار داده شدند تا اسانس‌ها کاملا جذب دیسک‌ها شود. سپس این دیسک‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا خشک شوند. از کشت ۲۴ ساعته باکتری *Listeria monocytogenes*، سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک‌فارلند تهیه و به وسیله سواپ بر سطح محیط کشت مولر هینتون آگار کشت یکنواختی تهیه شد. سپس دیسک‌های حاوی اسانس بر سطح آگار قرار داده شدند و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها، حساسیت یا مقاومت باکتری‌ها به اسانس‌ها تعیین شد. همچنین پلیت‌های شاهد منفی و مثبت (پلیت‌های تلقیح نشده و پلیت‌های تلقیح شده بدون اسانس) در کنار سایر تیمارها

1- Brain Heart Infusion Broth

www.SID.ir

Archive of SID

گرمخانه‌گذاری شدند (Nanasombat and Lohasupthawee, 2005).

تعین حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC)

برای تعیین MIC[1] از روش میکرودایلوشن در محیط مولر هینتون براث استفاده شد. به این صورت که سری‌های رقت اسانس ۱۰ تایی در نظر گرفته شد و در نهایت به تمامی لوله‌ها ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری اضافه شد (غلظت نهایی باکتری در هر لوله در حد نیم مک فارلند تنظیم شد). یک لوله حاوی محیط کشت و باکتری برای شاهد مثبت و یک لوله حاوی محیط کشت برای شاهد منفی تهیه شد. تمامی لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از انکوباسیون کمترین غلظت از اسانس که در آن هیچ‌گونه کدورت ناشی از رشد مشاهده نشده بود به عنوان حداقل غلظت ممانعت کنندگی در نظر گرفته شد. این عملیات برای هر یک از اسانس‌ها و باکتری مورد نظر در سه تکرار به طور جداگانه انجام شد (حسین‌زاده و همکاران، ۱۳۹۰).

تعیین حداقل غلظت کشنده (MBC)

از تمام لوله‌هایی که در آن‌ها هیچ‌گونه رشدی مشاهده نشده بود، روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت سطحی داده شد و پلیت باکتری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، گرمخانه‌گذاری شد. پس از گذشت مدت زمان گرمخانه‌گذاری، کمترین غلظتی (بالاترین رقت) که در پلیت رشدی مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت کشنده (MBC)[2] گزارش شد (Kim et al., 1995).

ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌ها، اسید استیک، نمک و نایسین به روش جذب نوری (OD)

غلظت‌های مختلفی از اسانس‌ها، نایسین، نمک و اسید استیک متناسب با پیش آزمون‌ها به محیط کشت BHI اضافه شد. همچنین از توئین ۸۰ به عنوان امولسیون کننده استفاده شد. سپس از باکتری *L. monocytogenes* که ۲۴ ساعت قبل کشت داده شده بود (از رقت 10^{-6} کلونی باکتری در هر میلی‌لیتر) میزان ۱۰ میکرولیتر به هر لوله (در دو تکرار) اضافه شد. یک لوله آزمایش فاقد ماده ضدمیکروبی نیز به عنوان شاهد مثبت و در هر یک از رقت‌های ماده ضدمیکروبی نیز یک شاهد منفی حاوی تمامی

1- Minimum Inhibitory Concentration

2- Minimum Bactericidal Concentration

www.SID.ir

Archive of SID

اجزا به جز سوسپانسیون میکروبی رشد، در نظر گرفته شد. سپس لوله‌های حاوی تیمارهای مختلف در شیکر (Orbital Shaker OS 10 Control، IKA، آلمان) با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و هر دو ساعت یک‌بار OD[1] هر لوله با دستگاه اسپکتوفتومتر که با شاهد منفی در طول موج ۶۰۰ نانومتر تنظیم شده بود خوانده و اعداد آن ثبت شد.

آماده‌سازی سوپرناتانت عاری از سلول (CFS[2])

برای جلوگیری از رشد باکتری *L. monocytogenes*، باکتری *L. lactis* در ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت MRS[3] براث در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. بعد از تخمیر در pH ۶/۵، باکتری‌ها به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از گذشت زمان مورد نظر (۲ ساعت در pH نزدیک به خنثی)، نمونه به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس مایع رویی آن دور ریخته شد و سلول‌ها جمع‌آوری شدند. سلول‌های جمع‌آوری شده با سرم مخلوط و pH آن به ۲/۵ رسانده شد. سپس به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سوسپانسیون مذکور به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی غنی از باکتریوسین به دست آمد که pH آن با NaOH به ۷ رسانده شد. مایع رویی به مدت ۲۴ ساعت درون دستگاه خشک‌کن انجمادی (Epu 7012) گذاشته شد و از پودر به دست آمده برای انجام آزمایش‌های بعدی استفاده شد (Yang et al., 1992).

تعیین واحد AU باکتریوسین

محیط کشت مولر هینتون در حالت مذاب با سوسپانسیون باکتری *L. monocytogenes* (۶ لوگ) مخلوط و در پتری‌دیش منعقد شد. سپس چاهک‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر ایجاد شد و در هر چاهک از رقت‌های دو برابری از سوپرناتانت عاری از سلول خنثی شده که در بافر فسفات پتاسیم ۲۰ mM تهیه شده بود (یعنی مایع رقیق کننده، رقت‌های سریالی بافر فسفات بود)، به میزان ۵۰ میکرولیتر از هر رقت درون چاهک ریخته شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای اپتیمم رشد گونه بیماری‌زا (۳۷ درجه سانتی‌گراد) درون انکوباتور قرار گرفتند. در

1- Optical Density
2- Cell Free Supernatant
3- Man Rogosa Sharpe

www.SID.ir

Archive of SID

مرحله بعد، هاله عدم رشد آن‌ها بررسی شد. فعالیت باکتریوسین با واحد AU (Arbitrary Units per Milliliter) گزارش می‌شود. یک AU به عنوان ۵۰ میکرولیتر از بالاترین رقت تهیه شده که یک هاله مشخص (با اندازه اختیاری) در اطراف چاهک، علیه گونه مد نظر، به وجود می‌آورد که از رابطه ۱ محاسبه می‌شود (Hwanhlem et al., 2015).

رابطه ۱:

$$AU\ (mL^{-1}) = (1000/V)\times D$$

V: حجم تلقیح؛ D: ضریب رقت.

تیماربندی و شمارش باکتری *Listeria monocytogenes* طی دوره نگهداری

تیمارهای شاهد، گوشت هموژن شده با اسانس‌های پونه کوهی، مرزنجوش و شوید در غلظت‌های تعیین شده (۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱٪)، نایسین (۵۰۰ IU/g)، نمک (۳٪-۲) و تیمارهای ترکیبی (مرزنجوش- پونه کوهی، پونه کوهی- اسید استیک، مرزنجوش- اسید استیک) تهیه شد. برای هر تیمار ۷ بسته گوشت ۷ گرمی در نظر گرفته شد. همه تیمارها در کیسه‌های پلاستیکی بسته‌بندی و در طول دوره آزمایش (۱۲ روز) در دمای یخچال نگهداری شدند. در طول دوره آزمایش، شمارش باکتری *L. monocytogenes* هر ۴۸ ساعت انجام پذیرفت. به منظور شمارش باکتری از محیط انتخابی لیستریا آکسفورد آگار (بیولایف، آلمان) و مکمل آن استفاده شد. برای شمارش باکتری در هر نمونه، به ۵ گرم گوشت چرخ شده ماهی مقدار ۴۵mL سرم فیزیولوژی اضافه و سپس هموژن شد. به منظور شمارش باکتری‌ها، رقت‌های سریالی (۱:۱۰) تهیه شد. ۰/۱mL نمونه رقیق شده، کشت سطحی داده شد و محیط کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. سپس کلنی‌های سیاه رنگی که توسط باکتری *L. monocytogenes* روی این محیط تشکیل شد، شمارش شد. برای هر تیمار دو تکرار در نظر گرفته شد که پس از کشت، انتخاب و شمارش شدند (Abdollahzadeh et al., 2014).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 انجام شد. ابتدا بررسی نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف (Kolomogorav-Smirnov) و سپس همگنی واریانس داده‌ها با آزمون لون انجام شد که نتایج این آزمون‌ها برای آنالیز آماری داده‌های مربوط به تیمارهای آزمایش،

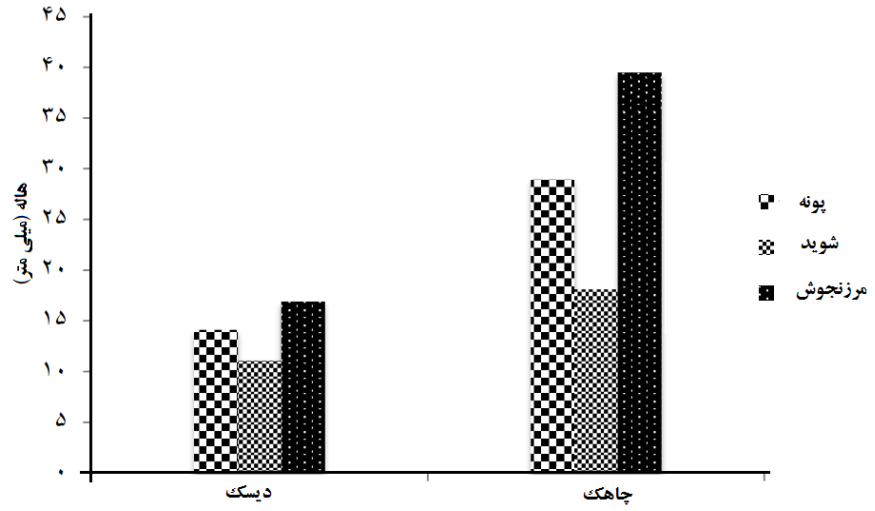
www.SID.ir

Archive of SID

مورد استفاده قرار گرفت. برای مقایسه آماری کدورت و تاثیر عامل زمان و تیمار بر فساد، از تجزیه واریانس یک طرفه و پس‌آزمون دانکن در سطح خطای ۵ درصد استفاده شد. همچنین به منظور بررسی اثر تیمارها بر ویژگی‌های حسی نمونه‌ها، از آزمون کوروسکال والیس و از آزمون دانکن برای تعیین اختلاف معنی‌دار بین نتایج به دست آمده از آزمون‌های حسی تیمارهای مورد آزمایش، استفاده شد.

نتایج

نتایج مربوط به قطر هاله عدم رشد باکتری *Listeria monocytogenes* در محیط کشت حاوی اسانس به دو روش دیسک و چاهک در شکل ۱ نشان داده شده است. مرزنجوش بیشترین هاله عدم رشد و شوید کمترین هاله عدم رشد را نشان داد.



شکل ۱: میانگین قطر هاله عدم رشد *Listeria monocytogenes* در محیط کشت حاوی اسانس‌های مختلف

نتایج مربوط به MIC و MBC اسانس‌های مرزنجوش، پونه کوهی، شوید و اسید استیک به تنهایی و ترکیب با هم در برابر *L. monocytogenes* در جدول ۱ آورده شده است. طبق نتایج، ترتیب داشتن خاصیت ضدباکتریایی در تیمارها به صورت تنها،

www.SID.ir

Archive of SID

مرزنجوش < اسید استیک < پونه کوهی < شوید و در حالت ترکیب به صورت مرزنجوش- پونه کوهی < پونه کوهی- اسید استیک < مرزنجوش- اسید استیک بود.

جدول ۱: شاخص MIC و MBC اسانس‌ها و اسید استیک به تنهایی و ترکیب با هم بر علیه باکتری *Listeria monocytogenes* (میکرولیتر بر میلی‌لیتر)

	MIC_a (µL/mL)	MIC_c (µL/mL)	MBC (µL/mL)
مرزنجوش	۲/۰۵۶	-	۳/۲۸
پونه کوهی	۶/۷۷	-	۱۱/۸۷
اسید استیک	۴/۳۷	-	۱۰
شوید	۴۰۰	-	> ۴۰۰
مرزنجوش- پونه کوهی	-	۱/۸۷	۳/۳۳
پونه کوهی- اسید استیک	-	۲/۵	۱۰
مرزنجوش-اسید استیک	-	۳/۷۵	۱۰

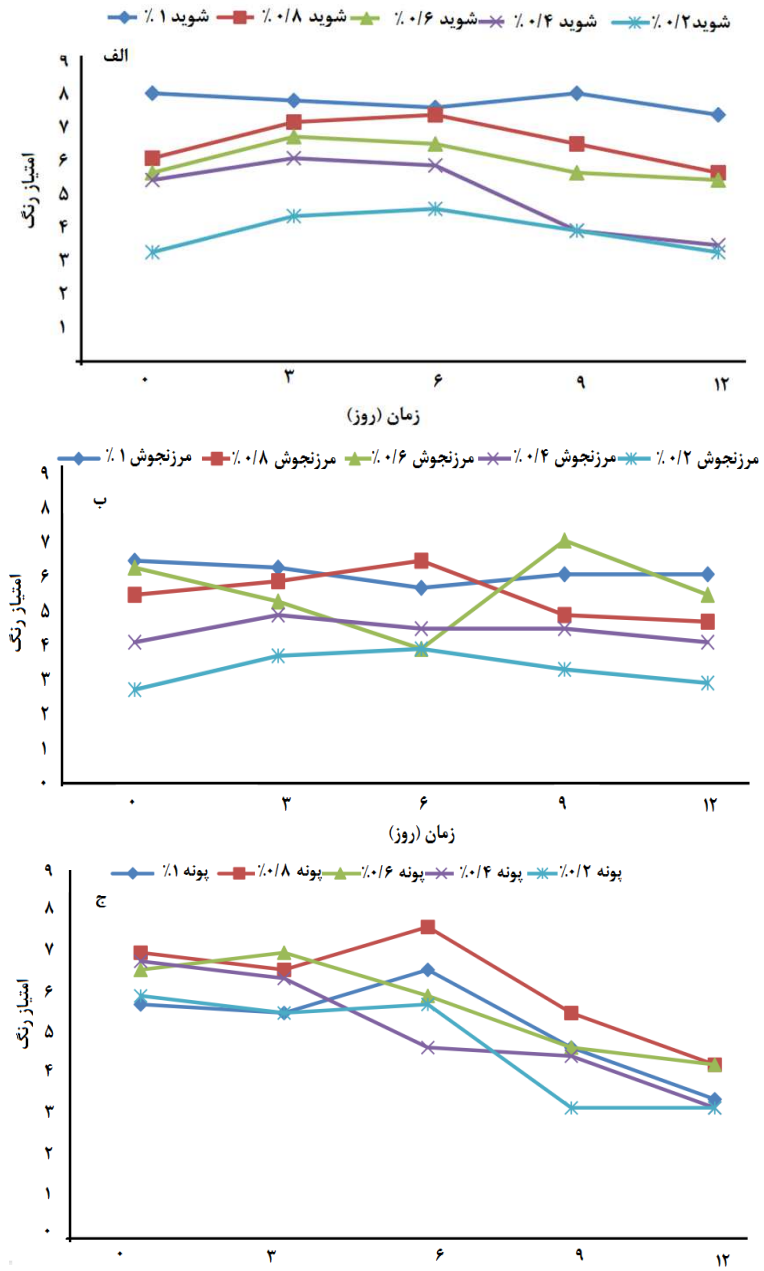
MICa : MIC ترکیب ضدمیکروبی به تنهایی MICc : MIC ترکیب ضدمیکروبی در حالت ترکیبی

نتایج امتیازدهی ارزیابی حسی اسانس‌ها طی مدت نگهداری در یخچال در شکل‌های ۲، ۳ و ۴ نشان داده شده است. همان طور که ملاحظه می‌شود امتیاز بو، رنگ و پذیرش کلی در همه تیمارها به جز در امتیاز مربوط به بو و پذیرش کلی در شوید، به طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) با گذشت زمان کاهش یافت. روز ۱۲ کمترین امتیاز را از هر سه ویژگی داشت و بیشترین امتیاز از هر ویژگی مربوط به روزهای ۳ و ۶ بود.

نتایج مربوط به تغییرات جمعیت *L. monocytogenes* تلقیح شده به مینس ماهی در شکل ۵ نشان داده شده است. باتوجه به نتایج، همه تیمارها به جز مرزنجوش نسبت به شاهد اختلاف معنی‌دار نشان دادند و بیشترین اختلاف معنی‌دار با شاهد در تیمار اسید استیک و ترکیبی (نایسین با اسانس‌های گیاهی) مشاهده شد. با توجه به ارزیابی روزها، کمترین میزان باکتری در روز سوم مشاهده شد.

www.SID.ir

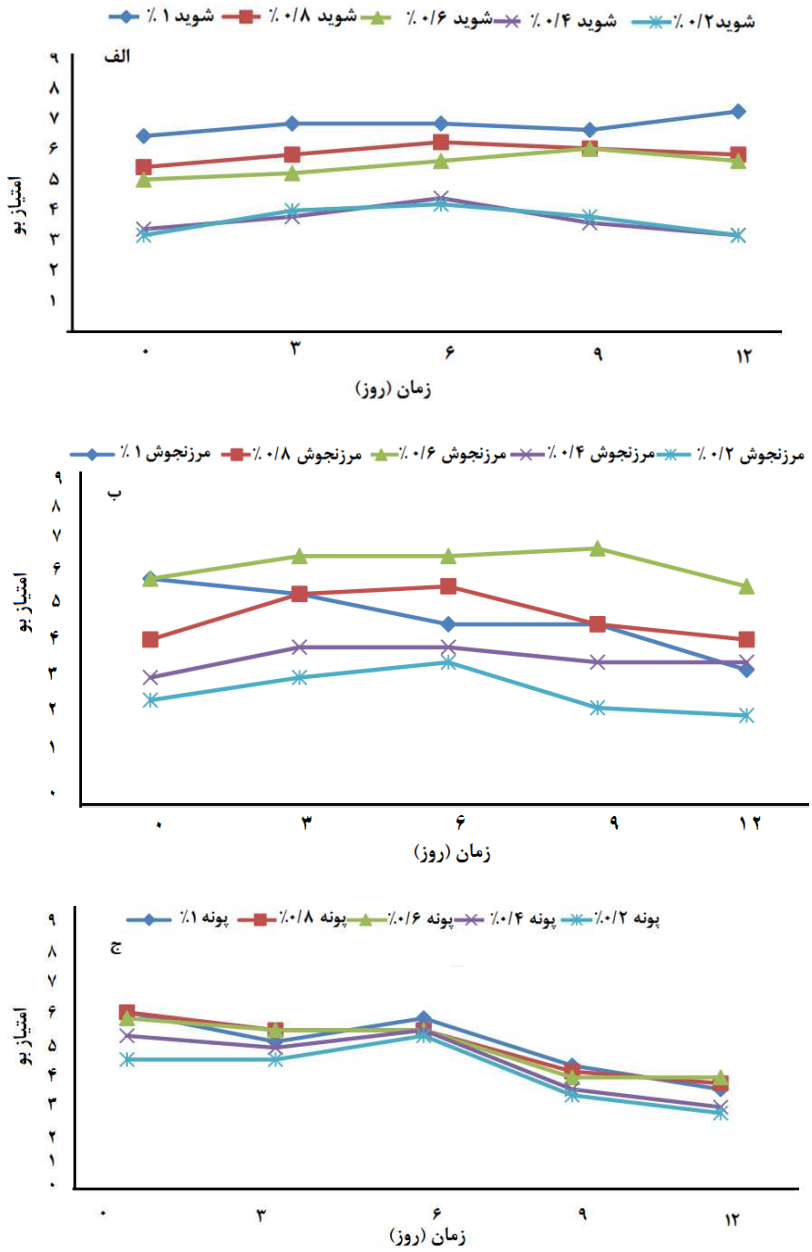
Archive of SID



شکل ۲: امتیازدهی ارزیابی حسی مربوط به رنگ در تیمارهای مختلف اسانس و مینس ماهی فیتوفاگ در طی زمان نگهداری. الف) شوید؛ ب) مرزنجوش؛ ج) پونه کوهی.

www.SID.ir

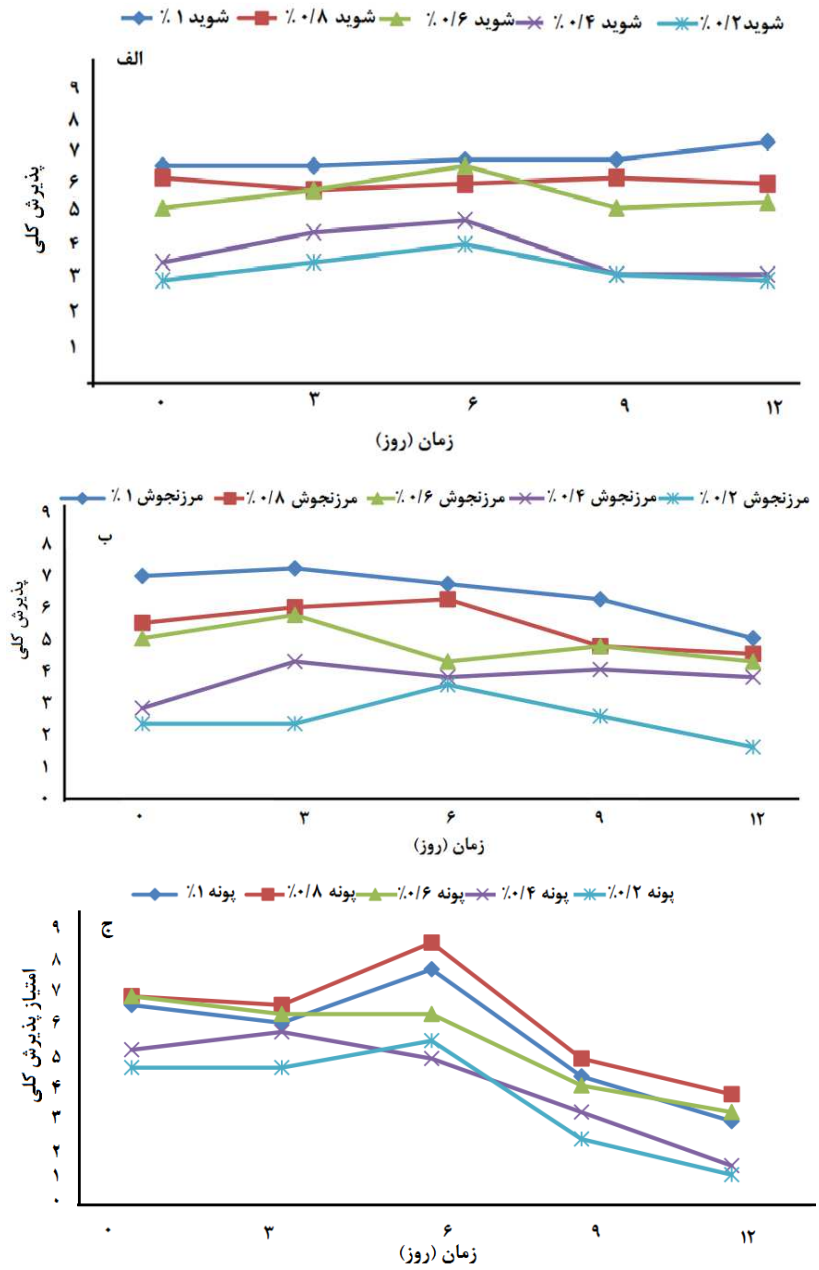
Archive of SID



شکل ۳: امتیازدهی ارزیابی حسی مربوط به بو در تیمارهای مختلف اسانس و مینس ماهی فیتوفاگ در طی زمان نگهداری. الف) شوید؛ ب) مرزنجوش؛ ج) پونه کوهی.

www.SID.ir

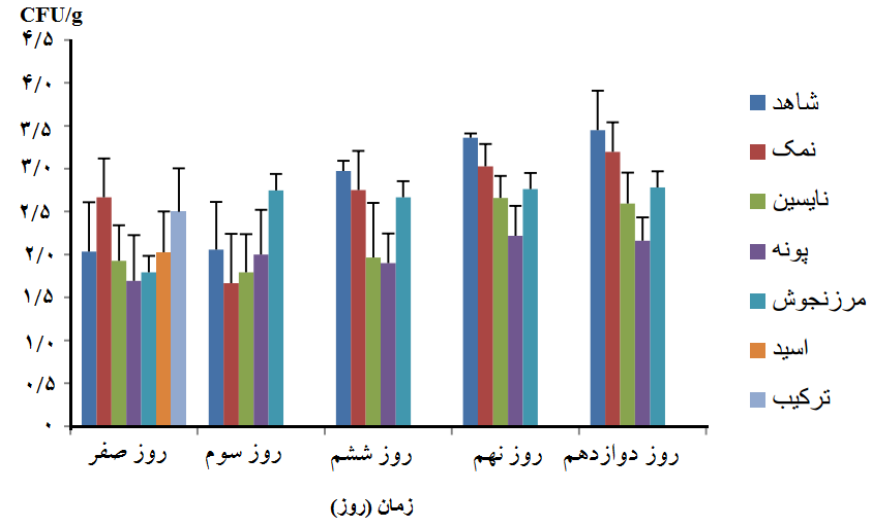
Archive of SID



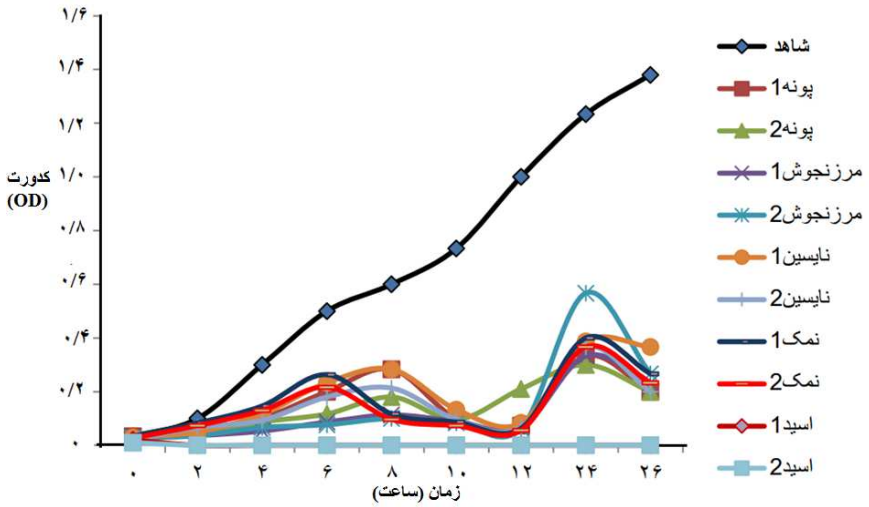
شکل ۴: امتیازدهی ارزیابی حسی مربوط به پذیرش کلی در تیمارهای مختلف اسانس و مینس ماهی فیتوفاگ در طی زمان نگهداری. الف) شوید؛ ب) مرزنجوش؛ ج) پونه کوهی.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵: تغییرات جمعیت باکتری *Listeria monocytogenes* تلقیح شده به مینس ماهی در طی دوره نگهداری (ترکیب: نایسین و اسانس‌ها) (میانگین ± انحراف معیار).



شکل ۶: تغییرات کدورت در تیمارهای مختلف اسانس‌های پونه، مرزنجوش، نایسین، نمک و اسید در محیط کشت حاوی *Listeria monocytogenes*

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

نگه‌داری ماهی در یخچال، سبب کاهش سرعت فعالیت‌های آنزیمی و شیمیایی و فعالیت موجودات ذره‌بینی می‌شود، ولی به دلیل عدم توانایی دمای یخچال برای کاهش دمای ماهی به مقدار لازم، تغییرات نامطلوبی از جمله اکسیداسیون و هیدرولیز چربی به آرامی صورت می‌گیرد و همچنین توانایی رشد بعضی از باکتری‌ها در یخچال مانند *Listeria monocytogenes*، باعث فساد مواد غذایی می‌شود. بنابراین، استفاده از موادی مناسب با فعالیت ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی به منظور بهبود کیفیت، افزایش عمر ماندگاری گوشت و در عین حال جلوگیری از ضررهای اقتصادی، ضروری و مفید به نظر می‌رسد.

در مقایسه نتایج MIC و MBC اسانس‌ها و اسید استیک به تنهایی و در ترکیب با هم علیه باکتری *L. monocytogenes*، به علت حجم بالای مورد استفاده و اثر ضدباکتریایی ضعیف، از انجام بقیه آزمایش‌ها برای شوید، صرف نظر شد. با توجه به نتایج دیسک و چاهک، بیشترین قطر هاله عدم رشد در برابر *L. monocytogenes* از بین اسانس‌ها را مرزنجوش با ۱۶/۸۹mm و ۳۹/۴۷mm از خود نشان داد. یافته‌های بسیاری در زمینه اثرات ضدباکتریایی فرآورده‌های طبیعی نشان داده است که اکثر گیاهان دارویی که خاصیت ضدمیکروبی دارند بر باکتری‌های گرم مثبت تاثیر بیشتری دارند، در حالی که تعداد کمی از آن‌ها بر باکتری‌های گرم منفی اثر می‌گذارند (Herrera et al., 1996; Meng et al., 2000; Scrinivasan et al., 2001). دلیل حساسیت بیشتر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به ترکیبات ضدباکتریایی، ممکن است ناشی از وجود تفاوت در دیواره سلولی آن‌ها در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی باشد (Enzo et al., 2002). این امر با نتایج به دست آمده از این مطالعه نیز تطبیق دارد.

در این میان بیشترین تاثیر را مرزنجوش روی *L. monocytogenes* نشان داد به گونه‌ای که در غلظت ۲/۵µL/mL از رشد آن جلوگیری و در غلظت ۳/۷۵µL/mL موجب مرگ باکتری شد. اثر ضدمیکروبی اسانس مرزنجوش، مربوط به جزء تیمول و کارواکرول است که در این اسانس میزان کارواکرول نسبت به تیمول در سطح بالاتری قرار دارد (اندی و همکاران، ۱۳۹۱).

کارواکرول با غشای سلولی از طریق تغییر در نفوذپذیری کانال‌های H^+/K^+ واکنش می‌دهد. تغییر در شیب یونی منجر به توقف و

www.SID.ir

Archive of SID

اختلال عملکردهای اساسی سلول و مرگ می‌شود (Ultee et al., 1999). همچنین ثابت شده است که واکنش اجزای اسانس با یکدیگر نقش مهمی در تعیین اثر ضدمیکروبی گیاه ایفا می‌کند، تیمول و کارواکرول دارای اثرات سینرژیستی هستند (Didry et al., 1994).

طبق مطالعات، میزان MIC نایسین علیه سویه‌های مختلف *L. monocytogenes* در حد ۷۴۰ تا ۱۰۵IU/mL و در محیط MRS آگار در حد ۱/۸۵ تا ۱۰۳IU/mL تعیین شد (Benkerroum and Sandine, 1988). در مطالعه‌ای دیگر فعالیت مهار کنندگی نایسین Z علیه سوش‌های مختلف باکتری *L. monocytogenes* از ۱۲ تا ۴۶µg/mL در محیط MRS متغیر بود (Meghrous et al., 1999). همچنین در محیط BHI حداقل غلظت مهار کنندگی نایسین علیه فرم‌های مقاوم و غیرمقاوم *L. monocytogenes* در حد ۳/۱ تا ۱۲/۵µg/mL تعیین شد (Nilsson et al., 2000). میزان MIC نایسین تولیدی در مطالعه حاضر ۳۰/۵µg/mL به دست آمد.

در این مطالعه، با توجه به شکل ۵، طی دوره نگهداری در دمای یخچال، جمعیت *L. monocytogenes* تلقیح شده به خمیر ماهی فیتوفاگ در تیمار شاهد افزایش یافت که این مورد به دلیل قابلیت رشد باکتری مذکور در شرایط سرمایی است. در انتهای دوره افزایش جزیی در تعداد باکتری‌های *L. monocytogenes* در تیمارهای مربوط به اسانس‌ها مشاهده شد که این مسئله احتمالا به دو دلیل فرار بودن اسانس‌های گیاهی و کاهش غلظت اولیه طی نگهداری و یا حذف سایر باکتری‌های رقیب *L. monocytogenes* که نسبت به اسانس حساسیت بیشتری داشته‌اند، بوده است. با این وجود برای دستیابی به اثرات ضدمیکروبی مشابه در غذا به غلظت بیشتری از اسانس نیاز است. به عنوان مثال مطالعات نشان می‌دهد که برای ایجاد خواص ضدمیکروبی مشابه محیط آزمایشگاهی ۲ تا ۱۰۰ برابر غلظت بیشتری از اسانس در غذا نیاز است (Burt, 2004). بنابراین در محیط غذایی نسبت به محیط کشت مقدار بالاتری از اسانس برای مهار باکتری لازم می‌شود، به دلیل این که میزان آب موجود در غذا نسبت به محیط کشت آزمایشگاهی کمتر است، این احتمال وجود دارد که ماده ضدمیکروب به راحتی نتواند به نواحی مورد هدف در سلول باکتری نزدیک شود (Burt, 2004). اگرچه باکتریوسین‌ها برای اعمال خاصیت ضدمیکروبی خود از طریق مکانیسم‌های مختلفی وارد عمل می‌شوند، اما به

www.SID.ir

Archive of SID

طور عمده پوشش سلولی، مورد هدف اغلب آن‌ها است. باکتریوسین نایسین در سطح ۱۰۵۶AU فعالیت مهار کنندگی ضعیفی علیه *L. monocytogenes* از خود نشان داد و با گذر زمان از فعالیت ضدباکتریایی آن کاسته شد. نتایج حاصل از این مطالعه با یافته‌های سایر پژوهشگران که بیانگر کاسته شدن خاصیت ضد لیستریایی نایسین در گوشت با گذشت زمان است، مطابقت دارد (Yin et al., 2007; Solomakos et al., 2008). مکانیسم عملکردی باکتریوسین به این صورت است که ابتدا نیروی جاذبه الکترواستاتیکی بین غشای سلولی هدف و پپتید باکتریوسین، نیروی جلو برنده سایر وقایع را فراهم می‌کند. بسیاری از باکتریوسین‌ها در دیواره میکروارگانیسم‌های حساس، سوراخ ایجاد می‌کنند. نایسین علاوه بر ایجاد سوراخ در دیواره سلولی باکتری حساس، نیروی محرکه پروتونی و تعادل pH سلول را بهم زده و باعث خروج یون‌ها و هیدرولیز ATP می شود. همه این موارد در نهایت زمینه مرگ سلولی را فراهم می‌سازند. علاوه بر مکانیسم‌های ذکر شده در مورد نایسین، مشخص شده است که این باکتریوسین می‌تواند در بیوسنتز دیواره سلولی نیز اختلال ایجاد کند. امروزه مشخص شده است که این رویداد به علت توانایی نایسین برای پیوند و محصور ساختن لیپید II (یک گیرنده پپتیدوگلیکان) است (Deegan et al., 2006).

در مطالعه Solomakos و همکاران (۲۰۰۸) اسانس آویشن با باکتریوسن نایسین علیه باکتری *L. monocytogenes* در گوشت گاو به کار گرفته شد. نتایج این مطالعه نشان داد که ترکیب این دو ماده علیه باکتری مذکور دارای خواص سینرژیستی بوده و اسانس آویشن در دوز ۰/۶٪ نسبت به نایسین (در دوزهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰AU) فعالیت ضد لیستریایی قوی‌تری داشت (Solomakos et al., 2008). در مطالعه حاضر نیز اثر نایسین و اسانس‌ها در گوشت ماهی چرخ شده به مراتب بیشتر از نایسین گزارش شد. نتایج سایر پژوهشگران نیز این موارد را تایید می‌کند (Kaur et al., 2013; Zhao et al., 2016 Diop et al., 2016). Yin و همکاران (۲۰۰۷) نایسین و پدیوسین را در سطوح مختلف بین ۳۷۵ تا ۷۵۰۰IU/g در کوفته ماهی به کار بردند. نتایج حاصل از مطالعه مذکور بیانگر محدود شدن فعالیت ضد لیستریایی این باکتریوسین‌ها در دو هفته اول مطالعه بود. علاوه بر این در مطالعه مذکور نایسین در غلظت ۱۵۰۰IU/g حتی در روزهای اول نیز قادر به کاهش لیستریا به زیر حد نسبتا

www.SID.ir

Archive of SID

قابل قبول (۱۰۰ باکتری در هر گرم غذا برای افراد سالم) نبود (Yin et al., 2007). کاهش فعالیت ضد لیستریایی نایسین در طول زمان، احتمالا به دلیل ترکیب نایسین با پروتئین و چربی غذا، بروز مقاومت میکروبی و یا به خاطر فعالیت آنزیم‌های موجود در گوشت است (Solomakos et al., 2008).

نتایج حاصل از امتیازات سنجش حسی مینس ماهی در شکل‌های ۲، ۳ و ۴ آورده شده است. نتایج بررسی‌های ارگانولپتیک مینس، توسط گروه پانل برای بررسی مدت ماندگاری و تغییرات کیفی آن‌ها طی دوره نگهداری نشان داد که کلیه شاخص‌های حسی نمونه‌ها کاهش پیدا کردند و این کاهش در نمونه شاهد بیشتر از نمونه‌های تیمار شده با اسانس بود. بو، رنگ و پذیرش کلی در همه تیمارها به جز در امتیاز مربوط به بو و پذیرش کلی در شوید به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P<۰/۰۵$). روز ۱۲ کمترین امتیاز از هر سه ویژگی را داشت و بیشترین امتیاز از هر ویژگی مربوط به روز ۳ و ۶ بود. Siddaiah و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند که امتیاز کیفیت ظاهر، بو و بافت گوشت چرخ شده ماهی فیتوفاگ با افزایش نگهداری در سردخانه کاهش یافت. Hernandes و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی حسی فیله میش‌ماهی نگهداری شده در یخ بیان کردند که با گذشت زمان نگهداری امتیاز کلیه شاخص‌های حسی کاهش یافت. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که افزودن اسانس، مدت ماندگاری را افزایش می‌دهد.

به عنوان یک نتیجه‌گیری کلی، فعالیت ضدباکتریایی افزودنی‌ها در تمامی تیمارها به جز اسید استیک، در حالت تکی کمتر بود و استفاده ترکیبی از اسانس‌ها اثر بهتر و موثرتری داشت. از آنجایی که افزودنی‌ها تحت تاثیر ترکیبات غذایی و نوع فرآوری مواد غذایی هستند، پیشنهاد می‌شود که برای تامین ایمنی غذایی مطلوب، از تکنولوژی‌های تلفیقی مانند کاربرد توام نایسین با اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی و یا استفاده همزمان با بسته‌بندی خلا یا بسته بندی با اتمسفر اصلاح شده بهره‌گیری شود. همچنین با توجه به نتایج حاصل از مطالعه حاضر، استفاده از اسانس‌های مرزنجوش، پونه کوهی و شوید به همراه مواد زیست‌فعال تولیدی از *Lactococcus lactis* و اسید استیک بسیار مناسب است و شاید بتواند ایمنی غذایی مطلوب را فراهم کند.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

اندی س.ع.، ناظری و.، هادیان ج. ۱۳۹۱. مقایسه ترکیبات شیمیایی اسانس مرزنجوش (*Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare*) جمع‌آوری شده از جنوب چالوس در مراحل گلدهی و بذردهی. مجله علوم باغبانی ایران (علوم کشاورزی ایران)، ۴۳(۲): ۱۵۹-۱۵۳.

حسین‌زاده ا.، مهاجرفر ط.، آخوندزاده بستی ا.، خنجری ع.، گندمی نصرآبادی ح.، میثاقی ع. و صادقی س. ۱۳۹۰. تعیین میزان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) لیزوزیم و آویشن شیرازی بر باکتری *Escherichia coli* :O157 H7. فصلنامه گیاهان دارویی، ۱۱(۸): ۲۱۷-۲۰۸.

شعبانپور ب.، اصغرزاده ا.، حسینی ه. و عباسی م. ۱۳۸۶. تغییرات کیفیت چربی سوریمی ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) در زمان نگهداری به صورت منجمد. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ۱۵(۱): ۷-۱.

موسوی‌نسب م.، موسوی‌نسب س .، عابدی ع.، حقیقی‌منش س.، خالصی ه. و عباسفرد ا. ۱۳۸۷. تولید فرآورده‌های دریایی با ارزش افزوده. هجدهمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی، مشهد، پارک علم و فناوری خراسان. ص: ۷-۱.

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(1): 177–183.

Bagamboula C.F., Uyttendaele M. and Debevere J. 2004. Inhibitory effect of thyme and bacil essential oils, carvacol, thyme, estragol, linalool and P-cymene to ward *Shigella somei* and *Shigella flexneri*. Journal of Food Microbiology, 21: 32–42.

Barrera A.M., Ramirez J.A., Gonzalez-Cabriiales J.J. and Vazquez M. 2002. Effect of pectins on the gelling properties of surimi from silver carp. Food Hydrocolloids, 16: 441–447.

Benkerroum N. and Sandine W.E. 1988. Inhibitory action of nisin against *Listeria monocytogenes*. Journal of Dairy Science, 71: 3237–3245.

Burt S. 2004. Essential oil: their anti-bacterial properties and potential applications in food. International Journal of Food Microbiology, 94: 223–253.

Deegan L.H., Cotter P.D., Hill C. and Ross P. 2006. Bacteriocins: Biological tools for biopreservation and shelf-life extension. International Dairy Journal, 16: 1058–1071.

www.SID.ir

Archive of SID

Didry N., Dubreuil L. and Pinkas M. 1994. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. Pharmaceutica Acta Helvetiae, 69: 25–28.

Diop M.B., Destain J., Alvrez V.B., Kone M.A. and Thonart P. 2016. Use of nisin-producing starter cultures of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* on cereal based-matrix to optimize preservative factors over fish fermentation at 30C° typical to Senegal. Journal of Food Processing and Technology, 6: 432–440.

Enzo A., Palombo E.A. and Susan J. 2002. Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology, 77: 151–157.

Gandhi M. and Chikindas M.L. 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. International Journal of Food Microbiology, 113: 1–15.

Herrera R.M., Perez M., Martin-Herrera D.A., Lopez-Garcia R. and Rabanal R.M. 1996. Antimicrobial activity of extracts from plants endemics to the Canary Islands. Journal of Phytotheraphy Research, 10: 364– 366.

Hernandes M.D., Lopez M.B., Alvares A., Fernandini E., Garcia B. and Garrido M.D. 2009. Sensory, physical, chemical and microbiological changes in aquaculchred meager (*Argyrosomus regius*) fillets during ice storage. Food chemistry, 114: 237–245.

Hwanhlem N., Jaffres E., Dousset X., Pillot G., Choiset Y., Haertle T., Kittikun A. and Ghobert J.M. 2015. Application of a nisin Z-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KT2W2L isolated from brackish water for bio-preservation in cooked, peeled and ionized tropical shrimps during storage at 8°C under modified atmosphere packaging. European Food Research and Technology, 240(6): 1259–1269.

Kaur G., Singh T.P. and Malik R.K. 2013. Antibacterial efficacy of nisin, pediocin 34 and enterocin FH99 against *Listeria monocytogenes* and cross resistance of its bacteriocin resistant variants to common food preservatives. Brazilian Journal of Microbiology, 44: 63–71.

Kim J., Marshall M.R. and Wei C.I. 1995. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43(11): 2839–2845.

Luo Y., Shen H., Pan D. and Bu G. 2008. Gel properties of surimi from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) as affected by heat treatmentan soyprosolate. Food Hydrocolloids, 22: 1513–1519.

Meghrous J., Lacroix C. and Simard R.E. 1999. The effects on

www.SID.ir

Archive of SID

vegetative cells and spores of three bacteriocins from lactic acid bacteria. Food Microbiology, 16: 105–114.

Meng J.C., Zhu Q.X. and Tan R.X. 2000. New antimicrobial mono- and sesquiterpenes from *Soroseris hookeriana* subsp, *erysimoides*. Journal of Planta Media, 66: 541–544.

Nanasombat S. and Lohasupthawee P. 2005. Antimicrobial activity of crude ethanolic extracts and essential oils of spices against salmonellae and other entrobacteria. Journal of Science and Technology, 5: 527–538.

Nilsson L., Chen Y., Chikindas M.L., Huss H.H., Gram L. and Montville T.J. 2000. Carbon dioxide and nisin act synergistically on *Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology, 66: 769–774.

Okutani A., Yumiko O., Shigeki Y. and Shizunobu I. 2004. Overview of *Listeria monocytogenes* ontamination in Japan. International Journal of Food Microbiology, 93: 131–140.

Oyetayo V.O. 2004. Phenotypic characterization and assessment of the inhibitory potential of lactobacillus isolates from different sources. African Journal of Biotechnology, 3: 355–357.

Savadogo A., Ouattara C.A.T., Bassole I.H.N. and Traore A.S. 2004. Antimicrobial avtivities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina Faso fermented milk. Pakistan Journal of Nutrition, 3: 174–179.

Savadogo A. 2006. Bacteriocins and lactic acid bacteria: A minireview. African Journal of Biotechnology, 5: 678–683.

Scrinivasan D., Nathan S., Suresh T. and Perumalsamy O. 2001. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. Journal of Ethnopharmacology, 74: 217–220.

Siddaiah D., Vidya Sagar Reddy G., Raju C.V. and Chandrasekhar T.C. 2001. Change in lipids, proteins and Kamaboko forming ability of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) mince during frozen storage. Food Research International, 34: 47–53.

Solomakos N., Govaris A., Koidis P. and Botsoglou N. 2008. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. Meat Science, 80: 159–166.

Ultee A., Kets E.P.W. and Smid E.J. 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Journal

www.SID.ir

Archive of SID

of Applied and Environmental Microbiology, 65: 4606–4610.

Tserovska L., Stefanova S. and Yordanova T. 2002. Identification of lactic acid bacteria isolated from katyk, goat's milk and cheese. Journal of Culture Collections, 3: 48–52.

Yang R., Johnson M.C. and Ray B.I. 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 58(10): 3355–3359.

Yin L.J., Wu C.W. and Jiang S.T. 2007. Biopreservative effect of pediocin ACCEL on refrigerated seafood. Fisheries Science, 73: 907–912.

Zhao X., Shi C., Meng R., Liu Z., Huang Y., Zhao Z. and Guo N. 2016. Effect of nisin and perilla oil combination against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in milk. Journal of Food Science and Technology, 53: 2644–2653.

www.SID.ir

Archive of SID

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 4, No. 4, Winter 2017

Effectiveness of bioactive compounds produced by *Lactobacillus lactis* in combination with essential oils, salts and acetic acid to control *Listeria monocytogenes* in liquid model and minced meat of *Hypophthalmichthys molitrix*

Seyed Mahdi Ojagh[1]*, Esmail Abdollahzadeh[2], Bahareh Shabanpour[3], Moazameh Kordjazi[4], Roya Khosravi Ghaleh[5]

Received: September 2016 Accepted: December 2016

Abstract

Biopersevation technology can reduce the use of chemical preservatives in food products and promote the organoleptic properties of food. In this study, the microbiological and sensory quality of minced meat produced from silver carp (*Hypophthalmichtys molitrix*) were investigated under the influence of essential oils, salt, nisin and acetic acid in refrigerated storage for 12 days. The treatments were including control, oregano essential oil (EO), marjoram EO, dill EO (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1%), salt, nisin and the combined groups (marjoram- oregano< oregano-acetic acid< marjoram-acetic acid). According to the results, marjoram EO showed the highest diameter of inhibition zone and the greatest impact against *L. monocytogenes*. The MIC and MBC of marjoram EO against *L. monocytogenes* were 2.5µL/mL and 3.75µL/mL, respectively. All sensory sample indices decreased during preservation and more decrease was observed in the control group compared to samples treated with essential oils. In turbidity test, the results of this experiment show that the effect of treatment and time is significant and more turbidity was shown in the control group in comparison to other samples. The lowest turbidity was related to acid treatment. Therefore, application of nisin with herbal essential oils is appropriate to promote seafood safety.

Key words: Lactobacillus lactis, Listeria monocytogenes, *Herbal Essential Oils*, *Silver Carp*, *Antibacterial Activity*.

1- Associate Professor, Fisheries Department, Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
2- Ph.D. in Seafood Processing, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
3- Professor, Fisheries Department, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
4- Assistant Professor, Fisheries Department, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
5- M.Sc. in Seafood Processing, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
*Corresponding Author: mahdi_ojagh@yahoo.com

www.SID.ir