

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 نانوذره کیتوزان و عصاره آویشن شیرازی نانوکپسوله شده در فساد میکروبی فیله ماهی قزل آلا رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) تلقیح شده با لیستریا منوسایتوزنز (*Listeria monocytogenes*)

- ❖ حسین علی سلمان پور احمدی\*: دانشجوی کارشناسی ارشد دانشکده علوم دامی و شیلات - دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
- ❖ حامد منوچهری: استادیار گروه شیلات - دانشکده دامپزشکی - دانشگاه آزاد اسلامی بابل
- ❖ رضا صفری: مربی پژوهشی بخش میکروبیولوژی غذایی - پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

### چکیده

غذاهای دریایی، به‌منزله منبع پروتئینی بالارزش برای انسان‌ها، در رژیم غذایی سالم نقش مهمی را ایفا می‌کنند؛ با توجه به امکان آلودگی ماهی از لحظه برداشت تا مصرف با میکروارگانیسم‌های مختلف، روش‌های متفاوتی برای جلوگیری از فساد آن‌ها به کار می‌رود. هدف تحقیق حاضر بررسی استفاده از عصاره آویشن و کیتوزان نانوکپسوله شده برای مهار رشد باکتری لیستریا منوسایتوزنز در گوشت فیله شده ماهی قزل آلا رنگین کمان در زمان نگهداری در یخچال است. به نمونه‌های فیله شده گوشت ماهی  $103 \times 1$  CFU/g باکتری لیستریا منوسایتوزنز تلقیح شد؛ سپس، نمونه‌ها در معرض عصاره آویشن در دو سطح ۰/۸ و ۱/۲ و نانوذره 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 منوسایتوزنز اندازه‌گیری شد. کمترین تعداد کل باکتری‌ها، تعداد باکتری‌های سرماگرا و تعداد باکتری‌های لیستریا منوسایتوزنز 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 منوسایتوزنز کاسته می‌شود. استفاده از فرم نانوکپسوله آویشن و کیتوزان به طور معنی‌داری از رشد باکتری لیستریا منوسایتوزنز جلوگیری کرد همچنین، کیتوزان بهتر از عصاره آویشن باعث مهار لیستریا منوسایتوزنز شد.

واژگان کلیدی: عصاره آویشن، کیتوزان، لیستریا منوسایتوزنز، ماهی قزل آلا، نانوکپسول.

## ۱. مقدمه

مصنوعی (Banerjee, 2006)، به کارگیری اسانس‌ها (Frangos et al., 2010)، روکش دار 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 عصاره 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 به منزله 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 ماده 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 اندازه ذرات بسیار ریز است. در این روش مواد اولیه 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 تمام‌شده ماده نگهدارنده بیشتر خواهد بود؛ از آن‌جا که فرم نانو دارای

افزایش جمعیت و کمبود مواد غذایی، به خصوص منابع پروتئینی با کیفیت بالا، سبب شده است تا در چند دهه اخیر توجه خاصی به منابع خوراکی دریایی صورت پذیرد. از طرف دیگر، آزیان به دلیل pH بالای عضله ( $pH > 6$ ) پس از جمود نعشی، حضور مقادیر بالای ترکیبات ازته 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 وسیله باکتری لیستریا منوسایتوزنز ایجاد می‌شود (Chen et al., 2010). لیستریا منوسایتوزنز باسیل کوتاه، گرم مثبت، بدون اسپور، هوازی اختیاری، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت و سرماگراست که در دمای ۲۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد متحرک و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بدون تحرک است (Vázquez-Boland et al., 2001). با وجود این که تعداد عفونت‌های غذایی گزارش شده ناشی از لیستریا منوسایتوزنز 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

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 تهیه نانوذرات کیتوزان (سیگما-آلدریج، وزن مولکولی مدیوم-درجه داستیلاسیون ۷۵۰)، پس از تهیه سوسپانسیون آبی از کیتوزان، از دستگاه اولتراسوند به مدت ۵ دقیقه به منظور تولید نانوذره 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. تهیه ماهی

۱۵ قطعه ماهی قزل‌آلا به وزن  $600 \pm 20$  گرم از مزرعه 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 منوسایتوزنز

#### برای تلقیح

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

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

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

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۱.۲. تهیه عصاره آویشن

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

### ۲.۲. نانو کردن

عصاره آویشن شیرازی با استفاده از دستگاه اسپری درایر (Labplant, USA) که دمای ورودی آن ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد و دمای خروجی نیز ۸۵ درجه 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 (به‌منزله سورفاکتانت) در دمای ۴۰ درجه 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 درجه سانتی‌گراد، آویشن به مخلوط لیپوزوم و سورفاکتانت اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در دمای محیط شیک

و تعداد کل باکتری لیستریا منوسایتوزنز) 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 انجام شده 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 فیله ماهی با استفاده از تیغ اسکارپل و پنس استریل شده 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 تهیه شده از محیط کشت تریپتیک سوی آگار (Tryptic Soy Agar) به صورت کشت سطحی استفاده شد (AOAC, 2005). پلیت‌های کشت داده شده مربوط به کل باکتری‌ها بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد شمارش شدند. برای شمارش PTC از نمونه‌های تهیه شده، از محیط تریپتیک سوی آگار (TSA) استفاده شد. پلیت‌های مربوط به باکتری‌های سرمادوست بعد از ۱۰ روز انکوباسیون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد شمارش شدند (MacFaddin, 2000). برای شمارش لیستریا منوسایتوزنز از محیط

نخست، در شرایط استریل باز شد سپس، به محیط کشت مایع (Tryptic soy broth) TSB انتقال یافت و به مدت ۴۸ ساعت در ۳۰ درجه 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  $1 \times 10^8$  باکتری در هر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد (Debbarma et al., 2013). به منظور دستیابی به این محدوده 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 درجه سانتی‌گراد) انجام پذیرفت. در پایان به فیله‌های ماهی قزل‌آلا تعداد  $1 \times 10^3$  عدد باکتری در گرم به همراه دوزهای مختلف آویشن و کیتوزان اضافه شد. دوزهای آویشن و کیتوزان بر اساس مقدار تعیین شده در ۱۰۰ گرم فیله محاسبه شدند؛ سپس، نمونه‌ها ماساژ داده شدند تا از اختلاط کامل باکتری با فیله 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 درجه سانتی‌گراد، هر ۴ روز یک بار از نظر میکروبی (تعیین کل باکتری‌های قابل رؤیت<sup>۱</sup> (TVC)، تعداد کل باکتری‌های سرمادوست<sup>۲</sup> (PTC)،

1. Total viable counts
2. Psychrotrophic counts

تجزیه واریانس یک طرفه و آزمون دانکن با حداقل معناداری در سطح ۵٪ استفاده شد. به منظور مقایسه بین تیمارها به طور مجزا از آزمون t نیز استفاده شد.

### ۳. نتایج

#### ۱.۳. شمارش تعداد کلی باکتری‌ها (TVC)

تعداد باکتری‌های هوای مزوفیل در روز صفر نگهداری در تیمارهای مختلف تفاوت معنی داری نداشت و در تمامی نمونه گیری‌های بعدی تعداد باکتری‌های کل در تیمارهای حاوی نگهدارنده کمتر از تیمار شاهد بود ( $P < 0/05$ ) به طوری که، در پایان دوره آزمایش کمترین تعداد باکتری در تیمار کیتوزان ۰/۲۵٪ مشاهده شد.

انتخابی CHROMagartm Listeria supplement (محیط کشت کروموزنیک، شرکت میکروبیولوژی کروم آگار فرانسه) استفاده شد. نمونه رقیق شده بر روی محیط کشت، کشت سطحی داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری شد. باکتری لیستریا منوسایتوزنز بر روی این محیط کلنی‌هایی به رنگ آبی با هاله سفید تشکیل می دهد.

#### ۶.۲. تجزیه و تحلیل آماری

همه آزمایش‌ها در سه تکرار صورت گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS 19 تحت برنامه ویندوز انجام گرفت. از طرح آزمایش کاملاً تصادفی استفاده شد. به منظور بررسی وجود یا نبود اختلاف معنادار بین تیمارها همچنین در هر تیمار در طول مدت نگهداری در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی گراد از

جدول ۱. تغییرات تعداد کل باکتری‌ها در فیله ماهی قزل آلائی رنگین کمان در تیمارهای مختلف طی زمان در یخچال ( $4 \pm 1^\circ C$ )

تیمار	۰	۴	۸	۱۲	۱۶
شاهد	$a4/56 \pm 0/08^*$	$d6/60 \pm 0/10$	$d7/96 \pm 0/04$	$d9/52 \pm 0/20$	$d10/98 \pm 0/01$
آویشن ۰/۸٪	$a4/15 \pm 0/04$	$c5/70 \pm 0/04$	$c6/53 \pm 0/16$	$c7/49 \pm 0/06$	$c8/92 \pm 0/05$
آویشن ۱/۲٪	$a4/15 \pm 0/05$	$b4/92 \pm 0/08$	$b5/91 \pm 0/04$	$b6/98 \pm 0/02$	$b8/82 \pm 0/02$
کیتوزان ۰/۱۵٪	$a4/30 \pm 0/08$	$a4/77 \pm 0/06$	$a5/69 \pm 0/05$	$a6/74 \pm 0/10$	$a7/96 \pm 0/04$
کیتوزان ۰/۲۵٪	$a4/15 \pm 0/04$	$a4/82 \pm 0/01$	$a5/77 \pm 0/07$	$a6/71 \pm 0/07$	$a7/75 \pm 0/01$

\*مقادیر داده شده به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار است.

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

#### ۲.۳. شمارش تعداد باکتری‌های سرماگرا

(PTC)

تعداد باکتری‌های سرماگرا در روز صفر نگهداری در تیمارهای مختلف تفاوت معنی داری نداشت و در

تمامی نمونه گیری‌های بعدی تعداد باکتری‌های سرماگرا در تیمارهای حاوی نگهدارنده کمتر از تیمار شاهد بود ( $P < 0/05$ )؛ به طوری که، در روز ۴، تعداد باکتری‌های سرماگرا در تیمار کیتوزان ۰/۱۵٪ و

کیتوزان ۰/۲۵٪ کمترین بود، در روز ۸، بین تعداد باکتری های سرماگرا در تیمارهای حاوی نگهدارنده تفاوت معنی داری مشاهده نشد ( $P > 0/05$ )، اما در روزهای ۱۲ و ۱۶ آزمایش تعداد باکتری های سرماگرا در تیمارهای کیتوزان ۰/۱۵٪ و کیتوزان ۰/۲۵٪ کمترین بود.

جدول ۲. تغییرات تعداد باکتری های سرماگرا در فیله ماهی قزل آلائی رنگین کمان در تیمارهای مختلف طی زمان در یخچال ( $4 \pm 1^\circ C$ )

مدت زمان نگهداری (روز)					تیمار
۱۶	۱۲	۸	۴	۰	
c10/74 ± 0/07	d9/46 ± 0/10	b7/84 ± 0/05	d5/94 ± 0/04	a4/24 ± 0/04*	شاهد
b8/69 ± 0/07	c6/83 ± 0/04	a5/78 ± 0/08	c5/35 ± 0/05	a3/95 ± 0/03	آویشن ۰/۸٪
b8/69 ± 0/07	b6/83 ± 0/04	a5/78 ± 0/08	b4/82 ± 0/05	a4/00 ± 0/02	آویشن ۱/۲٪
a7/83 ± 0/04	a6/66 ± 0/02	a5/52 ± 0/02	a4/64 ± 0/01	a4/10 ± 0/06	کیتوزان ۰/۱۵٪
a7/83 ± 0/05	a6/60 ± 0/07	a5/67 ± 0/07	a4/63 ± 0/03	a4/20 ± 0/04	کیتوزان ۰/۲۵٪

\*مقادیر داده شده به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار است.

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

نداشت و در تمامی نمونه گیری های بعدی در تیمارهای حاوی نگهدارنده کمتر از تیمار شاهد بود ( $P < 0/05$ ).

### ۳.۳. شمارش تعداد باکتری های لیستریا منوسایتوزنز

تعداد باکتری های لیستریا منوسایتوزنز در روز صفر نگهداری در تیمارهای مختلف تفاوت معنی داری

جدول ۳. تغییرات تعداد باکتری های لیستریا منوسایتوزنز در فیله ماهی قزل آلائی رنگین کمان در تیمارهای مختلف طی زمان در یخچال ( $4 \pm 1^\circ C$ )

مدت زمان نگهداری (روز)					تیمار
۱۶	۱۲	۸	۴	۰	
d10/85 ± 0/04	d8/82 ± 0/12	d7/49 ± 0/12	d5/78 ± 0/04	a2/91 ± 0/02*	شاهد
c8/78 ± 0/02	c7/61 ± 0/10	c6/91 ± 0/02	c4/92 ± 0/06	a2/87 ± 0/03	آویشن ۰/۸٪
b8/78 ± 0/02	c7/55 ± 0/03	b6/78 ± 0/08	c4/88 ± 0/08	a2/93 ± 0/03	آویشن ۱/۲٪
b8/71 ± 0/05	b7/34 ± 0/02	b6/68 ± 0/06	b4/78 ± 0/02	a2/09 ± 0/02	کیتوزان ۰/۱۵٪
a8/58 ± 0/01	a7/19 ± 0/08	a6/57 ± 0/08	a4/65 ± 0/01	a2/92 ± 0/05	کیتوزان ۰/۲۵٪

\*مقادیر داده شده به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار است.

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

آویشن ۰/۸٪، تا روز ۱۲ کمتر از این حد بود که با نتایج آزمایش‌هایی مانند نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعه انجام شده درباره فیله نیمه سرخ شده کفال با پوشش عصاره آویشن ۲/۵ و ۵٪ (Yasin and Abou-Taleb, 2007) و فیله ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با پوشش آلزینات 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 مهارتی متفاوتی در برابر قارچ، باکتری گرم مثبت و منفی نشان می‌دهد (Zheng and Zhu, 2003). فعالیت ضد باکتری مرحله 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 آمینه پروتونه شده ( $\text{NH}_3^+$ ) و اثر مخرب آن در گروه‌های فسفریل در ترکیبات فسفولیپیدی دیواره سلولی باکتری است (Briandet et al., 1999). همان‌طور که، در تحقیق حاضر کیتوزان اثر مهارکنندگی خوبی در باکتری گرم مثبت لیستریا منوسایتوزنز نشان داد.

#### ۴. بحث و نتیجه‌گیری

استفاده از مواد مؤثره گیاهان دارویی به صورت نانوکپسول باعث کاهش واکنش ماده فعال (ماده مؤثره 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 همه 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، دیواره پوشش باز و ماده هسته به آرامی 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 فیله ماهی قزل‌آلای رنگین کمان طی دوره نگهداری (۱۶ روز) در جدول ۱ آورده شده است. بهترین عملکرد تا پایان دوره آزمایش در تیمار کیتوزان ۰/۲۵٪ دیده شد ( $7.75 \pm 0.1 \log \text{CFU/g}$ ). حداکثر محدوده پیشنهادی (MRL) برای TVC در ماهی  $7 \log \text{CFU/g}$  عنوان شده است (ICMSF, 1986). بار باکتریایی تیمار شاهد تا روز ۴ کمتر از حد مجاز تعیین شده برای ماهی خام بود؛ در حالی که، بار باکتریایی در تیمارهای حاوی نگهدارنده طبیعی، صرف نظر از

است. بهترین عملکرد تا پایان دوره آزمایش در تیمار کیتوزان ۰/۲۵٪ و ۰/۱۵٪ مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). افزودن عصاره آویشن به میزان ۰/۸ و ۱/۲ درصد اثر ضد لیستریایی خوبی داشت. مطالعات آزمایشگاهی نشان‌دهنده 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., درباره گوشت گاو مشابهت دارد (Singh et al., 2003; Solomakos et al., 2008a). اما با نتایج et al., (2011) Abdollahzadeh که استفاده از عصاره خاصیت باکتری‌کشی داشت مغایرت دارد (Abdollahzadeh et al., 2011). تیمارهای حاوی کیتوزان تأثیر مهاری قوی‌تری ( $P < 0/05$ ) 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 استفاده هم‌زمان از عصاره آویشن شیرازی و کیتوزان بررسی شود.

عوامل فساد در فرآورده‌های دریایی عمدتاً باکتری‌های سرمادوست‌اند. این باکتری‌ها قادرند در صفر درجه و بیشتر فعالیت کنند و پس از گذراندن مرحله 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  $7 \log CFU/g$  است (ICMSF, 1986).

تغییرات PTC گوشت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان طی دوره نگهداری (۱۶ روز) در جدول ۲ آورده شده است. میزان PTC اولیه گوشت فیله‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در این تحقیق در تمامی تیمارها تقریباً برابر  $4/23 \pm 0/11$  بود که می‌تواند نشانه 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 ( $P < 0/05$ ). در روز ۸ آزمایش میزان PTC در تیمار شاهد از حد  $7 \log CFU/g$  گذشته بود و در آخرین روز انجام آزمایش (روز ۱۶) تیمار شاهد دارای بیشترین میزان PTC ( $10/73 \pm 0/07 \log CFU/g$ ) بود. این نشان می‌دهد که عمر ماندگاری فیله‌ها در تیمار شاهد در دمای یخچال از نظر شاخص PTC بین ۴ تا ۸ روز



## 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 monocytogenes* in 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 (*Psetta maxima*). *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.

- [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.

- [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.

