تغــذیه و بیــوشیمی آبزیــان
سال دوم، شماره سوم،
پاییز و زمستان ۱۳۹۴

اثرات مستقل و ترکیبی نایسین Z و سدیم سیترات بر روی شاخص‌های شیمیایی و جمعیت باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک مزوفیل و سرمادوست فیله ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii*) طی نگهداری در دمای ۴ °C

مسعود هدایتی‌فرد*[۱]، مژگان علی نژاد[۲]، مسعود هاشمی کروئی[۳]
۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، واحد قائم‌شهر، دانشگاه آزاد اسلامی قائم شهر، مازندران
۲- گروه شیلات، مرکز تحصیلات تکمیلی، واحد قائم‌شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم شهر، مازندران
۳- گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، مازندران

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۲/۰۸ تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۶/۲۱

چکیده
تأثیر مستقل و ترکیبی نایسین Z (۱/۵٪) و سدیم سیترات (۲٪) بر زمان ماندگاری فیله ماهی سفید نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. شاخص‌های شیمیایی شامل مجموع بازهای نیتروژنی فرار (TVB-N)، اندیس پراکساید (PV)، اسید تیوباربیتوریک (TBA) و شمارش جمعیت باکتری‌ها شامل مزوفیل (TMC)، سرمادوست (TPC) و اسید لاکتیک (LAB) در زمان‌های صفر، ۳، ۶، ۹ و ۱۲ روز اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که شاخص‌های TVB-N، PV و TBA در تیمار شاهد بالاتر از تیمارهای حاوی نگهدارنده بودند. باکتری‌های مزوفیل و سرمادوست نمونه شاهد در روز سوم نگهداری (به ترتیب با ۶/۵۳ و ۶/۷۱ CFU/g) به حداکثر میزان مجاز رسیدند، در حالی که تیمارهای حاوی نگهدارنده هم سرمادوست (بین ۶/۷۲ تا ۶/۹۳ CFU/g) و هم مزوفیل (بین ۶/۶۷ تا ۶/۹۰ CFU/g) تا روز نهم نگهداری شرایط بهتری نشان دادند ($P<0/01$). همچنین، رشد باکتری‌های اسید لاکتیک در تیمار شاهد تا روز نهم (با ۶/۸۸ CFU/g) کنترل شد، اما در تیمارهای حاوی نگهدارنده در پایان همین روز متوقف شدند ($P<0/01$). نتایج مشخص کرد که استفاده توأم از نایسین Z و سیترات سدیم به عنوان نگهدارنده مؤثر می‌تواند به منظور افزایش زمان ماندگاری فیله ماهی سفید طی نگهداری در سردخانه مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: باکتریوسین، سدیم سیترات، ماهی سفید، نایسین Z

*نویسنده مسئول: persiafish@gmail.com

مقدمه

ماهی‌ها به دلیل داشتن پروتئین نسبتاً بالا و چربی‌های غیراشباع فراوان در عضلات، جزء فسادپذیرترین مواد غذایی محسوب می‌شوند (Behnam et al. 2015). تنوع در ترکیبات شیمیایی ممکن است به دلیل تفاوت در تغذیه، فصل صید، چرخه تخم‌ریزی، تفاوت‌های جنسی، اندازه ماهی، ناحیه زندگی و دیگر عوامل محیطی باشد (Nishimoto et al. 1985). شاخص‌های کیفی ماهی و فرآورده‌های دریایی طی دوره نگهداری از لحاظ کیفی دچار افت می‌شود. این کاهش کیفیت با افزایش شاخص‌های شیمیایی و جمعیت باکتریایی همراه است (هدایتی‌فرد، ۱۳۸۲). تجزیه ترکیبات نیتروژنی در طول نگهداری ماهی می‌تواند نشانگر رشد باکتری‌ها، کاهش کیفیت و در نهایت فساد ماهی باشد (Gram and Huss, 1996). مواد ازته فرار یا TVB-N به تنهایی شاخص با قدرتی برای ارزیابی تازگی ماهی نیست (Castro et al. 2006)، ولی با توجه به اینکه با دیگر شاخص‌های فساد از جمله جمعیت باکتری‌ها مرتبط است، معمولاً از آن برای ارزیابی فسادهای ترکیبی گوشت ماهی استفاده می‌شود (هدایتی‌فرد، ۱۳۸۲). میزان TVB-N دامنه وسیعی از ترکیبات فرار بازی همانند آمونیاک، متیل آمین، دی متیل آمین و تری متیل آمین[1] را در بر می‌گیرد (Connell, 1990).

به منظور ارزیابی درجه اکسیداسیون چربی در ماهیان از شاخص‌های پراکساید (PV) و تیوباربیتوریک اسید (TBA) استفاده می‌شود که اولی، میزان اکسیداسیون اولیه و دومی، میزان محصولات ثانویه اکسیداسیون به‌ویژه آلدئیدها را نشان می‌دهد (Raharjo and Sofos, 1993: Namulema et al. 1999). میزان چربی در ماهیان دریایی و پرورشی متفاوت است (USDA, 1987; Gram and Dalgaard, 2002). بنابراین، استفاده از موادی مناسب با فعالیت ضد باکتریایی و ضداکسیدانی به منظور جلوگیری از افت کیفیت، افزایش عمر ماندگاری گوشت و در عین حال، جلوگیری از ضررهای اقتصادی، ضروری و مفید به نظر می‌رسد (Yin and Cheng, 2003).

امروزه استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها در مواد غذایی مورد قبول مصرف‌کنندگان نیست (Hurst, 1981; Jay, 2000; Sallam, 2007) و از طرفی، ترکیبات شیمیایی دارای محدودیت‌هایی در استقبال عمومی از نظر مصرف هستند.

در هر حال، تحقیقات گذشته تائید کرده‌اند که این دو روش تجاری نگهداری منجر به افزایش اکسیداسیون چربی‌ها (به ویژه اسیدهای چرب چند غیراشباع) و کاهش ارزش غذایی فرآورده می‌شوند (Behnam et al. 2015). بنابراین، ضروری است تا نگهدارنده‌های مجاز و فناوری‌های نوین نگهداری برای افزایش عمر ماندگاری فرآورده‌های دریایی به کار گرفته شوند.

باکتریوسین‌ها، پروتئین‌های ضدباکتریایی‌اند که توسط باکتری‌ها تولید شده و باعث کشته شدن یا جلوگیری از رشد دیگر باکتری‌ها می‌شوند (Hurst, 1981; Stevens et al. 1991). در میان باکتریوسین‌های تولیدی توسط باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک که در بسیاری از غذاهای تخمیری و غیرتخمیری یافت می‌شوند، نایسین[2] یکی از باکتریوسین‌هایی است که به طور گسترده برای نگهداری فرآورده‌های غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد و در واقع، یک باکتریوسین پلی‌پپتیدی با اثرات باکتری‌های گرم مثبت است که به وسیله زیرگروه‌های لاکتوکوکوس‌هایی همچون *Lactococcus lactis* تولید می‌شود (Hurst, 1981). فعالیت ضدمیکروبی نایسین بر علیه باکتری‌های گرم مثبت به واسطه وجود خلل و فرج در ساختمان غشای آن است که سبب نشت محتویات سیتوپلاسم می‌شود (Hurst, 1981). در برخی مطالعات نیز بیان شده که استفاده بالقوه از اسیدهای آلی یا نمک‌شان به عنوان محلول‌های ضدمیکروبی کاربرد دارد (Palumbo and Williams, 1994). از طرفی، غیرسمی بودن نایسین، استفاده از این نگهدارنده را مطمئن می‌کند.

مطالعه کاربرد انواع باکتریوسین و به ویژه نگهدارنده‌های حاوی سدیم در صنایع شیلاتی، در سال‌های اخیر توسعه یافته است. به طوری که Steven و همکاران (۱۹۹۱) دریافتند نایسین موجب فعالیت جلوگیری کننده علیه باکتری‌های گرم منفی می‌شود. تحقیقاتی هم توسط

[1] MA, DMA and TMA

[2] Nisin

Kim و همکاران (۱۹۹۵) و Zhuang و همکاران (۱۹۹۶) در افزایش عمر ماندگاری فیله گربه ماهی (*Ictalurus punctatus*) با استفاده از نمک اسیدهای آلی صورت گرفت که نتایج مثبت و مؤثری در پی داشته است. همچنین از نایسین با غلظت ۱۰۰ تا ۵۰۰ IU/g در سوسیس فرانکفورتر[۱] استفاده شد که در نمونه‌های حاوی نایسین پس از بسته‌بندی و ۴۵ روز نگهداری، رشد این باکتری به طور معنی‌داری کاهش یافت (Samelis et al. 2002). در ادامه Sallam (۲۰۰۷) عمر ماندگاری، شاخص‌های کیفی و میکروبی ماهی ساک آی (*Oncorhynchus nerka*) را تحت تأثیر نمک اسیدهای آلی همانند محلول‌های ۲/۵٪ استات سدیم، لاکتات سدیم و سیترات سدیم ارزیابی کردند. Manju و همکاران (۲۰۰۷) نیز اثرات استات سدیم را همراه با بسته‌بندی در خلاء بر روی ماهی دانه مرواریدی (*Etroplus suratensis*) طی نگهداری در سردخانه مطالعه کردند. Pastoriza و همکاران (۱۹۹۸) نیز اثر کلرید سدیم بر روی خصوصیات کیفی و میکروب شناختی ماهی هیک (*Merluccius merluccius*) را در طول نگهداری در یخ و بسته‌بندی در اتمسفر اصلاح شده (MAP[۲]) مطالعه کردند.

همچنین، در داخل کشور توان بالقوه ضد باکتریایی و ضد اکسیدانی باکتریوسین Z (با غلظت ۲٪) در افزایش زمان ماندگاری فیله ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بسته‌بندی شده در خلاء[۳] در دمای نگهداری ۴ درجه سانتی‌گراد توسط Behnam و همکاران (۲۰۱۵) بررسی شد و از سوی دیگر، اصغری و همکاران (۱۳۸۸) تأثیر نایسین Z و استات سدیم را بر زمان ماندگاری فیله کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد مطالعه کردند. همچنین Shirazinejad و همکاران (۲۰۱۰) اثر توأم اسید لاکتیک و نایسین را بر روی کاهش فلور میکروبی طبیعی میگو در دمای یخچال بررسی کردند و دهبندی و همکاران (۱۳۹۳) نیز اثرات نایسین Z را روی حفظ کیفیت سوریمی تهیه شده از کیلکا ارزیابی کردند. با توجه به تحقیقات موجود، کاربرد نایسین و سیترات سدیم اثرات منفی روی شاخص‌های حسی به خصوص طعم ماهیان نداشته‌اند (Kashiri et al. 2011).

ماهی سفید دریای خزر با نام علمی *Rutilus frisii* مهمترین ماهی استخوانی اقتصادی دریای خزر است و اغلب به صورت کامل و یا به صورت فیله شده در بازارهای ماهی قابل تهیه است. طبق آخرین آمار، میزان صید این گونه دریای خزر به کمک تکثیر نیمه طبیعی و بازسازی ذخایر آن به ۱۳۸۳۹ تن در سال ۱۳۹۲ افزایش یافته است (وزارت جهاد کشاورزی، ۱۳۹۲).

هدف از پژوهش حاضر حفظ کیفیت توأم با افزایش زمان ماندگاری فیله ماهی سفید بسته‌بندی شده در شرایط معمولی و نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، با استفاده مستقل و ترکیبی از باکتریوسین Z "به عنوان نگهدارنده بیولوژیک" و همچنین سدیم سیترات و بررسی تأثیر مواد به کار رفته در بهبود شاخص‌های شیمیایی و انواع جمعیت باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک سرمادوست و مزوفیل است.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی نمونه

تعداد ۲۰ قطعه ماهی سفید با میانگین وزن ۲/۱۰ ± ۱۰۰۰ گرم از بازار ماهی (شهرستان ساری، مازندران) تهیه شد و در کمتر از ۴۵ دقیقه در جعبه‌های فوم عایق یونولیت به همراه یخ (به نسبت ۱:۱) به آزمایشگاه‌های تخصصی منتقل شد. بلافاصله اقدامات فیله کردن ماهی به تعداد ۴۰ فیله با وزن انفرادی ۲/۵۵ ± ۲۰۰ گرمی انجام شد. بر اساس گستره وزنی، ۱۰ فیله در محلولی حاوی ترکیبی از سیترات سدیم با غلظت ۲٪ و نایسین Z به میزان ۱/۵٪ قرار داده شدند (Hurst, 1981; AOAC, 2005) و پس از مدت زمان ۱۵ دقیقه از محلول خارج شدند و همزمان ۱۰ فیله دیگر به مدت ۱ دقیقه در محلولی که فقط حاوی نایسین به میزان ۱/۵٪ بودند، قرار گرفتند و ۱۰ فیله دیگر نیز در محلولی که فقط حاوی سیترات سدیم با غلظت ۲٪ بودند، قرار داده شدند. در نهایت، ۱۰ فیله باقیمانده به عنوان نمونه‌های شاهد و فاقد هر گونه نگهدارنده انتخاب شدند. نمونه‌های حاوی نایسین Z و ترکیب توأم با نمونه‌های حاوی تیمار سیترات سدیم به صورت جداگانه به وسیله

---

[۱] Frankfurters
[۲] Modified Atmosphere Packaging
[۳] Vacuum Packed

پوشش سلفون بسته‌بندی معمولی[۱] شده و در دمـای ۴°C نگهداری شدند و در ۶ زمان شامل روزهای صـفر، ۳، ۶، ۹ و۱۲ دوره نگهداری به منظور تعیین پارامترهای کیفی اعم از شیمیایی و میکروبی مورد آزمایش قرار گرفتند. در عمل برای هر زمان ۳ تکرار در نظر گرفته شد.

آماده‌سازی نایسین

در پـژوهش کنـونی نایسـین (Serva, USA) در اسـید کلریدریک ۰/۰۲ نرمال (Merk, Germany) حل شد و در ظرف استریل توسط صافی ۰/۴۵ میکرون استریل شده و مقدار لازم برای تهیه تیمارها از آن برداشته، بـه ظـروف شامل آب مقطر استریل افزوده و پس از مخلوط شـدن بـا غلظت مورد نیاز، بر روی فیله ماهیان سفید افشانه شد.

آزمون‌های شیمیایی

آزمایش‌های مربوط به پارامترهای شیمیایی شامل بازهای نیتروژنی فرار (TVB-N)، شاخص پراکساید (PV) و تیوباربیتوریک اسید (TBA) در آزمایشگاه تشخیص دامپزشکی مرکزی طبری و آنالیزهای میکروبی در آزمایشگاه گروه پژوهشی شیلات و آلاینده‌های آبی خزر (ساری، ایران) انجام شد.

با استفاده از تقطیر کلدال مقدار مواد ازته فرار بر حسب میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم گوشت ماهی (mg/100g) اندازه‌گیری شد (AOAC, 2005). مقدار ۱۰ گرم از نمونه چرخ شده ماهی به یک بالن ۵۰۰ میلی‌لیتری انتقال یافت. سپس ۲ گرم اکسید منیزیم به عنوان کاتالیزور به آن اضافه شد و در نهایت، ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر برای تقطیر به آن اضافه شد. در مرحله بعد ۲۵ میلی‌لیتر اسید بوریک ۲٪ در داخل ارلن مایر تمیز ریخته شد و یک تا ۲ قطره معرف متیل قرمز به آن اضافه کرده تا به رنگ ارغوانی درآید.

برای اندازه‌گیری PV بر حسب میلی اکی والان بر کیلوگرم چربی (meq/Kg)، ابتدا اقدام به استخراج روغن شد، به طوری که ۱۰ گرم از نمونه همگن فیله ماهی سفید درون یک ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته و به آن ۲ گرم شن و ۲۰ گرم سولفات سدیم اضافه و کاملاً مخلوط شد. بعد از تبخیر رطوبت، به همراه ۲۰ سانتیمتر مکعب از حلال اتردوپرول مخلوط شده و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت محلول را صاف کرده و آن را داخل بالن سوکسله که قبلاً توزین شده بود، ریخته و در دستگاه روتری (Buchi EL, 141) قرار داده شد. در نتیجه این فرآیند، حلال‌ها جداشده و چربی باقیمانده به همراه بالن مجدداً توزین شد و از تفاوت وزن بالن خالی و بالن حاوی نمونه چربی، مقدار چربی به دست آمد. بعد از آن، برای تعیین PV، ۵ گرم از نمونه روغن استخراج شده از فیله ماهیان سفید را به دقت در ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری سر سمباده‌ای وزن کرده و حدود ۲۵ میلی‌لیتر از محلول اسید استیک کلروفرمی (نسبت کلروفرم به اسید استیک ۳:۲) به محتویات ارلن اضافه شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول یدید پتاسیم اشباع، ۳۰ میلی‌لیتر از آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر محلول نشاسته ۱٪ به مجموعه اضافه و مقدار ید آزاد شده با محلول تیوسولفات سدیم ۰/۰۱ نرمال تیتر شد و بر حسب (meq/Kg) محاسبه شد (Kirk and Sawyer, 1991).

اندازه‌گیری TBA بر حسب میلی‌گرم مالون دی‌آلدئید بر کیلوگرم (mgMDA/Kg) به روش رنگ سنجی صورت گرفت. مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم از نمونه چرخ شده ماهی به یک بالن ۲۵ میلی‌لیتری انتقال یافته و سپس با ۱-بوتانل به حجم رسانده شد. ۵ میلی‌لیتر از مخلوط بالا به لوله‌های خشک درب‌دار وارد شده و به آن ۵ میلی‌لیتر از معرف TBA افزوده شد. لوله‌های درب‌دار در حمام آب با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قرار گرفته و پس از آن، در دمای محیط سرد شدند. سپس توسط دستگاه اسپکتروفتومتری مقدار جذب (As) در ۵۳۰ نانومتر در مقابل شاهد آب مقطر (Ab) خوانده شد (Kirk and Sawyer, 1991).

شمارش جمعیت انواع باکتری‌ها

برای شمارش باکتری‌های مزوفیل و باکتری‌های سرمادوست در نمونه‌های تهیه شده، از روش پیشنهادی Jay (۲۰۰۰) و محیط تریپتیکاز سویا آگار (Trypticase soy agar) و برای شمارش باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک از محیط کشت MRS (Merck آلمان) استفاده شد. بعد از تهیه محیط کشت، با میکروسمپلر، ۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های تهیه شده طبق

---

[۱] Air pack

دستورالعمل بالا، بر روی محیط کشت به صورت کشت سطحی پخش شد. پلیت‌های کشت داده شده مربوط به باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک و مزوفیل به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد (AOAC, 2005) و پلیت‌های مربوط به باکتری‌های سرماگرا ۱۰ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و شمارش شدند (Jay, 2000).

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها با ۳ تکرار به دست آمدند و برای بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف – اسمیرنف استفاده شد. برای انجام تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۱ و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel^{MST} 2003 استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصل از تیمارهای مختلف از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) و برای تعیین تفاوت‌های بین تیمارها در زمان‌های مختلف و بین تیمارهای مختلف در یک زمان، از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan) در سطح اطمینان ۹۹٪ (P<۰/۰۱) استفاده شد.

نتایج

تغییرات مجموع بازهای نیتروژنی فرار (TVB-N)

در جدول ۱ تغییرات بازهای نیتروژنی فرار ماهی سفید در تیمارهای مختلف، طی زمان نگهداری نشان داده شده است. طبق نتایج، مقدار TVB-N طی ۱۲ روز نگهداری در هر ۶ تیمار افزایش معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۱)، به طوری که دامنه تغییرات این شاخص در نمونه‌های شاهد بیش از نمونه‌های تیمار واجد نگهدارنده‌های مورد نظر بود. آنالیز آماری نشان می‌دهد که میزان بازهای نیتروژنی فرار در تمام روزهای نگهداری (بجز روز صفر) در ماهیان شاهد به صورت قابل توجهی بیش از نمونه‌های دیگر بوده است (P<۰/۰۱). همان طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، کمترین مقدار باکتری در تیمار حاوی ترکیب نایسین z و سیترات سدیم دیده شد.

جدول ۱- مقادیر بازهای نیتروژنی فرار (mg/100g) فیله ماهی سفید نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و نگهدارنده‌های مختلف.

تیمار	روز صفر	روز سوم	روز ششم	روز نهم	روز دوازدهم
C	۱۲/۸۶ ± ۰/۷۷^{aA}	۲۴/۹۷ ± ۰/۵۵^{bA}	۳۶/۳۹ ± ۱/۶۱^{cA}	۴۹/۵ ± ۱/۶۱^{dA}	۵۵/۲۸ ± ۱/۶۴^{eA}
Z	۱۳/۱۱ ± ۱۰^{aB}	۱۸/۶۶ ± ۰/۰۲^{bB}	۲۵/۳۸ ± ۰/۰۴^{cB}	۲۸/۹۵ ± ۰/۲۲^{dB}	۳۵/۲۱ ± ۰/۰۴^{eB}
SN	۱۲/۲۴ ± ۰/۵۶^{aB}	۱۶/۹۷ ± ۰/۱۲^{bC}	۲۴/۸۴ ± ۰/۲۳^{cB}	۲۷/۵۷ ± ۰/۵۵^{dB}	۳۱/۸۱ ± ۰/۴۷^{eC}
S	۱۲/۷۷ ± ۰/۳۳^{aB}	۱۷/۹۶ ± ۰/۱۳^{bB}	۲۵/۷۷ ± ۰/۱۳^{cB}	۲۸/۹۲ ± ۰/۳۳^{dB}	۳۵/۰۷ ± ۰/۸۶^{eB}

(C: گروه شاهد؛ Z: نایسین z؛ SN: ترکیب سیترات سدیم و نایسین؛ S: سیترات سدیم)

میانگین ± انحراف معیار؛ حروف کوچک مختلف در هر ردیف و حروف بزرگ مختلف در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار است (P<۰/۰۱).

تغییرات شاخص پراکساید (PV)

در جدول ۲ تغییرات شاخص پراکساید ماهی سفید در تیمارهای مختلف طی زمان نگهداری نشان داده شده است. میزان PV در تمامی تیمارها با افزایش زمان نگهداری افزایش یافته است (P<۰/۰۱). میزان این افزایش در تیمارهای حاوی نگهدارنده نسبت به نمونه‌های شاهد از شدت کمتری برخوردار بود. نتایج نشان داد اختلاف میزان PV بین نمونه‌های دارای باکتریوسین و اسید آلی (SN) معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۱). سرعت افزایش PV در روزهای آخر کند و در برخی تیمارها متوقف شده است.

جدول ۲- مقادیر شاخص پراکساید (meq/Kg) فیله ماهی سفید نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و نگهدارنده-های مختلف.

تیمار	روز صفر	روز سوم	روز ششم	روز نهم	روز دوازدهم
C	۱/۶۸ ± ۰/۰۲^{aA}	۳/۲۲ ± ۰/۰۲^{bA}	۴/۶۹ ± ۰/۰۴^{cA}	۷/۴۵ ± ۰/۰۳^{dA}	۸/۰۵ ± ۰/۰۵^{dA}
Z	۱/۴۶ ± ۰/۰۱^{aA}	۲/۰۶ ± ۰/۰۲^{aB}	۳/۵۸ ± ۰/۰۸^{bA}	۵/۳۶ ± ۰/۱۲^{bB}	۶/۲۷ ± ۰/۱۰^{dB}
SN	۱/۳۸ ± ۰/۰۲^{aA}	۲/۲۱ ± ۰/۰۲^{bB}	۳/۲۶ ± ۰/۰۲^{cB}	۵/۰۵ ± ۰/۰۸^{dBC}	۶ /۵۰ ± ۰/۰۶^{eB}
S	۱/۴۷ ± ۰/۰۳^{aA}	۲/۵۵ ± ۰/۰۶^{aAB}	۳/۶۷ ± ۰/۱۲^{bA}	۴/۷۶ ± ۰/۰۷^{cC}	۷/۰۵ ± ۰/۱۱^{dA}

(C: گروه شاهد؛ Z: نایسین z؛ SN: ترکیب سدیم سیترات و نایسین؛ S: سدیم سیترات)

میانگین ± انحراف معیار؛ حروف کوچک مختلف در هر ردیف و حروف بزرگ مختلف در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار است (P<۰/۰۱).

تغییرات اسید تیو باربیتوریک (TBA)

جدول ۳ نشان می‌دهد میزان TBA در تمامی تیمارها با افزایش زمان نگهداری افزایش یافته است (P<۰/۰۱). میزان افزایش TBA در تیمارهایی که دارای نگهدارنده بودند، نسبت به نمونه‌های شاهد از آهنگ ملایم‌تری برخوردار بود. مقایسه میان تیمارهایی که دارای نگهدارنده بودند نشان داد اختلاف میزان TBA بین نمونه‌های دارای باکتریوسین نایسین و ترکیب سیترات سدیم و نایسین (SN) همواره کمتر از دیگر نمونه‌ها بوده است (P<۰/۰۱).

جدول ۳- مقادیر اسید تیوباربیتوریک (mgMDA/Kg) فیله ماهی سفید نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و نگهدارنده‌های مختلف.

تیمار	روز صفر	روز سوم	روز ششم	روز نهم	روز دوازدهم
C	۰/۱۳ ± ۰/۰۱^{eA}	۰/۸ ± ۰/۰۲^{dA}	۱/۴۰± ۰/۰۷^{cA}	۲/۶۱ ± ۰/۲۳^{bA}	۴/۲۵ ± ۰/۱۴^{aA}
Z	۰/۱۴ ± ۰/۰۱^{eA}	۰/۵۳ ± ۰/۰۲^{dB}	۱/۲۸ ± ۰/۰۴^{cA}	۱/۹۳ ± ۰/۰۲^{bB}	۲/۳۰ ± ۰/۰۵^{aB}
SN	۰/۱۳ ± ۰/۰۲^{eA}	۰/۳۴ ± ۰/۰۲^{dC}	۰/۸۳ ± ۰/۰۲^{cB}	۱/۲۲ ± ۰/۰۳^{bC}	۱/۸۴ ± ۰/۰۲^{aC}
S	۰/۱۳ ± ۰/۰۱^{eA}	۰/۵۳ ± ۰/۰۳^{dB}	۱/۱۸ ± ۰/۰۲^{cA}	۱/۸۹ ± ۰/۰۲^{bB}	۲/۲۱ ± ۰/۰۵^{aB}

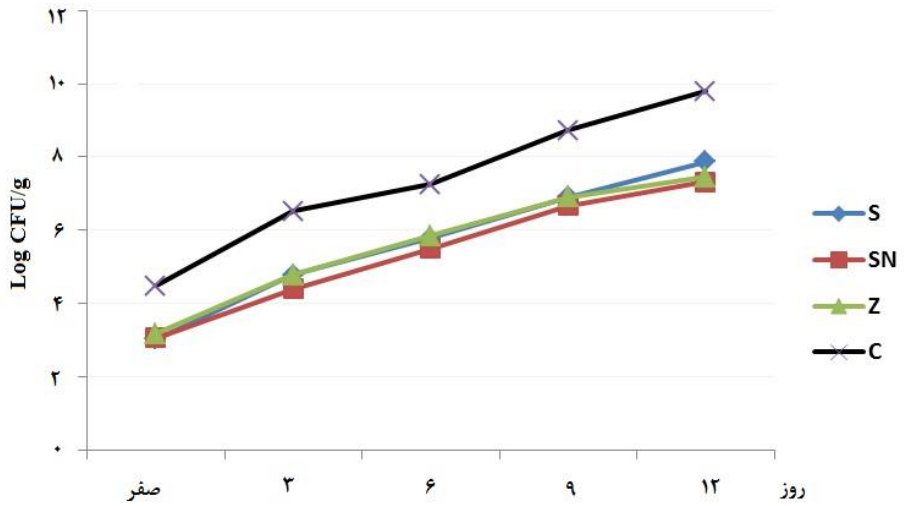
(C: گروه شاهد؛ Z: نایسین z؛ SN: ترکیب سیترات سدیم و نایسین؛ S: سیترات سدیم)

میانگین ± انحراف معیار؛ حروف کوچک مختلف در هر ردیف و حروف بزرگ مختلف در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار است (P<۰/۰۱).

شمارش جمعیت‌های باکتریایی

باکتری‌های مزوفیل

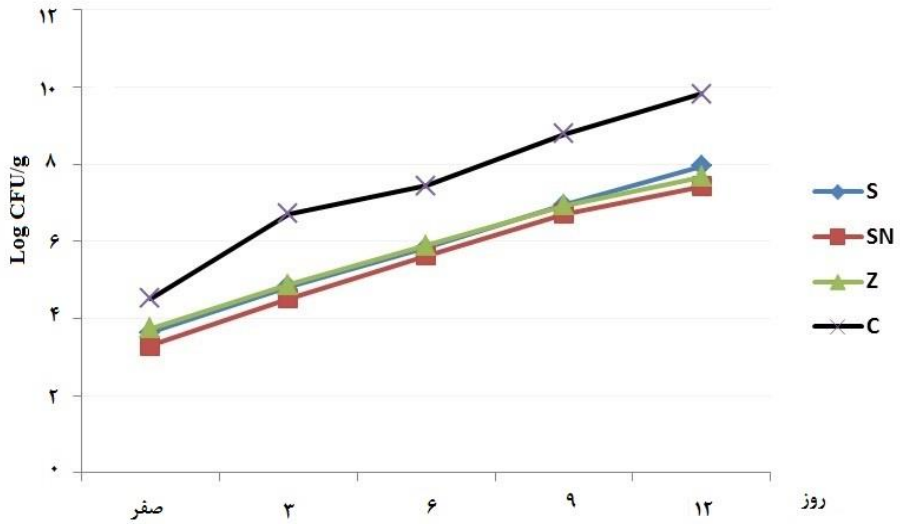
شکل ۱ جمعیت باکتری‌های مزوفیل را در گوشت ماهی سفید هنگام نگهداری در ۴ درجه سانتی‌گراد و همراه با انواع نگهدارنده‌ها نشان می‌دهد. تعداد باکتری‌های مزوفیل در تیمارهای شاهد و آزمایش روند افزایشی داشته و بین گروه شاهد با دیگر گروه‌ها تفاوت وجود داشت (P<۰/۰۱). جمعیت باکتری‌های مزوفیل در تیمار شاهد در روز ششم و در تیمارهای حاوی نگهدارنده در روز دوازدهم به مرز $۱۰^{۷}$ باکتری در گرم و یا Log 7 CFU/g رسیدند. تغییرات این باکتری‌ها در هر یک از تیمارها در زمان‌های مختلف معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۱). کمترین رشد باکتریایی در نمونه SN حاوی هر دو نگهدارنده نایسین Z و سدیم سیترات دیده شد. نتایج همچنین نشان داد به‌رغم روند افزایشی در تیمارهای حاوی انواع نگهدارنده، اختلاف آماری در هر زمان بین آنها دیده نشد (P>۰/۰۱)، ولی بین شاهد با دیگر تیمارها در هر زمانی از دوره نگهداری اختلاف معنی‌دار وجود داشت (P<۰/۰۱).



شکل ۱- مقادیر باکتری‌های مزوفیل فیله ماهی سفید نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و نگهدارنده‌های مختلف (C: گروه شاهد؛ Z: نایسین z؛ SN: ترکیب سیترات سدیم و نایسین؛ S: سیترات سدیم).

باکتری‌های سرمادوست

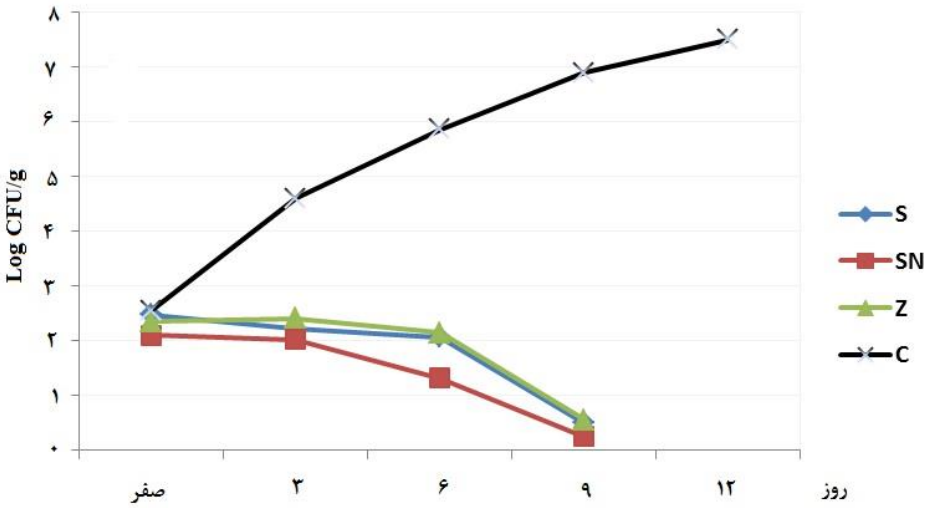
تغییرات جمعیت باکتری‌های سرمادوست در فیله ماهی سفید در شکل ۲ آورده شده است. میزان باکتری‌ها در تیمارها روندی افزایشی داشته است (P<۰/۰۱). نتایج همچنین نشان داد بین تیمار شاهد و دیگر تیمارهایی که حاوی انواع نگهدارنده بودند، از روز سوم تفاوت معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۱). جمعیت باکتری‌های سرمادوست در تیمار شاهد در روز ششم و دیگر تیمارها در روز دوازدهم به محدوده Log7 CFU/g رسیدند. مطابق نتایج، کمترین مقدار باکتری‌های سرمادوست در تیمار SN یعنی تیمار حاوی نایسین z و سیترات سدیم دیده شد. از طرفی بین تیمارهای دارای نگهدارنده اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P<۰/۰۱)، ولی بین شاهد با دیگر تیمارها اختلاف معنی‌دار دیده شد (P<۰/۰۱). روند تمام تیمارها و گروه شاهد افزایشی بوده است.



شکل ۲- مقادیر باکتری‌های سرمادوست فیله ماهی سفید نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و نگهدارنده‌های مختلف (C: گروه شاهد؛ Z: نایسین z؛ SN: ترکیب سیترات سدیم و نایسین؛ S: سیترات سدیم).

باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک

شمارش باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک در گوشت ماهی سفید در تیمارهای مختلف حاوی نگهدارنده در شکل ۳ آورده شده است. تعداد باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک در گروه شاهد روند افزایشی داشته و با تیمارهای دیگر اختلاف نشان داد (P<۰/۰۱)، در حالی که در بقیه تیمارها که حاوی انواع نگهدارنده های مستقل و ترکیبی بودند، روندی کاهشی داشته است، به طوری که از روز ششم نگهداری در ۴ درجه سانتی‌گراد، فرآیند کاهش تسریع، و در روز نهم به حداقل رسید. کمترین مقدار باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک در تیمار SN حاوی ترکیب نایسین و سیترات سدیم مشاهده شد. مطابق نتایج در تیمار شاهد روند افزایشی وجود داشته (P<۰/۰۱)، ولی تیمارهای حاوی انواع نگهدارنده با یکدیگر اختلافی نداشته‌اند (P<۰/۰۱).



شکل ۳- مقادیر باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک فیله ماهی سفید نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و نگهدارنده‌های مختلف (C: گروه شاهد؛ Z: نایسین z؛ SN: ترکیب سیترات سدیم و نایسین؛ S: سیترات سدیم).

بحث

در مطالعه حاضر میزان TVB-N طی ۱۲ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در تمام تیمارها افزایش یافت. تولید این ترکیبات می‌تواند ناشی از تخریب اسیدهای آمینه بافت ماهی طی فعالیت‌های باکتریایی در طول دوره نگهداری باشد (Raharjo and Sofos, 1993). علاوه بر این، افزایش این شاخص حین نگهداری در دمای یخچال می‌تواند در نتیجه دی‌آمیناسیون و تخریب اسیدهای آمینه باشد (Castro et al. 2006). مقدار طبیعی TVB-N در عضلات ماهیان از گونه‌ای به گونه دیگر متفاوت است و در یک گونه نیز بر حسب سن، جنس، محیط و فصل تغییر می‌کند، اما معمولاً کمتر از ۱۲ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم است (Chaijan et al. 2006). حد مجاز TVB-N در ماهی خام تا ۲۰ (Connell, 1990) و در محصولات عمل‌آوری شده ۳۰ تا ۳۵ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم است (هدایتی‌فرد، ۱۳۸۲؛ Erkan et al. 2006) که با نتایج به دست آمده در تیمارهای تازه C، Z، SN و S به ترتیب با ۱۲/۸۶، ۱۳/۱۱، ۱۲/۲۴ و ۱۲/۷۷ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم مطابقت دارد.

Sallam (۲۰۰۷) با استفاده از محلول‌های ۲/۵٪ استات سدیم، لاکتات سدیم و سیترات سدیم در نگهداری ماهی آزاد در ۱ درجه سانتی‌گراد، کاهش معنی‌داری را در مقادیر TVB-N، تری متیل آمین (TMA)، PV و TBA نمونه‌های تیمار شده در مقایسه با نمونه شاهد گزارش کرد. همچنین Pastoriza و همکاران (۱۹۹۸) اعلام کردند که با کاربرد ترکیبی از نمک کلرید سدیم - استات همراه با یخ و بسته‌بندی MAP می‌توان عمر ماندگاری ماهی هیک را ۸ روز افزایش داد.

در مطالعه کنونی، پایین‌تر بودن میزان TVB-N در تیمارهای آغشته به باکتریوسین نسبت به تیمار شاهد،

همین مطلب را تائید می‌کند. در بین تیمارهای روز آخر نگهداری (دوازدهم)، تیمارهایی که دارای ترکیبی از اسیدهای آلی و نایسین بوده‌اند، مقادیر کمتری از TVB-N را نشان دادند، در حالی که نمونه‌هایی که به تنهایی فقط دارای اسید آلی و یا نایسین بودند، مقادیر بالاتری از TVB-N را نشان دادند. تحقیقات زیادی برای پاسخ به این سؤال که چرا اسیدهای آلی و نمک آنها از رشد عوامل بیماری‌زا و ریزموجودات مسئول فساد مواد غذایی جلوگیری می‌کنند، انجام شده است و بسیاری از آنها کاهش pH در مواد غذایی را عامل اصلی این ویژگی می‌دانند (Zhou et al. 2010; Kashiri et al. 2011). باکتریوسین‌ها اغلب به عنوان ابزارهای بیولوژیک با ارزش برای ارتقای ایمنی غذا و کاهش شیوع بیماری‌های ناشی از غذاهای فاسد مطرح هستند و باکتریوسین نایسین ترکیب زیست‌فعال و پپتیدی است که توسط برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک تولید می‌شود (Juncioni de Arauz et al. 2009; Zhou et al. 2010).

مطابق جدول‌های ۲ و ۳ افزایش PV و TBA در طی دوره نگهداری در کل تیمارها معنی‌دار بود که با نتایج گزارش شده توسط Chaijan و همکاران (۲۰۰۶) و Manju و همکاران (۲۰۰۷) مطابقت دارد. افزایش PV در روزهای پایانی نگهداری محصول در یخچال کاهش پیدا کرد، به طوری که در روز آخر نگهداری تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای حاوی نایسین (SN و Z) و نیز بین تیمارهای شاهد و حاوی سیترات سدیم (S و C) دیده نشد. حداکثر میزان شاخص PV برای مصرف روغن‌ها و محصولات چرب ۱۰ میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم چربی است (Kirk and Sawyer, 1991)، در حالی که مقادیر ۱ تا ۲ واحد آن برای روغن‌های تازه شناسایی شده است (هدایتی‌فرد، ۱۳۸۲). عنوان شده است که شاخص پراکساید در طول دوره سردخانه‌داری می‌تواند به آلدئیدها و کتون‌ها شکسته و تبدیل به موادی شود که نهایتاً مقادیر TBA را افزایش می‌دهند (هدایتی‌فرد، ۱۳۸۲؛ Yin et al. 2003). این موضوع در پژوهش کنونی و از روز نهم نگهداری به بعد مشاهده شد.

روند افزایش TBA در طول مدت نگهداری در تمامی تیمارهای مورد مطالعه می‌تواند به دلیل افزایش آهن آزاد و دیگر عوامل پراکسیدان در ماهیچه ماهی باشد؛ همچنین آلدئیدها به عنوان محصول ثانویه اکسیداسیون ناشی از شکست هیدروپراکسیدها ایجاد می‌شوند که روند افزایشی هیدروپراکسیدها می‌تواند دلیلی بر این امر باشد (Gomes et al. 2003). به دلیل واکنش مالون آلدئید با ترکیبات بدن ماهی مثل آمین‌ها، نوکلئوتیدها، اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها، فسفولیپیدها و دیگر آلدئیدهایی که از محصولات نهایی اکسیداسیون هستند، شاخص TBA ممکن است بیان کننده درجه واقعی اکسیداسیون نباشد و با تغییر گونه ماهی این واکنش‌ها تا حد زیادی تغییر می‌کند (Aubourg and Gallardo, 2005). محدوده ۱ تا ۲ میلی‌گرم مالون آلدئید بر کیلوگرم چربی را برای محصولات تازه (Guillen and Ruiz, 2004) معرفی کردند، ولی حد معمول TBA در شرایط کاملاً مناسب برای ماهی نگهداری شده در سردخانه (هدایتی‌فرد، ۱۳۸۲) و ماهی یخ زده (Erkan et al. 2006) ۵ میلی‌گرم مالون دی آلدئید در گوشت ماهی است. مطابق جدول ۳، میزان TBA در تمامی تیمارها با افزایش زمان نگهداری، روندی افزایشی داشته است؛ به طوری که این اختلاف در طول دوره ۱۲ روزه کاملاً معنی‌دار بوده است.

با توجه به این اصل که بار میکروبی اولیه ماهیان آب شیرین وابسته به دما و وضعیت آب تغییر می‌کند، محققان محدوده بین ۲ تا ۶ Log CFU/g را برای شمارش کل باکتری‌های اولیه در گونه‌های مختلف آب شیرین پیشنهاد داده‌اند (صفری و یعقوب‌زاده، ۱۳۹۴؛ هدایتی‌فرد، ۱۳۸۲؛ Sallam, 2007). روند تغییرات باکتری‌های مزوفیل (TVC) در ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان (صفری و یعقوب‌زاده، ۱۳۹۴؛ Ojagh و همکاران، ۲۰۱۰)، دانه مرواریدی (Samelis et al. 2002) و اردک ماهی (*Esox lucius*) (نعمتی و همکاران، ۱۳۹۰) هنگام نگهداری در شرایط سرما و در همین مدت زمان نیز در همین محدوده بوده است. در این پژوهش تمام نمونه‌های دارای نگهدارنده بیش از شش روز به جمعیت باکتری مزوفیل کمتر از ۶ Log CFU/g رسیدند، اما باکتری‌های نمونه شاهد در پایان روز سوم به این محدوده رسیده بودند. همچنین، تیمارهای دارای ترکیب نایسین و سیترات سدیم (SN) همواره دارای کمترین جمعیت باکتری‌های مزوفیل بوده و اثر مهارکنندگی بیشتری روی آنها نشان دادند.

از سویی، گروه اصلی ریزموجودات مسئول فساد ماهی تازه نگهداری شده به صورت سرد، باکتری‌های سرمادوست (PTC) هستند (Gram and Huss, 1996). از سوی دیگر، اثر ممانعت از رشد گروهی از باکتری‌ها توسط محیط‌های کشت باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک و نگهدارنده‌های غذایی بر روی فیله گربه ماهی توسط Kim و همکاران (۱۹۹۵) نشان داد که باکتری‌های سرمادوست گروه اصلی ریزموجودات مسئول فساد غذاهای دریایی‌اند و عوامل ضد میکروبی مثل لاکتات سدیم در جلوگیری از رشد میکروبی و افزایش عمر ماندگاری فیله ماهی هنگام نگهداری در سردخانه مؤثرند. مطابق شکل ۲، افزایش باکتری‌های سرمادوست با زمان نگهداری در تیمارهای مختلف معنی‌دار بوده که با اظهارات Gram and Huss (1996) و نتایج به دست آمده توسط Sallam در سال ۲۰۰۷ و نیز Hozbor و همکاران (۲۰۰۶) در مطالعه بر روی ماهی آزاد دریایی (*Pseudopercis semifasciata*) مطابقت دارد.

در تحقیق Ojagh و همکاران (۲۰۱۰) بر روی فیله ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در دمای یخچال، میزانPTC اولیه برابر با ۳/۸۵ Log CFU/g بود که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. Sallam و همکاران (۲۰۰۴) نیز میزان PTC اولیه فیله ماهی آزاد اقیانوس آرام در دمای یخچال را در تیمار شاهد برابر ۴/۲۴ و در تیمار استات سدیم برابر ۳/۵۹ Log CFU/g گزارش کردند که این نتیجه با نتایج صفری و یعقوب‌زاده (۱۳۹۴) و البته تحقیق حاضر مغایرت دارد زیرا در این تحقیق در روز صفر آزمایشات تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی و تیمار شاهد مشاهده نشد. در پژوهش کنونی الگوی تغییرات افزایشی باکتری‌های سرمادوست به روند باکتـری‌های مزوفیل شباهت داشت اما در مقایسه، سرمادوست‌ها رشد بالاتری در تیمارهای مختلف نسبت به باکتری‌های مزوفیل نشان دادند. الگوی رشد مشابه این دو گروه باکتری توسط صفری و یعقوب‌زاده (۱۳۹۴) نیز تائید شده بود.

همچنین، اختلاف معنی‌دار بین زمان‌های مختلف آزمایش مشاهده شد که با نتایج به دست آمده توسط Hozbor و همکاران (۲۰۰۶) و Sallam و همکاران (۲۰۰۷) مطابقت داشت.

از ابتدای دوره نگهداری به ویژه از روز سوم به بعد، همواره تیمار شاهد به طور معنی‌داری بیشترین میزان PTC را در مقایسه با سایر تیمارها نشان داد. کمترین تغییرات مربوط به تیمارهای ترکیبی بوده و تیمارهای حاوی مواد نگهدارنده به صورت منفرد ما بین آنها قرار داشتند. نتیجه مشابه توسط صفری و یعقوب‌زاده (۱۳۹۴) نیز گزارش شده بود. این در حالی است که Shirazinejad و همکاران (۲۰۱۰) اثر توأم اسید لاکتیک و نایسین را بر روی کاهش فلور میکروبی طبیعی میگو در دمای یخچال بررسی کردند؛ میزان PTC در روز ۱ در تیمار نایسین + اسید لاکتیک ۲٪ صفر بود، در حالی که این میزان در تیمار شاهد ۳/۶۴ Log CFU/g بود که این نتایج با نتایج تحقیق حاضر مغایرت دارد زیرا در این تحقیق میزان PTC اولیه در کلیه تیمارها تقریباً برابر بود و تیمارها با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند. در روز ۱۴ تیمار نایسین + اسید لاکتیک ۲٪ و تیمار شاهد به ترتیب PTC برابر با ۶/۵۹ و ۸/۹۸ Log CFU/g داشتند.

بنابر نتایج Shirazinejad و همکاران (۲۰۱۰) نایسین به تنهایی کمترین اثر را بر روی باکتری‌های سرمادوست گرم منفی داشت؛ همچنین تأثیر بهتر استفاده همزمان از نایسین و اسید لاکتیک نسبت به نایسین به تنهایی را به دلیل کمک اسید لاکتیک به تجزیه دیـواره سلولی باکتری‌های گرم منفی و در نتیجه افزایش نفوذ نایسین به داخل باکتری‌های گرم منفی دانستند. در پژوهش Shirazinejad و همکاران (۲۰۱۰) جمعیت باکتری‌های سرمادوست به نسبت باکتری‌های کل در برخی تیمارها تا حدودی بیشتر بود که علت آن را نگهداری در دمای یخچال دانستند چرا که نگهداری ماهی در دمای یخچال رشد باکتری‌های مزوفیل که جمعیت زیادی از میکروفلور داخلی بدن ماهی را تشکیل می‌دهند را کاهش می‌دهد و به باکتری‌های سرمادوست این اجازه را می‌دهد که در طول دوره نگهداری در یخچال رشد کرده و میکروارگانیسسم غالب باشند.

میزان تأثیر نایسین بر رشد میکروبی در محصولات فرآوری شده ماهی احتمالاً به فاکتورهای متعددی مثل غلظت نایسین مورد استفاده، روش استفاده از نایسین، گونه ماهی، نوع محصول، درجه آلودگی میکروبی و وضعیت نگهداری بستگی دارد (Shirazinejad et al. 2010).

مطابق شکل ۳ جمعیت اولیه باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) بافت ماهی سفید دریای خزر کمتر از باکتری‌های سرمادوست و نیز مزوفیل بوده است. مطابق نتایج رشد باکتری‌های LAB در آغاز روند ثابت به خود گرفته، اما کاهش تدریجی آنها در نمونه‌های حاوی باکتریوسین نشان دهنده اثرات بازدارندگی آن بر باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد. نتایج کنونی با گزارش Atrea و همکارانش (۲۰۰۹) مطابقت دارد. در گزارش Sallam در سال ۲۰۰۷ نیز که پیرامون کیفیت ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی استات، لاکتات و سیترات سدیم بر روی فیله ماهی آزاد صورت گرفت، تعداد باکتری‌های LAB شمارش شده از سایر انواع باکتری‌ها کمتر بود. صفری و یعقوب‌زاد (۱۳۹۴) و شاملوفر و همکاران (۱۳۹۳) نیز به همین موضوع اشاره کردند.

میزان LAB اولیه فیله ماهی سفید دریای مازندران در این تحقیق در تیمارهای شکم خالی ۰/۳۰ ± ۲/۵۵ Log CFU/g بوده و تیمارها با هم از نظر میزان LAB اولیه اختلاف معنی‌داری نداشتند که دلالت بر تازگی نمونه ماهیان دارد.

مقدار LAB در تمامی تیمارهای این آزمایش در روز آخر نگهداری (روز دوازدهم) بیشترین میزان و در روز صفر کمترین میزان بود و بین زمان‌های مختلف آزمایش در همه تیمارها از نظر آماری اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. مقایسه بین تیمارهای دارای مواد نگهدارنده با یکدیگر نشان دهنده آن است که با طولانی‌تر شدن زمان نگهداری فیله ماهی در سردخانه، تغییرات مشاهده شده معنی‌دار نمی‌باشد و حاکی از این است که جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک در زمان‌های اولیه تحت تأثیر مواد نگهدارنده مورد استفاده قرار گرفته و کاهش می‌یابد.

مشابه مقاومت دارویی، باکتری‌ها می‌توانند نسبت به باکتریوسین نیز مقاومت نشان دهند. نخستین مقاومت به نایسین توسط *Bacillus cereus* گزارش شد (Jarvis and Farr, 1971). باکتری‌های تولید کننده نایسین نیز از خودشان در مقابل نایسین محافظت می‌کنند به طوری که نایسین توسط پروتئین انتقال دهنده که توسط ژن اختصاصی کد می‌شود، به بیرون سلول ترشح می‌شود و از تجمع آن درون سلول جلوگیری می‌گردد (Dodd et al. 1996).

همان گونه که پیشتر اشاره شد نایسین به تنهایی کمترین اثر را بر روی باکتری‌های سرمادوست گرم منفی دارد؛ اما استفاده همزمان از نایسین و اسید لاکتیک به دلیل کمک عامل اسیدی در تجزیه دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی و سپس افزایش نفوذ نایسین به داخل باکتری‌های گرم منفی، تأثیر بیشتری دارد (Shirazinejad et al. 2010). از طرفی شاملوفر و همکاران (۱۳۹۳) طی نگهداری قزل‌آلا توسط نایسین و بسته‌بندی‌های مختلف به این نتیجه رسیدند که تیمارهای حاوی نایسین به طور معنی‌داری میزان LAB کمتری نسبت به تیمار شاهد داشتند. همچنین Castellano و همکاران (۲۰۰۸) علت این امر را تأثیر باکتریوسیدی و کشندگی نایسین بر روی بیشتر باکتری‌های گروه لاکتیک دانستند. در گزارش شاملوفر و همکاران (۱۳۹۳) گرچه نایسین توانست LAB را کنترل کند اما در طول دوره نگهداری مقادیر آنها افزایش یافت، در حالی که در پژوهش کنونی رشد باکتری‌های گروه اسید لاکتیک در روز ۹ نگهداری متوقف شد که علاوه بر تأثیر باکتریوسین، همراهی نگهدارنده‌ای مانند سیترات سدیم و البته حضور در محیط سرما نیز از دیگر عوامل بازدارنده بودند. نتایج کنونی می‌تواند مؤید نظر Lee و همکارانش (۲۰۰۲) باشد که سیترات سدیم را ماده نگهدارنده مؤثری در مقابل باکتری‌های گرم مثبت معرفی کرده‌اند. همچنین ادعا شده است که گرچه نایسین نمی‌تواند باکتری‌های گرم منفی (همانند *E. coli* O157:H7) را مهار کند، لیکن ترکیبات لیپوپلی‌ساکارید آب‌گریز حاضر در لایه بیرونی باکتری‌های گرم منفی می‌توانند مسئول افزایش مقاومت در برابر چنین موادی باشند (Lee et al. 2002). از طرفی کم بودن باکتری‌های LAB در نمونه ماهی خود دلیل بر این است که این نوع باکتری‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد یخچال به کندی رشد می‌کنند و در شرایط هوازی معمول نیز در رقابت با گونه‌های گرم منفی همچون سودوموناس‌ها می‌باشند (Sallam, 2007).

طبق گزارش منتشرشده توسط Behnam و همکاران (۲۰۱۵) تنها فیله ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تیمار شده با باکتریوسین تا انتهای دوره نگهداری ۱۶ روزه قابل مصرف بودند؛ به طوری که باکتریوسین Z توانست عمر ماندگاری ماهی را به میزان ۸ روز افزایش دهد. این حفظ تازگی و عمر ماندگاری برای ماهی کپور نقره‌ای با استفاده

از نایسین Z و استات سدیم به مدت ۹ روز گزارش شد (اصغری و همکاران، ۱۳۸۸) و مشخص شد که استفاده همزمان از نایسین Z و استات سدیم می‌تواند زمان ماندگاری فیله ماهی کپور نقره‌ای را ۵ روز بیشتر افزایش دهد. نتیجه مشابهی نیز توسط دهبندی و همکاران (۱۳۹۳) در خصوص افزایش عمر ماندگاری سوریمی کیلکا از ۹ روز به ۱۲ تا ۱۵ روز گزارش شد. نتایج تحقیقات با نتایج تحقیق کنونی مبنی بر تأثیر ضد باکتریایی نمک اسیدهای آلی و نایسین و همچنین تأثیر این نگهدارنده‌ها بر افزایش زمان ماندگاری مطابقت دارد. همان طور که در نتایج آزمایشات میکروبی، شیمیایی مشاهده شد با به کارگیری نگهدارنده‌ها (نایسن، سدیم سیترات) زمان ماندگاری ۶ روز افزایش یافت و به ۱۲ روز رسید و بهترین تیمار، نمونه‌های حاوی ترکیبی از نایسین Z (۰/۱۵گرم در کیلوگرم) و سدیم سیترات (۲٪) بود.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصله از پژوهش کنونی، استفاده از متابولیت‌ها به‌عنوان نگهدارنده‌های طبیعی در طول دوره‌های نگهداری فیله ماهیان در یخچال، خصوصاً جهت بهبود کیفیت فیله‌ها می‌تواند مؤثر باشد. بنابراین نایسین برای کنترل بعضی از باکتری‌ها کارآیی دارد، اما بهتر است از غلظت‌های مناسب آن استفاده گردد تا از ایجاد مقاومت در باکتری‌ها جلوگیری شود و یا همراه سایر مواد نگهدارنده مورد استفاده قرار گیرد تا ضمن به حداقل رسانیدن مقاومت باکتری، بتوان غلظت‌های کمتری از آن را بکار برد. همین‌طور استفاده ترکیبی و توأم از نایسین و نمک اسیدهای آلی در زمان ماندگاری فیله ماهیان مؤثرتر از استفاده به تنهایی از هریک از این نگهدارنده ها می‌باشد.

تقدیر و تشکر

از همکاران گرامی آقایان دکتر رضا صفری و مهندس محمود حیدری (آزمایشگاه آنالیز خوراک مازندران) به جهت کمک‌های کاربردی در اجرای پژوهش کنونی در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد تقدیر می‌گردد.

منابع

اصغری، م.، علیزاده دوغیکلایی، ا.، صفری، ر.، ارشدی، ع.، سعیدی اصل، م.ر. ۱۳۸۸. بررسی تأثیر نایسین Z و استات سدیم بر زمان ماندگاری فیله کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) در طی نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد. فصلنامه علوم و فناوری غذایی ۱: ۶۴-۵۵.

دهبندی، ع، مطلبی، ع.، رضویلر، و.، پورغلام، ر. ۱۳۹۳. تأثیر نایسین Z بر برخی پارامترهای شیمیایی و باکتریایی مولد فساد در سوریمی ماهی کیلکا معمولی (*Clupeonella cultriventris caspia*) نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتیگراد. مجله علمی شیلات ایران ۲۳: ۵۶-۴۱.

شاملوفر، م.، حسینی، س.ا.، کمالی، ا.، مطلبی، ع.، پورغلام، ر.، صفری، ر. ۱۳۹۳. اثر آنتی باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی نایسین بر فیله ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بسته‌بندی شده با روش اتمسفر اصلاح شده (MAP). مجله شیلات ۸: ۶۸-۵۵.

صفری، ر.، یعقوب‌زاده، ز. ۱۳۹۴. اثر ترکیبی نایسین و استات سدیم بر افزایش زمان ماندگاری قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) شکم خالی. مجله علمی شیلات ایران ۲۴: ۱۶۹-۱۵۵.

نعمتی، س.، هدایتی‌فرد، م.، چاشنی‌دل، ی. ۱۳۹۰. بررسی اثرت فرآیند شور کردن بر روی شاخص‌های کیفی و پروفایل اسیدهای چرب بافت اردک ماهی *Esox lucius* در زمان نگهداری در سردخانه. مجله شیلات ۵: ۱۶-۱.

وزارت جهاد کشاورزی. ۱۳۹۲. آمارنامه کشاورزی سال ۱۳۹۲ (جلد دوم)، مرکز فناوری اطلاعات و ارتباطات، معاونت برنامه‌ریزی و اقتصادی، وزارت جهاد کشاورزی، تهران، ۳۸۷ ص.

هدایتی‌فرد، م. ۱۳۸۲. صنایع فرآورده‌های ماهی و میگو، صنایع شیلاتی پارس، تهران، ۱۲۰ ص.

AOAC. 2005. Official Method of Analysis (17th ed). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.

Atrea, I., Papavergou, A., Amvrosiadis, I., Savvaidis, I.N. 2009. Combined effect of vacuum-packaging and oregano essential oil on the shelf-life of Mediterranean octopus (*Octopus vulgaris*) from the Aegean Sea stored at 4 °C. Food Microbiology 26: 166-172.

Aubourg, S.P., Gallardo, J.M. 2005. Effect of brine freezing on the rancidity development during the frozen storage of small pelagic fish species. European Food Research and Technology 220: 107-112.

Behnam, S., Anvari, M., Rezaei, M., Soltanian, S., Safari, R. 2015. Effect of nisin as a biopreservative agent on quality and shelf life of vacuum packaged rainbow trout (*Oncorhynchus* mykiss), stored at 4 °C. Journal of Food Science and Technology 52: 2184-2192.

Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S. 2008. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. Meat Science 79: 483-499.

Castro, P., Carlos Penedo Padron, J., Caballero Cansino, M., Sanjuna Velazques, E., Millan De Larriva, R. 2006. Total volatile base nitrogen and its use to assess freshness in European sea bass stored in ice. Food Control 71: 245-248.

Chaijan, M., Benjakul, S., Visessanguan, W., Faustman, C. 2006. Changes of lipids in sardine (*Sardinella gibbosa*) muscle during iced storage. Food Chemistry 99: 83-91.

Connell, J.J. 1990. Methods of assessing and selecting for quality. In Control of fish quality (3rd ed.), Fishing. News Books, Oxford, 122-150.

De Arauz, J.L., Jozala, A.F., Mazzola, P.G., Vessoni Penna, T.C. 2009. Nisin biotechnological production and application: a review. Trends in Food Science & Technology 20: 146-154.

Dodd, H.M., Horn, N., Chan, W.C., Giffard, C.J., Bycroft, B.W., Roberts, G.C.K., Gasson, M.J. 1996. Molecular analysis of the regulation of nisin immunity. In: Microbiology 142: 2385-2392.

Erkan, N., Ozden, O., Alakavuk, D.U., Yildirim, S.Y., Inugur, M. 2006. Spoilage and shelflife of sardines (*Sardina pilchardus*) packed inmodified atmosphere. European Food Research Technology 222: 667-673.

Gomes, H.A., Silva, E.N., Nascimanto, M.R.L., Fukuma, H.T. 2003. Evaluation of the 2-thiobarbituric acid method for the measurment of lipid oxidation in mechanically deboned gamma irradiated chiken meat. Food Chemistry 80: 433-437.

Gram, L., Dalgaard, P. 2002. Fish spoilage bacteria – problems and solutions. Current Opinion in Biotechnology 13: 262-266.

Gram, L., Huss, H.H. 1996. Microbiologica Is poilage of fish and fish products. International Journal of Food Microbiology 3: 121-137.

Guillen, M.D., Ruiz, A. 2004. Study of the oxidative stability of salted and unsalted salmon fillets by H nuclear magnetic resonance. Food Chemistry 86: 297-304.

Hozbor, M.C., Saiz, A.I., Yeannes, M.I., Fritz, R. 2006. Microbiological changes and its correlation with quality indices during aerobic iced storage of sea salmon (*Pseudopercis semifasciata*). LWT-Food Science and Technology 39: 99-104.

Hurst, A. 1981. Nisin. Advances in Applied Microbiology 27: 85-123.

Jarvis, B., Farr, J. 1971. Partial purification, specificity and mechanism of action of the nisin-inactivating enzyme from *Bacillus cereu*. Biochimica et Biophysica Acta 227: 232-240.

Jay, J.M. 2000, Modern food microbiology (6th Ed.). Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, MD, USA. 810 p.

Kashiri, H., Haghparast, S., Shabanpour, B. 2011. Effects of sodium salt solutions (sodium acetate, lactate and citrate) on physicochemical and sensory characteristics of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) fillets under refrigerated storage. Journal of Agricultural Science and Technology 13: 89-98.

Kim, C.R., Hearnsberger, J.O., Vickery, A.P., White, C.H., Marshal, D.L. 1995. Extending shelf life of refrigerated catfish fillets using sodium acetate and mono potassium phosphate. Journal of Food Protection 58: 644-647.

Kirk, R.S., Sawyer, R. 1991. Pearson's Chemical Analysis of Foods. (9th Ed.) Longman Scientific and Technical. Harlow, Essex, UK.

Lee, Y.L, Cesario, T., Owens, J., Shanbrom, E., Thrupp, L.D. 2002. Antibacterial activity of citrate and acetate. Nutrition 18: 665-666.

Manju, S., Leema, J., Srinivasa Gopal, T.K., Ravishankar, C.N., Jose, L. 2007. Effects of sodium acetate dip treatment and vacuum-packaging on chemical, microbiological, textural and sensory changes of Pearlspot (*Etroplus suratensis*) during chill storage. Food Chemistry 102: 27-32.

Namulema, A., Muyonga, J.H., Kaaya, A.N. 1999. Quality deterioration in frozen Nile perch (*Lates niloticus*) stored at -13 and -27 °C. Food Research International 32: 151-156.

Nishimoto, J., Suwetja, I.K., Miki, H. 1985. Estimation of keeping freshness period and practical storage life of mackerel muscle during storage at low temperatures. Memoirs of the Faculty of Fisheries Kagoshima University 34: 89-96.

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.

Palumbo, S.A., Williams, A.C. 1994. Control of Listeria monocytogenes on the surface of frankfurters by acid treatments. Food Microbiology 11: 293-300.

Pastoriza, L., Sampedro, G., Herrera, J.J., Cabo, M.L. 1998. Infuence of sodium chloride and modified atmosphere packaging on microbiological, chemical and sensorial properties in ice storage of slices of hake (*Merluccius merluccius*). Food Chemistry 61: 23-28.

Raharjo, S., Sofos J.N. 1993. Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid peroxidation in musle tissues. Meat Science 35: 145-169.

Sallam, K.I. 2007. Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. Food Control 18: 566-575.

Samelis, J., Bedie, G.K., Sofos, J.N., Belk, K.E., Scanga, J.A., Smith, G.C. 2002. Control of Listeria monocytogenes with combined antimicrobials after postprocess contamination and extended storage of frankfurters at 4 °C in vacuum packages. Journal of Food Protection 65: 299-307.

Shirazinejad, A.R., Noryati, I., Rosma, A., Darah, I. 2010. Inhbitory effect of lactic acid and nisin on bacterial and spoilage of chilled shrimp. World Academy of Science Engineering and Technology 65: 163-167.

Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A., Klaenhammer, T.R. 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. Appllied and Environmental Microbiology 57: 3613-3615.

USDA. 1987. Composition of Foods, 15. Fish and shellfish. Agricultural Handbook number 8. US Government Printing Office, Washington, DC.

Yin, M.C., Cheng, W.S. 2003. Antioxidant and antimicrobial effects of four garlic-

derived organosulfur compounds in ground beef. Meat Science 63: 23-28.

Zhou, G.H., Xu, X.L., Liu, Y. 2010. Preservation technologies for fresh meat: A review. Meat Science 86: 119-128.

Zhuang, R.Y., Huang, Y.W., Beuchat, L.R. 1996. Quality changes during refrigerated storage of packaged shrimp and catfish fillets treated with sodium acetate, sodium lactate or propyl gallate. Journal of Food Science 61: 241-244.

Individual and combined effects of nisin-Z and sodium citrate on the chemical attributes and lactic acid, mesophyll and psychrophill bacteria communities of Caspian Kutum fillets (*Rutilus frisii* kutum) Stored at 4 ºC

Masoud Hedayatifard*[1], Mojgan Alinezhad[2], Masoud Hashemi Karouei[3]
1- Department of Fisheries, College of Natural Resources, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Mazandaran, Iran
2- Department of Fisheries, Advanced Educational Center, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Mazandaran, Iran
3-Department of Veterinary, College of Veterinary, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Mazandaran, Iran

Received 28 April 2015; accepted 12 September 2015

Abstract
Individual and combined effects of Nisin Z (1.5%) and sodium citrate (2%) in air-packed Caspian Kutum fillets during the refrigerated storage at 4°C was investigated. Changes in some quality indexes of fish including chemical attributes including TVB-N, PV and TBA and microbial communities counts including mesophilic (TMC), psychrophill (TPC) and lactic acid bacteria (LAB) were determined during days of 0, 3, 6, 9 and 12. The results showed that TVB-N, PV and TBA indices in treatments were higher than control. Mesophilic and psychrophill bacteria in control sample (with 6.53 and 6.71 CFU/g, respectively) reached to acceptable amount, while treatments containing preservatives showed a better condition in both TPC (with 6.63 to 6.93 CFU/g) and TMC (with 6.67 to 6.90 CFU/g) ($P<0.01$). Also, growth of LAB has controlled at 9 days (with 6.88 CFU/g) but stopped in treatment samples at the same days ($P<0.01$). The results revealed that Nisin Z in combination with sodium citrate can therefore be used as the effective preservatives to shelf-life of Caspian Kutum fillets during refrigerated storage.

Keywords: Bacteriocin, Nisin Z, *Rutilus frisii*, Sodium citrate

Corresponding author: persiafish@gmail.com