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

الهام شکوه صارمی[1]،محمد باقر حبیبی نجفی[2]*،محمد حسین حداد خداپرست[2]معصومه بحرینی[3]

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

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۶/۰۷

چکیده

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

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

*مسوول مکاتبات: habibi@um.ac.ir

۱-مقدمه

تقاضای مصرف کنندگان برای غذاهای مغذی، آماده به مصرف، دارای عمر ماندگاری طولانی و عاری از افزودنی های سنتزی منجر به تحقیقات گسترده ای در صنعت غذا و در جهت بدست آوردن غذاهای ایمن و سالم شده است. وجود اسیدهای چرب چند غیراشباع[1]در ماهی برای سلامتی سودمند است(۱۲).ماهیان چرب منبع غنی از امگا۳ هستند. ماهی کیلکا معروفترین ماهی کوچک در دریای خزر است. ماهی کیلکای معمولی (C.c. caspia) متداولترین گونه صید شده کیلکا در جنوب دریای خزر می باشد(۲۱). وجود اسیدهای چرب چند غیراشباع در ماهی منجر به کاهش کیفیت ماهی به دلیل اکسایش می شود. لذا لازم است به منظور کاهش توسعه اکسایش، رنسیدیتی[2] توسعه بوهای نامطبوع، کاهش ارزش تغذیه ای و نهایتا کاهش بازارپسندی محصول روش های محافظت محصول انجام شود (۲۵). روش های گوناگونی برای به تاخیر انداختن و یا جلوگیری از اکسیداسیون وجود دارد که از آن جمله می توان به فریز کردن(۱۱) و افزودن آنتی اکسیدان ها می باشد(۴۸). افزایش تقاضای مصرف کنندگان به غذاهایی که حداقل فرآیند بر روی آن ها انجام شده باشد و کمترین مقادیر نگهدارنده های ضدمیکروبی مصنوعی در آن ها بکار رفته باشد منجر به استفاده از اسانس ها و عصاره های گیاهی دارای خاصیت ضدمیکروبی در صنعت غذا شد(۱۰). این ترکیبات با اثر بر مکانیسم دیواره فسفولیپیدی میکروارگانیسم ها و همچنین سیستم آنزیمی و مواد ژنتیکی باکتری ها باعث از بین رفتن باکتری ها و اعمال اثرات ضدباکتریایی در محصولات غذایی می شوند(۱۳). اناریجه[3] با نام علمیPimpinella affinis Ledebگیاهی است یکساله و در مطالعات بسیار آزمایشگاهی خواص آن ثابت شده است(۳۶). در این مطالعه سعی بر آن شد تا اثر عصاره اناریجه بر واکنش های فساد میکروبی و شیمایی طی دوره نگهداری در ماهی کیکلکای چرخ شده مورد بررسی قرار بگیرد.

۲-مواد و روش ها

۲-۱- مواد

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

۲-۲- روش ها

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

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

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

[1]- Poly unsaturated fatty acid (PUFA)
[2]-Rancidity
[3]-Pimpinella

خزر- ایران) چرخ شدند. سپس ماهی های چرخ شده به نسبت ۱:۳ (محلول:ماهی) به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۰/۳٪ $NaHCO_3$با دمای ۱۰ درجه سانتیگراد غوطه ور شدند. سپس با دست فشرده شدند تا آب اضافی آن ها خارج شود (۳). سوسپانسیون میکروبی *لیستریامونوستوژنز* با کدورت ۰/۵ مک فارلند به نمونه های ماهی چرخ شده افزوده شد. هر تیمارحاوی ۱۰۰ گرم گوشت چرخ شده ماهی می باشد. از نمونه های آلوده مذکور به منظور کنترل غلظت میکروب ها کشت به عمل آمد. پس از آن، بهترین عصاره از نظر خاصیت ضد میکروبی در سه غلظت ۸، ۹ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر (حداقل غلظت ممانعت کنندگی و دو غلظت بالاتر) به نمونه های ماهی چرخ شده افزوده شد. برای نمونه کنترل از لاکتات سدیم ۶۰٪ به میزان ۱۸ میلی گرم بر کیلوگرم استفاده شد.

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

نمونه ها در شرایط استریل و در بسته های پلی اتیلنی قرار گرفتند و در سه دمای ۴، ۱۰ و ۱۲-درجه سانتیگراد نگهداری شدند. در زمان‌های ۰، ۱۵ ،۳۰ و ۴۵ روز نگهداری، شاخص-های شیمیایی عدد پراکسید، عدد اسید تیوباربیتوریک، مجوع بازهای ازته فرار و آزمون های میکروبی شمارش انواع میکروارگانیسم و شمارش کلی میکروارگانیسم ها اندازه گیری شد. کلیه آزمایشات در سه تکرار انجام شد. آزمون های شمارش باکتری های *لیستریا مونوسیتوژنز* و شمارش کلی میکروارگانیسم ها به ترتیب مطابق با روش ICMSF(۲۶)انجام شد. عدد پراکسید، عدد TBAو بازهای ازته فرار نیزمطابق با روش AOCSبه شماره (Cd 8-53) ، (Cd 19-90) (۸)و روش جن و همکاران(۲۸)انجام شد.

۲-۴-تجزیه و تحلیل آماری

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

۳-نتایج و بحث

۳-۱- ترکیب شیمیایی ماهی کیلکای اولیه

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

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

رطوبت	چربی	پروتئین	خاکستر
۷۲/۰±۰۸/۰۴	۸/۰±۲/۴۲	۱۶/۰±۶/۱۳	۳/۰±۱۲/۱۱

بیش از ۸ درصد از ترکیب ماهی از چربی و اسیدهای چرب غیر اشباع تشکیل شده است که آن را مستعد اکسیداسیون کرده است. همچنین میزان پروتئین در ماهی بالا است که شرایط را برای فعالیت باکتری های پروتئولیتیک مناسب نموده است (۲۹). خانی پور و همکاران(۲۹) ترکیبات شیمیایی ماهی کیلکا را به ترتیب ۷۵، ۶/۵ و ۱۵/۵ درصد به ترتیب برای رطوبت، چربی، پروتئین و خاکستر اعلام نمودند. پیرستانی و همکاران(۳۸) نیز در پژوهشی مشابه ترکیبات تشکیل دهنده ماهی کیلکا را به ترتیب ۷۰/۸ و ۱۰/۲ گزارش نمودند. پیرستانی و همکاران (۳۹) مقادیر چربی در ماهی کیلکای

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

۳-۲-ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره

ترکیبات فنولی متابولیتهای ثانویه آروماتیک گیاهی با تاثیرات بیولوژیکی متعدد همچون فعالیت آنتی اکسیدانی وفعالیت ضدباکتریایی هستند. مقدار کل ترکیبات فنولی عصاره اناریجه در این پژوهش ۱۸۳۶/۶۹(mgGA/۱۰۰gE) بود که با نتایج تارون و همکاران(۵۰) مطابقت داشت. نتایج مربوط به فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره در جدول ۲ نشان داده شده است. با افزایش غلظت عصاره، فعالیت آنتی اکسیدانی آن در هر دو روش افزایش یافت و اختلاف معنی دار آماری (P<۰/۰۵)بین غلظت های مختلف مشاهده شد. آنتی اکسیدان ها با مقاومت به اکسایش را افزایش می دهند. عصاره گیاه اناریجه حاوی ترکیبات فنولی است که این ترکیبات با خاصیت جاروب کنندگی رادیکال های آزاد اثرات آنتی اکسیدانی خود را اعمال می کنند(۵۰).

جدول ۲.فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها در غلظت‌های مختلف

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

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

۳-۳- اثر متغیرهای مختلف بر خصوصیات شیمیایی و میکروبی ماهی حاوی لیستریامونوسیتوژنز

نتایج تاثیر سطوح مختلف دما، زمان نگهداری، غلظت عصاره و اثر متقابل فاکتورها بر خصوصیات شیمیایی و میکروبی نمونه های تیمار شده با *لیستریامونوسیتوژنز* در جدول ۳ نشان داده شده است. مشاهده می شود زمان نگهداری، دما و غلظت عصاره همگی عوامل دارای تاثیر معنی دار آماری بر تعداد میکروارگانیسم ها، عدد پراکسید، عدد TBAو بازهای ازته فرار بوده اند. همچنین اثر متقابل فاکتورهای غلظت*روز و غلظت*دما بجز تعداد میکروارگانیسم بر سایر عوامل مورد بررسی تاثیر معنی دار آماری داشته است.

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

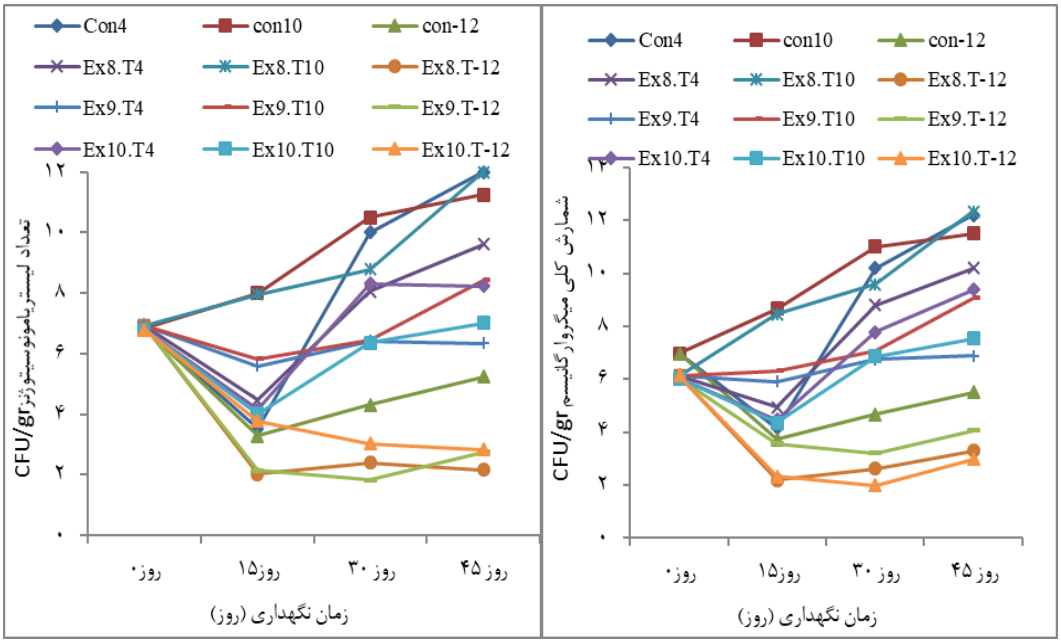
	درجه آزادی	تعداد *لیستریامونوسیتوژنز* (CFU/gr)	شمارش کلی میکروارگانیسم (CFU/gr)	عدد پراکسید (meqO2/kgOil)	عدد TBA mg MA/kg) (Oil	بازهای ازته فرار (mgN2/100grmeat)
روز	۳	۱۳۹/۷۹*	۱۴۹/۷۵*	۸/۴۵*	۷/۶۶*	۲۱۸۳/۲۸*
دما	۲	۱۹۹/۸۴*	۲۲۱/۱۸*	۳/۵۵*	۰/۵۱*	۱۲۵۷/۲۶*
غلظت	۳	۲۶/۵۳*	۲۶/۷۶*	۲/۶*	۰/۷۲*	۴۸۷/۱۱*
غلظت*روز	۹	۶/۶۷ns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

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

۳-۴- شمارش میکروبی

ماهی از غذاهای پروتئینی فسادپذیر است. زمانیکه ماهی در دمای کمتر از ۱۰ درجه سانتیگراد نگهداری می شود بعد از ۴۰ ساعت فاسد می شود. فریز کردن موجب جلوگیری از فساد ماهی نمی شود زیرا فعالیت های اتولیتیک و تغییرات شیمیایی در ماهی بلافاصله بعد از صید اتفاق می افتند (۲۷). فعالیت میکروارگانیسم ها در ماهی منجر به بروز بوهای نامطبوع، تخریب بافت و ظاهر ماهی می شوند(۴۱). شکل ۱. تعداد میکروارگانیسم رشد کرده طی دوره نگهداری در نمونه های مختلف را نشان می دهد. *لیستریامونوسیتوژنز* یکی از میکروارگانیسم های بیماریزای مهم است که ۳۰ درصد مرگ و میر در دنیا ناشی از بیماری های لیستریایی است(۱۴). نتایج نشان داد که با افزایش زمان نگهداری، تعداد نهایی باکتری و شمارش کلی میکروب در تمام نمونه های مورد بررسی روند افزایشی داشته است. این نتایج با نتایج بررسی دیسای و همکاران (۱۵)مطابقت دارد. در پژوهش آن ها نشان دادند در نمونه کنترل همواره روند رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* افزایشی بوده و با افزایش غلظت عصاره رشد لیستریایی کاهش می یابد. ضدمیکروب ها اصلی ترین مواد مورد استفاده برای کاهش فساد در مواد غذایی هستند. مواد ضدمیکروبی سنتزی علاوه بر هزینه بالا، مشکل مقاوم شدن عوامل میکروبی را نیز در پی دارند(۲۹). در نمونه های حاوی عصاره، با افزایش غلظت عصاره رشد میکروارگانیسم ها کاهش یافت. این نتایج با نتایج پزشک و همکاران(۳۷) مطابقت دارد. مکانیسم اثرات کشندگی و ممانعت کنندگی عصاره بر روی باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* بخوبی مشخص نیست(۳۷). این نتایج با نتایج عبدالله زاده و همکاران (۱) مطابقت داشت. آن ها ضمن بررسی اثرات ضدمیکروبی اسانس آویشن در دو غلظت ۰/۴ و۰/۸ درصد بر رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* اعلام نمودند که با افزایش غلظت عصاره میزان رشد باکتری کاهش می یابد. این نتایج با نتایج دیجنان و همکاران(۴۹) در مورد تاثیر عصاره های گیاهی بر رشد میکروارگانیسم ها در گوشت و همچنین با نتایج لی و همکاران(۱۶) در مورد تاثیر عصاره رزماری و پلی فنول های چای بر رشد باکتری ها مطابقت دارد که هر دوی آن ها به اتفاق اعلام نمودند ترکیبات فنولی عصاره ها از رشد میکروارگانیسم ها جلوگیری می نمایند.خواص

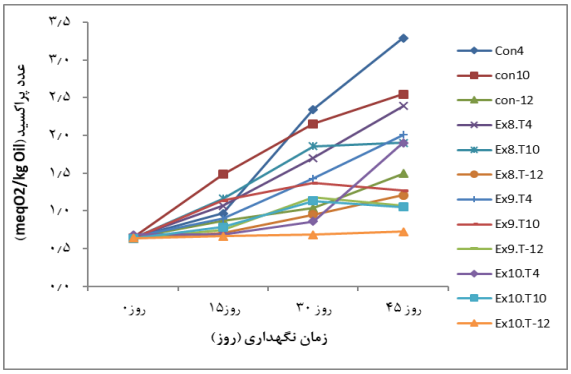
بازدارندگی از رشد میکروبها مربوط به ترکیبات فنولی عصاره ها است که محلول درحلالهای‌قطبی می باشد. در مطالعات اخیر اثرات آنتی میکروبی ترکیبات فنولی، ترپن ها و تری ترپنوئیدها در عصاره های گیاهی به اثبات رسیده است (۳۶). تخریب دیواره سلولی منجر به نشت محتویات سلولی به بیرون ودرنتیجه مرگ سلول می شود.(۱۳). همچنین مشاهده شد که با کاهش دما تعداد میکروارگانیسم های رشد کرده کاهش می یابد. کاهش دما منجر به کند شدن واکنش های ایجاد کننده فساد میکروبی در ماهی می شود و در نتیجه تعداد میکروارگانیسم های رشد کرده کاهش می یابد. عصاره هیدروالکلی اناریجه به سبب دارا بودن ترکیبات قطبی و غیر قطبی توانایی حل شدن در آب و چربی موجود در ماهی را دارد. در دمای های زیر صفر درجه سانتیگراد رطوبت موجود در ماهی به شکل منجمد وجود دارد. لذا بخش اعظم عصاره با میکروارگانیسم ها درگیر می شود و اثرات آنتی باکتریایی خود را اعمال می کند. بنابراین در دمای ۱۲- درجه سانتیگراد سرعت رشد میکروارگانیسم ها در نمونه های حاوی عصاره کمتر بود.



شکل ۱. میانگین تغییرات رشد لیستریامونوسیتوژنز وشمارش کلی میکروب

۳-۵- اکسیداسیون چربی

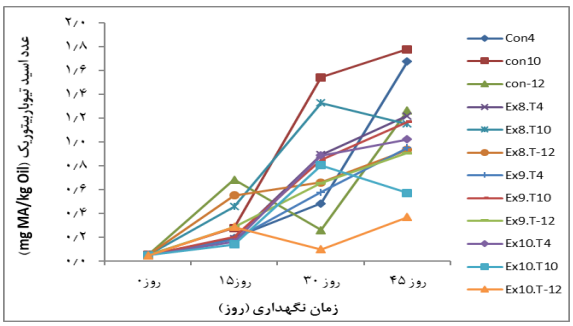
گوشت ماهی سیستم پیچیده و محیط مناسب برای اکسایش سریع چربی است. اکسیداسیون چربی دلیل اصلی از بین رفتن کیفیت ماهی در دوره نگهداری است که منجر به تخریب ویتامین ها، رنگ رفتگی ماهی و از دست رفتن اسیدهای چرب ضروری می شود. تمام این تغییرات منجر به کاهش ارزش تغذیه‌ای ماهی می شوند (۳۳). چربی موجود در ماهی (اسیدهای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



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

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

روند تغییرات عدد اسیدتیوباربیتوریک برای تمام نمونه ها افزایشی بود توکر و همکاران (۱۱)و تنها در چند نمونه کاهش مشاهده شد.این نتایج همراستا با نتایج سیف زاده و همکاران(۴۷) می باشد. کاهش عدد TBAدر پایان دوره نگهداری به دلیل از دست رفتن ترکیبات با وزن ملوکلی پایین که در نتیجه تجزیه محصولات پیشرفته اکسیداسیون ایجاد می شوند، می باشد(۳۴). همچنین ممکن است به دلیل واکنش بین مالون آلدهید و آمینواسیدهای موجود در ماهی که منجر به تشکیل ترکیبات کربونیل می شود عدد TBAدر ماهی ابتدا افزایش و سپس کاهش یابد. اسچرمولر و همکاران (۴۵) میزان ۷-۸ میلی گرم مالون آلدئید بر کیلوگرم روغن را بالاترین حد قابل قبول برای تازگی ماهی دانستند. مشاهده می شود که در تمام نمونه های حاوی عصاره عدد TBAدر محدوده قابل قبول قرار دارد. نمونه شاهد بالاترین میزان عدد TBAرا داشت و در نمونه های حاوی عصاره اناریجه مقادیر عدد TBAکمتر بود. این نتایج با نتایج تیان سیلاکول و همکاران (۴۳)و فهیم دژیان و همکاران (۱۹) مطابقت داشت. در پژوهش آن ها همواره نمونه شاهد بالاترین عدد اسیدتیوباربیتوریک را داشت. بنجاکول و همکاران (۳۳)، سانجز آلنسو و بردریاس(۴۵)اعلام نمودند مقادیر TBAبرای نمونه های حاوی آنتی اکسیدان بسیار کمتر از نمونه شاهد است. گوکوگلو و همکاران (۲۲) نشان دادند که در نمونه های ماهی حاوی کاتچین و سس انار اکسیداسیون چربی بسیار کمتر است.



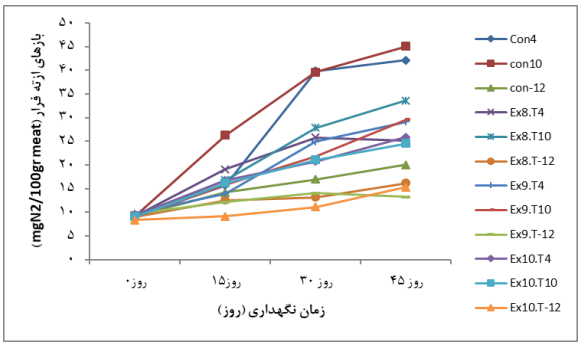
شکل ۳. میانگین تغییرات عدد اسید تیوباربیتوریک در نمونه های تیمار شده با لیستریا مونوسیتوژنز

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

۳-۶- بازهای ازته فرار

یکی از شاخص های شیمیایی تعیین کننده فساد غذاهای دریایی مقادیر بازهای نیتروژنی فرار (TVB-N) می باشد و یک اصطلاح کلی برای مجموع تری متیل آمین (که بوسیله باکتری های عامل فساد تولید می شوند)، دی متیل آمین (که بوسیله آنزیم های خودبخودی موجود در گوشت طی نگهداری سرد ایجاد می شوند)، آمونیاک (که در نتیجه دآمیناسیون آمینواسیدها و کاتابولیسم نوکلوتیدها ایجاد می شود) و دیگر ترکیبات فرار که در ترکیبات آن ها نیتروژن وجود دارد و در نتیجه فساد غذاهای دریایی تولید می شوند، می باشد(۳۲). آنزیم های موجود در گوشت و فعالیت های باکتری های موجود در گوشت هر دو بر روی مقدار بازهای نیتروژنی فرار موثرند (۴۰). شکل ۴ بازهای ازته فرار نمونه های مختلف را نشان می دهد. مشاهده می شود در تمام نمونه های مورد بررسی با روند افزایشی در تولید بازهای ازته فرار روبرو هستیم. در ابتدای دوره نگهداری جمعیت باکتریایی در فاز پایه قرار داشت و با سرعت کمی رشد نمودند لذا مقدار بازهای ازته فرار با گذشت زمان تولید بازهای ازته با سرعت

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



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

بیشترین میزان تولید بازهای ازته فرار در نمونه شاهد مشاهده شد. کاهش رشد میکروارگانیسم ها در نمونه های حاوی عصاره منجر به کاهش تولید بازهای ازته فرار شد. این نتایج با نتایج فن و همکاران(۲۰)مطابقت دارد. مطابق با نتایج آنها افزودن عصاره های گیاهی به ماهی میتواند به کاهش رشد جمعیت باکتریایی و یا کاهش ظرفیت باکتری ها برای دآمیناسیون اکسیداتیو نیتروژن غیر پروتئینی ترکیبات و یا هر دوی آن ها منجر شود که به دلیل وجود ترکیبات فنولی در عصاره است. در نمونه های حاوی عصاره، با افزایش غلظت عصاره تولید بازهای ازته فرار کاهش یافت. نمونه های حاوی عصاره با کاهش رشد میکروارگانیسم ها به طور مستقیم بر تولید بازهای ازته فرار نقش داشتند. در دمای ۱۲C°- نسبت به دو دمای ۴ و ۱۰ درجه سانتیگراد بازهای ازته فرار کمتری تولید شد. در دماهای زیر صفر آب به صورت منجمد وجود دارد. کاهش فعالیت آبی در دمای ۱۲C°- منجر به کاهش فعالیت میکروارگانیسم ها شد که خود کاهش تولید بازهای نیتروژنی فرار را در پی داشت (۳۱).

۴-نتیجه گیری

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

۵-منابع

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

of Superchilled Minced Meat of Common Kilka (Clupeonellacultriventriscaspia). Journal of food quality hazard control, (1):85-88.

5. Albu, S. Joyce, E. Paniwnyk, L.Lorimer, P. and Mason, J. 2004. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from Rosmarinusofficinalis for the food and pharmaceutical industry. Ultrasonicssonochemistry, (11): 261−265.
6. Amarowicz, R.Pegg, R. B. Rahimi-Moghaddam, P. Barl, B.and Weil, J.A. 2004. Freeradical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. Food chemistry, (84):551–562.
7. AOAC. 1995. Official methods of analysis (16th ed.). Arlington, VA.USA: AOAC.
8. AOCS. 1990Official Methods and Recommended Practices ofAmerican Oil Chemists' Society, edited by DavidFirestone, Vol. 1., Method Cd 8-53. 15th ed. Washington,DC.
9. Arun, K.D. Rajkumar, V. 2011. Antioxidant effect of curry leaf (Murrayakoenigii) powder on quality of ground and cooked goat meat.International food research journal, 18(2):563-569.
10. Bakkali, F.Averbeck, S. Averbeck, D. andIdaomar, M. 2008. Biological effects ofessential oils-a review. Food Chemical Toxicology, (46): 446-475.
11. Benjakul, S.and Visessanguan, W. 2011. Impacts of freezing and frozen storage on quality changes of seafoods. Physicochemical aspects of food engineering and processing. CRC Press, 283-306.
12. Berra, B.Montorfano, G.Negroni, M.Corsetto, P.and Rizzo, A.M.2009. Biomarkers of long-chain PUFA ω-3 fatty acids and the humannutritional status. Lipid Technology,(21): 32-35.
13. Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: areview. Journal of food protection, (94):223–53.
14. Dadkhah, H. Bassami, M. R. Hashemi, S. Shahraz, F. Hosseini, H.and Karatzas, K.A.G. 2012. Evaluation and comparison of SYBR Green I Real-Time PCR andTaqMan Real-Time PCR methods for quantitative assay of Listeria monocytogenesin nutrient broth and milk. African journal of microbiology research, (6): 1908-1917.
15. Desai, M.A. Soni, K. A. Nannapaneni, R. Schilling, M. W.and Silva, J. L. 2012.Reductionof Listeria monocytogenes in raw catfish fillets by essential oils andphenolic constituentcarvacrol. Journal of food science, (77): 516-522.
16. Djenane, D. Escalante, A.S. Beltran,J.A.and Roncales, P. 2003. The shelf-lifeacid and antioxidants and stored undermodified atmospheres. International journal of food microbiology, (20): 1-7.
17. Donald S. Prenzler, P. D. Autolovich, M.and Robards, K. 2001. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. Food chemistry, (73):73-84.
18. EsmaeilzadehKenari, R. Mohsenzadeh F.and RaftaniAmiri Z. 2014. Antioxidant activity and total phenolic compounds of Dezful sesame cake extracts obtained by classical and ultrasound-assisted extraction methods. Food science and nutrition, 2(4):426-435.
19. Fahimdezhban, Y. Motallebi, A. A. Hosseini, E. Khanipour, A.A.and Soltani, M. 2014. Comparison of effect of Zatariamultifloraand Rosemarinusofficinalisextracts on quality of minced frozen silver carp. Iranian journal of fishery science, 13(1):20-29.
20. Fan, W. J. Chi, Y. L.and Zhang, S. 2008. The use of a tea polyphenol dip to extend theshelf life of silver carp (Hypophthalmicthysmolitrix) during storage in ice. FoodChemistry, (108):148–153.
21. Fazli, H. 2011. Some environmental factors effects on species composition, catch and CPUE of Kilkas in the

31. Li, T. Li, J. Hu, W. Zhang, X. Li, X.and Zhao, J. 2012. Shelf-life extension of crucian carp (Carassiusauratus) using natural preservatives during chilled storage. Journal of food chemistry, (135):140–145.
32. Mahmoudzadeh, M. Khaksar, B. Motallebi, A. Hosseini, H. Ahmadi, H.Hosseini, M. andFarzaneh, M.2012. Freezingeffectsonchangesin-18°C qualityrawburgermade from Sauridaundosquamisuncoated.Journal of food science and nutrition, 7(1):23-30.
33. Maqsood, S. Benjakul, S. Abushelaibi, A.and Alam A. 2014. Phenolic Compounds and Plant Phenolic Extracts as Natural Antioxidants in Prevention of Lipid Oxidation in Seafood: A Detailed Review. Comprehensive reviews in food science and technology, (13):1125-1140.
34. Nawar, W.W. 1996. Lipids. In: Fennema, O.R, editor. Food chem. 3rd ed.New York: Marcel Dekker. 225–320.
35. Ojagh, S. M. Rezaei, M. Razavi, S. H.and Hosseini, S.M.H. 2010. Effect of chitosancoatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbowtrout. Food Chemistry, (120): 193–198.
36. Özbek, H. Güvenalp1, Z. Kuruüzüm-Uz, A. Kazaz, C. and Demirezer, L. O. 2016. Phenylpropanoids, Sesquiterpenoids and Flavonoids from PimpinellatragiumVill. subsp. lithophila(Schischkin) Tutin, Record of natural products journal, 10(2):207-213.
37. Pezeshk, S. Hosseini, H. Rezaei M.and Khaksar, R. 2013. Evaluation of shelf life of live and gutted fish treated with a shallot extract. Journal of food processing and preservation, (37):970–976.
38. Pirestani, S. Ali Sahari, M.Barzegar, M. and Seyfabadi, S. J. 2009. Chemical compositions and minerals of some commercially important fish species from the South Caspian Sea. International food research journal, (16): 39-44.
39. Pirestani, S.Sahari, M. A.and Barzegar, M. 2010. Fatty acid changes during Caspian Sea. International Journal of NaturalResource and Marine Science, 1(2):157-164.
22. Gokoglu, N. Yerlikaya, P. KadirTopuz, O.and Aydan Buyukbenli, H. 2012. Effects of Plant Extracts on Lipid Oxidation in Fish Croquette during Frozen Storage. Food science and biotechnology, 21(6):1641-1645.
23. Gram, L.and Huss, H. 1996.Microbiological spoilage of fish and fishproducts. International journal food microbiology, (33):589–595.
24. Huber, G.M.Rupasinghe, H.P.V.and Shahidi, F. 2009. Inhibition of oxidation ofω-3 polyunsaturated fatty acids and fish oil by quercetin glycosides.Food Chemistry,(117): 290-295.
25. ICMSF 1982. International Commission of Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in foods. Their significance and methods of enumeration. 2nd ed. University of Toronto Press. 436.
26. James, M. Jay-Martin J.and Loessner-david, A. 2005. Modern food microbiology. Volume1.
27. Jeon, Y. J.Kamil, J. Y.and Shahidi, F. 2002. Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and atlantic cod. Journal of agriculture of food Chemistry, (50): 5167-5178.
28. Kaur, T. Gupta, R. Vaiphel, K. Kapoor, R..Gupta, N.M.Khanduja. K.L. 2007. International journal of radiation oncology,1-9.
29. Khanipour, A. A.Jorjani, S. and Soltani, M. 2014. Chemical, sensory and microbial quality changes of breaded kilka (Clupeonellacultriventris) with tempura batter in production stage and during frozen storage.International food research journal, 21(6):2421-2430.
30. Leroi, F.Joffraud, J.J.and Chevalier, F.2000. Effect of salt and smoke on themicrobiological quality of cold-smokedsalmon during storage at 5°C as estimated bythe factorial design method. Journal of foodprotection, 63(4):502–508.

frozen storage in several fish species from south Caspian Sea. . Journal of agriculture of food technology, (12):321-329.
40. RazaviShirzi, H. 2007. Seafoodtechnology, principles of handling andprocessing (1). Pars negar Press.
41. Sahoo, J.Kawasra, R. K.and Hooda, S. 2004. Studies on a-tocopherol acetate as an antioxidant in chicken mince on its quality during refrigerated storage. Journal of food science and technology, (41):240-243.
42. SanchezAlonso I. JimenezEscrig, A. SauraCalixto, F.and Borderıas, J. 2008.Antioxidant protection of white grape pomace on restructured fish productsduring frozen storage. LWT - food science and technology journal, (41):42-50.
43. Schormüller, J. 1968. Manual of Food Chemistry. TeilSpringer-Verlag, Berlin, Germany. 1482-1537.
44. Seifzadeh, M.Motallebi, A. A.and Mazloumi, M.T. 2012. Evaluation of fat quality in packaged common kilka fishsoaked in whey protein compared with sodium alginate. Scholarly journal of agriculture science, 2(2)26-31.Sabah Abbas, M. 2014. Isolation of bacteria from fish. International journal of advanced research, 2(3): 274-279.
45. Sallam, K. I. Ahmed, A. M.Elgazzar, M. M.and Eldaly, E.A. 2007. Chemical qualityand sensory attributes of marinated Pacific saury (Cololabissaira) duringvacuum-packaged storage at 4°C. Food Chemistr, (102): 1061–1070.
46. Shahidi, F. and Zhong, Y. 2005. Lipid oxidation measurement methods.Canada. 357-386.
47. Smith-Palmer, A. Stewart, J.and Fyfe, L. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils andessences against five important food-borne pathogens. Letters in applied microbiology, (26)118–22.
48. Tharun, G.and Kumar Pindi, P. 2013. Evaluation of antioxidant potential andantimicrobial activity of successive extractsof Pimpinellatirupatiensis. Journal of pharmacy research. (7): 817-822.
49. Thiansilakul, Y. Benjakul, S.and Richards, M.P. 2013. Effect of phenolic compounds in combination with modified atmospheric packaging on inhibition of quality losses of refrigerated Eastern little tuna slices. LWT - food science and technology journal, (50):146-152
50. Tokur, B. Ozkutuk, S. Atici, E. Ozyurt, G.and Ozyurt, C.E. 2006. Chemical andsensory quality changes of fish fingers, made from mirror carp (Cyprinuscarpio L.), during frozen storage (−18°C). FoodChemistry, (99): 335-341.
51. Weber, J. Bochi, V. C. Ribeiro, C. P.Victorio, A.M. and Emanuelli, T. 2008. Effect of different cookingmethods on the oxidation, proximateand fatty acid composition of silvercatfish (Rhadiaquelen) fillets. FoodChemistry,(106): 140-146.