(مقاله پژوهشی)

بررسی خصوصیات ضد باکتریایی اسانس‌های خوشاریزه، مرزه بختیاری و پوشش خوراکی کیتوزان بر *لیستریا مونوسایتوژنز* در فیله ماهی قزل آلای رنگین‌کمان

الهام فتحی مقدم[۱]، امیر شاکریان[۱*]، رضا شرافتی چالشتری[۲]، ابراهیم رحیمی[۱]

۱-مرکز تحقیقات تغذیه و محصولات ارگانیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی ، شهرکرد، ایران.

۲-گروه تغذیه، مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۱۵ تاریخ پذیرش:۱۳۹۸/۱۰/۱۸

چکیده

مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثر کیتوزان و اسانس‌های خوشاریزه و مرزه بختیاری روی باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* در فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شد. نمونه های ماهی با کیتوزان و اسانس‌های مرزه بختیاری (۰/۰۶۲، ۰/۱۲۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و خوشاریزه (۰/۰۶۲، ۰/۱۲۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) پوشش‌دهی شدند. *لیستریا مونوسایتوژنز* (۱×۱۰^{۳} پرگنه در گرم) به نمونه ها تلقیح و ۱۶ روز در دمای یخچال ارزیابی شد. فراوان‌ترین ترکیبات در گیاه مرزه بختیاری carvacrol (۳۱/۲۵ درصد)، thymol (۲۳/۵۰ درصد)، o-cymene (۱۳/۸۷ درصد) و Gamma-terpinene (۱۰/۶۵ درصد) بودند. فراوان‌ترین ترکیبات شیمیایی در اسانس گیاه خوشاریزه ocimene (۴۴/۱۵ درصد)، alpha-phellandrene (۱۶/۸۰ درصد)، gamma-terpinene (۸/۵۲ درصد) و beta-myrcene (۶/۰۸ درصد) بودند. میزان MIC (۰/۰۶۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و MBC (۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مرزه بختیاری از اسانس خوشاریزه کمتر بود. بیشترین تعداد باکتری در روز ۱۶ نگه‌داری به ترتیب مربوط به نمونه‌های ماهی شاهد (۰/۱۰ ± ۱۱/۰۰ Log CFU/g) و کمترین مربوط به گروه‌های کیتوزان، اسانس‌های خوشاریزه (۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و مرزه بختیاری (۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) (۰/۰۲ ± ۸/۰۲ Log CFU/g) بود. افزایش ازت فرار تام در تیمار شاهد بیشتر از سایر نمونه‌ها بود ($P \leq ۰/۰۵$). نمونه‌های تیمارشده با کیتوزان و اسانس‌های خوشاریزه (۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و مرزه بختیاری (۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بیشترین امتیازات حسی مربوط به فاکتورهای عطر و طعم، بافت و پذیرش کلی را داشتند. استفاده از کیتوزان و اسانس‌های خوشاریزه و مرزه بختیاری سبب کنترل تعداد *لیستریا مونوسایتوژنز* و تولید ازت فرار تام و بهبود خصوصیات ارگانولپتیکی نمونه‌های ماهی قزل‌آلای رنگین کمان شد.

واژه های کلیدی: قزل آلای رنگین کمان، کیتوزان، خوشاریزه، مرزه بختیاری، *لیستریا مونوسایتوژنز* .

* مسئول مکاتبات: Amshakerian@yahoo.com

۱-مقدمه

امروزه ماهی قزل آلای رنگین کمان به صورت انبوه در اکثر کارگاه‌های تکثیر و پرورش ماهیان سرد آبی در بیشتر نقاط جهان پرورش می یابد (۲۵، ۲۶). گوشت ماهی قزل آلای رنگین کمان غنی از پروتئین و چربی های ضروری می باشد. کلسیم، فسفر، آهن و پتاسیم جز اصلی ترین املاح معدنی موجود در گوشت ماهی قزل‌آلای رنگین کمان هستند. اسیدهای چرب موجود در گوشت ماهی قزل آلای رنگین‌کمان به‌صورت اسیدهای چرب غیراشباع است. حضور اسیدهای آمینه ضروری مانند آرژنین، هیستیدین، لوسین، ایزولوسین، لیزین، متیونین، فنیل آلانین، ترئونین، تریپتوفان و والین و ویتامین‌های محلول در چربی و محلول در آب در گوشت ماهی قزل آلای رنگین کمان سبب افزایش ارزش تغذیه‌ای آن شده است (۲۱, ۲۸). فعالیت آبی بالا، pH نزدیک به خنثی، مقادیر نسبتاً بالای اسید های آمینه آزاد و در نهایت حضور آنزیم‌های اتولیز کننده در گوشت ماهی قزل‌آلای رنگین کمان سبب شده است تا این فراورده دریایی نسبت به سایر انواع گوشت و محصولات گوشتی، نسبت به فساد شیمیایی و میکروبی حساس‌تر باشد (۱۱, ۱۶). به منظور به تعویق انداختن فساد اکسیداتیو و باکتریایی ماهی و فرآورده‌های آن می‌توان از روش‌هایی همچون کنترل درجهٔ حرارت و کاهش آن، بسته بندی تحت خلأ، بسته بندی در اتمسفر اصلاح یافته، افزودن عوامل ضد میکروبی مانند نمک و افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها و نگه‌دارنده‌ها اشاره-کرد (۲۵، ۲۶). امروزه استفاده از پوشش های خوراکی و فیلم های با خصوصیات ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی که موجب کند شدن آزادسازی ترکیبات اسانس ها در ماده غذایی شده و در نتیجه حفظ طعم و عطر اولیه گوشت ماهی و سایر فراورده های دریایی را سبب می‌شود، مورد توجه قرار گرفته است (۷, ۱۳). کیتوزان به عنوان یک بیوپلیمر غیر سمی و زیست تخریب‌پذیر که از کیتین موجود در پوسته خارجی سخت پوستان به دست می‌آید، در صنایع غذایی مورد مصرف می باشد. در مطالعات گذشته اثرات ضدباکتریایی، آنتی اکسیدانی، ضدسرطانی و کاهش دهندگی کلسترول توسط کیتوزان گزارش شده است (۱۷, ۲۷). جنس خوشاریزه (Echinophora) در ایران ۴ گونه گیاه علفی چند ساله معطر دارد. دو گونه platyloba و cinerea انحصاری ایران هستند و دو گونه دیگر به نام های orientalis و sibthorpiana علاوه بر ایران، در سایر کشورهای موجود در قاره آسیا نیز می‌رویند(۱۵). *Echinophora platyloba* گیاهی است علفی، یک ساله، معطر از تیره چتریان (Apiaceae) به ارتفاع حدود ۳۰ تا ۱۰۰ سانتی‌متر، ساقه آن استوانه ای بی کرک و ریشه آن مخروطی است و حاوی ترکیباتی مانند ساپونین، فلاوونوئید، آلکالوئید، فنول و اوسیمن با خصوصیات ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی می باشد. به دلیل عطر و طعم خوشایند، از این گیاه برای نگه‌داری مواد غذایی استفاده می‌شده است (۱۵). جنس مرزه (Satureja) در ایران ۱۴ گونه گیاه علفی یک ساله و چند ساله دارد که در مناطق مختلف کشور یافت می شود.گونه *Satureja bachtiarica* دارای پراکندگی نسبتاً وسیعی در ایران است ودراکثراستان‌های کشور جمع آوری شده است (۱۰). مرزه بختیاری بوته هایی منشعب به ارتفاع ۲۰ تا ۳۰ سانتی‌متر و قاعده چوبی، ساقه ها خاکستری بسیارکوتاه و نرم و سرشار از ترکیبات با خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی می‌باشد. از جمله مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس جنس مرزه می‌توان به منتول، کارواکرول، ترپین، لیمونن، پینن و اسپاتولنون اشاره کرد (۱۲). با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای در خصوص استفاده از اسانس های خوشاریزه و مرزه بختیاری همراه با کیتوزان روی گوشت ماهی مشاهده نشده است، مطالعه حاضر به منظور ارزیابی خصوصیات ضد میکروبی اسانس گیاهان خوشاریزه و مرزه بختیاری و پوشش خوراکی کیتوزان بر باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* در ماهی قزل آلای رنگین کمان انجام شد.

۲-مواد و روش ها

۲-۱- جمع آوری گیاهان دارویی

گیاهان خوشاریزه و مرزه بختیاری در فصول بهار و تابستان سال ۱۳۹۷ از مناطق مختلف استان چهارمحال و بختیاری جمع‌آوری شدند. نمونه های گیاه پس از انتقال به

آزمایشگاه، توسط گروه گیاهان دارویی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی و معطر دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد مورد تایید قرار گرفتند. جنس و گونه گیاهان دارویی خوشاریزه و مرزه بختیاری در این مطالعه به ترتیب Echinophora platyloba DC و Satureja bachtiarica L شناسایی شد. سپس اندام هوایی گیاهان خوشاریزه و مرزه بختیاری پس از یک شستشوی ساده و آبکشی جهت رفع گرد و غبار، در سایه خشک و سپس آسیاب شد. پودر حاصل از آسیاب اندام هوایی گیاهان خوشاریزه و مرزه بختیاری جهت انجام آزمایشات بعدی به مرکز تحقیقات تغذیه و محصولات ارگانیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل شد.

۲-۲- تهیه اسانس

پودر حاصل از آسیاب گیاهان دارویی جمع آوری شده توسط دستگاه Clevenger (آداک تجهیز، ایران) به روش تقطیر آبی به منظور اسانس گیری مورد استفاده قرارگرفت. در هر بار اسانس گیری، ۱۰۰ گرم پودر گیاه به همراه یک لیتر آب در دستگاه Clevenger ریخته شد و اسانس‌گیری به مدت سه ساعت انجام پذیرفت. اسانس‌ها توسط سدیم سولفات بدون آب، آب‌گیری شدند. در نهایت اسانس‌های تهیه شده در یخچال و در دمای ۴ درجه سلسیوس و درون شیشه های تیره رنگ نگه‌داری شدند (۸).

۲-۳- ارزیابی ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس گیاهان دارویی

ترکیبات شیمیایی اسانس گیاهان خوشاریزه و مرزه بختیاری با استفاده از دستگاه GC-Mass (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور تعیین ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه مرزه بختیاری، از ستون موئینه به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از نوع HP5، استفاده شد. دمای ابتدایی آون ۶۰ درجه سلسیوس و توقف در این دما به مدت ۴ دقیقه و سپس افزایش دما تا ۲۶۰ درجه سلسیوس با سرعت ۴ درجه سلسیوس در هر دقیقه بود. دمای اتاقک تزریق ۲۹۰ درجه سلسیوس و دمای تشخیص ۳۰۰ درجه سلسیوس بود. از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۰/۸ میلی متر در دقیقه استفاده شد. شناساگر مورد استفاده نیز از نوع FID بود. میزان تزریق اسانس در این مطالعه، ۰/۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد. به منظور تعیین ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه خوشاریزه، از ستون از نوع HP5، با خصوصیات مشابه استفاده شد. دمای ابتدایی آون ۵۰ درجه سلسیوس و توقف در این دما به مدت ۲دقیقه و در نهایت افزایش دما تا ۲۹۰درجه سلسیوس با سرعت ۱۰ درجه سلسیوس در هر دقیقه و توقف در این دما به مدت ۲ دقیقه بود. دمای اتاقک تزریق ۳۰۰ درجه سلسیوس و دمای تشخیص ۲۰۰ درجه سلسیوس تنظیم گردید. از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۱ میلی متر در دقیقه استفاده شد. میزان تزریق اسانس در این مطالعه، ۴ میکرولیتر در نظر گرفته شد. طیف نگار جرمی مورد استفاده مدل Agilent 5973 با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سلسیوس بود. نرم افزار مورد استفاده Chemestation خواهد بود. شناسایی طیف ها به کمک شاخص بازداری کواتس (Kovats retention index=KI) و مقایسه‌ی آن‌ها با مقادیری که در کتب مرجع و مقالات و نیز با استفاده از طیف های جرمی ترکیبات استاندارد و اطلاعات موجود در کتابخانه رایانه‌ی GC/MS انجام شد (۱, ۱۴, ۱۹).

۲-٤- نمونه های ماهی

در این مطالعه تعداد ۳۰ نمونه ماهی قزل آلای رنگین کمان با وزن تقریبی ۲۰±۳۵۰ گرم از مراکز فروش ماهی در شهرکرد خریداری و در ظروف یونولیتی، به صورت یک لایه ماهی و یک لایه یخ، به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه های ماهی در آزمایشگاه تخلیه شکمی شدند و سر و دم آن ها قطع گردید. سپس نمونه ها به وسیله آب، کاملاً شسته و در نهایت مجددا توزین شدند (۲۵).

۲-۵- آماده سازی کیتوزان و تیمار بندی

کیتوزان با وزن مولکولی متوسط (ویسکوزیته ۸۰۰ cp- ۲۰۰) از شرکت سیگما (St. Louis, M.O. USA, CAS No 9012-76-4) خریداری شد. محلول کیتوزان با حل کردن ۱ درصد وزنی/حجمی از کیتوزان در اسید استیک ۱ درصد (مرک، آلمان) تهیه شد. به منظور نرم شدن و افزایش انعطاف پذیری پوشش، ۰/۷۵درصد (حجمی/حجمی) گلیسرول به عنوان نرم کننده به محلول اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط شد (۲۷). سپس محلول کیتوزان همراه با اسانس های خوشاریزه و مرزه بختیاری با غلظت های ۰/۰۶۲، ۰/۱۲۵ و ۰/۲۵ درصد تهیه شد. جدول ۱ تیمار های مورد استفاده در مطالعه حاضر را نشان می دهد.

جدول ۱. تیمار های ماهی مورد استفاده در مطالعه حاضر

شماره تیمار	پوشش کیتوزان	اسانس خوشاریزه (٪)	اسانس مرزه بختیاری (٪)
۱	–	–	–
۲	+	–	–
۳	+	۰/۰۶۲	۰/۰۶۲
٤	+	۰/۱۲۵	۰/۱۲۵
۵	+	۰/۲۵	۰/۲۵

به منظور پوشش دهی، نمونه ها به مدت ۱۰ ثانیه در محلول کیتوزان۱درصد غوطه ور شدند. جهت خشک شدن و تشکیل پوشش در سطح، نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در یخچال نگه‌داری شدند. سپس نمونه ها در کیسه های زیپ دار پلی اتیلنی بسته بندی و در یخچال (۴ درجه سلسیوس) قرار گرفتند.

۲-٦- اندازه گیری میزان ازت فرار تام

این آزمون در روزهای ۰، ۴، ۸، ۱۲ و ۱۶ پس از پوشش دهی و نگه‌داری نمونه های ماهی در یخچال انجام پذیرفت. به منظور اندازه گیری میزان ازت فرار تام (TVN) با استفاده از روش استاندارد ماکروکلدال به دنبال تقطیر ۱۰ گرم از نمونه در دستگاه تقطیر کلدال، ازت فرار جمع شده در بالن گیرنده حاوی ۲۵ میلی لیتر اسید بوریک ۲ درصد همراه با معرف متیل رد به علاوه بروموکروزول گرین، با استفاده از اسید سولفوریک ۰/۱ نرمال تیتراسیون شد و عدد به دست آمده در تیتراسیون در ضریب ثابت ۱۴ ضرب شد تا مقدار ازت فرار تام بر حسب میلی گرم ازت در ۱۰۰ گرم نمونه به دست آید (۲۷).

۲-۷- فعالیت ضد میکروبی اسانس ها

باکتری مورد استفاده برای آزمایش های میکروبی، لیستریا مونوسیتوژنز(ATCC 7644) بود که از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. میزان حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل میزان کشندگی باکتری ها (MBC) با استفاده از روش ریز رقت اندازه‌گیری شد. برای هر تست ۹ چاهک از پلیت الایزا در نظر گرفته شد و به هر کدام ۹۵ میکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون براث اضافه شد. سپس ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی معادل لوله ۰/۵ مک فارلند به همه چاهک‌ها اضافه شد. ابتدا باکتری مورد نظر جهت تهیه سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند به محیط کشت آبگوشت قلب و مغز (مرک، آلمان) منتقل شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه گذاری شد. سپس به هر کدام از چاهک ها ۱۰۰ میکرولیتر از رقت های متوالی اسانس های خوشاریزه و مرزه بختیاری (۰/۰۶۲، ۰/۱۲۵ و۰/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر) اضافه شد. یک چاهک صرفاً حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت و به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد و چاهک دیگر حاوی ۱۹۵ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث۱ و ۵

1- Muller Hinton Broth(MHB)

میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی بود که به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. پس از مخلوط کردن نمونه‌ها به وسیله همزن (۲۰ ثانیه ۳۰۰ دور در دقیقه)، نمونه ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در گرم‌خانه ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد و از نظر وجود یا عدم وجود کدورت مورد بررسی قرار گرفتند. سپس چاهک ها به صورت چشمی از نظر ایجاد یا عدم ایجاد کدورت بررسی شد و برای تایید، به میزان ۱۰ میکرولیتر از اولین چاهک شفاف، همراه با یک چاهک شفاف و کدر مجاور آن برداشته شد و پس از رقت سازی، به صورت سطحی در آگار مغذی کشت داده شد. رقت چاهک حاوی کمترین غلظت اسانس که موجب جلوگیری از رشد باکتری (عدم ایجاد کدورت) شد، به عنوان MIC در نظر گرفته شد. سپس از نمونه های چاهک های بدون کدورت روی محیط کشت مولر هینتون آگار پاساژ داده و میزان MBC نیز تعیین شد (۶).

۲-۸- تلقیح و شمارش لیستریا مونوسایتوژنز

برای تعیین میزان تلقیح باکتریایی مورد مطالعه، باکتری به محیط آبگوشت قلب و مغز اضافه و ۲ مرتبه متوالی در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه گذاری شد. سپس از کشت ۱۸ساعته دوم مقادیر مختلفی به سل های مخصوص دستگاه (کووت) حاوی ۵ میلی لیتر آبگوشت قلب و مغز سترون اضافه شد و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر جذب نوری آن‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین‌گردید. هم زمان با عمل فوق، نمونه برداری از محتویات لوله های کووت صورت گرفت و شمارش باکتریایی انجام شد. در نهایت لوله کووتی که حاوی ۱×۱۰۸ پرگنه در هر میلی لیتر بود، مشخص گردید. بدین ترتیب در هر بار انجام آزمایش با مشخص شدن جذب نوری معادل تقریبا ۱×۱۰۸ پرگنه در هر میلی لیتر که با کشت دادن سطحی نیز تایید شد، لوله کووت حاوی تقریبا ۱×۱۰۸ باکتری در هر میلی لیتر مشخص گردید (۲۵). سپس از این لوله رقت های ۱۰ تایی تهیه شد و سپس با استفاده از آزمون مک فارلند و با توجه به روش ارائه شده در مطالعه پیشین (۲۵، ۲۶) جهت به دست آوردن دوز تلقیح ۱۰۳ در این آزمایش استفاده شد. در نهایت تعداد ۱۰۳ عدد باکتری در گرم به همراه دوز های مختلف اسانس های خوشاریزه و مرزه بختیاری (۰/۰۶۲، ۰/۱۲۵ و۰/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر) و کیتوزان اضافه شد (۲۵). دوز های اسانس ها و کیتوزان بر اساس مقدار تعیین شده در ۱۰۰ گرم فیله ماهی محاسبه شد.سپس نمونه ها ماساژ داده شد تا از اختلاط کامل باکتری با فیله ماهی اطمینان حاصل شود. نمونه ها پس از اضافه کردن مواد فوق به صورت معمولی بسته بندی شد (زیپ پک) و در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۶ روز نگه‌داری شدند و در روزهای ۰، ۴، ۸، ۱۲ و ۱۶، از نظر تعداد کل باکتری لیستریا مونوسایتوژنز مورد مطالعه قرار گرفتند (۲۶). ابتدا ۱۰ گرم از نمونه ماهی در ۹۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژیک سترون ۰/۸۵ درصد قرار داده شد و به مدت ۱ دقیقه با استفاده از دستگاه استوماکر (Seward، انگلستان)، هموژن شد (رقت ۱-). سپس رقت های متوالی بعدی به صورت سریالی تهیه شدند. به منظور شمارش لیستریا مونوسایتوژنز، از محیط انتخابی کروموژنیک (Chrom agar, French) استفاده شد. نمونه رقیق شده روی محیط کشت به صورت سطحی کشت داده شد و و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شد. از هر رقت دو پلیت برای کشت استفاده شد. رنگ پرگنه‌های لیستریا مونوسایتوژنز روی این محیط، به رنگ آبی با هاله سفید است (۹، ۱۰).

۲-۹- ارزیابی حسی نمونه های ماهی قزل آلای رنگین کمان

بدین منظور، ۱۰ نفر پانلیست از بین متخصصان و کارشناسان گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد با دامنه‌ی سنی ۳۰ تا ۴۰ سال انتخاب و از روش مقیاس هدونیک پنج نقطه ای (۱ = بد، ۲ = ضعیف، ۳ = متوسط، ۴ = خوب و ۵ = بسیار خوب) برای ارزیابی حسی استفاده شد. نمونه‌های ماهی تیمار های مختلف در روغن آفتاب گردان مخصوص سرخ کردن (اویلا، ایران) در دمای ۲۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۵دقیقه سرخ شدند. به هر پانلیست ۵۰۰ گرم ماهی از هر تیمار در

ظروف مخصوص پلاستیکی شفاف بی‌رنگ که با کد سه رقمی تفکیک شده بود، در داده شد. آب تازه نیز به منظور نوشیدن بین هر مرحله تشخیص در دسترس پانل ها قرار گرفت. سپس پانل ها سه فاکتور عطر و طعم، بافت و پذیرش کلی ماهی را مورد ارزیابی قرار دادند. مراحل ارزیابی روی تمام تیمارها انجام شد و نمره ۵ /۲ (از ۵) به عنوان نقطه انقطاع برای پذیرش نمونه ها و پایان زمان ماندگاری محصول انتخاب گردید.

۲-۱۰-تجزیه و تحلیل آماری داده ها

تمام آزمایشات در ۳ تکرار انجام پذیرفت. داده های حاصل از هر آزمایش به صفحه گسترده اکسل منتقل شد. سپس تجزیه و تحلیل آماری نتایج با استفاده از نرم افزار آماری SPSS شماره ۱۹ انجام پذیرفت. ارزیابی آماری داده ها در قالب طرح فاکتوریل انجام شد. از آزمون های آماری تجزیه واریانس دو طرفه و دانکن به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده ها استفاده شد. در پایان، $P\ value \leq ۰/۰۵$ به عنوان حد معنی‌داری در نظر گرفته شد.

٤-نتایج و بحث

علی رغم ارزش تغذیه‌ای بالای ماهی قزل آلای رنگین‌کمان از نظر اسید های چرب و اسید های آمینه ضروری، پروتئین، ویتامین‌ها و مواد معدنی، گوشت ماهی حساسیت بالایی نسبت به شرایط فساد شیمیایی و میکروبی دارد. بنابراین اکثر مطالعات انجام پذیرفته در این زمینه تلاش در افزایش مدت زمان نگهداری و به تعویق افتادن فساد شیمیایی و میکروبی گوشت ماهی دارند. امروزه استفاده از فیلم های ضد میکروبی بر پایه کیتوزان به همراه اسانس های گیاهی تاثیرات بسیار خوبی روی افزایش ماندگاری و تعویق فساد ماهی داشته است. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی تاثیر اسانس گیاهان خوشاریزه و مرزه بختیاری و پوشش خوراکی کیتوزان بر میزان ازت فرار تام و هم‌چنین الگوی رشد باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* در طی مدت زمان نگه‌داری گوشت ماهی قزل آلای رنگین کمان در دمای یخچال انجام شد. دلیل انتخاب این دوگیاه دارویی به منظور تعویق در رشد باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* در گوشت ماهی قزل‌آلای رنگین کمان، سازگاری عطر و طعم این دو گیاه با ذائقه ایرانیان است. مردم ایران به شکل مداوم از این دو گیاه به عنوان خوشبو کننده در صنعت شیر و فراورده‌های آن و هم‌چنین به عنوان دمنوش های گیاهی استفاده می‌کنند. دلیل دیگر انتخاب این دو گیاه، اثرات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی بالای آن ها و عدم مشاهده‌ی مطالعات مشابه در این زمینه بود. دلیل انتخاب باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز*، ویزگی سرمادوست بودن آن که رشد آن را در شرایط یخچالی تضمین می‌کند و اختصاصیت بالای این باکتری به عنوان یکی از فلور های میکروبی گوشت ماهی بود. دلیل انتخاب ماهی قزل آلای رنگین کمان نیز ارزش تغذیه ای بالای آن، مصرف بالای آن در ایران و حساسیت زیاد گوشت این ماهی نسبت به فساد بود. جدول ۲ ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس گیاهان مرزه بختیاری و خوشاریزه را نشان می دهد. بر طبق نتایج بدست آمده از این جدول، در کل ۲۹ ترکیب شیمیایی معادل ۹۸/۷۲۷ درصد در اسانس گیاه مرزه بختیاری ردیابی شد. فراوان‌ترین ترکیبات شیمیایی ردیابی شده در اسانس گیاه مرزه بختیاری به ترتیب carvacrol (۳۱/۲۵ درصد)، thymol (۲۳/۵۰ درصد)، o-cymene (۱۳/۸۷درصد) و Gamma-terpinene (۱۰/۶۵ درصد) بودند. carvacryl acetate (۰/۰۸۹ درصد) ، alpha-humulene (۰/۰۱۸ درصد) و pinocamphone (۰/۱۲ درصد) کمترین فراوانی را در بین ترکیبات شیمیایی ردیابی شده در اسانس گیاه مرزه بختیاری داشتند. در کل ۳۳ ترکیب شیمیایی معادل ۹۹/۲۷ درصد در اسانس گیاه خوشاریزه ردیابی شد. فراوان ترین ترکیبات شیمیایی ردیابی شده در اسانس گیاه خوشاریزه به ترتیب ocimene (۴۴/۱۵درصد)، alpha-phellandrene (۱۶/۸۰ درصد)، gamma-terpinene (۸/۵۲ درصد) و beta-myrcene (۶/۰۸ درصد) بودند. 2,3-dimethyl-cyclohexa-1,3-diene (۰/۰۶ درصد)، 2-methyle-2-bornene (۰/۰۸ درصد) و 4-carvomenthenol (۰/۱۰ درصد) کمترین فراوانی را در بین ترکیبات شیمیایی ردیابی شده در اسانس گیاه خوشاریزه داشتند.

جدول ۲- ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس گیاهان مرزه بختیاری و خوشاریزه

مرزه بختیاری			خوشاریزه		
شماره	ترکیب شیمیایی	فراوانی (درصد)	شماره	ترکیب شیمیایی	فراوانی (درصد)
۱	Alpha-thujene	۰/۱۵	۱	2,3-dimethyl-cyclohexa-1,3-diene	۰/۰۶
۲	Alpha-pinene	۰/۹۱	۲	Alpha-thujene	۰/۱۵
۳	camphene	۰/۹۷	۳	Alpha-pinene	۳/۱٤
٤	beta-pinene	۰/۱۵	٤	Sabinen	۰/٤۸
۵	beta-myrcene	۰/٦۹	۵	Beta-pinene	۰/۳۳
٦	Alpha-phellandrene	۰/۱۵	٦	Beta-myrcene	٦/۰۸
۷	Alpha-terpinene	۱/٦۵	۷	Alpha-phellandrene	۱٦/۸۰
۸	o-cymene	۱۳/۸۷	۸	o-cymene	۳/۳٦
۹	Limonene	۰/٤٤	۹	Beta- phellandrene	۵/۹۱
۱۰	1,8-cineole	۰/۱۳	۱۰	Beta-ocimene	۱/٤۹
۱۱	Gamma-terpinene	۱۰/٦۵	۱۱	ocimene	٤٤/۱۵
۱۲	terpinolene	۰/۲۵	۱۲	Gamma-terpinene	۸/۵۲
۱۳	Linalool L	٤/۲٤	۱۳	terpinolene	1.72
۱٤	borneol l	٤/٤۰	۱٤	1,3,8-p-menthatriene	۰/٤۱
۱۵	pinocamphone	۰/۱۲	۱۵	verbenol	۰/۱۹
۱٦	Terpineol-4	۰/٦۸	۱٦	2,3-dihydro-2,2,6-trimethylbenzalhyde	۰/۲۵
۱۷	Geraniol formate	۰/۲۲	۱۷	pinocamphone	۰/٤۵
۱۸	Thymol	۲۳/۵۰	۱۸	4-carvomenthenol	۰/۱۰
۱۹	carvacrol	۳۱/۲۵	۱۹	Alpha.terpineol	۰/۲۹
۲۰	Thymyl acetate	۱/۰٤	۲۰	1,3,8-p-menthatriene	۰/۱۵
۲۱	Carvacryl acetate	۰/۰۸۹	۲۱	Cis-3-hexenyl 2-methylbutanoate	۰/۱۵
۲۲	Trans-caryophyllene	۳/۰٦	۲۲	Isovaleric acid,3-hexenyl ester	۰/۱۷
۲۳	aromadendrene	۰/۱۵	۲۳	Cis-citral	۰/۵٦
۲٤	Alpha-humulene	۰/۰۱۸	۲٤	carvone	۰/۳۲

۲۵	Ledene	۰/۱۳	۲۵	2-methyle-2-bornene	۰/۰۸
۲۶	Beta-bisabolene	۰/۱۸	۲۶	geraniol	۰/۱۵
۲۷	spathuleno	۰/۳۶	۲۷	citral	۰/۷۰
۲۸	Caryophyllene oxide	۱/۱۳	۲۸	thymol	۰/۱۱
۲۹	Limonene oxide,cis-	۰/۱۵	۲۹	carvacrol	۰/۱۱
			۳۰	methyleugenol	۰/۲۰
			۳۱	4-decanolide	۱/۰٤
کل		۹۸/۷۲۷	۳۲	bicyclogermacrene	۰/۲۰
			۳۳	Farnesyl alcohol	۱/٤۵
			کل		۹۹/۲۷

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اسانس های گیاهان خوشاریزه و مرزه بختیاری سرشار از ترکیبات با خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی است. فراوان‌ترین ترکیبات شیمیایی ردیابی شده در اسانس گیاه مرزه بختیاری کارواکرول، تیمول، اوسیمن و گاما ترپینن بودند. هم‌چنین فراوان‌ترین ترکیبات شیمیایی ردیابی شده در اسانس گیاه خوشاریزه اوسیمن، آلفا فلاندرن، گاما ترپینن و بتا میرسین بودند. خصوصیات ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی این ترکیبات در مطالعات گذشته به اثبات رسیده است (۱۸, ۲۹). Asghari و همکاران در سال ۲۰۱۳ (۴) بتا-اوسیمن (۶۷/۹۰ درصد)، ۲-فورانون (۶/۲۰ درصد) و میرسین (۶/۰۰ درصد) را به عنوان اصلی ترین ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس گیاه خوشاریزه معرفی نمودند. Avijgan و همکاران در سال ۲۰۰۶ (۵) بتا-اوسیمن (۴۹/۹۰ درصد)، گاما-دکالاکتون (۸/۴۰ درصد)، آلفا-پینن (۶ درصد) و لینالول (۵/۶ درصد) را به عنوان اصلی ترین ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس خوشاریزه معرفی نمودند. Hassanpouraghdam و همکاران در سال ۲۰۰۹ (۱۴) نشان دادند که اصلی ترین ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس گیاه خوشاریزه، بتا-اوسیمن (۳۸/۹۰ درصد)، آلفا-فلاندرن (۲۴/۲۰ درصد)، سیمن (۷/۴۰ درصد)، بتا-فلاندرن (۶/۳۰ درصد)، آلفا-پینن (۳/۴۰ درصد)، گاما-دکالاکتون (۱/۷۰ درصد) و لینالول (۱/۲۰ درصد) می باشند. Moein و همکاران در سال ۲۰۱۸ (۲۰)، تیمول (۶۵/۱۰ درصد)، گاما-ترپینن (۱۵/۰۰ درصد)، بتا-کاریوفیلن (۴/۸۵ درصد)، سیمن (۴/۴۰ درصد)، لنالول (۳/۵۰ درصد) و بومئول (۳/۰۵ درصد) را به عنوان اصلی ترین ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس مرزه بختیاری گزارش نمودند. مطالعات انجام پذیرفته در سال‌های پیشین(۲۳, ۲۴) نشان می دهد که کارواکرول و تیمول به ترتیب با فراوانی ۱۹ تا ۶۷ درصد و ۰/۳ تا ۲۰ درصد، فراوان ترین ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس گیاه مرزه بختیاری بودند. در این ارتباط، Ahanjan و همکاران در سال ۲۰۱۴ (۲) مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس گیاه مرزه بختیاری را فنول (۳۷/۳۶ درصد)، تیمول (۲۲/۶۵ درصد)، سیمن (۱۹/۲۹ درصد)، تریپینن (۵/۰۱ درصد)، لینالول (۴/۹۲ درصد) و کاریوفیلن (۲/۱۹ درصد) گزارش نمودند. دلیل احتمالی اختلاف در نوع و فراوانی ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس‌های گیاهان دارویی مرزه بختیاری و خوشاریزه گزارش شده در مطالعات مختلف، تفاوت در منطقه جغرافیایی، میزان بارندگی و رطوبت نسبی، تنوع آب و هوایی، فاصله از سطح دریا، طول

شب و روز و جنس خاک می‌باشد. جدول ۳ میزان MIC و MBC اسانس های گیاهان مرزه بختیاری و خوشاریزه را روی باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* نشان می دهد. برطبق نتایج بدست آمده از این جدول، میزان MIC و MBC اسانس گیاه خوشاریزه از اسانس گیاه مرزه بختیاری به مراتب بیشتر بود که نشان دهنده خصوصیات ضد باکتریایی بالاتر اسانس مرزه بختیاری است.

جدول ۳- میزان MIC و MBC اسانس های گیاهان مرزه بختیاری و خوشاریزه بر علیه باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز*

نوع اسانس	MIC (میلی گرم بر میلی لیتر)	MBC (میلی گرم بر میلی لیتر)
مرزه بختیاری	۰/۰۶۲	۰/۱۲۵
خوشاریزه	۰/۱۲۵	۰/۲۵

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان MIC و MBC اسانس گیاه مرزه بختیاری برای باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* به ترتیب ۰/۰۶۲ و ۰/۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر بود. هم‌چنین میزان MIC و MBC اسانس گیاه خوشاریزه برای باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* به ترتیب ۰/۱۲۵ و ۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر بود. بنابراین گیاه مرزه بختیاری اثرات ضد میکروبی به مراتب بیشتری نسبت به گیاه خوشاریزه داشت. دلیل این یافته احتمالاً حضور ترکیبات با خاصیت ضد میکروبی بیشتر در مورد مرزه بختیاری است. جدول ۴ تغییرات تعداد باکتری های *لیستریا مونوسایتوژنز* در فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان در تیمار های مختلف در طی زمان نگه‌داری در دمای ۴ درجه سلسیوس را نشان می‌دهد. بر طبق نتایج بدست آمده از این جدول، تعداد باکتری های *لیستریا مونوسایتوژنز* در همه تیمار های ماهی افزایش پیدا کرد که در برخی از تیمار ها معنی دار بود ($P \leq ۰/۰۵$). نمونه های شاهد بیشترین تعداد باکتری و نمونه های تیمار شده با کیتوزان و اسانس‌های خوشاریزه (۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر) و مرزه بختیاری (۰/۲۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)کمترین تعداد باکتری را در تمامی روزه های مورد مطالعه داشتند. بیشترین تعداد باکتری‌های *لیستریا مونوسایتوژنز* در روز ۱۶ نگه‌داری در نمونه های ماهی شاهد (۱۱/۰۰ ± ۰/۱۰ Log CFU/g) و کم ترین تعداد باکتری‌ها در نمونه‌های ماهی تیمار شده با کیتوزان و اسانس های خوشاریزه (۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر) و مرزه بختیاری (۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر) (۸/۰۲ ± ۰/۰۲ Log CFU/g) بود.

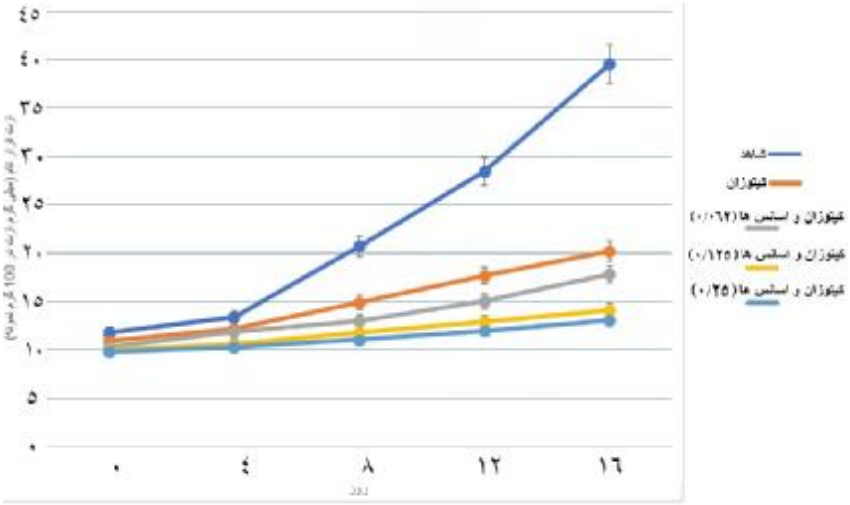
جدول ٤- تغییرات تعداد باکتری های *لیستریا مونوسایتوژنز* در فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان در تیمار های مختلف در طی زمان نگه‌داری در دمای ٤ درجه سلسیوس

تیمار (میلی گرم بر میلی لیتر)	میانگین ± انحراف معیار تعداد کلنی های *لیستریا مونوسایتوزنز* در روز های مختلف (Log CFU/g)				
	۰	٤	۸	۱۲	١٦
شاهد	۲/۹۸ ± ۰/۰۳ ^{Ae}	٥/٥٦ ± ۰/۰٥ ^{Ad}	۷/۳۲ ± ۰/۱۱ ^{Ac}	۹/۱۸ ± ۰/۱۳ ^{Ab}	۱۱/۰۰ ± ۰/۱۰ ^{Aa}
کیتوزان	۲/۹٤ ± ۰/۰۲ ^{Ac}	٤/٦۹ ± ۰/۰۸ ^{Bb}	٦/۹۰ ± ۰/۰٤ ^{Ba}	۷/٥۹ ± ۰/۰۷ ^{Ba}	۸/۳۲ ± ۰/۰۳ ^{Ba}
کیتوزان و اسانس ها (۰/۰٦۲)	۲/۹۲ ± ۰/۰٥ ^{Ae}	٤/٤۳ ± ۰/۰٦ ^{Cd}	٦/٤٥ ± ۰/۰۸ ^{Cc}	۷/۳۸ ± ۰/۰٦ ^{Cb}	۸/۱۰ ± ۰/۰٥ ^{Ca}
کیتوزان و اسانس ها (۰/۱۲٥)	۲/۹۱ ± ۰/۰۲ ^{Ae}	٤/۳٥ ± ۰/۰۲ ^{Cd}	٦/۳۰ ± ۰/۰٦ ^{Cc}	۷/۲۷ ± ۰/۱۰ ^{Db}	۸/۰۲ ± ۰/۰۲ ^{Ca}
کیتوزان و اسانس ها (۰/۲٥)	۲/۸٥ ± ۰/۰۲ ^{Ac}	٤/۰۰ ± ۰/۰۱ ^{Db}	٥/٥۲ ± ۰/۰۷ ^{Da}	٦/۱۷ ± ۰/۰۸ ^{Ea}	٦/۹۷ ± ۰/۰٤ ^{Da}

*حرف بزرگ غیر یکسان در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنادار در حد $P \leq ۰/۰۵$ می باشند.

*حرف کوچک غیر یکسان در هر ردیف نشان دهنده اختلاف آماری معنادار در حد $P \leq ۰/۰۵$ می باشند.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تعداد باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* در نمونه های ماهی قزل آلای رنگین کمان نگه‌داری شده در یخچال در همه تیمارها به مرور زمان افزایش پیدا کرد اما این افزایش تعداد باکتری‌ها در نمونه های ماهی شاهد بیشتر و در نمونه‌های ماهی تیمار شده با کیتوزان و اسانس های مرزه بختیاری (۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر) و خوشاریزه (۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر) کمتر از سایر تیمارها بود. نتایج نشان دهنده اثر مستقیم غلظت اسانس روی تعداد *لیستریا مونوسایتوژنز* در نمونه‌های ماهی قزل‌آلای رنگین کمان می باشد. حضور کیتوزان نیز در مقایسه با نمونه های شاهد سبب کاهش تعداد باکتری‌های *لیستریا مونوسایتوژنز* شد. خاصیت ضد باکتریایی کیتوزان، مربوط به وجود بار مثبت مولکول های آن و نتیجه ی واکنش با ملکول‌های با بار منفی غشای سلول باکتری می‌باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که خاصیت ضد میکروبی کیتوزان در اثر استفاده از اسانس های مرزه بختیاری و خوشاریزه به صورت سینرژیستی افزایش پیدا کرد. بنابراین استفاده توام از هر دو اسانس در غلظت ۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر به همراه پوشش کیتوزان بهترین تاثیر را روی جمعیت میکروبی *لیستریا مونوسایتوژنز* در ماهی قزل آلای رنگین کمان داشت. Soleimanpour Ahmadi و همکاران در سال ۲۰۱۶ (۲۶) اقدام به مطالعه تأثیر نانوذرهٔ کیتوزان و عصارهٔ آویشن شیرازی نانوکپسوله شده در فساد میکروبی فیلهٔ ماهی قزل آلای تلقیح شده با باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* پرداختند. نتایج این تحقیق نشان داد که نمونه‌های ماهی شاهد دارای بیشترین تعداد باکتری های *لیستریا مونوسایتوژنز* بودند و نمونه های تیمار شده با کیتوزان (۰/۲۵ درصد) کمترین تعداد باکتری های *لیستریا مونوسایتوژنز* را داشتند. نتایج این تحقیق همانند نتایج مطالعه حاضر نشان داد که استفاده توام از اسانس گیاه دارویی (آویشن) به همراه کیتوزان سبب کاهش معنی‌دار در تعداد باکتری‌های *لیستریا مونوسایتوژنز* در فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان شد. Ekhtiarzadeh و همکاران نیز در مطالعه ای مشابه در سال ۲۰۱۲ (۹) گزارش نمودند که اسانس گیاه آویشن شیرازی دارای اثری معنی دار در ممانعت از رشد *لیستریا منوسایتوژنز* در ماهی شور در طول نگه‌داری در دمای یخچال بود. در این ارتباط افزایش غلظت اسانس تا ۰/۴۰۵ درصد سبب افزایش معنادار اثرات ضد لیستریایی اسانس شد. در این مطالعه افزودن اسانس سبب بهبود خصوصیات ارگانولپتیکی ماهی شور شد. اثرات مشابه همچنین در استفاده از اسانس گیاهان دارویی گشنیز (۳)، زیره (۱۰) و اکالیپتوس(۲۵) گزارش شده است. با این وجود تاکنون اثرات ضد لیستریایی مرزه بختیاری و خوشاریزه مطالعه نشده است. شکل ۱ میزان ازت فرار تام تیمارهای مختلف ماهی در طی ۱۶ روز نگه‌داری در یخچال را نشان می دهد. بر طبق نتایج بدست آمده از این شکل، میزان ازت فرار تام در همه تیمار ها در طی مدت زمان نگه‌داری افزایش یافت. با این وجود، افزایش میزان ازت فرار تام در تیمار شاهد بیشتر از سایر نمونه ها بود ($P \leq ۰/۰۵$). افزایش میزان ازت فرار تام در نمونه های ماهی قزل آلای تیمار شده با کیتوزان و اسانس های مرزه بختیاری و خوشاریزه (با غلظت های ۰/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر) در همه روز های مورد مطالعه کمتر از سایر تیمارها بود. با این وجود هیچ گونه اختلاف آماری معنی‌داری برای میزان ازت فرار تام بین تیمار های ترکیبی کیتوزان و اسانس ها دیده نشد.



شکل ۱-تغییرات میزان ازت فرار تام تیمار های مختلف ماهی در طی ۱۶ روز نگه‌داری در یخچال

ویژگی مهم باکتری های سرمادوست مانند *لیستریا مونوسایتوژنز*، توانایی تولید آنزیم‌های پروتئولیتیک و لیپولیتیک قوی و سرعت تکثیر آن‌ها در زمان کوتاه است(۲۲). تجزیه پروتئین ها که بوسیله این دسته از باکتری در ماهی و سایر فراورده‌های دریایی صورت می‌پذیرد سبب افزایش تولید ازت فرار تام می شود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از کیتوزان به صورت توام با اسانس‌های خوشاریزه و مرزه بختیاری سبب کاهش تعداد *لیستریا مونوسایتوژنز* و در پی آن کنترل تولید ازت فرار تام شد. بیشترین میزان ازت فرار تام در نمونه های ماهی شاهد ردیابی شد که نشان دهنده فعالیت بیشتر باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* در این نمونه‌ها بود.

جداول ۵ تا ۷ میانگین امتیازات ارزیابان حسی به ترتیب به خصوصیات عطر و طعم، بافت و پذیرش کلی تیمارهای مختلف ماهی در طی مدت زمان نگه‌داری در یخچال را نشان می‌دهد. بر طبق نتایج بدست آمده از این جداول، میانگین امتیازات حسی داده شده با تمامی خصوصیات ارگانولپتیک در همه تیمارها در طول مدت زمان نگه‌داری ۱۶روزه در یخچال، کاهش پیدا کرد. میزان کاهش امتیازات حسی برای نمونه های شاهد بیشتر از سایر تیمارها بود ($P\leq$ ۰/۰۵). میانگین میزان کاهش امتیازات حسی برای نمونه‌های ماهی تیمار شده با کیتوزان و اسانس های خوشاریزه (۰/۲۵ درصد) و مرزه بختیاری (۰/۲۵ درصد) کمتر از سایر تیمارها بود ($P \leq$ ۰/۰۵).

جدول ۵- میانگین امتیازات ارزیابان حسی به عطر و طعم تیمارهای مختلف ماهی در طی مدت زمان نگه‌داری در یخچال

تیمار (میلی گرم بر میلی لیتر)	میانگین ± انحراف معیار امتیازات عطر و طعم در روز های مختلف				
	۰	۴	۸	۱۲	۱۶
شاهد	۴/۳۵ ± ۰/۲۱ ^{Ba}	۴/۰۳ ± ۰/۲۳ ^{Db}	۳/۵۱ ± ۰/۲۵ ^{Ec}	۳/۰۸ ± ۰/۲۲ ^{Ed}	۲/۶۰ ± ۰/۲۰ ^{De}
کیتوزان	۴/۴۷ ± ۰/۱۸ ^{Ba}	۴/۲۰ ± ۰/۱۹ ^{Cb}	۳/۸۴ ± ۰/۲۱ ^{Dc}	۳/۴۹ ± ۰/۱۷ ^{Dd}	۳/۱۷ ± ۰/۲۵ ^{Cd}
کیتوزان و اسانس ها (۰/۰۶۲)	۴/۵۹ ± ۰/۱۴ ^{Aa}	۴/۳۱ ± ۰/۲۰ ^{Cb}	۴/۰۲ ± ۰/۱۶ ^{Cc}	۳/۷۵ ± ۰/۱۸ ^{Cd}	۳/۳۲ ± ۰/۲۰ ^{Ce}
کیتوزان و اسانس ها (۰/۱۲۵)	۴/۷۱ ± ۰/۲۶ ^{Aa}	۴/۵۵ ± ۰/۱۷ ^{Bb}	۴/۳۰ ± ۰/۱۴ ^{Bc}	۴/۰۰ ± ۰/۲۴ ^{Bd}	۳/۵۹ ± ۰/۲۲ ^{Be}
کیتوزان و اسانس ها (۰/۲۵)	۴/۸۸ ± ۰/۱۲ ^{Aa}	۴/۷۳ ± ۰/۱۶ ^{Aa}	۴/۵۸ ± ۰/۲۰ ^{Ab}	۴/۳۳ ± ۰/۱۳ ^{Ac}	۴/۰۴ ± ۰/۲۴ ^{Ad}

*حرف بزرگ غیر یکسان در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در حد $P \leq$ ۰/۰۵ می باشند.

*حرف کوچک غیر یکسان در هر ردیف نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار در حد $P \leq$ ۰/۰۵ می باشند.

جدول ٦- میانگین امتیازات ارزیابان حسی به بافت تیمار های مختلف ماهی در طی مدت زمان نگه‌داری در یخچال

تیمار (میلی گرم بر میلی لیتر)	میانگین ± انحراف معیار امتیازات بافت				
	۰	٤	۸	۱۲	١٦
شاهد	٤/٥٠ ± ۰/۱۰ ^{Aa}	٤/۱۸ ± ۰/۱٤ ^{Bb}	۳/۷۱ ± ۰/۲۰ ^{Cc}	۳/۳۰ ± ۰/۱۷ ^{Cd}	۳/۰۰ ± ۰/۲۳ ^{De}
کیتوزان	٤/٥٦ ± ۰/۱٤ ^{Aa}	٤/۳۱ ± ۰/۲۰ ^{Ab}	٤/۰۷ ± ۰/۱۷ ^{Bc}	۳/۷٦ ± ۰/۲۰ ^{Bd}	۳/٤٥ ± ۰/۱۷ ^{Ce}
کیتوزان و اسانس ها (۰/۰٦۲)	٤/٥۲ ± ۰/۱۱ ^{Aa}	٤/٤۲ ± ۰/۱۷ ^{Aa}	٤/۲۳ ± ۰/۱۸ ^{Ab}	٤/۰٤ ± ۰/۱۹ ^{Ac}	۳/۸۲ ± ۰/۲۱ ^{Bd}
کیتوزان و اسانس ها (۰/۱۲٥)	٤/٥۳ ± ۰/۱۲ ^{Aa}	٤/٤٤ ± ۰/۱٥ ^{Aa}	٤/۲۸ ± ۰/۲۱ ^{Ab}	٤/۱۲ ± ۰/۱٥ ^{Ac}	۳/۹۳ ± ۰/۱۸ ^{Bc}
کیتوزان و اسانس ها (۰/۲٥)	٤/٥٥ ± ۰/۱۳ ^{Aa}	٤/٤۸ ± ۰/۱۱ ^{Aa}	٤/۳۳ ± ۰/۱۲ ^{Aa}	٤/۱۹ ± ۰/۱٦ ^{Ab}	٤/۰۸ ± ۰/۲۰ ^{Ab}

*حرف بزرگ غیر یکسان در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در حد $P \leq$ ۰/۰۵ می باشند.

*حرف کوچک غیر یکسان در هر ردیف نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در حد $P \leq$ ۰/۰۵ می باشند.

جدول ۷-میانگین امتیازات ارزیابان حسی به پذیرش کلی تیمار های مختلف ماهی در طی مدت زمان نگه‌داری در یخچال

تیمار (میلی گرم بر میلی لیتر)	میانگین ± انحراف معیار امتیازات پذیرش کلی				
	۰	٤	۸	۱۲	١٦
شاهد	٤/٤۲ ± ۰/۱۲ ^{Aa}	٤/۱۰ ± ۰/۱۷ ^{Cb}	۳/۸۲ ± ۰/۲۱ ^{Dc}	۳/۳۱ ± ۰/۲۱ ^{Ed}	۲/۹۳ ± ۰/۲۲ ^{Ee}
کیتوزان	٤/٥۰ ± ۰/۱۷ ^{Aa}	٤/۲۷ ± ۰/۱٤ ^{Bb}	٤/۰۲ ± ۰/۲۲ ^{Cc}	۳/۷٦ ± ۰/۱۷ ^{Dd}	۳/٥۲ ± ۰/۲۰ ^{De}
کیتوزان و اسانس ها (۰/۰٦۲)	٤/٥٥ ± ۰/۱۳ ^{Aa}	٤/۳۹ ± ۰/۱٦ ^{Ab}	٤/۱۹ ± ۰/۲٥ ^{Bc}	۳/۹٤ ± ۰/۲۳ ^{Cd}	۳/۷۰ ± ۰/۱۸ ^{Cd}
کیتوزان و اسانس ها (۰/۱۲٥)	٤/٦۰ ± ۰/۱٥ ^{Aa}	٤/٤٥ ± ۰/۱۸ ^{Ab}	٤/۳۲ ± ۰/۲۰ ^{Ab}	٤/۰۷ ± ۰/۱۳ ^{Bc}	۳/۹۰ ± ۰/۱٦ ^{Bd}
کیتوزان و اسانس ها (۰/۲٥)	٤/۷۰ ± ۰/۱۰ ^{Aa}	٤/٥۸ ± ۰/۱٥ ^{Aa}	٤/٤۱ ± ۰/۲۳ ^{Ab}	٤/۲٦ ± ۰/۱۷ ^{Ac}	٤/۰۳ ± ۰/۲۰ ^{Ad}

*حرف بزرگ غیر یکسان در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در حد $P \leq$ ۰/۰۵ می باشند.

*حرف کوچک غیر یکسان در هر ردیف نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در حد $P \leq$ ۰/۰۵ می باشند.

نتایج ارزیابی حسی نشان داد که ارزیابان حسی بیشترین میزان امتیازات مربوط به عطر و طعم، بافت و پذیرش کلی در همه روزهای انجام آزمون را به نمونه های ماهی قزل آلای رنگین کمان تیمار شده با کیتوزان و اسانس‌های خوشاریزه (۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر) و مرزه بختیاری (۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر) دادند ($P \leq ۰/۰۵$). بنابراین به نظر می‌رسد که استفاده از کیتوزان و اسانس‌های خوشاریزه (۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر) و مرزه بختیاری (۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر) نه تنها موجب به تعویق افتادن فساد ناشی از باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* نمونه های فیله ماهی نمی شود بلکه منجر به افزایش و همچنین حفظ خصوصیات ارگانولپتیک نمونه‌های فیله ماهی می شود. احتمالا عطر و طعم خوشاریزه و مرزه بختیاری که مورد پسند و مطابق با ذائقه اکثر ایرانیان است سبب شده تا امتیازات داده شده به خصوصیات عطر و طعم و پذیرش کلی نمونه ها ماهی افزایش یابد. هم‌چنین جلوگیری از بروز فساد میکروبی و نرم شدن بیش از حد نمونه‌های فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان تیمار شده با کیتوزان و اسانس‌های خوشاریزه (۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر) و مرزه بختیاری (۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر) سبب شده است تا ارزیابان حسی امتیاز بالاتری برای فاکتور بافت به این نمونه های ماهی اختصاص دهند. در اکثر مطالعات انجام شده در این زمینه نیز ارزیابان حسی امتیازات بالاتری به خصوصیات ارگانولپتیک نمونه های ماهی تیمار شده با اسانس های طبیعی نسبت به سایر تیمارها، داده‌اند (۳, ۹, ۱۰, ۲۵, ۲۶).

٤-نتیجه گیری

بررسی حاضر احتمالاً اولین مطالعه در زمینه استفاده از اسانس های خوشاریزه و مرزه بختیاری همراه با پوشش کیتوزان به منظور کنترل جمعیت میکروبی *لیستریا مونوسایتوژنز* در ماهی قزل آلای رنگین کمان نگه‌داری شده در یخچال می باشد. نتایج این تحقیق نشان دهنده حضور ترکیبات با خصوصیات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی در اسانس استحصال شده از گیاهان خوشاریزه و مرزه بختیاری می باشد. اثرات ضد میکروبی اسانس مرزه بختیاری در مقایسه با خوشاریزه بیشتر بود و موجب کاهش حداقل غلظت مهارکننده رشد و کشندگی باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* شد. تعداد پرگنه‌های *لیستریا مونوسایتوژنز* در طی زمان نگه‌داری در همه تیمارها افزایش یافت اما این میزان افزایش تعداد باکتری ها در نمونه های شاهد بیشتر و در نمونه های تیمار شده با کیتوزان و اسانس های خوشاریزه (۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر) و مرزه بختیاری (۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر) از سایر تیمارها کمتر بود. کنترل جمعیت باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* در نمونه های ماهی تیمار شده با کیتوزان و اسانس های خوشاریزه (۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر) و مرزه بختیاری (۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر) سبب کنترل میزان تولید ازت فرار تام در نمونه های ماهی شد. بنابراین بیشترین و کم‌ترین میزان تولید ازت فرار تام به ترتیب در نمونه های ماهی شاهد و نمونه های ماهی تیمار شده با کیتوزان و اسانس‌های خوشاریزه (۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر) و مرزه بختیاری (۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر) دیده شد. همچنین ارزیابان حسی بیشترین میزان امتیازات به فاکتور های عطر و طعم، بافت و پذیرش کلی در تمام روز های انجام آزمون را به نمونه های ماهی تیمار شده با کیتوزان و اسانس های خوشاریزه (۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر) و مرزه بختیاری (۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر) دادند. بنابراین استفاده از کیتوزان و اسانس های خوشاریزه و مرزه بختیاری در غلظت ۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر می تواند موجب تعویق در روند فساد میکروبی حاصل از باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* در نمونه های ماهی قزل آلای رنگین کمان شود.

٥- سپاسگزاری

نویسندگان مطالعه حاضر کمال تشکر و قدردانی را از پرسنل مرکز تحقیقات تغذیه و محصولات ارگانیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرددارند.مطالعه حاضر برگرفته از پایان نامه مقطع دکتری تخصصی در رشته بهداشت مواد غذایی در دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد می باشد. بنابراین از معاونت پژوهش

و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد کمال تشکر و قدردانی می گردد.

٦-منابع

1. Adams, R.P. and Sparkman, O.D. 2007. Review of Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4 ed: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois.
2. Ahanjan, M., Ghaffari, J. and Hagi, F.M. 2014. Antibacterial Activity and Chemical Composition of Medicinal Plant Satureja bakhtiarica Bung against Multi Drug-Resistant Acinetobacter baumannii [ESBL]. *Peak Journal of Medicinal Plant Research*, 2(1):13-7.
3. Alimoradian, Z., Roomiani, L. and Tadayoni, M. 2019. The effect of antioxidant and antimicrobial of Coriandrum sativum essential oil on shelf life of Otolithes ruber fillets at 4 ºC. *JFST 15(85).*
4. Asghari, G.R., Sajjadi, S.E., Sadraei, H. and Yaghobi, K. 2010. Essential oil constituents of Echinophora platyloba DC. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2(3):185-6.
5. Avijgan, M., Hafizi, M., Saadat, M. and Nilforoushzadeh, M.A. 2006. Antifungal effect of Echinophora platyloba's extract against Candida albicans. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 5(4):285-9.
6. Chaleshtori, R.S., Rokni, N., Razavilar, V. and Kopaei, M.R. 2013. The evaluation of the antibacterial and antioxidant activity of Tarragon (Artemisia dracunculus L.) essential oil and its chemical composition. J*undishapur Journal of Microbiology*, 6(9).
7. Çoban, Ö.E., Patir, B. and Yilmaz, Ö. 2014. Protective effect of essential oils on the shelf life of smoked and vacuum packed rainbow trout (Oncorhynchus mykiss W. 1792) fillets. *Journal of food science and technology*, 51(10):2741-7.
8. Commission, B.P. British Pharmacopoeia London Bernan Press (PA); 1988.
9. Ekhtiarzadeh, H., Akhondzadeh Basti, A., Misaghi, A., Ebrahimzadeh Mousavi, H., Bokaei, S., Taherkhani, P. et al. 2012. Effect of Zataria multiflora on Listeria monocytogenes manner on Salted fish. *Medicinal Plants forum*, 10(4):89-96.
10. Fazlara, A., Sadeghi, E. and Rostami, S.P. 2012. Study on the antibacterial effects of Cuminum cyminum essential oil on Listeria monocytogenes in Iranian white cheese. 9. 35:35-44.
11. Fernandes, P. 2016. Enzymes in fish and seafood processing. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 4:59.
12. Ghasemi Pirbalouti, A. and Dadfar, S. 2013. Chemical constituents and antibacterial activity of essential oil of Satureja bachtiarica (Lamiaceae). *Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research*. 70(5):933-8.
13. Giuffrida, A., Giarratana, F., Valenti, D., Muscolino, D., Parisi, R., Parco, A. et al. 2017. A new approach to predict the fish fillet shelf-life in presence of natural preservative agents. *Italian journal of food safety*, 6(2):6768.
14. Hassanpour Aghdam, M.B., Shalamzari, M.S., and Sepehri, N. 2009. GC/MS analysis of Echinophora platyloba DC. essential oil from Northwest Iran: a potential source of (Z)-β-ocimene and α-phellandrene. *chemija*. 20(2).
15. Hosseini, Z., Lorigooini, Z., Rafieian-Kopaei, M., Shirmardi, H.A. and Solati, K. 2017. A review of botany and pharmacological effect and chemical composition of Echinophora species growing in Iran. *Pharmacognosy research*, 9(4):305.
16. in't Veld, J.H.H. 1996. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International journal of food microbiology*, 33(1):1-18.
17. Jeyakumari, A., Ninan, G., Joshy, C., Parvathy, U., Zynudheen, A. and Lalitha, K. 2016. Effect of chitosan on shelf life of restructured fish products from pangasius (pangasianodon hypophthalmus) surimi during chilled storage. *Journal of food science and technology*, 53(4):2099-107.
18. Mahdian, F., Mahboubi, M., Rahimi, E. and Shad, M.M. 2017. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Echinophora platyloba essential oil. *Infectio*. 21(3):176-81.
19. McLafferty, W. Wiley registry of mass spectral data 9th/NIST 08. 9 ed2009.
20. Moein, M., Karami, F., Tavallali, H. and Ghasemi, Y. 2012. Chemical Composition of the Essential oil of Satureja bachtiarica Bunge. from Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 8(4):277-81.
21. Rodrigues, B.L., da Cruz Silva, A.C.V., da Costa, M.P., da Silva, F.A., Máralém, E.T. and Conte-Junior, C.A. 2017. Fatty acid profiles of five farmed Brazilian freshwater

fish species from different families. PloS one. 12(6):e0178898.
22. Sallam, K.I. 2007. Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Food Control*. 18(5):566-75.
23. Sefidkon, F., Jamzad, Z. and Barazandeh, M. 2005. Essential oil of Satureja bachtiarica Bunge, A potential source of carvacrol. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 4:425-39.
24. Sefidkon, F., Sadeghzadeh, L., Teymouri, M., Asgari, F. and Ahmadi, S. 2007. Antimicrobial effects of the essential oils of two Satureja species (S. Khuzistanica Jamzad and S. bachtiarica Bunge) in two harvesting time.
25. Sharafati Chaleshtori, R., Taghizadeh, M., Khanalizadeh, A., Hesami, S., Heidaryan, Z., Sahebjami, P. et al. 2016. The effects of chitosan incorporated with eucalyptus and cuminum essential oils on storage time of oncorhynchus mykiss. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*.25(133):151-60.
26. Soleimanpour Ahmadi, H., Manouchehri, H. and Safari, R. 2015. Study the effect of chitosan nano particle and nano capsulated essential oil of Zataria multiflora on microbial spoilage of fillet of Onchorhynchus mykiss inoculated by Listeria monocytogene. Shilat, *Journal of Natural Resources of Iran*. 68(4):577-87.
27. Souza, B.W., Cerqueira, M.A., Ruiz, H.c.A., Martins, J.T., Casariego, A., Teixeira, J.A. et al. 2010. Effect of chitosan-based coatings on the shelf life of salmon (Salmo salar). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(21):11456-62.
28. Tilami, S.K., Sampels, S., Zajíc, T., Krejsa, J., Másílko, J. and Mráz, J. 2018. Nutritional value of several commercially important river fish species from the Czech Republic. PeerJ. 6:e5729.
29. Zomorodian, K., Ghadiri, P., Saharkhiz, M.J., Moein, M.R., Mehriar, P., Bahrani, F. et al. 2015. Antimicrobial activity of seven essential oils from Iranian aromatic plants against common causes of oral infections. *Jundishapur journal of microbiology*, 8(2): e17766.

(Original Research Paper)

Study the Antibacterial Properties of *Echinophora Platyloba* and *Satureja Bachtiarica* Essential Oils and Chitosan Edible Coating on *Listeria Monocytogenes* in Rainbow Trout Fillet

Elham Fathimoghaadam[1], Amir Shakerian[1*], Reza Sherafati Chaleshtouri[2], Ebrahim Rahimi[1]

1-Research Center of Nutrition and Organic Products, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2-Department of Nutrition, Biochemistry and Nutrition Research Center in Metabolic Disorders, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran.

Received:07/10/2019 Accepted:08/01/2020

Abstract

Present study was done to evaluate the antimicrobial effect of chitosan and *Echinophora platyloba* and *Satureja bachtiarica* essential oils on *Listeria monocytogenes* in Rainbow trout. Essential oil extraction was done from the aerial parts of *E. platyloba* and *S. bachtiarica* plants. Minimum inhibitory concentration bacterial concentration of essential oils against bacterium were evaluated by microdilution method. Fish samples were coated using chitosan, *E. platyloba* (0.062, 0.125 and 0.25 mg/ml) and *S. bachtiarica* (0.062, 0.125 and 0.25 mg/ml) essential oils. *L. monocytogenes* (1×10^3 cfu/g) was inoculated into fish samples and was evaluated during 16 days at refrigerator temperature. The most frequent components detected in *S. bachtiarica* essential oil were carvacrol (31.25%), thymol (23.50%), o-cymene (13.87%) and Gamma-terpinene (10.65%). The most frequent components detected in *E. platyloba* essential oil were ocimene (44.15%), alpha-phellandrene (16.80%), gamma-terpinene (8.52%) and beta-myrcene (6.08%). Amount of MIC (0.062 mg/ml) and MBC (0.125 mg/ml) of *S. bachtiarica* was lower than *E. platyloba* essential oil. *L. monocytogenes* was increased in all treatments. The highest number of bacteria in 16th day of maintenance was related to control fish samples and the lowest number was related to chitosan, *S. bachtiarica* (0.25 mg/ml) and *E. platyloba* (0.25 mg/ml) essential oils (8.02±0.02 cfu/g) groups. Total volatile nitrogen in control treatment was higher than other samples ($P \leq 0.05$). Chitosan and *S. bachtiarica* (0.25 mg/ml) and *E. platyloba* (0.25 mg/ml) essential oils had highest sensory scores related to flavor and odor, texture and overall acceptance factors. Use of chitosan, *S. bachtiarica* and *E. platyloba* essential oils caused controlling number of *L. monocytogenes* and total volatile nitrogen and improvement of organoleptic characteristics of samples.

Keywords: Rainbow trout, Chitosan, *Echinophora platyloba*, *Satureja bachtiarica*, *Listeria monocytogenes*.

*Corresponding Author: Amshakerian@yahoo.com