مطالعه اثر الحاق *لاکتوکوکوس لاکتیس* بر ماندگاری فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان در شرایط یخچالی

اسد عباس پور انبی[1]، ودود رضویلر[1*]، مسلم نیریز نقدهی[2]، یوسفعلی اسدپور اصالو[3]

۱. گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران.

۳. مرکز تحقیقات آرتمیای کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، ارومیه، ایران.

***نویسنده مسئول:** *vrazavi@ut.ac.ir*

تاریخ دریافت:۱۳۹۸/۰۲/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۰۸

چکیده

مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثر الحاق باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* و سوپرناتانت آن جهت افزایش مدت زمان ماندگاری فیله‌های قزل آلای رنگین کمان نگهداری شده در یخچال انجام پذیرفت. چهل و پنج قطعه ماهی قزل آلای رنگین کمان پرورشی به وزن کلی ۳۰ کیلوگرم تهیه شدند و در محلول‌های حاوی *لاکتوکوکوس لاکتیس* با رقت 10^{6} کلنی در هر میلی لیتر و سوپرناتانت آن با درصدهای ۳۰ و ۶۰ به مدت ۱۵ دقیقه غوطه‌ور شدند. جهت پایش روند فساد نمونه‌های فیله، فاکتورهای شیمیایی، میکروبی و حسی در روزهای ۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ ارزیابی شدند. نمونه‌های فیله شاهد بیشترین و نمونه های فیله تیمار شده با باکتری خالص کمترین تعداد میکروارگانیسم‌ها را داشتند ($P\leq۰/۰۵$). میانگین لگاریتم تعداد باکتری‌های سرمادوست، سرماگرا، مزوفیل و کپک و مخمر در هر گرم از فیله بطور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد کمتر بود ($P\leq۰/۰۵$). تاثیر باکتری‌های مولد اسید لاکتیک و سوپرناتانت بر کاهش تیوباربیتوریک اسید و نیتروژن فرار کل در پایان زمان نگهداری معنی‌دار ($P\leq۰/۰۵$) اما روی تغییرات pH معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$). استفاده از باکتری خالص سبب افزایش امتیازات داده‌شده به فاکتورهای حسی شد. نمونه‌های تیمار شده با باکتری خالص و سوپرناتانت از نظر طعم در پایان دوره نگهداری در وضعیت خوب اما تیمارهای دیگر در وضعیت غیر قابل مصرف بودند. استفاده از *لاکتوکوکوس لاکتیس* و سوپرناتانت آن به منظور بهبود طول عمر فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان، پیشنهاد می‌شود.

کلید واژه ها: *لاکتوکوکوس لاکتیس*، ماهی قزل آلای رنگین کمان، فساد میکروبی، فساد شیمیایی، خصوصیات حسی.

مقدمه

مهم‌ترین گونه پرورشی آزاد ماهیان، ماهی قزل آلای رنگین کمان[1] است که بومی ایران نیست اما تخم چشم‌زده آن از کشورهـای مختلـف وارد کشـور شده و پرورش می‌یابد. امروزه ماهی قزل آلای رنگین کمان به صورت انبوه در اکثر کارگاه‌های تکثیر و پرورش ماهیان سرد آبی در بیشتر نقاط جهان پرورش می‌یابد. گوشت ماهی قزل آلای رنگین کمان غنی از پروتئین و چربی‌های ضروری می‌باشد. کلسیم، فسفر، آهن و پتاسیم جز اصلی‌ترین املاح معدنی موجود در گوشت ماهی قزل‌آلای رنگین کمان هستند. ترکیب شیمیایی گوشت این ماهی شامل آب، پروتئین، چربی، کربوهیدرات، ویتامین‌ها و مواد معدنی است. اسیدهای چرب موجود در گوشت ماهی قزل آلای رنگین کمان به‌صورت اسیدهای چرب غیراشباع است. نوع کربوهیدرات موجود در آن اغلب از نوع گلیکوژن بوده و در مجموع مقدار کربوهیدرات در آن آن‌قدر پایین است که نقش قابل‌توجهی در تغذیه انسان ندارند. 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 شده‌است

1 Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Khalili Tilami et al., 2018; Rodrigues et al.,) 2017).

فعالیت آبی بالا، pH نزدیک به خنثی، مقادیر نسبتاً بالای اسیدهای 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 (Fernandes et al., 2016; Wang et al., 2017). رشد میکروبی و تولید متابولیسم‌های مختلف، عامل اصلی فساد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان هستند که با تولید آمین‌ها، آمین‌های بیوژنیک مانند پوترسین، هیستامین و کاداورین، اسیدهای ارگانیک، الکل‌ها، آلدئیدها و کتون‌ها همراه است و سبب ایجاد طعم غیر قابل قبول می‌شود (Shen et al., 2015; Binsi et al., 2015).

میزان نیتروژن فرار کل[1] یک شاخص مهم برای ارزیابی کیفیت محصولات دریایی است که برای اندازه‌گیری میزان فساد آن‌ها بکار می رود. نیتروژن فرار کل گروهی از آمین‌های بیوژنیک هستند که در محصولات غیر قابل تخمیری در طول مدت نگهداری تشکیل می‌شوند (Shen et al., 2015; Binsi et al., 2015). 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 ضدمیکروبی مانند نمک و افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها و نگه‌دارنده‌ها اشاره کرد (Shen et al. 2015; Binsi et al. 2015). امروزه استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک به منظور افزایش ماندگاری و تعویق در روند فساد ماهی توسعه یافته است.

باکتری‌های مولد اسید لاکتیک، جزء گروه بزرگی از باکتری‌های گرم مثبت، هوازی بی‌هوازی اختیاری، غیراسپورزا، کاتالاز و اکسیداز منفی و میله ای و کوکسی شکل هستند که اسید لاکتیک را از تخمیر قندها تولید می‌کنند. این باکتری‌ها در سطح جهان گسترده‌اند و معمولا در بیشتر مواد غذایی یافت می‌شوند (Wackett, 2016). *لاکتوکوکوس لاکتیس*[2] یکی از مهم‌ترین گونه‌های باکتریایی مولد اسید لاکتیک است که جزء باکتری‌های پروبیوتیکی نیز طبقه‌بندی می‌شود (Kechagia et al., 2013; Shi et al., 2016). پروبیوتیک‌ها به عنوان یک ارتقاء دهنده سلامتی و یک نگهدارنده طبیعی مورد توجه قرار گرفته‌اند. این باکتری‌ها قادرند ترکیبات ضد میکروبی از جمله نیسین تولید کنند که خواص ضد میکروبی فراوانی دارد و می‌تواند موجب کاهش بار میکروبی فراورده‌ها و بالطبع افزایش مدت زمان نگهداری آن‌ها شود (Kechagia et al., 2013; Shi et al., 2016).

با توجه به اهمیت تغذیه‌ای بالای ماهی قزل آلای رنگین کمان و طول عمر کوتاه این فراورده، مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثر الحاق باکتری پروبیوتیکی *لاکتوکوکوس لاکتیس* بر ماندگاری فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان نگهداری شده در شرایط یخچالی انجام پذیرفت.

روش کار

مواد و وسایل

تیوسولفات سدیم، متانول، کلروفرم، سود اکروس، اسید بوریک، اتانول ۹۶ درصد اسید سولفوریک ۹۸ درصد، محیط های کشت پلیت کانت آگار[3] و نوترینت براث[4]، گلیسرول و ۱- بوتانول از کمپانی مرک آلمان خریداری شدند. همچنین ۲- تیوباربیتوریک اسید، متیل رد و متیلن بلو از کمپانی سیگما آمریکا و در نهایت یدور پتاسیم از کمپانی فلوکا خریداری شدند. سانتریفیوز یخچال دار با دور ۱۴۰۰۰ در دقیقه، آون، هود بیولوژیک، اسپکتروفتومتر، هموژنایزر، ترازوی دیجیتال ۰/۰۰۱ گرم، انکوباتور و انکوباتور یخچال دار با

1 Total Volatile Base Nitrogen (TVB-N)

2 *Lactococcus lactis*
3 Plate Count Agar
4 Nutrient broth

قابلیت تامین دی اکسید کربن ساخت کمپانی ممرت آلمان، سیستم کجدال و سوکسله ساخت شرکت فرازما تحقیق، بن ماری ساخت شرکت سلیمان تجهیز ایران، دستگاه کلنی کانتر ساخت شرکت مرک آلمان و دستگاه بسته‌بندی وکیوم ساخت شرکت مولتی وک ایران بود.

نمونه‌های ماهی

در این تحقیق ۴۵ قطعه ماهی قزل آلای رنگین کمان پرورشی به وزن کلی ۳۰ کیلوگرم از یک مزرعه در شمال غرب ایران خریداری و در مجاورت آب و یخ به آزمایشگاه انتقال داده‌شدند. در اسرع وقت امعاء و احشاء داخلی نمونه‌های ماهی با جدا شدند. سر، دم و باله ماهی‌ها جدا و پس از شتشو با آب تمیز تحت شرایط استریل، ۹۶ فیله ماهی ۱۰۰ گرمی تهیه شد. سپس نمونه های ماهی با استفاده از پرتو UV استریل شدند.

تهیه محلول به همراه باکتری با رقت مورد مطالعه

گونه باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* تحت گونه لاکتیس (PTCC 1336) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. باکتری در محیط کشت MRS broth به مدت ۷۲ ساعت کشت داده‌شد و سپس روی محیط کشت MRS آگار به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد جهت تکثیر باکتری کشت داده‌شد. سپس مجددا در محیط کشتMRS براث به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد کشت داده شد. باکتری‌های کشت داده شده در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد جهت توقف رشد آن نگهداری شد و از آن ۱ میلی لیتر برداشته و رقت‌های سریالی ۱×۱۰^{-۱} تا ۱×۱۰^{-۶} تهیه شدند و پس از ۴۸ ساعت کشت، کلنی‌های آن شمارش شد تا رقت باکتری اولیه بدست آید و از آن غلظت $۱۰^{۶}$ $CFUml^{-1}$ تهیه شد.

تهیه درصدهای سوپرناتانت

عصاره ضدباکتریایی (سوپرناتانت) به وسیله سانتریفیوژ یخچال‌دار (۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه) استخراج شد. سپس عصاره استخراج شده با استفاده از فیلتر سلولز استات با روزنه های ۰/۲ میکرومتری فیلتر شد تا اینکه سوپرناتانت عاری از سلول‌ها باشند. pH سوپرناتانت استخراج شده با استفاده از هیدرواکسید سدیم ۱ نرمال به ۶/۵ رسید تا اینکه اثرات pH از بین برود. غلظت سوپرناتانت بدست آمده ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد و از این سوپرناتانت با استفاده از آب مقطر ۲ بار تقطیر شده درصدهای۳۰ و ۶۰ بدست آمدند (Schillinger and Lucke, 1987).

عمل آوری نمونه‌ها

برای این منظور از شیوه غوطه وری استفاده شد که درصد های ۳۰ و ۶۰ از محلول سوپرناتانت تهیه شدند. محلول سوپرناتانت بعد از کشت باکتری و رقت $۱۰^{۶}$ کلنی در هر میلی لیتر باکتری مولد اسید لاکتیک *لاکتوکوکوس لاکتیس* که در این تحقیق تیمار سلول های زنده خوانده می‌شود، از هرکدام ۵۰ میلی لیتر برای هر ۵ کیلوگرم فیله ماهی در نظر گرفته‌شد. نمونه های ۱۰۰ گرمی از فیله‌های ماهی قزل آلای رنگین کمان در داخل ظروف حاوی درصدهای مورد مطالعه سوپرناتانت و غلظت $۱۰^{۶}$ باکتری اسید لاکتیک در هر میلی لیتر به مدت ۱۵ دقیقه غوطه‌ور شدند و نمونه‌های غوطه‌ور شده بعد از این مدت در داخل کیسه‌های پلاستکی قرار داده‌شد و سپس در داخل یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. عمل نمونه برداری از فیله ماهیان در روزهای صفر (شروع)، ۵، ۱۰ و ۱۵ به منظور انجام آزمایشات میکروبیولوژیکی، شیمیایی و کیفی انجام شد.

آزمون باکتری‌های مزوفیل

برای شمارش باکتری‌های مزوفیل، ۲۵ گرم از فیله ماهی به ۲۲۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژیک اضافه شد و با استومیکر به مدت ۱ دقیقه به هم زده شد تا به

صورت هموژنیزه درآید. سپس با استفاده از آب پپتونه (۰/۱ درصد W/v) به مدت ۲ دقیقه به هم زده‌شد و در نهایت رقت‌های سریالی تا 10^{-6} تهیه شدند. سپس محتویات روی محیط کشت پلیت کانت آگار تلقیح و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری شدند. فقط پلیت‌های با تعداد کلنی بین ۱۵ تا ۱۵۰ عدد شمارش شدند. در نهایت تعداد کلنی در هر پلیت در عکس ضریب رقت ضرب و شمارش انجام و نتایج بر اساس Log CFU g^{-1} وزن ماهی گزارش شدند.

آزمون باکتری‌های سرما دوست

به منظور شمارش باکتری‌های سرمادوست، ۱۰ گرم از نمونه‌های فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان به ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی اضافه شد و به مدت ۱ دقیقه با استفاده از استومیکر به هم زده شد. سپس محتویات با آب پپتونه (۰/۱ درصد W/v) به مدت ۲ دقیقه مخلوط شد و رقت‌های سریالی تهیه شد. برای شمارش باکتری‌های سرمادوست ۰/۱ میلی لیتر از محتویات هر رقت روی محیط کشت پلیت کانت آگار[1] به مدت ۱۰ روز در دمای ۷ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری شد (Gulhan, 2012). فقط پلیت‌های با تعداد کلنی بین ۱۵ تا ۱۵۰ عدد شمارش شدند. در نهایت تعداد کلنی در هر پلیت در عکس ضریب رقت ضرب و شمارش انجام و نتایج بر اساس Log CFU g^{-1} وزن ماهی گزارش شدند.

آزمون باکتری های سرما گرا

برای شمارش باکتری‌های سرماگرا از دستورالعمل استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران (موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران ۱۳۸۲) استفاده شد. برای این منظور از محیط کشت جامد انتخابی نوترینت آگار استفاده شد و گرمخانه گزاری در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انجام شد (موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران ۱۳۸۲). فقط پلیت‌های با تعداد کلنی بین ۱۵ تا ۱۵۰ عدد شمارش شدند. در نهایت تعداد کلنی در هر پلیت در عکس ضریب رقت ضرب و شمارش انجام و نتایج بر اساس Log CFU g^{-1} وزن ماهی گزارش شدند.

اندازه گیری نیتروژن فرار کل[2]

به منظور اندازه گیری TVN از روش استاندارد، ماکروکلدال ارئه شده توسط AOCS[3] استفاده شد. برای این منظور، با تقطیر ۱۰ گرم از هر یک از نمونه‌های مورد نظر در دستگاه تقطیر کلدال، ازت فرارجمع شده در بالن گیرنده با استفاده از اسید سولفوریک ۰/۱ نرمال تیتراسیون شد و عدد بدست آمده را در ۱۴ ضرب و مقدار ازت فرار تام بر حسب میلی گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه گوشت ماهی بدست آمد (AOCS, 2001).

اندازه گیری TBARS[4]

بدین منظور مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم از نمونه چرخ شده فیله ماهی به یک بالن ۲۵ میلی‌لیتری اضافه شده و با ۱- بوتانول به حجم رسانده شد. سپس ۵ میلی لیتر از مخلوط فوق به لوله‌های خشک درب دار ریخته و به آن ۵ میلی لیتر معرف TBA افزوده شد. لوله‌های درب دار در حمام آب با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت قرار گرفت و پس از آن در دمای محیط سرد شدند. سپس مقدار جذب (As) در طول موج ۵۳۲ نانومتر در مقابل بلانک (شاهد) محلول TBA در حلال ۱-بوتانول (Ab) قرائت شد و با استفاده از رابطه زیر میزان تیوباربیتوریک اسید بر حسب میلی‌گرم مالون آلدئید بر کیلوگرم گوشت ماهی گزارش شد (Herlich, 1990).

$$\text{میزان تیوباربیتوریک اسید} = \frac{50\times(As-Ab)}{m\ (\text{گرم میلی حسب بر نمونه وزن})}$$

1 Plate Count Agar

2 Total Volatile Nitrogen (TVN)

3 Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society

4 Thiobarbituric acids

اندازه گیری pH

پس از هموژن کردن ۵ گرم از نمونه با ۴۵ میلی لیتر آب مقطر، مخلوط صاف گردید. سپس pH نمونه‌ها با استفاده از دستگاه pH متر کالیبره شده (Eutech Instruments Cyber Scan pH 510) و با در نظر گرفتن استانداردهایی در pH با رنج ۴ تا ۷ و طبق روش ارائه شده توسط AOAC (۱۹۹۵) اندازه‌گیری شد (Benjakul et al. 2010).

ارزیابی حسی نمونه های ماهی

ارزیابی حسی نمونه‌های ماهی بر مبنای سنجش پذیرش و مقبولیت فیله‌های قزل آلای رنگین کمان پخته شده و با استفاده از فرم‌های هدونیک ۵ نقطه‌ای در روز اول نگهداری (زمان صفر) و در فواصل زمانی صفر، ۵، ۱۰ و ۱۵ روز انجام شد. برای این منظور روی نمونه‌های ماهی نمک پاشیده شد و به مدت تقریبی ۴۵ دقیقه درون یک تستر با حرارت همه جانبه (از بالا و پایین) در دمای ۲۰۰ درجه سانتی گراد پخته شدند. فیله‌های پخته شده روی ظروف کد گذاری شده قرار داده‌شدند و به همراه فرم ارزیابی حسی و با ترتیب کاملاً تصادفی به ارزیاب‌ها عرضه شدند. اعضای پانل شامل ۵ نفر از محققین مرکز ملی تحقیقات آرتمیای کشور بودند. فیله‌های ماهی قزل آلای رنگین کمان از حیث شاخص‌های بافت، بو، طعم و مزه و رنگ مورد ارزیابی قرار گرفت. درجه مقبولیت هریک از ویژگی‌های مورد نظر بین ۵ و ۱ امتیاز بندی شد به گونه‌ای که ۵ (عالی)، ۴ (خیلی خوب)، ۳ (خوب)، ۲ (قابل مصرف) و ۱ (غیرقابل مصرف) در نظر گرفته‌شد (Zpata, 2013).

ارزیابی آماری

داده‌های بدست آمده از آزمایشات انجام شده در صفحه گسترده اکسل وارد شدند. به منظور ارزیابی آماری از طرح کاملا تصادفی استفاده شد و مقایسات به صورت فاکتوریل انجام شد و داده‌های حاصله، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل آماری داده ها و رسم نمودارها با استفاده از نرم افـزار SPSS ورژن ۱۸ انجام شد. ابتـدا نرمـال بـودن داده‌هـا بـا اسـتفاده از آزمـون کولمـوگراف-اسـمیرنوف[1] و سپس همگنی واریانس داده‌ها با آزمون لون[2] بررسی شد. در نهایت $P\leq ۰/۰۵$ به عنوان حد معناداری در نظر گرفته شد.

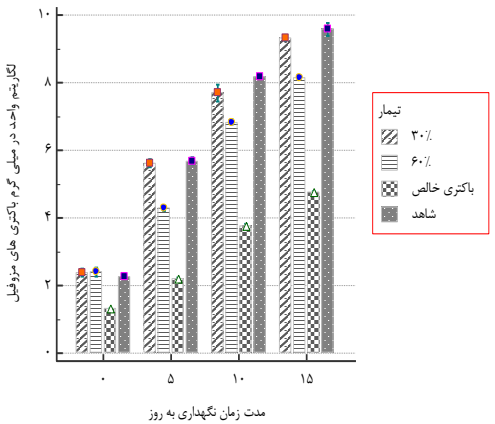
نتایج

مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثر الحاق باکتری پروبیوتیکی *لاکتوکوکوس لاکتیس* بر ماندگاری فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان نگهداری شده در شرایط یخچالی انجام پذیرفت. اشکال ۱ تا ۴ به ترتیب میانگین تعداد باکتری‌های مزوفیل هوازی، سرماگرا و سرمادوست و کپک و مخمر در تیمارهای مختلف ماهی قزل آلای رنگین کمان در طول مدت زمان نگهداری در شرایط یخچال را نشان می‌دهند. بر طبق نتایج بدست آمده از شکل ۱، تعداد باکتری‌های مزوفیل هوازی در طی مدت زمان نگهداری ۱۵ روزه در همه تیمارهای ماهی قزل آلای رنگین کمان، افزایش یافت. کمترین میزان افزایش تعداد باکتری‌های مزوفیل هوازی در نمونه‌های فیله ماهی تیمار شده با باکتری خالص *لاکتوکوکوس لاکتیس* و بیشترین میزان افزایش تعداد باکتری‌های مزوفیل هوازی در نمونه‌های فیله ماهی شاهد دیده شد ($P\leq ۰/۰۵$). نمونه‌های ماهی تیمار شده با ۶۰ درصد سوپرناتانت در مقایسه با نمونه‌های تیمار شده با ۳۰ درصد سوپرناتانت، در همه روز های آزمون از تعداد باکتری‌های مزوفیل هوازی کمتری برخوردار بودند ($P \leq ۰/۰۵$).

بر طبق نتایج بدست آمده از شکل ۲، تعداد باکتری‌های سرماگرا در طی مدت زمان نگهداری ۱۵ روزه در همه تیمارهای ماهی قزل آلای رنگین کمان، افزایش یافت.

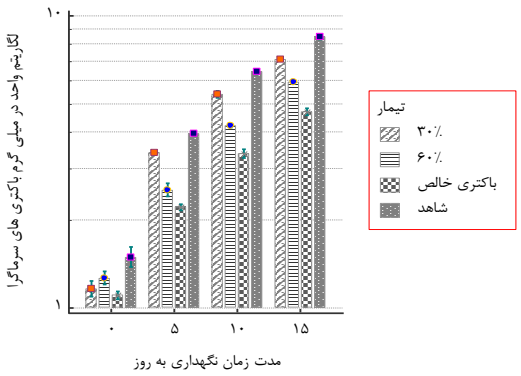
1 Kolomogorav – Smirnov

2 Leven



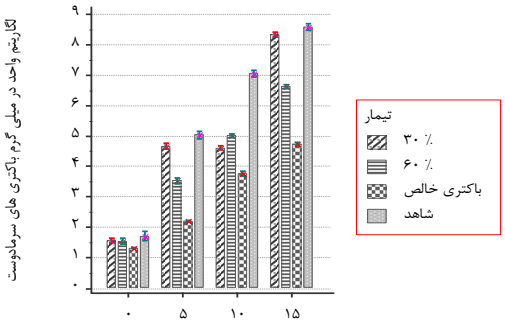
شکل ۱. میانگین تعداد باکتری‌های مزوفیل هوازی در تیمارهای مختلف ماهی قزل آلای رنگین کمان در طول مدت زمان نگهداری در شرایط یخچال.

در شکل ۲، کمترین میزان افزایش تعداد باکتری‌های سرماگرا در نمونه‌های فیله ماهی تیمار شده با باکتری خالص *لاکتوکوکوس لاکتیس* و بیشترین میزان افزایش تعداد باکتری‌های سرماگرا در نمونه‌های فیله ماهی شاهد دیده شد ($P\leq ۰/۰۵$). نمونه‌های ماهی تیمار شده با ۶۰ درصد سوپرناتانت در مقایسه با نمونه‌های تیمار شده با ۳۰ درصد سوپرناتانت، در همه روزهای آزمون از تعداد باکتری‌های سرماگرا کمتری برخوردار بودند ($P\leq ۰/۰۵$).



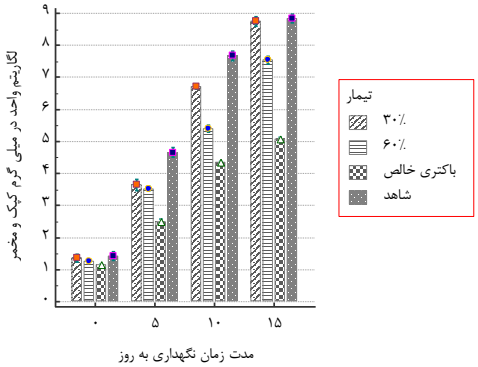
شکل ۲. میانگین تعداد باکتری‌های سرماگرا در تیمارهای مختلف ماهی قزل آلای رنگین کمان در طول مدت زمان نگهداری در شرایط یخچال.

بر طبق نتایج بدست آمده از شکل ۳، تعداد باکتری‌های سرمادوست در طی مدت زمان نگهداری ۱۵ روزه در همه تیمارهای ماهی قزل آلای رنگین کمان، افزایش یافت. کمترین میزان افزایش تعداد باکتری‌های سرمادوست در نمونه‌های فیله ماهی تیمار شده با باکتری خالص *لاکتوکوکوس لاکتیس* و بیشترین میزان افزایش تعداد باکتری‌های سرمادوست در نمونه‌های فیله ماهی شاهد دیده شد ($P\leq ۰/۰۵$). نمونه‌های ماهی تیمار شده با ۶۰ درصد سوپرناتانت در مقایسه با نمونه‌های تیمار شده با ۳۰ درصد سوپرناتانت، در همه روزهای آزمون از تعداد باکتری‌های سرمادوست کمتری برخوردار بودند ($P\leq ۰/۰۵$).



شکل ۳. میانگین تعداد باکتری‌های سرمادوست در تیمارهای مختلف ماهی قزل آلای رنگین کمان در طول مدت زمان نگهداری در شرایط یخچال.

بر طبق نتایج بدست آمده از شکل ۴، تعداد کپک و مخمر در طی مدت زمان نگهداری ۱۵ روزه در همه تیمارهای ماهی قزل آلای رنگین کمان، افزایش یافت. کمترین میزان افزایش تعداد کپک و مخمر در نمونه‌های فیله ماهی تیمار شده با باکتری خالص *لاکتوکوکوس لاکتیس* و بیشترین میزان افزایش تعداد کپک و مخمر در نمونه‌های فیله ماهی شاهد دیده شد ($P\leq ۰/۰۵$). نمونه‌های ماهی تیمار شده با ۶۰ درصد سوپرناتانت در مقایسه با نمونه‌های تیمار شده با ۳۰ درصد سوپرناتانت، در همه روزهای آزمون از تعداد کپک و مخمر کمتری برخوردار بودند ($P\leq ۰/۰۵$).



شکل ۴. میانگین تعداد کپک و مخمر در تیمارهای مختلف ماهی قزل آلای رنگین کمان در طول مدت زمان نگهداری در شرایط یخچال

جدول ۱. میزان تغییرات معیارهای شیمیایی (میانگین+ انحراف معیار) در تیمارهای مختلف ماهی قزل آلای رنگین کمان مورد مطالعه در طول دوره نگهداری در دمای یخچال را نشان می دهد. بر طبق نتایج بدست آمده از این جدول، میزان تیوباربیتوریک اسید، نیتروژن فرار کل، pH و عدد پراکسید در همه تیمارهای ماهی در طول مدت زمان نگهداری به شکل مستقیم افزایش یافت. میزان تیوباربیتوریک اسید در طی ۱۵ روز نگهداری نمونه‌های ماهی در تیمارهای مختلف رنجی معادل ۰/۰۰ ± ۰/۰۱ تا ۰/۱۰ ± ۴/۳۰ میلی گرم مالون آلدئید بر کیلوگرم نمونه داشت. بیشترین و کمترین میزان تیوباربیتوریک اسید در روز ۱۵ پس از نگهداری مربوط به نمونه‌های فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان شاهد (۰/۰۴ ± ۱/۰۰ میلی گرم مالون آلدئید بر کیلوگرم) و نمونه تیمار شده با باکتری خالص (۰/۱۰ ± ۴/۳۰ میلی گرم مالون آلدئید بر کیلوگرم) بود (P ≤۰/۰۵). میزان نیتروژن فرار کل در طی ۱۵ روز نگهداری نمونه‌های ماهی در تیمارهای مختلف رنجی معادل ۰/۳۰ ± ۸/۹ تا ۱/۲ ± ۹۶/۷ میلی گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه داشت. بیشترین و کمترین میزان تیوباربیتوریک اسید در روز ۱۵ پس از نگهداری مربوط به نمونه‌های فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان شاهد (۰/۰۴ ± ۱/۰۰ میلی گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه) و نمونه تیمار شده با باکتری خالص (۰/۱۰ ± ۴/۳۰ میلی گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه) بود (P ≤۰/۰۵). میزان pH در طی ۱۵ روز نگهداری نمونه‌های ماهی در تیمارهای مختلف محدوده‌ای معادل ۰/۰۷ ± ۴/۹ تا ۰/۰۴ ± ۶/۸ داشت. بیشترین و کمترین میزان pH در روز ۱۵ پس از نگهداری مربوط به نمونه‌های فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان تیمار شده با ۶۰ درصد سوپرناتانت (۰/۰۴ ± ۶/۸) و نمونه تیمار شده با ۳۰ درصد سوپرناتانت (۰/۱۴ ± ۵/۹) بود (P≤۰/۰۵).

جدول ۱. تغییرات معیارهای شیمیایی (میانگین ± انحراف استاندارد) در تیمارهای مختلف ماهی مورد مطالعه در طول دوره نگهداری در دمای یخچال.

متغیر	مدت زمان (روز)	گروه های مورد مطالعه ها (Mean ±SD)			
		باکتری خالص	سوپرناتانت		کنترل
			۳۰ درصد	۶۰ درصد	
تیوباربیتوریک اسید (میلی گرم مالون آلدئید بر کیلوگرم)	۰	۰/۰۱ ± ۰/۰۰ Cb	۰/۰۵ ± ۰/۰۱ Db	۰/۰۱ ± ۰/۰۰ Db	۰/۳۴ ± ۰/۰۰ Da
	۵	۰/۰۹ ± ۰/۰۰ Cd	۰/۷۸ ± ۰/۰۴ Cb	۰/۲۲ ± ۰/۴۶ Cb	۱/۵۰ ± ۰/۰۳ Ca
	۱۰	۰/۳۷ ± ۰/۰۱ Bc	۱/۴۵ ± ۰/۰۹ Bb	۱/۱۵ ± ۰/۰۷ Bb	۲/۱۴ ± ۰/۰۸ Ba
	۱۵	۱/۰۰ ± ۰/۰۴ Ac	۲/۵۷ ± ۰/۱۳ Ab	۲/۵۸ ± ۰/۱۳ Ab	۴/۳۰ ± ۰/۱۰ Aa
نیتروژن فرار کل (میلی گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه)	۰	۸/۹ ± ۰/۳۰ Db	۱۰/۲ ± ۰/۲۷ Da	۱۰/۰ ± ۰/۱۳ Da	۱۰/۳ ± ۰/۱۰ Da
	۵	۲۷/۵ ± ۱/۸۴ Cc	۴۲/۵ ± ۰/۷۸ Cb	۳۰/۶ ± ۰/۹۴ Cc	۵۲/۸ ± ۰/۸۵ Cc
	۱۰	۴۵/۵ ± ۱/۳۶ Bc	۶۲/۵ ± ۰/۴۵ Bb	۵۸/۱ ± ۰/۶۴ Bb	۷۶/۳ ± ۱/۱۱ Bb
	۱۵	۶۳/۱ ± ۰/۴۶ Ab	۸۴/۶ ± ۰/۴۳ Ab	۷۳/۷ ± ۰/۶۴ Ab	۹۶/۷ ± ۱/۲ Ab
pH	۰	۵/۰ ± ۰/۰۳ Ba	۵/۲ ± ۰/۰۴ Aa	۴/۹ ± ۰/۰۷ Ba	۵/۳ ± ۰/۱۳ Aa
	۵	۵/۴ ± ۰/۰۷ Ba	۵/۸ ± ۰/۰۵ Aa	۵/۳ ± ۰/۱۰ Ba	۵/۶ ± ۰/۰۴ Aa
	۱۰	۵/۸ ± ۰/۰۵ Ba	۶/۱ ± ۰/۰۳ Aa	۵/۶ ± ۰/۰۷ Ba	۶/۱ ± ۰/۰۲ Aa
	۱۵	۶/۶ ± ۰/۰۵ Aa	۵/۹ ± ۰/۱۴ Aa	۶/۸ ± ۰/۰۴ Aa	۶/۰ ± ۰/۰۱ Aa

حروف کوچک غیر یکسان در هر ردیف برای هر متغیر نشان دهنده اختلاف آماری معنادار در حد P ≤۰/۰۵ و حروف بزرگ غیر یکسان در هر ستون اختلاف آماری معنادار در حد P ≤۰/۰۵

جدول ۲ میانگین و انحراف معیار امتیازات داده‌شده به خصوصیات حسی تیمارهای مختلف ماهی قزل آلای رنگین کمان در طی مدت زمان نگهداری در یخچال را نشان می‌دهد. بر حسب نتایج بدست آمده از این جدول، ارزیابان حسی بیشترین امتیازات مربوط به فاکتورهای حسی بو، طعم، بافت و رنگ در روز ۱۵ پس از نگهداری را به ترتیب به نمونه‌های ماهی تیمار شده با باکتری خالص (۰/۵۷± ۱/۵۰)، باکتری خالص (۰/۵۰ ± ۱/۲۵)، ۳۰ درصد سوپرناتانت (۰/۵۷± ۱/۲۵) و باکتری خالص (۰/۰۰± ۲/۷۵) دادند.

جدول ۲. میانگین و انحراف معیار امتیازات داده‌شده به خصوصیات حسی تیمارهای مختلف ماهی قزل آلای رنگین کمان در طی مدت زمان نگهداری در یخچال.

فاکتورهای حسی	مدت زمان (روز)	گروه‌های مورد مطالعه (میانگین ± انحراف استاندارد)			
		باکتری خالص	سوپرناتانت		کنترل
			۳۰ درصد	۶۰ درصد	
بو	0	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ Aa	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ Aa	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ Aa	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ Aa
	5	۵/۰۰ ± ۰/۵۷ Aa	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ Aa	۴/۵۰ ± ۰/۵۷ Aa	۵/۰۰ ± ۰/۵۷ Aa
	10	۳/۷۵ ± ۰/۵۷ Ba	۲/۵۰ ± ۰/۵۷ Bb	۲/۲۵ ± ۰/۹۵ Bb	۲/۰۰ ± ۰/۰۰ Bb
	15	۱/۵۰ ± ۰/۵۷ Ca	۱/۲۵ ± ۰/۵۷ Ca	۱/۰۰ ± ۰/۰۰ Ca	۱/۰۰ ± ۰/۰۰ Ca
طعم	0	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ Aa	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ Aa	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ Aa	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ Aa
	5	۴/۰۰ ± ۰/۰۰ Ba	۴/۷۵ ± ۰/۵۰ Aa	۴/۵۰ ± ۰/۵۷ Aa	۴/۰۰ ± ۰/۰۰ Ba
	10	۳/۵۰ ± ۰/۵۷ Ba	۳/۲۵ ± ۰/۵۰ Ba	۲/۵۰ ± ۰/۵۷ Bb	۲/۵۰ ± ۰/۷۰ Cb
	15	۱/۲۵ ± ۰/۵۰ Ca	۱/۰۰ ± ۰/۵۰ Ca	۱/۰۰ ± ۰/۰۰ Ca	۱/۰۰ ± ۰/۰۰ Da
بافت	0	۴/۰۰ ± ۰/۰۰ Ab	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ Aa	۳/۷۵ ± ۰/۵۰ Ab	۴/۲۵ ± ۰/۰۰ Ab
	5	۳/۷۵ ± ۰/۵۰ Ab	۴/۷۵ ± ۰/۵۰ Aa	۳/۷۵ ± ۰/۵۰ Ab	۴/۰۰ ± ۰/۰۰ Ab
	10	۲/۷۵ ± ۰/۵۰ Bb	۳/۵۰ ± ۰/۵۷ Ba	۲/۰۰ ± ۰/۰۰ Bb	۲/۵۰ ± ۰/۷۰ Bb
	15	۱/۰۰ ± ۰/۰۰ Ca	۱/۲۵ ± ۰/۵۷ Ca	۱/۰۰ ± ۰/۰۰ Ca	۱/۰۰ ± ۰/۰۰ Ca
رنگ	0	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ Aa	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ Aa	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ Aa	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ Aa
	5	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ Aa	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ Aa	۴/۵۰ ± ۰/۵۷ Aa	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ Aa
	10	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ Aa	۴/۲۵ ± ۰/۵۰ Ab	۳/۵۰ ± ۰/۵۷ Bc	۳/۰۰ ± ۰/۰۰ Bc
	15	۲/۷۵ ± ۰/۰۰ Ba	۱/۲۵ ± ۰/۵۰ Bb	۱/۵۰ ± ۰/۵۷ Cb	۱/۵۰ ± ۰/۰۰ Cb

حروف کوچک غیر یکسان در هر ردیف برای هر متغیر نشان دهنده اختلاف آماری معنادار در حد $P \leq ۰/۰۵$ می‌باشند.
حروف بزرگ غیر یکسان در هر ستون برای هر متغیر نشان دهنده اختلاف آماری معنادار در حد $P \leq ۰/۰۵$ می‌باشند.

بحث

افزایش مدت زمان نگهداری موادغذایی دریایی با استفاده از مواد زیستییک تکنیک برجسته در صنعت تولید و فراوری موادغذایی دریایی است. در این زمینه، ارزش تغذیه‌ای بالای اغذیه دریایی و خصوصا ماهیان سبب شده است تا این موضوع به یکی از برجسته‌ترین و مهم‌ترین مباحث علم صنایع غذایی دریایی تبدیل شود. ارزش غذایی بالای ماهی قزل آلای رنگین کمان از لحاظ اسیدهای آیمنه و همچنین اسیدهای چرب ضروری سبب شده است تا تولید کنندگان این نوع اغذیه دریایی تلاش‌های فراوانی برای افزایش مدت زمان نگهداری آن، با توجه به فعالیت آبی بالا، pH نزدیک به خنثی، مقادیر نسبتاً بالای اسیدهای آمینه آزاد و در نهایت حضور آنزیم‌های اتولیز کننده در آن، کنند. مطالعات نشان داده‌اند که استفاده از اسید لاکتیک باکتری‌ها به عنوان میکروارگانیسم‌های مفید به منظور افزایش مدت زمان نگهداری موادغذایی سبب سلامتی مصرف کننده می شود (Nath et al., 2014). در مطالعه حاضر سعی بر این شد تا اثر الحاق *لاکتوکوکوس لاکتیس* بر افزایش ماندگاری فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان نگهداری شده در شرایط یخچالی ارزیابی شود. در این مطالعه علاوه بر شمارش تعداد باکتری‌های مزوفیل هوازی، باکتری‌های سرمادوست و سرماگرا و کپک و مخمر، خصوصیات شیمایی شامل میزان تیوباربیتوریک اسید، pH و نیتروژن فرار کل و همچنین خصوصیات ارگانولپتیک نمونه‌های ماهی قزل آلای رنگین کمان تیمارهای

مختلف در طی ۱۵ روز نگهداری در شرایط یخچالی نیز ارزیابی شد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تیمار بندی نمونه‌های ماهی قزل آلای رنگین کمان با استفاده از باکتری خالص *لاکتوکوکوس لاکتیس* سبب تعویق در تولید تیوباربیتوریک اسید و نیتروژن فرار کل شد. همچنین استفاده از باکتری خالص *لاکتوکوکوس لاکتیس* سبب جلوگیری از افزایش بیش از حد pH شد. همچنین تعداد باکتری‌های مزوفیل هوازی، سرمادوست و سرما گرا و کپک و مخمر در نمونه‌های ماهی قزل آلای رنگین کمان تیمار شده با باکتری خالص *لاکتوکوکوس لاکتیس* در طی مدت زمان نگهداری، کمتر از سایر تیمارها بود. میانگین امتیازات حسی داده شده به فاکتورهای ارگانولپتیک در نمونه‌های ماهی قزل آلای رنگین کمان تیمار شده با باکتری خالص *لاکتوکوکوس لاکتیس* در طی مدت زمان نگهداری بیشتر از سایر نمونه‌ها بود. این نتایج حاکی از اثرات باقلوه استفاده از باکتری خالص *لاکتوکوکوس لاکتیس* در تعویق فساد میکروبی و شیمیایی در نمونه‌های ماهی قزل آلای رنگین کمان است (Chowdhury et al., 2012; Nath et al., 2014).

حد مجاز باکتری‌های سرمادوست در فیله ماهی Log $CFUg^{-1}$ ۶-۷ گزارش شده است (Erkan et al. 2007). در مطالعه حاضر، در نمونه‌های ماهی تیمار شده با سوپرناتانت و همچنین نمونه‌های ماهی کنترل، تعداد باکتری‌های سرمادوست بیشتر از log $CFUg^{-1}$ ۷ بود که نتایج آن‌ها به ترتیب از ۰/۰۶ ± ۱/۵۷ و ۰/۱۵ ± ۱/۰۷ در روز صفر به ۰/۰۷ ± ۸/۳ و ۰/۱۱ ± ۸/۵ در روز ۱۵ نگهداری نمونه‌های ماهی رسید. در نمونه‌های تیمار شده با ۶۰ درصد سوپرناتانت و سلول‌های باکتری زنده با غلظت log $CFUg^{-1}$ ۶، میزان شمارش باکتری‌های سرمادوست در روز ۱۵ کمتر از حد مجاز مصرف انسانی بود به طوری که به ترتیب از ۰/۰۹ ± ۱/۵۳ و ۰/۰۱ ± ۰۷۳۱۱ در روز صفر به ۰/۰۵ ± ۶/۶ و ۰/۰۴ ± ۴/۷۰ در روز ۱۵ نگهداری نمونه‌های ماهی رسید. در این ارتباط در تیمارهای باکتری خالص و ۶۰ درصد سوپرناتانت شرایط میکروبی بهتر از ۳۰ درصد سوپرناتانت بود. با این وجود مزیت استفاده از سوپرناتانت نسبت به استفاده از باکتری زنده *لاکتوکوکوس لاکتیس*، پایین تر نگه داشتن تعداد باکتری‌های سرمادوست بود. در ارتباط با باکتری‌های سرماگرا، استفاده از تیمارهای ۶۰ درصد سوپرناتانت و باکتری خالص نسبت به تیمار ۳۰ درصد سوپرناتانت سبب جلوگیری از افزایش بیش از حد سرماگراها شد به طوری که تعداد باکتری‌های سرماگرا در انتهای زمان نگهداری از حد مجاز مصرف انسانی پایین تر بود. این نتایج دقیقا برای تعداد کپک و مخمر نیز صادق بود. در نتیجه افزایش غلظت سوپرناتانت سبب جلوگیری از رشد بیش از حد میکروارگانیسم‌ها شد. همچنین استفاده از باکتری خالص *لاکتوکوکوس لاکتیس* بهترین نتایج میکروبی را به همراه داشت. مطالعات کم و بیش پراکنده‌ای در این زمینه انجام پذیرفته است. Vieira در سال ۲۰۱۶ (Vieira, 2016) اقدام به بررسی تاثیر *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در جذابیت و کیفیت عضله و میزان باکتری‌های روده میگوی سفید دریای خزر نگهداری شده در دماهای ۴ و ۱۸- درجه سانتی گراد پرداختند. این محققان یافتند که در روز ۶۰ میزان باکتری‌های هتروتروفیک در نمونه‌های تیمار شده با باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، کمتر از نمونه‌های شاهد بود (Vieira, 2016) که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت. Ibrahim و Desouky در سال ۲۰۰۹ (Ibrahim and Desousky, 2009) به بررسی اثرات متابولیت‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* روی فیله ماهی تیلاپیا در دمای انجماد پرداختند. نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از باکتری‌ها به منظور تیمار بندی نمونه های

میگو سبب جلوگیری از افزایش بیش از حد بار میکروبی نمونه های میگو شد. اثرات بالقوه باکتری‌های مولد اسید لاکتیک روی افزایش مدت زمان ماندگاری و جلوگیری از افزایش تعداد میکروارگانسیم‌های عامل فساد در مطالعه انجام شده روی ماهی ماکرل در هند نیز گزارش شده است (Sudalayandi and Manja, 2011). Hisar و همکاران نیز در سال ۲۰۰۵ (Hisar et al., 2005) اقدام به مطاله تاثیر الحاق *لاکتوباسیلوس ساکی* بر خصوصیات میکروبی ماهی قزل آلای رنگین کمان نگهداری شده در یخچال نمودند. نتایج این تحقیق نشان داد که رشد لیستریا مونوسایتوژنز در نمونه های تیمار شده با *لاکتوباسیلوس ساکی* به شکل معنی داری کاهش یافت ($P\leq ۰/۰۵$). Santo و همکاران در سال ۲۰۰۳ (Santo et al., 2003) اقدام به مطالعه تاثیر الحاق *لاکتوباسیلوس ساکی* بر خصوصیات میکروبی ماهی ساردین نمودند. نتایج این تحقیق نشان داد که تعداد باکتری های هوازی کل، کلی فرم ها، استافیلوکوک، انتروکوک و سالمونلا در نمونه های ماهی تیمار شده با *لاکتوباسیلوس ساکی* در تمام روز های نگهداری در دمای یخچال، به مراتب کمتر از نمونه های شاهد بود که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت.

تاثیر باکتری‌های مولد اسید لاکتیک و سوپرناتانت بر کنترل فاکتورهای شیمیایی تیوباربیتوریک اسید و نیتروژن فرار کل در پایان زمان نگهداری نیز معنی‌دار بود اما اثرات آن‌ها روی pH معنی دار نبود. همچنین آزمون‌های حسی (بو، طعم، بافت و رنگ) نیز مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که بجز در نمونه‌هایی که با استفاده از باکتری خالص تیمار شده بودند، هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری از نظر بو وجود نداشت. از نظر طعم، در نمونه‌های تیمار شده با سوپرناتانت و باکتری خالص در پایان روز ۱۵، در حد خوب اما سایر تیمارها در وضعیت غیر قابل مصرف بودند. بنابراین استفاده از سوپرناتانت در غلظت ۶۰ درصد و خصوصا باکتری خالص سبب بهبود امتیازات حسی داده شده به نمونه‌های ماهی شد. دلیل اصلی ناچیز بودن تاثیر باکتری و سوپرناتانت روی تغییرات pH می‌تواند ناشی از تشکیل نیتروژن پایه فرار باشد که خود باعث تغییرات بیوشیمیایی در دماهای پایین می‌شود.

بوی فیله‌های ماهی قزل آلای رنگین کمان در هیچ کدام از تیمارها اختلاف معنی داری نداشتند به جز در تیمار باکتری خالص که کمی بوی فیله‌ها تحت تاثیر فرایند تخمیر قرار گرفته بود که با بقیه تیمارها اختلاف معنی داری داشت. طعم در نمونه‌های فیله ماهی تیمار شده با سوپرناتانت و باکتری خالص در روز دهم در حد خوب بود. در صورتی‌که در نمونه‌های شاهد در حد قابل مصرف قرار گرفتند و در تمامی تیمارها در روز ۱۵ غیر قابل مصرف مشاهده شد. از نظر بافتی هم در تیمار باکتری زنده و ۶۰ درصد سوپرناتانت در روز ۱۰ در حد قابل مصرف مشاهده شد. همچنین نمونه‌های ماهی تیمار شده با ۳۰ درصد سوپرناتانت و نمونه‌های شاهد نیز در وضعیت قابل مصرف قرار گرفتند اما با در نظر گرفتن کیفیت بافتی در روز صفر، تیمارهای شاهد و ۳۰ درصد سوپرناتانت در حد عالی بودند ولی تیمار ۶۰ درصد سوپرناتانت و باکتری زنده در ابتدای آزمایش در حد خیلی خوب بودند که احتمالا در اثر عوامل ناشناخته‌ای مانند دستکاری‌های فیزیکی در حین تهیه فیله‌ها یا ناشی از عوامل تغذیه‌ای ماهی و یا سایر فاکتورها بوده است. نتایج همچنین نشان داد که همه تیمارها از نظر رنگ در حد عالی باقی ماندند. مطالعه Ibrahim و Desouky در سال ۲۰۰۹ (Ibrahim and Desousky, 2009) نشان داد که اثرات متابولیت‌های باکتریایی روی pH فیله‌های ماهی که بدلیل تشکیل نیتروژن پایه فرار که خود باعث تغییرات بیوشیمیایی در دماهای پایین می‌شود، ناچیز بود که با مطالعه ما همخوانی داشت. با مقایسه نتایج pH در تیمارها و روزهای مطالعه هیچ‌گونه تغییر معنی‌دار در آن‌ها

مشاهده نشد و حتی در تیماری که از باکتری خالص استفاده شد، هیچ گونه تغییر معنی‌دار مشاهده نشد که احتمالا به دلیل شرایط خاص رشد باکتری به صورت بی‌هوازی بودن آن بوده است. مطالعاتی در این زمینه انجام پذیرفته‌است. Nath و همکاران در سال ۲۰۱۴ (Nath et al., 2014) از باکتری *لاکتوباسیلوس ساکی* به عنوان نگهدارنده زیستی در فیله ماهی ماکرل نگهداری شده در دمای ۶ درجه سانتی گراد استفاده نمودند. نتایج این مطالعه نشان داد که خاصیت جلوگیری کننده از رشد *لاکتوباسیلوس ساکی* بیشتر از خاصیت باکتری کشی آن روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* تلقیح شده در ماهی بود. نتایج این تحقیق همچنین نشان داد که استفاده از باکتری *لاکتوباسیلوس ساکی* به منوظر تیماربندی نمونه‌های ماهی سبب کنترل میزان ازت تام فرار و تیوباربیتوریک اسید شد که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت. Vijayabaskar و Somasundaram (۲۰۰۸) (Vijayabaskar and Somasundaram, 2008) اقدام به مطالعه تاثیر باکتری‌های مولد اسید لاکتیک روی باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* و ماندگاری ماهی تیلاپیا پرداختند. نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از باکتری مولد اسید لاکتیک باعث کاهش باکتریواستاتیک و باکتریوسیدی پاتوژن *آئروموناس هیدروفیلا* و در نتیجه کاهش میزان مرگ و میر ناشی از آن می‌شود. Ghanbari و همکاران در سال ۲۰۱۲ (Ghanbari et al., 2012) اقدام به مطالعه تاثیر تلقیح *لاکتوباسیلوس کازئی* بر کیفیت میکروبی و شیمیایی فراورده های دودی ماهی سفید نمودند. نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از *لاکتوباسیلوس کازئی* موجب کاهش تعداد *لیستریا مونوسایتوژنز* و انتروباکتریاسه ها در نمونه های ماهی شد. همچنین میزان نیتوروژن فرار کل در طی مدت زمان نگهداری در نمونه های ماهی تیمار شده با *لاکتوباسیلوس کازئی* کمتر از نمونه های شاهد بود ($P\leq ۰/۰۵$).

نتیجه گیری کلی

تحقیق حاضر احتمالا اولین مطالعه در زمینه استفاده از *لاکتوکوکوس لاکتیس* به منظور افزایش مدت زمان ماندگاری نمونه‌های فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان نگهداری شده در شرایط یخچالی در ایران می‌باشد. نتایج این مطالعه نشان‌دهنده تاثیر بالقوه استفاده از *لاکتوکوکوس لاکتیس* به منظور تعویق در ایجاد فساد شیمیایی (کنترل فاکتور های شیمیایی pH، تیوباربیتوریک اسید و نیتروژن فرار کل) و میکروبی (کنترل تعداد باکتری های مزوفیل هوازی، سرمادوست و سرماگرا و کپک و مخمر) و بهبود امتیازات داده شده به فاکتورهای حسی طعم، بو، بافت و رنگ شد. همچنین تیماربندی نمونه‌های ماهی سوپرناتانت باکتری نیز می‌تواند موجب تعویق در بروز فساد شیمیایی و میکروبی و بهبود خصوصیات حسی ماهی شود که این اثرات با افزایش غلظت سوپرناتانت تا ۶۰ درصد افزایش می‌یابد. با این وجود مطالعات بیشتری نیاز است تا تاثیر دقیق باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* روی مدت زمان نگهداری و تعویق روند فساد ماهی قزل آلای رنگین کمان مشخص شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مطالعه حاضر از شرکت دانش بنیان نام آوران جوان زیست فن گستر اسپوتا و مرکز تحقیقات آرتمیای کشور به جهت همکاری در زمینه نمونه گیری و اخذ مجوزات لازم، کمال تشکر و قدردانی را دارند. همچنین از معاونت پژوهش و فن آوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران نیز تشکر به عمل می آید.

منابع

۱. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. (۲۰۰۳). شمارش باکتری های سرمادوست و سرماگرا در غذا و خوراک دام. استاندارد شماره ۲۶۲۹. کرج.

2. AOCS (Association of Official Methods Analytical Chemists). 2001. 2-Thiobarbituric acid value. Direct method. In Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. Fifteenth addition. USA, Washington, D.C. 19-90.

3. Benjakul, S., Yarnpakdee, S., Visessanguan, W., Phatcharat, S. 2010. Combination effects of whey protein concentrate and calcium chloride on the properties of goatfish surimi gel. J Text Studies. 41: 341-357.

4. Binsi, P.K., Viji, P., Visnuvinayagam, S., Ninan, G., Sangeeta, G., Triveni, A., Ravishankar, C.N. 2015. Microbiological and shelf life characteristics of eviscerated and vacuum packed freshwater catfish (*Ompok pabda*) during chill storage. J Food Sci Technol. 52: 1424-33.

5. Chowdhury, S., Ray Chowdhury, U., Dora, K. C. 2012: competitive Inhibition of Staphylococcus aureus in Vacuum Packed Fish Fillet by Lactic Acid Bacteria. Asian J Anim Sci. 7: 108-113.

6. Erkan, N., Özden, Ö., Inugur, M. 2007. The effects of modified atmosphere and vacuum packaging on quality of chub mackerel. Int J Food Sci Technol. 42: 1297-1304.

7. Fernandes, P. 2016. Enzymes in fish and seafood processing. Front Bioeng Biotechnol. 4: 59.

8. Ghanbari, M., Rezaei, M., Soltani, M., and Shahhosseini, Gh. 2011. The effect of inoculation of *Lactobacillus casei* as a biopreservative strain on the microbiological and chemical quality of smoked roach. Food Sci Technol. 8: 27-34.

9. Gulhan, M.D.S. 2012. Effects of propolis on microbiologic and biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after exposure to the pesticide. Iran J Fish Sci. 11: 490-503.

10. Herlich, K. 1990. Thiobarbituric acid value. Direct method. In Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society (Association of Official Methods Analytical Chemists). Fifteenth addition. USA, Washington, D.C. 771.

11. Hisar, S.A., Kaban, C., Yanik, O.H.T., Kaya, M. 2005. Effect of Lactobacillus sakei Lb706 on Behavior of Listeria monocytogenes in Vacuum-Packed Rainbow Trout Fillets. Turk J Vet Anim Sci. 29: 1039-1044.

12. Ibrahim, S.M., Desouky, S.G. 2009. Effect of antimicrobial metabolites produced by lactic acid bacteria (lab) on quality aspects of frozen Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets. World J Fish Marine Sci. 1: 40-45.

13. Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., Fakiri, E.M. 2013. Health benefits of probiotics: a review. ISRN Nutr. 2013: 481651.

14. Khalili Tilami, S., Sampels, S., Zajíc, T., Krejsa, J., Másílko, J., Mráz, J. 2018. Nutritional value of several commercially important river fish species from the Czech Republic. Peer J. 6: e5729.

15. Nath, S., Chowdhury, S., Dora, K.C. 2014. Effect of lactic acid bacteria application on shelf life and safety of fish fillet at 6±1°c. Int J Adv Res. 2: 201-207.

16. Rodrigues, B.L., Canto, A.C.V.D.C.S., Costa, M.P.D., Silva, F.A.D., Mársico, E.T., Conte-Junior, C.A. 2017. Fatty acid profiles of five farmed Brazilian freshwater fish species from different families. Plos One. 12: e0178898.

17. Santo, M.L.P.E., Beirão, L.H., Sant'Anna, E.S., Dalcin, E.B., Franco, B.G.M. 2003. Bacteriocinogenic Effect of *Lactobacillus sakei* 2a on Microbiological Quality of Fermented *Sardinella Brasiliensis*. Braz Arch Biol Technol. 46: 553-561.

shrimp maturation. Pes Agropec Bras Brasília. 51: 1799-1805.
23. Vijayabaskar, P., Somasundaram, S.T. 2008. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from fish gut and probiotic activity against common freshwater fish pathogen *Aeromonas hydrophila*. Biotechnol. 7: 124-128.
24. Wackett, L.P. 2016. Lactic acid bacteria: An annotated selection of World Wide Web sites relevant to the topics in microbial biotechnology. Microb Biotechnol. 9: 525-6.
25. Wang, H., Zhang, X., Wang, G., Jia, K., Xu, X., Zhou, G. 2017. Bacterial community and spoilage profiles shift in response to packaging in yellow-feather broiler, a highly popular meat in Asia Front Microbiol. 8: 2588.
26. Zpata, A.A. 2013. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Nile Tilapia intestine (*Oreochromis niloticus*). J Biol Life Sci. 4: 164-171.
18. Schillinger, U., and Lucke, F.K.1987. Identification of *Lactobacilli* from meat and meat products. Food Microbiol. 4: 199–208.
19. Shen, S., Jiang, Y., Liu, X., Luo, Y., Gao, L. 2015. Quality assessment of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during super chilling and chilled storage. J Food Sci Technol. 52: 5204-11.
20. Shi, L.H., Balakrishnan, K., Thiagarajah, K., Mohd Ismail, N.I., Yin, O.S. 2016. Beneficial Properties of Probiotics. Trop Life Sci Res. 27: 73-90.
21. Sudalayandi, K., Manja, M. 2011. Efficacy of lactic acid bacteria in the reduction of trimethylamine-nitrogen and related spoilage derivatives of fresh Indian mackerel fish chunks. Afr J Biotechnol. 10: 42-47.
22. Vieira, G.R.A.S.V., Soares, M., Bolívar Ramírez, N.C., Schleder, D.D., da Silva, B.C., Mouriño, J.L.P., Andreatta, E.R., Vieira, F.d.N. 2016. Lactic acid bacteria used as preservative in fresh feed for marine

Study of the effect of incorporation of *Lactococcus lactis* on the shelf life of rainbow trout fillet in glacial condition

Abbaspour Anbi A[1], Razavilar V[1*], Neyriz Naghadehi M[2], Asadpour Osalou YA

1. Department of Food Hygiene and Quality Control, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Department of Food Hygiene and Quality Control, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran.

3. National Artemia Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Urmia, Iran.

***Corresponding author:** *v.razavii@yahoo.com*

Received: 28 April 2019 Accepted: 30 July 2019

Abstract

The present study was conducted to evaluate the effect of *Lactococcus lactis* and its supernatant inclusion in order to increase the shelf-life of rainbow trout fillets stored in the refrigerator. Forty-five pieces of cultured rainbow trout with a total weight of 30 kg were prepared and were immersed in solutions of *L. lactis* with a dilution of 10^6 $CFUml^{-1}$ and its supernatant with percentages of 30 and 60. In order to monitor the corruption procedure of fillet samples, chemical, microbial and sensory factors were analyzed on days 0, 5, 10 and 15. Control fillet samples had the highest and samples of fillets treated with pure bacteria contained the lowest number of microorganisms ($P\leq0.05$). The mean log of the number of psychrophilic, psychotropic, mesophilic bacteria, yeast and mold per each gram of fillet was significantly lower than that of control ($P\leq0.05$). The effect of lactic acid bacteria and supernatant on the reduction of thiobarbituric acid and total volatile nitrogen at the end of storage time was significant ($P\leq0.05$) but were not significant on pH changes ($P>0.05$). The use of pure bacteria increased the points given to sensory factors. Samples treated with pure bacteria and supernatants were in good condition in term of taste at the end of the maintenance period while other treatments were unusable. Considering the results, *L. lactis* and its supernatant is suggested improving the shelf life of rainbow trout fillets.

Keywords: *Lactococcus lactis***,** Rainbow trout, Microbial spoilage, Chemical spoilage, Sensory properties.