

تأثیر ضد اکسیدانی و باکتریایی نایسین ریزپوشانی شده با نانو لیپوزوم در فیله ماهی کپور نقره ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) در دمای یخچال ($4 \pm 1^\circ \text{C}$)

زهرة یساری^(۱)، سید روح الله جوادیان^{(۲)*}، محمد رضا سعیدی اصل^(۳)

ro.javadian@gmail.com

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد مهندسی شیلات- دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائمشهر.

۲- استادیار گروه شیلات دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائمشهر.

۳- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار

تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۳

چکیده

قابلیت فساد پذیری بالای ماهیان سبب شده تا حفظ کیفیت ماهی تازه، یکی از مسائل مهم در فرآوری ماهی باشد. هدف این مطالعه، ارزیابی اثر ضد باکتریایی و اکسیدانی نایسین ریزپوشانی شده با نانولیپوزوم روی فیله ماهی کپور نقره ای هنگام نگهداری در یخچال بود. فیله های ماهی، توزین گشته و نایسین ریزپوشانی شده با نانولیپوزوم با دو واحد حجمی ۷۰۰ و ۱۰۰۰ IU به فیله ها اسپری شدند. سپس فیله ها بسته بندی شده و درون یخچال نگهداری شدند. شاخص های مورد بررسی در طول زمان نگهداری شامل شاخص های شیمیایی (عدد پراکسید، مواد واکنشگر با تیوباربتوریک اسید (TBARS) و مجموع بازهای نیتروژنه فرار) و باکتریایی (شمارش باکتریهای کل و باکتریهای سرمادوست) در زمانهای ۰، ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ روز مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد، تمامی شاخص ها در نمونه های شاهد، بالاتر از تیمار حاوی نایسین ریزپوشانی شده بود، یعنی اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($p < 0/05$). شاخص های میکروبی در تیمارهای دارای نایسین ریزپوشانی شده با نانولیپوزوم در آغاز دوره دارای روند افزایشی بوده و از آن پس با سرعت رشد کمتری نسبت به نمونه های شاهد افزایش یافت. شاخص های شیمیایی نیز در تیمارهای حاوی نایسین نسبت به تیمار شاهد با شیب کمتری افزایش یافت. بنابراین استفاده از نگهدارنده طبیعی مانند نایسین ریزپوشانی شده با نانولیپوزوم هنگام نگهداری فیله ماهیان در یخچال سبب افزایش ماندگاری فیله خواهد شد. بهترین فرمول پیشنهادی با مقایسه دو غلظت آزمایش شده، استفاده از نایسین انکپسوله با واحد حجمی ۱۰۰۰ IU است.

کلمات کلیدی: ریزپوشانی شده، زمان ماندگاری، فیله کپور نقره ای، نانولیپوزوم، نایسین.

۱. مقدمه

ماهیان پرورشی نقش به سزایی در رفع نیاز غذاهای پروتئینی حاصل از آبزیان ایفا می کنند. غذاهای دریایی دارای تمام اسیدهای آمینه ضروری به مقدار و نسبت لازم می باشند (۱). از مهمترین ماهیانی که پرورش آنها در ایران متداول است و سازگاری بسیار خوبی با اقلیم های متنوع ایران دارد، ماهی کپور نقره ای (فتوفانگ) (*Hypophthalmichthys molitrix*) می باشد. این ماهی در فصل تولید به میزان انبوه از مزارع پرورشی برداشت می شود.

آبزیان و به ویژه ماهی ها، به دلیل pH مناسب عضله ($pH > 6$)، حضور مقادیر بالای نیتروژن غیر پروتئینی (NPN)، مقادیر بالای اسیدهای غیراشباع، حضور آنزیم های اتولیز کننده و... در مقایسه با سایر محصولات گوشتی، زمان ماندگاری کوتاهتری دارند (۸). نسبت به فساد بسیار حساس بوده و سریع تر از سایر غذاهای گوشتی فاسد می شوند (۷). معمولاً بروز واکنش های آنزیمی و شیمیایی، سبب افت اولیه در تازگی ماهی می شود در حالی که فعالیت های میکروبی مسول فساد ثانویه و تعیین کننده زمان ماندگاری ماهی هستند (۲۸). بنابراین، استفاده از موادی مناسب با فعالیت آنتی باکتریایی و آنتی اکسیدانی به منظور بهبود کیفیت، افزایش عمر ماندگاری و همچنین جلوگیری از ضررهای اقتصادی، ضروری و مفید به نظر می رسد (۳۵).

نگهدارنده ها ترکیباتی هستند که برای به تأخیر انداختن و یا ممانعت از فساد شیمیایی و یا میکروبی غذا استفاده می شوند. دسته ای از مواد نگهدارنده که امروز مورد توجه بسیاری هستند، نگهدارنده های طبیعی می باشند که از مهم ترین آنها نایسین است. نایسین، پپتیدی حاوی ۳۴ آمینو اسید از گروه A لنتی-بیوتیک^۱ هاست، که از باکتری های لاکتوباسیلوس لاکتیس^۲

تولید می شود و استفاده از آن به منظور افزایش مدت زمان ماندگاری و کنترل باکتری های نامطلوب در بسیاری از مواد غذایی رایج می باشد (۱۳ و ۱۶). مهمترین علت استفاده از نایسین به عنوان نگهدارنده طبیعی این است که این ماده کاملاً بی ضرر است، توسط پروتئازهای دستگاه گوارش به اسیدهای آمینه تشکیل دهنده آن تجزیه می شود و تغییری در خواص ارگانولپتیک مواد غذایی ایجاد نمی کند (۹).

عملکرد نایسین بر اساس ارگانوسم هدفش به ۳ گروه اصلی تقسیم می شود:

- ممانعت از فساد ماده غذایی با از بین بردن باکتری های تولید کننده اسپور

- ممانعت از فساد میکروبی ایجاد شده توسط باکتری های اسید لاکتیک

- از بین بردن یا ممانعت از عملکرد باکتری های گرم مثبت بیماریزا مانند باسیلوس سرئوس، کلاستریدیوم بوتولینوم و لیستریا مونوسیتوژنز (۳۱).

با وجود اینکه نایسین به طور وسیعی به عنوان ماده ضد باکتری طبیعی موثر بر علیه بسیاری از میکروبهای بیماریزای غذا، مورد استفاده قرار می گیرد، اما این امر به اثبات رسیده است که کارایی ضد میکروبی آن به مقدار زیادی به علت واکنش با محتویات ماده غذایی مانند پروتئین ها، لیپیدها، آنزیم ها و یون ها کاهش می یابد. از این رو بسیاری از محققین روشهای انتقالی را برای مواد ضد میکروبی معرفی کرده اند تا آزادسازی پایدار را برای این مواد فراهم سازد و تأثیر محتویات غذا را بر این مواد به حداقل خود کاهش دهد (۳۴).

از طرفی استفاده از نایسین در فرم آزاد اقتصادی نمی باشد (۲۷). بنابراین انجام مطالعات تحقیقی بیشتر جهت حفظ اثر و افزایش کارایی این نگه دارنده بیولوژیک در مواد غذایی ضروری می

^۱. Lantibiotics

^۲. Lactic Acid Bacteria

دستی (در شرایط آزمایشگاه با دمای تقریبی ۲۵ درجه سانتی-گراد)، از هر ماهی ۴ فیله با وزن نسبی ۵۰ گرم، که دو فیله از قسمت دوم و دو فیله نیز از قسمت شکمی ماهی با چاقو استریل و تیز جدا گردید، برای انجام تیمارهای مختلف آماده گردید.

دو غلظت از نایسین انکپسوله شده با واحد حجمی (IU ۷۰۰، IU ۱۰۰۰) به روش اسپری به فیله کپور نقره‌ای اضافه شد. $\times (3) \times (2) \times (1)$ نایسین انکپسوله $36 = (6) \times \text{زمان}$ $18 = (6) \times \text{زمان} \times (3) \times \text{تکرار} \times (1)$ شاهد $54 = 36 + 18$

محلول ۲/۵٪ نایسین (شرکت serva، آمریکا) که حاوی IU/mg ۱۰۰۰ (واحد بین‌المللی بر میلی‌گرم) ماده خشک (۷۵٪ کلرید سدیم و ۲۲/۵٪ شیر خشک) بوده تهیه شد (۴). محلول نایسین ۲/۵٪ با غلظت ۶ میلی‌گرم ماده جامد در ۱ میلی‌لیتر حلال (اتانول آبدار ۵۰٪ v/v) تهیه شده و به مدت ۶ ساعت با هم‌زن بهم زده که دمای درونی آن °C ۱۰۵ و دمای بیرونی آن نیز متعاقباً °C ۶۸ بود (۳۴). ماده‌ای که برای ریزپوشانی کردن مورد استفاده قرار گرفته نانولیپوزوم (Merck، آلمان) بوده که به شکل تجاری تهیه و ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه با اسیدلینولئیک (Merck، آلمان) به مقدار ۰/۱۳۰ درصد (بعنوان سورفاکتانت) در دمای ۴۰ درجه به هم زده شده (pH=۴/۵) (۳۴).

پس از پایان زمان انکوباسیون، نایسین به مخلوط لیپوزوم و سورفاکتانت اضافه شده و به مدت ۲ ساعت در دمای محیط مخلوط به هم زده شد. مخلوط مذکور در دستگاه خشک‌کن پاششی (UK Ltd Yo14 OPH Lab-plant، انگلستان) با سرعت ۵/۲۶ ml/min یا ۱۰۰٪ هوادهی، در حالتی قرار گرفت که دمای ورودی ۱۰۵ درجه و دمای خروجی ۶۸ درجه خشک شد (۳۰).

باشد. یکی از راهکارها برای غلبه بر این محدودیت‌ها ریزپوشانی^۳ کردن نایسین در گویچه‌های فسفولیپیدی نظر لیپوزوم می‌باشد. ریزپوشانی کردن نایسین سبب کاهش فعالیت نایسین با مواد غذایی می‌شود و ممکن است خاصیت ضدباکتریایی آن را در مواد غذایی بهبود بخشد (۲۰ و ۳۲).

لیپوزوم‌ها، گویچه‌های کوچکی هستند که از لیپیدهای دو گانه دوست^۴ تشکیل شده‌اند. وجود دو فاز لیپیدی و آبی در ساختار گویچه‌های لیپیدی آنها رابرای گیر انداختن، انتقال و رهاسازی مواد قابل حل در آب، قابل حل در چربی و مواد دو قطبی مناسب می‌کند (۱۴). به دلیل توجه روزافزون به نگهدارنده‌های طبیعی، مطالعات متعددی پیرامون اثرات ضدباکتریایی نایسین در محیط آزمایشگاهی صورت گرفته است، اما مطالعات اندکی در زمینه تأثیر این ماده در فرآورده‌های گوشتی خام به ویژه گوشت ماهی انجام شده است.

در حال حاضر نایسین به عنوان یک افزودنی غذایی در بیش از ۵۰ کشور مجاز شناخته شده است. مقدار استفاده از نایسین در اغلب غذاها بین ۲/۵ تا ۱۰۰ ppm است (۶). بنابراین هدف از این تحقیق، استفاده از ماده‌ی نگه‌دارنده نایسین ریزپوشانی شده با نانولیپوزوم و تأثیر ضداکسیدانی و ضدباکتریایی آن بر فیله کپور نقره‌ای بوده است.

۲. مواد و روشها

برای انجام آزمایش در خردادماه، ماهی‌های فیتوفاگ موردنیاز به تعداد ۱۴ عدد با میانگین وزنی 900 ± 50 گرم، از یکی از استخرهای منطقه واقع در ساری خریداری شده و با رعایت شرایط صحیح (قرار دادن در جعبه‌های عایق پر از یخ) به آزمایشگاه پژوهشکده اکولوژی دریای خزر واقع در ساری منتقل شده و پس از سرزنی، تخلیه امعا و احشاء، کندن پوست و استخوان‌گیری ماهیان به صورت

³. Encapsulation

⁴. Amphipatic

آماري از نرم افزار SPSS17 استفاده شد. خطای مجاز برای H_0 ، ۵ درصد در نظر گرفته شد ($p < 0.05$).

۳. نتایج

آنالیز میکروبی

شمارش کل باکتری‌ها (TVC)

نتایج آنالیز شمارش کل باکتری‌ها، در جدول ۱ نشان داده شده است. طبق نتایج حاصله، میزان کل باکتری‌های قابل رویت در تمامی تیمارها در طول زمان روند افزایشی داشت، یعنی در روز صفر کمترین و در روز ۱۵ بیشترین مقدار را داشت. همچنین اختلاف معنی دار بین زمان‌های مختلف آزمایش مشاهده شد ($p < 0.05$). کمترین میزان شمارش باکتری‌های کل در روز ۱۵ در نمونه حاوی نایسین ریز پوشانی شده 1000 IU ($7/25 \pm 0/02$) و نیز بیشترین میزان شمارش باکتری‌های کل در روز ۱۵ در نمونه شاهد فاقد نگهدارنده مشاهده شد ($9/42 \pm 0/07$). در این شاخص، غلظت بین دو تیمار نایسین ریز پوشانی شده در روز ۱۲ نگهداری دارای اختلاف معناداری بود.

سپس فیله‌ها را، با کپسول‌های نایسین به دست آمده با این روش، با دو غلظت 700 IU و 1000 IU به صورت دستی اسپری گردید (۳۴). سپس نمونه‌ها به صورت هوای درون ظرف‌های یکبار مصرف سر بسته بسته بندی شده و درون یخچال ($4 \pm 1^\circ \text{C}$) به مدت ۱۵ روز نگهداری شوند و به فاصله زمانی هر ۳ روز یک بار از نظر پارامترهای میکروبی و شیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند.

اندازه گیری شاخص‌های شیمیایی عدد پراکسید (PV) از روش پیرسون (۲۵) و اندازه گیری تیوباریتوریک اسید به روش Hedayatifard و همکاران صورت گرفت (۱۰). مقدار بازهای نیتروژنی فرار (TVB-N) مطابق روش (۲) محاسبه گردید. تعداد باکتری‌های کل (۳) و باکتری‌های سر مادوست (۱۷) در محیط کشت TSA (Tryptic Soy Agar) به ترتیب در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت و در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ روز با شمارش کلنی-های موجود بر روی محیط کشت صورت گرفت. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصل از دو تیمار از آنالیز واریانس دو طرفه (ANOVA) و برای بررسی تفاوت بین میانگین‌ها در زمان‌های مختلف برای یک تیمار و انجام آنالیزهای

جدول ۱- تفاوت بین مقادیر میانگین شمارش باکتری‌های کل (Log CFU/g) در زمانهای مختلف نگهداری برای هر تیمار

تیمار	روز	۰	۳	۶	۹	۱۲	۱۵
شاهد (فاقد نگهدارنده)		$3/4 \pm 0/12$ *fA	$4/78 \pm 0/07$ eA	$6/31 \pm 0/07$ dA	$7/49 \pm 0/05$ cA	$8/49 \pm 0/05$ bA	$9/42 \pm 0/07$ aA
1000 IU نایسین ریز پوشانی شده		$3/30 \pm 0/05$ fB	$4/27 \pm 0/04$ eB	$5/3 \pm 0/05$ dB	$6/28 \pm 0/01$ cB	$6/8 \pm 0/04$ bB	$7/26 \pm 0/01$ aB
1000 IU نایسین ریز پوشانی شده		$3/31 \pm 0/07$ fB	$4/22 \pm 0/02$ eC	$5/23 \pm 0/03$ dB	$6/22 \pm 0/03$ cC	$6/62 \pm 0/04$ bB	$7/25 \pm 0/02$ aB

* داده‌ها براساس (انحراف معیار \pm میانگین) است.

حروف کوچک متفاوت در هر سطر نشان دهنده اختلاف معنی دار ($p < 0.05$) در روزهای مختلف برای یک تیمار مشخص و حروف بزرگ متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار در یک روز برای تیمارهای مختلف می‌باشد.

دارای تفاوت معنادار بین دو غلظت به جز روزهای ۰ و ۳ و ۹ نگهداری می‌باشد ($p < 0.05$).
در نمونه حاوی نایسین ریزپوشانی شده 700 IU ($7/17 \pm 0.03$) و بیشترین میزان شمارش باکتری‌های سرمادوست در روز ۱۵ نیز در نمونه شاهد فاقد نگهدارنده مشاهده شد ($9/23 \pm 0.02$). غلظت اختلاف معناداری بین تیمارهای نایسین ریزپوشانی شده نداشت.

نتایج تغییرات باکتری‌های سرمادوست، در جدول ۲ نشان داده شده است. طبق نتایج حاصله، میزان باکتری‌های سرمادوست در تمامی تیمارها در طول زمان روندی افزایشی داشت، همچنین اختلاف معنی‌دار بین زمان‌های مختلف به جز روز صفر بین تیمارها آزمایش مشاهده شد ($p < 0.05$).
کمترین میزان شمارش باکتری‌های سرمادوست در روز ۱۵

جدول ۲- تفاوت بین مقادیر میانگین شمارش باکتری‌های سرمادوست (Log CFU/g) بر فیله فیتوفاگک در یخچال

روز						تیمار
۱۵	۱۲	۹	۶	۳	۰	
aA $9/23 \pm 0.02$	bA $8/26 \pm 0.05$	cA $7/23 \pm 0.03$	dA $6/14 \pm 0.02$	eA $4/4 \pm 0.05$	fA $* 3/23 \pm 0.01$	شاهد (فاقد نگهدارنده)
aB $7/17 \pm 0.03$	bB $6/37 \pm 0.03$	cB $6/13 \pm 0.01$	dB $5/15 \pm 0.02$	eA $4/14 \pm 0.03$	3/27 ± 0.05 fA	نایسین ریزپوشانی شده 700 IU
aB $7/23 \pm 0.01$	bC $6/26 \pm 0.05$	cB $6/13 \pm 0.02$	dB $5/12 \pm 0.02$	eA $4/12 \pm 0.01$	3/24 ± 0.04 fA	نایسین ریزپوشانی شده 1000 IU

* داده‌ها بر اساس (انحراف معیار \pm میانگین) است.

حروف کوچک متفاوت در هر سطر نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$) در روزهای مختلف برای یک تیمار مشخص و حروف بزرگ متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در یک روز برای تیمارهای مختلف می‌باشد.

آنالیز شیمیایی

مجموع بازهای نیتروژنی فرار (TVB-N)

($p < 0.05$). کمترین مقدار مجموع بازهای نیتروژنی فرار در روز ۱۵، در نمونه حاوی نایسین ریزپوشانی شده 700 IU ($32/50 \pm 0.42$) مشاهده و بیشترین مقادیر مجموع بازهای نیتروژنی فرار در روز ۱۵ نیز در نمونه شاهد فاقد نگهدارنده مشاهده شد (41 ± 0.41). تیمارهای نایسین ریزپوشانی شده

مقادیر بازهای نیتروژنی فرار در جدول ۳ نشان داده شده است. مطابق نتایج، در تمامی تیمارها بین زمان‌های مختلف آزمایش به جز روز صفر اختلاف معنی‌داری وجود داشت

جدول ۳- تغییرات مجموع بازهای نیتروژنی فرار (میلیگرم در ۱۰۰ گرم بافت) در زمان‌های مختلف نگهداری بر فیله کپور نقره‌ای

روز						تیمار
۱۵	۱۲	۹	۶	۳	۰	
۴۱±۰/۴۱aA	۳۴/۴۱±۰/۰۴bA	۳۰/۳۸±۰/۰۴cA	۲۳/۱۸±۰/۳۶dA	۱۶/۳۱±۰/۱۴eA	۹/۳۲±۰/۰۴ *fA	شاهد (فاقد نگهدارنده)
۳۲/۵۰±۰/۴۲aB	۲۹/۱۲±۰/۶۵bB	۲۲/۹۸±۰/۴۸cB	۱۶/۲۳±۰/۲۹dA	۱۴/۴۷±۰/۰۸eA	۹/۳۵±۰/۰۲fA	نایسین ریزپوشانی شده ۷۰۰IU
۳۲/۵۷±۰/۰۴aC	۲۴/۷۸±۰/۵۷bC	۲۳/۴۸±۰/۶۶cB	۲۰/۴۶±۰/۹۸dB	۱۴/۴۵±۰/۰۸eB	۹/۳۵±۰/۰۵fA	نایسین ریزپوشانی شده ۱۰۰۰IU

* داده‌ها بر اساس (انحراف معیار ± میانگین) است.

حروف کوچک متفاوت در هر سطر نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$) در روزهای مختلف برای یک تیمار مشخص و حروف بزرگ متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در یک روز برای تیمارهای مختلف می‌باشد.

مقادیر عدد پراکسید (PV)

در روز ۱۵ در نمونه حاوی نایسین ریزپوشانی شده ۱۰۰۰ IU مشاهده (۴/۳۳±۰/۰۴) و بیشترین میزان پراکسید در روز ۱۵ نیز در نمونه شاهد فاقد نگهدارنده مشاهده شد (۹/۸۲±۰/۰۴). غلظت بین تیمارهای نایسین دارای اختلاف معناداری در روزهای ۰ و ۱۲ نگهداری نبود.

روند تغییرات پراکسید، در جدول ۴ نشان داده شده است. مطابق نتایج، در تیمارها بین زمان‌های مختلف آزمایش به جز روز صفر اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p < 0.05$). طی ۱۵ روز نگهداری در دمای یخچال، میزان پراکسید در تمامی تیمارها روند افزایشی داشت. کمترین میزان پراکسید

جدول ۴- نتایج تغییرات عدد پراکسید (میلی‌اکی‌والان اکسیژن در کیلوگرم روغن) تیمارهای فیله ماهی کپور نقره‌ای با نایسین ریزپوشانی شده در نانولیپوزوم

روز						تیمار
۱۵	۱۲	۹	۶	۳	۰	
aA۹/۸۲±۰/۰۴	bA۶/۴۴±۰/۰۲	cA۴/۳۲±۰/۰۶	dA۲/۵۹±۰/۰۵	eA۱/۸۴±۰/۰۳	fA * ۱/۴±۰/۰۴	شاهد (فاقد نگهدارنده)
aB۴/۴۹±۰/۰۴	bB۳/۶±۰/۰۵	cA۳/۲±۰/۰۳	dB۱/۶۷±۰/۰۲	eB۱/۴۸±۰/۰۳	۱/۳۲±۰/۰۲fA	نایسین ریزپوشانی شده ۷۰۰IU
aC۴/۳۳±۰/۰۴	bB۳/۵۸±۰/۰۳	cB۳/۳۴±۰/۰۲	dC۲/۳۴±۰/۰۳	eC۱/۴۲±۰/۰۲	۱/۳۲±۰/۰۱fA	نایسین ریزپوشانی شده ۱۰۰۰IU

* داده‌ها بر اساس (انحراف معیار ± میانگین) است.

حروف کوچک متفاوت در هر سطر نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$) در روزهای مختلف برای یک تیمار مشخص و حروف بزرگ متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در یک روز برای تیمارهای مختلف می‌باشد.

مقادیر تیوباریتوریک اسید (TBA)

تغییرات تیوباریتوریک اسید در جدول ۵ نشان داده شده است. مطابق نتایج، در بیشتر تیمارها بین زمان های مختلف به جز روز صفر آزمایش اختلاف معنی داری وجود داشت ($p < 0.05$)، ولی در نمونه شاهد بین زمان های ۶ و ۹ روز تفاوت معناداری دیده نشد. کمترین مقدار تیوباریتوریک

اسید در روز ۱۵ نگهداری، در نمونه نایسین ریزپوشانی شده 1000 ± 0.03 IU و بیشترین مقادیر تیوباریتوریک اسید در روز ۱۵ نیز در نمونه شاهد فاقد نگهدارنده مشاهده شد ($3/85 \pm 0.02$). در تیمارهای نایسین ریزپوشانی شده با نانولیپوزوم، تفاوت معنادار آماری در روزهای ۶ و ۹ و ۱۲ نگهداری بین دو غلظت ۷۰۰ و ۱۰۰۰ IU مشاهده شده است ($p < 0.05$).

جدول ۵- تغییرات تیوباریتوریک اسید (میلی گرم مالون دی آلدئید در کیلوگرم بافت) تیمارهای فیله کپور نقره ای با نایسین ریزپوشانی شده در نانولیپوزوم

تیمار	روز	۰	۳	۶	۹	۱۲	۱۵
شاهد (فاقد نگهدارنده)		$eA_{0/94 \pm 0.01}^*$	$dA_{1/74 \pm 0.05}$	$cA_{2/87 \pm 0.03}$	$cA_{2/92 \pm 0.06}$	$bA_{3/37 \pm 0.03}$	$aA_{3/85 \pm 0.02}$
نایسین ریزپوشانی شده ۷۰۰ IU		$fA_{0/95 \pm 0.01}$	$eB_{1/55 \pm 0.07}$	$dB_{2/45 \pm 0.02}$	$cB_{2/71 \pm 0.05}$	$bB_{2/85 \pm 0.03}$	$aB_{3/14 \pm 0.03}$
نایسین ریزپوشانی شده ۱۰۰۰ IU		$fA_{0/94 \pm 0.01}$	$eB_{1/58 \pm 0.03}$	$dC_{2/4 \pm 0.02}$	$cB_{2/44 \pm 0.01}$	$bC_{2/6 \pm 0.04}$	$aB_{2/92 \pm 0.03}$

* داده ها بر اساس (انحراف معیار \pm میانگین) است.

حروف کوچک متفاوت در هر سطر نشان دهنده اختلاف معنی دار ($p < 0.05$) در روزهای مختلف برای یک تیمار مشخص و حروف بزرگ متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار در یک روز برای تیمارهای مختلف می باشد.

۴. بحث

بیشترین حد پیشنهاد شده برای شمارش باکتریایی کل در ماهی $7 \log CFU/g$ است (۲۸). در مطالعه حاضر نیز بار باکتریایی با گذشت زمان نگهداری افزایش یافت اما تا روز ۹ نگهداری بار باکتریایی کل، برای همه تیمارها کمتر از ۷ بود (به جز تیمار شاهد)، اما نمونه نایسین ریزپوشانی شده در روز ۱۵ نگهداری به بالاتر از این حد رسیده است که این موضوع احتمالاً ناشی از ریزپوشانی کردن نایسین و در نتیجه اثر ضد میکروبی آن می باشد.

اثرات قابل توجه نایسین بر رشد میکروبی در محصولات فرآوری شده ماهی احتمالاً به فاکتورهای متعددی مثل غلظت نایسین مورد استفاده، روش استفاده از نایسین، زمان غوطه وری، گونه ماهی، نوع محصول، درجه ی آلودگی میکروبی و وضعیت نگهداری بستگی دارد (۱۲). با توجه به نتایج، یک دوره ماندگاری تقریباً ۱۴-۱۵ روزه را با توجه به بار باکتریایی موجود برای ماهی مورد مطالعه می توان در نظر گرفت.

باکتری سرما دوست گرم منفی گروه اصلی میکروارگانیزم-های عامل فساد ماهی نگهداری شده در دماهای سرد هستند

ایجاد نمی‌کند، اما ممکن است منجر به ایجاد خطرهایی برای مصرف‌کننده شود (۲۲). پراکسیدها ترکیبات بدون طعم و بو هستند، نمی‌توانند به وسیله مصرف‌کنندگان تشخیص داده شوند ولی این ترکیبات سبب به وجود آمدن ترکیبات ثانویه مثل آلدئیدها و کتون‌ها می‌شوند که سبب بد شدن بو و طعم می‌شوند (۲۴). طبق نظر Xioa در سال ۲۰۱۰، کارایی ضد میکروبی نایسین به مقدار زیادی به علت واکنش با محتویات ماده غذایی مانند پروتئین‌ها، لیپیدها، آنزیم‌ها و یون‌ها کاهش می‌یابد و ریزپوشانی کردن نایسین می‌تواند موجب شود تا از تأثیر این مواد بر نایسین جلوگیری شود. افزودن ترکیبات ضد میکروبی طبیعی مثل نایسین ریزپوشانی شده با نانولیپوزوم باعث کاهش میزان پراکسید تیمارها در کل دوره نگهداری و در نهایت افزایش عمر و نگهداری مواد غذایی می‌شود. حد قابل قبول پیشنهادی برای میزان پراکسید ۱۰ میلی‌اکی‌والان پراکسید بر کیلوگرم روغن ماهی می‌باشد (۲۱).

بنابراین با توجه به نتایج، در تیمارها هیچ یک از تیمارها تا روز ۱۵ نگهداری از حد مجاز خود عبور نکردند و عمر ماندگاری فرآورده از نظر ارزش پراکسید حداقل ۱۵ روز بود. در روز ۹ نگهداری شیب تندتری از تغییرات مشاهده شد که این امر ممکن است به دلیل واکنش‌های ثانویه اکسیداسیون و تولید ترکیبات کربونیلی نظیر استالدهید، پروپیونالدهید و استن و اسیدهای چرب فرار نظیر اسید کاپروئیک، اسید پروپیونیک و گازهای فرار باشد (۳۳). روند تغییرات پراکسید در تیمارهای شاهد نسبت به تیمارهای دیگر سریع‌تر بوده است که علت آن می‌تواند ناشی از تأثیر نایسین بر کاهش جمعیت باکتری‌های لیپولیتیک که ترشح‌کننده آنزیم لیپاز است باشد.

آزمایش تیوباربتوریک اسید شاخص مناسبی برای تعیین پیشرفت اندازه‌گیری اکسیداسیون ثانویه چربی است (۵).

(۲۸). بیشترین حد پیشنهاد شده برای باکتری‌های سرمادوست در فیله ماهیان $7 \log \text{CFU/g}$ است (۲۶). با توجه به نتایج، تیمار شاهد در روز ۹ از این حد عبور کرده و در روز پایانی آزمایش، نمونه‌های ریزپوشانی شده رد شده‌اند که دلیل آن تأثیر بیشتر نایسین در فرم ریزپوشانی شده بر کاهش فعالیت باکتری‌های سرمادوست و همچنین تأثیر غلظت بالاتر بر افزایش کارایی نایسین دانست.

بازهای نیتروژنی فرار شاخص مناسبی برای ارزیابی تازگی ماهی‌های گوناگون می‌باشد. این شاخص عمدتاً بوسیله تجزیه باکتریایی گوشت تولید می‌شود (۲۴). باکتری‌های پروتئولیتیک سبب افزایش تولید ترکیبات فرار بازی می‌شوند. نایسین به دلیل خاصیت ضد باکتریایی خود بر روی این گروه از باکتری‌ها تأثیر گذاشته و باعث کاهش ظرفیت باکتری‌ها برای آمینه کردن ترکیبات نیتروژن غیر پروتئینی می‌شود (۲۳). در مطالعه کنونی، پایین‌تر بودن میزان بازهای نیتروژنی فرار در تیمارهای آغشته به نایسین ریزپوشانی شده نسبت به تیمارهای شاهد، این مطلب را تأیید می‌کند. Ojagh و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ به عنوان حد قابل قبول برای میزان بازهای نیتروژنی فرار را، ۳۰ میلی‌گرم نیتروژن را در ۱۰۰ گرم گوشت ماهی انتخاب کردند (۲۱). با توجه به نتایج، تیمار شاهد در روز ۹ و تیمار نایسین ریزپوشانی شده در روز ۱۵ از حد مجاز عبور کردند. نایسین ریزپوشانی شده 700 IU دارای کمترین میزان در روز ۱۵ می‌باشد. که این امر نشان می‌دهد که استفاده از نایسین ریزپوشانی شده منجر به بهبود در افزایش ماندگاری فیله می‌باشد زیرا نایسین با تأثیر بر روی باکتری‌های پروتئولیتیک تولید ترکیبات نیتروژنی فرار را کاهش می‌دهد.

اندازه‌گیری عدد پراکسید به منظور تعیین فساد چربی یا اکسیداسیون خود به خودی چربی (هیدروپراکسیدها) به کار می‌رود که تولید آنها تغییری در ویژگی‌های حسی ماهی

نتیجه ممانعت از کاهش فعالیت نایسین می شود. شاخص هایی شیمیایی (مقادیر پراکسید، تیوباریتوریک اسید و مجموع بازهای از ته فرار) در نمونه های نایسین ریزپوشانی شده کم تر از نمونه های شاهد بود. نتایج آنالیزهای میکروبی نیز کاهش معنی دار باکتری های سرمادوست و باکتری های کل در تیمارهای حاوی نایسین ریزپوشانی شده را نشان داد. در پایان می توان گفت، استفاده از نایسین ریزپوشانی شده با نانولیپوزوم، زمان ماندگاری فیله کپور نقره ای نگه داری شده در ۴ درجه ی سانتی گراد را از حیث تغییرات میکروبی و شیمیایی افزایش می دهد و می تواند تقاضای مصرف کنندگان به مصرف مواد غذایی کاملاً طبیعی، با کیفیت بالاتر و ایمن تر را تأمین نماید.

سپاسگزاری

بدین وسیله از کارشناس محترم بیوتکنولوژی پژوهشگاه اکتولوژی دریای خزر که هماهنگی های لازم را جهت پروژه انجام دادند، تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

۱. رضوی شیرازی، ح. ۱۳۸۰. تکنولوژی فرآورده های دریایی. انتشارات نقش مهر. تهران. ۲۵ صفحه.
2. A.O.A.C(Association of Official Analytical Chemists).2002.Official method of analysis. (17th edition).Washington, DC.
- 3.A.O.A.C(Association of Official Analytical Chemists).2005.Official methods of analysis. Arlington. Virginia. USA.
4. Asghari, M., Alizadeh doughikollae, E., Safari, R., Arshadi, A. 2010. Effects of bacteriocine Z on the shelf-life of silver carp fillets during refrigerated storage. Journal of food Processing & Production of Iran. P: 31-38.
5. Chouliara, I., Savvaidisa, I. N., Panagiotakisb, N., Kontominasa, M.G.

محصولات ثانویه اکسیداسیون سبب ایجاد طعم و بوی نامطلوب در محصول می شوند (۱۸).

Asghari و همکاران در سال ۲۰۱۰ تأثیر نایسین Z و استات سدیم را بر زمان ماندگاری فیله کپور نقره ای در طی نگهداری در دمای ۴ درجه را به مدت ۹ روز بررسی کردند (۴). در این آزمایش میزان TBA در نمونه های حاوی نایسین و تیمار شاهد در طول دوره نگهداری افزایش پیدا کرد، در پایان دوره آزمایش این میزان برای تیمار شاهد بالاتر از حد استاندارد و در دو تیمار دیگر کم تر از حد استاندارد بود. حد مجاز پیشنهادی برای میزان تیوباریتوریک اسید ۲ میلی گرم مالون آلدهید بر کیلوگرم چربی ماهی می باشد (۲۱) و مقادیر بالاتر از ۳-۴ میلی گرم مالون آلدهید در هر کیلوگرم روغن ماهی، نشان دهنده افت کیفیت آن بیان شده است (۱۱). با توجه به نتایج، میزان این شاخص در روز ۱۵ نگهداری بیشترین میزان بوده و تیمار نایسین ریزپوشانی شده IU ۱۰۰۰ شرایط بهتری نسبت به دیگر تیمارها داشت. علت را می توان در تأثیر بیشتر نایسین در فرم ریزپوشانی شده بر کاهش فعالیت های باکتری های لیپولیتیک موثر در فساد دانست.

نتیجه گیری

باتوجه به نتایج به دست آمده از آنالیزهای شیمیایی و میکروبی تیمارهای شاهد و حاوی نایسین ریزپوشانی شده با ۲ واحد حجمی (۷۰۰IU و ۱۰۰۰IU) که در فاصله زمانی ۱۵ روز صورت پذیرفت، عملکرد بهتر تیمار نایسین ریزپوشانی شده را در مقایسه با استفاده از تیمار شاهد جهت افزایش زمان ماندگاری فیله کپور نقره ای را تأیید می کند. علت تأثیر حفاظتی کپسول های نانولیپوزومی بر نایسین و تضمین پایداری آن در طول نگهداری، و جلوگیری از واکنش با سایر ترکیبات موجود در محیط در طی زمان و در

2004. Preservation of salted, vacuum packaged, refrigerated sea bream (*Sparus aurata*) fillets by irradiation: microbiological, chemical and sensory attributes. *Journal of Food Microbiology*. 21: 351–359.
6. Calo-Mata, P., Arlindo, S., Boehme, K., Miguel, T., Pascoal, A., Barros-Velazquez, J. 2008. Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. *Food Bio process Technology*. 1(1):43-63.
7. Fan, W., Sun, J., Chen, Y., Qiu J., Zhang, Y., Chi, Y. 2009. Effect of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. *Journal of Food Chemistry*; 115: 66-70.
8. Goulas, A. E., Kontominas, M. G. 2005. Effect of salting and smoking method on the keeping quality of chub mackerel (*Scomber japonicos*): Biochemical and sensory attributes: *Food Chemistry*. 93: 511-520.
9. Guerra, N. P., Agrasar, A. T., Macias, C. L., Bernardez, P. F., Castro, L. P. 2007. Dynamic mathematical models to describe the growth and nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* CECT 539 in both batch and re-alkalized fed-batch cultures. *Journal of Food Engineering*. 2: 103-113.
10. Hedayatifard, M. 2003. *Fish and Shrimp Processing Technology*. 1st Ed. Persia Fisheries Industries Company. Tehran; 120p.
11. Karacam, H. and Boran, M. 1996. Quality changes in frozen whole and gutted anchovies during storage at -18 °C. *International Journal of Food Science and Technology*. 31: 527-531.
12. Kim, C. R., Hearnberger, J. O., Vickery, A. P., White, C. H., Marshal, D. L. 1995. Extended shelf life of refrigerated catfish fillets using sodium acetate and monopotassium phosphate. *Journal of Food Preservation*. 58: 644-647.
13. Laridi, R., Kheadr, E. E., Benech, R. O., Vuilleumard, J. C., Lacroix, C. Fliss, I. 2003. Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability, and release during milk fermentation. *International Dairy Journal*. 13:325-36.
14. Lasic, D. D. 1995. Applications of liposomes. In: Lipowsky R, Sackmann E, editors. *Handbook of Biological Physics*. Menlo Park, CA. Elsevier Science B. Vol. P: 491-519.
15. Martin, R. E., Carter, E. P., Flick, G. J., Davis, L. M. 2000. *Marine and fresh water Products Handbook*. Technomic Publishing Company. P: 964.
16. Mazzotta, A. S., Crandall, A. D., Montville, T. J. 1997. Nisin resistance in *Clostridium botulinum* spores and vegetative cells. *Applied Environmental Microbiology*. 63: 2654–2659.
17. McFaddin, J. F. 2000. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, 7nd Ed.
18. Mexis, S.F., Chouliara, E., Kontominas, M.G. 2009. Combined effect of an oxygen absorber and oregano essential oil on shelf-life extension of rainbow trout fillets stored at on shelf-life extension of rainbow trout fillets stored at 4°C. *Journal of Food Microbiology*. 26: 598-605.
19. Natseba, A., Lwalinda, I., Kakura, E., Muyanja, C. K., Muyonga, J. H. 2005. Effect of pre-freezing icing duration on quality changes in frozen Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Research International*. 38: 469-474.
20. Nettles Cutter, C., Siragusa, G. R. 1994. Decontamination of beef carcass tissue with nisin using a pilot scale model carcass washer. *Food Microbiology*. 11: (6), 481-489.
21. Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H. and Hosseini, S. M. H. 2010. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*. 120: 193–198.
22. Olafsdottir, G., Martinsdottir, E., Oehlenschlager, J., Dalgaard, P., Jensen, B., and Undeland, I. 1997. Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends Food Science and Technology*. 8: 258-263.

23. Özogul, F., Polat, A., Özogul, Y. 2004. The effects of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (*Sardina pilchardus*). Food Chemistry. 85: 267-273.
24. Ozyurt, G., Kuley, E., Ozkutuk, S., Ozogul, F. 2009. Sensory, microbiological and chemical assessment of the freshness of red mullet (*Mullus barbatus*) and gold band goatfish (*Upeneus moluccensis*) during storage in ice. Journal of Food Chemistry; 114: 505–10.
25. Pearson, D. 1994. Laboratory technic in food analysis. Butter Worth. London, UK. Pp. 256-270.
26. Rezaei, M., and Hosseini, S. F. 2008. Quality assessment of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chilled storage. Journal of Food science. 73: 93-96.
27. Roberts, R., F. 1991. Development of a nisin-producing starter culture for use in Cheddar cheese manufacture to inhibit spoilage in high-moisture pasteurized process cheese spreads. Ph.D. Thesis, University of Minnesota, Minneapolis, MN.
28. Sallam, Kh. I. 2007. Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. Food Control. 18(5): 566-575.
29. Sallam, Kh. I., Ahmed, A. M., Elgazzar, M. M., Eldaly, E. A. 2007. Chemical quality and sensory attributes of marinated Pacific saury (*Cololabis saira*) during vacuum-packaged storage at 4°C. Journal of Food Chemistry; 102: 1061-70.
30. Schmidt, SH. E. 2009. Antimicrobial efficacy of liposome encapsulated nisin and nisin inhibition against *Listeria monocytogenes* in fluid milk at different storage temperature. Thesis for degree of Master of Science. Texas A&M University.
31. Stiles, M. E. 1994. Potential for biological control of agents of foodborne disease. Food Research International; 27:245-250.
32. Teerakarn, A., Hirt, D. E., Acton, J. C., Rieck, J. R., Dawson, P, L. 2002. Nisin diffusion in protein films: Effects of film type and temperature. Journal of Food Science. 67, (8): 3019-3025.
33. Vidya, S.R. G., Srikar, L.N. 1996. Effect of preprocess ice storage on the lipid changes of Japanese threadfin bream (*Nemipterus japonicus*) mince during frozen. Journal of Asian Fishery Science, 9: 109-14.
34. Xiao, D. 2010. Novel Delivery Systems of Nisin to Enhance Longterm Efficacy against Foodborne Pathogen *Listeria Monocytogenes*. Doctoral Dissertations. University of Tennessee, Knoxville. PP: 1-3.
35. Yin, M. C. and Cheng, W. S. 2003. Antioxidant and antimicrobial effects of four garlic derived organosulfur compounds in ground beef. Meat Science; 63: 23-28.

Anti-Oxidant and Anti-bacterial Effects of Encapsulated Nisin with Nanoliposome on the Fillets of Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) During Storage at Refrigerated ($4 \pm 1^{\circ}$ C)

Yasari Z. ⁽¹⁾, Javadian S.R.^{(2)*}, Saeidi Asl M.R.⁽³⁾

Ro.javadian@gmail.com

1-M.Sc. graduated, Department of Fisheries, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran..

2- Depamartent. Of Fisheries, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran.

3- Assistant Professor, Department of Food Science and Engineering, University of Sabzevar.

Received: September 2015

Accepted: December 2015

Abstract

Because of the high perishability of fish, keeping the quality of fresh fish is one of the most important problems in the fish-processing. The aim of this study was to determine the antioxidant and antibacterial effects of encapsulated nisin on silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) fillets during refrigerated storage. After being weighted, fish fillets were sprayed with encapsulated nisin with nanoliposome with two levels of its (700 IU and 1000 IU). Then the samples were packed and placed in refrigerated. Chemical (PV, TBARS, TVB-N) and microbial (TVC, PTC) parameters were measured during of storage at days (0, 3, 6, 9, 12 and 15). The result show that, all parameters on control samples, were higher than encapsulated nisin samples, the difference was statistically significant ($p < 0.05$). Microbial parameters decreased significantly in the encapsulated nisin samples at the beginning of the period, followed by a slower rate of increase than the control; the chemical parameters showed a slower rate of decrease. So, using natural preservatives such as encapsulated nisin in fish fillets may increase shelf-life of fish fillets during refrigerated storage. Encapsulated nisin with level of (1000 IU) is the best effect on shelf- life of fillets.

Keywords: Encapsulated, Nisin, Nanoliposome, Shelf-life, Silver carp.

*Corresponding author