View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Aquatic Commons

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور – پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

عنوان:

استفاده از متابولیتهای باکتریهای لاکتیک (باکتر یوسین و اسیدهای آلی) به منظور افزایش زمان ماندگاری ماهی قزل آلا و تاثیر آنها بر باکتریهای شاخص در قالب مطالعات تلقیحی

مجری :
رضا صفری

شماره ثبت
۴۸۶۱۱

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

عنوان پروژه : استفاده از متابولیتهای باکتریهای لاکتیک (باکتر یوسین و اسیدهای آلی)به منظور افزایش زمان ماندگاری ماهی قزل آلا وتاثیر آنها بر باکتریهای شاخص در قالب مطالعات تلقیحی
شماره مصوب پروژه : ۸۹۰۵۶-۱۲-۷۶-۲
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : رضا صفری
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) :
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : رضا صفری
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : زهرا یعقوب زاده ، زهرا بانکه ساز، عباسعلی مطلبی
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : احمد غرقی
محل اجرا : استان مازندران
تاریخ شروع : ۸۹/۶/۱
مدت اجرا : ۲ سال
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال۱۳۹۵
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

پروژه : استفاده از متابولیتهای باکتریهای لاکتیک (باکتر یوسین و اسیدهای آلی)به منظور افزایش زمان ماندگاری ماهی قزل آلا وتاثیر آنها بر باکتریهای شاخص در قالب مطالعات تلقیحی

کد مصوب : ۸۹.۵۶-۱۲-۷۶-۲

شماره ثبت (فروست) : ۴۸۶۱۱ تاریخ : ۹۴/۱۱/۸

با مسئولیت اجرایی جناب آقای رضا صفری دارای مدرک تحصیلی کارشناسی ارشد در رشته تکثیر و پرورش می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست فنآوری و فرآوری آبزیان مورد ارزیابی و رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده ■ مرکز □ ایستگاه □

با سمت عضو هیئت علمی در پژوهشکده اکولوژی دریای خزر مشغول بوده است.

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱-مقدمه ۲
۱-۱- اهمیت مصرف آبزیان ۲
۱-۲- نگرانیها در مورد سلامت میکروبی مواد غذایی ۲
۱-۳- قابلیت فساد پذیری سریع آبزیان پس از صید ۳
۱-۴- جنبه های مختلف فسادآبزیان پس از صید ۴
۱-۵- ماهی به عنوان یک سوبسترا برای باکتریها ۵
۱-۶- مواد ضد میکروبی ۶
۱-۷- نایسین ۹
۱-۸- انتقال بیماری از طریق آبزیان ۱۲
۱-۹- استات سدیم ۱۳
۱-۱۰- بسته بندی تحت خلاء (VP) در فرآورده های گوشتی ۱۵
۱-۱۱- لیستریا ۱۶
۱-۱۲- کلستریدیوم بوتولینوم ۲۰
۱-۱۳- ماهی قزل آلا رنگین کمان ۲۱
۲- مطالعات انجام شده در کشور ۲۲
۲-۱- مطالعات انجام شده خارج از کشور ۲۴
۳- مواد و روش کار ۳۲
۳-۱- تهیه و آماده سازی نمونه ماهی ۳۳
۳-۲- آماده سازی نمونه های حاوی استات سدیم ۳۳
۳-۳- آماده سازی نمونه های حاوی نایسین ۳۳
۳-۴- آماده سازی نمونه ها جهت آزمایشات تلقیح لیستریا مونوسیتوژنز ۳۴
۳-۵- آماده سازی نمونه ها جهت آزمایشات تلقیح کلستریدیوم بوتولینوم ۳۵
۳-۶- آزمایشات شمارش لیستریا و کلستریدیوم ۳۵
۳-۷- آزمایشات شیمیایی ۳۶
۳-۸- آزمایشات میکروبی ۳۹

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

۹-۳- تجزیه و تحلیل آماری ۴۰
۴- نتایج ۴۱
۱-۴- درصد ترکیبات بدن ۴۱
۲-۴- نتایج آزمایشات شیمیایی ۴۱
۳-۴- نتایج آزمایشات میکروبی ۴۵
۵- بحث ۵۳
۱-۵- ارزیابی شیمیایی ۵۳
۲-۵- ارزیابی میکروبی ۶۱
۶- نتیجه گیری کلی ۷۴
- پیشنهادها ۷۵
منابع ۷۶
چکیده انگلیسی ۸۶

چکیده

نایسین یک ماده ضد میکروبی طبیعی است که بر روی بسیاری از عوامل بیماریزا و ارگانیسمهای مسبب فساد مواد غذایی تأثیر دارد. از آنجا که کارایی این ماده در اثر واکنش با محتویات مواد غذایی کاهش می یابد این فرضیه وجود دارد که استفاده از نمک آلی به همراه نایسین باعث افزایش زمان ماندگاری ماهی میگردد. هدف از انجام این تحقیق در مرحله اول ارزیابی اثرات نایسین (۰/۱۵ درصد)و استات سدیم(۱ درصد) بصورت منفرد و ترکیبی بر افزایش زمان ماندگاری فیله و ماهی کامل شکم خالی ماهی قزل آلا بوده است. در مرحله دوم ارزیابی رفتار دو باکتری لیستریا مونوسیتوژنز و کلستریدیوم بوتولینوم در تیمارهای مورد استفاده بوده است. شرایط نگهداری برای هر دو مرحله بسته بندی در شرایط خلاء و دمای ۴ درجه بوده است. پارامترهای مورد بررسی در مرحله اول شامل pH ، PV ، TBA و TVN (شیمیایی) و TVC، PTC و LAB (میکروبی) بوده اند. دور بررسی برای هر دو مرحله ۱۶ روز بوده که آزمایشات شیمیایی و میکروبی به فواصل زمانی هر ۴ روز انجام گرفت.

نتایج بررسی فاکتورهای شیمیایی و میکروبی نشان داد که تیمارهای دارای ماهی کامل شکم خالی دارای شرایط مطلوبتری نسبت به تیمارهای دارای فیله بوده اند. همچنین نشان داد که میزان شاخصهای عدد پراکسید، میزان تیوباربیتوریک اسید، مقدار بازهای ازته فرار و pH در تیمارهایی که در معرض استات سدیم و نایسین Z قرار داشتند به طور معنی داری نسبت به تیمارهای شاهد (فاقد مواد نگهدارنده) کمتر بود ($P<۰/۰۵$). تیمارهای دارای استات سدیم و نایسین Z (بصورت منفرد) بعد از تیمار ترکیبی قرار داشتند. از اینرو می توان نتیجه گرفت که حداکثر زمان ماندگاری تیمارهای دارای مواد نگهدارنده ، ۱۶ روز بوده ولی در تیمار شاهد در برخی از موارد ۱۲ و در برخی موارد نیز ۱۶ بوده است. نتایج اثرات تیمارهای مورد استفاده بر لیستریا مونوسیتوژنز و کلستریدیوم بوتولینوم نشان داد که در تیمار شاهد بیشترین رشد در هر دو باکتری مشاهده گردید(لوگ ۸) ولی در تیمارهای ترکیبی و منفرد رشد فزاینده باکتریها کندتر بوده ولی کماکان روند صعودی داشته است بطوریکه در روز ۱۶ برای لیستریا لوگ ۶ و برای کلستریدیوم لوگ ۵ بوده است. حساسیت سلولهای رویشی کلستریدیوم بیشتر از لیستریا بوده است. بهنگام استفاده از مواد نگهدارنده(شیمیایی و یا بیولوژیک) در بافت ماهی پارامترهای مختلفی از جمله نوع ماده نگهدارنده، روش مورد استفاده ، pH بافت، آنزیمهای پروتئولیتیک ، بروز سویه های مقاوم و ... بر روند ضدمیکروبی مواد مورد استفاده تاثیر می گذارند. نتیجه گیری کلی که از مطالعه حاضر حاصل شده آنست که اولا ماهی مورد استفاده جهت بسته بندی به فرم ماهی کامل شکم خالی باشد ثانیا مواد نگهدارنده بصورت ترکیبی مورد استفاده قرار گیرد، ثالثا جهت کاهش معنی دار باکتریهای بیماریزا از دوزهای بالاتر مواد نگهدارنده و بصورت ترکیبی استفاده شود.

کلمات کلیدی: نایسین Z، استات سدیم، قزل آلای رنگین کمان، لیستریا مونوسیتوژنز، کلستریدیوم بوتولینوم

۱-مقدمه

۱-۱- اهمیت مصرف آبزیان

افزایش جمعیت و کمبود مواد غذایی بخصوص منابع پروتئینی با کیفیت بالا سبب گردیده است تا در چند دهه اخیر توجه خاصی به منابع خوراکی دریایی مبذول گردیده و مطالعات بیشتری در زمینه انواع آبزیان و استفاده از آنها صورت پذیرد. در این مورد علاوه بر موضوع تهیه غذا ، فراهم آوردن غذای سالم نیز مورد نظر می باشد. این امر اهمیت کنترل کیفی میکروبی و شیمیایی مواد غذایی را در مراحل مختلف تهیه، تولید و مصرف روشن می نماید. به هر حال وجود نیاز های تغذیه ای بخصوص در کشورهای در حال توسعه و امکان تأمین قسمتی از آن از طریق منابع دریایی ضرورت شناخت، توجه و بهره گیری بهینه از این منابع را بخوبی نشان می دهد (رضایی و همکاران، ۱۳۸۱).

غذاهای دریایی منبع پروتئینی با ارزشی برای انسانها می باشند و در یک رژیم غذایی سالم نقش مهمی را ایفا می کنند (Kose وهمکاران ،۲۰۰۱). ماهیان حاوی مقدار زیادی از ترکیبات مهم همچون ترکیبات مغذی، ویتامینهای محلول در چربی (اساساً A و D)، املاح معدنی نظیر I، Fe، Ca، Cu، Zn و اسیدهای چرب چند غیر اشباع می باشند این امر سبب شده است که استفاده انسانی از اغلب منابع شیلاتی توسعه یابد (Perez-Alonso و همکاران ،۲۰۰۳). استفاده از ماهی و سایر گونه های دریایی برای تولید فرآورده هایی با اهمیت اقتصادی زیاد در بسیاری از کشورها رواج یافته است (Aubourg و همکاران، ۲۰۰۴).

چربی ماهیان منبع مهمی از اسیدهای چرب چند غیر اشباع بلند زنجیره خصوصا از خانواده امگا-۳[1] نظیر DHA[2]، EPA[3] است. اسیدهای چرب خانواده امگا-۳ برای رشد عصبی کودک و در مرحله جنینی و در طی سالهای نخست پس از تولد ضروری هستند و اثرات مفیدی بر کاهش التهاب، افسردگی، فشار خون بالا (Haliloglu و همکاران ،۲۰۰۴)، جلوگیری و درمان بیماریهای قلبی و عروقی (Kose و همکاران ، ۲۰۰۱) داشته و پیشرفت سرطان را کند نموده و به بهبود اختلالات خود ایمنی ، تقویت حافظه و بینایی کمک می کند (Stodolnik و همکاران ، ۲۰۰۵).

۱-۲- نگرانیها در مورد سلامت میکروبی مواد غذایی

سالانه ۲۰ درصد کل جمعیت جهان دچار بیماری های ناشی از غذا می شوند که از این میزان نیم درصد آنها دچار مرگ و میر می شوند (WHO ، ۲۰۰۸). هرساله در آمریکا ۷۶ میلیون مورد بیمایهای ناشی از مصرف غذای آلوده و ۳۲۵۰۰۰ بستری در بیمارستان و ۵۰۰۰ مرگ به همین علت اتفاق می افتد (Mead و همکاران ،

---

[1]- ω-3

[2] - Docosa hexaenoic acid

[3]- Eicosa pentaenoic acid

۲۰۰۰). در ایران نیز آلودگی غذایی سالانه جان ۳۵ هزار نفر از جمعیت ۷۰ میلیونی کشور را می گیرد (رضویلر، ۱۳۸۹). جهانی شدن محصولات غذایی به نفع مشتریان است زیرا دردسترس بودن و تنوع محصولات را افزایش می دهد اما مسأله سلامت مواد غذایی و امنیت مصرف کننده در هنگام مصرف اهمیت بسیار زیادی پیدا می کند. از آنجایی که تولید خیلی از محصولات انبوه است آلودگی ماده غذایی به میکروب بیماریزا می تواند باعث شیوع وسیع بیماری در سطح جامعه مصرف کننده شود . به عنوان مثال در سال ۲۰۰۹ شیوع چند ایالتی Escherichia coli O157:H7 در امریکا به علت آلودگی گوشت گوساله چرخ شده بود که منجر به بستری ۱۹ نفر شد (CDC ، ۲۰۰۹) اگرچه تلاشهای زیادی توسط دولتها و کمپانیهای غذایی برای کنترل بیماریهای ناشی از غذا انجام می شود ، مرکز کنترل و پیشگیری بیماریها در آمریکا اعلام کرد که سالانه حدودا ۵/۲ میلیون بیماری و ۴۵۸۲۶ مورد بستری در بیمارستان و ۱۴۵۸ مرگ دراثر باکتریهای بیماریزای شناخته شده در غذا ایجاد می شود (Mead و همکاران ،۱۹۹۹). پیشرفتهای تکنولوژیکی جدیدی مانند سیستم انتقال مواد ضد میکروبی لازم است که آلودگی در حین تولید را کاهش و سلامت مواد غذایی را افزایش دهد .

۳-۱- قابلیت فساد پذیری سریع آبزیان پس از صید

آبزیان بدلیل داشتن پروتئین نسبتاً بالا، ترکیبات ازت‌دار و چربیهای غیر اشباع فراوان در عضلات، جزو فسادپذیرترین مواد غذایی محسوب می‌شوند (رضوی شیرازی، ۱۳۸۰). پس از صید ماهی و مرگ آن، تغییرات پیچیده ای در اثر فعالیت های آنزیمی، شیمیایی و میکروبی در آن رخ می دهد به طوری که با مرگ ماهی و تضعیف سیستم ایمنی بدن، باکتری ها به راحتی تکثیر یافته و به سرعت به بافتها هجوم برده و باکتری های ویژه فساد با استفاده از مواد حاصل از خود هضمی، رشد و تکثیر می یابند. افزایش تعداد باکتری های ماهی معمولا با تغییرات کیفی همراه است (Gram و Dalgaard ،۲۰۰۲). امروزه شیوه های متفاوتی از قبیل استفاده از نگهدارنده های غذایی و بسته بندی در خلا جهت افزایش ماندگاری ماهیان استفاده می شوند استفاده از هر مادۀ افزودنی در مواد غذایی می تواند خطراتی را به دنبال داشته باشد اما این خطرات نمی بایست بیش از مزایای کلی آنها باشد (جیمز، ۱۳۸۵).

قابلیت فساد پذیری بالای ماهیان سبب شده تا حفظ کیفیت ماهی تازه، یکی از مسائل مهم مورد توجه صنعت ماهی و مصرف کنندگان باشد. در این رابطه توجه به عمر ماندگاری محصول (دوره زمانی که یک محصول غذایی، تحت وضعیت نگهداری مشخص، برای مصرف مناسب و امن باشد) مهم است. بدین منظور تکنیک های متفاوتی مثل سرد سازی محصول بلافاصله پس از صید و نگهداری در یخ (Özyurt و همکاران ، ۲۰۰۹)، انجماد (Aubourg و همکاران، ۱۹۹۳، ۲۰۰۵) ،بسته بندی در خلا و اتمسفر اصلاح شده (Özogul و همکاران ۲۰۰۴)، استفاده از مواد ضد میکروبی مثل اسید های آلی (Al-Dagal و Buzarra ، ۱۹۹۹) و نمک اسید های آلی (Sallam و همکاران ،۲۰۰۷)، استفاده از آنتی اکسیدانهای طبیعی و مصنوعی (Banergee ، ۲۰۰۶)، بکارگیری اسانس ها

(Frangos و همکاران، ۲۰۱۰) و همچنین اثر ترکیبی روکش غذایی و اسانس (Ojagh و همکاران ،۲۰۱۰) برای افزایش عمر ماندگاری محصولات دریایی و حفظ کیفیت ماهی به کار گرفته شده است. عدم استفاده از تکنیکهای مناسب نگهداری ماهیان و محصولات دریایی منجر به تغییرات سریع در فاکتور های متفاوت شیمیایی، بیوشیمیایی و میکروبیولوژی محصول گردیده و پدیده پیچیده فساد ماهی را به دنبال دارد (Kashiri و همکاران ، ۲۰۱۱).

۴-۱- جنبه های مختلف فسادآبزیان پس از صید

۱-۴-۱-تغییرات ارگانولپتیک

آزمایشات ارگانولپتیک، مجموعه‌ای از عواملی است که به وسیله اعضای حسی انسان قابل تشخیص می‌باشد. مثلا در زمان خوردن و یا آشامیدن احساس‌های مختلفی که به دست می‌آید، مجموعه‌ای از فعل و انفعالات پیچیده فیزیولوژیکی و روانی می‌باشد. اگر چه این احساس‌ها به صورت کامل قابل اندازگیری نمی‌باشد و با توجه به کوششی که برای جایگزین کردن این تست‌ها به وسیله ابزار آزمایشگاه به وجود آمده است، اما هنوز انجام آن‌ها ضروری می‌باشد (الیاسی، ۱۳۸۸). تغییرات ارگانولپتیک در واقع تغییراتی مانند ظاهر، بو، بافت و مزه هستند که به وسیله حواس قابل درک می باشند (Huss(b)، ۱۹۹۵). زمانی که یک ماده غذایی مصرف می شود کیفیت آن از طریق ایجاد ارتباط بین مجموعه ای از اختصاصات حسی و ارگانولپتیک مانند ظاهر، طعم، بو و بافت سنجیده می شود. لذا وقتی تغییراتی در ماهی رخ می دهد، بسیاری از این تغییرات به وسیله بکار گیری حواس انسان یعنی با دیدن، بوئیدن و لمس کردن و چشیدن قابل درک است (شریفیان، ۱۳۸۸).

۲-۴-۱- فسادمیکروبی

بخشی از فساد ماهیان تازه، به دلیل فعالیت و رشد ارگانیزم های ویژه عامل فساد است که با تولید متابولیت هایی منجر به نامطلوب شدن طعم و بوی ماهیان و در نهایت غیرقابل مصرف شدن آنها می شود (Gram و Dalgaard ، ۲۰۰۲). تغییرات میکروبی با کمک آنزیم ها صورت می گیرد و در نهایت منجر به فساد می گردد. ماهی مانند تمامی موجودات زنده همواره حامل تعدادی از باکتری ها هستند که در اصطلاح به آنها فلور طبیعی می گویند که بازتاب آبی است که ماهی از آن صید شده است (رضوی شیرازی، ۱۳۸۵). باکتری ها در تمام سطوح خارجی (پوست وآبشش ها) و در روده ماهی زنده و ماهی تازه صید شده یافت می شوند. که میزان آن بسته به محیط (Özogul و همکاران ، ۲۰۰۶)، گونه ماهی (Guizani و همکاران ، ۲۰۰۵) و فصل (رضوی شیرازی، ۱۳۸۵) متفاوت می باشد. در حالت طبیعی وجود باکتری ها برای ماهی سالم و زنده بدون خطر است، زیرا سیستم دفاع طبیعی بدن مانع از آسیب رسانی آنها می گردد ولی بلا فاصله پس از مرگ، باکتریها و آنزیم های مترشحه آنها از طریق آبشش ها، عروق خونی، پوست و لایه پوششی حفره شکمی به بافت ها هجوم می برند (رضوی

شیرازی، ۱۳۸۵). باکتری ها در شرایط طبیعی، آنزیم هایی ترشح می کنند که بافت مورد هجوم را شکسته و حل می نمایند. به عبارت دیگر این آنزیم ها هستند که سبب ایجاد تغییرات و در نهایت فساد می گردند. باکتری های موجود در گوشت ماهی در اثر وجود شرایط مناسب برای رشدشان، در بو و طعم ماهی تغییراتی را به وجود می آورند. باکتریهایی که به طور طبیعی روی سطوح خارجی بدن ماهی وجود دارند به قسمتهایی که فیله می شوند نزدیک تر از باکتری های روده هستند به همین دلیل عضلات، قبل از آنکه باکتری های روده از دیواره لوله گوارشی نفوذ کنند، مورد هجوم باکتریهای سطحی قرار می گیرند. البته شستشوی سطح بدن ماهی می تواند تا حدود ۸۰-۹۰ درصد، شمارش باکتریهای سطحی را کاهش دهد (Huss(b) ، ۱۹۹۵). تعداد باکتریهای ماهی تازه زیاد می باشد ولی از نظر ایجاد تغییرات و فساد بسیاری از این باکتری ها فاقد اهمیت می باشند. باکتری های عامل فساد باکتری هایی هستند که صفت مشخصه آنها قابلیت ایجاد بو و طعم نامطبوع در عضله ماهی می باشد که به طور طبیعی نیز تعداد این باکتریها محدود بوده و درصد کمی از فلور طبیعی ماهی را شامل می شوند . پس از مرگ ماهی سرعت رشد باکتریها به تعداد باکتریهای موجود در ماهی و درجه حرارت محیط نگهداری بستگی دارد (Gram وDalgaard ، ۲۰۰۲).پس از صید تحت تاثیر شرایط اعمال شده، تغییراتی در فلور طبیعی رخ می دهد. بدین صورت که برخی از باکتریها می میرند و در عوض باکتریهای جدید در اثر آلودگی های ثانویه اضافه می گردند (رضوی شیرازی، ۱۳۸۵). زمانی که سلول باکتری در یک محیط مغذی کشت داده شود شروع به تقسیم نموده و یک سلول به دو سلول، دو به چهار و چهار به هشت و همینطور یک بیلیون سلول به دو بیلیون و بیشتر تقسیم می شوند و در نهایت یک توده سلولی در محیط کشت تشکیل می شود که آن را کلونی یا پرگنه می نامند (سعیدی اصل، ۱۳۸۸).

۵-۱- ماهی به عنوان یک سوبسترا برای باکتریها

کربوهیدراتها (از قبیل لاکتوز و ریبوز) و ترکیبات نوکلئوتیدی همراه با بقایای بخش ترکیبات ازت دار غیر پروتئینی سوبستراهای موجود هستند که به آسانی در دسترس باکتریها قرار می گیرند. میکروارگانیسم های هوازی و بی هوازی کربوهیدراتها را به ترتیب طی فرایند اکسیداسیون و تخمیر به ATP تبدیل می کنند.

اکسیداسیون هوازی کربوهیدراتها :

$$C_6H_{12}O_6+6O_2+36ADP+Phosphat \longrightarrow 6CO_2+42H_2O+36ATP$$

تخمیر بی هوازی:

$$C_6H_{12}O_6+2ADP+Phosphat \longrightarrow 6CH_3CHOHCOOH+2H_2O+2ATP$$

رشد میکروارگانیسم های هوازی منجر به تشکیل جزئی خرد اقلیم های بی هوازی بر روی سطح ماهی می شود. در این شرایط، باکتریهای بی هوازی اختیاری مورد توجه قرار می گیرند. با این وجود برای یکسری از باکتریهای کاهنده تری متیل آمین اکساید (TMAO)، شامل بعضی از باکتریها که معمولا به عنوان هوازی اجباری طبقه بندی می شوند، وجود TMAO سبب می گردد که ارگانیسم ها به سرعت با وجود شرایط بی هوازی رشد کنند (Huss ،

۱۹۸۸). اکسی تری متیل آمین ترکیبی است بدون بو که در عضلات تمامی گونه های آب شور به مقدار ۷-۱ درصد وزن خشک عضله وجود دارد. این ترکیب پس از مرگ توسط آنزیم های باکتریایی شکسته شده و تبدیل به تری متیل آمین (TMA) می گردد، هنگامی که ماهی تازه از آب خارج می شود فاقد بوی مخصوص ماهی بوده و فقط رایحه علف دریا از آن استشمام می گردد، ولی با گذشت مدتی کوتاه، کم کم رایحه ماهی تازه در آن ظاهر می شود که تقریبا همزمان با تجزیه TMAO به TMA است (رضوی شیرازی، ۱۳۸۵). در عضله تیره ماهیان پلاژیک یک سیستم احیا کننده وجود دارد که TMAO را احیا نموده و آن را تبدیل به TMA می نماید. این واکنش که در عین حال توسط باکتری ها صورت می گیرد سبب ایجاد مقدار زیادی TMA و دی متیل آمین (DMA) در عضله می گردد، که هنوز هم به عنوان مهمترین ترکیبات ایجاد کننده رایحه در فرآورده های دریایی به حساب می آیند. تبدیل TMAO به TMA و DMA و اندازه گیری آنها همراه با آمونیاک به عنوان مجموعه بازهای فرار از جمله شاخص هایی است که برای ارزیابی کیفی ماهی مورد استفاده قرار می گیرد. مقدار کمی از آمونیوم در طی اتولیز تشکیل می شود اما بخش اصلی از آمین زدایی آمینو اسیدها حاصل می شود (شریفیان، ۱۳۸۸).

در صنایع غذایی حفظ کیفیت به همراه افزایش زمان ماندگاری از طریق کاهش ، حذف یا کنترل عوامل میکروبی بیماری زا یا عامل فساد مواد غذایی صورت می گیرد. با توجه به اثبات بسیاری ازاثرات زیان بار نگهدارنده های شیمیایی و نگرانی عمومی در این خصوص ، بحث جایگزینی آنها با انواع ترکیبات طبیعی نظیر آنتی باکتریهای طبیعی افزایش یافته است و انجام این مطالعات ابتدا در مدل های آزمایشگاهی و سپس در مدل های غذایی در این رابطه لازم و ضروری به نظر می رسد. بیماریهای ناشی از غذا در نتیجه مصرف غذاهای آلوده به باکتری های عامل فساد و بیماری زا به طور مستقیم در سلامت جامعه نقش دارد. استفاده از مواد شیمیایی به منظورجلوگیری یا به تاخیر انداختن فساد مواد غذایی امروزه دارای کاربرد وسیعی می باشد. در ارتباط با اثرات سوٗ استفاده از مواد شیمیایی صنعتی بحث های قابل قبولی در خصوص سرطان زایی و سمیت آنها برای انسان صورت گرفته است. به این دلیل تولیدکنندگان مواد غذایی و مصرف کنندگان آن بایستی در استفاده از این گونه مواد نگهدارنده احتیاط نمایند (رهنما و همکاران۱۳۸۸).

۶-۱- مواد ضد میکروبی

مواد نگهدارنده به دو گروه شیمیایی و بیولوژیک تقسیم بندی می شوند . تحقیقات نشان داده که استفاده از نگهدارنده های شیمیایی، در طولانی مدت دارای عوارض متعددی از جمله سرطان بوده بطوریکه امروزه مصرف برخی از نگهدارنده های شیمیایی منسوخ گشته و یا به مقدار بسیار پائین مورد استفاده قرار میگیرند. یکی از راههای افزایش رفع این نقیصه ، استفاده از نگهدارنده های بیولوژیک بوه که نه تنها دارای عوارض جانبی

نیستند بلکه باعث بهبود بو ، طعم و مزه ماده غذایی شده و زمان ماندگاری محصول را نیز افزایش میدهند (محمدزاده و رضایی ، ۱۳۹۰).

نگهدارنده های بیولوژیک به گروههای مختلفی تقسیم بندی میشوند که شامل باکتریهای لاکتیک(لاکتوباسیلوسها ، کارنوباکتریومها و لاکتوکوکوس ها) ، متابولیتهای تولید شده از باکتریهای لاکتیک (باکتریوسینها) ،آنزیمها (لیزوزیم و گلوکز اکسیدازها)، پروتئینهای کاتیونیک (پروتامینها و دیفنزین ها) میباشند. باکتریهای لاکتیک به لحاظ تولید متابولیتهای مختلف از جمله اسیدهای آلی ، باکتریوسینها ، پراکسید هیدروژن و متابولیتهایی با وزن مولکولی پائین نظیر دی استیل و روترین دارای اثر مهار کننده بر انواع میکروبهای گرم مثبت و منفی مسبب فساد نظیر میکروکوکوسها ، سودوموناسها ، موراگزلا ، اسینتوباکترها ، شونلا و همچنین باکتریهای مولد مسمویت غذایی و بیماری مثل استافیلوکوکوس اورئوس ، لیستریا مونوسیتوژنز ، کلستریدیوم بوتولینوم تیپ E ، یرسینیا انتروکولیتیکا و ... میباشند (Lauzonو همکاران ، ۲۰۰۲). مکانیسم عمل باکتریوسینها ،ناپایدار نمودن سلول و افزایش نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی میباشد. باکتریهای لاکتیک طیف وسیعی از باکتریوسینها را ترشح میکنند که میتوان به نایسین ، پدیوسین ، لاکتاسین ، دایورجین ، دیپلوسین ، لاکتواستریتوسین و ... اشاره که نمود که دارای طیف ضدمیکروبی متفاوتی بوده ولی بیشتر بر روی باکتریهای گرم مثبت عامل فساد و بیماری موثر میباشند. یکی از این ترکیبات نگهدارنده طبیعی ، نایسین (پلی پپتیدی که توسط سویه های خاصی از باکتری لاکتوکوکوس در طول تخمیر ایجاد می گردد) می باشد که مانع رشد بسیاری از باکتریهای گرم مثبت می گردد (Naidu ، ۲۰۰۰).

از گروه دیگر متابولیتهای میکروبی میتوان به اسیدهای آلی اشاره نمود که فعالیت باکتریوسینها را تکمیل نموده و بیشترین اثر مهار کننده را بر باکتریهای گرم منفی نشان میدهند. مکانیسم عمل این گروه از متابولیتها، مختل نمودن فعالیت سلول و اجزای درون سلولی میباشد (Sallam ، ۲۰۰۷). در صنایع غذایی از نمکهای سدیم اسیدهای آلی با وزن مولکولی کم مانند لاکتیک ، استیک ، سیتریک به منظور کنترل رشد میکروبی ، بهبود خواص حسی و افزایش مدت زمان ماندگاری مواد غذایی مانند گوشت قرمز و ماهی استفاده می شود (حق پرست و همکاران ، ۱۳۷۸) . به علاوه با توجه به اثر مهارکنندگی این نمکها در مقابل باکتریهای عامل فساد مواد غذایی ، این نمکها می توانند خواص آنتی باکتریایی در مقابل انواع باکتریهای بیماریزای غذا از جمله استافیلوکوکوس اورئوس ، یرسینیا انتروکولیتیکا ، لیستریا مونوسیتوژنز ، اشرشیا کولی و کلاستریدیوم بوتولینوم نشان دهند . به علاوه این نمکها به راحتی در دسترس بوده و به طور کلی بی خطر و فاقد عوارض جانبی برای انسان شناخته شده اند (Sallam ، ۲۰۰۷ و Kashiri و همکاران ، ۲۰۱۱ ، Varnam and Evans 2005).

۱-۶-۱- مشکلات مصرف مواد ضد میکروبی در غذا

مواد ضد میکروبی اغلب پس از اضافه شدن به محیط های غذایی کارایی شان نسبت به مصرف در محیط های کشت میکروبی کاهش می یابد . برای مثال کارایی نایسین در محیطهای کشت یا غذا های مایع بیشتر از مواد غذایی جامد هموژن است زیرا توزیع آن در تمام سطح محیط مایع راحت تر صورت می گیرد. شرایط محیطی و مراحل فرآوری محصول هم می تواند بر کارایی مواد ضد میکروبی تاثیر بگذارد.برای مثال گرمایی که جهت پاستوریزه کردن پنیر به آن داده می شود ۲۰٪ کارایی نایسین را کاهش می دهد(Thomas ،۲۰۰۵).

۲-۶-۱- سیستم انتقال مواد ضد میکروبی

سیستم انتقال در ابتدا برای بدست آوردن رهایش کنترل شده داروها در محلهای هدف مورد استفاده قرار گرفت. در این تکنولوژی یک ماده حامل برای ریزپوشانی داروها در یک ساختار طراحی شده بکار می رود به طوری که دارو به آرامی از حامل خود رها شود (Juliano ، ۱۹۷۸) به طور مشابه مطالعات مختلفی به این نتیجه رسیده اند که سیستم انتقال می تواند کارایی مواد ضد میکروبی را با حفاظت آنها از آثار سوء محیط و مراحل فرآوری و همچنین جلوگیری از واکنش آنها با محتویات ماده غذایی ، افزایش دهد. به عنوان مثال نایسین ریزپوشانی شده با لیپوزوم در مقایسه با نایسین آزاد باعث ممانعت بیشتر از رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در حد ۲ لگاریتم رشد باکتریایی شد(Ben Embarek 1994; Were et al.,2004) . نایسین ریزپوشانی شده در لیپوزوم و EDTA[4] جلوی رشد باکتری E. coli را بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون بهتر از نایسین آزاد گرفت (Taylor و همکاران ، ۲۰۰۸). Salmoso و همکاران بیان کردند که رهاسازی پایدار نایسین از نانوکپسولهای پلی ال-لاکتات می تواند تا ۴۵ روز از رشد Lactobacillus delbrueckii در مقابل ۴ روز برای نایسین آزاد جلوگیری کند (Salmaso و همکاران ، ۲۰۰۴). رهاسازی پایدار لیزوزیم در مدت ۴۹ روز از کپسولهای زئین که به وسیله خشک کن پاششی ریز پوشانی شده بودند مشاهده شد (Zhong و همکاران ، ۲۰۰۸ و ۲۰۰۹ : Ghalanbor و همکاران ۲۰۱۰). قرار دادن مواد ضد میکروبی در پوششها می تواند به عنوان بسته بندی فعال زیستی از آلودگی پس از تولید ماده غذایی جلوگیری کند. به عنوان مثال پوشش سدیم کازئینات حاوی نایسین بر روی پنیر بعد از گذشت یک هفته نگهداری در دمای یخچال میزان رشد باکتری Listeria monocytogenes را ۱/۱ لگاریتم کاهش داد. (Cao-Hoang و همکاران ، ۲۰۱۰) همچنین پوشش پلی اتیلن- کو -ونیل استات حاوی نایسین از رشد باکتری Staphylococcus epidermidis ATCC 35984 جلوگیری کرد (Nostro و همکاران ، ۲۰۱۰) در تحقیق دیگرسویا ، زئین و گلوتن گندم به عنوان حامل پوششی برای نایسین مورد استفاده قرار گرفتند و از رشد باکتری Listeria monocytogenes ممانعت به عمل آوردند (Lungu و همکاران ،۲۰۰۵).

[4] . Ethylene diaminetetraacetic acid

۷-۱- نایسین

نایسین تنها باکتریوسینی است که اجازه استفاده بی خطر آن در مواد غذایی داده شده و یک ماده نگهدارنده بی خطر (GRAS[5]: عنوانی که سازمان غذا و داروی آمریکا به مواد افزودنی غذایی بی خطر و سالم داده است) می باشد زیرا باکتری تولید کننده آن (Lactococcus lactis) به طور طبیعی در شیر وجود دارد و صدها سال است که برای تولید فرآورده های تخمیری مانند پنیر و ماهی توسط انسان مورد استفاده قرار می گیرد، بدون اینکه هیچ بیماری شناخته شده ای را نشان دهد. (FDA ، ۱۹۸۸، FDA/CFSAN. 2008)

شکل ۱-۱- شمایی از آرایش اسیدهای آمینه در ساختار نایسین z .(ross G وM orell ، ۱۹۷۱)

نایسین یک پپتید با وزن مولکولی پایین است که به طور تجاری توسط باکتری Lactococcus lactis که از فرآورده های لبنی جدا سازی می شود ، بدست می آید . نایسین ۳۴ اسید آمینه دارد و وزن مولکولی آن ۳۵۱۰ دالتون است (Gross ،۱۹۷۱) این ماده یک باکتریوسین (ضد باکتری) کلاس I و دارای اسیدهای آمینه ضروری می باشد. نایسین A ۵ پیوند داخلی دی سولفید دارد و نایسین Z گونه طبیعی دیگر نایسین A است که هیستیدین آن در جایگاه ۲۷ با آسپارژین جایگزین شده است (Mulders و همکاران ، ۱۹۹۱) در فرم پودری خشک نایسین یک ماده مقاوم به حرارت است . زمانی که در حالت محلول است حد اپتیمم مقاومت به حرارت را در pH ۳-۳/۵ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۱۵°C نشان می دهد . در pH بیشتر از ۳/۵ فعالیت نایسین کاهش می یابد. (Davies و همکاران ، ۱۹۹۸) آنچنان که از نتایج این بخش بر می آید پیشنهاد می شود که اقداماتی جهت جلوگیری از تأثیر گذاری ترکیبات ماده غذایی بر عملکرد نایسین صورت گیرد. انحلال نایسین نیز به pH بستگی دارد . در pH ۲/۲ انحلال نایسین ۵۶ mg/mL است . در pH ۶ و ۸/۵ میزان انحلال نایسین به ترتیب به ۱/۵ و ۰/۲۵ mg/mL کاهش می یابد(Wei و Hansen ۱۹۹۰) . اگرچه ، انحلال نایسین در محیط های غذایی هیچگاه به حد بحرانی نمی رسد زیرا میزان مصرف آن هرگز از ۰/۰۲۵ mg/mL تجاوز نمی کند(Thomas ، ۲۰۰۵) از آنجاییکه برخی باکتریوسین ها می توانند هم در pH پایین و هم در دمای پایین فعالیت کنند بنابراین جهت استفاده در غذاهای اسیدی و محصولات فرآوری شده که در دمای پایین نگهداری می شوند مناسب هستند (Abee و

[5] .Generally recognized as safe

همکاران ، ۱۹۹۴) . تا کنون مطالعات متعددی پیرامون اثرات ضد باکتریایی نایسین در محیط های آزمایشگاهی انجام گرفته است ومطالعات چندی نیز بر روی تاثیر ضد میکروبی نایسین در مدلهای غذایی مایع صورت گرفته است و نیز مطالعات اندکی نیز در زمینه تأثیر این ماده در فرآورده های خام گوشتی انجام شده است اما در مجموع در مورد تأثیر نایسین در مدلهای غذایی جامد به ویژه گوشت ماهی اطلاعات کمی وجود دارد. لذا با توجه به ضرورت به کارگیری مواد نگهدارنده غیر مضر برای مصرف کنندگان از طرفی و فساد پذیری سریع برخی فرآورده های غذایی نظیر گوشت ماهی ، یافتن مواد نگهدارنده مفید برای کاهش بار میکروبی این گونه فرآورده ها یکی از ضرورتهای امروزی ارتقاء سطح بهداشت مواد غذایی در جوامع می باشد.

از آنجاییکه باکتری های گرم منفی عامل اصلی فساد ماهی در یخچال هستند، ناکارآمد بودن نایسین علیه باکتری های گرم منفی استفاده از آنرا ملزم به همراه بودن با سایر مواد افزودنی شیمیایی می کند. این مواد ساختار لایه لیپوپلی ساکاریدی غشاء باکتریهای گرم منفی را از بین می برند و به ماده ضد باکتری اجازه می دهد که به غشاء سیتوپلاسمی دسترسی پیدا کند (Abee ، ۱۹۹۵).

عملکرد نایسین بر اساس ارگانیسم هدفش به ۳ گروه اصلی تقسیم می شود.

۱- ممانعت از فساد ماده غذایی با از بین بردن باکتریهای تولید کننده اسپور

۲- ممانعت از فساد میکروبی ایجاد شده توسط باکترهای اسید لاکتیک

۳- از بین بردن یا ممانعت از عملکرد باکتریهای گرم مثبت بیماریزا مانند باسیلوس سرئوس (Bacillus cereus، کلاستریدیوم بوتولینوم (Clostridium botulinum) و لیستریا مونوسیتوژنز(Listeria monocytogenes) (Stiles ، ۱۹۹۴، Ita and Hutkins ۱۹۹۱)

دلایل مختلفی وجود دارد که نایسین را به عنوان یک نگهدارنده خوب غذا مطرح می سازد. مثلا این باکتریوسین می تواند دوره ماندگاری غذا را افزایش دهد. همچنین به علت خاصیت نگهدارندگی و خواص ضد باکتری خود تولید کننده غذا را قادر می سازد تا فرآیند دمای خود را- که اثر منفی روی کیفیت غذا و افزایش قیمت تمام شده دارد- کاهش دهد. گفته می شود احتمال دارد نایسین بتواند هزینه حمل و نقل غذا را به علت عدم نیاز به نگهداری سرد، کاهش دهد (Thomas ، ۲۰۰۵).

بسته به نوع غذا، فرآیند حرارتی، pH ، شرایط ذخیره سازی و بار باکتریایی میزان نایسینی که به غذا اضافه می شود، متفاوت خواهد بود. نایسین طیف مهارکنندگی وسیعی علیه باکتری های گرم مثبت دارد. همچنین علیه اسپورهای مقاوم به گرمای باکتری های گرم مثبت دارای فعالیت مهارکنندگی است. همچنین گفته می شود باکتریوسین نایسین علیه پاتوژن های غذای نظیر Listeria monocytogenes موثر است (Thomas ، ۲۰۰۵). نایسین تجاری موجود در بازار مانند نایسیپلین که محصول شرکت Danisco است ، شامل ۲/۵٪ نایسین A که خود در برگیرنده یک میلیون واحد بین المللی (IU) در گرم می باشد و ما بقی آن نمک و شیر خشک است. روش

سنجش (آزمایش آگار دیفیوژن افقی برای اندازه گیری فعالیت نایسین برای اولین بار توسط Tramer و Fowlerابداع شد. (Fowler و همکاران ، ۱۹۷۵)

باکتری گرم مثبت Micrococcus Luteus به عنوان موجود شاخص انتخاب شد چون نسبت به نایسین حساس است. بسیاری از محققان از جمله Wolf و Gibbons این روش سنجش را بهبود بخشیدند (Wolfو Gibbons ،۱۹۹۶). این موضوع که نایسین در مقابل باکتریهای گرم مثبت کارایی دارد و در مقابل گرم منفی ها کارایی ندارد به خوبی به اثبات رسیده است . نایسین به طور مشخص در مقابل دیواره های رویشی سلولها و اسپورهای مقاوم به حرارت باکتری های باسیلوس ، کلاستریدیوم و لیستریا مونوسیتوژنز فعال است (Hurst ، ۱۹۸۱) . مکانیسم هدف فعالیت ضد میکروبی نایسین در مقابل دیواره های رویشی سلولها اتصال به غشاء سیتوپلاسمی است . نایسین یک ماده ضد میکروبی کاتیونی است که از طریق پیوند الکترواستاتیک به باکتریهای با بار الکتریکی منفی متصل می شود .پس از اتصال نایسین به داخل غشاء وارد می شود و سوراخهای کوچک موقتی داخل غشاء ایجاد می کند . علاوه بر اینکه ساختار غشاء به دلیل اتصال نایسین به هم می ریزد ، این امر موجب انتشار سریع یونها ، اسیدهای آمینه و ATP سلولی می شود (Abee و همکاران ،۱۹۹۴). مکانیسم پنهانی دیگر شامل فعل و انفعالات بین نایسین و لیپید II (ماده ای که باعث کد گذاری مولکولها در تشکیل حفرات بعدی می شود) می باشد . محققین به این نتیجه رسیده اند که با لیپدII مدت زمان باقی ماندن حفره های موقتی که در غشاء باکتری بوجود آمده بود از دهم ثانیه به ۶ ثانیه افزایش می یابد و اندازه حفرات از ۱ نانومتر به ۲/۵ نانومتر می رسد (Wiedemann و همکاران ، ۲۰۰۱)

نایسین به دلیل اینکه نمی تواند به دیواره سلولی پیچیده باکتریهای گرم منفی نفوذ کند و به محل فعالیت خود یعنی غشاء سیتوپلاسمی برسد در مقابل باکتریهای گرم منفی کارایی ندارد (Thomas ، ۲۰۰۵) استفاده همزمان از نایسین و یک ماده شیمیایی آلی مانند EDTA به آن اجازه می دهد که در مقابل باکتریهای گرم منفی کارایی داشته باشد از آنجایی که چلاتورها (Chelating agents) با آنیونهای دو ظرفیتی دیواره سلول باکتری ترکیب می شود ، فسفولیپیدها و لیپوپروتئینها را آزاد می کند و نفوذپذیری دیواره سلول را افزایش می دهد (Stevens و همکاران ، ۱۹۹۱) .

همانطور که در بالا شرح داده شد فعالیت نایسین زمانی که در داخل ماده غذایی قرار می گیرد کاهش می یابد . ترکیبات مهمی در ماده غذایی مانند سدیم متابیسولفیت ، دی اکسید تیتانیم ، +Ca2 و+Mg2 می توانند عملکرد نایسین را کاهش دهند (Abee و همکاران ، ۱۹۹۴) حضور لیپیدها و حتی پروتئینها در غذا می تواند با ترکیب یا واکنش با نایسین باعث کاهش کارایی نایسین در مقابل باکتریها شود . برای مثال در تحقیقی بر روی عملکرد همزمان نایسین و ترکیبات آلی مانند (فسفات، سیترات، EDTA) مشاهده شد که این ترکیبات بر روی دو باکتری E. coli و Salmonella Typhimurium در محلولهای بافری تأثیر مثبت دارند ، اما عملکرد آنها در گوشت

گوساله کاهش می یابد (Cutter و Siragusa ، ۱۹۹۵) بنابراین باید از یک سیستم انتقال مناسب برای این ماده ضد میکروبی استفاده نمود .

زمان ماندگاری[6] ماهی با ارزیابی شدت واکنش‌های آنزیمی، درجه حرارت و تعداد و نوع میکروارگانیسم‌های مولد فساد تعیین می شود (b)Huss، ۱۹۹۵). یکی از عوامل افزایش زمان ماندگاری، استفاده از روشهای بسته بندی مناسب می‌باشد. از مهمترین مزایای بسته بندی می‌توان به افزایش کیفیت ماهی، جلوگیری از اکسیداسیون چربی، حفظ تازگی، سهولت در انبارداری و حمل و نقل و در نهایت فروش راحت‌تر محصول اشاره نمود (Cakli و همکاران، ۲۰۰۶) از روش های بسته بندی ماهی، استفاده از روش خلاء و اتمسفر اصلاح شده (MAP)[7] می باشد. در بسته بندی به روش خلاء ، فرآورده نهایی در محیطی فاقد اکسیژن بسته بندی شده و شرایط کاملا بی هوازی می باشد. در روش اتمسفر اصلاح شده، ترکیبی از گازهای معین (دی اکسید کربن، ازت و اکسیژن)، جایگزین هوا در بسته شده و سپس عمل بسته بندی انجام می‌گیرد. مطالعات نشان داده که درصد افزایش ماندگاری در سیستم MAP در مقایسه با نگهداری در معرض هوا از صفر (بدون افزایش) تا ۲۸۰٪ متغیر می‌باشد (Sivertsvik و همکاران ، ۲۰۰۲ ، Lyhs و همکاران، ۲۰۰۷).

۸-۱- انتقال بیماری از طریق آبزیان

ماهی ها توانایی انتقال بسیاری از عوامل عفونی و مسمومیتهای غذای به انسان را دارا بوده که به این نوع بیماریهای قابل انتقال Fishborn zoonotic گفته میشود. مطالعات نشان دادکه به طور کلی ۷۶ میلیون نفر در معرض خطر این بیماری اند. از ۵۱۳۳ نمونه بیماری Foodborn ، ۳۴۰ مورد به غذاهای دریائی آلوده بوده اند. در ذیل به برخی از بیماریهای مهم اشاره میگردد (Varnam, 1991):

۱- مسمومیت غذائی میکروبی (Food intoxication) :

مسمومیت غذائی که توسط میکروارگانیسم ها ایجاد می گردد به علت توکسینی است که از آنها یا در مواد غذائی و یا در روده مصرف کننده ترشح می گردد. به هر صورت در این گونه بیماریها هیچ گونه عفونتی ایجاد نمی گردد و شدت و حدت بیشتر مسمومیت های غذائی به میزان ورود میکروبهای زنده به بدن انسان بستگی دارد (Guyer, et al.,1991).به طور کلی مسمومیت غذائی بیماری است که در نتیجه مصرف غذا یا آب آلوده بوجود می آید . مسمومیت غذائی میکروبی به دو دسته تقسیم می شوند:

- مسمومیت غذائی که در نتیجه ورود و جایگزینی میکروارگانیسم ها در بدن بوجود می آید.
- مسمومیت غذائی که در نتیجه وجود سم حاصل می شوند.

---

[6] .Shelf life

[7] . Modified Atmosphere Packaging

از این دسته از میکروارگانیزمها می توان به کلستریدیوم بوتولینوم(Clostridium botulinium) ، کلستریدیوم پرفرنجنس(Clostridium perfrigenes) ، باسیلوس سرئوس(Bacillus cereus) و مسمومیت قارچی (کپکها و مخمرها) اشاره کرد.

۲- عفونتهای غذایی (Food infection) :

به بیماریهای مشترک بین انسان و سایر جانوران اصطلاحا" بیماریهای زئونوز گفته می شود. بسیاری از زئونوزها می توانند از طریق خوردن مواد غذایی آلوده منتقل گردند. عفونتهای غذایی معمولا" با عوارض گوارشی از قبیل استفراغ، اسهال، دردهای شکم و تشنجات عصبی همراه میباشند (Guyer et al.,1991).

برخی از عوامل مهم مسبب ایجاد عفونت غذایی شامل , سالمونلا(Salmonella), اشریشیا کلی آنتروپاتوژن (Escherichia coli), یرسینیا (Yersinia),لیستریا (Lysteria)می باشند(Varnam, 1991).

۹-۱- استات سدیم

از آنجاییکه باکتری های گرم منفی عامل اصلی فساد ماهی در یخچال هستند، ناکارآمد بودن نایسین علیه باکتری های گرم منفی استفاده از آنرا ملزم به همراه بودن با سایر مواد افزودنی شیمیایی می کند. این مواد ساختار لایه لیپوپلی ساکاریدی غشاء باکتریهای گرم منفی را از بین می برند و به ماده ضد باکتری اجازه می دهد که به غشاء سیتوپلاسمی دسترسی پیدا کند ((Abee 1995; Davidson and Branen 2004.

از گروه دیگر متابولیتهای میکروبی میتوان به اسیدهای آلی اشاره نمود که فعالیت باکتریوسینها را تکمیل نموده و بیشترین اثر مهار کننده را بر باکتریهای گرم منفی نشان میدهند. مکانیسم عمل این گروه از متابولیتها، مختل نمودن فعالیت سلول و اجزای درون سلولی میباشد (Sallam ، ۲۰۰۶). در صنایع غذایی از نمکهای سدیم اسیدهای آلی با وزن مولکولی کم مانند لاکتیک ، استیک ، سیتریک به منظور کنترل رشد میکروبی ، بهبود خواص حسی و افزایش مدت زمان ماندگاری مواد غذایی مانند گوشت قرمز(Sallam و Samejima ، ۲۰۰۴) و ماهی (Boskou و Beuchat ، ۲۰۰۰) استفاده می شود. عوامل ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی مانند استات و سیترات سدیم علاوه بر ایجاد طعم مقبول و کنترل pH (USFDA ، ۱۹۹۵) در افزایش دوره ماندگاری مواد غذایی نگهداری شده در شرایط مختلف نگهداری موثر می باشند (Kim ، ۱۹۹۵ و Kashiri و همکاران ، ۲۰۱۱)

به علاوه با توجه به اثر مهارکنندگی این نمکها در مقابل باکتریهای عامل فساد مواد غذایی ، این نمکها می توانند خواص آنتی باکتریایی در مقابل انواع باکتریهای بیماریزای غذا از جمله استافیلوکوکوس اورئوس ، یرسینیا انتروکولیتیکا ، لیستریا مونوسیتوژنز ، اشرشیا کولی و کلاستریدیوم بوتولینوم نشان دهند (Lee ، ۲۰۰۲) . به علاوه این نمکها به راحتی در دسترس بوده و به طور کلی بی خطر و فاقد عوارض جانبی برای انسان شناخته شده اند (Sallam ، ۲۰۰۶ و حق پرست و همکاران ، ۱۳۸۷) .

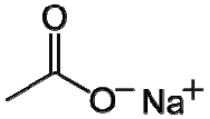
نمک سدیم، اسید های آلی با وزن ملکولی کم مثل اسید استیک، اسید لاکتیک و سیتریک به منظور افزایش عمر ماندگاری محصولات متنوع غذایی مثل تولیدات گوشتی (Sallam, 2007; Maca et al., 1997 ; Davidson and Huang and Beuchat, 1996 ؛Boskou and Debevere, 2000) (جوجه، اردک، شتر مرغ) و ماهی (Harrison 2002) استفاده شده است.

پژوهش ها نشان داد که اثر آنتی باکتریایی نمک های اسید های آلی هنگامی که بصورت ترکیبی مورد استفاده قرار می گیرند افزایش می یابد.(Qvist et al, 1994; Blom et al, 1997; Samelis et al., 2002) که نتایج این پژوهش ها منجر به استفاده از افزودنی های شیمیایی در محصولات گوشتی و افزایش کاربردهای تجاری آن گردید. این پژوهش ها منجر به تصویب استفاده از افزودنی های شیمیایی در محصولات گوشتی و همچنین افزایش تعداد کاربردهای تجاری آن شد.

استات سدیم با برچسب E۲۶۲ به عنوان یک نگه دارنده در صنایع غذایی استفاده می شود. این ماده را می توان از واکنش بین اسید استیک و کربنات سدیم، بیکربنات سدیم یا هیدوکسید سدیم در آزمایشگاه تولید کرد ولی به دلیل ارزان و باصرفه بودن معمولاً از فروشگاه های عرضه کننده مواد شیمیایی تهیه می شود.

$$CH_3–COOH + Na^+[HCO_3]^- \rightarrow CH_3–COO^- Na^+ + H_2O + CO_2$$

جدول ۱- ۱ خصوصیات شیمیایی و فیزیکی استات سدیم

ظاهر	جرم مولی	فرمول مولکولی	نام سیستماتیک	فرمول شیمیایی
پودر سفید آب شونده	۸۰/۰۳(g/mol) (anhydrate) ۱۳۶/۰۸(g/mol) (Trihydrate)	CH_3COONa	سدیم اتانوات (سیستماتیک) سدیم استات (IUPAC)	
ساختار کریستالی	نقطه ذوب	(pKa)قدرت بازی	حلالیت در آب	فاز و چگالی
مونوکلنیک	۳۲۴ °C	۹/۲۵	۷۵g /۱۰۰ml (0°C)	۱/۴۵(g/cm^3), جامد

تحقیقات زیادی جهت پاسخ به این سؤال که چرا اسیدهای آلی و نمک آنها از رشد پاتوژن ها و میکروارگانیزم های مسئول فساد مواد غذایی جلوگیری می کنند، انجام شده است. بسیاری از آنها کاهش pH را عامل اصلی این ویژگی می دانند(Jensen et al, 2003 ؛USDA, 1995 ؛ Maca et al, 1997).

در مطالعه Ita و همکاران که در سال ۱۹۹۱ انجام دادند مشخص شد که لیستریا مونوسایتوژنز که یکی از مهمترین باکتری های فساد در محصولات دریایی کنسرو و دودی شده هستند، حتی در pH ۳/۵، نیز زنده می ماند این در حالی است که گزارشات زیادی مبنی بر اثر بازدارندگی اسید های آلی و نمک آنها بر لیستریا مونوسایتوژنز وجود دارد.

اگر چه اسیدهای لاکتیک وسیتریک در کاهش pH نسبت به اسیدهای استیک مؤثرتر می باشند ولی اسیدهای استیک بر بقاء سلول اثر بیشتری دارند. کاهش pH سیتوپلاسم توسط اسیدهای استیک یک اثر سمی اضافی را نیز بر روی سلول اعمال می کنند. بنابراین اثرات آنتی باکتریایی این اسید تنها به خاطر کاهش pH بین سلولی نبوده بلکه به دلیل اثرات ویژه فرم تجزیه شده اسید بروی فعالیت متابولیکی و فیزیولوژیکی سلول نیز می باشد(Jensen and et al, 2003).

به دلیل تمایل مصرف کنندگان به کاهش استفاده از افزودنیهای شیمیایی (Vescovo and et al, 2006 ; Tome and et al, 2006)، پژوهش های زیادی در زمینه استفاده از افزودنی های بیولوژیکی به عنوان ابزاری جهت کنترل طبیعی میکروارگانیزم های عامل فساد و بیماریزا (خصوصاً لیستریا) که منشا غذایی در گوشت منجمد (Budde and et al, 2003) ، مواد گیاهی (Schillinger and et al, 2001)، لبنیات (Foulquié Moreno and et al, 2003) و غذاهای دریایی (Vaz-Velho and et al, 2005 ;Brillet and et al, 2004 ;Duffes and et al, 2000 ;Katla and et al, 2001 ; Lyver and et al, 1998 ;Weiss and Hammes, 2005 ;Vescovo and et al, 2005; Tome and et al, 2006) دارند انجام شده است.

برخی مطالعات نیز استفاده بالقوه از اسیدهای آلی یا نمک شان که بعنوان محلول های آنتی میکروبی قبل از فرآوری، به تنهایی یا ترکیب با سایر ترکیبات، که بصورت اسپری کردن یا غوطه وری روی محصول قبل از بسته بندی انجام می شد را محدود کردند (Palumbo and Williams, 1994; Jumah et al., 2000; Klinkesorn et al., 2006). فعالیت های آنتی میکروبی اسیدهای آلی یا نمک شان بصورت محلول های غوطه ور شده پیش از فرآوری هنگامی که در غلظت کمتر و ترکیب شان با افزودنی های بازدارنده، نظیر باکتریوسین یا دیگر آنتی میکروب های طبیعی استفاده شود افزایش پیدا خواهد کرد (Samelis and et al, 2005).

۱۰-۱- بسته بندی تحت خلاء (VP) در فرآورده های گوشتی

فرآورده مورد نظر در این روش در بسته‌ای با نفوذپذیری پایین اکسیژن قرار داده می‌شود، هوا از درون بسته تخلیه می‌گردد و سپس آن بسته درزگیری و بسته می‌شود. اتمسفر گازی بسته‌بندی خلاء (Vaccum Packaging) احتمالاً در طی نگهداری تغییر می‌یابد (از متابولیسم ماده غذایی یا میکرواورگانیسم‌ها) و بنابراین آن فضا یا اتمسفر به صورتی غیرمستقیم اصلاح می‌گردد (Ozogul, 2004). وجود اکسیژن در فضای بسته سبب فساد محصولات در برابر اکسیداسیون می‌گردد و در بعضی موارد وجود اکسیژن سبب رشد و فعالیت میکروارگانیسم‌ها می‌گردد، بنابراین در این روش تخلیه اکسیژن و سایر گازها و خالی نمودن بسته‌بندی از هوا راهی برای ماندگاری بیشتر محصول می‌باشد(Özogul, 2000). مدت زمان ماندگاری ماهی و گوشت بسته بندی شده در شرایط تحت خلاء به فاکتور های متعددی بویژه کیفیت میکروبیولوژیکی محصول، pH گوشت یا ماهی در زمان بسته بندی، نفوذپذیری فیلم بسته بندی مورد استفاده، سالم بودن بسته و دمای نگهداری بستگی دارد که

موفقیت سیستم بسته بندی تحت خلاء کاملا بستگی به کیفیت اولیه ماهی و کنترل درجه حرارت مناسب در طول ذخیره سازی را دارد(Gibson, 1995).بسته بندی تحت خلاء به طور قابل ملاحظه ای از طریق ایجاد یک محیط بی هوازی از رشد باکتری های هوازی عامل فساد جلوگیری می کند که عموما شامل باکتری های گرم منفی مانند سودوموناس یا مخمرهای هوازی و کپک ها می شود که این میکروارگانیسم ها مسئول بوی بد(off odors) و تغییرات بافت و ایجاد ماده لزج که از نشانه های فساد هستند می باشد. بسته بندی تحت خلاء همچنین به طور قابل ملاحظه ای فساد اکسیداتیو را در ماهی منجمد و محصولات دریایی کاهش می دهد(Ordonez, 2000). در بسته بندی تحت خلاء با توجه به فعالیت کمتر میکروارگانیسم ها در شرایط خلاء، تخریب بافت گوشت کاهش یافته که در نهایت منجر به حفظ بیشتر کیفیت بافت فیله می گردد .از معایب این نوع بسته بندی کاهش کیفیت ظاهری فیله هاست که در اثر آبچک ایجاد می گردد(Huss., 1971).

این دو نوع از بسته‌بندی حفاظتی یاد شده به وسیله روشی که در آن ارگانیسم‌های عامل فساد کنترل و از همدیگر متمایز می‌گردند. در بسته‌بندی‌های خلاء از رشد ارگانیسم‌های هوازی به دلیل خارج سازی اکسیژن از محیط درون بسته‌ها جلوگیری به عمل می‌آید، فساد و آلودگی در زمان‌های طولانی در اثر رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌هایی که رشد کند داشته و قادر به زیستن در شرایط بی‌هوازی می‌باشد امکان پذیر است. در بسته‌بندی‌های انجام شده با اتمسفر اصلاح شده و یا اکسیژن بالا (High- O_2 MAP)، رشد میکروارگانیسم‌های هوازی بیشتر می‌گردد، در بسته‌های اصلاح شده با اتمسفر کم اکسیژن (Low- O_2 MAP)، غلظت CO_2 می‌تواند سبب کند کردن رشد گونه‌های مقاوم در برابر شرایط بی‌هوازی گردد (Simon, 2006; Hudecová et al., 2010).

۱۱-۱- لیستریا

خصوصیات ظاهری و بیوشیمیائی لیستریا :

لیستریا درسال ۱۸۶۰ توسط یک جراح بریتانیائی بنام لردجوزف لیستر(Lord joseph lister) کسی که, برای جلوگیری از عفونت جراحیها ضد عفونی کردن را کشف کرد. لیستریا کوچک، گرم مثبت، کوکوسید، که به شکل میله ای است و در اثر حرارت بالا کاهش می یابد. این ارگانیزم کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی، متابولیسم تخمیری از گلوکز دارد که تولید اسید می کند نه گاز (Seeliger, et al . 1986). لیستریا درحدود ۲ تا ۰/۵ * ۴/ ۰تا۰/۵ میکرومتر میباشد (Dillon, 1993). کلنی سطحی کوچک، پهن, شفاف, سفید مایل به آبی و قطر آنها از یک میلی متر تجاوز نمی کند.

- پراکنش لیستریا :

این ارگانیزم به طور معمول در سطح آبها و دریاچه ها و سواحل آبها (Colbum et al., **۱۹۹۱**) دیده شده است. آبهای دریائی غیر آلوده و آبهای زیر زمینی و چشمه ها فاقد این ارگانیزم اند و ماهیانی که از این آبها استفاده می کنند فاقد آلودگی اند (Huss, et al.,1995). لیستریا به طور وسیعی در نقاط مختلف گسترش یافته و برای

مدت طولانی شناخته شده است و از خاک، آب، سبزیجات، لجن و حیوانات مختلف جدا شده است (Benmbreak, 1994). سلولهای این باکتری قادرند برای هفته ها و ماهها بدون کاهش چشمگیری در محیط های خشک و مرطوب زنده بمانند. در محیطهای نمکی قادر به رشد است و در محیط بدون اکسیژن نیز رشد می کند (Peterson, 1993; Lauzon 2002).

اداره کل غذا و دارو آمریکا (Food and Drug Administration) (FDA)توجه خاصی به نظارت به تولیدات غذاهای دریائی آماده مصرف و حرارت دیده و منجمد از نظر وجود لیستریا دارد. تعداد این باکتری در رودخانه ها به مراتب بیشتر از سالمونلا می باشد و از آب دریاچه ها و کانالها نیز جده شده است. آبی که کلر ندارد، احتمال انتقال این باکتری به انسان و حیوانات را افزایش می دهد (Vogel, et al., 2001).

لیستریا می تواند در لجن زنده بماند و آب را مرتبا" آلوده کرده و این آلودگی به پوست و محتویات روده ماهی منتقل شده و باعث آلودگی دوباره آب و لجن می شود و این سیکل با پرورش متوالی ماهی افزایش می یابد (Watkins, etall ., 1981).آلودگی در حین عمل آوری و خطرات ناشی از آلودگی میکروبی در ماهی دودی اساسا" به علت تماس با آب رخ داده است (Dodds,et al.1992).

- لیستریا به عنوان یک عامل انتقال بیماری ناشی از مواد غذائی :

لیستریا در حدود۲۰ سال پیش به عنوان عامل بیماری غذائی شناخته شده است . بیماری بطور متداول تر در نواحی معتدله، و به ندرت در نواحی حاره، دیده می شود (Bowmer, 1995).

لیستریا از عوامل مهم بیماریزا ناشی از مواد غذائی بوده وباکتری گرم مثبت که دو خصوصیت عمده آن ما را در تشخیص این باکتری در مواد غذائی کمک می نماید (Donn, 1992)

۱-گستردگی زیاد آن در طبیعت

۲-توانائی رشدآن در دمای یخچال

تا حال حاضر رابطه مستقیمی بین شیوع لیستریا و آلودگی دریائی مواد غذائی دریائی پیدا نشده، با وجود این لیستریا از فراورده های دریائی خام و فراوری شده جداسازی شده است (Gram , 1999).

لیستریا از جمله باکترهایی است که از نظر مسمومیت غذایی و سایر بیماریهایی که در انسان و دام ایجاد می کند از اهمیت خاصی برخوردار استت . این باکتری منجر به بیماری لیستریوزیر در انسان می شود . Dalton وهمکاران در سال ۱۹۹۷ روی شیوع بیماری لیستریوزیزفعالیت کردند که نشان دهنده آن است که در هر میلی لیتر از محصول غذائی به طور بسیار وسیعی درحدودcfu ۱۰دیده شده است.

گروهی که مستعد به این بیماری اند زنان حامله و جنین آنها ،بیماران سرطانی و دیگر افرادی که ایمنی ضعیف دارند از جمله دیابتی ها و افراد سالخورده می باشد آلودگی به لیستریا منجر به سپتی سمی(Septicemia) ، مننژیت ،ورم مغز و ورم روده کوچک می گردد. در حال حاضر پادگنی لیستریا به ۱۳ سروتیپ تقسیم می شود که نتیجه تکنیک بیولوژیکی- ژنتیکی مولکولهای مدرن همراه با مطابقت ژنی است .(Seeliger and Jones 1986) . خطر

لیستریوزیز در مناطقی که آب رودخانه ها را برای شستشوی حیوانات و یا آبیاری مورد استفاده قرار می گیرند بالا می باشد (Autio, et al.,1999) . بیماری بیشتر توسط سروتیپ های4b ,1b,2a تولید می شود (Tina, 1996).

۷جنس ازلیستریا شناسایی شده که عبارتند ازلیستریاایوانوئی(*L.ivanoii*)، لیستریاسیلجری (*L.seeliger*)لیستریامونوسیتوژنز(*L.monocytogenes*)، لیستریا اینوکوآ (*L.innocua*)لیستریا ولسبیمری(L.welsbimeri) , لیستریا گری(L.gray). لیستریا ماریا (L.murrayi)(Seeliger، et al., 1986).گونه هشتمی نیز بنام لیستریا دنتریفیکن (L.denitrificans) وجود دارد که دیگر جز لیستریا محسوب نمی شود ولی وضعیت تقسیم بندی آن هنوز معلوم نیست. بر پایه همولوژی RNA–DNA پنج گونه اول یک جنس واحد را تشکیل می دهد و پیشنهاد شده که دو گونه آخر در جنسی تحت عنوان مورایا قرار دارد. لیستریوز برای اولین بار در سال ۱۹۲۶بوسیله مورای و همکاران به ثبت رسید.

بیماری لیستریوز ناشی از لیستریا می باشد که در سال از هر یک میلیون ۵ نفر به این بیماری دچار می شوند. بیشتر آلودگیها ئی که گزارش شده مربوط به L.monocytogenes و L.innocua (Kazak etal.,1996; Jay,2000) .

نمونه های ماهی دودی از نظر آلودگی به لیستریا مورد آزمایش قرار گرفتند و نتایج نشان داد که ۱۶٪ نمونه ها به لیستریا مونوسیتوژنز و ۲۲٪ به گونه های دیگر لیستریا آلوده بودند(Rovik, et al., 1993) . لیستریا مونوسیتوژنز باکتری است که در همه جا واکثر مواد غذائی یافت می شود و به عنوان عامل اولیه شیوع اغلب عفونتها ی ناشی از مصرف مواد غذائی در آمریکای شمالی و سوئیس شناخته شده است که مرگ ومیر این اپیدمیها بسیار بالا بوده است (۳۰-۲۵٪) (Gram et al., 2004) در سال از هر یک میلیون ۵ نفر به این بیماری دچار می شوند . بیشتر آلودگیها ئی که گزارش شده مربوط به L.monocytogenes و L.innocua (Kazak, etal., 1996).

در ذیل به دلیل اهمیتی که لیستریا مونوسیتوژنز دارد به بررسی آن پرداخته می شود :

لیستریا منوسیتوژنز باکتری میله ای شکل،گرم مثبت و به طول ۲-۱ میکرون است و معمولا"یک سر آن اندکی متورم می باشد و از این جهت به کورینه باکتریها شباهت دارد (Kyriakides, et al., 2003). اشکال کوکسی مانند این باکتری نیز اغلب در کشتهای کهنه دیده می شود. لیستریا مونوسیتوژنز هاگ تولید نمی کند .در اثر کهنه شدن گرم منفی میشود و به اشکال غیر عادی در می آید. سلولهای این باکتری قادرند برای هفته ها و ماهها بدون کاهش چشمگیری در محیط های خشک و مرطوب زنده بمانند . در محیط کشت ممکن است باکتریها به طور مجزا و یا دوتائی با زاویه تند نسبت به یکدیگر قرار گیرند ویا زنجیره های کوتاهی تشکیل دهند. لیستریا مونوسیتوژنز در شرایط هوازی در بیشتر محیطهای عادی آزمایشگاه به طور خفیف رشد می کنند. منظره ظاهری کشت این باکتری به استرپتوکوکها شباهت دارد. برای جداکردن این لیستریا از آگار خوندار استفاده می کنند . به این صورت که پس از ۲۴ ساعت در سطح ودر عمق محیط کلنی های میکروب ایجاد می گردد. کلنی های عمقی بسیار ریز و نقطه ای شکل است واطراف آن منطقه باریکی از همولیز کامل احاطه کرده است .

خصوصیات بیوشیمیایی لیستریا مونوسیتوژنز در جدول ۱-۲ نشان داده شده است

جدول ۱-۲ : خصوصیات بیوشیمیایی لیستریا مونوسیتوژنز (شیمی .۱۳۷۶)

ردیف	نوع آزمایش	نتیجه
۱	مشخصات ماکروسکوپی	سطحی کوچک ،پهن وشفاف مایل به آبی
۲	اندازه کلنی(میلی متر)	<۱
۳	تخمیر گلوکز	+
۴	تخمیر رامنوز	+
۵	تخمیر سالیسین	+
۶	تخمیر ساکارز	+ ضعیف
۷	تخمیر دکسترین	+ ضعیف
۸	تخمیر مانیتول	-
۹	تخمیر گزیلوز	-
۱۰	تولید کاتالاز	+
۱۱	تولید اندول	+
۱۲	تولید H2S	+
۱۳	تولید آنزیم اوره آز	-
۱۴	قدرت احیاء نیترات	-
۱۵	تولید آنزیم اکسیدار	-

لیستریا مونوسیتوژنز به طور گسترده در طبیعت از جمله : خاک ، سبزیجات ،رسوبات دریاها و رودخانه ها و آبها جداشده است (Embreak, 1994). لیستریا مونوسیتوژنز در دمای یخچال ۵- ۴ درجه سانتی گراد نیز قادر به رشد است. تیمار حرارت روی لیستریا مونوسیتوژنز تاثیر به سزائی دارد و مقدار آن در غذاها را کاهش می دهد . رنج فعالیت لیستریا مونوسیتوژنز در PH ۹/۴ -۴/۳۹ می باشد و عمده ترین عامل زنده باقی ماندن لیستریا میزان PH محیط است در PH برابر۵ وبالاتر از آن لیستریا ازدیاد حاصل می کند ولی در PH کمتر از ۵ رشد باکتری ضعیف است . اپتیمم فعلیت آبی (aw) ۹۲/. می باشد (Gram . ,2004). در دمای پایین رشد می کند و حداکثر دمایی که می تواند تحمل کند ۴۵-۴۲ درجه سانتی گراد است (Rovik, 1995) لیستریا مونوسیتوژنز در برابر گرما بیش از بیشتر باکتریها ی فاقد هاگ مقاوم است. گرچه در حرارت پاستوریزاسیون از بین می رود ولی اگر تعداد باکتری ها بیش از ۱۰۰۰ در هر لیتر باشد ممکن است حرارت پاستوریزاسیون نتواند تمام باکتریهارا نابود کند. در محیطهای نمکی قادر به رشد است و در محیط بدون اکسیژن نیز رشد می کند (Peterson, 1993).

سویه های مختلف لیستریا مونوسیتوژنز از نظر پادگنی متفاوت می باشد . پانزده نوع پادگن O و۵ نوع پادگن H در انواع مختلف این باکتری شناخته شده است . پادگن H را با حروف وپادگن O را با عدد نمایش می دهند. به علت مشاهده مکرر لیستریا مونوسیتوژنز در ماهی دودی، بررسی و شناسائی محلهای آلودگی و نحوه کنترل

محصولات مورد توجه قرار گرفته است این باکتری در آبی که در دمای اطاق نگهداری می شود به مدت ۳۰-۱۰ روز ودرآب سرد که در یخچال نگهداری می شود به مدت ۱۱۰-۷۰ روز زنده می ماند (Huss, et al., 2000). علاوه بر بیماری های عفونی ، این باکتری عامل مسمومیت غذایی درانسان بوده و از طریق مصرف فرآورده های مختلف از جمله محصولات شیلاتی منتقل می شود .

۱۲-۱- کلستریدیوم بوتولینوم

بوتولیسم عبارت است از مسمویتی که توسط توکسین مترشحه از یکی از بی هوازی های هاگ زا به نام *Clostridium botulinum* ایجاد می گردد. این میکروارگانیسم در خاک و آب های نزدیک سواحل در اکثر نقاط جهان به وفور یافت می گردد و هشت نوع توکسین ترشح می نماید که با روش های ایمونوبیولوژیک قابل تفکیک می باشند. برحسب نوع توکسین مترشحه کلستریدیوم بوتولینوم دارای ۸ تیپ مختلف می باشد که آنها را از A تا G نامگذاری می نمایند.این مسمویت غذایی به صورت سندرم نوروپارالیتیک است که اغلب با اختلالات و عوارض در معده و روده ها همراه می باشد. ۱۲ تا ۳۶ ساعت پس از دریافت توکسین، اسهال و استفراغ و سپس ضعف و پریدگی رنگ ایجاد می گردد. علاوه بر آن خشکی دهان و گلو و اشکال در بلعیدن از علائم اولیه این بیماری است. پس از مدتی نشانه های فلجی در ماهیچه های صورت، زبان و دست و پا آغاز می گردد و در اثر فلج شدن N.phrenicus تنفس دچار اشکال شده و سرانجام در اثر خفگی و از کار افتادن قلب مرگ فرا می رسد. مرگ و میر و شدت مسمویت بستگی به نوع و میزان توکسین دارد. در بسیاری از موارد پس از ۲۰ الی ۲۴ ساعت منجر به مرگ می شود، ولی در صورتی که بیماران مسموم ده روز اول بیماری را بگذرانند معمولاً خطر مرگ منتفی خواهد بود(Peck et al 2006; Baker etal 1990; Cockey and Tatro 1974).

برای ایجاد توکسین در مواد غذایی شرایط زیر ضروری می باشد:

الف- محیط بی هوازی که معمولاً در قوطی های کنسرو وجود دارد و نیز در ظروف در بسته با کمک مصرف اکسیژن توسط سایر میکروارگانیسم های هوازی ایجاد می گردد.

ب- درجه حرارت مناسب جهت تکثیر کلستریدیوم بوتولینوم که برای تیپ های A و B بین (۱۲/۵-۱۰) و (۵۰-۴۷/۵) درجه سلسیوس می باشد. تیپ E به عنوان تیپ سرماگرا شناخته شده و می تواند در عرض ۳۱ الی ۴۵ روز حتی در برودت $^{\circ}c$ ۳/۳+ نیز تولید توکسین نماید. رطوبت به نسبت زیاد، نمک کم، اسید کم(pH بالای۴/۶)، غذاهای عاری از اکسیژن و نگهداری شده بدون یخچال (بالای ۳/۳ درجه) ، رشد و توکسین زایی کلستریدیوم بوتولینوم را حمایت می کنند. با استفاده از استریلیزاسیون تجارتی، پاستوریزاسیون همراه با سایر معیار های کنترل مثل نیتریت و نمک، همچنین استفاده از یخچال در مورد مواد گوشتی واکیوم شده فاسد شدنی، می توان مسمومیت با کلستریدیوم بوتولینوم را کنترل کرد.

مهمترین مواد غذایی که در معرض خطر مسمومیت بوتولیسم قرار دارند عبارتند از انواع کنسروها به ویژه کنسروهای سبزی ها مثل مارچوبه، اسفناج، نخودفرنگی، لوبیا و در مرحله بعد کنسروهای گوشتی و ماهی. علاوه بر آن فرآورده های دیگری مثل انواع ماهی دودی بسته بندی شده نیز در معرض خطر این آلودگی می باشند. در لبنیات به ویژه در کشک آلودگی فوق به ندرت مشاهده شده است. ارگانیسم و اسپور این باکتری در خاک زراعی و جنگل، رسوبات بستر رودخانه ها، دریاچه ها، و وجود داشته و همچنین در روده ماهی و پستانداران نیز وجود دارد. کلستریدیوم بوتولینوم، نوع E، بارها از رسوبات جدا شده است در مناطق ساحلی آمریکای شمالی، روسیه و اسکاندیناوی و همچنین از نمونه ماهی از این مناطق نیز جدا شده است (Peck et al 2006; Baker etal 1990).

۱۳-۱- ماهی قزل آلا رنگین کمان

در بین گونه های متفاوت پرورشی ماهی قزل آلای رنگین کمان (Oncorhynchus mykiss) از نظر تولید بالای سالیانه، قابلیت ، دسترسی برای مصرف کننده و پراکنش مناسب از اهمیت زیادی بین پرورش دهندگان و مصرف کنندگان برخوردار است (حمزه و رضایی، ۱۳۹۰).

ماهی قزل‌آلا در اکثر استانهای کشور عرضه می‌گردد بررسی وضعیت حمل و نقل نشان می‌دهد که هم اکنون در حمل ونقل این ماهی، رعایت زنجیره سرما از صید تا عرضه به صورت ناقص اعمال می‌شود. بررسی شرایط حمل و نقل و عرضه نشان می‌دهد که ماهی قزل آلا به یکی از روش های ذیل عرضه می شود. بخشی از ماهیان صید شده در شرایط دمایی محیط و بدون استفاده از شرایط سرمایی به مشتری تحویل می گردد. این روش بیشتر در محل مزارع و یا در بازار ماهی فروشان عرضه می گردد(بدون تخلیه امعاء و احشاء). بخش دیگر در کنار یخ و بدون بسته بندی به شهرهای دور و نزدیک یا در فروشگاهها عرضه می‌شود (با تخلیه امعاء و احشاء و یا بدون تخلیه) و بخش دیگر نیز پس از صید به محل فرآوری حمل و سپس سرو دم زنی، تخلیه امعاء و احشاء ، بسته بندی و منجمد شده و به بازار عرضه می گردد. بدلیل عدم رعایت زنجیره سرما در حمل و نقل و عرضه خصوصاً در دو روش اول و دوم، ماهی سریعتر به مرحله فساد رسیده و از زمان ماندگاری آن کاسته می‌شود. این وضعیت (شرایط حمل و عرضه) تولید کننده را مجبور می نماید تا در بازار رقابت و تجارت در مدت زمان کوتاهی، ماهی را عرضه نماید زیرا در صورت طولانی شدن مدت عرضه، ماهی به مرحله فساد رسیده و باعث ضرر اقتصادی خواهد شد (سلمانی ، ۱۳۸۶). نظر به ارزش اقتصادی و غذایی، درصد بالای تولید ، شیوه های نگهداری موقت و عرضه این ماهی، بررسی کیفیت و تعیین عمر ماندگاری آن در یخچال و تأثیرات بسته بندی و افزودنی های مختلف بر آن از جنبه های مهم مطالعات کیفی در بهداشت و تغذیه انسان بشمار می رود.

۲- مطالعات انجام شده در کشور

اجاق و همکاران (۱۳۸۳) اثر آنتی اکسیدانهای طبیعی بر کیفیت ماهی کیلکای معمولی (Clupeonella cultriventris caspia) به هنگام نگهداری در یخ را مورد بررسی قرار دادند شاخص‌های عدد پراکسید[8] و تیوباربیتوریک اسید[9] در زمان‌های ۱۴، ۳۸ و ۶۲ ساعت پس از صید اندازه گیری و با نمونه مشابه بدون آنتی‌اکسیدان (گروه شاهد) مقایسه شدند. بر اساس نتایج آماری، اگر چه در همه‌ی تیمارها با گذشت زمان مقادیر عدد پراکسید و تیوباربیتوریک اسید به شکل معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) افزایش یافت اما در نمونه‌های حاوی آنتی‌اکسیدان در مقایسه با نمونه شاهد در هر سه زمان (۱۴، ۳۸ و ۶۲ ساعت) به شکل معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) عدد پراکسید و تیوباربیتوریک اسید کمتری داشت. با توجه به نتایج حاصل از آزمایش ارگانولپتیکی (رنگ، بو، بافت، طعم) و نبود تفاوت معنی‌دار میان دو آنتی‌اکسیدان می‌توان استفاده از هر دو نوع آنتی‌اکسیدان را در نگهداری این ماهی توصیه کرد.

اعتمادی و همکاران (۱۳۸۷) اثر آنتی باکتریایی و آنتی اکسیدانی عصاره رزماری (۰/۱٪) در ماهی قزل آلای بسته بندی شده در خلا را مورد بررسی شیمیایی، میکروبی و حسی قرار دادند و نتیجه گرفتند که غوطه وری نمونه ها در عصاره رزماری (۰/۱٪) به طور معنی داری اکسیداسیون لیپید و رشد میکروبی را به تاخیر انداخته و باعث افزایش عمر ماندگاری محصول می گردد.

انوری و همکاران در سال ۱۳۸۸ پتانسیل آنتی باکتریایی و آنتی اکسیدانی باکتریوسین Z (۰/۲٪)را در افزایش زمان ماندگاری فیله ماهی قزل آلای (Oncorhynchus mykiss) بسته بندی شده در خلأ در مدت ۱۶ روز نگهداری در دمای ۴ درجه بررسی کردند. در این آزمایش پارامترهای میکروبی (شمارش کلی باکتریها ، شمارش باکتریهای سرماگرا و باکتریهای اسید لاکتیک) و شیمیایی (PV، TVB-N ، TBA) اندازه گیری شدند . میزان PV و TBA در نمونه های حاوی باکتریوسین Z و تیمار شاهد در طول دوره نگهداری افزایش پیدا کرد ، در پایان دوره آزمایش این میزان برای تیمار شاهد از حد استاندارد بالاتر بود و در تیمار باکتریوسین کم تر از حد استاندارد بود . میزان TVB-N در نمونه های شاهد با سرعت بیشتری نسبت به تیمارهای حاوی باکتریوسین افزایش پیدا کرد . همچنین بررسی فاکتورهای میکروبی بیانگر آن بود که مقادیر باکتریهای سرمادوست ، لاکتیک و کل باکتریها در روز ۸ نگهداری در نمونه های شاهد از حد آستانه تعیین شده بالاتر رفت . بر طبق نتایج انوری باکتریوسین Z توانست عمر ماندگاری فیله ماهی قزل آلا ی بسته بندی شده در خلأ را در دمای ۴ ºC به میزان ۸ روز افزایش دهد .

اصغری و همکاران ۱۳۸۸ تأثیر نایسین Z و استات سدیم را بر زمان ماندگاری فیله کپور نقره ای Hypophthalmichthys molitrix در طی نگهداری در دمای ۴ درجه را به مدت ۹ روز بررسی کردند. در این

---

[8] . PV
[9] . TBA

آزمایش پارامترهای میکروبی (شمارش کلی باکتریها ، شمارش باکتریهای سرماگرا و باکتریهای اسید لاکتیک) و شیمیایی (عدد پراکسید ، مواد ازته فرار و اسید تیوباربیتوریک) اندازه گیری شدند. میزان PVو 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 از حد استاندارد بالاتر بود و در دو تیمار دیگر کم تر از حد استاندارد بود . مقادیر TVN در نمونه های حاوی نایسین افزایش پیدا کرد ولی تا قبل از روز ۹ به بیش از حد مجاز خود نرسید در حالی که در نمونه های شاهد در روز ۴ نگه داری به حد غیر قابل قبول برای مصرف رسیده بودند . بررسی شاخص های میکروبی بیانگر آن بود که میزان باکتری های سرمادوست، لاکتیک و کل باکتری ها در نمونه های شاهد بالاتر از نمونه های حاوی نایسین بود .همچنین در نمونه های حاوی نایسین میزان شاخصهای مذکور بالاتر از نمونه های حاوی ترکیب نایسین و استات سدیم بود ($p>۰/۰۵$) . به طوری که میزان کل باکتری ها در نمونه ی شاهد در روز ۴ و در نمونه های حاوی نایسین در روز ۶ و در نمونه حاوی هردو در روز ۹ از حد آستانه ی تعیین شده بالاتر رفت .

چوبکار و همکاران در سال ۱۳۸۹ مطالعه ای به منظور ارزیابی اثرات ضد میکروبی نایسین بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در فیله کپور نقره ای شور سبک و سنگین (۴ و ۸ درصد نمک) انجام دادند. اثر غلظتهای مختلف نیسین (۰، ۰/۱۵ ، ۰/۲۵ ، ۰/۷۵ و ۵/ میکروگرم بر میلی لیتر) بر رفتار رشد باکتری بررسی شد و نتایج نشان داد که نایسین دارای اثر بازدارندگی بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس است و می تواند به عنوان یک نگهدارنده طبیعی در ماهی شور سبک و سنگین مورد توجه قرار گیرد.

حق پرست و همکاران نیز در سال ۱۳۸۷ تغییرات کیفی فیله ماهی قزل آلای رنگین (*Onchorhynchus mykiss*) پس از غوطه وری در محلولهای نمکی سدیم طی نگهداری در یخچال (۴ ° C) را مورد بررسی قرار دادند . در این تحقیق فیله های ماهی در محلولهای نمکی لاکتات و سیترات سدیم ۲/۵ درصد (w/v) و آب مقطر به عنوان شاهد مدت ۱۰ دقیقه غوطه ور شده و سپس بسته بندی شده و در یخچال نگهداری شدند و در روزهای ۰ ،۳، ۶، ۹ و ۱۲ آزمایشات اندازه گیری TBA ، FFA[10] ، pH و ویژگیهای حسی (طعم ، رنگ و بو) انجام شد. نتایج حاکی از پائین تر بودن مقادیر TBA و FFA درتیمار حاوی لاکتات و سیترات سدیم نسبت به تیمار شاهد می باشد ($P <۰/۰۵$) . در حالیکه مقادیر pH حاصل از تیمار سیترات سدیم (به جز روزهای ۹ و ۱۲) به طور معنی داری بالاتر از تیمار لاکتاتت سدیم و شاهد می باشد ($P <۰/۰۵$) . همچنین بررسی ارگانولپتیک در پایان دوره ارزیابی (روز ۱۲) نشان دهنده بو طعم و رنگ بهتر تیمار سیترات سدیم نسبت به تیمار شاهد می باشد. با توجه به نتایج حاصله می توان بیان کرد که تیمار سیترات سدیم در جلوگیری از به تعویق انداختن اکسیداسیون چربی و بهبود خواص حسی دارای خواص کارکردی موثرتی نسبت به نمک لاکتات سدیم می باشد .

[10] .Free faty acid

۱-۲- مطالعات انجام شده خارج از کشور

Kashiri و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثر محلولهای نمکی سدیم (استات ، لاکتات و سیترات) را بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی و حسی فیله تاس ماهی ایرانی در طول ۱۲ روز نگهداری در دمای یخچال بررسی کردند. فیله ها در محلولهای نمکی استات ، لاکتات و سیترات سدیم ۲/۵ درصد (w/v) و آب مقطر به مدت ۱۰ دقیقه غوطه ور شده و سپس بسته بندی شده و در یخچال نگهداری شدند و در روزهای ۰، ۳، ۶، ۹ و ۱۲ آزمایشات اندازه گیری TBA ، FFA ، pH و ویژگیهای حسی (طعم ، رنگ و بو)انجام شد. آزمایشات نشان دهنده افزایش TBA با گذشت زمان بود و تیمار شاهد بالاترین میزان و تیمار استات سدیم کمترین میزان TBA را در انتهای دوره داشت ($P< 0.05$) . میزان FFA (Free Fatty Acids)اندازه گیری شده نیز در پایان آزمایش در تیمار استات سدیم کمترین و در شاهد بیشترین بود ($P< 0.05$) . در آزمایشات آنالیز حسی نیز امتیاز ات قابل قبول بهتری برای تیمار استات سدیم کسب شد. ترتیب اثر نمکهای سدیم در این تحقیق عبارت بود از استات سدیم > سیترات سدیم > لاکتات سدیم .

Jafari و همکاران در سال ۲۰۱۱ مقاله ای مروری با عنوان کارایی انکپسولیشن روغنها و طعم دهنده های غذا به روش خشک کن پاششی را به چاپ رساندند . در این مقاله میکروانکپسولیشن روشی بی نظیر برای بسته بندی مواد در اندازه ذرات کوچک میکرو و نانو معرفی شده و آنرا فرایندی دانسته که توسط آن مواد اولیه (هسته) توسط مواد ثانویه (دیواره) پوشش داده می شوند. در این مطالعه پیشرفتهای جدید در ریز پوشانی روغنها و طعم دهنده های غذایی توسط خشک کن پاششی بیان شد و فاکتورهایی را که می تواند روی کارایی ریزپوشانی با خشک کن پاششی تاثیر بگذارد معرفی شد.

Xiao و Zhong در سال ۲۰۱۱ تحقیقی با عنوان آزادسازی نایسین ریزپوشانی شده با زئین به همراه گلیسرول و tween 20 به روش خشک کن پاششی انجام دادند. در این مطالعه مشخص شد گلیسرول و tween 20 کپسولها را از یک فاز مداوم به ساختار پوسته ای شکل تبدیل کردند.کپسولهایی که حاوی درصد بیشتری از twen 20 بودند خروج کامل نایسین را در pH ۸ نشان دادند در مقابل آن گلیسرول هیچ اثر واضحی در آزادسازی نایسین نداشت.

Faghani و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثر نایسین و استات سدیم را بر روی خواص میکروبی و شیمیایی ماهی آمور در تلقیح با باکتری لیستریا مونوسیتوژنز بررسی کردند . در این تحقیق فیله های ماهی آمور در غلظت (۱و ۳ ٪) استات سدیم و (۰/۱ و ۰/۲ ٪ نایسین) وهمچنین به طور همزمان این دو ماده غوطه ور شدند. نتایج این تحقیق نشان داد که خاصیت ضد میکروبی این دو ماده با افزایش غلظت استات سدیم افزایش می یابدو مقدار عدد پراکسید و مقادیر TBA و TVB-N در تیمارهایی که از هر دو ماده استفاده شده بود کمتر بود.

Choobkar و همکاران (۲۰۱۰) به بررسی اثر اسانس آویشن شیرازی بر رشد استافیلوکوک اورئوس (Staphylococcus aureus) در فیله های کپور نقره ای نمک سود شده سبک پرداختند. نتایج نشان داد که در زمان

بلافاصله پس از تلقیح باکتری هیچ تفاوت معنی داری در رشد باکتریایی بین نمونه های تیمار شده با غلظت های متفاوت اسانس آویشن و نمونه های شاهد وجود نداشت. با این وجود تفاوت معنی داری (P<۰/۰۵) در رشد S. aureus بین نمونه های تیمار شده با غلظت ۰/۱۳۵٪ اسانس آویشن شیرازی و نمونه های شاهد در روزهای ۲ و ۶ نگهداری مشاهده گردید. به غیر از روز ۱ نگهداری، هیچ تفاوت معنی داری در رشد S. aureus در بین نمونه های تیمار شده با غلظت های پایین اسانس آویشن (زیر ۰/۰۴۵٪) و نمونه های شاهد دیده نشد. بیشترین اثر بازدارندگی در نمونه های تیمار شده با ۰/۴۰۵٪ و ۰/۸۱۰٪ از اسانس آویشن تا روزهای ۹ و ۱۲ پس از نگهداری دیده شد.

Vongsawasdi و همکاران در سال ۲۰۱۰ اثر ممانعتی نایسین را در غلظت ۰-۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر بر علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (با غلظت تقریبا برابر ۷log cfu/ml) در کوفته ماهی اندازه گیری کردند . نتایج نشان دادند که اثر ممانعتی نایسین بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس زمانی که غلظت نایسین و مدت زمان انکوباسیون افزایش یافت ، بیشتر شد (P<۰/۰۵). زمانی که غلظت نایسین از ۵ تا ۲۰ µg/ml افزایش یافت تعداد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بعد از ۴۲ ساعت انکوباسیون از ۴/۹۴ به ۲/۷۳ log cfu/ml در دمای ۲±۴ oC رسید. نمونه ها در بسته های پلی اتیلن قرار گرفتند . نتایج شمارش میکروبی نشان داد که شمارش باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از ۰/۳۴ ±۷/۳۷ به ۰/۳۴ ±۹/۳۵ log cfu/g در تیمار شاهد رسید در حالی که در تیمارهایی که در معرض نایسین بودند در روز ۱۲ شمارش باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به ۰/۵۳ ±۵/۷۰ log cfu/g رسید. به علاوه میزان TPC در نمونه شاهد بعد از ۱۲ روز به ۰/۳۶ ±۱۰/۲ ریسد در حای که در نمونه های حاوی نایسین به ۰/۲۰ ±۶/۸۶ رسید. در نهایت می توان گفت که استفاده از نایسین در اندازه ۱۵ میکروگرم بر میلی لیتر می تواند یک روش جایگزین برای کاهش سطح آلودگی باشد و می تواند به صورت ترکیبی با سایر ابزار روشهای نگهداری مواد غذایی استفاده شود.

Xiao در سال ۲۰۱۰ رساله دکتری خود را با عنوان روشهای نوین انتقال نایسین برای افزایش کارایی طولانی مدت آن علیه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز به انجام رسانید. به طور کلی هدف این تحقیق این بود که یک سیستم عرضه جدید نایسین را معرفی کند که کارایی ضد میکروبی آنرا به طور طولانی مدت افزایش دهد. در این پایان نامه اولین هدف این بود که یک روش کم هزینه برای استخراج نایسین از محصول تجاری آن بود که حاوی ۲/۵ درصد نایسین می باشد معرفی گردد. بهترین استخراج محصول در انحلال ۶ میلی گرم ماده جامد در میلی لیتر الکل اتانول ۵۰٪ v/vبدست آمد. سپس نایسین محلول در اتانول به همراه زئین به روش خشک کن پاششی ریزپوشانی شد(Lawton 2002). بهترین نتیجه در آزادسازی پایدار نایسین از کپسولها در دمای درونی ۱۰۵درجه دستگاه مشاهده شد.استفاده از ماده tween20 به همراه زئین باعث آزادسازی بهتر نایسین در PH ۸ گردید. استفاده از نایسین کپسوله نشده تنها ۱۲ ساعت از رشد باکتری لیستریا در دمای ۳۰ درجه جلوگیری کرد در حالی که کپسولهای نایسین و تیمول بادرصد کمی گلیسرول ۹۶ ساعت از رشد باکتری لیستریا ممانعت کردند.

Shirazinejad و همکاران در سال ۲۰۱۰ اثر توأم اسید لاکتیک و نایسین را بر روی کاهش فلور میکروبی طبیعی میگو در دمای یخچال بررسی کردند . میگو های تازه در دو غلظت ۱ و ۲ ٪(v/v) اسید لاکتیک به تنهایی یا با محلول نایسین ۰/۰۴ (g/L/kg) به مدت ۱۰ دقیقه غوطه ور شدند . تعداد کل باکتری های هوازی (TPCs) ، باکتریهای سرما دوست ، سودوموناسها و باکتریهای تولید کننده H2S و باکتریهای اسید لاکتیک در این تحقیق شمارش شدند. نتایج نشان داد که تعداد کل باکتریها ی نمونه های شاهد در روزهای ۷ و ۱۴ نگهداری به ترتیب ، ۲/۹۱ و ۲/۶۳ log CFU/g از نمونه های ۲ ٪(v/v) با نایسین ۰/۰۴ (g/L/kg) بیشتر بود. هر دو غلظت اسید لاکتیک کاهش معنی داری را در جمعیت باکتریهای سودوموناس ایجاد کردند که در غلظت ۲٪ اسید لاکتیک به همراه نایسین بیشترین کاهش مشاهده شد.

Mirdamadi و همکاران در سال ۲۰۱۰در تحقیقی اثر ممانعتی نایسین ریزپوشانی شده ، نایسین آزاد و L.lactis ATCC 11454 در مقابل باکتریهای L.monocytogenes ATCC 19117, S.aureus ATCC 25923 and E.coli ATCC 25922 در پنیر و در محیط کشت (in-vitro) مورد بررسی قرار دادند. نتایج این تحقیق بیان کننده آن بود که میزان MIC[11] نایسین آزاد در محیط کشت و پنیر بر روی هر دو گونه *L. monocytogenes and S.aureus* بیشتر از نایسین ریزپوشانی بود . باکتری E.coli نسبت به هر دو فرم نایسین در محیط کشت مقاوم بود اما در پنیر این طور نبود. به علاوه ریزپوشانی کردن منجر به محافظت نایسین در مقابل چربی پنیر و آنزیم پروتئاز شد. همچنین باعث کنترل اثر مستقیم نایسین بر روی محیط کشت آغاز گر شد. بنابراین به این نتیجه رسیدند که استفاده از نایسین ریزپوشانی کارایی بیشتری از نایسین آزاد دارد. این مطالعه نشان داد که ریزپوشانی کردن نایسین با لیپوزوم می تواند مقاومت و کارایی نایسین را در پنیر افزایش دهد . این تحقیق نشان داد مقادیر کمتری از نایسین ریزپوشانی در مقایسه با نایسین آزاد لازم است تا باکتریهای بیماریزا را از بین ببرد.به علاوه ریزپوشانی کردن نایسین را در مقابل چربی پروتاز مو.جود در پنیر محافظت کرد . در نتیجه استفاده از نایسین ریزپوشانی نتایج بهتری از نایسین آزاد داشته است.

Hampikyan و همکاران در سال ۲۰۰۹ کارایی نایسین را در جلوگیری از فعالیت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در نوعی سوسیس تخمیری به نام سوکوک بررسی کردند. برای این کار به خمیر سوسیس باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به میزان ۶ log cfu/g اضافه شد و سپس این خمیر به ۶ قسمت مساوی تقسیم شد و به هر قسمت غلظتهای متفاوتی از نایسین (۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰و ۲۰۰ µg/g اضافه شد و ازمایشات میکروبی شامل شمارش باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، کل باکتریهای مزوفیل و باکتریهای اسید لاکتیک در روزهای ۱، ۳، ۵، ۱۰، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۵ انجام شد. جمعیت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در تیمارهای ۱۵۰ و ۲۰۰ µg/g بعد از به ترتیب ۳۰ و ۳۵ روز حد غیر قابل شمارش رسید. در حالی که جمعیت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در تیمارهای ۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ µ g/g نایسین بعد از ۴۵ روز به ترتیب به ۵/۳۶ ، ۵/۶۸، ۴/۱۰ و ۳/۵۴ log

[11] .Minimum inhibitory concentration

cfu/g رسید . بنابر این اینطور نتیجه گیری کردند که افزودن نایسین در غلظتهای بالاتر از ۱۵۰ µg/g به سوسیس سوکوک می تواند از رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در طول زمان نگهداری آن جلوگیری کند.

Kostaki و همکاران (۲۰۰۹) به بررسی اثر ترکیب بسته بندی بااتمسفر اصلاح شده (MAP) و اسانس آویشن بر روی خصوصیات میکروبی، شیمیایی و حسی فیله های باس دریایی (Dicentrarchus labrax) پرداختند. نتایج نشان داد که فیله های تیمار شده با ترکیب گازهای (۱۰٪O_2/۳۰٪N_2/۶۰٪CO_2) و آویشن ۰/۲٪ بیشترین زمان ماندگاری را دارا بود و بعد از آن به ترتیب فیله های تیمار شده با ترکیب گازهای (۱۰٪O_2/۴۰٪N_2/۵۰٪CO_2)، فیله های تیمار شده با ترکیب گازهای(۱۰٪O_2/۵۰٪N_2/۴۰٪CO_2)، فیله های بسته بندی شده با هوا و آویشن ۰/۲٪ و فیله های بسته بندی شده با هوا دارای بیشترین زمان ماندگاری از نظر آنالیز های میکروبی، شیمیایی و حسی بودند.

Schmidt در سال ۲۰۰۹ کارایی ضد میکروبی نایسین ریزپوشانی شده با لیزوزوم را علیه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز درون شیر با دماهای مختلف بررسی کرد .در این تحقیق از فاکتورهای موثر در خنثی کردن فعالیت نایسین در ماده غذایی واکنش آن با محتویات غذا، عدم انحلال ، ممانعت عملکرد توسط آنزیم پروتئاز و تغییر در دیواره سلولهای هدف نام برده شده و ریزپوشانی کردن نایسین در پوشش لیپوزوم را به عنوان کمکی به محافظت از عملکرد نایسین با تنظیم آزادسازی آن به محیط خارجی می داند. در این تحقیق هیچ تفاوت آماری قابل مشاهده ای در جمعیت لیستریا بین دو حالت نایسین آزاد و کپسوله مشاهده نشد.

Economou و همکاران در سال ۲۰۰۸ اثر نایسین و EDTA بر روی زمان نگهداری گوشت تازه مرغ بسته بندی شده با روش MAP در دمای ۴ درجه مورد بررسی قراردادند. در این تحقیق تیمارها شامل : N1 (تیمار شاهد) ، N2 (۵۰۰ IU/g نایسین) ، N3 (۱۵۰۰IU/g نایسین) ، N4 (۵۰۰ IU/g نایسین و ۱۰Mm EDTA) ، N5 (۱۵۰۰ IU/gنایسین و ۱۰Mm EDTA) ، N7 (۱۵۰۰IU/g نایسین و ۵۰ EDTA) و N8 (۱۰Mm EDTA) بود .تیمارهای N3 تا N7 بر روی جمعیت باکتریهای مزوفیل ، سوومونا‌سها، باکتریهای اسید لاکتیک و خانواده انتروباکتریاسه تاثیر گذاشتند . تیمارهای N5 تا N7 اثر معنی داری بر روی میزان TMA-N و TVB-N در گوشت مرغ داشتند. استفاده همزمان از روش MAP برای بسته بندی و این تیمارهای ضد میکروبی باعث افزایش زمان ماندگاری تیمارها از نظر ارگانولپتیک برای مدت ۱تا ۲ روز در تیمار N2 و ۳تا ۴ روز در تیمار(N3 ,N4) ، ۷ تا ۸ روز در تیمار (N5) ، ۹تا ۱۰ روز در (N7) و۱۳ تا ۱۴ روز در (N6) شد. گوشت مرغ در تیمارهای N6 و N7 حتی تا روز ۲۰ و ۲۴ نگهداری بوی قابل قبولی داشت.

Moosavy و همکاران (۲۰۰۸) تاثیر اسانس آویشن شیرازی و نایسین را بر Salmonella typhimurium و Staphylococcus aureus در سوپ جو تجاری، مورد مطالعه قرار دادند. غلظت‌های مورد استفاده اسانس آویشن شیرازی برابر صفر، ۵، ۱۵ و ۳۰ میکرولیتر بر ۱۰۰ میلی لیتر و غلظت‌های نایسین برابر صفر، ۰/۲۵ و ۰/۵ میکرولیتر بر میلی لیتر، دماهای مورد مطالعه ۲۵ و ۸ درجه سانتی‌گراد و زمان نگهداری تا ۲۱ روز بود. رشد S. typhimurium در غلظت‌های متفاوت اسانس آویشن شیرازی و ترکیب با نایسین در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد به

طور معنی‌داری کاهش یافت. غلظت‌های متفاوت اسانس و نایسین و ترکیب آن‌ها سبب توقف رشد S. aureus در هر دو دمای مورد مطالعه شد.

Stamatis و Arkoudelos (۲۰۰۷) تاثیر بسته بندی تحت خلا و اتمسفر اصلاح شده (۵۰٪ CO_2 +۵۰٪ N_2) بر تغییرات میکروبی، فیزیولوژیکی و حسی در ماهی ماکرل (Scomber colias japonicus) در دماهای ۳ و ۶ درجه سانتی گراد را مورد مطالعه قرار دادند و نتیجه گرفتند فساد در ماهی ماکرل تحت بسته بندی با اتمسفر اصلاح شده از تیمار بسته بندی شده تحت خلا و هوا دیرتر صورت گرفت.

Manju و همکاران (۲۰۰۷) اثرات بسته بندی در خلا و غوطه وری در استات سدیم (۲٪) بر تغییرات حسی، بافتی، میکروبیولوژی و شیمیایی ماهی لکه مرواریدی[۱۲](Etroplus suratensis) مورد مطالعه قرار دادند و عمر ماندگاری را برای ماهیان بسته بندی شده در هوا در مجاورت یخ ۸ روز، ماهیان بسته بندی شده در خلا همراه با تیماراستات سدیم ۱۵ روز گزارش نمودند. آنها نتیجه گرفتند که تیمار بسته بندی شده در خلا و استات سدیم، فساد ماهی را به تاخیر انداخته و به طور معنی داری باعث افزایش عمر ماندگاری محصول می شود.

Sallam و همکاران در سال ۲۰۰۷ کیفیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی فیله ماهی آزاد را در محلول (۲/۵ ٪ w/v)استات سدیم، لاکتات سدیم و سیترات سدیم در دمای ۱ درجه بررسی کردند .نتایج این تحقیق نشان داد که این نمکها برای جلوگیری از تکثیر انواع گونه های باکتریهای عامل فساد شامل جمعیتهای باکتریایی کل و سرماگرا ، سودوموناسها ، باکتریهای تولیدکننده H2S ، باکتریهای اسید لاکتیک و خانواده انتروباکتریاسه کارآمد می باشند . اکسیداسیون چربی (PV) و (TBA) در نمونه های حاوی استات سدیم و سیترات سدیم به میزان قابل ملاحظه ای به تاخیر افتاد . اثر آنتی اکسیدانی آنها به ترتیب در سیترات سدیم بیشتر از استات سدیم و لاکتات سدیم بود .بر طبق نتایج مدت زمان نگهداری فیله ها در معرض این سه نمک اسید آلی ۴ تا ۷ روز بیشتر از نمونه های شاهد بود. و در نتیجه گیری نهایی بیان کرد که استات ، لاکتات و سیترات سدیم می توانند به عنوان مواد نگهدارنده طبیعی بی خطر برای ماهی در شرایط نگهداری در یخچال مورد استفاده قرار گیرند.

Cakli و همکاران در سال ۲۰۰۶ زمان ماندگاری ماهی قزل آلای رنگین کمان دودی را در دو روش بسته بندی در خلاء (VP) و با اتمسفر اصلاح شده (MAP) با استفاده از شاخصهای شیمیایی و میکروبی بررسی کردند. در این آزمایش تیمارها شامل A (۶۰٪ CO2 ، ۴۰٪N2) و B (۵۰٪ CO2 ، ۵۰٪N2) و C بسته بندی در خلاء . نسبت ابعاد فیله به بسته بندی در این آزمایش ۱به ۳ بود . براساس نتایج آزمایشات میکروبی مدت زمان نگهداری ماهی قزل آلا دودی در تیمار C ۳۳ روز، در تیمار A ۴۷ روز و در تیمار B ۴۰ روز محاسبه شد. با توجه به نتایج آزمایشات میکروبی و حسی زمان ماندگاری ماهی قزل آلا دودی تیمار A ۱۴ روز بیشتر از تیمار C بود.

Cabo و همکاران در سال ۲۰۰۵ از نایسین وبرخی مواد شیمیایی که نفوذپذیری غشاء سلول را افزایش می دهد جهت نگهداری ماهی blue whiting (Micromesistius poutassou) در بسته بندی با اتمسفر حاوی CO2 در دای

[1] - Pearl spot

يخچال استفاده كردند. هدف از اين تحقيق اين بوده كه موادی كه نفوذپذيزی غشاء سلول باكتری را افزايش داده و انتشار بسياری از مواد ضد باكتريايی مانند نايسين را افزايش می دهند به منظور افزايش عملكرد شان در تركيب با نايسين در مقابل باكتريهای گرم منفی مورد استفاده قرا گيرند . با اندازه گيری ميزان عملكرد همزمان اين مواد با نايسين بهترين نتيجه در سديم هگزامتافسفات[۱۳]SMP و EDTA بدست آمد . مطالعات بيشتر در اثر همزمان نايسين ، SMP و CO2 انجام شد . نتايج نشان داد كه دی اكسيد كربن می تواند تعداد كل باكتريها و ميزان TVB-N را كاهش دهد. با آنحال كه حضور همزمان CO2 با نايسين و SMP تاثير مثبت داشت اما هچگونه اثر مثبتی از همكاری نايسين و SMP مشاهده نشد . اين طور نتيجه گيری شد كه CO2 به آسانی با SMP واكنش می دهد و باعث بهبود عملكرد بسته بندی با مخلوط گازی حاوی CO2 می باشد.

Lungu و Johnson در سال ۲۰۰۵ تحقيقی با عنوان سرنوشت ليستريا مونوسيتوژنر تلقيح شده بر سطح قطعات سوسيس فرانكفورتر بوقلمون در معرض نايسين ريزپوشانی شده با زئين ، دی استات سديم و لاكتات سديم در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام دادند. اين محققين هدف خود را از اين تحقيق اين موضوع عنوان كردند كه دريابند آيا زئين ، نايسين ، لاكتات و دی استات به تنهايی يا به همراه هم می توانند از رشد ليستريا مونوسيتوژنز در سوسيس فرانكفورتر بوقلمون پرچرب در دمای يخچال جلوگيری كند و آيا لاكتات و دی استات اثر مثبت همزمانی با نايسين دارند يا خير؟ بعد از ۲۸ روز تيمارهايی كه تنها از نايسين و سديم دی استات و يا به طور توأم از هر دو استفاده شده بود توانستند جمعيت ليستريا مونوسيتوژنز را به ترتيب به ۶/۶ و ۶/۳ log CFU/g برسانند و تيمار تركيبی نايسيين و سديم دی استات جمعيت ليستريا مونوسيتوژنز را به ۶ log CFU/g رساند و همچنين زئين به تنهايی نتوانست هيچگونه اثر آنتی باكتريايی بر روی جمعيت ليستريا مونوسيتوژنز داشته باشد. بعد از ۲۸ روز تيمارهای تركيبی نايسين ريزپوشانی شده با زئين به همراه سديم دی استات و تركيبی نايسين ريزپوشانی شده با زئين به همراه سديم دی استات و لاكتات سديم توانستند جمعيت ليستريا مونوسيتوژنز را در سوسيس فرانكفورتر بوقلمون به صفر برسانند . اين نتايج نشان داد اثر تركيبی تيمارهای زير بر روی جمعيت ليستريا مونوسيتوژنز بيشتر از زمانی است كه هر يک به تنهايی مورد استفاده قرار گيرند.

Chytiri و همكاران در سال ۲۰۰۴ اثر فيله كردن را روی خصوصيات ميكروبی و شيميايی و حسی قزل آلا رنگين كمان در زير يخ بررسی كردند. سودوموناسها ، باكتريهای توليد كننده H2S و Brochothrix thermosphacta باكترهای غالب در فلور ميكروبی فساد ماهی بودند در حالی كه انتروباكتريا سه كمترين تعداد را در طول ۱۸ روز نگهداری در زير يخ داشتند . شمارش باكتريايی در ماهی شكم خالی همواره كمتر از ماهی فيله بود. شمارش باكتريهای مزوفيل در ماهی فيله و شكم خالی بعد از به ترتيب ۱۰و ۱۸ روز از $\log CFU/cm^2$ ۷بيشتر شد. ميزان TVB-N بين ماهی فيله و شكم خالی تفاوتی نداشت و بعد از ۱۸ روز به ترتيب به ۲۰/۰۶ و ۲۰/۱۶ ميلی گرم نيتروژن در ۱۰۰ گرم گوشت ماهی رسيد. ميزان TBA در فيله ماهی با سرعت بيشتری از ماهی شكم خالی

[13] .Sodium hexa metaphosphate

افزایش پیدا کرد به طوری که بعد از ۱۸ روز به ترتیب به۱۹/۲۱ و ۱۶ /۴۱ MA/g رسید. از نظر فاکتورهای شیمیایی تفاوتی بین فیله ماهی و ماهی شکم خالی در نگهداری در یخ مشاهده نشد. ارزیابی حسی با استفاده از مقیاس تازگی EC ، درجه E را برای ۶ روز اول به ماهی شکم خالی و درجه A را برای ۳ روز بعد و درجه B را برای ۶ روز آخر نگهداری و در نهایت ماهی درجه C (نامناسب) را گرفت. نتایج این تحقیق بر اساس ارزیابیهای حسی و میکروبی نشان داد که زمان نگهداری ماهی کامل شکم خالی و فیله در زیر یخ به ترتیب ۱۵-۱۶ روز و ۱۰-۱۲ روز می باشد.

Özogul و همکاران (۲۰۰۴) به ارزیابی شیمیایی، میکروبی و حسی ماهی ساردین(Sardina pilchardus) بسته بندی شده با اتمسفر اصلاح شده و تحت خلا در مدت ۱۵ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد پرداختند. شاخص های حسی، شمارش کلی باکتری ها، تولید نوکلوتیدها، هیستامین، تری متیل آمین و مجموع بازهای نیتروژنی فرار مورد ارزیابی قرار گرفت. ماندگاری ماهی ساردین در شرایط بسته بندی با اتمسفر اصلاح شده ۱۲ روز، بسته بندی تحت خلا ۹ روز و در هوا ۳ روز برآورد شد. Arashisar و همکاران (۲۰۰۴) اثر بسته بندی تحت خلا و اتمسفر اصلاح شده را بر تغییرات میکروبی و شیمیایی فیله های ماهی قزل آلا، طی مدت نگهداری در دمای ۱±۴ درجه سانتی گراد مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند فساد در فیله های بسته بندی شده با اتمسفر اصلاح شده از فیله های بسته بندی شده تحت خلا و هوا دیرتر صورت می پذیرد.

Gimenz و همکاران در سال ۲۰۰۲ کیفیت فیله ماهی قزل آلا پرورشی در سه تیمار بدون پوشش ، بسته بندی در خلأ و بسته بندی با استفاده از اتمسفر اصلاح شده (MAP) در دمای یخچال با استفاده از اندازه گیری فاکتورهای شیمیایی (pH، TVB-N، هیپوزانتین و TBA) همچنین فاکتورهای میکروبی (شمارش باکتریهای سرمادوست) وپارامترهای حسی اندازه گیری کردند. نتایج تحقیق نشان داد که استفاده از اتمسفر اصلاح شده زمان ماندگاری فیله ماهی قزل آلا را نسبت به فیلا های بدون پوشش و بسته بندی در خلأ به طور معنی داری افزایش داد . که علت آنرا اثر ممانعتی CO2 بر رشد میکروبی دانست که منجر به تولید حداقل محصولات فساد ماهی (TVB-N و هیپوزانتین) شد.

Lauzon و همکارانش در سال ۲۰۰۲ مطالعات جامع و کاملی را در ارتباط با باکتریهای لاکتیک و متابولیتهای مترشحه از این باکتریها (اسیدهای آلی و باکتریوسینها) بر باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در محیط مدل و ماهی آزاد دودی شده انجام دادند. آنها در پروژه خود از تیمارهای متعددی استفاده نمودند و نتایج نشان داد که برخی از باکتریهای لاکتیک مثل کارنوباکتریوم در دماهای ۴ و ۸ درجه اثر مهار کننده بر لیستریا مونوسیتوژنزداشته و فاقد اثر منفی بر کیفیت ارگانولپتیک ماهی میباشند.

Nykanen و همکاران در سال ۲۰۰۰ اثر همزمان نایسین و لاکتات سدیم را بر روی باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در ماهی قزل آلا دودی بررسی کردند. در این تحقیق میزان (۴۰۰۰ تا ۶۰۰۰ Iu/ml) نایسین و ۶۰٪ لاکتات سدیم و همچنین ترکیب همزمان آنها به فیله ماهی قزل آلای دودی شده تزریق شد. سپس باکتری لیستریا مونوسیتوژنز به

میزان($۱۰^{۳}$ – $۱۰^{۴}$ cfu/g) به فیله ها تزریق شد و فیله ها به صورت وکیوم بسته بندی شده و در دمای ۸ درجه به مدت ۱۷ روز و همچنین در دمای ۳ درجه به مدت ۲۹ روز نگهداری شدند . نتایج نشان داد استفاده از نایسین و لاکتات سدیم از رشد باکتری لیستریا جلوگیری میکند اما استفاده ترکیبی از آنها اثر ممانعتی بیشتری دارد. استفاده همزمان از نایسین و لاکتات سدیم در فیله این ماهیان میزان باکتری لیستریا را از ۳/۲۶ به ۱/۸ cfu/g در۱۶ روز در دمای ۸ درجه کاهش داد . همچنین در مدت ۲۹ روز نگهداری در دمای ۳ درجه میزان باکتری در محدوده (۴/۹۲ – ۴/۶۶ cfu/g) ثابت باقی ماند .

مطالعات انجام شده توسط Vandenbergh و همکارانش در سال ۱۹۹۳ نشان داد که متابولیتهای مختلف تولید شده از باکتریهای لاکتیک قادر به مهار رشد باکتریهای ناخواسته در مواد غذایی میشود. مطالعات وی حاکی از آنست که باکتریوسین نایسین تولید شده از لاکتوکوکوس لاکتیس باعث افزایش زمان ماندگاری و مهار رشد باکتریهای آلوده کننده در ماهی و انواع مواد غذایی میگردد. همچنین دو باکتریوسین پدیوسین و ساکازین نیز قادر به مهار رشد باکتریهای مختلف بوده و میتوان از آنها به عنوان نگهدارنده های بیولوژیک استفاده نمود.

۳- مواد و روش کار

- مواد مصرفی

ماهی قزل آلای رنگین کمان، ، یدیدپتاسیم (Merck، آلمان)، تیوسولفات سدیم (Merck، آلمان)، متانول (Merck، آلمان)، کلروفرم (Merck، آلمان)، سود (Merck، آلمان)، اسید استیک (Merck، آلمان)، کلریدسدیم (Merck، آلمان)، اسید سولفوریک ۰/۱ نرمال (Merck، آلمان)، اکتان نرمال (Merck، آلمان)، اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال (Merck، آلمان)، قرص هضم حاوی سولفات مس (Merck، آلمان)، اسید بوریک (Merck، آلمان)، محلول نشاسته (Merck، آلمان)، تیغ اسکالپل، گاز پک c (Merck، آلمان)، ۱- بوتانول (Merck، آلمان)، معرف فنل فتالئین (Merck، آلمان)، اتانول (Merck، آلمان)، معرف TBA (Merck، آلمان)، معرف اسید (Merck، آلمان)، فرم آلدهید (Merck، آلمان)، تولوئن (Merck، آلمان)، کربنات پتاسیم (Merck، آلمان)، تری متیل آمین (Merck، آلمان)، اسید پیکریک (Merck، آلمان)، سولفات سدیم بدون نشاسته (Merck، آلمان)، کاغذ صافی واتمن (انگلیس آلمان)، کاغذ فویل آلومینیومی(سلفون)، پارافیلم (American National Can، آمریکا)، سرم فیزیولوژی، پلیتهای ۱۰ سانتیمتری استریل یکبار مصرف (Eppendrof، آلمان)، محیط کشت لیستریا کروم آگار(آلمان)، محیط کشت آگار حاوی زرده تخم مرغ (Merck، آلمان)

- وسایل غیر مصرفی و تجهیزات آزمایشگاهی

شیشه آلات آزمایشگاهی نظیر ارلن (ISOLAB، آلمان)، استوانه مدرج (ISOLAB، آلمان)، بشر (ISOLAB، آلمان)، قیف (ISOLAB، آلمان)، لوله های آزمایش ساده و درب دار، شیشه ساعت، پیپت (ISOLAB، آلمان)، همزن شیشه ای، بالن کجلدال (ISOLAB، آلمان)، پرل شیشه ای، کوزه درب دار (ISOLAB، آلمان)، دکانتور (ISOLAB، آلمان)، چراغ الکلی (ایران)، پنس (Allmed Instrumenete، آلمان)، ترازوی دقیق با دقت یک ده هزارم (R&D، ژاپن)، آون (BEHDAD، ایران)، سانتریفوژ (Cencom-p.selecta)، اتوکلاو (Reyhan Teb، ایران)، دسیکاتور (ISOLAB، آلمان)، اسپکتوفتومتر (JENWAY مدل6305)، pH متر (Wultiline p4 Wtw، آلمان)، دستگاه کجلدال اتوماتیک (Kjeltec Analyzer unit مدل2300)، بن ماری (Fater rizpardaz، ایران)، هود، شعله، جار بی هوازی (ISOLAB، آلمان)، بوته چینی (ISOLAB، آلمان)، دماسنج جیوه ای (Riester، آلمان)، ظروف پلاستیکی، پیپت (ISOLAB، آلمان)، جعبه های یونولیتی، میکروپیپت (ISOLAB، آلمان)، سمپلر های دیجیتالی (Eppendrof، آلمان)، انکوباتور های ۳۵، ۳۰، ۱۰درجه سانتیگراد (ژال تجهیز، ایران)، هیتر (Pars Teb، ایران)، کوره الکتریکی (ایران)، دستگاه وکیوم (HENKELMAN، مدل 200A، هلند).

۳-۱- تهیه و آماده سازی نمونه ماهی

ماهیان قزل آلا تازه صید شده با میانگین وزنی ۶۰۰ تا ۷۰۰ گرم از مزرعه پرورشی در شهرستان ساری خریداری شده و به سرعت داخل یخ به آزمایشگاه محل انجام تحقیق منتقل شدند . در مدت زمان کمتر از نیم ساعت شست و شو ، سر و دم زنی و تخلیه امعاء و احشاء صورت گرفت و ماهیان به فیله هایی با میانگین وزنی ۵ ± ۵۰ گرم تبدیل شده و مجددا آبکشی شدند . در کنار فیله های تهیه شده ، تعدادی از نمونه ها نیز بصورت ماهی کامل شکم خالی با میانگین وزنی ۲۵ ± ۴۱۰ گرم نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۳-۲-آماده سازی نمونه های حاوی استات سدیم

استات سدیم مورد استفاده در این آزمایش از شرکت (Merck ، آلمان) تهیه شد. تیمارهای حاوی ماهی کامل شکم خالی و فیله های ماهی قزل آلای رنگین کمان در محلول ۱ درصد w/v استات سدیم با دمای $4^{\circ}C$ به مدت ۱۵ دقیقه غوطه ور شدند. نمونه های های شاهد نیز در آب مقطر $4^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد، سپس نمونه ها ها به مدت ۵ دقیقه جهت خروج آب اضافی در شبکه توری در دمای $18^{\circ}C$ قرار گرفتند. (Sallam ، ۲۰۰۷ و Kashiri و همکاران ، ۲۰۱۱).

۳-۳- آماده سازی نمونه های حاوی نایسین

جهت آماده سازی تیمار حاوی نایسین ریز پوشانی نشده (آزاد) ، در اسید کلریدریک (Merck ، آلمان) ۰/۰۲ نرمال حل شد و در ظرف استریل توسط فیلتر ۰/۴۵ میکرو متر ، استریل شده و مقدار مورد نظر آنرا برداشته و به ظروف حاوی آب مقطر استریل افزوده و پس از مخلوط شدن، به میزان ۰/۱۵ درصد به صورت اسپری به نمونه ها اضافه شده و پس از بسته بندی در شرایط خلاء و قرار دادن در دمای $4\pm1^{\circ}C$ ، برای مدت ۱۶ روز و فواصل زمانی ۴ روز جهت انجام آزمایشات شیمیایی (مجموع بازهای نیتروژنی فرار (TVB-N) ، عدد پراکسید (PV) و pH) ، میکروبی (شمارش کلی باکتریها ، شمارش باکتریهای سرماگرا و شمارش باکتریهای گروه LAB) مورد بررسی قرار گرفتند. تیمارهای مورد استفاده برای نمونه های فاقد باکتری شامل موارد ذیل بودند:

۱. فیله ماهی بسته بندی در خلأ ، بدون مواد نگهدارنده
۲. ماهی کامل شکم خالی در خلأ ، بدون مواد نگهدارنده
۳. فیله دارای باکتریوسین Z
۴. فیله دارای استات سدیم
۵. فیله دارای باکتریوسین Z و استات سدیم
۶. ماهی کامل شکم خالی دارای باکتریوسین Z
۷. ماهی کامل شکم خالی دارای استات سدیم

۸. ماهی کامل شکم خالی دارای باکتریوسین Z و استات سدیم

۴-۳- آماده سازی نمونه ها جهت آزمایشات تلقیح لیستریا مونوسیتوژنز

باکتری لیستریا مونوسیتوژنز از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه شد . جهت فعال سازی باکتری از کشت لیوفلیزه در محیط آبگوشت قلب و مغز در دمای $35^{\circ}C$ به مدت ۱۸-۱۶ ساعت استفاده شد . برای تهیه میزان تلقیح باکتری مورد آزمایش، با انتقال باکتری از لوله میکروسانتریفیوژ اپندرف به محیط براث (BHI) و نگهداری به مدت ۱۸ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ انجام شد . مجددا کشت دومی از این کشت اولیه ، در براث (BHI) دیگر (به مدت ۱۸ ساعت در دمای $37^{\circ}C$) تهیه شد . پس از رساندن باکتری به فاز رشد لگاریتمی، به منظور مقایسه کدورت حاصله با لوله ۰/۵ مک فارلند، ابتدا سوسپانسیون باکتریایی در دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شده و پس از خارج نمودن مایع رویی، به رسوب حاصله بافر فسفات اضافه شده و مجددا سانتریقوژ شد. این عمل ۳ مرتبه انجام شد. به رسوب نهایی مقداری بافر فسفات اضافه شده و با لوله ۰/۵ مک فارلند مقایسه شده و پس از تهیه رقتهای متوالی و در نظر گرفتن وزن فیله و یا ماهی کامل شکم خالی، مقدار مورد نظر تلقیح لیستریا تعیین گردید (لوگ ۴). به منظور اضافه کردن باکتری به سطح فیله یا ماهی کامل از روش اسپری باکتری با سرنگ استفاده گردید سپس نمونه ها ماساژ داده شده تا از اختلاط کامل باکتری با نمونه های ماهی اطمینان حاصل شود. در ادامه نمونه ها به روش خلاء بسته بندی شده و در دمای $4 \pm 1^{\circ}C$ به مدت ۲۰ روز نگهداری شد. (Grisi و Lira ، ۲۰۰۵).

تیمارهای مربوط به آزمایشات تلقیح باکتری لیستریا مونوسیتوژنز بر فیله ماهی قزل آلا تیمارها ی تهیه شده در این تحقیق عبارت بودند از :

۱. فیله ماهی بسته بندی در خلأ ، بدون مواد نگهدارنده + لیستریا مونوسیتوژنز
۲. ماهی کامل شکم خالی در خلأ ، بدون مواد نگهدارنده + لیستریا مونوسیتوژنز
۳. فیله دارای باکتریوسین Z + لیستریا مونوسیتوژنز
۴. فیله دارای استات سدیم+ لیستریا مونوسیتوژنز
۵. فیله دارای باکتریوسین Z و استات سدیم + لیستریا مونوسیتوژنز
۶. ماهی کامل شکم خالی دارای باکتریوسین Z + لیستریا مونوسیتوژنز
۷. ماهی کامل شکم خالی دارای استات سدیم+ لیستریا مونوسیتوژنز
۸. ماهی کامل شکم خالی دارای باکتریوسین Z و استات سدیم+ لیستریا مونوسیتوژنز

۳-۵- آماده سازی نمونه ها جهت آزمایشات تلقیح کلستریدیوم بوتولینوم

الف)تهیه باکتری: سوش کلستریدیوم بوتولینوم، تیپ E-Beluga بوده که از دانشگاه دیویس کالیفرنیا تهیه شده بود.

ب) تهیه سوسپانسیونهای میکروبی جهت :Inoculation study

۱- تهیه سوسپانسیون اسپورهای کلستریدیوم بوتولینوم: با استفاده از تک کلنی خالص کلستریدیوم بوتولینوم در محیط کشتegg yolk agar کشتهای متعددی در همین محیط به صورت سطحی وپر حجم در شرایط بی هوازی(با استفاده از سیستم Gaspak) در ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۲-۴ روز تا تولید اسپورهای آزادتهیه گردید . اسپورهای آزاد از طریق تهیه لام ومشاهدات میکروسکوپی مداوم مشخص گردید. پس از تولیدحداکثر اسپورهای آزادجهت جمع آوری اسپورهااز پلیتهای egg yolk از آب مقطر استریل حاوی ۰/۱ درصد tween 80 از طریق شستشوی کلنی ها استفاده گردید. سوسپانسیون تهیه شده در اتانول ۵۰ درصد فیلتر استریل شده به مدت یک ساعت جهت کشتن سلولهای رویان باقیمانده باکتری در حرارت آزمایشگاه قرار گرفت. اسپورها حداقل چهار بار با استفاده از سانتریفوژ g ۱۵۰۰۰ شستشو و تجدید سوسپانسیون گردید(Baker etal 1990).

با استفاده از محلول tween 80 و دانه های شیشه ای(Glass beed) استریل و ورتکس نمودن سوسپانسیون مادر با تعداد معلوم اسپور در هر میلی لیتر از طریق کشت سطحی وشمارش آن در محیط egg yolk در شرایط بی هوازی انجام گرفت. قبل از انجام هر نوع مطالعه Inoculation study با برداشت ۲۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون مذکور وکشت وشمارش در محیط egg yolk تعداد اسپور مجددا" تعیین وتائید گردید. سوسپانسیون تا موقع آزمایش در صفر درجه نگهداری گردید(Baker etal 1990).

۳-۶- آزمایشات شمارش لیستریا و کلستریدیوم

۵ گرم از گوشت ماهی از بسته بندی جدا شده و به آن ۴۵ میلی لیتر آب پپتونه ۰/۱ درصد استریل افزوده و در دستگاه همزن قرار داده شد تا محیط هموژن گردد و سپس توسط سمپلر ۱۰۰-۱۰۰۰ میکرولیتری مقدار ۱ میلی لیتر جهت تهیه رقت های ۱۰ تایی متوالی در لوله های شیشه ای محتوی ۹ میلی لیتر محلول استریل آب پپتونه ۰/۱ درصد و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به عنوان رقت از خود بسته محتوی ماهی برداشت شد. جهت کشت لیستریا از محیط لیستریا کروم آگار استفاده شده و دمای مورد نظر جهت گرمخانه گذاری ۳۵ درجه به مدت ۴۸ ساعت بود. تشکیل کلنی های آبی با هاله سفید کمرنگ نشاندهنده لیستریا می باشد. جهت جداسازی کلستریدیوم بوتولینوم از محیط کشت آگار حاوی زرده تخم مرغ استفاده شده و رشد کلنی های رشد یافته دارای هاله کدر شیری حاکی از وجود کلستریدیوم بوتولینوم بوده که با رنگ آمیزی گرم تائید میگردد (Skandamis et al 2007; Peck et al 2006).

۳-۷- آزمایشات شیمیایی

۳-۷-۱- سنجش ترکیبات اولیه فیله ماهی

تعیین رطوبت

کپسول چینی خالی به مدت یک ساعت در آون(بهداد آون، ایران) ۱۰۰درجه سانتی گراد قرار داده و سپس در دسیکاتور سرد شد . نمونه ماهی در دستگاه ویژه کاملاً هموژن و یکنواخت و مقدار مشخصی از آن به دقت در کپسول چینی توزین شد (A) . سپس کپسول چینی به مدت 4 ساعت در در آون با دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد و سپس توزین گردید و مجدداً به مدت یک ساعت در آون قرار گرفت و برای آخرین بار وزن شد (B) (هرگاه دو وزن بدست آمده با هم تفاوت داشته باشند، این عمل تا بدست آمدن وزن ثابت تکرار میشود) و درصد رطوبت از رابطه زیر محاسبه شد (AOAC ، ۲۰۰۲ و ۲۰۰۴)

$$\text{درصد رطوبت} = \frac{(A-B) \times 100}{\text{وزن نمونه}}$$

- اندازه گیری خاکستر

مقدار مشخصی از نمونه ماهی در داخل بوته چینی توزین شد (A) و سپس در اجاق الکتریکی یا شعله در زیر هود به آرامی حرارت داده شد تا آب آن تبخیر و مواد آلی بصورت زغال درآید . بوته را به دستگاه کوره الکتریکی منتقل کرده و دمای آن روی ۵۰۰-۶۰۰ درجه سانتیگراد تنظیم گردید و عمل حرارت دهی ادامه یافت تا رنگ خاکستر کاملاً سفید و روشن شد . بوته به دسیکاتور منتقل و پس از سرد شدن توزین شد (B). درصد مواد معدنی از رابطه زیر محاسبه شد (AOAC ، ۲۰۰۲ و ۲۰۰۴).

$$\text{درصد مواد معدنی} = \frac{(B-A) \times 100}{\text{وزن نمونه}}$$

اندازه گیری پروتئین

مقدار 0 تا 9 گرم نمونه هموژن شده ماهی به دقت در بالن هضم توزین، مقدار 5 تا 8 گرم کاتالیزور هضم (سولفات پتاسیم 100 گرم + سولفات مس 10 گرم + پودر سلنیوم 1 گرم) و مقدار 20 سانتیمتر مکعب اسید سولفوریک خالص به آن اضافه شد .انتهای بالن هضم با یک جاذب گاز پوشش و در اجاق مخصوص حرارت داده شد، به طوریکه در ابتدا حرارت کم بوده و بعد از نیم ساعت حرارت افزایش یافت تا محتویات بالن کاملاً بیرنگ گردد . به علت متصاعد شدن گاز SO2 چنانچه این عمل بدون جذب گاز انجام شود، باید هضم زیر هود صورت گیرد . پس از سرد شدن بالن هضم، مقدار 250 سانتیمتر مکعب آب مقطر، 50 میلیمتر هیدرواکسید سدیم 30تا 50 درصد، یک عدد پرل شیشه ای، و چند قطره فنل فتالئین1 درصد در اتانول اضافه شد و سپس بالن به منضمات متصل، شیر آب سرد باز و در ظرف گیرنده مقدار 10 میلی لیتر اسیدبوریک ۲ درصد و چند قطره معرف توتیرول ریخته و در انتهای لوله طوری قرار داده شد که انتهای لوله سرد داخل محلول باشد . به بالن دستگاه توسط اجاق ویژه حرارت داده شد تا محلول بجوشد و تقطیر شروع شود .سپس قطره قطره سود ۳۰ تا ۵۰ درصد از

محل قیف دستگاه به بالن اضافه شد تا محیط محتویات بالن با ایجاد رنگ صورتی کاملاً قلیایی گردد .تقطیر ادامه یافت تا تقریباً ۱۵۰ سانتیمتر مکعب جمع آوری شد .آنگاه بالن گیرنده از مبرد قرمز تیتر شد .تقطیر ادامه یافت تا تقریباً ۱۵۰ سانتیمتر مکعب جمع آوری شد، آنگاه بالن گیرنده از مبرد خارج و حرارت قطع گردید .حاصل تقطیر توسط اسیدسولفوریک ۱ % نرمال تا ایجاد رنگ قرمز تیتر گردید. سپس با توجه به اینکه هر سانتیمتر مکعب اسید ۱ % نرمال برابر ۰/۰۰۱۴ گرم ازت نمونه است، درصد ازت نمونه از رابطه زیر بدست آمد(AOAC ، ۲۰۰۲ و ۲۰۰۴).

$$\text{درصد ازت نمونه } (N) = \frac{\text{مقدار مصرفی اسید } 1\% \text{ نرمال} \times 0/0014 \times 100}{\text{وزن نمونه برداشت شده}}$$

برای تعیین پروتئین، مقدار ازت بدست آمده، درضریب ویژه پروتئین ۶/۲۵ ضرب شد :

درصد پروتئین = ۶/۲۵ N

۲-۷-۳-اندازه گیری چربی

مقدار مشخصی از نمونه هموژن شده با مقداری شن مخلوط شده سپس به مدت ۶ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد (۱/۵ ساعت در دمای ۱۲۵ درجه سانتی گراد) قرار داده شد تا کاملاً رطوبت آن تبخیر گردد، سپس محتویات در یک کارتوش ریخته و در لوله رابط دستگاه تقطیر سوکسله قرار داده شد .این دستگاه را دقیقاً توزین کرده (A) و در داخل آن مقدار 250 سانتیمتر مکعب کلروفرم ریخته و به دستگاه تقطیر(لوله رابط و مبرد) متصل شد و شیر ورودی آب سرد باز شده و عمل تقطیر تا استخراج کامل چربی ادامه یافت . سپس کلروفرم موجود در بالن توسط دستگاه روتاری یا آون کاملاً تبخیر و بالن مجدداً توزین گردید (B) و مقدار کل چربی نمونه از رابطه زیر محاسبه شد(AOAC ، ۲۰۰۲ و ۲۰۰۴).

$$\text{درصد چربی} = \frac{(B-A) \times 100}{\text{وزن نمونه}}$$

۳-۷-۳- اندازه گیری PH

ابتدا مقداری از نمونه توسط دستگاه خردکن یکنواخت و هموژن شد . سپس مقدار۵ گرم از آن به ۵۰ سانتیمتر مکعب آب مقطر جوشیده سرد شده که عاری از دی اکسیدکربن بود ، اضافه و به مدت 30 ثانیه کاملاً مخلوط شد .دستگاه pH متر دیجیتالی (Multiline P4 WTW) با محلولهای بافر 4 و 7 کالیبره شد . با توجه به این که میزان اسیدی و قلیایی بودن یک محلول بستگی به غلظت یون هیدروژن دارد و نظر به اینکه فعالیت یونی نسبت به تغییر دمای محلول، تغییر میکند، pH نیز تغییر خواهد کرد . بنابراین pH در دمای مشخص اندازه گیری و گزارش شد .

الکترود دستگاه بعد از کالیبره نمودن با آب مقطر دو بار تقطیر شده ، شسته و با یک ورق دستمال کاغذی خشک شد .آنگاه الکترود در نمونه قرار داده و pH آن قرائت شد (AOAC ، ۲۰۰۲ و ۲۰۰۴).

۴-۷-۳- تعیین پراکسید (PV)

۱۰ گرم از نمونه هموژن شده فیله ماهی درون یک ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری ریخته و به آن ۲ گرم شن و ۲۰ گرم سولفات سدیم افزوده و کاملاً مخلوط گردید. بعد از تبخیر رطوبت، به همراه ۲۰ سانتیمتر مکعب از حلال اتردوپترول شده و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی قرار گرفت. روز بعد محلول را صاف کرده و محلول صاف شده را داخل بالن سوکسله که قبلاً توزین شده بود ریخته و در دستگاه روتاری (Buchi EL) 141 قرار داده شد. در نتیجه حلالها جدا شده و چربی، باقی مانده به همراه بالن دوباره توزین شد و از تفاوت وزن بالن خالی و بالن همراه با نمونه چربی، مقدار چربی بدست آمد. سپس ۵ گرم چربی استخراج شده در یک ارلن ۲۵۰ میلی لیتری دربدار دقیقاً توزین و مقدار ۳۰ میلی لیتر اسیداستیک و کلروفرم که قبلاً مخلوط شده بودند به آن افزوده و به مقدار ۰/۵ سانتیمتر مکعب محلول نشاسته ۱ درصد به آن اضافه شد و توسط تیوسولفات سدیم ۰/۱ نرمال تا بیرنگ شدن کامل تیتر گردید . مقدار پراکسید چربی بر حسب میلی اکی والان پراکسید در ۱۰۰۰ گرم چربی از رابطه زیر بدست آمد (Pearson ، ۱۹۹۴)

$$\text{مقدار پراکسید چربی بر حسب میلی اکی والان} = \frac{\text{مقدار مصرفی تیوسولفات} \times \text{نرمالیته} \times 1000}{5}$$

۵-۷-۳- سنجش مجوع بازهای نیتروژنی فرار (TVB-N)

مقدار مشخصی از نمونه هموژن شده در داخل بالن ویژه کجلدال قرار داده، مقدار 2 گرم پودر اکسید منیزم و ۳۰۰ سانتیمتر مکعب آب مقطر و یک عدد پرل شیشه ای به آن اضافه و سپس منضمات دستگاه تقطیر را به بالن متصل و شیر آب سرد باز شد .در ظرف گیرنده مقدار ۵ تا ۱۰ سانتیمتر مکعب اسیدبوریک ۲ درصد همراه با چند قطره معرف ریخته و زیر مبرد قرار داده شد، به طوریکه انتهای مبرد در محلول قرار گیرد .به بالن حرارت داده شد و از هنگام جوشیدن و شروع تقطیر مدت ۲۵ دقیقه تقطیر ادامه یافت، بنحوی که حجم تقطیر تقریباً به 150 سانتیمتر مکعب رسید .حاصل تقطیر توسط محلول اسید سولفوریک ۰/۱ نرمال تا ایجاد رنگ قرمز تیتر گردید. برای محاسبه مواد ازته فرار (TVB-N) بر حسب میلی گرم در صد گرم گوشت ماهی از معادله زیر استفاده شد (Pearson ، ۱۹۹۷) :

$$TVB-N = \frac{\text{مقدار مصرفی اسید} \times \text{نرمالیته اسید} \times 14}{\text{وزن نمونه}}$$

۸-۳- آزمایشات میکروبی

۱-۸-۳- شمارش کلی باکتریها (TVC[14])

به منظور شمارش کلی باکتریها در تیمارهای مختلف از روش استاندارد ملی ایران (شماره ۱-۸۹۲۳)، استفاده شد. جهت شمارش های میکروبی تهیه رقتهای اعشاری ضروری است . اولین رقت، رقت یک دهم می باشد که به صورت 10^{-1} نشان داده میشود . برای تهیه رقت یک دهم حدود ۱۰ گرم از نمونه ماهی توزین و خرد شد . آنگاه ۹۰ میلی لیتر محلول رقیق کننده مناسب به آن افزوده شد . بدین ترتیب مخلوطی یکنواخت از نمونه با رقت یک دهم به دست آمد . جهت رقیق کردن این نمونه، به تعداد لازم لوله های حاوی ۹ میلی لیتر مایع رقیق کننده را به ترتیب با ۰/۰۱ ، ۰/۰۰۱ ، ۰/۰۰۰۱ و ۰۰۰ مشخص کرده سپس با کمک یک پیپت یک میلی لیتری سترون، یک میلی لیتر از رقت ۰/۱ برداشته و به اولین لوله حاوی مایع رقیق کننده که با ۰/۰۱ مشخص شده بود، افزوده شد .لوله رقت ۰/۰۱ خوب تکان داده شد و سپس توسط یک پیپت یک میلی لیتری دیگر، یک میلی لیتر از آن به لوله حاوی محلول رقیق کننده که روی آن ۰/۰۰۱ نوشته شده بود، افزوده شد و به همین ترتیب عمل رقیق کردن ادامه یافت . باید در نظر داشت که هر پیپت فقط در یک رقت فرو رود و هرگز با رقتهای دیگر تماس پیدا نکند . کلیه عملیات بالا باید در کنار شعله و با رعایت شرایط سترونی انجام گیرد . محلول رقیق کننده مورد استفاده پپتون واتر بود .

روش کشت دادن در این آزمایش، روش (Plate Count agar (PCA) (Merck ، آلمان) بود . در این روش یک لیتر آب مقطر افزوده و حرارت داده شد تا به جوش آید سپس در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت 15 دقیقه سترون شد . توسط یک پیپت یک میلی لیتری، یک میلی لیتر از رقیق ترین محلول آماده شد . مثلاً رقت 10^{-1}را برداشته و به ظرف پتری سترون انتقال داده شد . سپس همان پیپت در محلولی با رقت 10^{-2} چند بار شسته شده و مجدداً یک میلی لیتر از این رقت به ظرف پتری سترون وارد شد . به همین ترتیب عملیات تا رقت 10^{-1} ادامه یافت . به سرعت محیط کشت که درجه حرارت آن نباید بیش از ۴۵ درجه سانتی گراد باشد، به ظروف پتری محتوی نمونه منتقل شد و سپس برای مخلوط شدن نمونه با محیط کشت ، ظرف پتری بطور واژگون در دمای 32 درجه سانتیگراد به مدت 48 ساعت در انکوباتور قرار گرفت و بعد از ۴۸ ساعت، نتیجه آزمایش بررسی و تمام پرگنه هایی که در ظرف پتری ظاهر شده بودند ، شمارش شد . برای شمارش، تعداد پرگنه های شمارش شده در عکس رقت ضرب شده و بر وزن نمونه تقسیم و به صورت cfu/gr بیان شد. در همه مراحل این آزمایش وسایل مورد استفاده ، قبل از بکارگیری با استفاده از شعله و الکل ۷۰٪ استریل شدند (استاندارد ملی ایران شماره ۱-۸۹۲۳، ۱۳۷۹) .

[14] .Total viable count

۲-۸-۳- شمارش باکتریهای سرمادوست (PTC[15])

برای شمارش تعداد باکترهای سرمادوست کشت به صورت سطحی بر روی محیط کشت پلیت کانت آگار انجام شد و بعد از نگهداری پلیتها در دمای ۱۰ درجه سانتیگراد به مدت ۷ روز تعداد کلنیهای موجود بر روی پلیت شمارش شد (استاندارد ملی ایران شماره ۲۶۲۹، ۱۳۷۸).

۳-۸-۳-شمارش باکتریهای اسید لاکتیک (LAB[16])

به منظور شمارش باکتری‌های گروه لاکتیک، از محیط کشت (deMan, Rogosa, and Sharpe) MRS آگار (Merck ، آلمان) استفاده شد .۱ میلی لیتر نمونه با میکرو سمپلر به پتری دیش خالی منتقل شد و سپس یک لایه محیط کشت مایع آماده شده به نمونه اضافه شده و پتری دیش را به طور سینوسی تکان داده تا نمونه با محیط کشت مخلوط شود و پس از سرد شدن، لایه باریک دیگری به لایه اولیه اضافه شد .برای ایجاد یک محیط بی هوازی پلیت های کشت داده شده در جار بی هوازی حاوی 2 گازپک C قرار داده شدند و در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ تا ۳ روز نگهداری شدند (Jones و همکاران ، ۲۰۰۸) .

داده های حاصل ازشمارش چشمی پلیت ها در عکس رقت ضرب شده، بر وزن نمونه برداشت شده تقسیم شد .با قرار دادن این داده ها در لگاریتم، لگاریتم تعداد کلنی در واحد وزن (log cfu/g) بدست آمد.

۹-۳- تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده های حاصله با نرم افزار SPSS 18 انجام پذیرفت . به منظور تجزیه و تحلیل مقادیر کمی به دست آمده از آزمایش های شیمیایی و آزمایش های میکروبی پس از کنترل نرمال بودن داده ها با استفاده از آزمون (Kolomogorav – Smirnov) کولموگراف – اسمیرنوف از تجزیه واریانس دو طرفه در قالب طرح آماری فاکتوریل کاملاً تصادفی استفاده گردید . همچنین برای تعیین تفاوت معنی دار بین میانگین ها در تیمارهای مختلف از آزمون حداقل (LSD) و برای بررسی تفاوت های بین تفاوت معنی دار میانگین ها در زمانهای مختلف برای یک تیمار از آزمون دانکن (Duncan) استفاده گردید لازم به ذکر است که در تمامی مراحل تجزیه و تحلیل، خطای مجاز برای رد H_0 ، ۵ درصد در نظر گرفته شد .

[15] . Psychrotrophic count
[16] .Lactic acid bacteria

۴- نتایج

۴-۱- درصد ترکیبات بدن

جدول ۴-۱ درصد ترکیبات بدن نمونه های شاهد ماهی قزل آلای رنگین کمان را در روز صفر نشان می دهد.

جدول ۴-۱- درصد ترکیبات بافت ماهی قزل آلای رنگین کمان مورد آزمایش

	پروتئین	چربی	رطوبت	خاکستر
قزل آلای رنگین کمان	۲۰/۳۲±۰/۵۴*	۲/۷۸±۰/۱۰	۷۳±۱/۰۲	۳/۹۸±۰/۲۷

* میانگین ± انحراف معیار از میانگین (تعداد تکرار= ۳)

۴-۲- نتایج آزمایشات شیمیایی

۴-۲-۱- مقادیر pH

تغییرات pH در نمونه فیله و شکم خالی ماهی قزل آلای رنگین کمان و تفاوت آماری pH در تیمارهای مختلف، طی زمان نگهداری در جداول ۴-۲ و ۴-۳ نشان داده شده است. روند افزایشی pH در نمونه های فیله دارای نایسین و استات سدیم بسیار کندتر از تیمار شاهد بوده و تفاوت موجود نیز معنی دار بوده ($P<0/05$) ولی با این وجود تغییرات در سایر تیمار معنی دار نبوده است. ($P>0/05$). نتایج تغییرات pH در تیمارهای شکم خالی مشابه نمونه های فیله بوده با این تفاوت که این میزان تغییرات pH پائین تر از نمونه های فیله بوده است.

جدول ۴-۲- تفاوت بین مقادیر میانگین pH در نمونه های فیله ماهی قزل آلا در زمانهای مختلف نگهداری

تیمار	زمان نگهداری(روز)				
	صفر	۴	۸	۱۲	۱۶
فیله شاهد	۶/۶۵±۰/۰۵* bA	۶/۷۱±۰/۰۴ bA	۶/۷۵±۰/۰۱ bA	۶/۶۵±۰/۰۴ bA	۶/۸۱±۰/۰۴ aA
فیله حاوی نایسین Z	۶/۳۸±۰/۰۶ aB	۶/۳۹±۰/۰۳ aB	۶/۳۷±۰/۰۵ aB	۶/۴۵±۰/۰۷ aB	۶/۴۷±۰/۰۶ aB
استات سدیم	۶/۳۱±۰/۰۳ aB	۶/۳۵±۰/۰۴ aB	۶/۴۱±۰/۰۴ aB	۶/۴۶±۰/۰۳ aB	۶/۳۵±۰/۰۶ aB
نایسین Z و استات سدیم	۶/۳۰±۰/۰۶ bB	۶/۳۴±۰/۰۳ bB	۶/۳۷±۰/۰۵ aB	۶/۳۹±۰/۰۷ aB	۶/۴۳±۰/۰۶ Ab

*میانگین ± انحراف معیار از میانگین، حروف کوچک مشترک در هر ردیف و ستون نشان از عدم تفاوت معنی دار در زمان های مختلف است.

جدول ۴-۳- تفاوت بین مقادیر میانگین pH در نمونه های شکم خالی ماهی قزل آلا در زمانهای مختلف نگهداری

شکم خالی شاهد	۶/۶۱±۰/۰۴* bA	۶/۶۴±۰/۰۳ bA	۶/۶۳±۰/۰۳ bA	۶/۶۹±۰/۰۲ bA	۶/۷۳±۰/۰۵ aA
شکم خالی حاوی نایسین Z	۶/۳۵±۰/۰۴ aB	۶/۳۴±۰/۰۳ aB	۶/۳۶±۰/۰۵ aB	۶/۳۹±۰/۰۵ aB	۶/۴۱±۰/۰۶ aB
شکم خالی استات سدیم	۶/۳۰±۰/۰۳ aB	۶/۳۱±۰/۰۲ aB	۶/۳۵±۰/۰۴ aB	۶/۳۷±۰/۰۴ aB	۶/۳۹±۰/۰۶ aB
شکم خالی نایسین Z و استات سدیم	۶/۳۰±۰/۰۳ bB	۶/۳۱±۰/۰۵ bB	۶/۳۲±۰/۰۴ aB	۶/۳۵±۰/۰۵ aB	۶/۳۸±۰/۰۴ aB

*میانگین ± انحراف معیار از میانگین. حروف کوچک و بزرگ مشترک به ترتیب در هر ردیف و ستون نشان از عدم تفاوت معنی دار در زمان های مختلف است.

۲-۲-۴- مقادیر پراکسید (pv) نمونه ماهی

تغییرات پراکسید ماهی قزل آلای رنگین کمان در تیمارهای مختلف، طی زمان نگهداری در جداول ۴-۴ و ۴-۵ نشان داده شده است. طبق نتایج حاصله، میزان پراکسید در تمامی نمونه ها روندی افزایشی و معنی دار داشته است ($P<0/05$). بررسی ماهیان فیله و شاهد شکم خالی نشان دهنده آن است که اختلاف میزان PV بین این دو تیمار تا روز ۱۲ بی معنی ($P> 0/05$) و از روز ۱۲ تا انتهای دوره معنی دار ($P<0/05$) می باشد. همچنین، آنالیزهای آماری نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی دار در PV بین ۲ تیمار حاوی نایسین Z و استات سدیم در طول دوره نگهداری در دمای ۴ درجه بوده ولی با این وجود در مقایسه با نمونه ترکیبی (نایسین و استات سدیم) معنی دار بوده است ($P > 0/05$). مقایسه تیمارهای دارای مواد نگهدارنده با نمونه شاهد ، نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار($P < 0/05$) بین آنها از روز ۸ تا روز ۱۶ نگهداری بوده است.

جدول ۴-۴- تفاوت بین مقادیر میانگین PV در نمونه های فیله ماهی قزل آلا در زمانهای مختلف نگهداری

تیمار	زمان نگهداری(روز)				
	صفر	۴	۸	۱۲	۱۶
فیله شاهد	۱/۹۵±۰/۰۳* eA	۴/۲۶±۰/۹۲ dA	۶/۷۸±۰/۶۳ cA	۸/۳۵±۰/۶۹ bA	۱۰/۶۲±۰/۳۲ aA
فیله حاوی نایسین Z	۲/۰۰±۰/۰۷ dA	۳/۵۲±۰/۴۸ cB	۴/۰۳±۰/۲۶ bB	۴/۳۳±۰/۱۸ bB	۶/۲۱±۰/۲۳ aB
استات سدیم	۱/۸۷±۰/۰۴ dA	۳/۲۲±۰/۴۵ cB	۳/۸۵±۰/۷۳ cB	۴/۲۳±۰/۵۷ bB	۵/۴۶±۰/۵۳ aB
نایسین Z و استات سدیم	۱/۸۱±۰/۰۶ dA	۳/۱۱±۰/۲۵ cB	۳/۴۵±۰/۳۴ cC	۴/۱۲±۰/۲۶ bB	۵/۳۲±۰/۱۴ aB

*میانگین ± انحراف معیار از میانگین. حروف کوچک و بزرگ مشترک به ترتیب در هر ردیف و ستون نشان از عدم تفاوت معنی دار در زمان های مختلف است.

جدول ۴-۵- تفاوت بین مقادیر میانگین PV در نمونه های شکم خالی ماهی قزل آلا در زمانهای مختلف نگهداری

تیمار	زمان نگهداری(روز)				
	صفر	۴	۸	۱۲	۱۶
شکم خالی شاهد	۱/۹۸±۰/۰۱ dA	۴/۰۸±۰/۶۳ cA	۵/۲۴±۰/۱۱ bA	۵/۸±۰/۰۰ bA	۸/۴۹±۰/۴۹ aA
شکم خالی حاوی نایسین Z	۱/۹۶±۰/۰۶ dA	۳/۰۲±۰/۰۱ cA	۳/۵۴±۰/۱۸ cB	۴/۲۱±۰/۲۱ bB	۶/۱۸±۰/۱۱ aB
استات سدیم	۱/۹۱±۰/۰۷ dA	۲/۹۸±۰/۰۶ cB	۳/۴۱±۰/۱۱ cB	۴/۱۵±۰/۱۳ bB	۵/۳۲±۰/۱۱ aB
نایسین Z و استات سدیم	۱/۹۳±۰/۰۴ dA	۲/۷۵±۰/۱ cB	۳/۳۲±۰/۲۶ cB	۴/۰۴±۰/۱۷ bB	۵/۲۵±۰/۲۲ aB

*میانگین ± انحراف معیار از میانگین، حروف کوچك مشترك در هر ردیف نشان از عدم تفاوت معنی دار در زمان های مختلف است.

۳-۲-۴- مقادیر تیو باربیتوریک اسید (TBA)

در جداول ۴-۶ و ۴-۷ تغییرات اسید تیوباربیتوریک فیله و شکم خالی ماهی قزل آلا در تیمارهای مختلف، طی زمان نگهداری نشان داده شده است. مطابق جدول، میزان TBA در تمامی تیمارهای این آزمایش در روز ۱۶ بیشترین میزان و در روز صفر کمترین میزان بود و بین زمانهای مختلف آزمایش در همه تیمارها از نظر آماری اختلاف معنی دار مشاهده شد ($P < ۰/۰۵$). میزان TBA فیله ماهیان در کلیه تیمارها در زمان صفر تفاوت معنی داری با هم نداشت ($P < ۰/۰۵$) . آنالیزهای آماری نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی دار در TBA بین ۲ تیمار حاوی نایسین Z و استات سدیم در طول دوره نگهداری در دمای ۴ درجه بوده ولی با این وجود در مقایسه با نمونه ترکیبی (نایسین و استات سدیم) معنی دار بوده است ($P > 0/05$). مقایسه تیمارهای دارای مواد نگهدارنده با نمونه شاهد ، نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار($P < 0/05$) بین آنها از روز ۴ تا روز ۱۶ نگهداری بوده است.

جدول ۴-۶- تفاوت بین مقادیر میانگین TBA در نمونه های فیله ماهی قزل آلا در زمانهای مختلف نگهداری

تیمار	زمان نگهداری(روز)				
	صفر	۴	۸	۱۲	۱۶
فیله شاهد	۰/۰۳۵±۰/۰۰۴ c A	۰/۲۶۵±۰/۰۶۳ b A	۱/۰۱±۰/۰۶۳ a A	۱/۶۷±۰/۴۲۰ a A	۲/۲۵±۰/۱۲۷ a A
فیله حاوی نایسین Z	۰/۰۳۶±۰/۰۰۷ c A	۰/۱۱۳±۰/۰۲۴ b B	۰/۸۰±۰/۰۲۸ a B	۰/۸۶±۰/۰۳۵ a B	۱/۱۹±۰/۰۳۵ a B
استات سدیم	۰/۰۳۸±۰/۰۰۳ c A	۰/۱۲۵±۰/۰۲۱ b B	۰/۸۴±۰/۰۲۸ a B	۱/۰۸±۰/۰۳۵ a B	۱/۴۷±۰/۰۷۰ a B
نایسین Z و استات سدیم	۰/۰۳۵±۰/۰۰۴ c A	۰/۱۳۵±۰/۰۳۵ b B	۰/۴۶۵±۰/۰۳۵ b B	۰/۸۶±۰/۰۳۶ a B	۱/۰۲±۰/۰۴۲ a C

*میانگین ± انحراف معیار از میانگین. حروف کوچك و بزرگ مشترك به ترتیب در هر ردیف و ستون نشان از عدم تفاوت معنی دار در زمان های مختلف است.

جدول ۴-۷- تفاوت بین مقادیر میانگین TBA در نمونه های شکم خالی ماهی قزل آلا در زمانهای مختلف نگهداری

تیمار	زمان نگهداری(روز)				
	صفر	۴	۸	۱۲	۱۶
شکم خالی شاهد	۰/۰۲۳±۰/۰۰۲ c A	۰/۲۱۱±۰/۰۴۱ b A	۰/۸۶±۰/۰۴۵ a A	۱/۳۲±۰/۳۲ a A	۲/۱۱±۰/۰۹ a A
شکم خالی حاوی نایسین Z	۰/۰۲۳±۰/۰۰۳ c A	۰/۱۰۱±۰/۰۱۲ b B	۰/۵۵±۰/۰۱۲ a B	۰/۷۵±۰/۰۱۲ a B	۱/۱۲±۰/۰۲۱ a B
استات سدیم	۰/۰۳۱±۰/۰۰۱ c A	۰/۱۱۳±۰/۰۱ b B	۰/۴۳±۰/۰۱۲ a B	۰/۷۳±۰/۰۲۳ a B	۱/۱۱±۰/۰۴۵ a B
نایسین Z و استات سدیم	۰/۰۲۹±۰/۰۰۲ c A	۰/۱۱±۰/۰۲۵ b B	۰/۴۲±۰/۰۲۷ b B	۰/۶۵±۰/۰۳۲ a B	۱/۱۳±۰/۰۳۶ a C

*میانگین ± انحراف معیار از میانگین. حروف کوچک و بزرگ مشترک به ترتیب در هر ردیف و ستون نشان از عدم تفاوت معنی دار در زمانهای مختلف است.

۴-۲-۴- مقادیر مجموع بازهای نیتروژنی فرار(TVN)

در جداول ۴-۸ و ۴-۹ تغییرات بازهای نیتروژنی فرار فیله و شکم خالی ماهی قزل آلا در تیمارهای مختلف، طی زمان نگه داری نشان داده شده است. طبق نتایج، مقدار TVN در تمامی تیمارهای این آزمایش در روز ۱۶ بیشترین میزان و در روز صفر کمترین میزان بود و بین زمانهای مختلف آزمایش در همه تیمارها از نظر آماری اختلاف معنی دار مشاهده شد ($P < ۰/۰۵$). میزان TVN در فیله و شکم خالی ماهیان در کلیه تیمارها در زمان صفر تفاوت معنی داری با هم نداشت ($P < ۰/۰۵$) . بطور کلی روند تغییرات در فیله بیشتر از شکم خالی بوده است. بررسی TVN در تیمارهای مورد نشان داد که تغییرات در نمونه های حاوی مواد نگهدارنده ، بجز نمونه ترکیبی حاوی استات سدیم و نایسین Z ، نسبت به یکدیگر معنی دار نبوده است ولی با این وجود تغییرات مشاهده در مقایسه با نمونه شاهد معنی دار بوده است($P < ۰/۰۵$).

جدول ۴-۸- تفاوت بین مقادیر میانگین TVN در نمونه های فیله ماهی قزل آلا در زمانهای مختلف نگهداری

تیمار	زمان نگهداری(روز)				
	صفر	۴	۸	۱۲	۱۶
فیله شاهد	۱۱/۰۲±۰/۲۳ eA	۱۷/۹۳±۱/۳۵ dA	۲۰/۶۸±۰/۶۱ cA	۲۶/۰۲±۰/۲۳ bA	۳۰/۱۷±۰/۴۲ aA
فیله حاوی نایسین Z	۱۰/۶۳±۰/۱۵ eA	۱۳/۴۳±۰/۸۲ dB	۱۷/۶۷±۰/۲ cB	۲۱/۸۲±۰/۳۲ bB	۲۴/۸۱±۰/۵۵ aB
استات سدیم	۱۰/۱۱±۰/۱۱ eA	۱۳/۲۴±۰/۳۴ dB	۱۶/۸۷±۰/۵۶ cB	۲۰/۹۴±۰/۴۵ bB	۲۳/۶۲±۰/۴۹ aB
نایسین Z و استات سدیم	۱۰/۴۵±۰/۲۳ eA	۱۲/۴۱±۰/۴۷ dB	۱۶/۲۴±۰/۳۵ cB	۲۰/۵۶±۰/۵۲ bB	۲۳/۳۱±۰/۳۸ aB

*میانگین ± انحراف معیار از میانگین. حروف کوچک و بزرگ مشترک به ترتیب در هر ردیف و ستون نشان از عدم تفاوت معنی دار در زمان های مختلف است.

جدول ۴-۹- تفاوت بین مقادیر میانگین TVN در نمونه های شکم خالی ماهی قزل آلا در زمانهای مختلف نگهداری

تیمار	زمان نگهداری(روز)				
	صفر	۴	۸	۱۲	۱۶
شکم خالی شاهد	۱۰/۳۱±۰/۲۶ eA	۱۵/۶۸±۰/۷۴ dA	۱۹/۷۸±۰/۲۷ cA	۲۲/۳۶±۰/۳۵ bA	۲۸/۱±۰/۱۵ aA
شکم خالی حاوی نایسین Z	۱۰/۷۱±۰/۷۳ cA	۱۱/۲±0/۳ cB	۱۵/۵±۰/54 bB	۱۹/۱۵±۰/56 aB	۲۰/۸۷±0/۲۳ aB
استات سدیم	۱۰/35±۰/43 dA	۱۱/12±0/67 dB	14/76±۰/35 cB	18/45±۰/67 bB	۲۰/32±0/72 aB
نایسین Z و استات سدیم	۱۰/21±۰/32 dA	10/43±0/52 dB	14/43±۰/75 cB	18/35±۰/82 bB	۲۰/12±0/54 Ab

*میانگین ± انحراف معیار از میانگین. حروف کوچك و بزرگ مشترك به ترتیب در هر ردیف و ستون نشان از عدم تفاوت معنی دار در زمان های مختلف است.

۳-۴- نتایج آزمایشات میکروبی

۱-۳-۴- مقادیر کل باکتری های قابل رویت (TVC) نمونه ماهی

تغییرات مقادیر کل باکتری های قابل روئیت و مقایسه آن در بین تیمارها در جداول ۴-۱۰ و ۴-۱۱ نشان داده شده داشت . طبق نتایج، مقدار TVC در تمامی تیمارهای این آزمایش در روز ۱۶ بیشترین میزان و در روز صفر کمترین میزان بود و بین زمانهای مختلف آزمایش در همه تیمارها از نظر آماری اختلاف معنی دار مشاهده شد ($P < ۰/۰۵$). میزان TVC فیله ماهیان در کلیه تیمارها در زمان صفر تفاوت معنی داری با هم نداشت ($P < ۰/۰۵$) . از زمان ۴ تا ۱۶ نگهداری، تغییرات شمارش کلی باکتریها در مقایسه با تیمار شاهد معنی دار بوده است. مقایسه بین تیمارهای دارای مواد نگهدارنده با یکدیگر ، بجز در چند مورد ، حاکی از عدم اختلاف معنی دار ما بین آنها بوده است. نتایج تغییرات باکتریها در تیمارهای دارای قزل آلا شکم خالی نشان دهنده آنست که روند تغییرات در تیمارهای شکم خالی کمتر بوده ولی آنالیز آماری انجام شده مشابه تیمارهای دارای فیله بوده است.

جدول ۴-۱۰- تفاوت بین مقادیر میانگین TVC در نمونه های فیله ماهی قزل آلا در زمانهای مختلف نگهداری

تیمار	زمان نگهداری(روز)				
	صفر	۴	۸	۱۲	۱۶
فیله شاهد	۳/۹۶±۰/۰۱* dA	۵/۷۷±۰/۰۴ cA	۶/۵۳±۰/۱۱ bA	۶/۶۹±۰/۰۴ bA	۷/۸۴±۰/۰۳ aA
فیله حاوی نایسین Z	۳/۷۰±۰/۰۱ cA	۴/۹۸±۰/۰۱ bB	۵/۶۸±۰/۰۳ aB	۵/۸۹±۰/۰۱ aB	۶/۳۰±۰/۰۹ aB
استات سدیم	۳/۵۰±۰/۰۰ dA	۴/۵۵±۰/۰۳ cB	۵/۴۳±۰/۰۱ bB	۵/۴۵±۰/۰۳ bB	۶/۱۵±۰/۰۴ aB
نایسین Z و استات سدیم	۳/۴۳±۰/۰۲ dA	۴/۳۳±۰/۰۱ cC	۵/۲۷±۰/۰۲ bB	۵/۳۵±۰/۰۴ aC	۵/۷۶±۰/۰۷ aC

*میانگین ± انحراف معیار از میانگین. حروف کوچک و بزرگ مشترک به ترتیب در هر ردیف و ستون نشان از عدم تفاوت معنی دار در زمانهای مختلف است.

جدول ۴-۱۱- تفاوت بین مقادیر میانگین TVC در نمونه های شکم خالی ماهی قزل آلا در زمانهای مختلف نگهداری

تیمار	زمان نگهداری(روز)				
	صفر	۴	۸	۱۲	۱۶
شکم خالی شاهد	۳/۷۴±۰/۰۱ dA	۵/۵۹±۰/۰۶ cA	۶/۲۰±۰/۰۱ bA	۶/۸۰±۰/۰۵ bA	۷/۶۰±۰/۰۵ aA
شکم خالی حاوی نایسین Z	۳/۶۵±۰/۰۲ dA	۴/۶۱±۰/۰۳ cB	۵/۲۵±۰/۰۱ bB	۵/۷۳±۰/۰۸ bB	۶/۱۱±۰/۰۵ aB
استات سدیم	۳/۴۳±۰/۰۵ eA	۴/۵۵±۰/۰۱ dB	۴/۹۸±۰/۰۳ cB	۵/۲۳±۰/۰۳ bB	۵/۸۲±۰/۰۳ aC
نایسین Z و استات سدیم	۳/۵۱±۰/۰۳ dA	۴/۳۴±۰/۰۲ cB	۴/۷۵±۰/۰۳ cB	۵/۲۰±۰/۰۵ bB	۵/۶۲±۰/۰۳ aC

*میانگین ± انحراف معیار از میانگین. حروف کوچک و بزرگ مشترک به ترتیب در هر ردیف و ستون نشان از عدم تفاوت معنی دار در زمان های مختلف است.

۲-۳-۴- مقادیر باکتری های سرمادوست (PTC)

تغییرات باکتریهای سرما دوست و مقایسه آن بین تیمارها در جداول ۴-۱۲ و ۴-۱۳ نشان داده شده است. مطابق نتایج ذکر شده در جداول، شمارش PTC در تمامی تیمارهای این آزمایش در روز ۱۶ بیشترین میزان و در روز صفر کمترین میزان بود و بین زمانهای مختلف آزمایش در همه تیمارها از نظر آماری اختلاف معنی دار مشاهده شد ($P < ۰/۰۵$). میزان PTC فیله ماهیان در کلیه تیمارها در زمان صفر تفاوت معنی داری با هم نداشت ($P < ۰/۰۵$). از زمان ۴ تا ۱۶ نگهداری، تغییرات باکتریهای سرماگرا در مقایسه با تیمار شاهد معنی دار بوده است. مقایسه بین

تیمارهای دارای مواد نگهدارنده با یکدیگر ، بجز در چند مورد ، حاکی از عدم اختلاف معنی دار ما بین آنها بوده است. نتایج تغییرات باکتریهای سرماگرا در تیمارهای دارای قزل آلا شکم خالی نشان دهنده آنست که روند تغییرات در تیمارهای شکم خالی کمتر بوده ولی آنالیز آماری انجام شده مشابه تیمارهای دارای فیله بوده است. بطور کلی تغییرات باکتریهای سرماگرا در تیمارهای مختلف و شاهد پائین تر از شمارش کلی باکتریها بوده است.

جدول ۴-۱۲- تفاوت بین مقادیر میانگین TPC در نمونه های فیله ماهی قزل آلا در زمانهای مختلف نگهداری

تیمار	زمان نگهداری(روز)				
	صفر	۴	۸	۱۲	۱۶
فیله شاهد	۳/۶۷±۰/۰۲* dA	۴/۳۵±۰/۰۵ cA	۵/۸۶±۰/۰۳ bA	۶/۰۰±۰/۰۹ bA	۷/۲۵±۰/۰۵ aA
فیله حاوی نایسین Z	۳/۳۵±۰/۰۵ dA	۳/۷±۰/۰۱ dB	۴/۴۵±۰/۰۳ cB	۵/۵۵±۰/۰۵ bB	۵/۸۲±۰/۰۲ aB
استات سدیم	۳/۲۱±۰/۰۳ dA	۳/۵۵±۰/۰۲ dB	۴/۲۱±۰/۰۴ cB	۵/۳۱±۰/۰۴ bB	۵/۶۸±۰/۰۳ aB
نایسین Z و استات سدیم	۳/۱۱±۰/۰۱ dA	۳/۴۵±۰/۰۳ dB	۴/۱۵±۰/۰۲ cB	۵/۱۷±۰/۰۲ bB	۵/۵۲±۰/۰۳ aB

*میانگین ± انحراف معیار از میانگین. حروف کوچک و بزرگ مشترک به ترتیب در هر ردیف و ستون نشان از عدم تفاوت معنی دار در زمانهای مختلف است.

جدول ۴-۱۳- تفاوت بین مقادیر میانگین TPC در نمونه های شکم خالی ماهی قزل آلا در زمانهای مختلف نگهداری

تیمار	زمان نگهداری(روز)				
	صفر	۴	۸	۱۲	۱۶
شکم خالی شاهد	۳/۳۵±۰/۰۲ dA	۴/۲۰±۰/۱۰ cA	۵/۶۷±۰/۰۳ bA	۶/۵۰±۰/۱۲ aA	۶/۷۸±۰/۰۹ aA
شکم خالی حاوی نایسین Z	۳/۳۲±۰/۰۳ dA	۳/۷۹±۰/۰۴ cB	۴/۳۴±۰/۰۲ bB	۴/۶۷±۰/۰۶ bB	۵/۴۵±۰/۰۱ aB
استات سدیم	۳/۲۵±۰/۰۵ dA	۳/۵۵±۰/۰۳ cB	۴/۲۴±۰/۰۴ bB	۴/۴۲±۰/۰۴ bB	۵/۳۸±۰/۰۳ aB
نایسین Z و استات سدیم	۳/۲۳±۰/۰۴ dA	۳/۴۳±۰/۰۳ cB	۴/۱۲±۰/۰۵ bB	۴/۳۷±۰/۰۵ bB	۵/۳۵±۰/۰۶ aB

*میانگین ± انحراف معیار از میانگین. حروف کوچک و بزرگ مشترک به ترتیب در هر ردیف و ستون نشان از عدم تفاوت معنی دار در زمانهای مختلف است.

۳-۳-۴- مقادیر باکتری های اسید لاکتیک(LAB)

در جداول ۴-۱۴ و ۴-۱۵ تغییرات باکتری های اسید لاکتیک فیله و شکم خالی ماهی قزل آلای رنگین کمان در تیمارهای مختلف، طی زمان نگهداری نشان داده شده است. مطابق نتایج ذکر شده در جداول، مقدار LAB در تمامی تیمارهای این آزمایش در روز ۱۶ بیشترین میزان و در روز صفر کمترین میزان بود و بین زمانهای مختلف آزمایش در همه تیمارها از نظر آماری اختلاف معنی دار مشاهده شد ($P < ۰/۰۵$). میزانLAB فیله ماهیان در کلیه تیمارها در زمان صفر تفاوت معنی داری با هم نداشت ($P < ۰/۰۵$). از زمان ۴ تا ۱۶ نگهداری، تغییرات باکتریهای لاکتیک در مقایسه با تیمار شاهد معنی دار بوده است. مقایسه بین تیمارهای دارای مواد نگهدارنده با یکدیگر نشاندهنده آنست که با طولانی تر شدن زمان ماندگاری ، تغییرات مشاهده شده معنی دار نمی باشد و حاکی از این امر است که جمعیت باکتریهای لاکتیک در زمانهای اولیه تحت تاثیر مواد نگهدارنده مورد استفاده قرار گرفته و کاهش می یابد. جمعیت باکتریهای لاکتیک در نمونه های شکم خالی تفاوت چندانی با فیله نداشته است.

جدول ۴-۱۴- تفاوت بین مقادیر میانگین باکتریهای لاکتیک در نمونه های فیله ماهی قزل آلا در زمانهای مختلف نگهداری

تیمار	زمان نگهداری(روز)				
	صفر	۴	۸	۱۲	۱۶
فیله شاهد	۳/۰۴±۰/۰۲* eA	۳/۶۶±۰/۰۲ dA	۴/۱۱±۰/۰۲ cA	۴/۹۴±۰/۰۲ bA	۵/۳۵±۰/۰۲ aA
فیله حاوی نایسین Z	۲/۹۵±۰/۰۰ aA	۲/۵۶±۰/۰۱ aB	۱/۸۷±۰/۰۲ bB	۱/۵۵±۰/۰۳ cB	۱/۳۶±۰/۰۲ cB
استات سدیم	۲/۷۶±۰/۰۲ aA	۲/۵۲±۰/۰۲ aB	۱/۷۹±۰/۰۴ bB	۱/۴۵±۰/۰۱ cB	۱/۳۵±۰/۰۵ cB
نایسین Z و استات سدیم	۲/۸۲±۰/۰۳ aA	۲/۳۴±۰/۰۱ aB	۱/۵۵±۰/۰۳ bB	۱/۳۲±۰/۰۲ bB	۱/۲۶±۰/۰۳ bB

*میانگین ± انحراف معیار از میانگین. حروف کوچک و بزرگ مشترک به ترتیب در هر ردیف و ستون نشان از عدم تفاوت معنی دار در زمانهای مختلف است.

جدول ۴-۱۵- تفاوت بین مقادیر میانگین باکتریهای لاکتیک در نمونه های شکم خالی ماهی قزل آلا در زمانهای مختلف نگهداری

تیمار	زمان نگهداری(روز)				
	صفر	۴	۸	۱۲	۱۶
شکم خالی شاهد	۳/۱۱±۰/۰۳* eA	۳/۶۵±۰/۰۳ dA	۴/۱۷±۰/۰۳ Ca	۴/۸۳±۰/۰۵ bA	۵/۴۱±۰/۰۴ aA
شکم خالی حاوی نایسین Z	۲/۸۵±۰/۰۳ aA	۲/۶۲±۰/۰۳ aB	۱/۹۳±۰/۰۴ Bb	۱/۴۵±۰/۰۶ cB	۱/۳۰±۰/۰۳ cB
استات سدیم	۲/۶۵±۰/۰۴ aA	۲/۴۷±۰/۰۳ aB	۱/۶۴±۰/۰۵ Bb	۱/۴۵±۰/۰۴ cB	۱/۲۷±۰/۰۳ cB
نایسین Z و استات سدیم	۲/۷۵±۰/۰۳ aA	۲/۳۸±۰/۰۲ aB	۱/۴۰±۰/۰۵ bB	۱/۲۷±۰/۰۳ bB	۱/۲۱±۰/۰۴ bB

*میانگین ± انحراف معیار از میانگین. حروف کوچک و بزرگ مشترک به ترتیب در هر ردیف و ستون نشان از عدم تفاوت معنی دار در زمانهای مختلف است.

۴-۳-۴- مقادیر شمارش باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در فیله و شکم خالی ماهی قزل آلا

در جداول ۴-۱۶ و ۴-۱۷ تغییرات باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در فیله و شکم خالی قزل آلای رنگین کمان در تیمارهای مختلف، طی زمان نگهداری نشان داده شده است. مطابق نتایج ذکر شده در جداول، مقدار باکتری لیستریا در تمامی تیمارهای این آزمایش در روز ۱۶ بیشترین میزان و در روز صفر کمترین میزان بود و بین زمانهای مختلف آزمایش در بیشتر تیمارها ، به جز در چند مورد، از نظر آماری اختلاف معنی دار بوده است ($P < ۰/۰۵$). میزان باکتری در فیله و شکم خالی در کلیه تیمارها در زمان صفر تفاوت معنی داری با هم نداشت ($P < ۰/۰۵$). نتایج تغییرات رشد لیستریا در تیمارهای حاوی مواد نگهدارنده، بسیار کندتر از تیمار شاهد بوده بطوری این مقدار در تیمار شاهد در روز ۱۶ ، لوگ ۸ و در تیمارهای حاوی مواد نگهدارنده، لوگ ۶ بوده است. این امر حاکی از تاثیرات مثبت نایسین و استات سدیم بر روند رشد لیستریا، هم در فیله و هم در شکم خالی، بوده است. نتایج تغییرات لیستریا در تیمارهای حاوی ماهی شکم خالی نیز مشابه فیله بوده و تفاوت چندانی با یکدیگر نداشته اند.

جدول ۴-۱۶- تفاوت بین مقادیر میانگین لیستریا مونوسیتوژنز در نمونه های فیله ماهی قزل آلا در زمانهای مختلف نگهداری

تیمار	زمان نگهداری(روز)				
	صفر	۴	۸	۱۲	۱۶
فیله شاهد	۴/۳۱±۰/۰۲* e A	۵/۲۵±۰/۰۴ d A	۶/۲۲±۰/۰۵ c A	۷/۱۳±۰/۰۶ b A	۸/۳۵±۰/۰۳ a A
فیله حاوی نایسین Z	۴/۲۶±۰/۰۵ d A	۴/۸۹±۰/۰۵۴ c B	۵/۴۵±۰/۰۷ b B	۵/۷۶±۰/۰۲ b B	۶/۵۳±۰/۰۶ a B
استات سدیم	۴/۲۹±۰/۰۴ d A	۴/۷۱±۰/۰۷ c B	۵/۲۱±۰/۰۳ b B	۵/۸۲±۰/۰۴ b B	۶/۶۱±۰/۰۷ a B
نایسین Z و استات سدیم	۴/۲۷±۰/۰۹ d A	۴/۶۵±۰/۰۶ b B	۵/۱۴±۰/۰۶ c B	۵/۶۸±۰/۰۷ b B	۶/۲۶±۰/۰۵ a B

*میانگین ± انحراف معیار از میانگین. حروف کوچک و بزرگ مشترک به ترتیب در هر ردیف و ستون نشان از عدم تفاوت معنی دار در زمانهای مختلف است.

جدول ۴-۱۷- تفاوت بین مقادیر میانگین لیستریا مونوسیتوژنز در نمونه های شکم خالی قزل آلا در زمانهای مختلف نگهداری

تیمار	زمان نگهداری(روز)				
	صفر	۴	۸	۱۲	۱۶
شکم خالی شاهد	۴/۲۵±۰/۰۳* e A	۵/۳۲±۰/۰۵ d A	۶/۳۵±۰/۱ c A	۷/۱۷±۰/۲ b A	۸/۲۱±۰/۳ a A
شکم خالی حاوی نایسین Z	۴/۲۹±۰/۰۹ e A	۵/۱۲±۰/۰۶ d B	۵/۸۶±۰/۰۴ c B	۶/۱۴±۰/۴ b B	۶/۶۷±۰/۱۲ a B
استات سدیم	۴/۲۴±۰/۰۶ c A	۴/۵۸±۰/۰۵ c B	۵/۶۷±۰/۱ b B	۵/۹۴±۰/۲ b B	۶/۴۵±۰/۰۷ a B
نایسین Z و استات سدیم	۴/۲۷±۰/۰۵ c A	۴/۵۱±۰/۱ c B	۵/۲۴±۰/۱۴ b B	۵/۷۲±۰/۰۹ b B	۶/۳۵±۰/۲ a B

*میانگین ± انحراف معیار از میانگین. حروف کوچک و بزرگ مشترک به ترتیب در هر ردیف و ستون نشان از عدم تفاوت معنی دار در زمانهای مختلف است.

۵-۳-۴- مقادیر شمارش باکتری کلستریدیوم بوتولینوم تیپ E در فیله و شکم خالی ماهی قزل آلا

در جداول ۴-۱۸ و ۴-۱۹ تغییرات باکتری کلستریدیوم بوتولینوم تیپ E در فیله و شکم خالی قزل آلای رنگین کمان در تیمارهای مختلف، طی زمان نگهداری نشان داده شده است. مطابق نتایج ذکر شده در جداول، مقدار باکتری کلستریدیوم در تمامی تیمارهای این آزمایش در روز ۱۶ بیشترین میزان و در روز صفر کمترین میزان

بود و بین زمانهای مختلف آزمایش در بیشتر تیمارها ، به جز در چند مورد، از نظر آماری اختلاف معنی دار بوده است ($P < ۰/۰۵$). میزان باکتری در فیله و شکم خالی در کلیه تیمارها در زمان صفر تفاوت معنی داری با هم نداشت ($P < ۰/۰۵$). نتایج تغییرات رشد کلستریدیوم در تیمارهای حاوی مواد نگهدارنده، بسیار کندتر از تیمار شاهد بوده بطوری این مقدار در تیمار شاهد در روز ۱۶ ، لوگ ۸ و در تیمارهای حاوی مواد نگهدارنده، لوگ ۵ بوده است. این امر حاکی از تاثیرات مثبت نایسین و استات سدیم بر روند رشد کلستریدیوم، هم در فیله و هم در شکم خالی، بوده است. نتایج تغییرات باکتری در تیمارهای حاوی ماهی شکم خالی نیز مشابه فیله بوده و تفاوت چندانی با یکدیگر نداشته اند. در مقایسه تاثیر مهار کننده مواد مورد استفاده بر دو باکتری مشخص گردید که میزان حساسیت کلستریدیوم بیشتر از لیستریا بوده و مواد نگهدارنده مورد استفاده قادر به کندتر نمودن روند رشد کلستریدیوم در فیله و شکم خالی قزل آلا می باشند.

جدول ۴-۱۸- تفاوت بین مقادیر میانگین کلستریدیوم بوتولینوم تیپ E در نمونه های فیله ماهی قزل آلا در زمانهای مختلف نگهداری

تیمار	زمان نگهداری(روز)				
	صفر	۴	۸	۱۲	۱۶
فیله شاهد	۴/۲۴±۰/۰۷* e A	۵/۳۶±۰/۰۳ d A	۶/۷۶±۰/۱۲ c A	۷/۴۵±۰/۰۸ b A	۸/۴۹±۰/۱۲ a A
فیله حاوی نایسین Z	۴/۳۱±۰/۰۲ d A	۴/۵۶±۰/۱ c B	۵/۲۵±۰/۰۵ b B	۵/۵۴±۰/۰۵ b B	۵/۸۹±۰/۱۳ a B
استات سدیم	۴/۲۵±۰/۰۴ d A	۴/۵۱±۰/۰۵ c B	۵/۲۷±۰/۰۶ b B	۵/۵۰±۰/۳ b B	۵/۹۱±۰/۰۸ a B
نایسین Z و استات سدیم	۴/۲۲±۰/۱ d A	۴/۴۵±۰/۰۴ b B	۵/۰۲±۰/۰۳ c B	۵/۴۲±۰/۰۵ b B	۵/۷۵±۰/۲ a B

*میانگین ± انحراف معیار از میانگین. حروف کوچك و بزرگ مشترك به ترتیب در هر ردیف و ستون نشان از عدم تفاوت معنی دار در زمانهای مختلف است.

جدول ۴-۱۹- تفاوت بین مقادیر میانگین کلستریدیوم بوتولینوم تیپ E در نمونه های شکم خالی قزل آلا در زمانهای مختلف نگهداری

تیمار	زمان نگهداری(روز)				
	صفر	۴	۸	۱۲	۱۶
شکم خالی شاهد	۴/۲۱±۰/۰۵* e A	۵/۳۲±۰/۰۴ d A	۶/۵۵±۰/۰۵ c A	۷/۵۷±۰/۳ b A	۸/۵۵±۰/۱۴ a A
شکم خالی حاوی نایسین Z	۴/۲۵±۰/۰۴ d A	۴/۴۵±۰/۰۵ c B	۵/۳۲±۰/۰۵ b B	۵/۶۱±۰/۰۷ b B	۵/۹۵±۰/۱ a B
استات سدیم	۴/۲۱±۰/۰۷ d A	۴/۴۸±۰/۰۳ c B	۵/۲۳±۰/۰۶ b B	۵/۵۵±۰/۰۵ b B	۵/۸۷±۰/۰۴ a B
نایسین Z و استات سدیم	۴/۲۴±۰/۰۶ d A	۴/۳۵±۰/۰۵ b B	۵/۱۷±۰/۱ c B	۵/۳۷±۰/۲ b B	۵/۸۰±۰/۰۹ a B

*میانگین ± انحراف معیار از میانگین. حروف کوچک و بزرگ مشترک به ترتیب در هر ردیف و ستون نشان از عدم تفاوت معنی دار در زمان های مختلف است.

۵- بحث

۱-۵- ارزیابی شیمیایی

۱-۱-۵- ترکیبات اولیه بدن

هر چند نتایج مطالعات مختلف مربوط به میزان ترکیبات بدن ماهی قزل آلای رنگین کمان حاکی از تفاوت این فاکتورها بخصوص در میزان چربی بوده است(USFDA، ۱۹۸۷). لکن میزان این ترکیبات در تحقیق حاضر (جدول ۴-۱) در دامنه ای از مقادیر ارائه شده در مطالعات قبلی، قرار گرفته است (Gonzales- Fandos، ۲۰۰۴ و Chen ، ۲۰۰۳و ۲۰۰۷ ; Ojagh و همکاران ، ۲۰۱۰ ; ذوالفقاری و همکاران ، ۱۳۹۰). تنوع در ترکیبات شیمیایی ممکن است به دلیل تفاوت در تغذیه، فصل صید، سیکل تخم ریزی، تفاوت های جنسی، اندازه ماهی، ناحیه زندگی و دیگر فاکتورهای محیطی باشد (Pacheco-Agilar و همکاران، ۲۰۰۰). تنوع در ترکیبات شیمیایی به دلایل مذکور فوق منجر به تغییرات در خصوصیات حسی مثل بو، بافت، رنگ و سطح ظاهری ماهی می شود که رشد میکروبی، میزان اکسیداسیون و اقبال عمومی را برای مصرف ماهی کنترل می نماید (Sallam ، ۲۰۰۷ ; Gonzales-Fandos، ۲۰۰۵ ؛ Ojagh و همکاران ، ۲۰۱۰).

pH -۵-۱-۲

بیشتر ماهیان دارای مقادیر اندك کربوهیدرات (کمتر از ۰/۵٪) در بافت ماهیچه‌ای خود هستند به طوریکه بعد از مرگ ماهی مقدار اسید لاکتیك تولید شده در نتیجه واکنش گلیکولیز اندك بوده و pH گوشت ماهیان بعد از مرحله جمود نعشی بالاتر از ۶ خواهد بود. این پدیده از خصوصیات ویژه و مهم مرتبط با گوشت ماهیان می باشد. تجزیه ترکیبات نیتروژنی در طول نگهداری ماهی منجر به افزایش pH گوشت می شود که بخشی از این افزایش ممکن است مرتبط با تولید ترکیبات آلکالین باشد. افزایش pH در اینحالت نشانگر رشد باکتری‌ها، کاهش کیفیت و در نهایت فساد ماهی میباشد (Gram و Huss ،۱۹۹۶). به دلیل اثرات محسوس کاهش pH بر رشد باکتری‌ها، تکنیك اسیدی کردن (کاربرد روش هایی مثل بسته بندی در اتمسفر اصلاح شده با غلظت بالای CO_2 یا افزودن ترکیباتی مثل اسیدهای آلی و نمك آنها که توانایی کاهش pH را داشته باشد) به منظور نگهداری محصولات غذایی از جمله ماهی و غذاهای دریایی استفاده می شود (Sallam ، ۲۰۰۷ ; Özogul، ۲۰۰۴) . تغییرات pH گوشت ماهی قزل آلای رنگین کمان در طول دوره نگهداری (۱۶ روز) در جداول ۴-۲ و ۴-۳ آورده شده است.

میزان pH اولیه فیله های ماهی قزل آلای رنگین کمان در این تحقیق در تمامی تیمارها تقریبا برابر ۰/۰۱±۶/۵۸ بود که با نتایج سایر محققین بر روی میزان pH اولیه گوشت ماهی قزل آلای رنگین کمان تقریبا همخوانی دارد (Chytiri و همکاران ، ۲۰۰۴ ; ذوالفقاری و همکاران ، ۱۳۹۰ ،Cakli و همکاران، ۲۰۰۶ ; Ozogul و همکاران ، ۲۰۰۴ ; Manju و همکاران، ۲۰۰۷)

بین روزهای ۴ تا ۲۰ آزمایشات، میزان pH کلیه تیمارها به آرامی افزایش داشته به طوری که در تمامی تیمارها در روز ۱۶ میزان pH افزایش معنی داری نسبت به روزهای ۰ و ۴ داشته است (P<۰/۰۵) که احتمالاً این افزایش به دلیل تولید ترکیبات فرار مثل آمونیوم توسط باکتری های عامل فساد ماهی می باشد (Sallam ، ۲۰۰۷ ; Kashiri و همکاران، ۲۰۱۱، Abbas و همکاران ، ۲۰۰۸). نتایج تغییرات pH در تیمارهای حاوی مواد نگهدارنده در روزهای مختلف، فاقد اختلاف معنی دار بوده است. در مطالعات انجام شده توسط Faghani و همکاران در سال ۲۰۱۱ تفاوت معنی داری بین pH فیله های ماهی کپور علفخوار *Ctenopharyngodon idella* در معرض غلظتهای مختلف نایسین و استات سدیم مشاهده نشد. همچنین در مطالعات انجام شده توسط Kashiri وهمکاران ،۲۰۱۱ نیز تفاوت معنی داری بین pH فیله های ماهی قره برون *Acipenser persicus* که در معرض غلظتهای مختلف سیترات و لاکتات سدیم قرار گرفته بودند با تیمار شاهد مشاهده نگردید که موید نتایج این تحقیق است. میزان pH در تیمارهایی که بطور توامان از نایسین و استات سدیم استفاده گردید کاهش محسوسی خصوصا در روزهای پایانی نشان داد. علت آنرا می توان به دلیل اثر مثبت استات سدیم بر افزایش عملکرد نایسین در جلوگیری از فعالیت میکروارگانیسمای موثر در فساد دانست (Faghani و همکاران، ۲۰۱۱) .

۳-۱-۵- عدد پراکسید(pv)

اکسیداسیون چربی واکنش پیچیده ای است که در آن اسیدهای چرب غیر اشباع با اکسیژن مولکولی واکنش داده، تولید رادیکال آزاد می کنند. رادیکال پراکسی چربی(ROO^{o}) با مولکول‌های دیگر اسید چرب ترکیب شده و تشکیل هیدروپراکسید و رادیکالهای آزاد دیگر می نماید. با تکرار این واکنش‌ها در نهایت تجمعی از هیدروپراکسیدها به وجود خواهد آمد (Ojagh و همکاران، ۲۰۱۱). ماهیان پرچرب تا حدودی به اکسیداسیون چربی حساسند که این امر موجب ایجاد مشکلات کیفیتی مانند طعم و بوی نامناسب (تند شدگی) و همچنین تغییراتی در بافت ، رنگ و ارزش غذایی حتی در زمانی که در دمای زیر صفر قرار دارد می شود (Losada و همکاران، ۲۰۰۴) اکسیداسیون چربی توسط واکنش‌های متنوع غیر آنزیمی و آنزیمی(آنزیم های باکتریایی، بین سلولی، هضم کننده) کنترل می شود که این واکنش‌ها به طور اساسی به گونه ماهی و دمای نگه داری بستگی دارد (a)Huss) ، ۱۹۹۵). جهت تعیین هیدروپراکسیدها به عنوان محصول اولیه اکسیداسیون چربی در ماهیان از شاخص عدد پراکسید استفاده می شود (Olafsdottir و همکاران، ۱۹۹۷).

تغییرات پراکسید گوشت ماهی قزل آلای رنگین کمان در طول دوره نگهداری (۱۶ روز) در جداول ۴-۴ و ۴-۵ نشان داده شده است.

میزان PV اولیه گوشت فیله های ماهی قزل آلای رنگین کمان در این تحقیق در تیمارهای حاوی فیله ماهی و شکم خالی به ترتیب ۰/۱۹±۱/۸۷ و ۰/۰۷±۱/۹۱ بود که با نتایج سایر محققین بر روی میزانPV اولیه گوشت

ماهی قزل آلای رنگین کمان تقریبا برابر می باشد (Chytiri و همکاران ، ۲۰۰۴ ; ذوالفقاری و همکاران ، ۱۳۹۰ ، Ojagh و همکاران ، ۲۰۱۰)

در این تحقیق مقدار پر اکسید در مراحل اولیه نگهداری کم بود . این مرحله که دوره اکسیداسیون کند نام دارد تحت اثر برخی ترکیبات سلولی است که در بافتهای بیولوژیک همانند عضلات ماهی وجود دارد و به عنوان بازدارنده های اکسیداسیون مراحل آغازی و انتشار با دادن الکترون عمل می کند این ترکیبات عمر محدودی داشته و سرانجام اکسید می شوند ، هنگامی که این مسئله رخ می دهد ، دوره کند اکسیداسیون پایان می یابد و به دنبال این مرحله افزایش سریع پراکسید مشاهده می شود (Hulin، ۱۹۹۴ ; انوری و همکاران، ۱۳۸۸). اما ممکن است دوباره با افزایش زمان ماندگاری مقادیر پراکسید کاهش یابد که در مطالعه حاضر چنین نشد.

طبق نتایج حاصله، میزان پراکسید در تمامی تیمار ها در طول زمان روندی افزایشی داشت یعنی در روز صفر کمترین و در روز ۱۶ بیشترین مقدار را داشت ، همچنین اختلاف معنی دار بین زمانهای مختلف آزمایشات مشاهده شد ($P<۰/۰۵$) نتایج Faghani و همکاران در سال ۲۰۱۱ تفاوت معنی داری بین میزان پراکسید فیله های ماهی کپور علفخوار Ctenopharyngodon idella در معرض غلظتهای مختلف نایسین و استات سدیم در طول ۱۶ روز آزمایشات در تمامی تیمارها نشان داد.

میزان PV فیله ماهیان در کلیه تیمارها در زمان صفر تفاوت معنی داری با هم نداشت ($P > ۰/۰۵$) . مشابه این نتیجه را انوری و همکاران، ۱۳۸۸ در تحقیقی که بر روی پتانسیل آنتی باکتریایی و آنتی اکسیدانی باکتریوسین Z در افزایش زمان ماندگاری فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان O. mykiss بسته بندی شده در خلأ در دمای ۴ ºC، انجام دادند، مشاهده کردند.

از روز ۴ تا ۱۶ آزمایشات همواره تیمار شاهد وکیوم به طور معنی داری بیشترین میزان PV را در مقایسه با سایر تیمارها نشان داد.

همچنین از روز ۴ تا ۱۶ همواره تیمار ترکیبی(استات سدیم و نایسین Z) به طور معنی داری کمترین میزان PV را در مقایسه با سایر تیمارها داشت . بنا بر نظر Shirazinejad و همکاران در سال ۲۰۱۰ علت افزایش کارایی نایسین در زمان استفاده توأم از آن و یک ماده شیمیایی مانند نمکهای اسیدهای آلی این است که نایسین به دلیل اینکه نمی تواند به دیواره سلولی پیچیده باکتریهای گرم منفی نفوذ کند و به محل فعالیت خود یعنی غشاء سیتوپلاسمی برسد در مقابل باکتریهای گرم منفی کارایی ندارد . از آنجایی نمکهای اسیدهای آلی با آنیونهای دو ظرفیتی دیواره سلول باکتری ترکیب می شوند ، فسفولیپیدها و لیپوپروتئینها را آزاد می کند و نفوذپذیری دیواره سلول را افزایش می دهد (Stevens و همکاران ، ۱۹۹۱) . نتایج Shirazinejad و همکاران ، ۲۰۱۰ و Faghani و همکاران ، ۲۰۱۱ نیز موید نتایج این تحقیق و حاکی از اثر مثبت سیترات سدیم بر افزایش کارایی نایسین و کاهش جمعیت باکتریهای لیپولتیک مثل برخی از گونه های سودوموناس و برخی از باکتریهای گرم مثبت و همچنین کاهش واکنشهای آنزیمی باکتریایی مرتبط با اکسیداسیون چربی در ماهیان می باشد .

Sallam در مطالعه خود در سال ۲۰۰۷ گزارش کرد که نمکهای سیترات ، لاکتات و استات سدیم در جلوگیری از رشد و تکثیر بسیاری از میکروارگانیسم های مولد فساد نقش دارند که منجر به تأخیر در اکسیداسیون چربی ها و افزایش زمان نگهداری محصول در زمان نگهداری در دمای یخچال می شوند. حد قابل قبول پیشنهادی برای میزان پراکسید ۱۰ میلی اکی والان پراکسید بر کیلوگرم چربی ماهی می باشد (Huss(a)، ۱۹۹۵ ; Jassour و همکاران، ۲۰۱۱; Ojagh وهمکاران، ۲۰۱۰) . در روز ۱۶ آزمایشات تنها میزان PV تیمار فیله شاهد وکیوم از حد ۱۰ میلی اکی والان اکسیژن در کیلوگرم چربی ماهی گذشت و نمونه شاهد شکم خالی در دامنه استاندارد قار داشت. علت اصلی این روند دستکاری بیش از اندازه به هنگام تهیه فیله می باشد. این نشان می دهد که عمر ماندگاری فیله های بسته بندی شده در خلأ در دمای یخچال کمتر از ۱۶ و برای نمونه ای شکم خالی بیشتر از ۱۶ روز می باشد.

۴-۱-۵- اسید تیوباربیتوریک (TBA)

اکسیداسیون چربی در ماهیان، بدلیل دارا بودن مقادیر بالای اسید چرب چند غیر اشباع پس از مرگ دارای اهمیت فراوان می باشد و از عوامل اساسی نامطلوب شدن طعم و مزه در آنها محسوب می شود (Kashiri و همکاران، ۲۰۱۱) . به منظور ارزیابی درجه اکسیداسیون چربی در ماهیان از شاخص TBA نیز استفاده می شود که میزان محصولات ثانویه اکسیداسیون بویژه آلدهیدها (مالون آلدهید) را نشان می دهد (Nishimoto و همکاران، ۱۹۸۵) محصولات اولیه اکسیداسیون چربی ها هیدروپراکسیدها هستند که ترکیباتی ناپایدارند و البته نقشی در طعم نامطلوب ماهی ندارند . در مرحله دوم اکسیداسیون پراکسیدها به موادی چون آلدهیدها ، کتونها، الکلها، هیدروکربنها، استرها و لاکتونها تبدیل می شوند. افزایش مقدار TBA طی نگهداری در دمای یخچال همچنین ممکن است ناشی از دهیدروژن شدن جزئی بافت ماهی و افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع باشد (محمدزاده و رضایی، ۱۳۹۰). سنجش مقدار TBA بر اساس واکنش بین تیوباربیتوریک اسید و آلدهیها می باشد، که منجر به تشکیل آلکالانهای رنگی شده که جذبشان توسط اسپکتروفتومتر می تواند مورد سنجش قرار گیرد.. بدلیل واکنش مالون آلدهید با ترکیبات بدن ماهی مثل آمین ها، نوکلئوتیدها، اسیدهای نوکلئیک، پروتئین ها، فسفولیپید ها و دیگر آلدهید هایی که از محصولات نهایی اکسیداسیون هستند، شاخص TBA ممکن است بیان کننده درجه واقعی اکسیداسیون نباشد و با تغییر گونه ماهی این واکنش ها تا حد زیادی تغییر می کند(Auburg، ۱۹۹۳).

تغییرات TBA گوشت ماهی قزل آلای رنگین کمان در طول دوره نگهداری (۱۶ روز) در جداول ۴-۶ و ۴-۷ نشان داده شده است.

میزان TBA اولیه گوشت فیله های ماهی قزل آلای رنگین کمان در این تحقیق در تیمارهای دارای فیله و شکم خالی به ترتیب ۰/۰۰۳±۰/۰۳۵ و ۰/۰۰۸±۰/۰۲۳ بوده که با نتایج سایر محققین بر روی میزانTBA اولیه گوشت

ماهی قزل آلای رنگین کمان(فیله) تقریبا برابر می باشد (Jasour و همکاران،۲۰۱۱ ; Chytiri و همکاران ، ۲۰۰۴ ; ذوالفقاری و همکاران ، ۱۳۹۰ ; Ojagh و همکاران ، ۲۰۱۰)

طبق نتایج حاصله، میزان TBA در تمامی تیمار ها در طول زمان روندی افزایشی داشت یعنی در روز صفر کمترین و در روز ۱۶ بیشترین مقدار را داشت ، همچنین اختلاف معنی دار بین زمانهای مختلف آزمایشات مشاهده شد (P<۰/۰۵) نتایج Sallam و همکاران در سال ۲۰۰۷ تفاوت معنی داری بین میزان TBA فیله های ماهی آزاد در معرض غلظتهای مختلف سیترات سدیم، لاکتات سدیم و استات سدیم در طول ۱۶روز آزمایشات در تمامی تیمارها نشان داد. همچنین نتایج Manju و همکاران در سال ۲۰۰۷ و Jasour و همکاران،۲۰۱۱ نیز کاملا موید روند افزایشی TBA در طول دوره نگهداری ماهی در دمای یخچال است.

در تحقیق حاضر میزان TBA در تیمارهای حاوی فیله و ماهی شکم خالی در کلیه تیمارها در زمان صفر تفاوت معنی داری با هم نداشت . مشابه این نتیجه را صفری و همکاران، ۱۳۹۰ در تحقیقی که با عنوان تاثیر نایسین A و بنزوات سدیم بر رفتار لیستریامونوستیوژنز و برخی از پارامترهای میکروبی و شیمیایی در فیله ماهی فیتوفاگ (Hypophtalmichtysmolitrix) نگهداری شده در دمای 4 درجه سلسیوس انجام دادند مشاهده کردند.

از روز ۴ تا ۱۶ آزمایشات همواره تیمار شاهد به طور معنی داری بیشترین میزان TBA را در مقایسه با سایر تیمارها نشان داده و کمترین تغییرات نیز مربوط به تیمار ترکیبی حاوی نایسین Z و استات سدیم بوده است .

Shirazinejad و همکاران در سال ۲۰۱۰ و Cabo و همکاران در سال ۲۰۰۵ در نتایج حاصل از تحقیقات خود گزارش کردند که باکتریهای گرم منفی عامل اصلی ایجاد فساد در گوشت ماهی هستند، اما نایسین به دلیل اینکه نمی تواند به دیواره سلولی پیچیده باکتریهای گرم منفی نفوذ کند و به محل فعالیت خود یعنی غشاء سیتوپلاسمی برسد در مقابل باکتریهای گرم منفی کارایی ندارد . از اینرو استفاده از یک ماده شیمیایی که بتواند نفوذپذیری غشاء سلولی را افزایش دهد و انتشار نایسین را به داخل دیواره سلولی باکتریهای گرم منفی را افزایش دهد ضروری به نظر می رسد . از آنجایی که استات سدیم دارای این خاصیت است در نتیجه تیمارهای توأم نایسین و استات سدیم به طور معنی داری میزان TBA کمتری را نسبت به هریک از این تیمارها به تنهایی نشان دادند. نتایج Shirazinejad و همکاران ، ۲۰۱۰ و Faghani و همکاران ، ۲۰۱۱ و Cabo و همکاران در سال ۲۰۰۵ نیز موید نتایج این تحقیق و حاکی از اثر مثبت نمک اسیدهای آلی مانند استات سدیم بر افزایش کارایی نایسین و همچنین کاهش واکنشهای آنزیمی باکتریایی مرتبط با اکسیداسیون چربی در ماهیان می باشد .

کمترین تغییرات در روزهای پایانی نیز مربوط به تیمار حاوی نمک آلی (استات سدیم) و نمونه ترکیبی آن با نایسین بوده است. این نتایج مطابق نتایج Kashiri و همکاران در سال ۲۰۱۱ و حق پرست و همکاران در سال ۱۳۸۷ بود که نشان دادند سیترات ، لاکتات و استات سدیم در جلوگیری از رشد و تکثیر بسیاری از میکروارگانیسم های مولد فساد نقش داشته و در نتیجه منجر به تأخیر در اکسیداسیون چربی ها و افزایش زمان نگهداری محصول در زمان نگهداری در دمای یخچال می شوند. مکانیسم عمل این گروه از متابولیتها، مختل

نمودن فعالیت سلول و اجزای درون سلولی میباشد . اثرات مختلف این نمک اسید های آلی می تواند به نوع و غلظت مصرف آنها ، گستره رشد میکروبی ، نوع بسته بندی و مدت زمان نگهداری مرتبط باشد(Sallam ، ۲۰۰۶). به هر حال استفاده از نمک سدیم اسیدهای آلی باعث کاهش میزان تولید TBA در داخل فیله ماهی می شود که نشان از تأثیر مثبت این نمکها بر کاهش سرعت اکسیداسیون در طول نگهداری در دمای یخچال دارد (Kashiri و همکاران، ۲۰۱۱).

بیشترین حد پیشنهادی[۱۷] (MRL) برای میزان TBA ۲ میلی گرم مالون آلدهید بر کیلوگرم چربی ماهی می باشد (Lakshmanan، ۲۰۰۰ ; Connell و همکاران، ۱۹۹۰ ; Rezaee و Hosseini ، ۲۰۰۷ ; Ojagh وهمکاران، ۲۰۱۰) . در روز ۱۲ آزمایشات میزان TBA در هیچ یک از تیمارهای آزمایشی از حد ۲ میلی گرم مالون آلدهید بر کیلوگرم چربی ماهی نگذشت. این نشان می دهد که عمر ماندگاری فیله ها در همه تیمارها حتی تیمار شاهد در دمای یخچال از نظر شاخص TBA بیشتر از ۱۲ روز بوده و این میزان در روز ۱۶ برای نمونه شاهد در فیله ماهی به ۲/۲۵ و برای شاهد شکم خالی به ۲/۱۱ رسیده و از دامنه استاندارد خارج میگردد.

۵-۱-۵- مجموع بازهای نیتروژنی فرار(TVN)

TVN شاخص مناسبی برای ارزیابی تازگی ماهی می باشد . مقدار TVV به دلیل فعالیت باکتریهای عامل فساد و آنزیمهای داخلی افزایش می یابد (Ruiz-Capillas و Moral، ۲۰۰۵ ; Ozogul و همکاران ، ۲۰۰۴) این شاخص دامنه ی وسیعی از ترکیبات فر ار بازی همانند متیل آمین، دی متیل آمین، تری متیل آمین و آمونیاک را در بر می گیرد که باعث ایجاد طعم نامناسب در ماهی می شوند(Goulas و Kontominas ، ۲۰۰۷) .

تغییرات TVN گوشت ماهی قزل آلای رنگین کمان در طول دوره نگهداری (۱۶ روز) در جداول ۴-۸ و ۴-۹ نشان داده شده است.

میزان TVN اولیه گوشت فیله های ماهی قزل آلای رنگین کمان در این تحقیق در تیمارهای حاوی فیله ۱۰/۱۱±۰/۹۱ و برای تیمارهای حاوی شکم خالی ۱۰/۲۱±۰/۵ بوده با نتایج سایر محققین بر روی میزان TVNاولیه گوشت ماهی قزل آلای رنگین کمان (فیله) نزدیک می باشد (Jasour و همکاران،۲۰۱۱ ; Chytiri و همکاران ، ۲۰۰۴ ; ; Rezaee و Hosseini ، ۲۰۰۷; Ojagh و همکاران ، ۲۰۱۰). میزان TVN گوشت ماهی بین گونه های مختلف متفاوت است ولی تفاوت در میزان TVN در یک گونه خاص ماهی می تواند به دلیل محتوای نیتروژن غیر پروتئینی گوشت ماهی(که خود متأثراز تغذیه ماهی می باشد) ، فصل صید، اندازه ماهی، جنس و سایر عوامل محیطی دیگر باشد (Ozogul و همکاران ، ۲۰۰۴ ; Goulas و Kontominas ، ۲۰۰۷).

طبق نتایج حاصله، میزان TVN در تمامی تیمار ها در طول زمان روندی افزایشی داشت یعنی در روز صفر کمترین و در روز ۱۶ بیشترین مقدار را داشت ، همچنین اختلاف معنی دار بین زمانهای مختلف آزمایشات

[17] . Maximal recommended limit

مشاهده شد (P<۰/۰۵) از آنجاکه TVN به طور عمده در اثر تجزیه باکتریایی گوشت ماهی ایجاد می شود، افزایش بار باکتریایی در طول دوره دلیلی بر افزایش TVN خواهد بود. علاوه بر این، افزایش این شاخص حین نگهداری در دمای یخچال احتمالاً در نتیجه دآمیلاسیون اسیدهای آمینه نیز می تواند باشد (Pacheco-Aquilar و همکاران، ۲۰۰۰) . نتایج سایر محققان از جمله Goulas وKontominas در سال ۲۰۰۷ و Rezaee و Hosseini در سال ۲۰۰۷ نیز نشان دهنده افزایش شاخص TVN در طول دوره نگهداری ماهی در دمای یخچال می باشد.

در تحقیق حاضر میزان TVN در تیمارهای حاوی فیله و ماهی شکم خالی در کلیه تیمارها در زمان صفر تفاوت معنی داری با هم نداشت . از روز ۴ تا ۱۶ آزمایشات همواره تیمار شاهد به طور معنی داری بیشترین میزان TVN را در مقایسه با سایر تیمارها نشان داد. نتایج مطالعات Goulas وKontominas در سال ۲۰۰۷ در فیله ماهی سیم دریایی (Sparus aurata) نشان داد که استفاده از نمک های آلی بهمراه اسانس پونه همچنین بسته بندی در شرایط اتمسفر اصلاح شده باعث افزایش زمان ماندگاری میشود.

همچنین از روز ۴ تا ۱۶ همواره تیمارهای ترکیبی دارای بیشترین اثر بر میزان TVN بوده و روند آنرا کند کرده اند. نتایج مطالعات Faghani و همکاران در سال ۲۰۱۱ مبنی بر اثر نایسین و استات سدیم بر برخی از خواص میکروبی و شیمیایی ماهی آمور در تلقیح با باکتری لیستریا مونوسیتوژنز نشان داد که خاصیت ضد میکروبی نایسین با افزایش غلظت استات سدیم افزایش می یابد و مقدار عدد پراکسید ،TBA و TVN کمتری در تیمارهایی که از هر دو ماده استفاده شده بود مشاهده گردید. در تحقیق دیگری Cabo و همکاران در سال ۲۰۰۵ از نایسین و برخی از مواد شیمیایی که نفوذپذیری غشاء سلول را افزایش می دهد جهت نگهداری نوعی ماهی کاد (*Micromesistius poutassou*) در بسته بندی با اتمسفر حاوی CO2 در دمای یخچال استفاده کردند. هدف از این تحقیق این بوده که موادی که نفوذپذیزی غشاء سلول باکتری را افزایش داده و انتشار بسیاری از مواد ضد باکتریایی مانند نایسین را افزایش می دهند به منظور افزایش عملکرد شان در ترکیب با نایسین در مقابل باکتریهای گرم منفی مورد استفاده قرا گیرند . با اندازه گیری میزان عملکرد همزمان این مواد با نایسین بهترین نتیجه در سدیم هگزامتافسفاتSMP[۱۸] و EDTA بدست آمد . نتایج نشان داد که دی اکسید کربن می تواند تعداد کل باکتریها و میزان TVN را کاهش دهد. با آنکه حضور همزمان CO2 با نایسین و SMP تاثیر مثبت داشت اما هیچگونه اثر مثبتی از همکاری نایسین و SMP مشاهده نشد . این طور نتیجه گیری شد که CO2 به آسانی با SMP واکنش می دهد و باعث بهبود عملکرد بسته بندی با مخلوط گازی حاوی CO2 می باشد.

در روزهای پایانی نگهداری، روند تغییرات TVN در تیمارهای ترکیبی (هم در فیله و هم در نمونه شکم خالی) کندتر از سایر تیمارها بوده است. این نتایج با مطالعات انجام شده توسط Sallam و همکاران در سال ۲۰۰۶ و Kashiri وهمکاران ، ۲۰۱۰ مطابقت داشته که نشان دادند سیترات ، لاکتات و استات سدیم در جلوگیری از رشد و تکثیر بسیاری از میکروارگانیسم های مولد فساد نقش موثری دارند.

[18] .Sodium hexa metaphosphate

Shirazinejad و همکاران در سال ۲۰۱۰ و De Vuyst و Vandamme در سال ۱۹۹۵بیان کردند که نایسین فعالیت دیواره سلولی باکتریها را از طریق تشکیل حفرات و اثر بر روی اجزاء زنجیره انتقال الکترونی مختل می کند . به علاوه نتیجه اثر نایسین در یک محیط غذایی به عوامل مختلفی از جمله ماهیت ماده غذایی، سایر مکانیسمها یی که جهت نگهداری ماده غذایی استفاده می شود، مانند حرارت دادن، خشک کردن، اتمسفر اصلاح شده، نگهداری در دمای پایین بستگی دارد. همچنین انحلال نایسین در pH های کمتر افزایش می یابد و عبور مولکولهای نایسین را از دیواره سلولی تسهیل می کند. باکتریهای پروتئولیتیک سبب افزایش تولید ترکیبات فرار بازی می شوند. نایسین به دلیل خاصیت ضد باکتریایی خود بر روی این گروه از باکتریها تاثیر گذاشته و باعث کاهش ظرفیت باکتریها برای دی آمینیشن اکسیداتیو ترکیبات نیتروژن غیر پروتئینی (NPN) می شود (Ojagh و همکاران، ۲۰۱۰ ; Ruiz-Capillas و Moral ، ۲۰۰۵) در مطالعه کنونی، پایین تر بودن میزان TVN در تیمارهای آغشته به باکتریوسین نسبت به تیمارهای شاهد، این مطلب را تایید می کند. این موضوع می تواند بیانگر علت کاهش میزان TVB-N در تیمار های نایسین ریز پوشانی شده و ریز پوشانی نشده باشد.

Mirdamadi و همکاران در سال ۲۰۱۰در تحقیقی اثر ممانعتی نایسین ریزپوشانی شده ، نایسین آزاد را در مقابل باکتریهای استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیتوژنز و اشرشیا کلی در پنیر و در محیط کشت مورد بررسی قرار دادند. نتایج این تحقیق بیان کننده آن بود ریزپوشانی کردن منجر به محافظت نایسین در مقابل چربی پنیر و آنزیم پروتئاز شد. بنابراین به این نتیجه رسیدند که استفاده از نایسین ریزپوشانی کارایی بیشتری از نایسین آزاد دارد. این مطالعه نشان داد که ریزپوشانی کردن نایسین با لیپوزوم می تواند مقاومت و کارایی نایسین را در پنیر افزایش دهد . این تحقیق نشان داد مقادیر کمتری از نایسین ریزپوشانی در مقایسه با نایسین آزاد لازم است تا باکتریهای بیماریزا را از بین ببرد. به علاوه ریزپوشانی کردن نایسین را در مقابل چربی پروتاز مو.جود در پنیر محافظت کرد . در نتیجه استفاده از نایسین ریزپوشانی نتایج بهتری از نایسین آزاد داشت.

بنابر نظر اتحادیه اروپا میزان TVN ، بسته به گونه های مختلف، ۲۵ ،۳۰ و ۳۵ میلی گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم گوشت ماهی می باشد (EEC ، ۱۹۹۵). بررسی های پروانه در سال ۱۳۷۷ با استفاده ار روش پیرسون روی کیفیت ماهی و مقدار تولید TVN در دمای زیر صفر نشان داد که اگر مقدار TVN کمتر از ۱۰ میلی گرم در ۱۰۰ گرم نمونه باشد می توان آنرا تازه دانست و در صورتی که بیشتر از ۳۰ میلی گرم در ۱۰۰ گرم بود ماهی غیر قابل مصرف خواهد بود. Ojagh وهمکاران، ۲۰۱۰ و Goulas وKontominas در سال ۲۰۰۷ نیز حد ۳۰ میلی گرم نیتروژن را در ۱۰۰ گرم گوشت ماهی را به عنوان حد قابل قبول برای میزان TVN انتخاب کردند.

در روز ۱۲ آزمایشات میزان TVN در هیچ یک از تیمارهای آزمایشی از حد ۳۰ میلی گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم گوشت ماهی نگذشت. این نشان می دهد که عمر ماندگاری فیله ها در همه تیمارها حتی تیمار شاهد در دمای یخچال از نظر شاخص TVN بیشتر از ۱۲ روز می باشد ولی در روز ۱۶ میزان TVN در نمونه شاهد (فیله) به

۳۰/۱۷ رسیده که از دامنه استاندارد خارج می باشد. میزان TVN در روز ۱۶ در نمونه حاوی ماهی شکم خالی در تیمار شاهد به ۲۸/۱ رسیده که کماکان در دامنه استاندارد قرار داشت.

۲-۵- ارزیابی میکروبی

فساد در ماهیان تازه بخشی به دلیل فعالیت و رشد ارگانیزم های ویژه عامل فساد (SSOs[19]) بوده که با تولید متابولیت های مختلف باعث ایجاد طعم و بوی نامطبوع در ماهی میشوند (Gram و Huss، ۱۹۹۶؛ Dalgaard و Gram، ۲۰۰۲). در مطالعات انجام شده توسط Gram و Dalgaard(۲۰۰۲) مشخص شد که میکروارگانیزم های عامل فساد مواد غذایی در موارد مشابه نیز یکسان نبودند و فلور میکروبی جداسازی شده از غذاهای دریایی از یک مطالعه به مطالعه متفاوت بوده به طوریکه نوع و میزان میکروبها در هر مطالعه بسته به گونه ماهی و محیط زندگی آنها، وضعیت اقلیمی، نحوه صید، نوع محصول فرآوری شده(فیله، ماهی کامل شکم پر، ماهی شکم خالی و ...)، دما و نحوه نگه داری متفاوت خواهد بود. سطوح SSO رابطه مستقیمی با زمان ماندگاری ماهی تازه دارد (Sallam، ۲۰۰۷).

۱-۲-۵- شمارش کلی باکتریها (TVC)

تغییرات TVC گوشت ماهی قزل آلای رنگین کمان در طول دوره نگهداری (۱۶ روز) در جداول ۴-۱۰ و ۴-۱۱ نشان داده شده است. میزان TVC اولیه گوشت فیله های ماهی قزل آلای رنگین کمان در این تحقیق در تیمارهای حاوی فیله و ماهی شکم خالی به ترتیب ۳/۴۳±۰/۵۳ و ۳/۴۳±۰/۳۱ بوده که نشان دهنده کیفیت مطلوب ماهی می باشد. با توجه به این اصل که بار میکروبی اولیه ماهیان آب شیرین بسته به دما و وضعیت آب تغییر می کند محققین محدوده بین ۲ تا ۶ log cfu/g را برای شمارش کل باکتری های اولیه در گونه های مختلف آب شیرین (تیلاپیا، باس راه راه، قزل آلای رنگین کمان و سوف نقره ای پیشنهاد داده اند (Gelman و همکاران، ۲۰۰۱ ; Chytiri و همکاران ، ۲۰۰۴ ; ; Rezaei و Hosseini ، ۲۰۰۷) ذوالفقاری و همکاران در سال ۱۳۹۰ در تحقیقی روند تغییرات میکروبی، شیمیایی و حسی فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان را طی نگهداری در دمای یخچال بررسی کردند . آنها در تحقیقات خود لوگ اولیه باکتریها را ۳ گزارش کردند که با مطالعه حاضر نیز همخوانی دارد. همچنین Chytiri و همکاران در سال ۲۰۰۴ روند تغییرات میکروبی، شیمیایی و حسی ماهی قزل آلای رنگین کمان را در زیر یخ به دو شکل فیله و شکم خالی شده با یکدیگر مقایسه کردند . آنها در مطالعه خود میزان TVC اولیه نمونه های فیله و شکم خالی را ۳/۸ log cfu/g محاسبه کردند که با مطالعه حاضر مطابقت دارد.

طبق نتایج حاصله، میزان TVC در تمامی تیمار ها در طول زمان روندی افزایشی داشت یعنی در روز صفر کمترین و در روز ۱۶ بیشترین مقدار را داشت ، همچنین اختلاف معنی دار بین زمانهای مختلف آزمایشات

[19] . Specific spoilage organism

مشاهده شد (P<۰/۰۵) نتایج سایر محققان از جمله Ojagh و همکاران، ۲۰۱۰ و Rezaee و Hosseini در سال ۲۰۰۸ نیز نشان دهنده افزایش شاخص TVC در طول دوره نگهداری ماهی در دمای یخچال بود.

در تحقیق حاضر میزان TVC فیله ماهیان در کلیه تیمارها در زمان صفر تفاوت معنی داری با هم نداشت (P > ۰/۰۵) . از روز ۴ تا ۱۶ آزمایشات همواره تیمار شاهد (فیله و شکم خالی) به طور معنی داری بیشترین میزان TVC را در مقایسه با سایر تیمارها نشان داد. همچنین از روز ۴ تا ۱۶ همواره تیمار ترکیبی حاوی استات سدیم و نایسین Z دارای بیشترین تاثیر مهار کننده بر جمعیت TVC بوده است (فیله و شکم خالی). Faghani و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثر نایسین و استات سدیم را بر روی خواص میکروبی و شیمیایی ماهی آمور در تلقیح با باکتری لیستریا مونوسیتوژنز بررسی کردند . در این تحقیق فیله های ماهی آمور با دو غلظت (۱و ۳ ٪) استات سدیم و (۰/۱ و ۰/۲ ٪ نایسین) در قالب تیمارهای مختلف مورد برسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که خاصیت ضد میکروبی این دو ماده با افزایش غلظت استات سدیم افزایش یافته و بیشترین کاهش در میزان TVC در تیمارهای استفاده توأم نایسین و استات سدیم مشاهده شد که علت آن را تاثیر نمک اسیدهای آلی در افزایش کارایی نایسین در کاهش جمعیت باکتریایی دانستند. نتایج مطالعه فوق با نتایج تحقیق حاضر که حاکی از تاثیر بیشتر استفاده ترکیبی از نگهدارنده ها می باشد دارد.

در آخرین روز نگهداری، تیمار ترکیبی بهترین نتیجه (چه در تیمار حاوی فیله و چه در تیمار دارای ماهی شکم خالی) را نشان داد. نتایج مطالعات حق پرست و همکاران در سال ۱۳۸۷ که تغییرات کیفی فیله ماهی قزل آلا رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) را پس از غوطه وری در محلولهای نمکی سدیم طی نگهداری در یخچال (۴ ° C) مورد بررسی داد تائید کننده این نتایج می باشد. نمکهای آلی سیترات ، لاکتات و استات سدیم دارای پتانسیل ضدمیکروبی بسیار بالایی بر میکروارگانیسم های مولد فساد می باشند. همچنین در آزمایشات زیادی مشخص شده که نمکهای اسیدهای آلی مانند استات سدیم باعث کاهش در جمعیت میکروبی و افزایش زمان ماندگاری در ماهیان در نگهداری در یخچال می شود. تفاوت در میزان تأثیر نمکهای اسیدهای آلی بر رشد میکروبی محصولات شیلاتی ممکن است به دلایل مختلفی مانند غلظت نمک اسید آلی ، زمان غوطه وری ، گونه ماهی ، نوع محصول فرآوری شده ،میزان آلودگی اولیه میکروبی ودمای نگهداری باشد Zhuang et al., (1996 و Boskou & Debevere 2000) .

Lungu و Johnson در نتایج خود بیان کردند که تیمارهایی که به صورت توأم از نایسین و نمک اسیدهای آلی استفاده شد نتیجه بهتری در کاهش جمعیت باکتری لیستریا مونوسیتوژنز داشتند .

بیشترین حد پیشنهاد شده برای TVC در فیله ماهیان log CFU/g ۷ است (ICMSF، ۱۹۸۶ ; Sallam ، ۲۰۰۷). Savvaidis و همکاران (۲۰۰۴) در مطالعه بر روی قزل الای رنگین تحت خلاء پس از ۸ روز نگه داری در یخچال و Chytiri و همکاران (۲۰۰۴) در مطالعه بر روی فیله قزل آلای رنگین کمان در شرایط هوازی پس از ۶ روز نگه داری در یخ و Arashisar و همکاران (۲۰۰۴) در مطالعه بر روی قزل آلای رنگین کمان تحت خلاء پس از ۸

روز نگه داری در c ° ۱±۴ به بیشترین حد پیشنهاد شده برای TVC رسیدند. همچنین Ojagh و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه ای که بر روی فیله های ماهی قزل آلای رنگین کمان در زمان نگهداری یخچال داشتند مشاهده کردند که تیمار کنترل در روز ۱۲ به میزان TVC برابر ۷/۸۸ log CFU/g رسید و عمر نگهداری تیمار کنترل را در دمای ۱±۴ °C ، ۹ تا ۱۰ روز تخمین زدند. آلودگی میکروبی ابتدایی، وضعیت نگهداری و بسته بندی (بسته بندی در هوا، خلاء یا اتمسفر اصلاح شده) و دمای نگهداری نقش مهمی را در تعیین زمان ماندگاری محصولات شیلاتی ایفا می کنند (Ojagh و همکاران ، ۲۰۱۰)

در روز ۱۶ آزمایشات میزان TVC در تیمار شاهد(هم فیله و هم شکم خالی) از حد logCFU/g ۷ گذشت. این نشان می دهد که عمر ماندگاری فیله ها در تیمار شاهد در دمای یخچال از نظر شاخص TVC برابر ۱۶ روز می باشد. سایر تیمارها که دارای مواد نگهدارنده بصورت منفرد و ترکیبی می باشند دارای عمر ماندگاری بیشتر از ۱۶ روز می باشند.

۲-۲-۵- باکتری های سرمادوست(PTC)

باکتری های سرمادوست گرم منفی، گروه اصلی میکروارگانیزم های مسئول فساد ماهی تازه نگهداری شده در دمای یخچال هستند(Gram و همکاران، ۱۹۸۷؛ Gram و Huss، ۱۹۹۶). تغییرات PTC گوشت ماهی قزل آلای رنگین کمان در طول دوره نگهداری (۱۶ روز) در جداول ۴-۱۲ و ۴-۱۳ نشان داده شده است. میزان PTC اولیه گوشت فیله های ماهی قزل آلای رنگین کمان در این تحقیق در تیمارهای دارای فیله و شکم خالی به ترتیب ۰/۵۶±۳/۱۱ و ۰/۱۲±۳/۲۳ بوده که نشانه تازگی ماهی باشد. در تحقیق اجاق و همکاران در سال ۲۰۱۰ بر روی فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان در دمای یخچال، میزان PTC اولیه برابر با logCFU/g ۳/۸۵ بود که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. Sallam و همکاران نیز میزان PTC اولیه فیله ماهی آزاد اقیانوس آرام در دمای یخچال را در تیمار شاهد برابر ۴/۲۴ و در تیمار استات سدیم برابر ۳/۵۹ گزارش کردند که این نتیجه با نتایج تحقیق حاضر مغایرت دارد زیرا در این تحقیق در روز صفر آزمایشات تفاوت معنی داری بین تیمارهای آزمایشی و تیمار شاهد مشاهده نشد. سایر محققین از جمله Hozbor و همکاران (۲۰۰۶) و انوری و همکاران (۱۳۸۸) در شمارش باکتریهای سرمادوست در روز اولیه آزمایشات بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی داری مشاهده نکردند.

الگوی افزایش مقادیر PTC مشابه با الگوی تغییرات TVC بوده و در برخی موارد میزان PTC مقادیر بالاتری از TVC داشت اما در تحقیق حاضر این روند به طور معنی داری مشهود نبود. طبق نتایج حاصله، میزان PTC در تمامی تیمار ها در طول زمان روندی افزایشی داشت یعنی در روز صفر کمترین و در روز ۱۶ بیشترین مقدار را داشت ، همچنین اختلاف معنی دار بین زمانهای مختلف آزمایشات مشاهده شد (P<۰/۰۵) که با نتایج بدست آمده توسط Hozbor و همکاران (۲۰۰۶) و Sallam (۲۰۰۷) در مطالعه بر روی ماهی آزاد اقیانوس آرام و Rezaee و Hosseini در سال ۲۰۰۸ مطابقت داشت.

از روز ۴ تا ۱۶ آزمایشات، همواره تیمار شاهد به طور معنی داری بیشترین میزان PTC را در مقایسه با سایر تیمارها نشان داد. کمترین تغییرات مربوط به تیمارهای ترکیبی بوده و تیمارهای حاوی مواد نگهدارنده بصورت منفرد ما بین آنها قرار داشتند. جمعیت باکتریهای سرماگرا در تیمارهای حاوی فیله بیشتر از ماهی شکم خالی بوده است. Shirazinejad و همکاران در سال ۲۰۱۰ اثر توأم اسید لاکتیک و نایسین را بر روی کاهش فلور میکروبی طبیعی میگو در دمای یخچال بررسی کردند . میزان PTC در روز ۱ در تیمار (نایسین + اسید لاکتیک۲٪) صفر بود در حالی که این میزان در تیمار شاهد ۳/۶۴ logCFU/g بود. که این نتایج با نتایج تحقیق حاضر مغایرت دارد زیرا در این تحقیق میزان PTC اولیه در کلیه تیمارها تقریبا برابر بود و تیمارها با یکدیگر اختلاف معنی داری نداشتند ($P < ۰/۰۵$). در روز ۱۴ تیمار (نایسین +اسید لاکتیک۲٪) و تیمار شاهد به ترتیب PTC برابر۶/۵۹ و ۸/۹۸ logCFU/g داشتند. بنابر نتایج Shirazinejad و همکاران نایسین به تنهایی کمترین اثر را بر روی باکتریهای سرمادوست گرم منفی داشت. همچنین تأثیر بهتر استفاده همزمان از نایسین و اسید لاکتیک نسب به نایسین به تنهایی را به دلیل کمک اسید لاکتیک به تجزیه دیواره سلولی باکتری های گرم منفی و در نتیجه افزایش نفوذ نایسین به داخل باکتریهای گرم منفی دانستند. در تحقیق Shirazinejad و همکاران (۲۰۱۰) جمعیت باکتریهای سرمادوست به نسبت باکتریهای کل در برخی تیمارها تا حدودی بیشتر بود که علت آنرا نگهداری در دمای یخچال دانستند زیرا نگهداری در دمای یخچال رشد باکتریهای مزوفیل ، که جمعیت زیادی از میکروفلور داخلی بدن ماهی را تشکیل می دهند ، کاهش می دهد و به باکتریهای سرمادوست این اجازه را می دهد که در طول دوره نگهداری در یخچال رشد کرده و میکروارگانیسم غالب باشند . میزان تاثیر نایسین بر رشد میکروبی در محصولات فرآوری شده ماهی احتمالاً به فاکتورهای متعددی مثل غلظت نایسین مورد استفاده، روش استفاده از نایسین، گونه ماهی، نوع محصول، درجه آلودگی میکروبی و وضعیت نگهداری بستگی دارد (Shirazinejad و همکاران، ۲۰۱۰).

در آخرین نگهداری (روز ۱۶)، تیمار ترکیبی بیشترین تاثیر مهارکننده را نشان داد. Sallam در سال ۲۰۰۷ کیفیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی فیله ماهی آزاد را در محلول (۲/۵ ٪ w/v) استات سدیم، لاکتات سدیم و سیترات سدیم در دمای ۱ درجه بررسی کرد. تمامی تیمارهای این آزمایش به طور معنی داری رشد باکتریهای سرمادوست را کاهش دادند اما با وجود اختلاف زیاد بین تیمارها تفاوت معنی دار نبود. بر عکس این نتایج را Nykanen و همکاران ۱۹۹۸ گزارش کردند که تیمار ۲ درصد لاکتات سدیم اثری بر جمعیت باکتریهای سرمادوست قزل آلا رنگین کمان نداشته است.

بیشترین حد پیشنهاد شده برای PTC نیز در فیله ماهیان log CFU/g ۷ است (ICMSF، ۱۹۸۶ ; Sallam ، ۲۰۰۷ ;و Rezaee و Hosseini ، ۲۰۰۸). در مطالعه Gimmenze و همکارانش(۲۰۰۲)، میزان PTC در فیله های ماهی قزل آلای رنگین کمان پرورشی در سه تیمار بسته بندی شده در فویل آلومینیومی، خلاء و اتمسفر اصلاح شده به ترتیب بعد از ۶، ۱۰، ۱۴ روز نگهداری در یخ به لوگ ۷ رسید. همچنین در تحقیق دیگری ، انوری و همکاران

(۱۳۸۷) پتانسیل آنتی باکتریایی و آنتی اکسیدانی باکتریوسین Z (۰/۲٪) را در افزایش زمان ماندگاری فیله ماهی قزل آلای (Oncorhynchus mykiss) بسته بندی شده در خلأ در مدت ۱۶ روز نگهداری در دمای ۴ درجه بررسی کردند. در نتایج حاصل از این تحقیق آمده است که میزان PTC تیمار شاهد بعد از ۱۶ روز از ۳/۶۷ به ۶/۸۲ logCFU/g و در تیمار نایسین از ۳/۳۵ در انتهای دوره به ۴/۸۳ logCFU/g رسید که به طور معنی داری کمتر از تیمارشاهد بود (P<۰/۰۵). این کاهش معنی دار را می توان به اثر بازدارندگی باکتریوسین بر فساد باکتریایی مرتبط دانست. طبق آنالیزهای میکروبی عمر ماندگاری نمونه شاهد ۱۶ روز بود در حالی که نمونه های حاوی باکتریوسین تا انتهای دوره نگهداری دچار فساد باکتریایی نشدند بنابر این تخمین عمر ماندگاری در این تیمار مستلزم نگهداری ماهی بیش از ۱۶ روز در دمای ۴ می باشد. نتایج مشابهی توسط Gimenz و همکاران (بر روی ماهی قزل آلا بسته بندی شده در خلأ گزارش شده است. در مطالعه حاضر در روز ۱۶ آزمایشات میزان PTC در تیمار شاهد در نمونه دارای فیله از حد logCFU/g ۷ گذشت. این نشان می دهد که عمر ماندگاری فیله ها در تیمار شاهد در دمای یخچال از نظر شاخص PTC برابر ۱۶ روز می باشد. در تیمارهای دارای ماهی شکم خالی ، میزان PTC در روز ۱۶ در دامنه استاندارد قرار داشته و ماهی قابل نگهداری میباشد. در سایر تیمارها نیز میزان PTC در دامنه استاندارد قرار داشته است.

۳-۲-۵- باکتری های اسید لاکتیک(LAB)

تغییرات LAB گوشت ماهی قزل آلای رنگین کمان در طول دوره نگهداری (۱۶ روز) در جداول ۴-۱۴ و ۴-۱۵ نشان داده شده است. میزان LAB اولیه گوشت فیله های ماهی قزل آلای رنگین کمان در این تحقیق در تیمارهای دارای فیله و شکم خالی به ترتیب ۲/۷۶±۰/۲۸ و ۲/۶۵±۰/۴۶ بوده و تیمارها با هم از نظر میزان LAB اولیه اختلاف معنی داری نداشتند (P<۰/۰۵) که این امر می تواند نشانه تازگی ماهی باشد . در تحقیق Sallam در سال ۲۰۰۷ بر روی کیفیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی استات سدیم، لاکتات سدیم و سیترات سدیم بر فیله ماهی آزاد تعداد باکتریهای LAB شمارش شده از سایر انواع باکتریها کمتر بود . در این مطالعه LAB اولیه در محدوده ۲/۳۳ logCFU/g در تیمار سیترات سدیم تا ۲/۶۲ logCFU/g در تیمار شاهد گزارش شد . میزان LAB نهایی تیمار شاهد بعد از ۱۵ روز نگهداری ۵/۲۳ logCFU/g بود و با تیمار استات و لاکتات سدیم اختلاف معنی داری نداشتند اما اختلاف معنی دار در تیمار سیترات سدیم با شاهد (۴/۰۸ با ۵/۲۳) مشاهده شد (P<۰/۰۵). نتایج حاصله می تواند موید ادعای Lee و همکاران در سال ۲۰۰۲ باشد که به این نتیجه رسیدند که استات سدیم یک ماده موثر در مقابل باکتریهای گرم مثبت است. همچنین بنابه نظر Sallam در سال ۲۰۰۷ کم بودن تعداد باکتریهای LAB در آزمایش خود را به دلیل این دانستند که این نوع باکتریها در دمای یخچال به کندی رشد می کنند و در شرایط هوازی معمولا در رقابت با سودوموناسها هستند .

طبق نتایج حاصله، میزان LAB در تمامی تیمار ها در طول زمان روندی افزایشی داشت یعنی در روز صفر کمترین و در روز ۱۶ بیشترین مقدار را داشت ، همچنین اختلاف معنی دار بین زمانهای مختلف آزمایشات مشاهده شد (P<۰/۰۵) صفری و سعیدی اصل در سال ۱۳۹۰ تاثیر نایسین A و بنزوات سدیم را بر رفتار لیستریامونوستیوژنز و برخی از پارامترهای میکروبی و شیمیایی در فیله ماهی فیتوفاگ (Hypophtalmichtysmolitrix) نگهداری شده در دمای 4 درجه سلسیوس بررسی کردند. طبق نتایج حاصله میزان اولیه LAB در این آزمایش در همه تیمارها تقریبا برابر ۰/۰۶± ۲/۸۶ logCFU/g بود و تا پایان ۱۲ روز آزمایشات روند افزایشی در همه تیمارها مشاهده شد. اما روند رشد LAB در تیمارهای شاهد و تیمار دارای بنزوات سدیم بصورت منفرد سریعتر از تیمارهای دارای مواد نگهدارنده ترکیبی و تیمار نایسین به تنهایی بود. Castellano و همکاران (۲۰۰۸)، علت این امر را تأثیر باکتریوسایدی[20] (باکتری کش) نایسین بر علیه اکثر باکتریهای گروه لاکتیک دانستند. همچنین صفری و سعیدی اصل روند کاهشی باکتریهای گروه لاکتیک را به تاثیر مهار کننده بنزوات سدیم نیز نسبت داد .

از روز ۴ تا ۱۶ آزمایشات همواره تیمار شاهد به طور معنی داری بیشترین میزان LAB را در مقایسه با سایر تیمارها نشان داد. در تحقیقی که Oguzhan وAngis در سال ۲۰۱۲ باعنوان تأثیر تیمارهای مختلف شور کردن و بسته بندی با اتمسفر اصلاح شده بر فیله های ماهی قزل آلای رنگین کمان در دمای یخچال انجام دادند میزان LAB اولیه را ۲ logCFU/g گزارش کردند که این میزان در تمامی تیمارهای آزمایشی در طول زمان افزایش یافت . همچنین ماندگاری تیمار شاهد وکیوم و شاهد MAP (۵۰٪ CO2 و ۵۰٪ O2) در این تحقیق به ترتیب ۱۰ و ۱۵ روز گزارش شد. در پایان آزمایشات Oguzhan وAngis این طور نتیجه گرفتند که ترکیب نمک سود کردن و بسته بندی در اتمسفر اصلاح شده می تواند باکتریهای کل، سرمادوست و سودوموناسها را نسبت به نگهداری در هوا کاهش دهد اما در میزان LAB افزایش مشاهده شد.

از میان باکتریهای LAB آن دسته که تولید کننده باکتریوسین (مواد ضد باکتری مانند نایسین) می توانند از رشد و تولید سم توسط باکتری کلاستریدیم بوتولینوم جلوگیری کنند (Crandall و Montville، ۱۹۹۳) باکتریهای اسید لاکتیک در روش بسته بندی در خلأ غالب هستند . توانایی رشد تحت شرایط بی هوازی و دمای پایین و تحمل زیاد نسبت به حضور CO2 می تواند توجیهی بر غالبیت این باکتریها در بسته بندی در خلأ و اتمسفر اصلاح شده باشد. مشابه همین نتایج در تحقیق Rasmussen و همکاران در سال ۲۰۰۲ مشاهده شد و میزان باکتریهای LAB به عنوان بیشترین میکروارگانیسم مسبب فساد در ماهی آزاد آتلانتیک در بسته بندی در خلأ در دمای یخچال گزارش شد .

همچنین از روز ۴ تا ۱۶ همواره تیمار ترکیبی (نایسینZ استات سدیم) به طور معنی داری کمترین میزان LAB را در مقایسه با سایر تیمارها داشت . Shirazinejad و همکاران در سال ۲۰۱۰ اثر توأم اسید لاکتیک و نایسین را بر

[20] .Bactericide

روی کاهش فلور میکروبی طبیعی میگو در دمای یخچال بررسی کردند . تعداد اولیه باکتریهای اسید لاکتیک در این تحقیق کمتر از محدوده قابل شمارش ۲ log CFU/g بود و در نهایت در تیمار شاهد به ۵/۴ رسید. در طول مدت آزمایشات تعداد باکتریهای اسید لاکتیک کمتر از سایر باکتریهای شمارش شده در این آزمایش از جمله سودوموناسها و باکتریهای تولید کننده H2S بود . در بین تیمارهای این آزمایش بهترین تأثیر را تیمار نایسین به همراه ۲٪ اسید لاکتیک داشت. از نظر Shirazinejad و همکاران علت کم بودن LAB در این تحقیق این بود که این باکتربها در دمای یخچال و در شرایط هوازی کمتر رشد می کنند و در رقابت با سودوموناسها قرار می گیرد (Huis In't Veld ، ۱۹۹۶). همچنین بیان کردند که اسیدهای آلی و نمکهایشان می توانند pH محیط را به گونه ای تغییر دهند که امکان رشد برای بسیاری از گونه های باکتریایی از بین برود . همچنین این مواد قادرند از دیواره سلولی عبور کنند و داخل سلول را اسیدی نمایند. از آنجایی که اسیدی شدن فعالیت ضد میکروبی اسیدهای آلی و باکتریوسینها را افزایش می دهد اسیدهای آلی ونمکهایشان می توانند عملکرد مثبت باکتریوسینها از جمله نایسین را به مقدار زیادی افزایش دهند (Jack و همکاران، ۱۹۹۵) .

بنا به نظر Faghani و همکاران در سال ۲۰۱۱ در تحقیقی که بر روی فیله های ماهی کپور علفخوار Ctenopharyngodon idella در معرض غلظتهای مختلف نایسین و استات سدیم انجام دادند، از آنجا که باکتریهای اسد لاکتیک از باکتریهای مسبب فساد هستند ، می توانند کیفیت ماهی و محصولات شیلاتی را کاهش دهند. در این تحقیق میزان LAB اولیه در آزمایشات بین ۴/۳۴ تا ۴/۷۶ گزارش شد که از نتایج حاصل از میزان اولیه LAB در تحقیق حاضر تقریبا به میزان ۲ لگاریتم رشد باکتریایی بیشتر می باشد که علت این امر را می توان تفاوت در نوع گونه و میزان بار میکروبی ایجاد شده در مراحل تهیه فیله و همچنین شرایط محیط پرورشی دانست . اما Faghani و همکاران نیز مانند نتایج تحقیق حاضر افزایش تدریجی LAB را در طول دوره آزمایش گزارش کردند. همچنین در تحقیق Faghani و همکاران تیمار شاهد در روز ۸ به میزان LAB نزدیک ۷ log cfu/g (حداکثر مجاز پیشنهادی برای میزان LAB) رسید . اما در تیمارهایی که غلظت بیشتر استات سدیم (۳٪) و نایسین (۰/۲٪) داشتند میزان LAB به طور معنی داری کمتر بود ($P < ۰/۰۵$). در تحقیق Faghani و همکاران تیمارهای ترکیبی نایسین و استات سدیم اثر ممانعتی بیشتری بر رشد باکتریها ی LAB داشتند . و حد مجار مصرف کلیه تیمارها را از نظر LAB روز ۱۲ آزمایشات معرفی کردند. در تحقیق Mohan و همکاران در سال ۲۰۱۲ که بر روی ماهی تون Scomberomorus commerson در معرض استات سدیم انجام شد شمارش میزان LAB در مقایسه با تیمار کنترل کمتر بود که نشان دهنده اثر ممانعتی نمکهای سدیم بر رشد LAB است.

بیشترین حد پیشنهاد شده برای LAB نیز در فیله ماهیان log CFU/g ۵ است (ICMSF، ۱۹۸۶ ; Sallam ، ۲۰۰۷ ;و Faghani و همکاران ، ۲۰۱۱). در این آزمایش تا روز ۱۶ آزمایشات میزان LAB در نمونه شاهد (فیله و شکم خالی) خارج از دامنه استاندارد بود. در سایر تیمارهای دارای مواد نگهدارنده، میزان باکتریهای گرو LAB تا روز ۱۶ در دامنه استاندارد قرار داشت.

۴-۲-۵- باکتری لیستریا مونوسیتوژنز

در جداول ۴- ۱۶ و ۴-۱۷ تغییرات باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در تیمارهای حاوی فیله و شکم خالی ماهی قزل آلای رنگین کمان در تیمارهای مختلف، طی زمان نگهداری نشان داده شده است. از آنجاکه میزان تلقیح باکتری به فیله ماهیان در ابتدای آزمایشات ۵ log cfu/g بود، شمارش اولیه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در زمان صفر آزمایشات در تیمارهای فیله و شکم خالی تقریبا مشابه و معادل ۰/۰۵ ±۴/۲۶ بود. به منظور اطمینان از عدم آلودگی اولیه نمونه ها به لیستریا، بطور تصادفی از ۱۰ تیمار حاوی فیله و شکم خالی نمونه برداری شده تا وجود یا عدم وجود لیستریا مشخص گردد. نتایج نمونه برداری و کشت باکتریایی اولیه در محیط کشت لیستریا کروم آگار حاکی از عدم وجود باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در نمونه های فیله و شکم خالی قزل آلا بود. نتایج نشان داد که روند رشد لیستریا در نمونه های شاهد و دارای مواد نگهدارنده افزایشی بوده با این تفاوت در نمونه شاهد روند سریعتری داشته است. نتایج مطالعات صفری و همکاران در سال ۱۳۹۰ نیز تائید کننده نتایج حاضر بوده و حاکی از آنست که نایسین A به همراه بنزوات سدیم باعث کاهش جمعیت لیستریا در فیله ماهی کپور نقره ای میشود. مطابق نتایج ذکر شده در جداول ۴-۱۶ و ۴-۱۷، مقدار باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در تمامی تیمارهای این آزمایش (فیله و شکم خالی) در روز ۱۶ بیشترین میزان و در روز صفر کمترین میزان را داشته و بین زمانهای مختلف آزمایش در بیشتر تیمارها از نظر آماری اختلاف معنی دار مشاهده شد (P<۰/۰۵). روند رشد لیستریا در نمونه های شکم خالی اندکی بیشتر از نمونه های فیله بوده ولی باین وجود ارتباط معنی داری وجود نداشته است. Faghani و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثر نایسین و استات سدیم را بر روی خواص میکروبی و شیمیایی ماهی آمور در تلقیح با باکتری لیستریا مونوسیتوژنز بررسی کردند . در این تحقیق فیله های ماهی آمور با دو غلظت (۱و ۳ ٪) استات سدیم و (۰/۱ و ۰/۲ ٪ نایسین) در قالب تیمارهای مختلف مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که خاصیت ضد میکروبی این دو ماده با افزایش غلظت استات سدیم افزایش یافته و بیشترین کاهش در میزان TVC و همچنین تعداد لیستریا مونوسیتوژنز در تیمارهای استفاده توأم نایسین و استات سدیم مشاهده شد که علت آن را تاثیر نمک اسیدهای آلی در افزایش کارایی نایسین در کاهش جمعیت باکتریایی دانستند. نتایج مطالعه فوق با نتایج تحقیق حاضر که حاکی از تاثیر بیشتر استفاده ترکیبی از نگهدارنده ها می باشد دارد.

Lungu و Johnson در نتایج خود بیان کردند که تیمارهایی که به صورت توأم از نایسین و نمک اسیدهای آلی استفاده شد نتیجه بهتری در کاهش جمعیت باکتری لیستریا مونوسیتوژنز داشتند .

نتایج جداول ۴-۱۶ و ۴-۱۷ نشان میدهد که بیشترین جمعیت لیستریا در نمونه شاهد (فیله و شکم خالی) در روز ۱۶ بوده که تعداد باکتری در این زمان به لوگ ۸ رسید. در مقایسه با سایر تیمارها که در محدوده لوگ ۶ قرار داشتند. مطالعات صفری و همکاران سال ۱۳۹۰ و Lungu و Johnson تائید کننده این نتایج می باشد. در مطالعات انجام شده توسط Dehbandy و همکاران در سال ۲۰۱۴ در خصوص اثرات نایسین به فرم آزاد و انکپسوله بر

لیستریا در سوریمی ماهی کیلکا مشخص گردید که نایسین در هر دو فرم باعث کند شدن روند صعودی لیستریا در دمای ۴ درجه میشود ولی با این وجود باکتری به رشد خود در این دما ادامه می دهد. عوامل مختلفی در تاثیر نایسین بر فلور میکروبی خصوصا لیستریا در شرایط in vivo دخالت داشته که میتوان به بافت ماهی ، pH ، آنزیمهای بافتی ، آب فعال بافتی و نوع پروتئین بافت اشاره نمود که باعث کاهش تاثیرات نایسین میشوند.

همانطور که در نتایج تحقیق حاضر مشاهده قرار گرفتن فیله و نمونه های شکم خالی ماهی در معرض تیمارهای حاوی استات سدیم ، مشابه تیمارهای نایسین Z و تیمار ترکیبی، منجر به کاهش میزان TVC ، PTC و LAB شد. مشابه همین نتایج در مورد لیستریا مونوسیتوژنز نیز مشاهده شده است. نتایج حاصله می تواند موید ادعای Lee و همکاران در سال ۲۰۰۲ باشد که به این نتیجه رسیدند که نمکهای سدیم مواد ضد باکتری موثر در مقابل باکتریهای گرم مثبت می باشند.

Mirdamadi و همکاران در تحقیق خود اثر ممانعتی نایسین انکپسوله و نایسین آزاد را در مقابل باکتریهای استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیتوژنز و اشرشیا کلی را در پنیر و در محیط کشت مورد بررسی قرار دادند. نتایج این تحقیق بیان کننده آن بود که میزان MIC نایسین آزاد در محیط کشت و پنیر بر روی هر دو گونه استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیتوژنز بیشتر از نایسین ریزپوشانی شده بود . همچنین بر اساس نظر Bhatti و همکاران در سال ۲۰۰۴ ، در مدلهای مختلف غذایی به دلیل واکنش این ترکیبات نگهدارنده با اجزاء غذا تأثیر ممانعت کنندگی این ترکیبات نگهدارنده کاهش می یابد . به عنوان مثال، چربی بر فعالیت ضد باکتریایی نایسین اثر منفی دارد ، پس استفاده از نایسین در محصولات غذایی با چربی زیادتر تأثیر محدودتری بر رشد باکتریها دارد . چوبکار و همکاران ۱۳۸۹ بیان کردند تأثیر ترکیبات نگهدارنده هنگام استفاده در محیط های "in vivo" مانند مدلهای غذایی مانند گوشت کاهش می یابد که این به دلیل محتوی بالای چربی و پروتئین در این محیط ها می باشد که سبب کاهش تأثیر این ترکیبات می شود البته شرایط محیطی هم تأثیر گذار است . در تأثیر نایسین بر گوشت اختلاف نظر وجود دارد برخی عنوان کرده اند که فسفولیپید موجود در گوشت فعالیت نایسین را مختل می کند و بهترین فعالیت نایسین در محیط مایع و هموژن می باشد و توسط آنزیمهای پروتئولیتیک در غذا ها مانند گوشت تازه ، این باکتریوسینها غیر فعال می شوند (Juncioni de Arauz و همکاران ، ۲۰۰۹).

همانطور که گفته شده تیمار ترکیبی تاثیر مهار کننده بیشتری بر لیستریا داشته است. نتایج مطالعات Leistner و Gorris(۱۹۹۵) نشان داد که استفاده از چند نگهدارنده با مقادیر کم بر مصرف یک نگهدارنده به تنهایی با مقادیر زیاد ، ارجحیت دارد که این موضوع هم از نظر ماندگاری و هم خواص ظاهری ، ارزش تغذیه ای و هم از نظر اقتصادی بهتر است . نتایج مطالعه صفری و سعیدی اصل در سال ۱۳۹۰ نیز تائید کننده مطلب فوق می باشد. طبق گزارشات این محققین تعداد لیستریا در تیمارهای حاوی مواد نگهدارنده روند کاهشی داشته بطوریکه در نمونه دارای ترکیب نایسین و بنزوات سدیم تعداد باکتری از۴/۱۲ به ۳/۶۶ واحد لگاریتمی کاهش داشته است .این در حالیست که در نمونه های فاقد ماده نگهدارنده تعداد لیستریای تلقیح شده از ۴/۴۳ به ۵/۱۴ واحد لگاریتمی

افزایش نشان داد . در سایر تیمارها روند رشد لیستریا نیز کاهشی بوده ولی با این وجود نتایج مربوط به تیمار دارای نایسین به تنهایی بهتر از بنزوات سدیم بوده است .تعداد لیستریا در تیمارهای دارای مواد نگهدارنده روند نزولی داشته ولی تعداد آن در تیمار شاهد افزایش داشته است. کاهش نسبی فعالیت ضد لیستریایی نایسین در طول زمان احتمالاً به دلیل ترکیب نایسین با پروتئین وچربی غذا و یا به خاطر فعالیت آنزیمهای موجود در گوشت می باشد . نتیجه گیری کلی نشان میدهد که اگرچه مواد نگهدارنده مورد استفاده در این تحقیق به هنگام استفاده در محیط کشت آزمایشگاهی (مطالعات انجام شده)،جمعیت لیستریا را به صفر می رسانند ولی به هنگام تلقیح باکتری در بافت ماهی، پارامترهای مختلف براثرات ضدمیکروبی مواد نگهدارنده تأثیرگذارمیباشند. از مهمترین این پارامترها میتوان به غلظت باکتریوسین و بنزوات سدیم مورد استفاده، روش استفاده از باکتریوسین، زمان غوطه وری، گونه ماهی، نوع محصول، درجه آلودگی میکروبی و وضعیت نگهداری اشاره نمود. همچنین Yin و همکاران (۲۰۰۷)، نایسین و پدیوسین را در سطوح مختلف بین ۳۷۵ تا ۷۵۰۰ IU/g در کوفته ماهی بکار بردند که نتایج حاصل از تحقیق مذکور بیانگر محدود شدن فعالیت ضد لیستریایی این باکتریوسینها در دو هفته اول مطالعه بود. علاوه بر این در مطالعه Yin و همکارانش نایسین در غلظت ۱۵۰۰ IU/g حتی در روزهای اول نیز قادر به کاهش لیستریا به زیر حد نسبتاً قابل قبول (۱۰۰ باکتری در هر گرم غذا برای افراد سالم) نبود. در مطالعه انجام شده توسط عبدالله زاده و همکاران در سال ۱۳۸۹ که در خصوص ارزیابی اثرات مهار کننده نایسین A و اسانس آویشن شیرازی(بصورت منفرد و ترکیبی) بود مشخص گردید که استفاده ترکیبی دو ماده فوق قادر به کند کردن روند رشد لیستریا در گوشت چرخ شده ماهی فیتوفاگ میگردد ولی با این وجود قادر به کاهش آن به زیر حد قابل قبول نمی باشد. در مطالعه انجام شده توسط خلیل نژاد و همکاران در سال ۱۳۹۰ که در ارتباط با اثرات مهار کننده اسانس آویشن شیرازی و نایسین Z بر لیستریا در گوشت چرخ شده ماهی کیلکا انجام گرفت نیز نتایج مشابه حاصل گردید.

۵-۲-۵- باکتری کلستریدیوم بوتولینوم

کلستریدیوم بوتولینوم جزء باکتریهای اسپوردار بی هوازی بوده که عامل بوتولیسم می باشد. تیپهای مختلف این باکتری باعث بروز بوتولیسم در انسان و حیوانات شده که از مهمترین تیپها میتوان به A ، B و E اشاره نمود. تیپ E شایع ترین تیپ در محصولات دریایی بوده و از دستگاه گوارش ماهی ، آبشش ، رسوبات دریا جدا شده است. رضویلر و همکاران در سال ۱۳۸۵ تیپهای مختلف کلستریدیوم بوتولینوم را در ماهیان شمال و جنوب مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که از ۲۴۰ نمونه مورد بررسی، ۱۲ نمونه به کلستریدیوم بوتولینوم آلوده بودند که سهم تیپ E بیشتر بوده (۶ نمونه) و تیپهای A و B در مرحله بعد قرار داشتند. بیشترین ارگان آلوده روده ماهیان مورد بررسی بوده است. همچنین میزان آلودگی در ماهیان شمال بیشتر از ماهیان جنوب بوده است. علت این امر احتمالا بدلیل شوری بسیار بالا آبهای جنوب بوده که باعث غیرفعال نمودن باکتری میگردد. در مطالعه

دیگر که توسط توکلی و همکاران در سال ۱۳۹۰ انجام گرفت ۱۴۶ نمونه از ماهیان فرآوری شده و فرآوری نشده از نظر آلودگی به کلستریدیوم بوتولینوم مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تعداد نمونه های آلوده ۱۶ قطعه بوده و درصد آلودگی در ماهیان فرآوری شده بیشتر از فرآوری نشده بود.همچنین شایع ترین تیپ نیز تیپ E بود. علت اصلی انتخاب تیپ E در مطالعه حاضر پراکنش فراوان آن در محیطهای آبی بوده که از این طریق پتانسیل آلوده نمودن ماهی را دارا می باشد

نتایج تغییرات رشد کلستریدیوم در تیمارهای حاوی فیله و شکم خالی ماهی قزل آلای رنگین کمان در تیمارهای مختلف،در جداول۴- ۱۸ و ۴-۱۹ نشان داده شده است. از آنجاکه میزان تلقیح باکتری به فیله ماهیان در ابتدای آزمایشات ۵ log cfu/g بود، شمارش اولیه باکتری در زمان صفر آزمایشات در تیمارهای فیله و شکم خالی به ترتیب۰/۰۹ ±۴/۲۲ و ۰/۰۴ ±۴/۲۱ بود. به منظور اطمینان از عدم آلودگی اولیه نمونه ها به کلستریدیوم بوتولینوم، بطور تصادفی از ۱۰ تیمار حاوی فیله و شکم خالی نمونه برداری شده تا وجود یا عدم وجود باکتری تعیین گردد. نتایج نمونه برداری و کشت باکتریایی اولیه در محیط کشت آگار حاوی زرده تخم مرغ حاکی از عدم وجود کلستریدیوم بوتولینوم در نمونه های فیله و شکم خالی قزل آلا بود. نتایج نشان داد که روند رشد کلستریدیوم در نمونه های شاهد و دارای مواد نگهدارنده افزایشی بوده با این تفاوت در نمونه شاهد روند سریعتری داشته است. میزان حساسیت کلستریدیوم به مواد نگهدارنده مورد استفاده نسبت لیستریا بیشتر بوده است. دلیل این امر احتمالا به خاطر آنست که زمانی اسپور کلستریدیوم به فیله یا ماهی کامل شکم خالی تبدیل به سلول رویشی شده و در نتیجه تحت تاثیر اثر مهار کننده نایسین و استات سدیم قرار میگیرد. سلول رویشی کلستریدیوم مقاومت کمتری، در مقایسه با سلول لیستریا، نسبت به نگهدارنده های شیمیایی و یا بیولوژیک دارد. مطالعات نشان میدهد که باکتریوسین های ترشح شده از باکتریهای گروه لاکتیک بر رشد و تولید نوروتوکسین از کلستریدیوم بوتولینوم اثر مهار کننده داشته و با غیرفعال کردن سلولهای باکتریایی مانع از تولید توکسین می شوند. از مهمترین باکتریوسین ها میتوان به نایسین، پدیوسین و لاکتاسین و همچنین اسیدهای آلی مثل لاکتیک، استیک و پروپیونیک اشاره نمود (Crandall و Montville، ۱۹۹۳). مطابق نتایج ذکر شده در جداول ۴-۱۸ و ۴-۱۹، جمعیت کلستریدیوم در تمامی تیمارهای این آزمایش (فیله و شکم خالی) در روز ۱۶ بیشترین میزان و در روز صفر کمترین میزان را داشته و بین زمانهای مختلف آزمایش در بیشتر تیمارها از نظر آماری اختلاف معنی دار مشاهده شد (P<۰/۰۵). روند رشد باکتری در نمونه های شکم خالی و فیله تفاوت چندانی با هم نداشته اند. در نمونه های دارای مواد نگهدارنده ترکیبی رشد بطئی تر بوده است. رضویلر و همکارانش در سال ۱۳۸۰ از محیط عصاره مغز و قلب گاو (BHI) بعنوان محیط کشت مدل خاویار جهت ارزیابی روند رشد کلستریدیوم بوتولینوم و اشرشیا کلی استفاده کردند. نگهدارنده های مورد استفاده شامل نمک خالص در فرمولاسیون با اسید بوریک و بوراکس ، سوربات پتاسیم و مشتقاوت بنزوات بوده که در دمای ۳۰ درجه و زمانهای صفر ، ۲ ، ۵ و ۷ روز مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که به هنگام استفاده از متیل پارابن (از مشتقات بنزوات) رشد و

تولید توکسین توسط کلستریدیوم متوقف شده ولی در سایر تیمارها خصوصا نمک خالص، باکتری روند رشد صعودی داشته است. نتایج تغییرات اشرشیا کلی نیز مشابه کلستریدیوم بوده است. نتایج تحقیق فوق حاکی از اثرات مهار کننده نمک های شیمیایی در محیط کشت آزمایشگاهی بوده که نمک استات سدیم مورد استفاده در این تحقیق نیز اثرات مشابه ای را نشان خواهد داد. همانطور که در نتایج تحقیق حاضر مشاهده قرار گرفتن فیله و نمونه های شکم خالی ماهی در معرض تیمارهای حاوی استات سدیم ، مشابه تیمارهای نایسین Z و تیمار ترکیبی، منجر به کاهش میزان TVC ، PTC و LAB شد. مشابه همین نتایج در مورد کلستریدیوم بوتولینوم نیز مشاهده شده است. نتایج حاصله می تواند موید ادعای Lee و همکاران در سال ۲۰۰۲ باشد که به این نتیجه رسیدند که نمکهای سدیم مواد ضد باکتری موثر در مقابل باکتریهای گرم مثبت می باشند. ولی با این وجود، به هنگام استفاده در بافت ماهی ، پارامترهای مختلفی بر فعالیت نگهدارنده های مورد استفاده (نگهدارنده شیمیایی و یا بیولوژیک) اثر خواهند گذاشت که میتوان به موارد ذیل اشاره نمود:

۱-نایسین در غذاهای مایع و هموژن نسبت به غذاهای جامد و هتروژن به علت توزیع راحت تر در ماتریکس غذایی موثرتر است.

۲- در غذاهایی که pH پائین تری داشته باشند حلالیت نایسین افزایش یافته و در نتیجه عبور مولکولهای نایسین از دیواره سلولی بهتر صورت گرفته و باعث افزایش کارایی نگهدارنده در توقف رشد باکتریایی می شود.

۳- از فاکتورهای محدود کننده بر عملکرد باکتریوسین در ماده غذایی میتوان به ترکیب باکتریوسین با افزودنی های غذایی، شرایط فراوری غذا، عوامل وابسته به فعالیتهای میکربی نظیر بار مبکربی و فعل وانفعالات آنها در غذا اشاره نمود.

۴-از انجا که باکتریوسین ها ترکیبات پپتیدی هستند این احتمال وجود دارد که این ترکیبات در اثر عملکرد انزیم های موجود در گوشت بخصوص پروتئازها یا آنزیم نایسیناز باکتری تجزیه شوند.

۵-از سوی دیگر علاوه بر فاکتور های مذکور، کاهش خواص ضد باکتریایی نایسین در طول زمان ممکن است با بروز سوشهای مقاوم به نایسین بروز کند که میتوان به بیان ژنهای مقاوم Imo2487،hpk1021, pbp2229 در باکتری لیستریا اشاره نمود.

۶- چوبکار و همکاران ۱۳۸۹ بیان کردند تأثیر ترکیبات نگهدارنده هنگام استفاده در محیط های "in vivo" مانند مدلهای غذایی مانند گوشت کاهش می یابد که این به دلیل محتوی بالای چربی و پروتئین در این محیط ها می باشد که سبب کاهش تأثیر این ترکیبات می شود البته شرایط محیطی هم تأثیر گذار است . در تأثیر نایسین بر گوشت اختلاف نظر وجود دارد برخی عنوان کرده اند که فسفولیپید موجود در گوشت فعالیت نایسین را مختل می کند و بهترین فعالیت نایسین در محیط مایع و هموژن می باشد و توسط آنزیمهای پروتئولیتیک در غذا ها مانند گوشت تازه ، این باکتریوسینها غیر فعال می شوند (Juncioni de Arauz و همکاران ، ۲۰۰۹).

نتایج جداول ۴-۱۸ و ۴-۱۹ نشان میدهد که بیشترین جمعیت کلستریدیوم در نمونه شاهد (فیله و شکم خالی) در روز ۱۶ بوده که تعداد باکتری در این زمان به لوگ ۸ رسید. در مقایسه با سایر تیمارها که در محدوده لوگ ۵ قرار داشتند.

همانطور که گفته شده تیمار ترکیبی تاثیر مهار کننده بیشتری بر کلستریدیوم داشته است. نتایج مطالعات Leistner و Gorris (۱۹۹۵) نشان داد که استفاده از چند نگهدارنده با مقادیر کم بر مصرف یک نگهدارنده به تنهایی با مقادیر زیاد ، ارجحیت دارد که این موضوع هم از نظر ماندگاری و هم خواص ظاهری ، ارزش تغذیه ای و هم از نظر اقتصادی بهتر است . نتایج مطالعه رضویلر و همکاران در سال ۱۳۸۰ نیز تائید کننده مطلب فوق میباشد. طبق گزارشات این محققین تعداد کلستریدیوم در مخلوط نمک و متیل پارابن و همچنین مخلوط نمک با سایر مواد نگهدارنده، روند کاهشی داشته بطوریکه در نمونه دارای ترکیب نمک و متیل پارابن تعداد باکتری به صفر رسیده بود. این در حالیست که در نمونه های فاقد ماده نگهدارنده و یا نمک خالص به تنهایی، تعداد باکتری تلقیح شده به سرعت افزایش یافته و نشان از عدم تاثیر نمک در دوز مورد استفاده بوده است.

۶- نتیجه گیری کلی

نتیجه گیری کلی که از این مطالعه حاصل میشود آنست که در تیمار شاهد که فاقد هر گونه ماده نگهدارنده بوده و فقط فیله و یا ماهی کامل شکم خالی در شرایط خلاء نگهداری میشد از نظر شاخصهای شیمیایی (PV، TBA، TVN) و میکروبی (TVC، PTC، LAB) فساد و همچنین شمارش باکتری لیستریا مونوسیتوژنز و کلستریدیوم بوتولینوم دارای بالاترین مقدار بود. همچنین از نظر شاخصهای شیمیایی به ترتیب ذکر شده میزان ماندگاری برای فیله (۱۲ تا ۱۶، ۱۲ و ۱۲ تا ۱۶) و از نظر شمارش میکروبی به ترتیب ذکر شده (۱۲ تا ۱۶، ۱۶ و ۱۶) روز و برای ماهی شکم خالی به ترتیب ۱۶ ، ۱۲ و ۱۶ (شیمیایی) و ۱۲ تا ۱۶ ،۱۶ و ۱۶ روز (میکروبی می باشد. میتوان نتیجه گیری نمود که درصد ماندگاری نمونه کامل شکم خالی اندکی بیشتر از فیله بوده که دلیل این امر نیز دستکاری بیش از حد ماهی به هنگام تهیه فیله بوده که باعث انتقال باکتریهای دست به ماهی میگردد. در سایر تیمارها که دارای نایسین Z و استات سدیم بصورت منفرد و یا ترکیب این دو بوده اند تمامی تیمارها هم از نظر شاخصهای شیمیایی و هم میکروبی تا روز ۱۶ در دامنه استاندارد قرار داشتند. علت افزایش زمان ماندگاری در این حالت را میتوان به نگهداری در دمای پائین ، بسته بندی در شرایط خلاء و تازه بودن ماهی نیز مرتبط دانست زیرا در نمونه های شاهد که فاقد ماده نگهدارنده بودند، زمان ماندگاری در برخی از موارد تا ۱۶ روز هم مشاهده شد.

در خصوص رفتار دو باکتری لیستریا مونوسیتوژنز و کلستریدیوم بوتولینوم بایستی اشاره کرد که مواد نگهدارنده مورد استفاده دارای اثرات مهار کننده بر رشد و رفتار این دو باکتری بوده و کلستریدیوم نسبت به لیستریا دارای حساسیت بیشتری بوده است ولی با این وجود به لحاظ استفاده در بافت ماهی ، پارامترهای مختلفی بر فعالیت مواد نگهدارنده تاثیر گذاشته و باعث کاهش میزان دسترسی باکتری و مواد نگهدارنده شده و در نتیجه میزان کاهش باکتریهای تلقیح شده در حد قابل قبول نبوده است هر چند که باکتریهای تلقیح شده ، در تیمار شاهد، به سرعت رشد کرده و نتایج نشان داد که تعداد آنها در روز ۱۶ به لوگ ۸ رسیده بود.

پیشنهادها

با در نظر گرفتن مجموع خواص ارزشمند تغذیه ای ماهیان و با توجه به حساسیت بالای آنها در مقابل فساد باکتریایی و اکسیدانی، مطالعه و مقایسه روشهای مختلف نگهداری و استفاده از آنها در ارائه راهکارهای مناسب جهت حفظ کیفیت تغذیه ای و افزایش ماندگاری آنها ارزشمند می باشد. لذا جهت مطالعات آتی موارد ذیل پیشهاد می گردد.

- پیشنهادهای پژوهشی

- استفاده از روش بسته بندی با اتسمفر اصلاح شده با ترکیبهای گازی مختلف
- استفاده از نایسین نانوکپسوله بهمراه نمکهای آلی در جهت افزایش زمان ماندگاری محصولات شیلاتی
- استفاده از نایسین به فرم آزاد و نانوکپسوله در سایر محصولات شیلاتی مانند گوشت چرخ شده و سوریمی ماهی

- پیشنهادات اجرایی

- با توجه پائین بودن پارامترهای شیمیایی و میکروبی مولد فساد در ماهی کامل شکم خالی نسبت به فیله ، پیشنهاد میگردد که به هنگام بسته بندی ماهی قزل آلا از این فرم استفاده شود و در صورت تهیه فیله حتما از روشهای مدرن تهیه فیله استفاده شود تا بار میکروبی به حداقل رسیده و احتمال آلودگی ثانویه نیز کاهش یابد.
- با توجه به ارجحیت تیمار ترکیبی(استات سدیم و نایسین Z) نسبت به سایر تیمارها در افزایش زمان ماندگاری و کاهش شاخصهای فساد فیله و ماهی کامل شکم خالی ماهی قزل آلا، پیشنهاد می شود جهت نگهداری ماهی قزل آلا در دمای یخچال از این دو ماده به صورت همزمان استفاده شود.

منابع

- اجاق، س.م.، سحری، م.ع.، رضائی، م. ۱۳۸۳. اثر آنتی اکسیدانهای طبیعی بر کیفیت ماهی کیلکای معمولی (cultriventris caspia Clupeonella) به هنگام نگهداری در یخ. مجله علوم و فنون دریایی ایران ; سال ۳، شماره ۴.ص ۱-۷.
- استاندارد ۱-۸۹۲۳، ۱۳۷۹. میکروبیولوژی مواد غذائی و خوراک دام- شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.
- استاندارد ۲۶۲۹، ۱۳۷۸. روش شمارش میکروارگانیسم‌های سرماگرا و سرمادوست. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.
- اصغری ، م . علیزاده دوغیکلایی ، ا . صفری ، ر .ارشدی ، ع . سعیدی اصل، م.ر.، ۱۳۸۸. بررسی تاثیر نایسین Z. واستات سدیم بر زمان ماندگاری فیله ی کپور نقره ای *Hypophthalmichthys molitrix* در طی نگهداری در دمای 4 درجه سانتیگراد . فصلنامه ی علوم و فناوری غذایی. سال ۱، شماره ۳ . ص ۵۶-۶۴ .
- اعتمادی، ح.، رضایی، م.، عابدیان، ع.،۱۳۸۷.پتانسیل آنتی باکتریایی وآنتی اکسیدانی عصاره رزماری *Rosmarinus officinalis* در افزایش عمر ماندگاری ماهی قزل آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss*. فصلنامه علوم وصنایع غذایی. شماره ۴ : ۶۷-۷۷.
- الیاسی، الف.، ۱۳۸۸. بررسی مقایسه ای کیفیت شیمیایی، میکروبی وحسی فیش فینگرهای تولید شده از گوشت چرخ شده و سوریمی کپور معمولی(*Cyprinus carpio*). پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده منابع طبیعی دانشگاه زابل.
- اانوری، م.، بهنام، ش.، رضایی، م.، سلطانیان، س.، صفری، ر.، ۱۳۸۸. پتانیل آنتی باکتریایی و آنتی اکسیدانی باکتریوسین Zدر افزایش زمان ماندگاری فیله ماهی قزل آلای (*Oncorhynchus mykiss*) بسته بندی شده در خلأ در دمای ۴ °C. ششمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، مرداد ۱۳۸۸ .
- توکلی، ح ر. ایمانی فولادی، ع. ۱۳۹۰. تعیین آلودگی به کلستریدیم بوتولینوم در دوگونه از ماهیان فرآوری شده و فرآوری نشده. مجله دانشگاه علوم پزشکی گرگان. ۱۳، ۱، ۸۷-۷۹.
- جیمز، ام.جی.، ۱۳۸۵. میکروبیولوژی غذای مدرن(جلد دوم). ترجمه: مرتضوی، ع.، معتمدزادگان، ع.، گوهری اردبیلی .ا.، اعلمی .م.، انتشارات فردوسی مشهد: ص. ۶۶۲.
- چوبکار، ن.، آخوندزاده بستی، ا.، سلطانی، م.، ساری، ع.، ملکشاهی، ع.، نعمتی، غ و پرتوی، ر.، ۱۳۸۹. مطالعه رشد باکتری *Staphylococcus aureus* در فیله های ماهی کپور نقره ای فرآوری شده با نمک و نیسین. مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره ۶۵. ص ۱۹۳ تا ۱۹۸.

- حق پرست، س.، کشیری، ح.، شعبانپور، ب.، ۱۳۸۷. بررسی تغییرات کیفی فیله ماهی قزل آلا رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) پس از غوطه وری در محلولهای نمکی سدیم طی نگهداری در یخچال (۴ ° C) . کنفرانس ملی غذای عملگر . ۱۱ و ۱۲ آذر ۱۳۸۷.
- حمزه، ع و رضایی، م. ۱۳۹۰ . اثرات ضداکسیداسیونی و ضد باکتریایی پوشش آلژینات سدیم به همراه اسانس آویشن بر فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان نگهداری شده در یخچال . مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران . سال ۶. شماره ۳ : ۱۱-۲۰.
- خلیل نژاد، ح. قبادی، ع. صفری، ر. ۱۳۹۰. اثرات مهار کننده اسانس آویشن شیرازی و نایسین Z بر لیستریا در گوشت چرخ شده ماهی کیلکا. پایان نامه کارشناسی ارشد رشته شیلات. دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل.
- ذوالفقاری، م.، شعبانپور، ب.، فلاح زاده، س.، ۱۳۹۰. بررسی روند تغییرات شیمیایی، میکروبی و حسی فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان جهت تعیین مدت زمان ماندگاری آن در دمای یخچال. نشریه شیلات، مجله منابع طبیعی ایران، ۶۴: ۲ . ۱۰۷-۱۱۹.
- رضایی، م.، سحری، م.ع.، معینی، س.، صفری، م.، رضاییان، م.، و غفاری، ف.، ۱۳۸۱. بررسی برخی خصوصیات کیفی چربی کیلکای آنچوی (*Clupeonella engrauliformis*) در زمان نگهداری به حالت انجماد. مجله علوم دریایی ایران، شماره ۴: ۵۵-۶۴.
- رضوی شیرازی، ح.، ۱۳۸۵. تکنولوژی فراورده های دریایی: اصول نگهداری و عمل آوری (۱).چاپ دوم. تهران انتشارات پارس نگار.
- رهنما، م.، رضوی روحانی، س.م.، تاجیک، ح.، خلیقی سیگارودی، ف.، رضازاده باری، م.، ۱۳۸۸. بررسی اثرات ضدمیکروبی اسانس گیاه آویشن شیرازی و نایسین به تنهایی و ترکیبی با یکدیگر بر علیه لیستریا مونوسیتوژنز در آبگوشت قلب – مغز. فصلنامه گیاهان دارویی . ۳۲: ۱۲۰-۱۳۱.
- سالنامه آماری شیلات ایران ۱۳۸۸. معاونت تولید و بهره برداری، سیلات ایران.
- سعیدی اصل، م.، صفری، ر.، ۱۳۸۸. مقدمه ای بر میکروب شناسی عمومی و غذایی آزمایشگاهی. انتشارات بیهقی. ص ۴۰۶.
- سلمانی جلودار، علی.، ۱۳۸۶. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی. موسسه تحقیقات شیلات ایران – مرکز ملی تحقیقات فرآوری آبزیان شیلات ایران .ص ۲-۵.
- شریفیان، س.، ۱۳۸۸.ارزیابی کیفی ماهی شوریده (*Otolithes ruber*) در طی نگهداری در یخ. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه زابل. ص ۹۳.
- صفری، ر.، سعیدی اصل، م.ر.، ۱۳۹۰. تاثیر نایسین A و بنزوات سدیم بر رفتار لیستریامونوستیوژنز و برخی از پارامترهای میکروبی و شیمیایی در فیله ماهی فیتوفاگ (*Hypophtalmichtys molitrix*) نگهداری شده در دمای 4درجه سلسیوس. مجله بهداشت مواد غذایی . ۱: ۳ . ص ۱-۱۳.

- عبداله زاده ا، رضائی م ، حسینی ه ، صفری رضا ، یعقوب زاده ز. ۱۳۹۰. اثر مهاری نایسین بر لیستریا مونوسایتوژنز تلقیح شده در گوشت چرخ شده و سوریمی ماهی.مجله دانشگاه علوم پزشکی فسا. ۱ ، ۴، ۲۲۶-۲۲۱.
- محمدزاده، ب.، و رضایی، م.، ۱۳۹۰. اثر عصاره چای سبز بر کیفیت چربی ماهی قزل آلای رنگین کمان (Oncorhynchus mykiss) به هنگام نگهداری زیر یخ . نشریه شیلات. مجله منابع طبیعی ایران، ۶۴، شماره ۱: ۹۳-۸۵.
- Abbaș, K.A., Mohamed, A., Jamilah, B. Ebrahimian, M.. 2008. A Review on Correlations between Fish Freshness and pH during Cold Storage. American Journal of Biochemistry and Biotechnology 4 (4): 416-421.
- Abee, T., Krockel, L., and Hill, C., Bacteriocins.1995. modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. Int J Food Microbiol , 28: 169–185.
- Abee, T., Rombouts, F. M., Hugenholtz, J.; Guihard, G.; Letellier, L., 1994. Mode of action of nisin Z against Listeria monocytogenes Scott A grown at high and low temperatures Applied and Environmental Microbiology, 60, (6): 1962-1968.
- Akhondzadeh Basti, A., Misaghi, A., Khaschabi, D. 2007. Growth response and modelling of the effects of Zataria multiflora Boiss. essential oil, pH and temperature on Salmonella typhimurium and Staphylococcus aureus. LWT - Food Science and Technology. 40: 973-981.
- Alamilla-Beltran, L.; Chanona-Perez, J. J.; Jimenez-Aparicio, A. R.; Gutierrez-Lopez, G.F. 2005, Description of morphological changes of particles along spray drying. Journal of Food Engineering, 67, (1-2), 179-184.
- Al-Dagal, M.M., Bazarra, W.A., 1999. Extension of shelf-life of whole and peeled shrimp with organic acid salts and bifidobacteria. Journal of Food Protect. 62: 51–56.
- A.O.A.C. 2002. The Official method of analysis. (17th ed.). Washington, DC. Association of Official Analytical Chemists.
- A.O.A.C. 2007. The Official Methods of Analysis of AOAC International (18th ed.). Washington, DC. Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg, MD.
- Arashisar, S., Hisar, O., Kaya, M., Yanik, T. 2004. Effects of modified atmosphere and vacuum packaging onmicrobiological and chemical properties of rainbow trout (Oncorynchus mykiss) fillets. International Journal of Food Microbiology, 97 : 209– 214.
- Aubourg, S.P., Perez-Alonso, F., and Gallardo, J.M. 2005. Studies on rancidity inhibition in frozen horse mackerel (Trachurus trachurus) by citric acid and ascorbic acids. European Journal of Lipid Science and Technology, 106: 232-240.
- Aubourg, S.P., 1993. Review: interaction of malondialdehyde with biological molecules—new trends about reactivity and significance.Int. J. Food Science and Technology, 28, 323–335.
- Autio T., Hielm S., Miettinen M., Sjberg A.-M., Aarnisalo K., Bjrkroth J., Mattila-Sandholm T., Korkeala H. Sources of Listeria monocytogenes contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. 1999. Appl. Environ. Microbiol. 65, 150-155.
- Baker, D. A., C. Genigeorgis, J. Glover, and V. Razavilar. 1990. Growth and toxigenesis of Clostridium botulinum type E in fishes packaged under modified atmospheres. International
- Banergee, S. 2006. Inhibition of mackerel (Scomber scomberus) muscle lipoxygenase by green tea polyphenols. Food Research and Technology, 39: 486-491.
- Ben Embarek P.K.1994. Presence, detection and growth of Listeria monocytogenes in seafoods: a review. Int. J. Food Microbiol. 23, 17-34.
- Bhatti, M., Veeranachanani, A., Shelef, L. A. (2004). Factors affecting the antilisterial effects of Nisin in milk. Int. Journal of Food Microbiology. 97:215-219.
- Blom, H., Nerbrink, E., Dainty, R., Hagtvedt, T., Borch, E., Nissen, H., & Nesbakken, T. 1997. Addition of 2.5% lactate and 0.25% acetate controls growth of Listeria monocytogenes in vacuumpacked, vacuum-packed, sensory-acceptable servelat sausage and cooked ham at 4_C. International Journal of Food Microbiology, 38, 71–76.
- Boskou, G., & Debevere, J. 2000. Shelf life extension of cod fillets with an acetate buffer spray prior to packaging under modified atmosphere. Food Additives and Contaminants, 17: 17–25.

- C.D.C, 2009. Multistate Outbreak of E. coli O157:H7 Infections Linked to Eating Raw Refrigerated, Prepackaged Cookie Dough. 2009.
- Cabo, M.L., Herrera,J. J. R., Sampedro, G., Pastoriza, L. 2005. Application of nisin, CO2 and a permeabilizing agent in the preservation of refrigerated blue whiting (Micromesistius poutassou) . J Sci Food Agric, 85: 1733–1740.
- Cakli, S., Kilinc, B., Dincer, T., Tolasa, S. 2006. Comparison of the shelf lifes of map and vacuum packaged hot smoked rainbow trout (Onchoryncus mykiss).J. Eur Food Res Technol , 224: 19–26.
- Cal, K., Sollohub, K. Spray Drying Technique. I: Hardware and Process Parameters.Journal of Pharmaceutical Sciences 2010, 99, (2): 575-586.
- Castellano, P., Belfiore, C., and Fadda, S. 2008. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. Meat Science, 79 : 483–499.
- Chen, H. and Hoover, D. G. 2003. Bacteriocins and their food application. Comprehensive Reviews Food Science and Food Safety, 2: 82- 100.
- Chen, Y.C., Nguyen, J., Semmens, K., Beamer, S., & Jaczynski, J. 2007. Chemical changes in omega-3-enhanced farmed rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fillets during abusive-temperature storage. Food Control, 19: 599–608.
- Chytiri, S., Chouliara, I., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G. 2004. Microbiological, chemical and sensory assessment of iced whole and filleted aquacultured rainbow trout . Journal of Food Microbiology, 21: 157–165.
- Cockey, R. R. and M. C. Tatro. 1974. Survival studies with spores of Clostridium botulinum type E in pasteurized meat of the blue crab Callinectes sapidus. Applied Microbiology 27:629-633.
- Connell, J.J. 1990. Control of Fish Quality. London: Fishing News Book. 3rd edn, p 226.
- Crandall, A.D., Montville, T.J. (1993) Inhibition of Cl. Botulinum growth and toxinogenesis in a model gravy system by coinoculation with bacteriocin producing lactic acid bacteria. J Food Prot, 56: 485–488
- Cutter, C.N., Siragusa, G.R. 1995. Treatments with nisin and chelators to reduce Salmonella and Escherichia coli on beef. Journal of Food Protection, 58, (9): 1028-1030.
- Dalton, C.B., Austin, C.C., Sobel, J., Hayes, P.S., Bibb, W.F., Graves, L.M., Swaminathan, B., Proctor, M.E. and Griffin, P.M. (1997) An outbreak of gastroenteritis and fever due to Listeria monocytogenes in milk. New England Journal of Medicine 336, 100–105.
- Davidson, P. M., Branen, A.L. 2005. Food antimicorbials-an introduction. In Antimicrobialsin Foods, Davidson, P. M.; Branen, A. L.; Sofos, J. N., Eds. CRC Press Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL: 1-10.
- Davidson, P.M., Harrison, M.A. 2002. Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. Food Technology , 56, (11): 69-78.
- Davies, E.A., Bevis, H.E., Potter, R., Harris, J., Williams, G.C., Delves-Broughton, J. 1998, Research note: The effect of pH on the stability of nisin solution during autoclaving. Letters in Applied Microbiology, 27, (3), 186-187.
- Davis, A.R., and Slade, A. 1995. Fare of Aeromonas and Yersinia on modified atmosphere packaged (MAP) cod and trout. Letters in Applied Microbiology, 21: 354-358.
- Dehbandy, A. Motalebi A. Pourgholam R. 2014. The effect of nisin Z on growth of Listeria monocytogenes in surimi of kilka stored iv 4◦ C. International Journal Biosciences. 5, 10, 61-67.
- Delvesbroughton, J., Williams, G.C., Wilkinson, S. 1992. The use of bacteriocin nisin as a preservative in pasteurized liquid whole egg. Letters in Applied Microbiology . 15, (4),133-136. Drying Symposium (IDS 2004), São Paulo, Brazil, 2004; Vol. A, pp 621-627.
- Dillon , R.M. and Patel , T.R .(1992) Listeria in seafoods : a rewiew .J . FoodProtect . 55:009-1015.
- Duffes, F ., Leroi, F., Dousset, X., Boyaval, P. 2000. Use of bacteriocin producing Carnobacterium piscicola strain, isolated from fish, to control Listeria monocytogenes development in vacuum-packed cold-smoked salmon stored at 4 degree C. Sci. Alim.20, 153-158.
- Economou, T., Pournis, N., Ntzimani, A., Savvaidis, I.N. 2008. Nisin–EDTA treatments and modified atmosphere packaging to increase fresh chicken meat shelf-life .Food chemistry. Vol 114. Issue 4.p 147-1476.
- EEC (1995). Total volatile basic nitrogen (TVB-N) limit values for certain categories of fishery products and specifying the analysis methods to be used. Commission Decision 95/149/EEC of 8 March 1995. Official Journal of European Communities, L97, 84–87.
- Embarek, P. K. 1994. Presence, detection, and growth of Listeria monocytogenes in seafoods: A review. International Journal of Food Microbiology 23:17-34.

- Faghani Langroudi , H., Soltani, M., Kamali, K., Ghomi, M.R., Hoseini, S.E., Benjakul, S., Heshmatipour , Z. 2011. Effect of Listeria monocytogenes inoculation, sodiuma cetate and nisin on microbiological and chemical quality of grass carp Ctenopharyngodon idella during refrigeration storage . African Journal of Biotechnology, Vol. 10(42), pp. 8484-8490 .
- FDA, 1988. Nisin preparation: Affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. In 21 CFR Part 184, FDA, Ed ; pp 11247-11251.
- FDA/CFSAN. 2008. Food-borne pathogens: Microorganisms and natural toxins. USA: International Medical Publication.
- Foulquié Moreno, M. R., Rea, M. C., Cogan, T. M. and De Vuyst, L. 2003. Applicability of a bacteriocin-producing Enterococcus faecium as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. International Journal of Food Microbiology 81, 73-84.
- Fowler, G.G., Jarvis, B., Tramer, J., 1975. The assay of nisin in foods. Technical Series,Society for Applied Bacteriology, (8), No. 8, 91-105.
- Frangos, L., Pyrgotou, N., Giatrakou, V., Ntzimani, A., Savvaidis, I.N. 2010. Combined effects of salting, oregano oil and vacuum-packaging on the shelf-life of refrigerated trout fillets. Food Microbiology, 27: 115–121.
- Gelman, A., Glatman, L., Drabkin, V., & Harpaz, S., 2001. Effects of storage temperature and preservative treatment on shelf life of the pond raised freshwater fish,silver perch (Bidyanus bidyanus). Journal of Food Protet.64: 1584–1591.
- Ghalanbor, Z., Korber, M., Bodmeier, R. 2010. Improved Lysozyme Stability and Release Properties of Poly(lactide-co-glycolide) Implants Prepared by Hot-Melt Extrusion.Pharmaceutical Research . 27, (2): 371-379.
- Gibson, D. M. and Davis, H. K. 1995. Fish and shellfish products in sous vide and modified atmosphere pachs. In: Principles of Modified Atmosphere and Sous-vide Product
- Gonza´ lez-Fandos, E., Garcı´a-Linares, M.C., Villarino-Rodrı´guez, A., Garcı´a-Arias, M.T., & Garcı´a-Ferna´ ndez, M.C. (2004). Evaluation of the microbiological safety and sensory quality of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) processed by the sous vide method. Food Microbiology, 2: 193–201.
- Goulas, A.E., and M.G. Kontominas, 2007. Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (Sparus aurata): Biochemical and sensory attributes. Food chemistry, 100: 287-296.
- Gram, L., & Dalgaard, P. 2004. Fish spoilage bacteria – problems and solutions. Current Opinion in Biotechnology, 13: 262–266.
- Gram, L., & Huss, H.H. 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. nternational Journal of Food Microbiology, 33: 121–137.
- Gram, L., Trolle, G., and Huss, H.H. 1987.Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0 °C) and high (20 °C) temperatures.I. Journal of Food Microbiology, 4: 65–72.
- Grisi, T.C & Lira, K.G. 2005. Action of nisin and high ph on growth of Staphylococcus aureus and Salmonella sp. in pure culture and the meat of land crab (Ucides cordatus) . Brazilian Journal of Microbiology . 36: 151-156.
- Gross, E., Morell, J.L., 1971. Structure of nisin. Journal of the American Chemical Society, 93, (18): 4634-4635.
- Guizani, N., Al-Busaidy, M.A., Al-Busaidy,I.M., Mothershaw, A., and Rahman, M.S. 2005.The effect of storage temperature on histamine production and freshness of yellow fin tuna(Thunnus albacores).Food Research International, Vol.38,pp:215-222.
- Guyer,S and jemmi , T .(1991) Behavior of Listeria monocytogenes during incubatiob and storage of exermentally contaminated smokedalmon.Appl.Environ.microbiol .57,1523-1527.
- Haliloglu, H.I., Bayir, A., Sirkecioglu, A.N., Aras, N.M., and Atamana lp, M. 2004. Comparison of fatty acid composition in some tissues of rainbow trot (Oncorhynchus mykiss) living in seawater and freshwater. Food Chemistry, 86: 55-59.
- Hampikyan H. 2009. Efficacy of nisin against Staphylococcus aureus in experimentallycontaminated sucuk, a Turkish-type fermented sausage. Journal of Food Protect. 72(8):1739-43.
- Hozbor, M. C., Saiz, A. I., Yeannes, M. I., & Fritz, R. 2006.Microbiological changes and its correlation with quality indices during aerobic iced storage of sea salmon (Pseudopercis semifasciata). LWTFood Science and Technology, 39: 99–104.
- Hudecová, K., Buchtová, H., Steinhauserová, I. 2010.The Effects of Modified Atmosphere Packaging on the Microbiological Properties of Fresh Common Carp (Cyprinus carpio L.). ACTA VET. BRNO .79. 93-100.

- Huis In't Veld JH.J., 1996. Microbial and Biochemical Spoilage of Foods:An Overview. Int. J. Food Microbiol, 33:1–18.
- Hulin H.O. 1994. Oxidation of lipid, in Seafood Chemistry Processing technology and Quality. F.Shahidi and J. R Botta(Ed), pp: 49-74.
- Hurst, A., 1981. Nisin Advances in Applied Microbiology, 27: 85-123.
- Huss, H. H., 1971. Prepackaged fresh fish. In: Kreuzer, R. Fish inspection and quality control. London: Fishing News(Books) Limited. Pp. 60-65.-
- Huss, H., Zagorec, M (b). 1995. Biopreservation of Fish Products- A Review of Recent Approaches and Results. J. of Aquatic Food Product Technology 4 (2): 5 -26.
- Huss, H.H. (a) 1995. Quality and quality change in fresh fish . FAO fisheries Technical paper. No.348. Food and Aqriculture organization(FAO) of the united Nations, Rome, Italy.
- Huss, H.H. 1998. Fresh Fish Quality and Quality Changes ,FAO Fisheries Series,No 29,FAO,Rome.
- ICMSF ''International Commission on Microbiological Specification for Foods'' (1986). Microorganisms in foods. 2. Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications (2nd ed.). Buffalo, NY:University of Toronto Press.
- Ita, P. S., & Hutkins, R. W. 1991. Intracellular pH and survival of Listeria monocytogenes Scott A in tryptic soy broth containing acetic, lactic, citric and hydrochloric acids. J. Food Prot, 54(1): 15–19.
- Jack R.W., Tagg J.R., Ray B., 1995. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. Microbiol, Rev. 59: 171-200.
- Jasour, M.S., Rahimabadi, E.Z., Ehsani, A., Rahnama, M., Arshadi, A., 2011. Effects of Refrigerated Storage on Fillet Lipid Quality of Rainbow Trout (Oncorhynchus Mykiss) Supplemented by a-Tocopheryl Acetate Through Diet and Direct Addition after Slaughtering. J Food Process Technol, 2: 124.
- Jay, J.M. 2000. In James M. Jay (Ed.), Modern food microbiology (6thed., pp. 268). aithersburg, MA, USA: Aspen Publishers.
- Jensen, J.M., Robbins, K.L., Ryan, K.J., Homco-Ryan C., McKeith, F.K. &Brewer M.S. 2003. Effects of lactic and acetic acid salts on quality characteristics of enhanced pork during retail display. Meat Sci, 63: 501-508.
- Jones, R., Hussein, H.M., Zagorec, M. 2008: Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat Food microbiology, 25: 228-234.
- Journal of Food Microbiology 10:269-289.
- Juliano, R.L. 1978. Drug delivery systems: A brief review. Canadian Journal of Physiologyand Pharmacology , 56, (5): 683-690.
- Jumah, R.Y., Tashtoush, B., Shaker, R.R., Zraiy, A.F., Manufacturing parameters and quality characteristics of spray dried jameed. Drying Technology 2000, 18, (4-5): 967-984.
- Juncioni de Arauz, L., Faustino Jozala, A., Gava Mazzola, P., Vessoni Penna, T. Ch. 2009. Nisin biotechnological production and application-A review.Trend. Science and Technology. 20: 146-154.
- Kashiri, H., Haghparast, S., and Shabanpour, B. 2011. Effects of Sodium Salt Solutions (Sodium Acetate, Lactate and Citrate) on Physico-chemical and Sensory Characteristics of Persian Sturgeon (Acipenser persicus) Fillets under Refrigerated Storage . Journal of Agricultural Technology, 13: 89-98.
- Katla, T., Moretro, T., Aasen, I. M., Holck, A., Axelsson, L., Naterstad, K. 2001. Inhibition of Listreia monocytogenes in cold smoked salmon by addition of sakacin P and or live Lactobacillus sakei cultures. Food Microbiology, 18:431-439
- Kim, C. R., Hearnsberger, J. O., Vickery, A. P., White, C. H., & Marshal, D. L. 1995. Extending shelf life of refrigerated catfish fillets using sodium acetate and mono potassium phosphate. J. Food Preserv, 58: 644–647.
- Klinkesorn, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., Decker, E.A., and McClements, D. J.2006. Characterization of spray-dried tuna oil emulsified in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition . Food Research International. 39:449–457.
- Kose, S., Karacam, H., Kutlu, S., and Boran, M. 2001.Investigating the shelf- life of the anchovy dish called .Hamsikusu. in frozen storage at -18±1ºc .Turk. J. Vet. Anim Sci .25: 651-656.
- Kostaki, M., Giatrakou, V., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G. 2009. Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (Dicentrarchus labrax) fillets. Food Microbiology, 26: 475–482.
- Lakshmanan, P.T. 2000. Fish spoilage and quality assessment. In T. S. G. Iyer, M. K. Kandoran, Mary Thomas, & P. T. Mathew (Eds.), Quality assurance in seafood processing (pp. 26–40). Cochin: Society Fisher Techno (India).
- Lauzon, H.L. 2002. Development of biological control for Listeria spp.. in the manufacture of cold –smoked fish. Project Report. Icelandic Fisheries Laboratories.

- Lawton, J.W., 2002. Zein: A history of processing and use. Cereal Chemistry, 79, (1): 1-18.
- Lee, Y.L., Cesario, T., Owens, J., Shanbrom, E., & Thrupp, L.D. 2002.Antibacterial activity of citrate and acetate. Nutrition, 18: 665–666.
- Leistner, L., Gorris, L. M. G. 1995. Food preservation by hurdle technology. Trends Food Science and Technology. 6:35-67.
- Losada, V., Go´mez, J., Maier, L., Marı´n Ma, E., Vinagre, J., Larraı´n, M. A. 2004. Lipid damage assessment during Coho salmon (Oncorhynchus kisutch) chilled storage. In 34th WEFTA meeting, 12–15 September 2004, Lu¨beck, Germany.
- Lungu, B., Johnson, M.G. 2005. Fate of Listeria monocytogenes inoculated onto the surface of model Turkey frankfurter pieces treated with zein coatings containing nisin, sodium diacetate, and sodium lactate at 4 degrees C. Journal of Food Protect,68 (4): 885-889.
- Lyhs, U., Lahtinenb, J., Schelvis-Smit, R. 2007. Microbiological quality of matjes herring stored in air and under modified atmosphere at 4 and 10°C.Food Microbiol, 24: 508-516.
- Lyver, A., Smith, J.P., Austin, J. and Blanchfield, B. 1998. Competitive inhibition of Clostridium butulinum type E by Bacillus speciec in a value-added seafood product package under a modified atmosphere. Food Research International 31:311-319.
- Maca, J. V., Miller, R. K., & Acuff, G. R. 1997. Microbiological, sensory and chemical characteristics of vacuum-packaged ground beef patties treated with salts of organic acids. J. Food Sci, 62: 591–596.
- Manju, S., Leema Jose., Srinivasa Gopal**,**T.K., Ravishankar, C.N., & Jose, L. 2007**.**Effects of sodium acetate dip treatment and vacuum-packaging on chemical**,**microbiological, textural and sensory changes of Pearlspot (Etroplus suratensis(during chill storage. Food Chem, 102(1): 27–32.
- Masniyom, P. 2010 . Deterioration and shelf-life extension of fish and fishery products by modified atmosphere packaging . journal of Science and Technology. 33 (2): 181-192.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., Tauxe, R.V. 1999. Food-related illness and death in the United States. Emerging Infectious Diseases . 5, (5): 607-625.
- Mirdamadi, S., Agha Ghazvini, Sh., Falahpour, M., Aziz Mohseni , F. 2010. Study of antimicrobial effect of nisin, encapsulated nisin in liposomes and Lactococcus lactis as a nisin producer on food born pathogens.International food conference of food innovation.
- Miserendino, T.; Demirci, A.; Pongtharangkul, T. 2008. Nisin production by immobilized microbial cell culture during batch and fed-batch fermentations with various pH profiles. Agricultural Engineering International, 10, Manuscript FP 07 016.
- Mohan, C.O. Ravishankar, C.N, Gopal, T.K.S, Lalitha KV, Kumar, K.A . 2010**.**Effect of reduced oxygen atmosphere and sodium acetate treatment on the microbial quality changes of seer fish (Scomberomorus commerson) steaks stored in ice. Food Microbiology., In press**.**
- Moosavi, M.H., A.,Akhonzadeh Basti., A. Misaghi. 2008. Effect of Zataria multiflora Boiss. essential oil and nisin on Salmonella typhimurium and Staphylococcus aureus in a food model system and on the bacterial cell membranes .Food research international . Vol 40.p 1050-1057.
- Moreau DL, Rosenberg M. 1998. Porosity of whey protein-based microcapsules containing nhydrous milk fat measured by gas displacement pycnometry. Journal of Food Science. 63(5):819–23.
- Mulders, J.W. M., Boerrigter, I.J., Rollema, H.S., Siezen, R.J., Devos, W. M. 1991. Identification and characterization of the lantibiotic nisin-Z, a natural nisin variant. European Journal of Biochemistry, 201, (3): 581-584.
- Naidu, S.A. 2000. Natural food antimicrobial system, (1st ed.) CRC press. Washington, USA .
- Nishimoto, J., Suwetja, I.K., and Miki, H. 1985.Estimation of keeping freshness period and practical storage life of mackerel muscle during storage at low temperatures. Memoirs of the Faculty of isheries Kagoshima University, 34(1): 89–96.
- Nostro, A., Scaffaro, R., Ginestra, G., D'Arrigo, M., Botta, L., Marino, A., Bisignano,G. 2010. Control of biofilm formation by poly-ethylene-co-vinyl acetate films incorporating nisin.Applied Microbiology and Biotechnology, 87, (2): 729-737.
- Nykanen, A., Lapvetela¨inen, A., Kallio, H., & Salminen, S. 1998. Effects of whey, whey-derived lactic acid and sodium lactate on the surface microbial counts of rainbow trout packed in vacuum pouches. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie/LWT-Food Science and Technology, 31: 361–365.
- Nykänen, A., Weckman, A. Lapveteläinen .2000. Synergistic inhibition of Listeria monocytogenes on cold-smoked rainbow trout by nisin and sodium lactate . International Journal of Food Microbiology. Vol 6,Issu 1,page 63-72.
- Oguzhan, P., Angis, S. 2012. Effect of Salting and Packaging Treatments on Fresh Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss) Fillets During Storage at Refrigerator Temperatures. J.Vet Fak Derg. 28: 54-63.

- Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H., Hosseini, S.M.H. 2010. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. Food Chemistry .120: 193–198.
- Olafsdottir, G., Martinsdottir, E., Oehlenschlager, J., Dalgaard, P., jensen, B., and Undeland, I. 1997.Methods to evaluate fish freshness in research and
- Ordonez, J. A., Lopez-Glavez, D. E., Fernandez, M., Hierro, E., De-La Hoz, L., 2000. Microbial and physicochemical modifications of hake steaks stored under carbon dioxide enriched atmospheres.Journal of the Science of Food and Agriculture 80, 1831-1840.
- Özogul, F., Polat, A., Özogul, Y. 2006. The effects of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (Sardina pilchardus). Food Chemistry. 85: 267-273.
- Ozogul, F.,Taylor, K. D. A. Quantick, P. and Ozogul, Y. 2000. Chemical, microbiological and sensory evalution of Atlantie(Clupea harengus) stored in ice, modified atmosphere and vacuum pack. Food Chemistry. 71: 267-273.
- Özyurt, G., Kuley, E., Özkűtűk, S., And Özogul, F. 2009. Sensory, microbiological and chemical assessment of the freshness of red mullet (Mullus barbutus) and goldband goatfish(Upeneus moluccensis)during storage in ice. Food Chemistry,Vol.114,pp:505-510.
- Pacheco-Aquilar, R., Lugo-Sanchez, M.E. and Robles-Burgueno, M.R. 2000. Post mortem biochemical and functional characteristic of Monterey sardine muscle stored at 0°c. J. Food Sci,65(1): 40-47.
- Palumbo, S. A., & Williams, A. C. 1994. Control of Listeria monocytogenes on the surface of frankfurters by acid treatments. Food Microbiology, 11, 293–300.
- Pearson, D., 1994. Laboratory technic in food analysis. Butter Worth. London, UK. Pp. 256-270.
- Peck, M.W. Goodburn, K.E. Betts, R.P. 2006. Clostridium botulinum in vacuum packed (VP) and modified atmosphere packed (MAP) chilled foods. Final Project Report (B13006) .
- Perez-Alonso, F., Arias, C., and Aubourg, S.P. 2003. Lipid deterioration during chilled storage of Atlantic pomfret (Brama brama). European Journal of Lipid Science and Technol. 105: 661- 667.
- Peterson , M, E. et .al .(1993) Parameters for control Listeria monocytogens is smoked fishery products : sodium chloride packagingethod.J.Food. Pro. vol .56, no .11, pp.938-943..
- Qvist, S., Sehested, K., & Zeuthen, P. 1994. Growth suppression of Listeria monocytogenes in a meat product. International Journal of Food Microbiology, 24, 283–293.
- Rasmussen, S.K.J., Ross, T., Olley, J., & McMeekin, T. 2002. A process risk model for the shelf life of Atlantic salmon fillets. International Journal of Food Microbiology, 73: 47–60.
- Reagan D.R., Doebbeling, B.N.P. faller, M.A . 1991. Elimination of coincident Staphylococcus aureus nasal and hand carriage with intranasal application of mupirocin calcium ointment. Ann Intern Med, 114, (2):101-6.
- Rezaei, M., Hosseini, S. 2008. Quality assesssment of farmed rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) during Chilled Storage. Journal of Food Science; 73: 93-6.
- Rorvik L.M., Caugant D.A., Yndestad M.: Contamination pattern of Listeria monocytogenes and other Listeria spp. in a salmon slaughterhouse and smoked salmon processing plant. 1995. Int. J. Food Microbiol. 25, 19-27.
- Ruiz-Capillas, C., & Moral, A. 2005. Sensory and biochemical aspects of quality of whole bigeye tuna (Thunnus obesus) during bulk storage in controlled atmospheres. Food Chemistry, 89(3): 347–354.
- Sallam, K.I. 2007. Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. Food control, 18(5): 566-575.
- Sallam, Kh. I., & Samejima, K. 2004. Microbiological and chemical quality of ground beef treated with sodium lactate and sodium chloride during refrigerated storage. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie/ LWT-Food Science and Technology, 37: 865–871.
- Sallam, Kh.I. 2006. Chemical, sensory and shelf life evaluation of sliced salmon treated with salts of organic acids .Journal of Food Chemistry, 101,(2): 592-600.
- Salmaso, S., Elvassore, N., Bertucco, A., Lante, A., Caliceti, P. 2004.Nisin-loaded poly-L-lactide nano-particles produced by CO2 anti-solvent precipitation for sustained antimicrobial activity. International Journal of Pharmaceutics, 287, (1-2): 163-173.
- Samelis, J., Bedie, G. K., Sofos, J. N., Belk, K. E., Scanga, J. A., & Smith, G. C. 2002. Control of Listeria monocytogenes with combined ntimicrobials after postprocess contamination and extended storage of frankfurters at 4_C in vacuum packages. Journal of Food Protection, 65, 299–307.

- Samelis, J., Bedie, G.K., Sofos, J.N., Belk, K.E., Scanga, J.A., and Smith, G.C. 2005. Combinations of Nisin with Organic Acids or Salts to Control Listeria monocytogenes on Sliced Pork Bologna Stored at 4°C in Vacuum Packages. LWT Food Sci. Technol. 38: 21–28.
- Savvaidis, I.N., Skandamis, P.N., Riganakos, K.A., Panagiotakis, N., Kontominas, M.G. 2004. Control of natural microbial flora and Listeria monocytogenes in vacuum packaged trout at 4 and 10°C using irradiation. Journal of Food Protect,65: 515–522.
- Schillinger, U., Becker, B., Vignolo, G. and Holzapfel, W.H. 2001. Efficacy of nisin in combination with protective cultures against Listeria monocytogenes Scott A in tofu. International Journal of Food Microbiology 71, 159-168.
- Shirazinejad, A., R.Noryati, A., Rosma and Darah, I. 2010 . Inhbitory effect of lactic acid and nisin on bacterial and spoilage of chilled shrimp .World academy of science engineering and technology .65: 163-167.
- Siddaih D., Vdya G., Raju C. V., Chandracekhar T. C. 2000. "Changes in lipids, protein and kamaboko forming ability of Silver carp (Hypophthalmichthys molitrix) mince during frozen storage"; Journal of Food Research International;34: 47-53.
- Skandamis, P.N. Stopforth, J.D. Sofos, J.N. 2007. Modeling the Effect of Storage Atmosphere on Growth–No Growth Interface of Listeria monocytogenes as a Function of Temperature, Sodium Lactate, Sodium Diacetate, and NaCl. Journal of Food Protection, 70, 10, 2329–2338.
- Stevens, K. A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A., Klaenhammer, T.R., 1991. Nisin treatment for inactivation of Salmonella species and other Gram-negative bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 57, (12): 3613-3615.
- Stiles, M.E. 1994. Potential for biological control of agents of foodborn disease. Food Research International 27:245-250.
- Stodolnik, L., Stawicka, A., Szczepanik, G., and Aubourg, S.P. 2005. Rancidity inhibition study in frozen whole mackerel (Scomber scombrus) following flaxseed (Linum usitatissimum) extract treatment. Grasas y Aceites.56 (3): 198-204.
- Thomas, L.V. D.-B., J . 2005. Nisin. . In Antimicrobials in Food,, 3rd ed ed.; Davidson, P. M.S., J. N.; Branen, A. L Ed. CRC Press Taylor & Francis Group, LLC: Boca Raton, FL,;pp 237-273.
- Tina,M .1996. Source of liseria monocytogenes contamination in acold - smoked Rainbow trout processing plant detected by : pulsed–fieldGel Electrophoresis typing. Applied and Environment Microbiology,no.56 p.155-160.
- Tome, E., Teixeira, P, A. Gibbs, P. 2006. Anti-listerial inhibitory lactic acid bacteria isolated from commercial cold smoked salmon. Food Microbiology, 23: 399-405
- USFDA. 1987. Composition of foods, 15. Fish and shellfish. Agricultural Handbook number 8. US Government Printing Office, Washington, DC.
- USFDA. 1995.Bacteriological/analytical manual (8th Ed.)AOAC International,Gaithersburg ,MD 20877,USA:United States Food and Drug Administration.
- Vandenbergh, P.A. 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. FEMS.Microbiology.Review. 12(13): 221-238.
- Varnam AH, Evans MG. 2005. Food-borne pathogens, anillustrated text,3th ed, Manson Publications.p: 83-157.
- Vaz-Velho, M., Todorov, S., Ribeiro, J., Gibbs, P. 2005. Growth control of listreia innocua 2030c during processing and storage of cold-smoked salmon – trout by Carnobacterium divergens V41 culture and supernatant. Food Control, 16: 541-549
- Vescovo, M., Scolari, G. and Zacconi C. 2005. Inhibition of listreia innocua growth by antimicrobial – producing lactic acid culture in vacuum – packed cold smoked salmon . Food Microbiology 23 : 689-693.
- Vongsawasdi, P., Nopharatana2, M., Supanivatin, P.,Promchana, M. 2012.Effect of nisin on the survival of Staphylococcus aureus inoculated in fish balls. As Journal of Agricultural -Industry, 5(01), 52-60.
- Wei, L., Hansen, J.N. 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by Lactococcus lactis. Applied and Environmental Microbiology,56, (8): 2551-2558.
- Weiss, A. and Hammes W. P. 2005. Lactic acid bacteria as protective cultures against Listeria spp. on cold-smoked salmon. European Food Research and Technology
- Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Bierbaum, G., de Kruijff,B., Sahl, H.A. 2001. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. Journal of Biological Chemistry, 276, (3): 1772-1779.
- Wolf, C.E., Gibbons, W.R. 1996. Improved method for quantification of the bacteriocin nisin. Journal of Applied Bacteriology, 80, (4): 453-457.

- 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.
- Xiao, D., & Zhong, Q. 2011. In vitro release kinetics of nisin as affected by Tween 20 and glycerol co-encapsulated in spray-dried zein capsules . Journal of Food Engineering. 42, (1):75-83.
- Yin, L.J., Wu, C.W. and Jiang, S.T. 2007. Biopreservative effect of pediocin and nisin on refrigerated seafood. Fisheries Science, 73(4): 907-912.
- Zhong, Q., Tian, H., Zivanovic, S. 2009. Encapsulation of fish oil in solid zein particles by liquid-liquid dispersion. Journal of Food Processing and Preservation, 33, (2): 255-270.
- Zhong, Q.; Jin, M.; Xiao, D.; Tian, H.; Zhang, W. 2008. Application of supercritical anti-solvent techniques for syntheses of delivery systems of bioactive food components. Food Biophysics, 3, (2), 186-190.
- Zhuang, R.Y., Huang, Y.W., & Beuchat, L. R. 1996. Quality changes during refrigerated storage of packaged shrimp and catfish fillets treated with sodium acetate, sodium lactate or propyl gallate. J. Food Sci, 61: 241–244.

Abstract

Nisin is a natural antimicrobial and has inhibitory effect on the pathogens and spoilage organisms. The efficiency of nisin reduced after reaction with food compounds. There is the hypothesis that combination of nisin with organic salt increases the shelf life of fish. The purpose of this study was mainly to evaluate the effects of nisin (0.15 %) and sodium acetate
(1%) individually and in combination on shelf life of fillets and whole trout (without viscera). then, the behavior of Listeria monocytogenes and Clostridium botulinum type E were evaluated in different time at 4^0C. Physical and chemical parameters including: pH, Peroxide Value (PV), Tiobarbithoric Acid (TBA) and Total Volatile Nitrogen (TVN) and bacterial factors such as Total Viable Count (TVC), Pscycrothophic Count (PTC) and Lactic Acid Bacteria (LAB) were examined. These parameters were done at intervals of 4 days for 16 days. Results showed that chemical and bacterial factors of whole trout (*Oncorhynchus mykiss*) ((without viscera) have been more favorable than the fillets . It also showed that the peroxide value , the thiobarbituric acid, volatile nitrogen bases , and pH in combination of sodium acetate and nisin Z treatments were exposed to significantly compared to control treatments (no preservatives) ($P<0.05$). Treatments with sodium acetate and nisin Z (individual) were exist after combination treatment. Hence it can be concluded that the maximum shelf life of in preservative treatments was 16 days , but control treatment was 12 days in some cases and in some cases 16 days. Effects of treatments on Listeria monocytogenes and Clostridium botulinum in the control treatment showed the highest growth was observed in both species (log 8) but in single and combined treatment of bacterial growth slower , but is still the trend the 16th day of so Listeria and Clostridium log 5 to log 6 , respectively. Vegetative cells of Clostridium were more sensitive in compare to Listeria. When using preservatives (chemical or biological) in fish tissue, parameters such as the type of preservative, used method, pH, proteolytic enzymes, the incidence of resistant strains and so on influence of antimicrobial agents used. The overall conclusion of the study was shelf life of whole trout (without viscera) was more than fillets, combination of nisin and sodium acetate were better than other treatment and finally higher doses of bilogival preservatives are need to for achieve to significant reduction of pathogenic bacteria .

Key words: Nisin Z, Sodium acetate, *Rainbow trout*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute – Caspian Sea Ecology Research Center

---

Project Title : The use of Lactic Acid Bacteria metabolites (nisin and organic acids) for the shelf life extension of trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their,s effect on dominant bacteria in inoculation study
Approved Number: 4-76-12-89056
Author: Reza Safari
Project Researcher : Reza Safari
Collaborator(s) *:* Yaghobzadeh, Z, Bankehsaz, A.A. Motalebi
Advisor(s): -
Supervisor: A.Ghoroghi
Location of execution : Mazandaran province
Date of Beginning : 2010
Publisher : Iranian Fisheries Science Research Institute
Date of publishing : 2016

All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute - Caspian Sea Ecology Research Center

Project Title :

The use of Lactic Acid Bacteria metabolites (nisin and organic acids) for the shelf life extension of trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their,s effect on dominant bacteria in inoculation study

Project Researcher :

Reza Safari

Register NO.

48611