بررسی اثر ضد باکتریایی پوشش خوراکی کیتوزان همراه با عصارهٔ آبی میوه گیاه پنیرباد (*Withania coagulans*) بر فیله ماهی کپور نقره‌ای طی نگهداری در یخچال

مریم صادقی[۱]، علی ارشدی*[۱]، جواد میردار هریجانی[۱]، فاطمه حدادی[۲]

*arshadi@uoz.ac.ir

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۸

چکیده

امروزه مواد بسته‌بندی ضد باکتریایی به عنوان یکی از فنآوریهای نوین به منظور جلوگیری از گسترش فساد و میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا از طریق موادغذایی مورد توجه می‌باشند. مطالعه حاضر به منظور بررسی تأثیر ضدباکتریایی پوشش کیتوزان به همراه عصارهٔ آبی میوه پنیرباد (*Withania coagulans*) بر افزایش زمان ماندگاری فیله کپورنقره ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) انجام شد. فیله ها در ۶ تیمار و ۳ تکرار طی ۱۸ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تیمارها شامل: تیمار بدون پوشش، عصارهٔ ۰/۵درصد، عصارهٔ ۱ درصد، کیتوزان ۱ درصد، کیتوزان ۱ درصد با عصارهٔ ۰/۵درصد و کیتوزان ۱درصد با عصارهٔ ۱ درصد بود. جمعیت باکتریایی (شمارش کلی باکتری‌ها و شمارش باکتری‌های سرمادوست) نمونه‌ها در روزهای صفر، ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵ و ۱۸ نگهداری فیله ها در یخچال مورد بررسی قرار گرفت. در طول دوره نگهداری تمامی تیمارهای دارای پوشش کیتوزان و عصاره در ارزیابی‌های باکتریایی دارای اختلاف معناداری با تیمار شاهد بودند ($p<۰/۰۵$). بیشترین مقدار شمارش کلی باکتریها و باکتریهای سرمادوست تا روز ۱۸ به ترتیب مربوط به تیمار شاهد (۸/۰۳±۰/۰۲ و ۸/۱۶±۰/۰۲) و کمترین آن مربوط به پوشش کیتوزان ۱ درصد با عصاره ۱ درصد (۵/۷۹±۰/۰۱ و ۶/۱۰±۰/۰۳) بود. نتایج حاصل نشان دهنده تأثیر ضدباکتریایی قوی پوشش خوراکی کیتوزان ۱ درصد با عصاره ۱ درصد بود که تأثیر معناداری بر کاهش مقدارکل باکتری‌ها و تعداد باکتریهای سرمادوست و همچنین افزایش زمان ماندگاری فیله‌های پوشش‌دار گردید.

لغات کلیدی: پوشش خوراکی، افزایش ماندگاری، کپور نقره ای، عصاره آبی میوه پنیرباد

*نویسنده مسئول

مقدمه

رشد باکتریایی یکی از دلایل اصلی فساد گوشت و فرآورده های گوشتی است که تغییرات نامطلوبی در این فرآورده‌ها ایجاد می‌کند و در نتیجه، سبب بروز مسمومیت های غذایی و مرگ و میر مصرف‌کنندگان و همچنین ایجاد خسارت‌های قابل ملاحظه اقتصادی می‌شود. آلودگی باکتریایی می‌تواند در ۳ سطح وارد زنجیره فرآوری محصولات شیلاتی شود: (۱) آب محیط زیست و پرورش آبزی، (۲) محیط کارخانه فرآوری، بسته‌بندی یا کنسروسازی محصول و (۳) محیط آماده سازی محصول در آشپزخانه جهت تهیه غذا (Barros-Velázquez, 2016). گوشت ماهی به دلیل ترکیبات بیولوژیک قدرت فساد پذیری بالایی دارد بطوریکه بلافاصله پس از مرگ شروع می‌شود. فساد ماهی خام، عمدتاً به ۳ دلیل فعالیت آنزیمی، میکروبی و شیمیایی صورت می‌گیرد. در بین این سه مورد، فساد ماهی که به دلیل وجود باکتری‌ها اتفاق می‌افتد، به عنوان یک خطر برای سلامتی انسان، نگرانی بیشتری دارد. فساد باکتریایی ماهی به دلیل رشد باکتری، آزاد شدن آنزیم‌های خارج سلولی یا درون سلولی باکتری اتفاق می‌افتد که با تغییر رنگ، بو، بافت، تشکیل لعاب، تجمع گاز و تجمع مایع همراه است (Dhanya and Mathew, 2017).

فساد باکتریایی به علت استفاده باکتری‌های عامل فساد از اسید آمینه‌های آزاد و تولید محصولات مختلف انواع آمین‌ها از تری متیل آمین و آمونیاک اتفاق می‌افتد (نقدی و همکاران، ۱۳۹۸). برای به تعویق انداختن فساد ماهی و فرآورده‌های آن، راهکارهای متعددی ارائه شده است که از جمله می‌توان به کنترل درجه حرارت و کاهش آن، بسته‌بندی در اتمسفر تغییر یافته، پوشش‌دار کردن و نیز استفاده از آنتی اکسیدان‌ها اشاره کرد. پوشش‌های خوراکی لایه‌ای نازک از مواد قابل خوردن است که به شکل مایع می‌باشد و با غوطه‌وری، واکس زدن و اسپری کردن محصول مورد نظر به صورت پوششی روی آن قرار می‌گیرد. این پوشش‌ها با منشأ پلی ساکارید، پروتئین و چربی می‌توانند عمر ماندگاری فرآورده‌های غذایی را افزایش دهند زیرا به عنوان سدی در برابر انتقال رطوبت، گازها و مواد محلول عمل می‌کنند. همچنین این روکش‌ها به دلیل زیست تخریب‌پذیر بودن آنها در بین مصرف‌کنندگان از محبوبیت بسیاری برخوردار هستند. در نتیجه، استفاده از پوشش‌های خوراکی حاوی مواد فعال ضد باکتریایی می‌توانند مفید واقع شوند(Ojagh *et al.*, 2010). کیتوزان یکی از منابع پلی ساکاریدی غیرسمی و تجدیدپذیر زیستی فراوان است که از منابع مختلف همانند پوسته سخت پوستان از قبیل میگو، خرچنگ استحصال می‌شود که با توجه به ویژگی‌های مناسب این پلی ساکارید برای تولید انواع فیلم‌ها مناسب است که می‌توانند به عنوان روکش پایه مورد استفاده قرار گیرند (نقدی و همکاران، ۱۳۹۸). پوشش کیتوزان با غلظت یک درصد بهترین خواص ضد باکتریایی، ضدقارچی و آنتی اکسیدانی را در گوشت دارد (Lopez-Caballero *et al.*, 2005). گیاه پنیرباد (*Withania coagulans*) از خانواده سیب‌زمینیان است که از ۲۳ گونه گیاهی متعلق به این جنس تنها ۲ گونه *Withania somnifera* و *W. coagulans* در ایران گزارش شده است. گیاه کمیاب پنیرباد بومی استان سیستان و بلوچستان می باشد که بخش‌های مختلف گیاه پنیرباد بیش از ۲۵۰۰ سال است که در طب سنتی کشورهای جنوب آسیا استفاده می‌شود (عزیزیان شرمه و همکاران، ۱۳۹۶).

میوه، برگ و ریشه گیاه پنیرباد دارای ترکیبات پلی فنلی، آلکالوئیدها و لاکتون‌های استروئیدی موسوم به ویتانولیدها (ویتافرین A) است که دارای اثرات داروئی، آنتی اکسیدانی قوی و ضدباکتریایی می‌باشند (Singh and Kumar, 2011) که با تغییر در ساختار لایه لیپوپلی ساکاریدی غشاء خارجی باکتری سبب تراوش آنزیم‌ها و مواد مغذی مختلف می‌شوند (Ojha *et al.*, 2014؛ Beigomi *et al.*, 2014؛ Sarbishegi *et al.*, 2016). دمای یخچالی برای نگهداری بسیاری از مواد غذایی به صورت تازه و غیر منجمد مورد استفاده است ولی در مورد ماهی و فرآورده های آن به دلیل رشد میکروب‌های سرمادوست به همراه تجزیه آنزیمی و بیوشیمیایی، فساد ایجاد خواهد شد (خضری احمدآباد و همکاران، ۱۳۹۱). در این شرایط استفاده از برخی نگهدارنده‌ها برای افزایش مدت ماندگاری

آنها ضروری بنظر می‌رسد. یکی از مزیت‌هایی که پوشش‌های حاوی مواد ضدباکتریایی دارند، آزاد کردن تدریجی ترکیبات ضد باکتریایی در سطح ماده غذایی است. پوشش‌های خوراکی طبیعی مختلف به تنهایی یا به عنوان حامل مواد فعال (مواد ضدمیکروب، آنتی اکسیدان‌ها، طعم دهنده‌ها، مواد مغذی و رنگ‌ها) در افزایش ماندگاری و بهبود کیفیت مواد غذایی تازه و منجمد استفاده می‌شود. بنابراین، استفاده از ضد باکتری‌های طبیعی عصاره گیاهی در ترکیب با فیلم‌های خوراکی بدست آمده از پلیمرهای طبیعی راه حلی برای محدود کردن فساد باکتریایی است (Jeyakumari *et al*., 2016). اثر ضد باکتریایی و ضداکسیدانی عصاره گیاهان مختلف بر مدت زمان ماندگاری فیله ماهیان مانند استفاده از عصاره گیاه رزماری (اعتمادی و همکاران، ۱۳۸۷)، موسیر (پزشک و همکاران، ۱۳۹۰)، آویشن (شعبانپور و همکاران، ۱۳۹۰)، اسانس مرزنجوش (عزیزی و همکاران، ۱۳۹۶) و عصاره سبوس برنج (جرجانی و همکاران، ۱۳۹۷) بر فیله قزل آلا، عصاره آویشن بر فیله سی باس اروپایی (Kostaki *et al*., 2009) و عصاره هسته انگور و گل میخک بر فیله کپورنقره‌ای (Shi *et al*., 2014) اشاره نمود. ترکیبات فعال زیستی عصاره اندام‌های مختلف گیاه پنیرباد از جمله برگ، میوه نرسیده، کاسه گل و میوه رسیده (Singh and Kumar, 2011; Singariya *et al*., 2012؛ Bokaeian and Saeidi, 2015؛) به عنوان آنتی بیوتیک طبیعی قوی بر ضد باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد. هرچند کاربرد پوشش خوراکی سبب کاهش سرعت افت کیفیت می‌شود اما در صورتی که در ترکیب پوشش خوراکی از مواد با خاصیت ضدباکتریایی مناسب استفاده نشود، نمی‌توان انتظار خاصیت ضدباکتریایی زیادی را از این پوشش داشت. با توجه به تولید بالای ماهی کپور نقره ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) در سال و ارزش غذایی بالای آن، جهت نگهداری و به تعویق انداختن فساد محصولات آن باید از روش‌های نگهداری مدرن مانند: پوشش‌دار کردن و استفاده از عصاره گیاهان با خواص ضدباکتریایی استفاده کرد. مطالعه‌ای در خصوص اثر عصاره گیاه پنیرباد بر ماندگاری گوشت و آبزیان یافت نشد. در این مطالعه اثر ضدباکتریایی پوشش کیتوزان و عصاره آبی میوه پنیرباد بر فیله کپورنقره ای در یخچال بررسی شد.

روش کار

ماهی کپورنقره ای به صورت زنده از بازار ماهی فروشان در شهر زابل خریداری شد و همراه با یخ به آزمایشگاه آنالیز باکتریایی و شیمیایی آبزیان گروه شیلات در دانشگاه زابل منتقل شدند. پس از سرزنی، تخلیه امعاء و احشاء ماهیان، از فیله‌ها برای انجام تیمارهای مختلف استفاده شد. به منظور تهیه محلول پوشش‌دهی، از محلول‌های کیتوزان (شرکت سیگما آلدریچ، آمریکا) با غلظت ۱ درصد (وزنی/حجمی)، استفاده شد. جهت استخراج عصاره آبی بوسیله اولتراسوند (امواج فراصوت)، ابتدا مقدار ۵۰ گرم نمونه پودر شده میوه پنیرباد را با نسبت ۱ به ۱۰ (وزنی/حجمی)، با ۵۰۰ میلی لیتر حلال (آب مقطر) مخلوط گردید. نمونه و حلال به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با فرکانس ۳۷ کیلو هرتز در دستگاه اولتراسوند (Ultranssonic 1500، شرکت Scientz کشور چین) قرار داده شد و برای جلوگیری از افزایش دما، از گردش آب سرد در مدت زمان استخراج استفاده شد. سپس مخلوط نمونه و حلال به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق روی شیکر قرار داده شد. پس از آن مخلوط حاصل با استفاده از پمپ خلأ و قیف بوخنر و کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ صاف گردید، در پلیت ریخته شد و در آون با دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت تا عصاره کاملاً خشک و عاری از حلال شود. سپس عصاره‌های استخراجی حاصل تا زمان انجام آزمایش‌های بعدی در ظروف تیره درون فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (Goli *et al*., 2005). در این تحقیق ۶ تیمار (با ۳ تکرار) به ترتیب ذیل مورد بررسی قرار گرفتند: تیمار اول شاهد (بدون پوشش)، تیمار دوم (عصاره ۰/۵ درصد)، تیمار سوم (عصاره ۱ درصد)، تیمار چهارم (کیتوزان ۱ درصد)، تیمار پنجم (کیتوزان ۱ درصد با عصاره ۰/۵ درصد)، تیمار ششم (کیتوزان ۱درصد با عصاره ۱ درصد) بودند. جهت ایجاد پوشش بر سطح فیله ها، ابتدا

فیله ها به مدت ۱ دقیقه در محلول‌های تهیه شده غوطه‌ور گردیدند. سپس آنها را از محلول‌ها خارج نمودند و پس از گذشت تقریباً ۲ دقیقه، مجدداً ۱ دقیقه دیگر در محلول‌های پوششی قرار گرفتند. نمونه‌های کنترل بدون پوشش باقی ماندند. فیله‌ها را جهت خشک کردن، به مدت ۱ ساعت از صفحات مشبک استریل آویزان کردند و در دمای محیط تا تشکیل پوشش روی فیله‌ها، باقی ماندند. پس از خشک شدن پوشش، فیله‌ها در بسته‌های پلاستیکی جدا بسته‌بندی و به یخچال منتقل شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ روز نگهداری شدند و در فواصل زمانی ۳ روز مورد ارزیابی باکتریایی (۳ تکرار) قرار گرفتند (Yingyuad *et al.*, 2006).

آزمون‌های میکروبی

برای آزمایش‌های میکروبی ۱۰ گرم از نمونه گوشت فیله هر ۶ تیمار (با ۳ تکرار) در شرایط استریل با ۹۰ میلی لیتر محلول نمک طعام ۰/۸۵ درصد مخلوط و هموژن شد. بعد از تهیه محیط کشت، توسط میکروسمپلر، ۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های تهیه شده در محیط کشت به طور سطحی پخش شد. شمارش تعداد باکتری‌های کل[1] و باکتری‌های سرمادوست[2] در محیط کشت تریپتیک سویا آگار[3] بترتیب در دماهای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ روز و ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ روز با شمارش کلنی‌های موجود روی پلیت انجام گرفت. شمارش ها به صورت log CFU/g گزارش شد (استاندارد ملی ایران، ۱۳۷۸).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرمافزار $SPSS_{16}$ انجام شد. جهت بررسی تأثیر زمان نگهداری و تیمارها بر شاخص‌های مورد بررسی از روش تجزیه واریانس دو طرفه و نیز برای مقایسه میانگین‌ها در مواردی که اثر کلی تیمارها معنی‌دار شناخته شد، از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد استفاده گردید.

نتایج

بار باکتریای کل (TBC)

تغییرات مجموع بارباکتریایی کل (log CFU/g) محاسبه شده در تیمارهای مختلف فیله کپور نقره‌ای طی نگهداری در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) در جدول ۱ نشان داده شده است.

مطابق جدول ۱ مقدار TBC در نمونه شاهد نسبت به نمونه‌های پوشش داده شده بیشتر بود. تیمار نمودن فیله‌ها با عصاره ۰/۵ درصد، عصاره ۱ درصد، کیتوزان ۱ درصد، کیتوزان ۱ درصد با عصاره ۰/۵ درصد و کیتوزان ۱ درصد با عصاره ۱ درصد باعث روند کندتر افزایش TBC نسبت به نمونه‌های شاهد به بطور معنی داری ($p<۰/۰۵$) گردیده است. بر اساس نتایج به دست آمده مجموع بارباکتریایی کل بین تیمارها و زمانهای نگهداری مختلف تغییرات معنی داری مشاهده شد.

بارباکتری های سرمادوست (PTC)

تغییرات مجموع بارباکتری های سرمادوست (log CFU/g) محاسبه شده در تیمارهای مختلف فیله کپور نقره‌ای طی نگهداری در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) در جدول ۲ نشان داده شده است.

مطابق جدول ۲ مقدار PTC در نمونه شاهد نسبت به نمونه‌های پوشش داده شده بیشتر بود. تیمار نمودن فیله ها با عصاره ۰/۵ درصد، عصاره ۱درصد، کیتوزان ۱ درصد، کیتوزان ۱ درصد با عصاره ۰/۵ درصد و کیتوزان ۱ درصد با عصاره ۱ درصد باعث روند کندتر افزایش PTC نسبت به نمونه‌های شاهد به بطور معنی داری گردید ($p<۰/۰۵$). بر اساس نتایج به دست آمده مجموع بارباکتری های سرمادوست بین تیمارها و زمانهای نگهداری مختلف تغییرات معنی داری مشاهده شد.

[1] Total Bacterial Counts
[2] Psychrophilic Counts
[3] Tripetic Soybean Agar

جدول ۱: اثر پوشش خوراکی کیتوزان و عصاره آبی میوه گیاه پنیرباد بر تغییرات مجموع باریاکتریایی کل (log CFU/g) در فیله فیتوفاگ طی نگهداری در دمای یخچال (n=۳؛ انحراف معیار ± میانگین)

Table 1: Effect of chitosan-*Withania coagulans* extract based edible coating on Total Bacterial Counts (Log cfu/g) of Silver Carp fillet during refrigerator storage (n = 3; mean±SD)

زمان ماندگاری (روز)	لوگ کلنی درهرگرم					
	شاهد	عصاره۰/۵درصد	عصاره۱درصد	کیتوزان۱درصد	کیتوزان۱درصد +عصاره۰/۵درصد	کیتوزان۱درصد +عصاره۱درصد
۰	۳/۳۷±۰/۰۱^{Ag}	۳/۲۲±۰/۰۱^{Bg}	۳/۱۸±۰/۰۲^{Cg}	۲/۹۲±۰/۰۱^{Dg}	۲/۷۸±۰/۰۲^{Eg}	۲/۶۰±۰/۰۳^{Fg}
۳	۳/۹۶±۰/۰۱^{Af}	۳/۷۹±۰/۰۲^{Bf}	۳/۲۳±۰/۰۲^{Cf}	۳/۰۵±۰/۰۳^{Df}	۲/۹۲±۰/۰۱^{Ef}	۲/۷۴±۰/۰۳^{Ff}
۶	۴/۷۰±۰/۰۳^{Ae}	۴/۴۶±۰/۰۲^{Be}	۳/۳۹±۰/۰۳^{Ce}	۳/۲۷±۰/۰۳^{De}	۳/۱۶±۰/۰۱^{Ee}	۲/۹۷±۰/۰۲^{Fe}
۹	۵/۸۴±۰/۰۱^{Ad}	۵/۲۴±۰/۰۲^{Bd}	۴/۱۳±۰/۰۱^{Cd}	۳/۷۱±۰/۰۲^{Dd}	۳/۴۷±۰/۰۱^{Ed}	۳/۳۱±۰/۰۱^{Fd}
۱۲	۷/۱۲±۰/۰۲^{Ac}	۶/۱۳±۰/۰۱^{Bc}	۵/۸۶±۰/۰۱^{Cc}	۴/۲۶±۰/۰۲^{Dc}	۴/۱۲±۰/۰۳^{Ec}	۳/۷۶±۰/۰۲^{Fc}
۱۵	۷/۸۳±۰/۰۲^{Ab}	۷/۲۱±۰/۰۲^{Bb}	۶/۷۹±۰/۰۲^{Cb}	۵/۱۱±۰/۰۱^{Db}	۴/۸۴±۰/۰۲^{Eb}	۴/۴۸±۰/۰۲^{Fb}
۱۸	۸/۰۳±۰/۰۲^{Aa}	۷/۷۶±۰/۰۱^{Ba}	۷/۳۹±۰/۰۱^{Ca}	۶/۱۹±۰/۰۱^{Da}	۵/۹۱±۰/۰۲^{Ea}	۵/۷۹±۰/۰۱^{Fa}

حروف بزرگ متفاوت(A, B, C, D, E, F)درهرسطرنشانگر تفاوت معنی دار($p<۰/۰۵$) بین تیمارهای مختلف می‌باشد.

حروف کوچک متفاوت(a, b, c, d, e, f, g) درهر ستون نشانگرتفاوت معنی دار($p<۰/۰۵$) درزمانهای مختلف می‌باشد.

جدول ۲: اثر پوشش خوراکی کیتوزان و عصاره آبی میوه گیاه پنیرباد بر تغییرات مجموع باریاکتری‌های سرمادوست (log CFU/g) در فیله فیتوفاگ طی نگهداری در دمای یخچال (n=۳؛ انحراف معیار ± میانگین)

Table 2: Effect of chitosan-*Withania coagulans* extract based edible coating on Psychrophilic Total Bacterial Counts (Log cfu/g) of Silver Carp fillet during refrigerator storage (n=3;mean±SD)

زمان ماندگاری (روز)	لوگ کلنی در هر گرم					
	شاهد	عصاره۰/۵درصد	عصاره۱درصد	کیتوزان۱درصد	کیتوزان۱درصد +عصاره۰/۵	کیتوزان۱درصد +عصاره۱درصد
۰	۳/۵۰±۰/۰۲^{Ag}	۳/۳۸±۰/۰۲^{Bg}	۳/۲۱±۰/۰۱^{Cg}	۲/۹۸±۰/۰۳^{Dg}	۲/۸۶±۰/۰۱^{Eg}	۲/۷۳±۰/۰۳^{Fg}
۳	۴/۲۴±۰/۰۱^{Af}	۳/۸۱±۰/۰۲^{Bf}	۳/۳۴±۰/۰۲^{Cf}	۳/۱۱±۰/۰۲^{Df}	۲/۹۷±۰/۰۱^{Ef}	۲/۹۱±۰/۰۳^{Ff}
۶	۵/۱۱±۰/۰۱^{Ae}	۴/۵۲±۰/۰۱^{Be}	۳/۴۸±۰/۰۲^{Ce}	۳/۳۷±۰/۰۳^{De}	۳/۲۴±۰/۰۲^{Ee}	۳/۱۵±۰/۰۱^{Fe}
۹	۶/۱۴±۰/۰۳^{Ad}	۵/۲۷±۰/۰۲^{Bd}	۴/۲۱±۰/۰۱^{Cd}	۳/۷۶±۰/۰۳^{Dd}	۳/۶۷±۰/۰۲^{Ed}	۳/۵۲±۰/۰۲^{Fd}
۱۲	۷/۲۰±۰/۰۲^{Ac}	۶/۱۵±۰/۰۳^{Bc}	۵/۹۳±۰/۰۱^{Cc}	۴/۳۴±۰/۰۲^{Dc}	۴/۳۹±۰/۰۳^{Ec}	۴/۱۸±۰/۰۲^{Fc}
۱۵	۷/۹۱±۰/۰۲^{Ab}	۷/۲۷±۰/۰۳^{Bb}	۶/۸۵±۰/۰۱^{Cb}	۵/۳۶±۰/۰۱^{Db}	۵/۲۱±۰/۰۲^{Eb}	۵/۱۲±۰/۰۱^{Fb}
۱۸	۸/۱۶±۰/۰۲^{Aa}	۷/۸۳±۰/۰۱^{Ba}	۷/۵۱±۰/۰۲^{Ca}	۶/۳۰±۰/۰۱^{Da}	۶/۱۷±۰/۰۱^{Ea}	۶/۱۰±۰/۰۳^{Fa}

حروف بزرگ متفاوت(A, B, C, D, E, F)درهرسطرنشانگر تفاوت معنی دار($p<۰/۰۵$) بین تیمارهای مختلف می‌باشد.

حروف کوچک متفاوت(a, b, c, d, e, f, g) درهر ستون نشانگر تفاوت معنی دار($p<۰/۰۵$) درزمان‌های مختلف می‌باشد.

بحث

میزان اولیه باریاکتریایی به عوامل متعددی نظیر دستکاری حین تهیه فیله، آلودگی وسایل بکار رفته، بهداشت افراد درگیر در کار بستگی دارد. کمیته بین المللی تعیین ویژگی های میکروبیولوژی موادغذایی، ۷ log CFU/g را حدمجاز برای میزان باریاکتریایی کل درماهی خام تعیین کرده است. فساد ماهی تازه یک فرآیند پروتئولیتیک پیش رونده است که غالباً توسط فعالیت باکتری‌های سرمادوست و به میزان کمتر توسط آنزیمهای اتولیتیک انجام می شود (Sallam, 2007). نتایج نشان داد الگوی رشد باکتریهای سرمادوست تا حدی مشابه الگوی رشد باریاکتریایی کل بود. این الگوی افزایشی

مشابه TBC و PTC با گذشت زمان نگهداری ثابت شده است. مقدار بار کل باکتریایی در ابتدای دوره برای تمامی تیمارها کمتر از log CFU /g ۴ بود که این تعداد، نشان دهنده کیفیت خوب فیله‌های مورد استفاده بود. افزایش بار کل باکتریایی برای هر تیمار در طول دوره نگهداری به میزان دستکاری، میزان رعایت اصول بهداشتی در روش های عمل آوری و میزان اولیه باکتری بستگی دارد (Chidanandaiah and Sanyal, 2007). با افزایش زمان نگهداری بارباکتریایی کل به طورمعنی داری در تمام تیمارها افزایش داشت بطوریکه در روز ۱۲ نگهداری، میزان باکتریهای کل در نمونه شاهد به log CFU /g ۷/۱۲±۰/۰۲ رسید که بیشتر از میزان قابل قبول بود. در نمونه عصاره ۰/۵ درصد در روز ۱۵ به log CFU /g ۷/۲۱±۰/۰۲ رسید که بیشتر از میزان قابل قبول بود همچنین در نمونه عصاره ۱ درصد در روز ۱۸ به log CFU /g ۷/۳۹±۰/۰۱ رسید که بیشتر از میزان قابل قبول بود اما در سایر تیمارها تا انتهای دوره نگهداری هیچیک به log CFU /g ۷ نرسیدند (جدول۱). کیتوزان با داشتن طیف گسترده از فعالیت های ضد باکتریایی بازده مهاری متفاوتی در برابر قارچ، باکتری گرم مثبت و منفی نشان می دهد. اثر ضد باکتریایی کیتوزان به دلیل وجود گروههای آمینی با بار مثبت می باشد که با درشت ملکولهای دارای بارمنفی در سطح سلول باکتریایی پیوند ایجاد نموده و منجر به گسیختگی غشای سلول باکتری، نشت مواد درون سلولی و در نهایت مرگ آن می‌شود. علاوه بر این عملکرد آن می‌تواند به صورت سدی در مقابل نفوذ اکسیژن باشد (Lopez-Caballero *et al*., 2005). میوه و ریشه گیاه پنیر باد دارای مقادیر بالای ترکیب های فیتوشیمیایی از جمله فلاونوئید، آنتوسیانین و پلی‌فنل‌ها بوده و این ترکیبات منجر به بروز خاصیت بالای آنتی اکسیدانی آن شده است (عزیزیان شرمه و همکاران،. ۱۳۹۶؛ ولی زاده و همکاران ۱۳۹۴). علاوه بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی این ترکیب‌ها، بررسی اثرات ضد میکروبی فلاونوئیدهای عصاره آبی میوه گیاه پنیرباد (*W. somnifera*) نیز توانمندی قابل توجه بر ضد پاتوژن‌های بیماری‌زای انسانی از جمله *Candida albicans*، *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* نشان داده است (Singh and Kumar, 2011). ترکیبات موجود در عصاره آبی میوه گیاه پنیرباد با تغییر در ساختار غشای سلولی باکتریها یا به صورت خراشیدن لایه لیپوپلی ساکاریدی غشاء خارجی باکتری سبب تراوش آنزیم‌ها و مواد مغذی مختلف می‌شوند (Beigomi *et al*., 2014). نتایج مطالعه حاضر با مطالعات Amiza و Kang (۲۰۱۳) تأثیر کیتوزان بر ژل سوریمی تهیه شده از ماهی (*Clarias gariepinus*)، Go´mez-Estaca و همکاران (۲۰۰۷) تأثیر پوشش کیتوزان حاوی عصاره گیاهی نعناع در ماهی ساردین، Wu و همکاران (۲۰۱۳) اثر ژلاتین همراه با کیتوزان و اسانس پونه بر فیله قزل آلا مطابقت دارد که می‌توان علت آن را اثرات ضد باکتریایی پوشش‌های کیتوزانی دانست که نهایتاً سبب مرگ باکتری‌ها می‌شود. فساد باکتریایی ماهی و محصولات آن که در یخچال نگهداری می‌شوندرا عمدتاً باکتریهای سرما دوست گرم منفی هوازی نظیر سودوموناس، آلتروموناس، شیوانلا و فلاویوباکتریها ایجاد می‌کنند. این باکتری‌ها و عمدتاً گونه‌های سودوموناس آنزیم‌های لیپاز و فسفو لیپاز تولید کرده که ترکیبات متابولیتی مختلفی مانند کتون، آلدهید (حاصل از تجزیه لیپید) و سولفیدهای فرار تولید می‌کنند که در نهایت سبب افزایش اسیدهای چرب آزاد می‌شوند. عمده نقش باکتری‌ها سرمادوست در فساد ماهی آمین‌زدایی اسیدهای آمینه آزاد و تولید ترکیبات نیتروژنی فرار می‌باشد که علاوه بر کاستن ارزش غذایی ماهی، بو و طعم نامطلوبی به آن می‌دهد (Go´mez-Estaca *et al*., 2009). این باکتریها قادرند در صفر درجه و بیشتر فعالیت کنند و پس از گذراندن مرحلهٔ سکون یا فاز تأخیری مطابقت با محیط به سرعت وارد فاز لگاریتمی شوند و در شرایط بی هوازی تکثیر یابند. از ویژگی‌های مهم باکتریهای سرمادوست دارا بودن آنزیم پروتئولیتیک و لیپولیتیک قوی و سرعت تکثیر آنها در زمان کوتاه است. محدوده حداکثر پیشنهادی برای باکتریهای سرمادوست در ماهی log CFU/g ۷ است (Sallam, 2007). با افزایش زمان نگهداری بار باکتریایی سرمادوست به طور معنی‌داری در تمام تیمارها افزایش داشت بطوریکه در روز

۱۲ نگهداری، میزان باکتریها سرمادوست در نمونه شاهد به log CFU/g ۷/۲۰±۰/۰۲ رسید که بیشتر از میزان قابل قبول بود. در نمونه عصاره ۰/۵ درصد در روز ۱۵ به ۷/۲۷±۰/۰۳ رسید که بیشتر از میزان قابل قبول بود. همچنین در نمونه عصاره ۱ درصد در روز ۱۸ به log CFU/g ۷/۵۱±۰/۰۲ رسید که بیشتر از میزان قابل قبول بود اما در سایر تیمارها تا انتهای دوره نگهداری هیچ یک به log CFU/g ۷ نرسیدند. در این مطالعه تیمار پوشش کیتوزان ۱ درصد با عصاره ۱ درصد میوه پنیرباد کمترین میزان PTC را در روز ۱۸ بین تیمارها نشان داد. اثرات ضدباکتریایی پوشش‌های کیتوزانی به دلیل بارمثبت گروه‌های آمینی آنها و واکنش با گروهای آنیونی سطح سلولی باکتریهاست که نهایتاً سبب مرگ باکتری‌ها می‌شود (Wu *et al*., 2013). در بررسی ها نشان داده شد که استفاده از پوشش‌های حاوی ترکیبات ضد باکتریایی مانند عصاره‌ها چون به مرور این ترکیبات را در غذا رها می‌سازند یا نسبت به زمانی که این ترکیبات را به تنهایی در غذا اضافه می‌کنند، مؤثرترند Go´mez-Estaca *et al*., 2007). عصاره آبی میوه پنیرباد به دلیل داشتن فعالیت ضد میکروبی قوی از افزایش اسیدهای چرب آزاد و تولید ترکیبات نیتروژنی فرار جلوگیری می‌کند و رشد میکروبهای سرمادوست را به تأخیر می‌اندازد Ojha *et al*., (2014). نتایج این تحقیق با مطالعات Tabatabaei Moradi و همکاران (۲۰۱۶)، Lopez-Caballero و همکاران (۲۰۰۵) و جرجانی و همکاران (۱۳۹۷) که از پوشش خوراکی کیتوزان حاوی عصاره گیاهی دارای آنتی اکسیدان یا به تنهایی جهت افزایش ماندگاری فرآورده‌های آبزیان استفاده کردند، مطابقت دارد. علت همسویی این تحقیقات ممکن است به دلیل خاصیت ضد باکتریایی پوشش‌های کیتوزانی و ممانعت از رسیدن مواد غذایی نظیر مواد آمینی به غشاء سلول باکتری و اتصال ترکیبات فنولی آنتی اکسیدانهای عصاره آبی گیاه پنیرباد (ویتافرین A) با پروتئین‌ها در دیواره سلول باکتری‌هایی که منجر به لیز شدن و از بین رفتن دیواره سلولی می‌گردد، باشد. به فعالیت ضد باکتریایی قوی ویتافرین A بدلیل وجود حلقه لاکتون غیراشباع می باشد.

بر طبق نتایج این مطالعه مشخص گردید استفاده از پوشش کیتوزان ۱ درصد با عصاره آبی ۱ درصد میوه پنیرباد باعث حفظ کیفیت و افزایش زمان ماندگاری فیله کپور نقره ای در طی یخچال گذاری می گردد، و زمینه لازم برای استفاده از این ترکیبات طبیعی در انواع گوشت و فرآورده های آنها را فراهم می کند.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه زابل و پژوهانه (Grant Code) با کد: UOZ-GR-9618-73 اجرا گردیده است. لذا، نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه زابل برای حمایت مالی این تحقیق تشکر نمایند.

منابع

استاندارد ملی ایران ۲۶۲۹. ۱۳۷۸. میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام، روش شمارش میکروارگانیسم های سرماگرا. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. ۱۶ صفحه.

اعتمادی، ح.، رضایی، م. و عابدیان کناری، ع.، ۱۳۸۷. پتانسیل آنتی باکتریایی و آنتی اکسیدانی عصاره رزماری (*Rosmarinus officinalis*) در افزایش عمر ماندگاری ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). علوم و صنایع غذایی ایران، ۵(۴): ۷۷-۶۷.

پزشک، س.، رضایی، م. و حسینی، ه.، ۱۳۹۰. اثر ضد باکتریایی و ضد اکسیداسیونی عصاره موسیر بر زمان ماندگاری ماهی قزل آلای رنگین کمان در شرایط نگهداری سرد (۴درجه سانتی گراد). مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۶(۲):۱۹-۱۱.

جرجانی، س.، قلیچ، ا. و هدایتی فرد، م.، ۱۳۹۷. تأثیر پوشش کیتوزان به همراه عصاره سبوس برنج بر زمان ماندگاری ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پرورشی طی دوره نگهداری در یخچال. نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی. ۲۸ (۳): ۱۷۶-۱۵۳.

خضری احمدآباد، م.، رضائی، م. و اجاق، س.م.، ۱۳۹۱. اثر اسید آسکوربیک به همراه پوشش پروتئین آب پنیر بر ماندگاری ماهی قزل آلای رنگین کمان در دمای یخچال: ارزیابی بار میکروبی و ویژگی های شیمیایی. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۷(۳): ۷۸-۶۹.

شعبانپور، ب.، ذوالفقاری، م.، فلاح زاده، س. و علی پور، غ.، ۱۳۹۰. اثر عصاره آویشن شیرازی (*Zataria multiflora Boiss*) بر ماندگاری فیله قزل آلای شور و بسته بندی شده در خلاء در شرایط یخچال: ارزیابی میکروبی، شیمیایی و خصوصیات حسی. فصلنامه علوم و صنایع غذایی ایران، ۸(۴):۱۱-۱.

عزیزی، ا.، یگانه، س.، فیروزبخش، ف. و جانی خلیلی، خ.، ۱۳۹۶. بررسی اثر اسانس مرزنجوش (*Origanum vulgare* L) بر شاخص های رشد و کیفیت فیله ی ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در زمان نگهداری در دمای یخچال. مجله علمی شیلات ایران، ۲۶(۱): ۱۱۰-۹۳.

Doi: 10.22.92/ISFJ.2017.110333.

عزیزیان شرمه، ا.، طاهری زاده، م.، ولی زاده، م. و قاسمی، ع.، ۱۳۹۶. بررسی فعالیت های ضدمیکروبی، آنتی اکسیدانی و تعیین محتوای فنلی و فلاونوئیدی کل عصاره های پنج گونه از تیره های مختلف گیاهان دارویی رشد یافته در استان سیستان و بلوچستان. مجله دانشگاه علوم پزشکی فسا، ۷ (۴): ۴۶۵-۴۷۹.

نقدی، شهاب.، رضایی، م. و بهرامی فر، ن.، ۱۳۹۸. مقایسه عملکرد حسگرهای برموفنول آبی و برموکروزول سبز در تعیین فساد باکتریایی و شیمیایی گوشت چرخ شده ماهی کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris caspi*) نگهداری شده در یخچال. مجله علمی شیلات ایران، ۲۸(۴): ۴۵-۵۵. Doi: 10.22092/ISFJ.2019.119411

ولی زاده، م.، باقری، ع.، ولی زاده، ج.، میرجلیلی، م.ح. و مشتاقی، ن.، ۱۳۹۴. بررسی فیتوشیمیایی گیاه دارویی و چند منظوره پنیرباد *Withania coagulans* در رویشگاه های طبیعی استان سیستان و بلوچستان. دو ماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۳۱ (۳): ۴۱۷-۴۰۶.

Doi:10.22092/IJMAPR.2015.101792.

Amiza, M.A. and Kang, W.C., 2013. Effect of chitosan on gelling properties, lipid oxidation, and microbial load of surimi gel made from African catfish (*Clarias gariepinus*). *International Food Research Journal*, 20 (4): 1585-1594.

Barros-Velázquez, J., 2016. Antimicrobial Food Packaging. Academic Press is an imprint of Elsevier, The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford OX5 1GB, UK, 678 P.

Beigomi, M., Mohammadifar, M.A., Hashemi, M., Ghods rohani, M., Senthil, K. and Valizadeh, M., 2014. Biochemical and rheological characterization of a protease from fruits of *Withania coagulans* with a milk-clotting activity. *Food Sciences Biotechnology*, 23: 1805-1813. Doi:10.1007/s10068-014-0247-5.

Bokaeian, M. and Saeidi, S., 2015. Evolution of antimicrobial activity of leaf extract of *Withania somnifera* against antibiotic resistanct *Staphylococcus aureus*. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 17(7): 29-32. Doi: 10.17795/zjrms1016.

Chidanandaiah Keshri, R.C. and Sanyal, M.K., 2007. Effect of sodium alginate coating with preservatives on the quality of meat paties during refrigerated (4 ± 1°C) storage. *Journal Muscle Foods*, 20: 275-292. Doi: 10.1111/j.1745-4573.2009.00147.x.

Dhanya, P.R. and Mathew, S., 2017. Microbial Spoilage in Fish. *Imperial Journal of Interdisciplinary Research (IJIR)*, 3(4): 2011-2015.

Go´mez-Estaca, J., Montero, P., Gimenez, B. and Guillen, M.C.G., 2007. Effect of functional edible films and high pressure processing on microbial and oxidative spoilage in cold-smoked sardine *Sardina pilchardus*. *Food Chemistry*, 105: 511-520. Doi:10.1016/j.foodchem.2007.04.006.

Go´mez-Estaca, J., Lo´pez de Lacey, A., Go´mez Guille´n, M.C., Lo´pez-Caballero, M.E. and Montero, P., 2009. Antimicrobial activity of composite edible films based on fish gelatin and chitosan incorporated with clove essential oil. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 18:46-52. Doi:10.1080/10498850802581252.

Goli, A.H., Barzegar, M. and Sahari, M.A., 2005. Antioxidant activity and total phenolic compound of pistachio (*Pistachia vera* L.) Hull extracts. *Journal of Food chemistry*, 92: 521–525. Doi: 10.1016/j.foodchem.2004.08.020.

Jeyakumari, A., Ninan, G., Joshy, C.G., Parvathy, U., Zynudheen, A.A. and Lalitha, K.V., 2016. Effect of chitosan on shelf life of restructured fish products from pangasius (*Angasianodon hypophthalmus*) surimi during chilled storage. *Journal of Food Science and Technology*, 53(4): 2099-2107. Doi: 10.1007/s13197-016-2174-3.

Kostaki, M., Giatrakou, V., Savvaidis, I.N. and 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(5): 475-482. Doi:10.1016/j.fm.2009.02.008.

Lopez-Caballero, M., Gomez-Guillen, M.C., Perez-Matoes. M. and Montero, P., 2005. A Chitosan-gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocolloids*, 19: 303-311. Doi:10.1016/j.foodhyd.2004.06.006.

Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H. and Hosseini, S.M.H., 2010. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*, 120: 193–198. Doi: 10.1016/j.foodchem.2009.10.006.

Ojha, S., Alkaabi, A., Amir, N., Sheikh, A., Agil, A., Abdelmonem, M. and Adem, A., 2014. *Withania coagulans* fruit extract reduces oxidative stress and inflammation in kidneys of streptozotocin-induced diabetic rats. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 36: 1-9. Doi:10.1155/2014/201436.

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. Doi:10.1016/j.foodcont.2006.02.002.

Sarbishegi, M., Khani, M., Salimi, S., Valizadeh, M. and Sargolzaei Aval, F., 2016. Antiproliferative and Antioxidant Effects of *Withania coagulans* Extract on Benign Prostatic Hyperplasia in Rats. *Nephro-Urology Monthly*, 8(1): 1-7. Doi:10.5812/numonthly.33180.

Shi, C., Cui, J., Yin, X., Luo, Y. and Zhou, Z., 2014. Grape seed and clove bud extracts

as natural antioxidants in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) fillets during chilled storage: Effect on lipid and protein oxidation. *Food Control*, 40: 134-139. Doi:10.1016/j.foodcont.2013.12.001.

Singariya, P., Mourya, K.K. and Kumar, P., 2012. Antimicrobial Activity of the Crude Extracts of *Withania somnifera* and *Cenchrus setigerus* In-vitro. Pharmacognosy Journal, 27(4): 60-65. Doi:10.5530/pj.2012.27.10.

Singh, G. and Kumar, P., 2011. Evaluation of antimicrobial efficacy of flavonoids of *Withania somnifera*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73(4): 473-478. Doi:10.4103/0250-474X.95656.

Tabatabaei Moradi, L., Sharifan A. and Larijani, K., 2016. Antimicrobial activity of lemon and peppermint essential oil in edible coating containing chitosan and pectin on Rainbow Trout fillets. *Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases*, 3(1-2): 38-43. Doi:10.1109/5.771073.

Wu, J., Chen, S., Ge, S., Miao, J., Li, J. and Zhang, Q., 2013. Preparation, properties and antioxidant activity of an active film from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 32: 42-51. Doi:10.1016/j.foodhyd.2012.11.029.

Yingyuad, S., Ruamsin, S., Reekprkhon, D., Douglas, S., Pongamphai, S. and Siripatrawan, U., 2006. Effect of chitosan coating and vacuum packaging on the quality of refrigerated grilled pork. *Packaging Technology and Science*, 19: 149–157. Doi:10.1002/pts.717.

Antimicrobial activity of chitosan edible coating enriched with aqueous extract of *Withania coagulans* fruit on the shelf life of Silver carp fillet stored in the refrigerator

Sadeghi M.[1]; Arshadi A.[1*]; Mirdar Harijani J.[1]; Haddadi F.[2]

[*]arshadi@uoz.ac.ir

1- Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Zabol University, Zabol, Iran
2- Department of Biology, Faculty of Sciences, Zabol University, Zabol, Iran

Abstract

Antibacterial packaging materials are nowadays considered as one of the new technologies to prevent the spread of spoilage and pathogenic microorganisms through food. The present study was conducted to investigate the antimicrobial effect of chitosan coating with the aqueous extract of *Withania coagulans* to increase the shelf life of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) fillet. Fish fillets were kept in 6 treatments and 3 replicates for 18 days at 4°C. Treatments included: uncoated treatments (control), 0.5% extract, 1% extract, 1% chitosan, 1% chitosan with 0.5% extract and 1% chitosan with 1% extract. The microbial characteristics [Total Bacterial Counts (TBC) and Psychrophilic Total Bacterial Counts (PTC)] of the samples were studied at 0, 3, 6, 9, 12, 15 and 18. During the storage period, all treatments containing chitosan coating and extract had significant differences in bacterial evaluation with control treatment ($p<0.05$). The highest bacterial indices of TBC and PTC up to day 18 of silver carp fillet storage in the refrigerator were in the control treatment (8.03 ± 0.02 and 8.16 ± 0.02) and the lowest in the 1% chitosan coating with 1% *Withania coagulans* extract (5.79 ± 0.01 and 6.10 ± 0.03), respectively.The results of current study showed the strong antibacterial effect of 1% chitosan edible coating with 1% whey extract which had a significant effect on the reduction of TBC and PTC and also increasing the shelf life of the coated fillets.

Keywords: Edible coating, Shelf-life increasing, *Hypophthalmichthys molitrix*, *Withania coagulans* aqueous extract

[*]Corresponding author