ارزیابی تعداد باکتری *Salmonella thyphi* در گوشت چرخ شده ماهی کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris caspia*) در فرم آزاد و نانوکپسوله گیاه رازیانه (*Foeniculum vulgare*) در دمای ۴°C در زمان‌های مختلف نگه‌داری

• **املیلا غزنوی***: باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۶

چکیده

گیاه رازیانه با نام علمی (*Foeniculum Vulgare*) از خانواده چتریان (Apiaceae) است. هدف از این مطالعه بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره گیاه رازیانه دارای فرم نانوکپسوله بر باکتری *Salmonella typhi* و مقایسه تاثیر عصاره فرم آزاد و فرم نانوکپسوله آن در مهار این باکتری و هم‌چنین دستیابی به بهترین ترکیب و غلظت عصاره گیاه رازیانه جهت پیشگیری و مهار رشد باکتری *Salmonella typhi* در گوشت چرخ شده ماهی کیلکای معمولی در دمای ٤°C بود. در این مطالعه عصاره الکلی آزاد و نانوکپسوله گیاه رازیانه در دو غلظت ۰/۵ و ۱ درصد بر رفتار باکتری *Salmonella thyphi* در گوشت چرخ شده ماهی کیلکا معمولی (*Clupeonella cultriventris caspia*) مورد ارزیابی قرار گرفت. پوشش مورد استفاده برای تولید نانوکپسوله صمغ عربی با نسبت ۳ به ۱ بود. رفتار *Salmonella thyphi* در روزهای ۳، ٦، ۹ و ۱۵ مورد ارزیابی قرار گرفت است. نتایج نشان داد با گذشت زمان فرم نانوکپسوله در غلظت ۱٪ بهترین اثر مهارکنندگی را بر باکتری *Salmonella thyphi* داشت. با افزایش زمان نگه‌داری ماهی در شرایط دمای ٤°C، اثر ضد باکتریایی فرم نانوکپسوله بیش‌تر بوده و فرم آزاد ضعیف‌تر عمل کرده و به فرم شاهد نزدیک‌تر شده و تعداد باکتری در فرم آزاد با گذشت زمان روند صعودی داشت (p<۰/۰۵). پیشنهاد می‌گردد که از عصاره آزاد و نانوکپسوله رازیانه در غلظت ۱٪ جهت کاهش بار باکتری‌های بیماری‌زای مولد فساد در سایر فرآورده‌های شیلاتی استفاده گردد که فرم نانوکپسوله آن تاثیر بیش‌تری در کاهش آن دارد.

کلمات کلیدی: *Clupeonella cultriventris caspia*، گیاه رازیانه، *Salmonella thyphi*، اثر مهارکنندگی باکتری

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: qaznavi@gmail.com

مقدمه

افزایش جمعیت و کمبود مواد غذایی به‌خصوص 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 این‌مورد علاوه‌بر موضوع تهیه غذا، فراهم آوردن غذای سالم نیز مورد نظر می‌باشد. این امر اهمیت کنترل کیفی میکروبی و شیمیایی مواد غذایی را در مراحل مختلف تهیه، تولید و مصرف روشن می‌نماید. به‌هرحال، وجود نیازهای تغذیه‌ای به‌خصوص درکشورهای در حال توسعه و امکان تامین قسمتی از آن از طریق منابع دریایی ضرورت شناخت، توجه و بهره‌گیری بهینه از این منابع را به‌خوبی نشان می‌دهد (رضایی و همکاران، ۱۳۸۱). قابلیت فسادپذیری بالای ماهیان سبب شده تا حفظ کیفیت ماهی تازه، یکی از مسائل مهم مورد توجه صنعت ماهی و مصرف‌کنندگان باشد. در این رابطه توجه به عمر ماندگاری محصول مهم است. بدین منظور تکنیک‌های متفاوتی مثل سردسازی محصول بلافاصله پس از صید و نگه‌داری در یخ (Ozyurt و همکاران، ۲۰۰۹). انجماد (Aubourg و همکاران، ۲۰۰۵). بسته‌بندی در خلاء و اتمسفر اصلاح شده (Ozogul و همکاران، ۲۰۰۴). پرتودهی با اشعه گاما و UV (Savvadis و همکاران، ۲۰۰۲). استفاده از مواد ضدمیکروبی مثل اسیدهای آلی (Al-Dagal و Buzarra، ۱۹۹۹). و نمک اسیدهای آلی (Sallam، ۲۰۰۷). استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و مصنوعی (Banergee، ۲۰۰۶). به‌کارگیری اسانس‌ها (Frangos و همکاران، ۲۰۱۰). روکش‌دار کردن (Fan و همکاران، ۲۰۰۹) و هم‌چنین اثر ترکیبی روکش غذایی و اسانس (Ojagh و همکاران، ۲۰۱۰) برای افزایش عمر ماندگاری محصولات دریایی و حفظ کیفیت ماهی به‌کار گرفته شده است. عدم استفاده از تکنیک‌های مناسب نگه‌داری ماهیان و محصولات دریایی منجر به تغییرات سریع در فاکتورهای متفاوت شیمیایی، بیوشیمیایی و میکروبیولوژی محصول گردیده و پدیده پیچیده فساد ماهی را به‌دنبال دارد (Ghaly و همکاران، ۲۰۱۰). نگه‌داری در یخچال از روش‌های نگه‌داری است که در مراکز عرضه ماهی از مراکز پرورش تا مراکز فروش به‌کار می‌رود و سبب کاهش سرعت فعالیت‌های آنزیمی و شیمیایی و فعالیت‌موجودات ذره‌بینی می‌شود. اما به‌دلیل عدم توانایی دمای یخچال (دمای ۴°C) برای کاهش دما به‌مقدار لازم، تغییرات نامطلوب ازجمله اکسیداسیون و هیدرولیز چربی‌ها به‌آرامی صورت می‌گیرد و کیفیت محصول را کاهش می‌دهد (Ozogul و همکاران، ۲۰۰۹؛ Ozyurt و همکاران، ۲۰۰۴). بنابراین، استفاده از موادی مناسب با فعالیت ضد باکتریایی به‌منظور بهبود کیفیت، افزایش زمان ماندگاری و هم‌چنین جلوگیری از ضررهای اقتصادی ضروری به‌نظر می‌رسد.

گیاه رازیانه با نام علمی *Foeniculum vulgare* از خانواده چتریان (Apiaceae) و از تیره جعفری است. رازیانه گیاهی علفی معطر به ارتفاع یک یا دو متر و دارای برگ‌هایی با پهنک منقسم به قطعات نازک و غنی شکل است (زرگری، ۱۳۸۳). صمغ عربی ماده مترشحه از درختی از انواع اقاقیا می‌باشد. صمغ عربی در آب بسیار محلول است و از محلول‌هایی که تا ۵۰ درصد حاوی این مواد هستند، می‌توان تهیه کرد. از این صمغ به‌منظور تثبیت اجزای طعم‌زا در سیستم‌های غذایی نیز استفاده می‌شود. در این حالت صمغ به‌صورت لایه‌ای این اجزا را در برمی‌گیرد و بدین‌ترتیب از جدا شدن آن‌ها عمدتاً به‌دلیل فراریت و خشک کردن جلوگیری می‌کند (Susan و Smolinske، ۱۹۹۹). بیماری‌های ناشی از Salmonella در انسان و حیوانات از زمان‌های قدیم وجود داشته ولی تشخیص تفریقی آن از سایر بیماری‌ها مشکل بود. Salmonella از طریق آب و غذای آلوده وارد دستگاه گوارش می‌شوند یکی از بیماری‌هایی که ازطریق Salmonella ایجاد می‌شود تب تیفوئید یا همان حصبه می‌باشد که بیش‌تر از طریق آب و غذای آلوده سرایت می‌کند(رحیمی، ۱۳۹۲). چلبیان و همکاران(۱۳۸۲)اثرات ضدمیکروبی اسانس هفت گونه گیاه از تیره‌های مختلف بر برخی از باکتری‌های بیماری‌زا را مورد بررسی قرار دادند. اجاق و همکاران (۱۳۸۳) اثر آنتی اکسیدان‌های‌طبیعی بر کیفیت ماهی کیلکای‌معمولی به‌هنگام نگه‌داری در یخ را مورد بررسی قرار دادند. موسوی و همکاران (۱۳۸۹) به بررسی اثر اسانس گیاه آویشن شیرازی بر میزان رشد باکتری *Salmonella typhi* در سوپ جو تجارتی پرداختند. ویژگی‌های ضدمیکروبی عصاره رازیانه علیه باکتری در مقیاس آزمایشگاهی به‌خوبی شناخته شده است (Hamdy و همکاران، ۲۰۱۳). به‌منظور جلوگیری از رشد باکتری‌ها و قارچ‌های مولد فساد مواد غذایی، از عصاره رازیانه به‌عنوان یک عامل نسبتاً قوی ضدمیکروبی روی مواد غذایی استفاده می‌شود (Shabnam و همکاران، ۲۰۱۲). Hefnawy (۱۹۹۳) اثرات بازدارندگی اسانس پونه، سیر،دارچین،آویشن، رزماری، مریم گلی، جوزهندی را بر *Salmonella typhi* گزارش داده‌اند (Kumar و Berwal، ۱۹۹۸). اثرات مهاری عصاره سیر را در آزمایشگاه بر *Salmonella typhi* به‌اثبات رساندند (Arora و kaur، ۱۹۹۹) اثرات ضدمیکروبی گیاهان مختلف را بر میکروب‌های مختلف مورد مطالعه قرار دادند ولی تنها اثر باکترسیدال سیر و میخک بر *Salmonella typhi* به‌اثبات رسید. هدف این مطالعه تعیین اثر ضد باکتریایی‌عصاره‌گیاه‌رازیانه دارای‌فرم‌نانوکپسوله‌بر‌باکتری *Salmonella typhi* و مقایسه تاثیر عصاره فرم آزاد و فرم نانوکپسوله آن در مهار این باکتری و هم‌چنین دستیابی به بهترین ترکیب و غلظت عصاره گیاه رازیانه جهت پیشگیری و مهار رشد باکتری *Salmonella typhi* در گوشت چرخ شده ماهی کیلکای معمولی در دمای ۴°C بود.

مواد و روش‌ها

ماهی کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris caspia*) از سواحل بندر بابلسر با استفاده از تور قیفی به‌وسیله لنج‌های صیادی صید و بعد از توزین جهت انجام آزمایش به‌سرعت در کنار یخ به آزمایشگاه پژوهشکده اکولوژی دریای خزر ارسال گردید.

آماده‌سازی ماهی: جهت تهیه نمونه، ابتدا ماهی کیلکا با آب شسته و به‌صورت دستی سر و امعاء و احشاء جدا گردید و پس از چرخ کردن با دستگاه مولینکس، گوشت به‌دست آمده به ظرفی انتقال و در یخچال در دمای $4^{\circ}C$ قرار داده شد. سپس به گوشت چرخ شده عصاره زیره سبز به فرم آزاد و با دوز ۰/۵ و ۱ درصد و فرم نانوکپسوله با دوز ۰/۵ و ۱ درصد مخلوط شده و باکتری *Salmonell typhi* به آن اضافه گردید و در ظروف درب‌دار پلاستیکی ۲۵ گرمی قرار داده شد و طبق تیمارهای تعریف شده در یخچال با دمای $4^{\circ}C$ نگه‌داری گردید و در چهار زمان در روزهای ۳، ۶، ۹ و ۱۵ کشت باکتری انجام گرفت (Duraipandiyan و همکاران، ۲۰۰۶).

عصاره‌گیری: ابتدا نمونه با میکسر پودر شده سپس داخل بشر قرار داده و تکان داده شد و به آن الکل (اتانول) اضافه گردید تا نمونه پر شود سپس ۲۴ ساعت در محیط آزاد قرار گرفت و هر ۴ الی ۵ ساعت تکان‌داده و در پایان با روتاری یا آون با دمای ۶۰ یا $70^{\circ}C$ حلال پراکنی گردید و در پایان نمونه باقی‌مانده خشک گردید (Duraipandiyan و همکاران، ۲۰۰۶).

نانوکردن: ابتدا سوسپانسیون اولیه از عصاره خشک گیاه رازیانه تهیه شده با استفاده از دستگاه اولتراسوند و امواج صوتی (Hielscher up zooh germany) به‌مدت ۵ الی ۱۰ دقیقه ذرات نانو رازیانه تهیه شده، سپس به‌منظور پایدار نمودن ذرات نانو تهیه شده از اسیدلینولئیک به عنوان سورفاکتانت استفاده شده و در نتیجه ذارات نانو با اندازه‌های مورد نظر پایدار ماند و واکنش‌پذیری آن‌ها با دود اطراف کاهش یافت. در مرحله دوم از پوشش‌های مختلف ازجمله لیپوزوم صمغ عربی به نسبت ۳ به ۱ به‌منظور پوشش‌دار نمودن یا کپسوله کردن هسته اولیه شد. بدین‌ترتیب با تهیه سوسپانسیون و رعایت نسبت پوشش به هسته و فرایند شیکر نموده این عمل انجام شده و در نهایت با استفاده از دستگاه اسپری درایر خشک گردید (Vehring، ۲۰۰۸).

تهیه محیط کشت Salmonella shigella agar: برای تهیه این محیط ۶۰ گرم از پودر تجاری آن در یک لیتر آب مقطر حل گردید و روی شعله گاز و تا زمان جوشیدن قرار داده شد. پس از کاهش دما به ۴۰ تا ۵۰ درجه به‌طور مساوی پلت ریخته شد. کلنی‌های Salmonella در این محیط به‌صورت زرد تیره متمایل به قرمز بوده و در بعضی از موارد مرکز کلنی به‌صورت نقطه‌های سیاه نمایان می‌باشد. در برخی نیز کلنی به‌صورت کلنی بی‌رنگ مشخص می‌باشد (Shirazinejad و همکاران، ۲۰۱۰).

آماده‌سازی باکتری *Salmonella typhi*: سوش لیوفلیزه از *Salmonella typhi* سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی تهیه گردید و کشت اولیه آن در محیط BHI (Brain Heart Infusion broth) انجام شد. به‌منظور رساندن باکتری به رشد لگاریتمی از انکوباسیون در دمای $37^{\circ}C$ و به‌مدت ۱۸ ساعت استفاده گردید. پس از رشد باکتری، محیط کشت حاوی باکتری به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و به رسوب حاصله سرم فیزیولوژی اضافه شد و سانتریفوژ در ۳ مرحله متوالی با دور ۵۰۰۰rpm به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. به نمونه‌های سانتریفیوژ شده و به رسوب حاصله، مقداری سرم فیزیولوژی اضافه گردید و با مقایسه با لوله‌های استاندارد مک فارلند مقدار تقریبی باکتری در یک میلی‌لیتر برحسب CFU/ml تعیین شد. دوز مورد استفاده باکتری جهت تلقیح، لگاریتم۳بوده که در زمان‌های مختلف‌موردارزیابی‌قرار گرفت (Sallam، ۲۰۰۶).

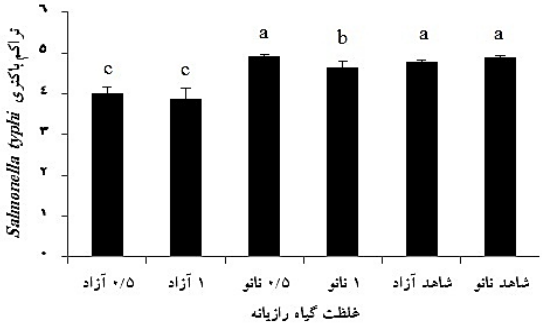
تعیین و شمارش باکتری *Salmonella typhi*: برای شمارش باکتری *Salmonella typhi* از محیط انتخابی (Salmonella shigella agar) استفاده شد. برای شمارش باکتری در هر بار زمان نمونه‌گیری، ۵ گرم گوشت نمونه را با ۴۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی اضافه و سپس هموژن گردید. بسته به نوع نمونه رقت‌ها از ۲-۱۰ تا ۶-۱۰ متغیر بود. ۰/۱ میلی‌لیتر نمونه رقیق شده را روی محیط کشت Salmonella shigella agar به‌صورت سطحی کشت داده و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ گرمخانه‌گذاری شد. باکتری *Salmonella typhi* روی این محیط، کلنی‌هایی به رنگ قرمز با مرکز سیاه تشکیل می‌دهد. برای هر تیمار دو تکرار در نظر گرفته شد که پس از کشت پلیت‌های استاندارد، انتخاب و شمارش شدند.

این آزمون دارای ۳۰ تیمار بوده که هر یک ۳ تکرار داشته بررسی آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۲۱ و توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه (One way ANOWA) انجام شد. مقایسه داده‌های به‌دست آمده به روش دانکن (Duncan) در سطح اطمینان ۹۵٪ انجام گرفت.

نتایج

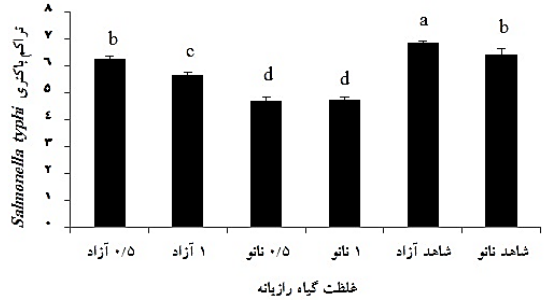
نتایج روز سوم نشان داد که افزایش مقدار عصاره رازیانه باعث کاهش تراکم باکتری *Salmonella typhi* در گوشت چرخ شده ماهی کلیکای معمولی گردید. به‌طوری‌که تمام تیمارها در مقایسه با شاهد تراکم باکتریایی کم‌تری داشتند ($p<0/05$). هرچند کاهش تراکم باکتریایی در تیمارهایی که تحت تاثیر عصاره نانوکپسوله بودند تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان ندادند. در بین تیمارهای مختلف بهترین

عملکرد در تیمارهای تحت تاثیر ۰/۵ و ۱٪ عصاره آزاد رازیانه مشاهده شد. در بین این دو تیمار تفاوت معنی‌داری دیده نشد اما از لحاظ کمی دوز ۱٪ عصاره آزاد تاثیر بهتری داشت.



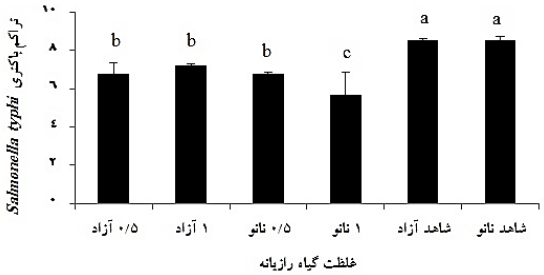
شکل ۱: تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره آزاد و نانوکپسوله گیاه رازیانه بر تراکم باکتری *Salmonella typhi* (برحسب cfu/gr) در گوشت چرخ شده ماهی کلیکای معمولی در دمای $4^{\circ}C$ در روز سوم (حروف متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است).

در روز ششم استفاده از عصاره‌رازیانه باعث بهبود شرایط میکروبی گوشت چرخ شده ماهی کلیکا معمولی شد. به‌طوری‌که تمام تیمارهای تحت تاثیر عصاره به‌طور معنی‌داری تراکم باکتریایی کم‌تری نسبت به تیمار شاهد داشتند. در این بین تیمارهای تحت تاثیر عصاره نانوکپسوله نسبت به تیمارهای تحت تاثیر عصاره آزاد از باکتری کم‌تری برخوردار بودند ($p<۰/۰۵$). اما بین دو تیمار نانو تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ولی تیمار دوز ۰/۵٪ نانو تاثیر بهتری داشت.



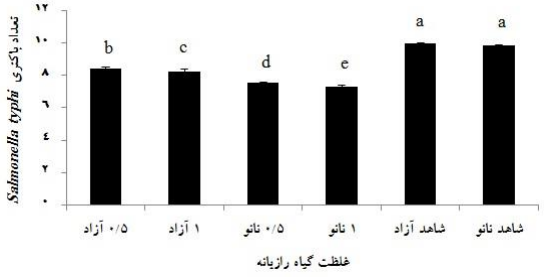
شکل ۲: تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره آزاد و نانوکپسوله گیاه رازیانه بر تراکم باکتری *Salmonella typhi* (برحسب cfu/gr) در گوشت چرخ شده ماهی کلیکای معمولی در دمای $4^{\circ}C$ در روز ششم (حروف متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است).

در روز نهم استفاده از عصاره رازیانه باعث بهبود شرایط میکروبی گوشت چرخ شده ماهی کلیکا شد به‌طوری‌که تمام تیمارهای تحت تاثیر عصاره به‌طور معنی‌داری تراکم باکتریایی کم‌تری نسبت به تیمار شاهد داشتند. در این بین تیمارهای تحت تاثیر عصاره نانوکپسوله نسبت به تیمارهای تحت تاثیر عصاره آزاد از باکتری کم‌تری برخوردار بودند ($p<۰/۰۵$). اما بین دو تیمار نانو تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ولی تیمار دوز ۱٪ نانو تاثیر بهتری داشت.



شکل ۳: تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره آزاد و نانوکپسوله گیاه رازیانه بر تراکم باکتری *Salmonella typhi* (برحسب cfu/gr) در گوشت چرخ شده ماهی کلیکای معمولی در دمای $4^{\circ}C$ در روز نهم (حروف متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است).

در روز پانزدهم استفاده از عصاره رازیانه باعث بهبود شرایط میکروبی گوشت چرخ شده ماهی کلیکا شد. به‌طوری‌که تمام تیمارهای تحت تاثیر عصاره به‌طور معنی‌داری تراکم باکتریایی کم‌تری نسبت به تیمار شاهد داشتند. در این بین تیمارهای تحت تاثیر عصاره نانوکپسوله نسبت به تیمارهای تحت تاثیر عصاره آزاد از باکتری کم‌تری برخوردار بودند ($p<۰/۰۵$). اما بین دو تیمار نانو تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. ولی تیمار دوز ۱٪ نانو تاثیر بهتری داشت.



شکل ۴: تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره آزاد و نانوکپسوله گیاه رازیانه بر تراکم باکتری *Salmonella typhi* (برحسب cfu/gr) در گوشت چرخ شده ماهی کلیکای معمولی در دمای $4^{\circ}C$ در روز پانزدهم (حروف متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است).

بحث

فساد در ماهیان تازه، بخشی به‌دلیل فعالیت و رشد ارگانیزم‌های ویژه عامل فساد (Specific spoilage organisms) بوده که با تولید متابولیت‌های‌مختلف باعث ایجادطعم و بوی نامطبوع در ماهی می‌شوند (Huss و Gram، ۱۹۹۶). در مطالعات انجام شده توسط (Gram و

Dalgaard، ۲۰۰۲) مشخص شد که میکروارگانیزم‌های عامل فساد مواد غذایی در موارد مشابه نیز یکسان نبودند و فلور میکروبی جداسازی شده از غذاهای دریایی از یک مطالعه به مطالعه دیگر متفاوت بود. به‌طوری‌که 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)، دما و نحوه نگه‌داری متفاوت بود. سطوح ارگانیزم‌های ویژه عامل فساد رابطه مستقیمی با زمان ماندگاری ماهی تازه دارد (Sallam، ۲۰۰۷). ماده غذایی می‌تواند از طریق واکنش‌های شیمیایی، میکروبیولوژیکی و آسیب‌های فیزیکی فاسد شود.با این وجود علت اصلی فساد غذا، رشد و متابولیسم میکروبی است که منجر به تشکیل ترکیباتی با بوی نامطلوب و ناخوشایند می‌شود. بیماری ناشی از مصرف غذاهای آلوده شده با باکتری‌های پاتوژن، موجب نگرانی مهم در سلامت عمومی شده است. به‌نظر می‌رسد جهت کاهش موارد خطرناک سلامتی، استفاده از فرآورده‌های طبیعی مثل ترکیب‌های ضدمیکروب راه جالبی برای کنترل باکتری‌های پاتوژن و توسعه زمان ماندگاری غذاهای فرآوری شده باشد (Oussalah و همکاران، ۲۰۰۷). از طرفی گروهی از مصرف کنندگان خواهان استفاده از غذاهای طبیعی، بدون افزودنی‌های شیمیایی، به‌لحاظ میکروبی سالم و نیز بسته‌بندی شده در مواد مناسب به لحاظ زیست‌محیطی می‌باشند (Wang و همکاران، ۲۰۰۷). برای برآورده کردن این خواسته یکی از چالش‌های بزرگ در صنایع غذایی کاهش افزودنی‌های شیمیایی رایج و استفاده از ترکیب‌های طبیعی در فرمولاسیون غذاست (Sanchez-Gonzalez و همکاران، ۲۰۱۱). امروزه فناوری نانو توانایی تاثیرگذاری در بسیاری از زمینه‌های صنایع غذایی دارد. نانو ذرات می‌توانند به‌طور موثری به افزایش پایداری مواد نانوکپسوله به‌وسیله محافظت آن‌ها از تغییرات محیطی، آنزیمی و شیمیایی، فراهم کردن حالت بافری در برابر تغییرات pH، مقابله با تغییرات حرارتی و یونی، محافظت در برابر طعم‌ها و بوهای ناخوشایند اشاره کرد. بنابراین با نانوکپسوله کردن عصاره گیاهی می‌توان انتظار داشت که زمان ماندگاری ماده غذایی از جمله ماهی افزایش معنی‌داری پیدا کند (McMeekin و همکاران، ۱۹۹۳). ماهیان حتی در دمای پایین نگهداری نیز ممکن است با فساد باکتریایی مواجه باشند. در نتیجه فعالیت باکتریایی، ترکیبات فرار با وزن ملکولی پایین تولید می‌شوند. این ترکیبات به‌طور معمول سولفید هیدروژن، تری متیل آمین و آمونیاک بوده (Huss، ۱۹۹۵؛ Ghaly و همکاران، ۲۰۱۰)، که عامل نامطلوب شدن گوشت، تشدید بوی نامطبوع و بی‌مزه شدن ماهی طی زمان نگه‌داری می‌باشند (Gram و Dalgaard، ۲۰۰۲). در سال‌های اخیر به‌علت استقبال کم‌تر مصرفکنندگان از مواد غذایی فرآوری شده با مواد شیمیایی به‌علت مضرات آن‌ها ازجمله سرطان‌زایی، استفاده از مواد نگه‌دارنده بیولوژیک مورد توجه قرار گرفته است (شعبانپور و همکاران، ۱۳۸۶).زمان‌ماندگاری‌ماهی با ارزیابی شدت‌واکنش‌های آنزیمی، درجه حرارت، تعداد و نوع میکروارگانیسم‌های مولد فساد تعیین می‌شود. در این مطالعه از دو غلظت ۰/۵٪ و ۱٪ عصاره رازیانه در دو فرم آزاد و نانوکپسوله استفاده گردید که در روز سوم دوز ۱٪ آزاد تاثیر بهتری داشت. در روز سوم در بین سه فرم آزاد، نانوکپسوله و شاهد، فرم آزاد به این دلیل که فاقد پوشش بوده و سریع‌تر عصاره آزاد شده از نظر اثرگذاری بر باکتری *Salmonella typhi* بهتر از نانوکپسوله و شاهد عمل کرد. ولی در نانوکپسوله به‌علت داشتن پوشش صمغ عربی مانع از آزاد شدن سریع عصاره شد. به‌همین دلیل در فرم نانوکپسوله در این روز تعداد باکتری *Salmonella typhi* بیش‌تر از فرم آزاد بود. ولی با این حال تعداد باکتری *Salmonella typhi* در هر دو فرم آزاد و نانوکپسوله از فرم شاهد کم‌تر بود چون در فرم شاهد عصاره‌ای به‌کار نرفته و فقط مخلوط گوشت و باکتری *Salmonella typhi* است. در روز ششم تعداد باکتری *Salmonella typhi* درفرم آزاد و نانوکپسوله اختلاف معنی‌داری با فرم شاهد داشت و عصاره در حال اثرگذاری خود بود. در این روز تعداد باکتری *Salmonella typhi* در عصاره نانوکپسوله به شکل معنی‌داری از فرم شاهد کم‌تر شد. زیرا فرم نانوکپسوله به‌دلیل داشتن پوشش صمغ عربی عصاره را به‌صورت تدریجی رها می‌کند و اثر کشندگی باکتری را حفظ می‌کند اما در فرم آزاد به‌دلیل نداشتن پوشش با گذشت زمان میزان تاثیرگذاری آن کم‌تر می‌شود. در این روز دوز ۰/۵٪ نانوکپسوله تاثیر بیش‌تری داشت. با گذشت زمان در روز نهم فرم نانوکپسوله تاثیرگذاری خود را حفظ کرده و میزان باکتری آن نسبت به دو فرم آزاد و شاهد به‌طور معنی‌داری کم‌تر شد ولی هم‌چنان تعداد باکتری *Salmonella typhi* در فرم آزاد نسبت به فرم شاهد کم‌تر بود. ولی با گذشت زمان میزان باکتری *Salmonella typhi* در فرم آزاد نسبت به روزهای قبل رو به افزایش بود. چون فرم آزاد فاقد پوشش بوده و باکتری به یک‌باره آزاد می‌شود، در این روز دوز ۱٪ نانوکپسوله تاثیر بهتری داشت. در نهایت در روز پانزدهم و پایانی آزمایش همانند روزهای قبل میزان تاثیرگذاری نانوکپسوله نسبت به دو فرم آزاد و شاهدبیش‌تر بوده‌و با گذشت زمان مشاهده می‌گردد که فرم نانوکپسوله هم‌چنان به‌دلیل داشتن پوشش صمغ عربی تاثیرپذیری خود را حفظ کرد. ولی در فرم آزاد با گذشت زمان به‌دلیل از دست دادن تاثیرگذاری خود، تعداد باکتری *Salmonella typhi* در حال نزدیک شدن به فرم شاهد است. در این روز دوز ۱٪ نانوکپسوله بهترین اثر را داشت. در این مطالعه گوشت ماهی کیلکای معمولی با عصاره رازیانه به فرم آزاد و نانو کپسوله با دزهای ۰/۵٪ و ۱٪ جهت بررسی بر زمان ماندگاری در گوشت چرخ شده ماهی کلیکا در دمای $4^{\circ}C$ با نمونه شاهد تا ۱۵ روز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که نمونه‌های حاوی رازیانه با اثرات

ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی بر عوامل شیمیایی و میکروبی موثر بوده، هم‌چنین عصاره رازیانه فرم نانوکپسوله نسبت به فرم آزاد آن موثرتر بوده ولی فرق چندانی بین دوزهای ۰/۵٪ و ۱٪ آن وجود نداشت. چون همیشه ارتباط مستقیمی بین غلظت مورد استفاده و افزایش آن و اثرات ضدمیکروبی‌وجودندارد. پیشنهادمی‌گردد که از عصاره آزاد و نانوکپسوله رازیانه جهت کاهش بار باکتری‌های بیماری‌زای مولد فساد در سایر فرآورده‌های شیلاتی استفاده گردیده که فرم نانوکپسوله با غلظت ۱٪ تاثیر بیش‌تری در کاهش آن دارد.

منابع

۱. **اجاق، س.م.؛ سحری، م.ع. و رضائی، م.، ۱۳۸۳.** اثر آنتی اکسیدان‌های طبیعی بر کیفیت ماهی کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris caspia*) به هنگام نگه‌داری در یخ. مجله علوم و فنون دریایی ایران. سال ۳، شماره ۴، صفحات ۱ تا ۷.

۲. **چلبیان، ف.؛ نوروزی، ح. و موسوی، س.ا.، ۱۳۸۲.** بررسی اثرات ضدمیکروبی اسانس هفت گونه گیاهی از تیره‌های مختلف بر برخی از باکتری‌های بیماری‌زا. فصلنامه گیاهان دارویی. سال ۷، صفحات ۳۷ تا ۴۱.

۳. **رحیمی، م.ک.، ۱۳۹۲.** فشرده میکروبیولوژی پزشکی. نشر آییژ. ۳۵۸ صفحه.

۴. **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، صفحات ۵۵ تا ۶۴.

۵. **زرگری، ع.، ۱۳۸۳.** گیاهان دارویی (جلد ۵). چاپ ششم، انتشارات دانشگاه تهران. ۱۰۱۰ صفحه.

۶. **شعبانپور، ب.؛ اصغرزاده‌کانی، ا.؛ حسینی، ه. و عباسی، م.، ۱۳۸۶.** تغییرات کیفیت چربی سوریمی ماهی فیتوفاگ. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی. شماره ۱۵، صفحات ۲۰ تا ۲۸.

۷. **موسوی، م.ح.؛ آخوندزاده‌بستی، ا.؛ میثاقی، ع.؛ جباری‌خامنه، ح.؛ کریم، گ. و زهرایی‌صالحی، ت.، ۱۳۸۹.** بررسی اثر اسانس گیاه آویشن شیرازی بر میزان رشد سالمونلا تیفی‌موریوم در سوپ جو تجاری. گیاهان دارویی. سال ۹، دوره ۲، صفحات ۱۰۹ تا ۱۱۶.

۸. **Al-Dagal, M.M. and Bazarra, W.A., 1999.** Extension of shelf-life of whole and peeled shrimp with organic acid salts and bifidobacteria. Jour of Food Protect. Vol. 62, pp: 51-56.

۹. **Arora, D. and Kaur, J., 1999.** Antimicrobial activity of spices. Intern J of Antimicrobial Agents. Vol. 12, pp: 257-262.

۱۰. **Aubourg, S.P.; Perez-Alonso, F. and Gallardo, J.M., 2005.** Studies on rancidity inhibition in frozen horse mackerel by citric acid and ascorbic acids. European Journal of Lipid Science and Technology. Vol. 106, pp: 232-240.

۱۱. **Banergee, S., 2006.** Inhibition of mackerel (*Scomber scomberus*) muscle lipoxygenase by green tea polyphenols. Food Res. Tech. Vol. 39, pp: 486-491.

۱۲. **Duraipandiyan, V.; Ayyanar, M. and Ignacimuthu, S., 2006.** Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. BMC Comp. Alt. Med. Vol. 6, pp: 35-41.

۱۳. **Fan, W.; Sun, J.; Chen, Y.; Qiu, J.; Zhang, Y. and Chi, Y., 2009.** Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. Food Chemistry. Vol. 115, pp: 66-70.

۱۴. **Frangos, L.; Pyrgotou, N.; Giatrakou,V.; Ntzimani, A. and Savvaidis, I.N., 2010.** Combined effects of salting, oregano oil and vacuum-packaging on the shelf-life of refrigerated trout fillets. Food Microbiology. Vol. 27, pp: 115-121.

۱۵. **Ghaly, A.E.; Dave, D.; Budge, S. and Brooks, M.S., 2010.** Fish Spoilage Mechanisms and Preservation Techniques. Review. American Journal of Applied Sciences. Vol. 7, No. 7, pp: 859-877.

۱۶. **Gram, L. and Huss, H.H., 1996.** Microbiological spoilage of fish and fish products. International Journal of Food Microbiology. Vol. 33, pp: 121-137.

۱۷. **Gram, L. and Dalgaard, P., 2002.** Fish spoilage bacteria problems and solutions. Current Opinion in Biotechnology. Vol. 13, pp: 262-266.

۱۸. **Hamdy Roby, M.H.; Sarhana, M.A.; Selima, K.A.H. and Khalel, K.I., 2013.** Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris*), sage (*Salvia officinalis*), and marjoram (*Origanum majorana*) extracts. Industrial Crops and Products. Vol. 43, pp: 827-831.

۱۹. **Hefnawy, Y.A.; Moustafa, I.S. and Marth, E.H., 1993.** Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to selected spices. Journal of Food Protection. Vol. 56, pp: 876-878.

۲۰. **Huss, H.H., 1995.** Quality and quality changes in fresh fish. FAO fisheries technical paper N°. 348, Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, Rome, Italy.

۲۱. **Kumar, M. and Berwal, J.S., 1998.** Sensitivity of food pathogens to cumin (*Nigella sativum*). J. Appl. Microbiol. Vol. 84, pp: 213-215.

۲۲. **McMeekin, T.A.; Olley, J.N.; Ross, T. and Ratkowsky, D.A., 1993.** Predictive Microbiology. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, UK.

۲۳. **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. Vol. 120, pp: 193-198.

۲۴. **Oussalah, M.; Caillet, S.; Saucier, L. and Lacroix, M., 2007.** Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogens*. Food control. Vol. 18, pp: 414-20.

۲۵. **Ozogul, F., Polat, A. and Ozogul, Y., 2004.** The effects of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (*Sardina pilchardus*). Food Chemistry, Vol. 85, pp: 267-273.

۲۶. **Ozyurt, G.; Kuley, E.; Ozkutuk, S. and Ozogul, F., 2009.** Sensory, microbiological and chemical assessment of the freshness of red mullet (*Mullus barbutus*) and gold band goatfish (*Upeneus moluccensis*) during storage in ice. Food Chemistry. Vol. 114, pp: 505-510.

۲۷. **Shabnam, J.; Sobia, M.; Ibatsam, Kh. Rauf, A. and Saleem Haider, M., 2012.** Comparative antimicrobial activity of clove and fennel essential oils against food borne pathogenic fungi and food spoilage bacteria. African Journal of Biotechnology. Vol. 11, No. 94, pp: 16065-16070.

۲۸. **Sallam, K.I., 2006.** Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. J food control. Vol. 18, pp: 566-575.

۲۹. **Sallam, K.I., 2007.** Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. Food Control. Vol. 18, pp: 566-575.

۳۰. **Sánchez-Gonzalez, L.; Vargas, M.; Gonzalez-Martínez, C.; Chiralt, A. and Chafer, M., 2011.** Use of essential oils in bioactive edible coatings. Food Engineering Reviews. Vol. 3, pp: 1-16.

۳۱. **Savvaidis, I.N.; Skandamis, P.N.; Riganakos, K.A.; Panagiotakis, N. and Kontominas, M.G., 2002.** Control of natural microbial flora and Listeriamonocytogenes in vacuum packaged trout at 4 and 10°C using irradiation. Journal of Food Protect. Vol. 65, pp: 515-522.

۳۲. **Shirazinejad, A.R.; Noryati, I.; Rosma A. and Darah, I., 2010.** Inhibitory effect of lactic acid and Nisin on bacterial and spoilage of chilled shrimp. World academy of science engineering and technology. Vol. 65, pp: 163-167.

۳۳. **Smolinske, S.C., 1992.** Handbook of Food, Drug, and Cosmetic Excipients. CRC Press. 448 p.

۳۴. **Vehring, R., 2008.** Pharmaceutical particle engineering via spray drying. Pharm. Res. Vol. 25, pp: 999-1022.

۳۵. **Wang, L.; Liu, L.; Holmes, J.; Kerry, J.F. and Kerry, J.P., 2007.** Assessment of film-forming potential and properties of protein and polysaccharide-based biopolymer films. J. Food Sci. Technol. Vol. 42, pp: 1128-1138.