تأثیر نانو کامپوزیت آب پنیر تغلیظ شده حاوی عصاره گیاه مرزنجوش (*Origanu vulgare* L.) بر رفتار *Staphylococcus aureus* در فیله ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

رضا صفری[1]

۱- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی. ساری، ایران

safari1351@gmail.com

چکیده

در این مطالعه تأثیر نانوکامپوزیت تهیه شده از آب پنیر تغلیظ شده و عصاره گیاه مرزنجوش بر رفتار استافیلوکوکوس اورئوس تلقیح شده به فیله ماهی فیتوفاگ مورد ارزیابی قرار گرفت. تیمارها شامل نمونه شاهد (بدون ماده نگهدارنده)، عصاره مرزنجوش (۰/۵درصد) و تیمار ترکیبی (نانوکامپوزیت آب پنیر و عصاره مرزنجوش ۰/۵) بوده و تغییرات رشد استافیلوکوکوس اورئوس (تلقیح اولیه = لوگ ۳) در فیله‌های ماهی فیتوفاگ نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، در غالب ۳ تکرار و زمان‌های صفر، ۳، ۶، ۹ و ۱۲ روز مورد آزمایش قرار گرفت. جهت شمارش این باکتری از محیط کشت برد پارکر آگار استفاده شده و رشد کلنی‌های سیاه با هاله شفاف تائید کننده استافیلوکوکوس اورئوس بود. نتایج آزمایشات نشان داد که تیمار حاوی ۰/۵ درصد عصاره مرزنجوش و همچنین ترکیب غلظت ۰/۵ درصد آن با آب پنیر باعث کاهش روند رشد استافیلوکوکوس اورئوس شده و نتایج حاصله نیز دارای اختلاف معنی‌دار با تیمار شاهد بوده است. بدین ترتیب که لوگ باکتری در تیمارهای شاهد، عصاره ۰/۵ درصد مرزنجوش و تیمارهای ترکیبی در زمان صفر به ترتیب ۳/۰۹، ۳/۱۱ و ۳/۰۶ واحد تشکیل‌دهنده کلنی در هر گرم از فیله بوده که در روز ۱۲به ۶/۸۷، ۴/۳۵ و ۳/۷۵ تغییر داشته‌است. بین تیمارهای حاوی عصاره ۰/۵ درصد و تیمارهای ترکیبی هیچ‌گونه اختلاف معنی‌دار وجود نداشته است. نتیجه‌گیری نهایی نشان داد که به هنگام استفاده از نانوکامپوزیت آب پنیر و عصاره گیاه مرزنجوش، رشد صعودی باکتری‌های بیماری‌زای فرصت‌طلب نظیر استافیلوکوکوس اورئوس بطور معنی‌داری کاهش داشته هرچند که در تیمار دارای عصاره، این روند نیز مشاهده شده ولی با این وجود جهت حفظ و پایداری بیشتر عصاره نیاز به استفاده از فیلم و یا پوشش‌های خوراکی بوده و استفاده از آنها به فرم نانوکامپوزیت باعث افزایش اثرات ضدباکتریایی عصاره می‌شود.

واژگان کلیدی: آب پنیر تغلیظ شده، عصاره مرزنجوش، استافیلوکوکوس اورئوس، ماهی فیتوفاگ

مقدمه

ماهی از زمان صید تا عرضه به بازار و یا کارخانه جهت فرآوری، تحت تأثیر عوامل مختلف قرار گرفته که می‌توان به تغییرات دمایی ناشی از حمل و نقل نامناسب، دستکاری و متعاقب آن آلودگی ثانویه اشاره نمود. بنابراین کنترل کیفی و تضمین سلامت ماهی از فاکتورهای اصلی بوده که بایستی به آن توجه نمود. از مهمترین باکتری‌هایی که در آلودگی ثانویه محصولات غذایی و شیلاتی نقش اصلی دارند می‌توان به استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی و انتروکوک‌ها اشاره نمود که جزء باکتری‌های فرصت‌طلب با منشاء انسانی بوده که از طریق دست‌های آلوده به مدفوع و یا سرفه و عطسه منتقل می‌شوند. در این میان، استافیلوکوکوس اورئوس دارای اهمیت خاصی بوده و به‌عنوان استاندارد اصلی جهت صدور گواهی سلامت ماده غذایی در نظر گرفته می‌شود. وجود این باکتری در ماده غذایی نشان‌دهنده عدم رعایت موازین بهداشتی به

هنگام فرآوری و تولید ماده غذایی می‌باشد. استافیلوکوکوس اورئوس یکی از باکتری‌های شاخص مسبب مسمومیت غذایی می‌باشد (Debbarma *et al*., 2012; Pal *et al*., 2016).

امروزه با توجه به عوارض استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی(Navarro-Garcıa *et al.,* 2004) و اثرات نامطلوب آنها مانند اثر جهش‌زایی، ایجاد مسمومیت، سرطان‌زایی و ... استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی به‌واسطه آثار محافظتی که در برابر بیماری‌های مزمن، سرطان، بیماری‌های قلبی عروقی و جهش‌زایی دارند، توصیه می‌شود (Kuorwel *et al.,* 2011).

گیاه (*Origanum vulgare* L.) با نام مرزنجوش وحشی یا اروپایی که در ایران نیز پراکنش وسیعی یافته‌است، گیاهی معطر از خانواده‌ی نعناعیان (*Labiatae*) می‌باشد، که از دیرباز در غذاهای سنتی به‌عنوان عطر و طعم‌دهنده و در طب سنتی به‌عنوان گیاه دارویی پرخاصیت کاربرد فراوانی دارد. مطالعات محققان مختلف نشان داده‌است که اسانس این گیاه، دارای فعالیت‌های ضد میکروبی و ضد اکسیدانی می‌باشد (Dorman and Deans, 2000, Dragland *et al.*, 2003, Economou *et al.,* 1991).

گیاه مرزنجوش به لحاظ داشتن مشتقات فنلی نظیر کارواکرول و تیمول دارای فعالیت ضدمیکروبی گسترده‌ای می‌باشد (Ahmad *et al.,* 2012 ; Castilho *et al.,* 2012). از آنجایی‌که مهم‌ترین دلیل فساد، رشد میکروب‌های مولد فساد در فرآورده غذایی می‌باشد، لذا بکار بردن عوامل ضدمیکروبی در بسته‌بندی می‌تواند سبب به تأخیر انداختن یا حتی جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های عامل فساد شده و در نتیجه باعث افزایش مدت زمان ماندگاری و بهبود ایمنی فرآورده غذایی شود (Cha and Chinnan, 2004).

در سال‌های اخیر افزایش نگرانی مصرف‌کنندگان نسبت به مشکلات زیست‌محیطی ایجاد شده بواسطه استفاده از مواد بسته‌بندی سنتزی منجر به گسترش تولید بسته‌بندی‌هایی با منابع طبیعی مانند پلی‌ساکاریدها، پروتئین و لیپیدها شده‌است (Silva *et al.*, 2009) . هر چند که فیلم‌های خوراکی کاملاً جایگزین بسته‌بندی‌های سنتی مصنوعی نشده‌اند، اما پتانسیل افزایش استفاده از آنها وجود دارد (Silva *et al.*, 2009). فیلم‌های ضد میکروبی می‌توانند مدت زمان ماندگاری غذا و سلامت آن را از طریق ممانعت رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد با افزایش فاز تأخیری و یا کاهش سرعت رشد آنها، افزایش دهند (اجاق و همکاران، ۱۳۸۹). از طرفی قابلیت فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی برای کند کردن نفوذ رطوبت، اکسیژن، مواد فرّار و محلول را می‌توان با افزودن موادی مانند آنتی‌اکسیدان‌ها، مواد ضدمیکروبی، مواد رنگی، طعم‌دهنده‌ها، ادویه‌ها و ... در ساختار فیلم، افزایش داد (اجاق و همکاران، ۱۳۸۹). ترکیب عوامل نگهدارنده طبیعی با فیلم‌ها باعث می‌شود که این عوامل به آرامی به سطح غذا آزاد شده و اثر آن‌ها برای مدت زمان طولانی‌تری باقی بماند (Benavides *et al*., 2012).

آب پنیر یکی از محصولات جانبی فرآیند تولید پنیر بوده و بعنوان پوشش و یا فیلم در مطالعات مختلف مورد بررسی قرار گرفته‌است. مطالعات نشان داده که فیلم تهیه شده از این ماده دارای خواص مکانیکی خوبی بوده و مانع از نفوذ اکسیژن و آروما به داخل ماده غذایی می‌شود. یکی از معایب پوشش تهیه شده از آب پنیر، افزایش نفوذپذیری به بخار آب بوده که این امر ناشی از ماهیت آبدوستی آن بوده که جهت رفع این مشکل از لیپیدها و اسانس‌های مختلف با ویژگی‌های آب گریزی استفاده می‌گردد (Bahram *et al.,* 2012).

در مطالعه انجام شده توسط Skandamis و Nychas (۲۰۰۱)، تأثیر اسانس مرزنجوش بر ویژگی‌های میکروبیولوژیکی و فیزیکو شیمیایی گوشت چرخ‌شده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که استفاده از غلظت‌های بالاتر اسانس باعث تأخیر در رشد میکروبی و کاهش فساد توسط میکروارگانیسم‌ها و عدم تغییر در خواص

فیزیکی و شیمیایی و بهبود کیفیت گوشت می‌گردد. اثر آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریالی اسانس‌های مرزنجوش و آویشن در فیله ماهی کفال نیمه‌سرخ‌شده مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که آویشن و مرزنجوش دارای اثرات ضدمیکروبی بالا بر علیه گروه انتروباکتریاسه می‌باشند (Yasin and Abou-Taleb, 2007).

ماهی فیتوفاگ یکی از مهمترین گونه‌های ماهیان گرمابی بوده که ۶۵ درصد از صید این گروه از ماهیان را به خود اختصاص می‌دهد آمار صید ماهیان گرمابی در استان مازندران در سال ۱۳۹۵ بیش از ۵۸۰۰۰ تن بوده که با احتساب ۶۵ درصد، بیش از ۳۷۰۰۰ تن مربوط به این ماهی می‌باشد. صید بالای این ماهی، لزوم فرآوری و تولید محصولات متنوع شیلاتی را دوچندان می‌کند(سالنامه آماری شیلات ایران، ۱۳۹۵). از این‌رو توجه به شرایط صید، حمل و نقل، شرایط نگهداری، اصول HACCP و GMP به هنگام فرآوری از جمله موضوعاتی است که در تولید محصولی با کیفیت بالا ضرورت پیدا می‌کند. هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات نانوکامپوزیت آب پنیر تغلیظ شده و عصاره گیاه مرزنجوش بر رفتار استافیلوکوکوس اورئوس در فیله ماهی فیتوفاگ نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بوده‌است.

مواد و روش ها

تهیه عصاره مرزنجوش

گیاه مرزنجوش از شهرستان ساری در استان مازندران تهیه گردید. جهت تهیه عصاره، یک کیلوگرم از گیاه در آون ۴۰ تا ۴۵ درجه (شرکت بهداد، ایران) تا خشک شدن کامل قرار داده شده و پس از آسیاب کردن، با استفاده از حلال متانول (نسبت ۱ به ۱۰ وزنی/ حجمی) عصاره‌گیری انجام شده و پس از صاف کردن سوسپانسیون، فرآیند حلال پراکنی و تغلیظ نمونه با استفاده از دستگاه روتاری انجام شد(Zare *et al.*, 2011) .

تهیه پوشش و نانوکامپوزیت آب پنیر تغلیظ شده و عصاره مرزنجوش

کنسانتره پروتئین آب پنیر (۸۰ % پروتئین) محصول شرکت DMV هلند برای تهیه پوشش مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا محلول۵ درصد (وزنی- حجمی) پروتئین آب پنیر در آب مقطر تهیه شده و در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد بن‌ماری شیکردار (اختریان، ایران) به مدت ۳۰ دقیقه مخلوط شد. پس از حل شدن آب پنیر، سوسپانسیون اولیه، سرد شده و در مرحله بعد از گلیسرول (شرکت مرک ، آلمان)، بعنوان پلاستی سایزر، به نسبت ۱ به ۱ آب پنیر استفاده شده و مجدداً به مدت ۲۰ دقیقه مخلوط گردید. برای تهیه نانوکامپوزیت، عصاره مرزنجوش به مقدار ۰/۵ درصد، به محلول پایه اضافه شده و محلول نهایی به مدت ۵ دقیقه در آمپلی تود ۱۰۰ و فرکانس ۲۰ کیلوهرتز سونیکه شده که این فرآیند با استفاده از دستگاه اولتراسوند (مدل Hilscher UP200، آلمان) انجام گرفت (Min and Krochta, 2007; Bahram *et al.*, 2012; Ojagh *et al.,* 2010).

تهیه استوک استافیلوکوکوس اورئوس جهت تلقیح

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس PTCC 1330 از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. جهت فعال‌سازی باکتری، از محیط مایع تریپتیک سوی براث (مرک، آلمان) و دمای ۳۷°C به مدت ۱۸-۱۶ ساعت استفاده شد. بعد از رساندن باکتری به فاز رشد لگاریتمی، لوله حاوی باکتری در دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ(کوکوسان، ژاپن) شده ئو رسوب حاصله سه بار با سرم فیزیولوژی شستشو داده شده و مجداً سانتریفوژ شد. به رسوب نهایی مقداری سرم فیزیولوژی اضافه شده و کدورت آن با لوله‌های استاندارد مک فارلند(۰/۵مک فارلند معادل ^{8} ۱۰ × ۱/۵) مقایسه شده و

در نهایت با تهیه رقت‌های متوالی، غلظت نهایی لوگ ۳ جهت تلقیح آماده گردید (ICMSF 1986; Pal, 2016).

آماده‌سازی ماهی فیتوفاگ و پوشش‌دهی تیمارها

بعد از تهیه ماهی فیتوفاگ از بازار ماهی‌فروشان شهرستان ساری، (وزن متوسط ۱۱۰۰-۹۰۰ گرم)، نمونه ها در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل شده و پس از سر و دم‌زنی و تخلیه امعاء و احشاء و جداسازی پوست و استخوان، از هر ماهی ۴ فیله تهیه شد. فیله به ۳ گروه تقسیم شده بدین ترتیب که در تیمار ۱ (شاهد بدون ماده نگهدارنده) نمونه‌ها در آب مقطر استریل به مدت ۱ دقیقه غوطه ور شده و پس از خارج کردن آبچک، در مجاورت هوا خشک شده و در نهایت در زیپ پلاس قرار داده شدند. در تیمار ۲ که مربوط به عصاره مرزنجوش بود، عصاره به مقدار ۰/۵ درصد هر فیله وزن شده و پس از مخلوط کردن در مقداری محلول دی متیل سولفوکساید (شرکت مرک، آلمان)، به فیله‌ها اضافه شده و پس از اطمینان از جذب عصاره، فیله ها به زیپ پلاس انتقال داده شدند. در تیمار ۳ (نانوکامپوزیت آب پنیر و عصاره)، فیله‌ها به روش غوطه‌وری و به مدت ۱ دقیقه در محلول نانوکامپوزیت قرار داده شده و پس از خارج کردن آبچک، خشک کردن در مجاورت هوا و اطمینان از تشکیل پوشش، به زیپ پلاس انتقال داده شدند. (اجاق و همکاران، ۱۳۸۹). تیمارهای تهیه شده، پس از اضافه کردن استافیلوکوکوس اورئوس(لوگ ۳ بصورت اسپری)، در دمای ۴ درجه برای مدت ۱۲ روز قرار داده شده و در زمان‌های صفر، ۳، ۶، ۹ و ۱۲ روز از نظر تغییرات رشد استافیلوکوکوس اورئوس مورد آزمایش قرار گرفتند. با در نظر گرفتن ۵ زمان، ۳ تکرار و ۳ تیمار، در مجموع ۴۵ نمونه مورد ارزیابی قرار گرفتند.

شمارش استافیلوکوکوس اورئوس

برای شمارش باکتری از محیط کشت برد پارکر آگار استفاده گردید. ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت تهیه شده از فیله ها در هر تیمار (در صورت نیاز از رقت‌های بالاتر استفاده می‌شود)، به طور سطحی در محیط مذکور کشت داده‌شد. نمونه ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شده گرفته که ظاهر شدن کلنی‌های سیاه دارای هاله شفاف نشان دهنده استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد. کلنی ها بعد از شمارش، در عکس رقت مورد استفاده ضرب شده و سپس لگاریتم گرفته شده تا در نهایت لگاریتم تعداد واحد تشکیل‌دهنده کلنی در یک گرم (log CFU/g) بدست آید(Ibrahim Sallam , 2007).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصله با نرم افزار SPSS18 انجام گرفت. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف و همگنی واریانس داده‌ها با آزمون لون (leven) انجام گرفته و به منظور ارزیابی تغییرات رشد استافیلوکوکوس اورئوس در زمان‌های مختلف از آزمون‌های آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA)و جهت مقایسه واریانس‌ها و ارزیابی معنی‌دار بودن داده‌ها، از آزمون دانکن (Duncan) استفاده شد. در نهایت ارزش p با ضریب اطمینان ۹۹ درصد تعیین گردید.

نتایج و بحث

نتایج تغییرات رشد استافیلوکوکوس اورئوس در تیمارهای حاوی عصاره مرزنجوش و نانوکامپوزیت آب پنیر و مقایسه آنها با تیمار شاهد در جدول ۱ نشان داه شده‌است. تغییرات رشد باکتری در تیمار شاهد، روند صعودی داشته و از لوگ ۳/۰۹ واحد تشکیل‌دهنده کلنی در هر گرم از فیله به ۶/۸۷ در روز ۱۲ افزایش داشته و تغییرات مشاهده شده نیز معنی‌دار بوده است ($p<0.05$) . این روند در تیمارهای دارای عصاره مرزنجوش و تیمار ترکیبی اندکی متفاوت بوده بطوریکه در تیمار

دارای ۰/۵ درصد عصاره، لوگ باکتری در زمان صفر، ۳/۱۱ بوده که بصورت بطئی افـزایش داشـته و بـه لـوگ ۴/۳۵ در روز ۱۲رسیده بود. نتایج تجزیه و تحلیل آماری حاکی از عدم اختلاف معنی‌دار ما بین زمان‌های مختلف بجز زمان صـفر در ایـن تیمار بوده‌است. در تیمار دارای نانوکامپوزیت، لوگ باکتری در زمان صفر، ۳/۰۶ بوده که تا روز ۶ نگهـداری افـزایش نسـبی داشته و بعد از آن، روند کاهشی نشان داد ولی با این وجود بین تغییرات بعد از زمـان صـفر هیچگونـه اخـتلاف معنـی‌داری مشاهده نشد.

در مقایسه بین تیمارهای مختلف، در تمامی زمان‌ها، بجز زمان صفر، بین تیمارهای دارای عصاره و ترکیـب آن بـا آب پنیـر (نانوکامپوزیت) و تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار وجود داشته است ($p<0.05$).

جدول ۱: نتایج لگاریتم تغییرات استافیلوکوکوس اورئوس در فیله ماهی فیتوفاگ حاوی نانوکامپوزیت آب پنیر و عصاره مرزنجوش در زمان های مختلف و مقایسه آن با تیمار شاهد

تیمار / زمان (روز)	شاهد	عصاره مرزنجوش	نانوکامپوزیت آب پنیر و عصاره
صفر	^{eA}۳/۰۹±۰/۰۳	^{dA}۳/۱۱±۰/۰۴	^{dA}۳/۰۶±۰/۰۶
۳	^{dA}۴/۹۰±۰/۰۲	^{cB}۳/۶۷±۰/۰۰	^{cC}۳/۳۵±۰/۲۷
۶	^{cA}۵/۲۶±۰/۲۰	^{abB}۴/۱۰±۰/۲۱	^{aB}۳/۸۷±۰/۲۱
۹	^{bA}۵/۸۰±۰/۰۱	^{aB}۴/۲۳±۰/۰۷	^{aC}۳/۸۱±۰/۰۲
۱۲	^{aA}۶/۸۷±۰/۲۱	^{aB}۴/۳۵±۰/۱۲	^{abB}۳/۷۵±۰/۰۴

حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در هر ستون و ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار مابین داده‌ها می‌باشد($P<0.05$).

استافیلوکوکوس اورئوس در صنعت فرآوری مواد غذایی، از طریق آب، پرسنل و تجهیزات آلـوده بـه ایـن بـاکتری، بـه مـاده غذایی انتقال می‌یابد. در تحقیق انجام شده توسط Varga and Anderson (1968) مشخص گردید که انتقال آلـودگی کلی فرم و انتروکوکوکها به فرآورده‌های شیلاتی بیشتر از طریق افراد عمل‌آوری کننده و تجهیزات به محصـول انتقـال مـی یابد تا آب آلوده به مدفوع. مطالعات مختلفی در خصوص تأثیر انواع عصاره‌ها از جمله بـره مـوم (تهیـه شـده از مـوم زنبـور عسل)، عصاره برگ زیتون و عصاره گزنه بر رفتار استافیلوکوکوس اورئوس در محصـولات غـذایی و مـاهی Samya *et al*., 2013; Aytyl, 2010) و (رضایی و همکاران ۱۳۹۳) همچنین تأثیر انواع عصاره هـا بـر رفتـار اسـتافیلوکوکوس اورئوس در شرایط in vitro انجام گرفته که نتایج بسته به نوع عصاره، غلظت آن و همچنـین نـوع محصـول متفـاوت بـوده است(صفری و عادل ۱۳۹۳).

پوشش‌ها و نانوکامپوزیت‌ها بعنوان پوشش های محافظت‌کننده عمل کرده و باعث دوام و پایداری هسـته مرکـزی(اسـانس، عصاره، متابولیت میکروبی) شده و با رهایش مواد مذکور اثرات مفید آنها را افزایش می‌دهند (Shamaei *et al*.,2017). ضرورت استفاده از پوشش‌های نانوکامپوزیت برای عصاره‌ها، حلالیت پائین آنها و حساسـیت بـه واکـنش‌هـای اکسیداسـیون بوده و از این‌رو تهیه نانوکامپوزیت باعث افزایش پایداری اکسایشی آنها و عدم تغییرات شدید در شرایط نامناسـب دمـایی و رطوبت می‌گردد (Lasongkram *et al*., 2011; Botrel *et al*., 2015).

نتایج تحقیقات Oliveira و همکاران (۲۰۱۷) در خصوص ارزیابی اثرات ضدمیکروبی آب پنیر ایزوله و اسانس مرزنجـوش نشان داد که با اضافه نمودن اسانس، برخی از خواص فیلم نظیر ویژگی‌های مکانیکی و نفوذپذیری به بخار آب تغییـر بهینـه یافته و با افزایش اسانس به ۱/۵ درصد، فعالیت ضدمیکروبی آن نیز افزایش می‌یابد. سـه غلظـت مـورد اسـتفاده در تحقیـق مذکور ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد بوده‌است. Oussalah و همکاران (۲۰۰۴) در مطالعه خود از فیلم‌های کازئینات کلسـیم و آب

پنیر ایزوله بـه‌همـراه اسـانس مرزنجـوش اسـتفاده کـرده و نتـایج نشـان داد کـه اثـرات ضـدباکتریایی علیـه بـاکتری‌هـای استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس در نمونه‌های ترکیبی (حاوی ۱ درصد اسانس مرزنجوش) بیشتر از نمونه‌های منفـرد بوده‌است. همچنین مشخص گردید که با افزایش غلظت اسانس به ۲ درصد در نمونه‌های ترکیبی، اثرات ضدباکتریایی علیـه باکتری‌های دیگر نظیر استافلوکوکوس‌اورئوس، سالمونلا اینتریدیس، لیسـتریا مونوسـیتوژنز و لاکتوباسـیلوس پلانتـاروم نیـز مشاهده می‌گردد. نتایج تحقیق فوق با تحقیق حاضر که همانا اثرات ضد باکتریایی بالاتر در نمونـه‌هـای ترکیبـی(آب پنیـر تغلیظ شده و عصاره با غلظت ۰/۵ درصد) همخوانی دارد. Seydim and Sarikus (۲۰۰۶) اثرات ضـدباکتریایی ترکیـب عصاره مرزنجوش ۱ درصد و آب پنیر ایزوله را مورد بررسی قرار داده و نتـایج نشـان از عـدم اثـرات ضـدمیکروبی ترکیبـات مذکور داشته که با مطالعه حاضر مغایرت دارد. ولی با ایـن وجـود بـا افـزایش غلظـت عصـاره در فـیلم آب پنیـر(۲ درصـد) کمترین غلظت مهار کننده باکتری مشخص شده و با افزایش عصاره به ۴ درصد نیـز بیشـترین هالـه عـدم رشـد مشـاهده گردید. Pelissari و همکاران(۲۰۰۹) از فیلم کیتوزان، نشاسته در ترکیـب بـا اسـانس مرزنجـوش جهـت ارزیـابی خـواص ضدباکتریایی استفاده کرده و نتایج نشان داد که با افزایش غلظت اسانس، اثرات ضدباکتریایی بیشـتر شـده و در ایـن میـان باکتری‌های گرم مثبت نظیر اشرشیاکلی و باسیلوس سرئوس در مقایسه با باکتری‌هـای گـرم منفـی نظیـر اسـتافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا از حساسیت بیشتری برخوردار بودنـد. نتـایج مطالعـه فـوق بـا مطالعـه حاضـر مغـایرت داشـته زیـرا در تیمارهای ترکیبی و همچنین تیمار دارای عصاره مرزنجوش به مقدار ۰/۵ درصد، اثـرات مهارکننـده علیـه اسـتافیلوکوکوس اورئوس کاملا مشهود بوده‌است. نتیجه‌گیری نهـایی نشـان داد کـه بـه هنگـام اسـتفاده از نانوکامپوزیـت آب پنیـر و عصـاره مرزنجوش، رشد صعودی باکتری‌های بیماری‌زای فرصت‌طلب نظیر استافیلوکوکوس اورئوس به‌طور معنی‌داری کاهش داشته هرچند که در تیمار دارای عصاره، این روند نیز مشاهده شده ولی با این وجود جهت حفظ و پایداری بیشتر این عصاره نیـاز به استفاده از فیلم و یا پوشش‌های خوراکی بوده و استفاده از آنها به فرم نانوکامپوزیـت باعـث افـزایش اثـرات ضـدباکتریایی عصاره می‌شود

منابع

اجاق، س.م. ۱۳۸۹. تأثیر استفاده از پوشش نگهدارنده کیتوزان غنی‌شده با اسانس دارچـین بـر کیفیـت و مانـدگاری فیله سرد شده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان(***Oncorhynchus mykiss***). رساله دکتری، دانشـکده منـابع طبیعـی و علوم دریایی. دانشگاه تربیت مدرس.

رضایی، م. احمدی، ۱۳۹۳. ارزیابی رفتار استافیلوکوکوس اورئوس در گوشت چرخ شده گوساله حاوی عصاره گزنه در دمای ۴ درجه. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد سوادکوه.

سالنامه آماری سازمان شیلات ایران. ۱۳۹۵. معاونت برنامه ریزی و مدیریت منابع. دفتر برنامه ریزی و بودجه .

صفری، رضا. عادل، م. ۱۳۹۳. ارزیابی تأثیر برخی از گیاهان دارویی بر رفتار باکتری‌هـای بیمـاریزا در شـرایط آزمایشـگاهی. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی. پژوهشکده اکولوژی دریای خزر.

ALTUG, G. BAYRAK, Y. 2003. Microbiological analysis of caviar from Russia and Iran. *Food Microbiology*, 20, 83-88.

AHMAD, M., BENJAKUL, S., PRODPRAN, T. & AGUSTINI, T. W. 2012. Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. *Food Hydrocolloids,* 28**,** 189-199.

AYTUL, K.K. 2010.Antimicrobial and Antioxidant activities of olive leaf extract and its food applications. Master of Science in Biotechnology. Pp.102.

BAHRAM,S. REZAEI,M. SOLTANI, M. 2012. Whey protein concentrate edible film activated with Cinnamon essential oil. *Journal of Food Processing and Preservation*. 1-8.

BENAVIDES, S., VILLALOBOS-CARVAJAL, R. & REYES, J. 2012. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. *Journal of Food Engineering,* 110**,** 232-239.

BOTREL DA, FERNANDES RV DE B, BORGES SV. 2015. Chapter 12 – Microencapsulation of Essential Oils Using Spray Drying Technology. In *Microencapsulation and Microspheres for Food Applications*, 235–251.

CASTILHO, P. C., SAVLUCHINSKE-FEIO, S., WEINHOLD, T. S. & GOUVEIA, S. C. 2012. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of essential oils, extracts and their main components from oregano from Madeira Island, Portugal. *Food Control,* 23**,** 552-558.

CHA, D. S. & CHINNAN, M. S. 2004. Biopolymer-based antimicrobial packaging: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition,* 44**,** 223-237.

COSTA, R.A. 2013. *Escherchia coli* in seafoods, A brief overview. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4, 450-454.

Debbarma, J. Kishre,P. Nayak,B. Kannuchamy,N. Gudipati,V. 2012. Antibacterial activity of Ginger, Eucalyptus, Sweet orange peel essential oils on fish-borne bacteria.Journal of food processing and preservation.1745-4549.

DORMAN, H. & DEANS, S. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology,* 88**,** 308-316.

DRAGLAND, S., SENOO, H., WAKE, K., HOLTE, K. & BLOMHOFF, R. 2003. Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. *The Journal of nutrition,* 133**,** 1286-1290.

ECONOMOU, K., OREOPOULOU, V. & THOMOPOULOS, C. 1991. Antioxidant activity of some plant extracts of the family Labiatae. *Journal of the American Oil Chemists Society,* 68**,** 109-113.

IBRAHIM SALLAM, K. 2007. Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon, Food Control, 18, 566–575.

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.

KUORWEL, K. K., CRAN, M. J., SONNEVELD, K., MILTZ, J. & BIGGER, S. W. 2011. Essential oils and their principal constituents as antimicrobial agents for synthetic packaging films. *Journal of food science,* 76**,** R164-R177.

LASONGKRAM K, MAHAMAKTUDSANEE T, CHAIWANICHSIRI S. 2011. Microencapsulation of Macadamia oil by spray drying. *Procedia Food Sci*, 1:1660–1665.

LIN, C.-C. & LIN, C.-S. 2005. Enhancement of the storage quality of frozen bonito fillets by glazing with tea extracts. *Food Control,* 16**,** 169-175.

MIN, S., KROCHTA, J. M. 2007. Ascorbic acid-containing whey protein film coatings for control of oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2964–2969.

NAVARRO-GARCIA, G., PACHECO-AGUILAR, R., BRINGAS-ALVARADO, L. & ORTEGA-GARCıA, J. 2004. Characterization of the lipid composition and natural antioxidants in the liver oi. rays. *Food chemistry,* 87**,** 89-96.

OJAGH, S. M., REZAEI, M., RAZAVI, S. H., & HOSSEINIi, S. M. H. 2010. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamonoil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry, 120*(1), 193-198 .

OLIVEIRA, S.P. BERTAN, L.C. DE RENSIS, C.M. 2017. Whey protein-based films incorporated with oregano essential oil. Polímeros, 27(2), 158-164.

OUSSALAH, M., CAILLET, S., SALMIERI, S., SAUCIER, L., & LACROIX, M. 2004. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(18), 5598-5605. PMid:15373399. http://dx.doi. org/10.1021/jf049389q.

PAL, M. KETEMA, A. ANBERBER, M. 2016. Microbial quality of fish and fish products. *Beverage and Food World*. 43, 2, 47-49.

PELISSARI, F. M., GROSSMANN, M. V. E., YAMASHITA, F., & PINEDA, E. A. G. 2009. Antimicrobial, mechanical, and barrier properties of cassava starch−chitosan films incorporated with oregano essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(16), 7499-7504. PMid:19627142. http://dx.doi. org/10.1021/jf9002363.

SAMYA I. A. HASSANIN,A. EL-SAID A. and EL-DALY,M. 2013. Effect of Propolis and Garlic on Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* Fillets during Frozen Storage. Journal of the Arabian Aquaculture Society. 8, 1, 237-247.

SEYDIM, A. C., & SARIKUS, G. 2006. Antimicrobial activity of whey protein-based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic extracts. *Food Research International*, *39*(5), 639-644. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2006.01.013.

SHAMAEI S, SEIIEDLOU SS, AGHBASHLO M, TSOTSAS E, KHARAGHANI. 2017. A: Microencapsulation of walnut oil by spray drying: Effects of wall material and drying conditions on physicochemical properties of microcapsules. *Innov Food Sci & Emerg Technol*, 39:101-112.

SILVA, M. A. D., BIERHALZ, A. C. K. & KIECKBUSCH, T. G. 2009. Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca< sup> 2+</sup> ions: Effect of the plasticizer concentration. *Carbohydrate polymers,* 77**,** 736-742.

SKANDAMIS, P. & NYCHAS, G. J. 2001. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology,* 91**,** 1011-1022.

VARGA,S.ANDERSON,W.G.1968.Significance of Coliforms and Enterococci in Fish Products. Applied Microbiology. 16,2, 193-196

YASIN, N. M. & ABOU-TALEB, M. 2007. Antioxidant and antimicrobial effects of marjoram and thyme in coated refrigerated semi fried mullet fish fillets. *World J. Dairy Food Sci,* 2**,** 1-9.

Aijamas

The Effect of whey protein concentrate nanocomposites and marjoram (*Origanum vulgare*) extract on the behavior of *Staphylococcus aureus* in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) fillets stored at 4°C

Abstract

In this study, the effect of nanocomposite prepared from whey protein concentrate (WPC) and marjoram (*Origanum vulgare*) extract was evaluated on the behavior of *Staphylococcus aureus* in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) fillets. Treatments included control sample(without preservative),marjoram extact (0.5%) and combined treatment (WPC and marjoram extract), and changes in Staph. aureus (initial inoculation = logarithm 3) in fish fillets stored at 4°C, was tested in 3 replicates and 0, 3, 6, 9 and 12 days. The Baird Parker agar was used to count this bacterium, which is the growth of black colonies with clear zone indicative of Staph. aureus. The results of the experiments showed that the use of marjoram extract and its combination with WPC reduced the growth rate of Staph. aureus and the results showed a significant difference with control treatment. The logarithm of Staph. aureus in control treatment, marjoram extract and combination treatment at zero time was 3.09, 3.11 and 3.06 CFU/g which have changed to 6.87, 4.35 and 3.75 on days 12 respectively. There was no significant difference between treatments containing extract and combined treatment. The final conclusion was that during the use of WPC and marjoram extract nanocomposites, the growth of opportunistic pathogens such as *Staphylococcus aureus* significantly decreased, although in the treatment with extract, this trend was also observed, however, to maintain the stability of this extract requires the use of film or edible coatings, and their use in the form of nanocomposite increases the antibacterial effects of extract.

Key words: whey protein concentrate, marjoram extract, *Staphylococcus aureus,* Silver carp

Aparat