تولید و بهینه سازی پوشش ترکیبی کنسانتره پروتئین آب پنیر، مالتودکسترین و اسانس رزماری و بررسی اثر آن بر شمارش کلی باکتریایی فیله ماهی تیلاپیا در طول نگهداری در سرما

سادات میرباقری، س.[۱]، سلیمی، آ.[۲]*، جبلی‌جوان، ا.[۳]، مهدی‌زاده مود، س.[۴].

دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۰۶ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۰

خلاصه

در این پژوهش، اثر ترکیبی کنسانتره پروتئین آب‌پنیر، مالتودکسترین و اسانس رزماری بر ویژگی‌های میکروبی ماهی تیلاپیا مورد بررسی قرار گرفته و به روش رویه سطح پاسخ[1] بهینه‌سازی شد. بدین منظور، بر اساس حدود تعیین شده توسط نرم‌افزار بهینه-سازی، ۱۸ محلول حاوی ترکیب ۱۰،۵ و ۱۵ درصد وزنی–وزنی کنسانتره پروتئین آب‌پنیر، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد وزنی–وزنی مالتودکسترین و ۱، ۳ و ۵ درصد وزنی–حجمی اسانس رزماری تهیه و فیله‌ها از طریق غوطه‌وری در آن‌ها، پوشش‌دهی شده و سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از شش روز نمونه‌ها از یخچال خارج شده و مورد ارزیابی میکروبی قرار گرفتند. بر اساس نتایج بدست آمده رابطه با باکتری‌های سرماگراها، بهترین محلول پوشش‌دهی برای ممانعت از رشد میکروبی، نمونه‌ای بود که شامل مقادیر میانی و متوسط کنسانتره پروتئین آب پنیر (حدود ۱۰٪ وزنی/وزنی) و بالاترین درصد اسانس رزماری (۵٪ حجمی/وزنی) بود. در مورد باکتری‌های مزوفیل بهترین اثر زمانی مشخص شد که در پوشش‌ها از حداکثر مقدار مالتودکسترین و کنسانتره پروتئین آب پنیر (۲۵ و ۱۵ درصد وزنی/وزنی) به همراه بالاترین مقدار اسانس رزماری (۵ درصد حجمی/وزنی) استفاده شده بود.

واژه‌های کلیدی: روش سطح پاسخ، پوشش‌دهی، باکتری سرماگرا، باکتری مزوفیل

۱.دانشجوی دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.
۲. استادیار علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.
۳.دانشیار بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.
۴. استادیار بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.

[1] Response Surface Methodology (RSM)

*نویسنده مسئول : a.salimi@semnan.ac.ir

مقدمه

آبزیان بویژه ماهیان به دلیل برخورداری از مقادیر قابل توجهی از اسیدهای چرب چند غیراشباع ، کلسترول کم، برخی از انواع ویتامین‌ها و موادمعدنی و پروتئین‌های با کیفیت در رژیم غذایی انسان اهمیت زیادی دارند (Halioglu و همکاران، ۲۰۰۴). پروتئین‌های ماهی حاوی تمام آمینواسیدهای ضروری (هیستیدین، فنیل‌آلانین، والین، ترئونین، تریپتوفان، لوسین، ایزولوسین، متیونین و لیزین) است که بدن قادر به ساخت آن‌ها نیست و باید از راه تغذیه برای بدن فراهم شود (Taherghorabi and Jaczynski، ۲۰۱۶). وجود اسیدهای چرب چندغیراشباع امگا۳ به مقدار زیاد در روغن ماهی، سبب کاهش خطر ابتلاء به بیماری‌های قلبی عروقی می شود (Watts و همکاران، ۲۰۱۸). محصولات دریایی به دلیل وجود مقادیر بالای اسیدهای آمینه آزاد، بازهای نیتروژنی فرار و اسیدهای چرب چندغیراشباع نسبت به گوشت قرمز و مرغ بیشتر مستعد فساد هستند (Sallam، ۲۰۰۷). فساد گوشت ماهی به صورت فساد شیمیایی (اکسیداسیون)، فساد بیوشیمیایی (اتولیز) و فساد میکروبی (آلودگی با میکروارگانیسم‌ها و رشد آن‌ها) می‌باشد (Ojagh و همکاران، ۲۰۱۰). بین عواملی که منجر به فساد گوشت ماهی می شوند، آنزیم‌های باکتریایی مهمترین عواملی هستند که منجر به تغییرات نامطلوب در طعم، بو و ظاهر آن می‌گردند (Debbarna و همکاران، ۲۰۱۲). میکروارگانیسم‌های مولد فساد با تجزیه پروتئین، محصولاتی مثل آمونیاک، ایندول، متان، پوتریسین، تری‌متیل‌آمین و سایر ترکیبات بدبو را ایجاد می‌کنند (Olafsdottir و همکاران، ۱۹۹۷؛ Davidson و همکاران، ۲۰۰۲). به دلیل مقادیر بالای چربی‌های غیراشباع و مولکول‌های پرواکسیدان، فساد آنزیمی و غیر آنزیمی که تاثیر بسزایی در کاهش ماندگاری گوشت ماهی دارد، در شرایط انجماد هم ادامه پیدا می‌کند (Aubourg و همکاران، ۲۰۰۵).

امروزه تمایل مصرف کنندگان به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی مثل متابولیت‌های میکروبی، عصاره و اسانس‌های گیاهی به عنوان ضد میکروب به جای نگهدارنده‌های مصنوعی مثل بوتیرات‌هیدروکسی‌تولوئن (BHT) که درصورت استفاده بیش از حد مجاز بین المللی اثرات سوء بر مصرف کننده دارند،سبب افزایش تحقیقات در این زمینه شده‌است (Debbarna و همکاران، ۲۰۱۲؛ Jeon و همکاران، ۲۰۰۲).

برخلاف فیلم‌های خوراکی که قبل از کاربرد در بسته‌بندی تولید می‌شوند، پوشش‌های خوراکی روی ماده‌غذایی تشکیل می‌شوند و پوشش موقع استفاده روی محصول باقی مانده و همراه آن مصرف می‌شوند. پوشش‌دهی با روش‌هایی مانند اسپری کردن، واکس زدن و غوطه‌وری انجام می‌شود (Guilbert و همکاران، ۱۹۹۵). پوشش‌های خوراکی می‌توانند منشا پروتئینی، لیپیدی و پلی‌ساکاریدی داشته باشند و مدت زمان نگهداری موادغذایی را افزایش دهند. این پوشش‌ها که در مقابل انتقال رطوبت، گازها و مواد محلول مانند سد حفاظتی عمل می‌کنند، زیست تخریب‌پذیر و ارزان‌قیمت هستند و مشکلات آلودگی زیست‌محیطی مانند بسته‌بندی‌های پلاستیکی را ندارند (Wang و همکاران، ۲۰۱۰).

آب‌پنیر یکی از محصولات جانبی کارخانه‌جات پنیرسازی است که به مقدار زیادی تولید می‌شود و بیشتر آن مورد استفاده قرار نمی‌گیرد و منجر به ایجاد مشکلات دور ریختن و آلودگی می‌شود (Ozdemir and floros ، ۲۰۰۸). به منظور پنیرسازی با افزودن رنت به شیر یا بواسطه تغییر pH کازئین رسوب می‌کند و پروتئین آب‌پنیر باقی می‌ماند. استفاده از پروتئین آب‌پنیر برای تشکیل فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی علاوه بر مصرف آب‌پنیر، سبب افزایش ارزش تغذیه‌ای و مدت زمان نگهداری موادغذایی می‌شود (Smithers، ۲۰۰۸؛ Gennadios، ۲۰۰۲).

مالتودکسترین پلیمری است که از هیدرولیز جزئی و خشک کردن پاششی نشاسته به دست می‌آید. واحد سازنده آن گلوکز بوده و شاخص طبقه بندی آن دکستروز اکی‌والان می‌باشد. از ویژگی‌های مهم مالتودکسترین می‌توان ارزان بودن، ویسکوزیته پایین در مقدار مواد جامد بالا، طعم خنثی و قابلیت بالای تشکیل فیلم و پوشش دادن ترکیب هسته در فرآیند ریزپوشانی نام برد (Jafari و همکاران، ۲۰۰۸).

اسانس‌های گیاهی مایعات روغنی معطر بدست آمده از بخش‌های مختلف گیاهان هستند که به عنوان طعم دهنده در موادغذایی کاربرد دارند. (Burt، ۲۰۰۴). اثرات ضدمیکروبی ترکیبات مونوترپنیدی موجود در اسانس‌های گیاهی مربوط به اثرات سمی است که روی ساختار و عملکرد غشای میکروارگانیسم‌ها ایجاد می‌کنند (Morris و همکاران، ۱۹۷۹).

.بهینه‌سازی عبارت است از بهبود عملکرد یک سیستم، فرآیند یا تولید به منظور دست‌یابی به حداکثر سود از آن. لغت بهینه‌سازی معمولاً در مباحث شیمیایی به عنوان وسیله‌ای برای تعیین شرایطی‌که در آن اجرای فرآیند موجب رسیدن به بهترین پاسخ میشود، تعریف می‌گردد. روش سطح پاسخ[2]، مجموعه‌ای از روشهای ریاضی و آماری است که برای مدلسازی و تجزیه و تحلیل مسائلی مورد استفاده قرار می‌گیرد که در آنها پاسخ مورد نظر، به هدف بهینه‌سازی آن پاسخ، تحت تأثیر چندین متغیر گوناگون قرار دارد. هدف از اعمال این روش، یافتن بهترین مجموعه از سطوح عامل برای رسیدن به بعضی ویژگی‌های خاص و مورد نظر می‌باشد. بدین منظور، روش‌های آماری و ریاضی که بر اساس انطباق معادلات چند جمله‌ای با داده‌های آزمایشی بنا شده‌اند، به گونه‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرند که بتوانند رفتار مجموعه داده‌ها را با توجه به هدف نهایی، پیش‌بینی کنند. بر این اساس، تابع‌های چند جمله‌ای (خطی، درجه دو و بالاتر) برای توصیف شرایط سیستم تحت بررسی و سوق دادن آن به سمت یک نقطه بهینه مورد استفاده قرار می‌گیرند. عموما روش سطح پاسخ، به منظور بهینه‌سازی طرح‌ها و با هدف کاهش هزینه‌های روش‌های تجزیه و تحلیل گران‌قیمت و همچنین کنترل خطاهای عددی به‌کار گرفته می‌شود (Noshad و همکاران، ۲۰۱۲). در این پژوهش، به منظور کاهش رشد و آلودگی میکروبی فیله‌های ماهی تیلاپیا، از پوشش خوراکی تولید شده با کنسانتره پروتئین آب پنیر، مالتودکسترین و اسانس رزماری استفاده شد. همچنین برای رسیدن به بهترین ترکیب برای تولید پوشش، از بهینه‌سازی به روش سطح پاسخ توسط نرم‌افزار دیزاین اکسپرت ۱۱[3] استفاده شد.

مواد و روش کار

مواد و محلول سازی

در این تحقیق از کنسانتره پروتئین آب پنیر (برند هیلمار، شرکت برگ سبز)، مالتودکسترین (شرکت بازرگانی حسینی)، اسانس رزماری (مرکز تحقیقات کشاورزی سمنان) با هدف پوشش دهی استفاده شد. به منظور انجام تست‌های میکروبی، محیط کشت‌های نوترینت آگار(مرک آلمان) و MRS آگار(مرک آلمان) از شرکت بازرگانی نانوشیمی پارس تهیه شد. برای تهیه محلول‌ها، ابتدا بر اساس حدود تعیین شده توسط نرم افزار، محلول‌هایی شامل ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد وزنی–وزنی پروتئین آب پنیر، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد وزنی–وزنی مالتودکسترین و ۱، ۳ و ۵ درصد حجمی–وزنی اسانس رزماری تهیه شد. بر این اساس، ۱۸ دستور تولیدی توسط نرم‌افزار ارائه گردید که محلول‌ها بر همین اساس تهیه شدند. بدین منظور، مقادیر تعیین شده مالتودکسترین ابتدا در آب مقطر حل شد و برای اطمینان از انحلال کامل آن‌ها، به مدت یک شب باقی ماند تا محلول شفافی به‌دست آید. کنسانتره پروتئین آب پنیر نیز در مقادیر تعیین شده، توزین و با آب مقطر مخلوط گردید. pH توسط بافر فسفات روی ۷ تنظیم شد. سپس تیمار حرارتی در ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه برای دناتوره شدن و بهبود ویژگی‌های عملکردی و تشکیل فیلم، اعمال گردید و در نهایت نمونه‌های آماده شده با یکدیگر ترکیب شدند.

پوشش دهی نمونه‌ها

تعداد ۲۰عدد ماهی تیلاپیای تازه صید شده با میانگین وزنی ۲۵۶ گرم در مهرماه ۹۹ از مرکز تکثیر و پرورش بخش آبزیان موسسه تحقیقات جهاد کشاورزی سمنان تهیه شد. ماهی‌ها در مجاورت یخ به آزمایشگاه موادغذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان منتقل شدند. بعد از سر و دم زنی

[2] Response Surface Methodology (RSM)

[3] Design Expert 11

و تخلیه احشاء ماهی‌ها به صورت دستی فیله و با آب سرد شستشو داده شدند. به منظور پوشش‌دهی، بر اساس تیمارهای تعیین شده توسط نرم افزار، ۱۸ قطعه فیله در ۱۸ محلول تهیه شده به روش غوطه‌وری قرار داده شدند. بعد از 45 دقیقه نمونه‌ها به سبد منتقل شدند تا محلول اضافی خارج و پوشش روی فیله تشکیل شود. سپس فیله‌های پوشش دار شده در ظروف یکبار مصرف از جنس پلی اتیلن، بسته بندی و از سلوفان به عنوان درپوش استفاده شد. هر ۱۸ نمونه به همراه نمونه شاهد که پوشش دهی نشده بود به یخچال منتقل شده و به مدت ۶ روز در دمای ۴ درجه نگهداری شدند. کلیه تست‌های شیمیایی که در بدو ورود نمونه به آزمایشگاه و قبل از پوشش دهی انجام شده بودند شامل تست‌های تیوباربیتوریک اسید، نیتروژن فرار کل، pH و عدد پراکسید بعد از گذشت ۶ روز و خارج کردن نمونه‌ها از یخچال روی نمونه شاهد و نمونه‌های پوشش داده شده تکرار شدند.

آزمون‌های میکروبی

ده گرم نمونه ماهی را با ۹۰ سی سی رقیق کننده پپتون واتر ۰/۱ درصد در شرایط کاملا استریل و در مجاورت شعله در استومیکسر و به مدت ۲ دقیقه با دور ۴ دستگاه هموژن گردید.۱ سی سی از محلول هموژن شده را با پیپت استریل برداشته و به لوله منتقل گردید. سپس ۹ سی سی رقیق کننده به لوله اضافه شد. دوباره با پیپت جدید ۱ سی سی از لوله اول به لوله دوم که ۹ سی سی رقیق کننده داشت منتقل و این کار را تا ۴ الی ۵ لوله دیگر ادامه یافت. ۰/۱ سی سی نمونه از لوله برداشته و روی سطح پلیت نوترینت آگار ریخته شد و با میله خمیده کشت سطحی داده شد. سپس پلیت‌های کشت داده شده در انکوباتور در دمای ۱۰ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و بعد از ۲۴-۴۸ ساعت شمارش انجام شد. (Siskos و همکاران، ۲۰۰۷).

نتایج

آنالیز واریانس پاسخ‌ها

برای آنالیز نتایج بدست آمده و بهینه سازی فرآیند، بر اساس طراحی که توسط نرم افزار دیزاین اکسپرت صورت گرفته بود، ۱۸ دستور یا ران تولیدی بر اساس سه متغیر مستقل (درصد پروتئین آب پنیر، درصد مالتودکسترین و درصد اسانس رزماری)، ارائه شد و پوشش‌دهی ماهی ها بر اساس این الگو صورت گرفت (جدول۱). پارامتر کیفی شمارش میکروبی، تحت عنوان متغیر وابسته یا پاسخ در نرم افزار وارد شد. سپس آنالیز توسط نرم‌افزار انجام شده و جدول آنالیز واریانس‌ها برای بررسی معنی‌دار بودن یا نبودن پارامترهای مدل‌ها استفاده شد (جدول ۲).

برای هر پارامتری، مقادیر F بالاتر و P پایینتر نشانه تاثیرگذارتر بودن آن ضریب رگرسیونی بود (Quanhong and Caili، ۲۰۰۵)؛ بنابراین متغیرهایی که بیشترین تاثیر را بر متغیرهای وابسته داشتند، عملا دارای مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ بوده و هر چقدر این عدد کوچکتر باشد، تاثیرگذاری پارامتر بر پاسخ‌ها، بیشتر و معنی‌دارتر بوده است. بر همین اساس، سایر پارامترهایی که مقدار P آنها از ۰/۰۵ بالاتر بود، عملا تاثیر معنی‌داری نداشته و می‌توانند از مدل حذف شوند.

ضریب همبستگی رگرسیونی (R^2) از دیگر مشخصه‌هایی است که برای بررسی میزان پوشش‌دهی مدلهای ارائه شده و مناسب بودن آنها با توجه به داده‌های بدست آمده تجربی و داده‌های تنظیم شده و پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار، مورد استفاده قرار میگیرد. بدیهی است مقادیر نزدیکتر به یک، نشان دهنده هماهنگی بیشتر بین مدل و داده‌های ارائه شده می‌باشد.

اثر متغیرهای مستقل بر شمارش کلی باکتری‌های سرماگرا

پیشتر، آنالیز واریانس اثر متغیرهای مستقل بر شمارش کلی باکتری‌های سرماگرا، نشان داد که تاثیر پارامتر خطی درصد رزماری و پارامترهای توان دوم درصد کنسانتره پروتئین آب پنیر و درصد مالتودکسترین، بسیار معنی‌دار بودند ($p<0.05$) اما سایر پارامترهای خطی و دو متغیره، تاثیر معنی‌داری در این زمینه نداشتند.

در همین راستا، تصاویر نمودارهای سه بعدی مربوط به این پارامتر، در اشکال ۱، ۲ و ۳ قابل مشاهده هستند.

همانطور که در شکل ۱ مشخص شده است، حداقل مقادیر باکتری‌های شمارش شده، در قسمت‌های میانی صفحه سه بعدی قابل مشاهده است. این بخشها متعلق به نمونه‌هایی می‌باشند که مقادیر درصدی کنسانتره پروتئین آب پنیر در حدود میانی خود (تقریبا ۱۰٪ وزنی/وزنی) و مقادیر درصدی مالتودکسترین در حدود حداکثری یا حداقلی قرار داشت.

با بررسی تاثیر مقادیر مختلف اسانس رزماری و کنسانتره پروتئین آب پنیر، مشخص شد که حداقل شمارش باکتری‌ها در نمونه‌های حاوی حداکثر مقادیر رزماری مشاهده شد. همچنین، بهترین ترکیب موجود برای ممانعت از رشد میکروبی، در حضور مقادیر میانی کنسانتره پروتئین آب پنیر (حدود ۱۰٪ وزنی/وزنی) در کنار بیشترین درصدهای اسانس رزماری (۵٪ حجمی/وزنی) مشاهده گردید.

همانطور که در تصاویر فوق مشخص شده، حداکثر شمارش باکتری‌ها در نمونه‌هایی مشاهده شد که مقدار درصدی اسانس رزماری در آنها حداقل (۱٪ حجمی/وزنی) بوده و مقدار مالتودکسترین در محدوده میانی (حدود ۲۰٪ وزنی/وزنی) قرار داشت. با افزایش مقدار اسانس رزماری، در مقادیر مختلف مالتودکسترین، کاهش مشهودی در شمارش میکروبی مشاهده گردید، با این وجود، این اثر در مقادیر حداکثری و حداقلی مالتودکسترین مشهودتر بود.

تاثیر متغیرهای مستقل بر شمارش کلی باکتری-های مزوفیل

بررسی نتایج مربوط به شمارش کلی باکتری‌های مزوفیل نشان داد که تاثیر پارامترهای خطی هر سه متغیر مستقل، پارامتر دومتغیره درصد کنسانتره پروتئین آب پنیر و اسانس رزماری و پارامتر توان دوم درصد اسانس رزماری، تاثیر معنی داری بر میکروارگانیسم‌های شمارش شده داشتند ($p<۰/۰۵$). اثر سایر پارامترها معنی‌دار نبود. در شکل‌های ۴، ۵ و ۶ نمودارهای سه بعدی مربوطه به ترسیم کشیده شده‌اند.

همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، ترکیب مالتودکسترین و کنسانتره پروتئین آب پنیر در مجموع موجب پایین بودن اعداد مرتبط با شمارش کلی باکتری‌های مزوفیل بوده و کل نمودار با رنگ آبی که نشان‌دهنده سطوح پایین میکروبی است مشخص شده است. با این وجود بهترین اثر زمانی مشخص شد که در پوششها از حداکثر مقدار مالتودکسترین و کنسانتره پروتئین آب پنیر (۲۵ و ۱۵ درصد وزنی/وزنی) استفاده شده بود.

با بررسی تصاویر مربوط به اثر همزمان مالتودکسترین و اسانس رزماری بر شمارش کلی میزوفیل‌ها، مشخص شد که بیشترین تعداد میکروارگانیسم‌ها متعلق به نمونه‌هایی بودند که کمترین درصد اسانس رزماری و مالتودکسترین را در پوشش خود داشتند که البته نقش اسانس رزماری بسیار بارزتر بود. با افزایش مقدار اسانس، افت چشمگیری در میکروب‌های شمارش شده مشاهده گردید.

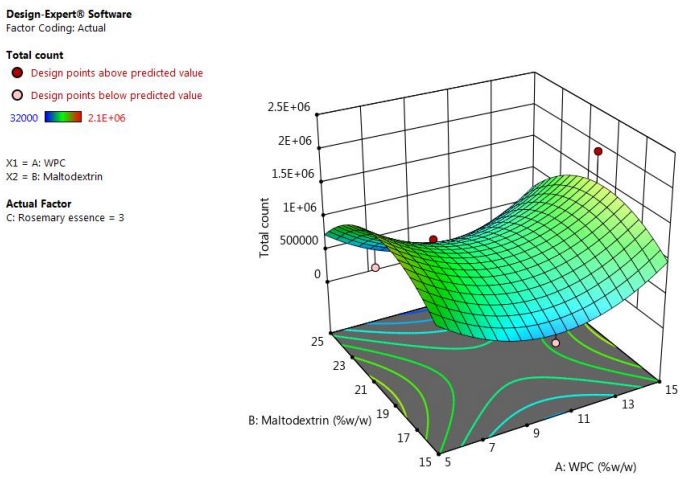
با بررسی شکل ۶ روند نسبتا مشابهی با شکل ۵ مشاهده میشود، بدین معنی که تاثیر اسانس رزماری بر بار میکروبی بسیار شاخص بوده و بیشترین شمارش میکروبی در نمونه‌هایی مشاهده شد که درصد اسانس رزماری آنها کم بود. نقش افزایش درصد کنسانتره پروتئین آب پنیر در کاهش شمارش کلی باکتری‌ها نیز در تصاویر قابل مشاهده است اما این اثر نسبت به رزماری بسیار کمتر بوده است. در مجموع نمونههایی با حداقل درصد اسانس رزماری و کنسانتره پروتئین آب پنیر (۱٪ حجمی/وزنی و ۵٪ وزنی/وزنی)، دارای بیشترین تعداد میکروارگانیسم مزوفیل شمارش شده بودند.

Run	کنسانتره پروتئین آب پنیر (%وزنی/وزنی)	مالتودکسترین (%وزنی/وزنی)	اسانس رزماری (%حجمی/وزنی)
۱	۵	۳۰	۳
۲	۱۵	۳۰	۳
۳	۱۰	۳۰	۳
۴	۵	۳۵	۵
۵	۵	۱۵	۵
۶	۱۵	۳۵	۱
۷	۵	۱۵	۱
۸	۱۰	۳۰	۳
۹	۵	۳۵	۱
۱۰	۱۰	۳۰	۱
۱۱	۱۵	۱۵	۵
۱۲	۱۰	۳۰	۳
۱۳	۱۰	۱۵	۳
۱۴	۱۵	۱۵	۱
۱۵	۱۵	۳۵	۵
۱۶	۱۰	۳۵	۳
۱۷	۱۰	۳۰	۵
۱۸	۱۰	۳۰	۳

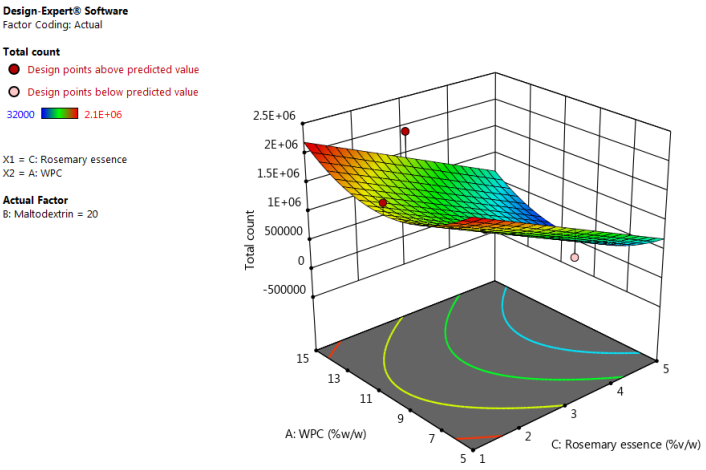
جدول ۱. چیدمان ارائه شده توسط نرم‌افزار بر اساس متغیرهای مستقل

	شمارش میکروبی کلی (مزوفیل)			شمارش کلی میکروبی (سرمادوست)		
متغیرها	ضرایب رگرسیون	*F*-value	*P*-value	ضرایب رگرسیون	*F*-value	*P*-value
X_0	۴/۲۰۹×۱۰$^{-۵}$			۸/۴۷۱×۱۰$^{-۵}$		
خطی						
X_1	-۱/۶۲۳×۱۰$^{-۵}$	۴۱/۲۶	۰/۰۰۰۲	-۱۳۶۰۰	۰/۰۲۹۷	۰/۸۶۶-
X_2	۸۵۵۰۰	۱۱/۴۵	۰/۰۰۹۶	-۱/۳۶۳×۱۰$^{-۵}$	۲/۹۸	۰/۱۰۹۸-
X_3	-۵/۷۷۲×۱۰$^{-۵}$	۵۲۱/۸۷	<۰/۰۰۰۱	-۷/۵۸۹×۱۰$^{-۵}$	۹۲/۴۶	<۰/۰۰۰۱
دومتغیره						
X_1X_2	۱۸۷۵	۰/۰۰۴۴	۰/۹۸۸۷	-	-	-
X_1X_3	۱/۴۷۱×۱۰$^{-۵}$	۲۷/۱۳	۰/۰۰۰۸	-	-	-
X_2X_3	۳۶۸۷۵	۱/۷۰	۰/۲۲۸۱	-	-	-
درجه دو						
X_1^2	-۳۰۳۶۰/۹۵	۰/۱۸۰۷-	۰/۶۸۳۰	-۶/۰۱۷×۱۰$^{-۵}$	۱۸/۰۵	۰/۰۰۱۱
X_2^2	-۳۵۶۳۰/۹۵	۰/۵۳۸۹	۰/۴۸۳۹	-۵/۸۹۳×۱۰$^{-۵}$	۱۷/۳۰	۰/۰۰۱۳
X_3^2	۲/۴۶۹×۱۰$^{-۵}$	۳۵/۸۷	۰/۰۰۰۹	-	-	-
R^2	۰/۹۸۷۶			۰/۹۰۷۹		
Adj-R^2	۰/۹۷۳۶			۰/۸۶۹۵		

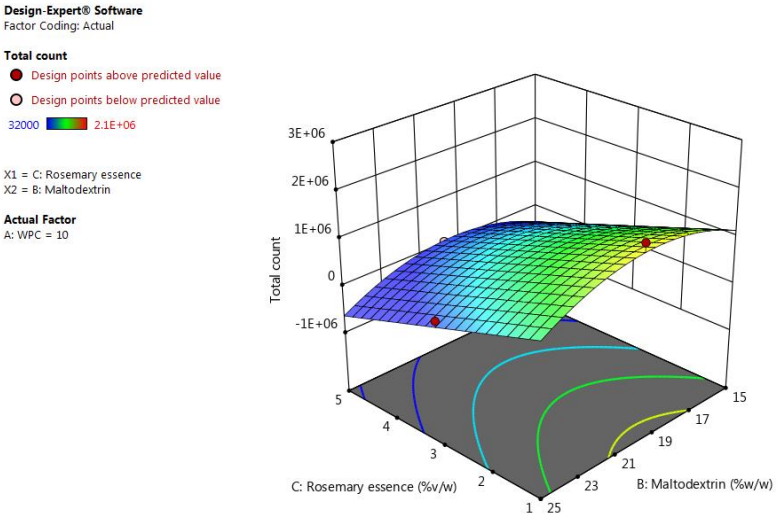
جدول ۲. آنالیز واریانس پاسخ‌های کیفی میکروبی



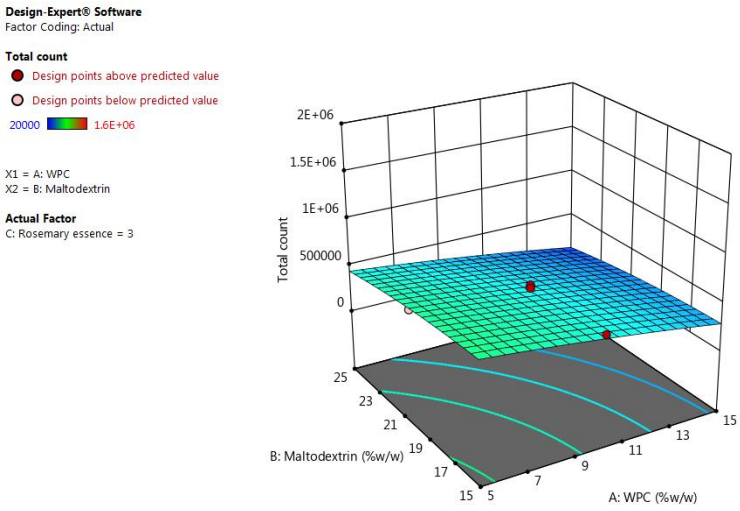
شکل ۱. تصاویر سه بعدی اثر درصد مالتودکسترین و کنسانتره پروتئین آب پنیر بر شمارش کلی باکتری های سرماگرا



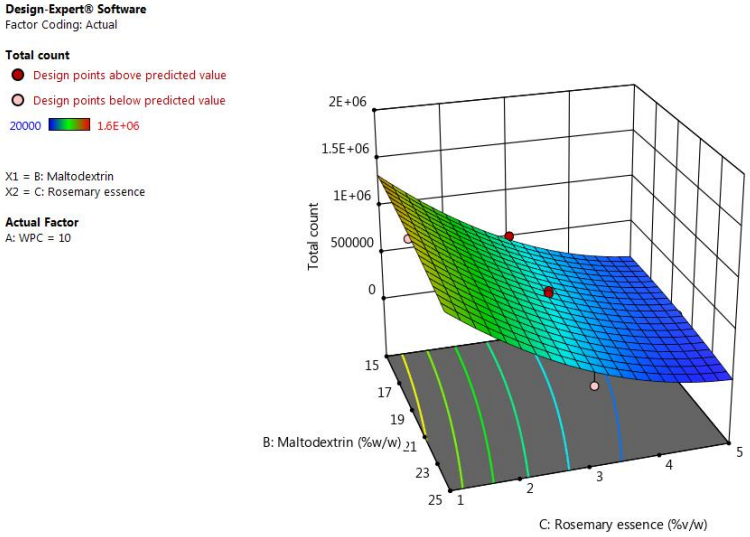
شکل ۲. تصاویر سه بعدی اثر درصد کنسانتره پروتئین آب پنیر و اسانس رزماری بر شمارش کلی باکتری های سرماگرا



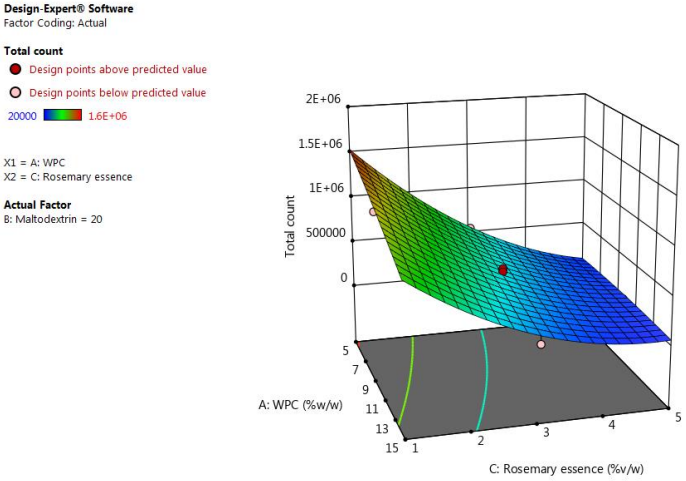
شکل ۳. تصاویر سه بعدی اثر درصد مالتودکسترین و اسانس رزماری بر شمارش کلی باکتری های سرماگرا



شکل ۴. سه بعدی اثر درصد مالتودکسترین و کنسانتره پروتئین آب پنیر بر شمارش کلی باکتری های مزوفیل



شکل ۵. تصاویر سه بعدی اثر درصد مالتودکسترین و اسانس رزماری بر شمارش کلی باکتری های مزوفیل



شکل ۶ تصاویر سه بعدی اثر درصد پروتئین آب پنیر و اسانس رزماری بر شمارش کلی باکتری های مزوفیل

بحث

گروه اصلی میکروارگانیسم‌های مسئول فساد ماهی تازه، باکتری‌های سرماگرا هستند (Sallam، ۲۰۰۷). علت کاهش مقدار باکتریایی کل و کاهش رشد باکتری‌های سرماگرا در نمونه‌های پوشش‌دهی شده، ویژگی آنتی‌میکروبی و اثر محافظتی پوشش‌ها در برابر رشد میکروب‌ها می‌باشد (Novak و همکاران، ۲۰۰۳).

نتایج بدست آمده در این پژوهش، نشان دهنده نقش بسیار شاخص اثر اسانس رزماری در جلوگیری از رشد میکروبی بود. در واقع بخش عمده کاهش رشد میکروبی در طول نگهداری در یخچال، بر عهده این ترکیب بود. بیوپلیمرهای مورد استفاده نیز ار طریق تشکیل لایه‌ای فیلمی و کاهش تماس محیطی، نقش مهمی در کنترل رشد میکروارگانیسم-ها داشتند، با این وجود در مورد میکروارگانیسم‌های سرماگرا، مشاهده شد کاهش یا افزایش زیاد غلظت ترکیبی مانند کنسانتره پروتئین آب پنیر، تاثیر منفی بر ویژگی‌های آنتی‌باکتریالی پوشش‌ها داشت.

از دلایل این امر می‌توان به اثر منفی کاهش مواد تشکیل دهنده فیلم و ضخامت و پیوستگی کم پوشش نهایی در مقادیر پایین بیوپلیمر و اثر نامناسب غلظت بالای محلول بر توزیع مناسب اسانس رزماری و نهایتا تاثیرگذاری ناکافی این ترکیب بر میکروارگانیسم‌های سرماگرا در زمانی که غلظت‌های بالای بیوپلیمر پروتئین آب پنیر استفاده شده بود، اشاره کرد (Salimi و همکاران، ۲۰۱۵).

این پدیده در مورد میکروارگانیسم‌های مزوفیل مشاهده نشد و در این مورد، حداقل رشد میکروبی در حداکثر غلظت‌های پوشش‌ها مشاهده شد. دلیل این امر، ماهیت متفاوت رشد این دو دسته میکروبی می‌باشد. در طول نگهداری در یخچال، میکروارگانیسم‌های سرماگرا شرایط بهتری برای رشد و تکثیر دارند، لذا هرگونه اختلالی در فرآیند تولید پوشش‌ها، منجر به افزایش سریع تعداد این دسته از میکروارگانیسم‌ها می‌گردد اما در مورد باکتری‌های مزوفیل، شرایط دمایی در یخچال مساعد نیست، لذا، اختلال اندکی در پروسه تولید پوشش که ممکن است ناشی از افزایش یا کاهش غلظت مواد باشد، نتوانست به طور چشمگیری بر تغییرات این دسته از میکروب‌ها موثر بوده و لذا با افزایش غلظت همه مواد تشکیل دهنده، حداقل میزان رشد میکروبی در آن‌ها مشاهده شد.

پژوهش‌های مشابهی هم در این زمینه انجام شده و نتایج آنها نشان‌دهنده اثر مثبت پوشش‌دهی و استفاده از اسانس‌ها در کنترل بار میکروبی می‌باشد، از جمله نتایج Khezri Ahmadabad و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان داد که استفاده از پوشش پروتئین آب پنیر غنی شده با اسانس آویشن می‌تواند از شدت رشد باکتری‌های سطح فیله قزل‌آلای رنگین کمان نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد یخچال بکاهد. همچنین Moslemi و همکاران در سال ۲۰۱۹، به نتایج مشابهی در زمینه اثر اسانس رزماری بر کنترل رشد میکروبی در ماهی قزل آلای رنگین کمان دست یافتند. Motalebi و همکاران در سال ۲۰۱۲ و Seifzadeh در سال ۲۰۱۴ نیز با پوشش‌دهی ماهی کیلکا با کنسانتره پروتئین آب پنیر، بیان کرد که این ماده می‌تواند رشد میکروبی در طول نگهداری را کاهش دهد. Bahram و همکاران در سال ۲۰۱۶ نیز با پوشش‌دهی ماهی خاویاری با پروتئین آب پنیر و اسانس دارچین، به نتایج مشابهی در این زمینه دست یافت.

نتیجه گیری

در بررسی نتایج حاصل درمورد رشد میکروارگانیسم‌ها، اثر اسانس رزماری بسیار شاخص بود. در واقع بخش عمده کاهش رشد میکروبی در طول نگهداری در یخچال، بر عهده این ترکیب بود. با این وجود در مورد میکروارگانیسم‌های سرماگرا، مشاهده شد کاهش یا افزایش زیاد غلظت ترکیبی مانند کنسانتره پروتئین آب پنیر، تاثیر منفی بر ویژگی‌های آنتی‌باکتریالی پوشش‌ها داشت. این پدیده در مورد میکروارگانیسم‌های مزوفیل مشاهده نشد و در این مورد، حداقل رشد میکروبی در حداکثر غلظت‌های پوشش‌ها مشاهده شد.

Journal of Veterinary Laboratory Research 13 (2021) 45-57

Optimization of the combined effect of whey protein concentrate, maltodextrin and rosemary essential oil on the bacterial total count of tilapia fillets during cold storage

Sadat Mirbagheri, S.[1], Salimi, A.[2*], Jebeli Javan, A.[3], Mehdizadeh Mood, S.[4].

Received:26.04.2021 Accepted: 11.09.2021

Abstract

In this study, the combined effect of whey protein concentrate, maltodextrin and rosemary essential oil on the microbial properties of tilapia was investigated and optimized by Response Surface Methodology. after preparing fish fillets, according to the software plans, 18 solutions including 10, 5 and 15% w/w of whey protein concentrate, 15, 20 and 25% w/w of maltodextrin and 1, 3 and 5% v/w rosemary essential oil were prepared. Fish fillets were coated by immersing in solutions and then were refrigerated at 4°C. After six days, coated samples were removed from refrigerator and microbial contamination was evaluated. Based on the obtained data from microbial counts (psychrophilic bacteria), the best protective solution was produced by mixing moderate amounts of whey protein concentrate (about 10% w/w) with the highest percentages of rosemary essential oil (5% v/w). In case of mesophilic bacteria, the best protective effect was observed when the coatings solution was included of maximum amount of maltodextrin and whey protein concentrate (25 and 15% w/w) and rosemary essential oil (5% v/w).

Key words: Response Surface Methodology, Coating, Psychrophilic bacteria, esophilic bacteria.

1. DMV Student of veterinary, faculty of veterinary, Semnan University, Semnan, Iran
2. Assistant professor of food science and technology, faculty of veterinary, Semnan University, Semnan, Iran
3.Associate professor of Food Hygiene, faculty of veterinary, Semnan University, Semnan, Iran
4. Assistant professor of aquatic anima health and diseases, faculty of veterinary, Semnan University, Semnan, Iran
*Corresponding author: **a.salimi@semnan.ac.ir**

Aubourg, S. PRudriguez, and Gallardo, J. 2005. Rancidity development during frozen storage of mackerel (Scomber scombrus): Effect of catching season and commercial presentation. European Journal of Lipid Science and Technology, **107**:316-323.

Bahram, S., Rezaei, M., Soltani, M., Abdollahi, M., Khezri. Ahmadabad, M., Kamali, A., Nemati, Effect of whey protein concentrate coating cinamon oil on quality and shelf life of refrigerated beluga sturegeon (huso huso). Journal of Food Quality ISSN 1745-4557.

Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. International Food Microbiology, **94**: 225-253.

Davidson, P.M. and Harrison, M.A., 2002. Resistance and adaptation of food antimicrobials, sanitizers and other process control. J. Food Technology, **59(11)**: 69-78.

Debbarma, J., Kishre, P., Nayak, B., Kannuchamy, N. and Gudipati, V., 2012. Antibacterial activity of Ginger, Eucalyptus, and Sweet orange peels essential oils on fish-borne bacteria. Journal of Food Processing and Preservation, **37(5)**: 1745- 4549.

Gennadios, A. 2002. Protein based film & Coating. CRC PRESS, Pp 773.

Guilbert, S., Gontard, N. and Cuq, B. 1995. Technology and applications of edible protective films. Journal of packaging technology and science, **8(6)**: 339-346.

Haliloglu, H.I, Bayır, A., Sirkecioglu, A.N., Aras, N.M. and Atamanalp, M. 2004. Comparison of fatty acid composition in some tissues of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) living in seawater and freshwater. Food Chemistry, **86(1)**: 55-69.

Jafari, S.M., Assadpoor, E., He, Y., Bhandari, B. 2008. Encapsulation efficiency of food flavors and oils during spray drying. Drying Technology, **26**: 816-835.

Jeon, C. O., Kamil, Y. V. A and Shahidi,F. 2002. Chitosan as an Edible invisible film for quality preservation of Herring and Atlantic Cod Journal of Agricultural and Food Chemistry **5**: 5167-5178.

Khezri Ahmadabad, M., Rezaei, M. and Ojagh, S. M. 2015. The effect of whey protein edible coating on microbial quality of rainbow trout fillet during cold storage. Journal of Food Science and Technology, **49(12)**: 11-20.

Morris, J.A., Khettry, A. and Seitz E.W. 1979. Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. Journal of the American Oil Chemists' Society, **56(5)**: 595-603.

Moslemi, M., Salehani, R., Mehdiabadi, Sh. 2019. Study of the Effect of Nissin and Rosemary Extract on Sensory and Microbial Spoilage Indicators of Rainbow Trout (Onchorynchus mykis) in cold Storage Conditions. Journal of Animal Biology summer, **11 (4)4**: 75-86.

Motalebi, A. A., Seyfzadeh, M. 2012. Effect s of whey protein edible coating on bacterial, chemical and sensory characteristics of frozen common Kilka (Clupeonellia delitula). Iranian Journal of Fisheries Sciences, **11(1)**: 132 -144.

Noshad, M., Mohebbi, M., Shahidi, F., Mortazavi, S.A. 2012. Multi-objective optimization of osmotic–ultrasonic pretreatments and hot-air drying of quince using response surface methodology. Food and Bioprocess Technology, **5(6)**: 2098- 2110.

Novak, S. J., Sapers, G. M. and Juneja, V. K., 2003. Microbial safety of minimally processed foods. CRC press, pp: 97-126.

Ojagh, S. M., Rezaei, M., S. H and Hosseini, S. M. H. 2010. Effect of chitosan enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. Food chemistry, **12**:193-198.

Olafsdottir, G., Marteinsdottir, E., Oehlenschlager, J., Dalgaard, P., Jensen, B., Undeland, I., Mackie, I.M., Henehan, G., Nielsen, J. and Nilsen, H., 1997. Methods to evaluate fish freshness in research and industry. Trends in Food Science and Technology, **8(8)**: 258-265.

Ozdemir, M. & Floros, J. D. 2008. Optimization of edible whey protein films containing preservatives for mechanical and optical properties. Journal of Food Engineering, **84**, 116–123.

Quanhong, L. and Caili, F. 2005. Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein. Food Chemistry, **92**: 701-706.

Salimi, A., Maghsoudlou, Y., Jafari, S. M., Sadeghi Mahounak, A., Kashaninejad, M. and Ziaiifar, A. M. 2015. Preparation of Lycopene Emulsions by Whey Protein Concentrate and Maltodextrin and Optimization by Response Surface Methodology. Journal of dispersion sicence and technology, **36 (2)**: 274-283.

Sallam, K.I., Ahmed, A.M., Elgazzar, M.M. and Eldaly, E.A., 2007: Chemical quality and sensory attributes of marinated Pacific saury (Cololabis saira) during vacuum packaged storage at 4°C. Food Chemistry, **102**: 1061-1070.

Sallam, K. I. 2007. Antimicrobial and antioxidant effect of sodium acetate, sodium lactate in refrigerated sliced salmon. Food control, **18**: 566-575.

Seifzadeh. M. 2014 effect of whey protein edible coating on bacterial, chemical and sensory characteristics of frozen common kilka. Iranian Journal of Fisheries sciences, **13(2)**: 477-491.

Siskos, L; Zotos, A; Melidou, S and Tsikritzi, R. 2007. The effect of liquid smoking of fillets of trout (Salmo gairdnerii) on sensory, microbiological and chemical changes during chilled storage. Food Chemistry, **101**: 458-464.

Smithers, G, W. 2008. Whey and whey proteins-forx gutter-to-gold international Dairy Journal, **18**: 695-704.

Taherghorbi, R. and Jaczynski, J. 2016. Seafood Proteins and Human Health. Elesevier. Chapter **29**, 323-331.

Watts, N., Amann, M., Ayeb-Karlsson, S. 2018. The Lancet Countdown on health and climate change: from 25 years of inaction to a global transformation for public health. Lancet, 2018; **391**: 581−630.

Wang, L., Auty, M. A. E. and Kerry, J. P. 2010. Physical assessment of composite biodegradable films manufactured using whey protein isolate, gelatin and sodium alginate. Journal of Food Engineering, **96**: 199-207.