اثر عصاره های مختلف بره موم بر ماندگاری فیله ماهی کپور نقره‌ای در شرایط یخچال: ترکیبات شیمیایی، ارزیابی میکروبی و حسی

علی اکبر شیخی کوهسار[۱]، سیده زهرا سید النگی[۲*]، مهشید شاملوفر[۳]، صابر شریفیان[۴]

۱- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران

۲- دانشیار گروه شیمی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران

۳- استادیار گروه شیلات، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران

٤- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۵ /۰۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۸/۱۷)

چکیده

بره موم شبیه موم و از تولیدات زنبور عسل است که دارای خواص دارویی و ضد باکتریایی بسیارزیادی می‌باشد. هدف از این پژوهش مطالعه ترکیبات شیمیایی و اثرمهارکنندگی عصاره های آبی و اتانولی بره موم در سه غلظت ۳، ۵ و ۷ ٪ بر شاخص‌های فساد میکروبی شامل شمارش کلی میکروبها، باکتری‌های سرما گرا، باکتری‌های اسید لاکتیک و استرپتوکوکوس اینیایی در دمای ٤ درجه طی ۹ روز می باشد. آنالیز ترکیبات شیمیایی بوسیله GC/MS وجود ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی نظیر کافئیک اسید، تکتوکریسین، کریسین، آکاستین، پینو سمبرین چالکون، پینواستروبین، پینوبانکسین-۳- استات و گالانجین۳-متیل اتر را در عصاره های بره موم اثبات کرد. نتایج نشان داد هر دو عصاره بر مهار شاخص های فساد میکروبی موفق عمل نمودند. نمونه های آغشته به عصاره های بره موم ۷٪اتانولی>۵٪اتانولی> ۳٪اتانولی>۷٪آبی>۵٪آبی>۳٪آبی به ترتیب بیشترین به کمترین تاثیر گذاری را در طول ۹ روز دارا بودند. همچنین، شاخص های ارزیابی حسی شامل بافت، رنگ، بو و پذیرش کلی تاثیرگذاری بیشتر عصاره اتانولی را نسبت به عصاره آبی تایید نمود.

کلید واژگان: عصاره، بره موم، کپور نقره‌ای، فساد میکروبی، ترکیبات شیمیایی

* مسئول مکاتبات: zalangi@gmail.com

۱- مقدمه

افزایش جمعیت از یک سو و کمبود موادغذایی به خصوص پروتئین با کیفیت بالا از سویی دیگر سبب گردیده که در سالهای اخیر توجه خاصی به منابع خوراکی دریایی، به خصوص ماهی مبذول شود [۱]. کپور نقره‌ای یکی از مهمترین ماهیان پرورشی کشور است که به علت استفاده از رژیم غذایی کم هزینه به مقدار زیاد پرورش می‌یابد. البته یکی از مهم ترین ویژگی های این ماهی، عرضه تازه و غیرمنجمد آن است. با توجه به افزایش روزافزون آگاهی مصرف کنندگان، به طور کلی تقاضا برای ماهی تازه رو به افزایش می باشد. اما با در نظر گرفتن فسادپذیری بالای ماهی، نگهداری غیرمنجمد آن موجب کاهش قابل توجه زمان ماندگاری می گردد. در بین عوامل موثر در فسادپذیری باکتریایی ماهیان، آلودگی به استرپتوکوکوس در سطح وسیعی از جهان گزارش شده است [۲]. استرپتوکوکوس اینیایی باکتری کروی یا تخم مرغی شکل گرم مثبت که به صورت جفت یا زنجیره‌ای دیده می‌شود [۳]. باکتری استرپتوکوکوس اینیایی از جمله عوامل بیماریزای مشترک در بین انسان و ماهی می‌باشد [٤].

نگرانی‌های مربوط به استفاده از ضد میکروب‌ها و نگهدارنده های سنتتیک و همچنین موادغذایی ناسالم باعث شده است که تمایل به استفاده از عصاره های استخراج شده از گیاهان و حیوانات به عنوان منابع طبیعی بدلیل داشتن ترکیبات پلی فنولیک جهت حفظ و نگهداری مواد غذایی مورد توجه قرار گیرد. از جمله مضرات نگهدارنده های شیمیایی و سنتزی سرطان زائی برخی از آنها می باشد. استفاده از مواد آنتی باکتریایی و آنتی اکسیدانی طبیعی می‌تواند نقش موثری در بهبود کیفیت منابع خوراکی دریایی ایفا نماید [٥]. خواص آنتی اکسیدانی عصاره‌های متعددی از جمله اسانس‌های آویشن، میخک، رزماری، پونه کوهی، مریم گلی، مرزه و ...، همچنین اثر ضدمیکروبی آنها مورد آزمایش قرار گرفته شده است [۸-٦]. یکی از ترکیبات نگهدارنده طبیعی حیوانی مهم، بره موم می‌باشد که مانع رشد بسیاری از باکتری‌های گرم مثبت می گردد [۹]. بره موم یا همان چسب زنبورعسل[1] در ساعات اولیه روز، عمدتاً صبح‌ها بوسیله آرواره‌ها و پاهای زنبورعسل از درختان جدا شده و به کندو حمل می گردد. کاربرد بره موم در آفت کش‌ها و قارچ کش‌ها هنوز در مرحله آزمایش است [۱۰]. بره موم اثر زیادی روی معالجه کردن بیماریهای ویروسی، آنفولانزا، عفونت روده کوچک، و همچنین فعالیتهای ضد قارچی و ضد باکتریایی برای نمونه در مقابل باسیلوس سوبتیلیس و آلوئی، باسیلوس لاروه، پروتئوس بولگاریس و اشرشیا کلای B و همچنین باعث از بین بردن برخی تیپهای استافیلوکوکوس، استرپتوکوکوس، و گونه‌های سالمونلا می‌شود [۱۰].

تحقیقات زیادی در خصوص بررسی فعالیت بیولوژیکی (آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی) بره موم و همچنین اثرات ضدمیکروبی عصاره های مختلف برخی از منابع طبیعی دیگر علیه باکتری ها و افزایش ماندگاری فیله ماهیان صورت گرفته است. اشراقی و همکاران (۱۳۸۲)، اثر ضد باکتریایی فاز اتانولی بره موم بر علیه ۱۳ سوش نوکاردیا استروئیدس و برازیلینس به عنوان باکتری‌های اصلی و۱۲ سوش استافیلوکوکوس آرئوس، اشریشیاکلای، آنتروباکتر کلواکه، سودوموناس آئروموژینوزا، شیگیلا فلکسنری و کلبسیلا نومونویه به عنوان باکتری‌های انتخابی جهت مقایسه، مورد بررسی قرار دادند [۱۱]. محمد علی ضیاء و همکاران (۱۳۸۸)، به بررسی تاثیر عصاره ی الکلی بره موم حاصل از کندوهای زنبور عسل ایران بر رشد تریکوفیتون منتاگروفایتیس، تریکوفیتون روبروم و تریکوفیتون وروکوزوم در آزمایشگاه پرداختند [۱۲]. عصاره الکلی بره موم فعالیت ضد قارچی مناسبی را بر ضد این سه گونه نشان داد.

بنابراین با استناد به مطالب فوق، در این تحقیق استفاده از غلظت‌های مختلف آبی و الکلی بره موم جهت مهار فساد میکروبی بر روی فیله ماهی کپور نقره ای مورد توجه قرار گرفت.

۲- مواد و روش

۲-۱- تهیه ی عصاره های آبی و الکلی بره موم

عصاره گیری به روش خیساندن و با استفاده از حلال های آب و اتانول ۷۰٪ صورت گرفت. بعد از خرید بره موم از زنبورستان‌های استان گلستان، از آلاینده‌ها پاک و به قطعات کوچک تقسیم گردید. مقدار ۱۰۰ گرم از آن پس از تکه تکه و خرد کردن، درون ظروف عصاره گیری ریخته شد. به میزان چهار برابر وزن بره موم، آب یا اتانول ۷۰٪ اضافه گردید و

1. Bee glu

مدت چهار روز روی شیکر در دمای آزمایشگاه نگهداری گردید. سپس محلول بدست آمده توسط کاغذ صافی واتمن ۴۲ و با کمک قیف بوخنر صاف شد. برای تغلیظ عصاره های به دست آمده از روتاری و دمای ۴۵-۵۰ درجه سانتی گراد استفاده گردید. عمل تغلیظ تا رسیدن به حدود یک درصد مقدار اولیه عصاره ادامه یافت. پس از اتمام عصاره گیری ماده بدست آمده را توزین کرده و درون شیشه مات ریخته و تا هنگام مصرف در یخچال نگهداری شد [۱۳].

۲-۲- شناسائی ترکیبات عصاره های بره موم توسط GC/MS

شناسائی ترکیبات عصاره های مختلف بره موم توسط دستگاه GC/MS ساخت آمریکا نوع Agilent-Hp مدل 6890N(Gl530N)(طول ستون ۶۰ متر و غیرقطبی)، گرادیان دمایی با سرعت ۵ درجه سلسیوس بر دقیقه و توقف ۱۰ دقیقه ای در ۲۶۰ درجه سلسیوس با نسبت split-split-less، یک به سی و گاز حامل هلیوم با سرعت ۱ میلی لیتر بر دقیقه و تزریق نمونه با حجم ۱میکرولیتر انجام گردید. شناسایی طیف های جرمی از طریق مقایسه با طیف های پایه موجود در بانک اطلاعاتی رایانه دستگاه مذکور ومنابع کتابخانه ای که به صورت الکترونی در دسترس می باشند، انجام شد.

۲-۳- تهیه ماهی کپورنقره‌ای

در این مطالعه تعداد ۸ قطعه ماهی کپور نقره‌ای با وزن متوسط ۱۰۰±۱۴۰۰ گرم و طول متوسط ۲±۳۸ سانتی‌متر از بین ماهی های هم اندازه و سالم، از بازار ماهی فروشان شهرستان گنبد کاوس بطور تصادفی انتخاب و خریداری گردیدند. سپس، در جعبه‌های یونولیت به همراه یخ به آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزادشهر انتقال داده شدند.

۲-۴- آماده سازی باکتری استرپتوکوکوس اینیایی جهت تلقیح

باکتری استرپتوکوکوس اینیایی LMG 14520 از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. جهت فعال سازی باکتری از کشت لیوفلیزه در محیط آبگوشت قلب و مغز در دمای ۳۵°C به مدت ۱۸-۱۶ ساعت استفاده گردبد. برای تهیه میزان تلقیح باکتری مورد آزمایش، با انتقال باکتری از لوله میکروسانتریفیوژ اپندرف به محیط براث (BHI) و نگهداری به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷°C انجام شد. مجددا کشت دومی از کشت اولیه، در محیط براث (BHI) دیگر (به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷°C) تهیه شد. سپس لوله‌های کووت حاوی ۵ میلی لیتر براث استریل تهیه گردید. مقادیر مختلفی از کشت براث ۱۸ ساعته دوم بر روی لوله‌های کووت مذکور برده شد. با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر، جذب نوری لوله‌های مذکور خوانده شد. بدین ترتیب در هر بار انجام آزمایش (تعیین لگاریتم درصد احتمال رشد)، با مشخص شدن جذب نوری که معادل تقریبا 10^{8} باکتری در هر میلی لیتر بود، لوله کووت حاوی تقریبا 10^{7} باکتری در میلی لیتر مشخص گردید. سپس ۱ میلی لیتر از این لوله کووت را برداشته و در شیشه زیمکس، ۳۹ میلی لیتر از آب پپتونه استریل به آن افزوده گردید تا در نهایت در هر ۱۰۰ میکرولیتر از محتویات شیشه زیمکس $10^{4}\times$ ۲/۵ باکتری موجود باشد. سپس در زمان تلقیح به فیله ماهی از ۱۰۰ میکرولیتر محتویات شیشه زیمکس استفاده شد تا در هر گرم از فیله ماهی $10^{5}\times$ ۱ باکتری موجود باشد و به منظور اضافه کردن باکتری به سطح فیله از روش اسپری باکتری با سرنگ استفاده گردید [۶]. باکتری استرپتوکوکوس اینیایی با این تعداد به همه تیمارهای آزمایشی اضافه شد. سپس نمونه‌ها ماساژ داده شده تا از اختلاط کامل باکتری با فیله ماهی اطمینان حاصل شود و در ادامه فیله‌ها بسته بندی شده و در دمای ۱°C± ۴ به مدت ۹ روز نگهداری شد.

۲-۵- آماده سازی ماهی کپور نقره ای و تیمارهای مورد آزمایش

جهت تهیه نمونه‌ها، ابتدا ماهیان با آب شستشو داده شده و به صورت دستی سر و امعاء و احشاء را جدا گردید. سپس هر ماهی به صورت مساوی به فیله‌های ۵۰ گرمی تقسیم بندی شد. در ادامه نسبت به انتخاب تیمارها و تکرارهای مورد نظر اقدام و با عصاره آبی و الکلی بره موم با غلظت ۳٪، ۵٪ و۷٪ درصد مخلوط و به یخچال منتقل و به مدت ۹ روز در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

۲-۶- آماده سازی نمونه‌ها جهت انجام آزمون های میکروبی

پس از آماده سازی نمونه ها، سه غلظت از عصاره الکلی بره موم (۳٪، ۵٪ و۷٪) و سه غلظت از عصاره آبی بره موم (۳٪، ۵٪ و۷٪) به فیله ماهی کپور نقره‌ای آلوده به استرپتوکوکوس

اینیایی اضافه شد. هر نمونه ۵۰ گرم و دوز اضافه شده استرپتوکوکوس اینیایی CFU/gr 10^5 بود. سپس نمونه‌ها ماساژ داده شده تا از اختلاط کامل عصاره با فیله ماهی اطمینان حاصل شود. در ادامه فیله‌ها بسته بندی شده و در دمای یخچال (٤ درجه سانتی گراد) و به مدت ۹ روز نگهداری شد. به فاصله هر ۳ روز از نقطه نظر پارامترهای میکروبی مورد بررسی قرار گرفت و بر مبنای تطابق این خواص با استانداردها، مدت زمان قابل قبول برای نگهداری آن تعیین گردید، که بالطبع بهترین غلظت و نوع عصاره جهت دستیابی به بهترین زمان نگهداری و جلوگیری کننده از رشد میکروبی معرفی گردید. در این مطالعه، پس از آماده سازی فیله ماهی کپور نقره ای، سه غلظت (۳٪، ۵٪ و۷٪) از عصاره الکلی و سه غلظت (۳٪، ۵٪ و۷٪) از عصاره آبی به فیله ماهی کپور نقره‌ای آلوده به استرپتوکوکوس اینیایی اضافه شد و در دمای یخچال به مدت ۹روز نگهداری و مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه، شاخص‌های میکروبی شامل شمارش کلی میکروبها، شمارش سرما گرا، شمارش لاکتوباسیل و شمارش استرپتوکوکوس اینیایی برای غلظت‌های عصاره بره موم اضافه شده به فیله ماهی کپور نقره‌ای طی روزهای۱، ۳، ٦ و ۹ مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲-۷- تست سوآب

به منظور اطمینان از سترون بودن ظروف مورد استفاده و همچنین پلیت‌ها از تست سوآب استفاده شد [١٤]. به طوری که ۹ میلی لیتر سرم فیزیولوژی درون ظروف مورد نظر ریخته و گردانده شد. سپس ۰/۱ میلی لیتر از آن برداشته و روی محیط پلیت کانت آگار ریخته شد. بعد از ٢٤ ساعت شمارش انجام شد.

۲-۸- آزمایش‌های میکروبی

۱۰ گرم از فیله ماهی بسته بندی شده را به آن ۹۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل افزوده و در دستگاه Bag mixer قرار داده شد تا محیط هموژن گردد. سپس توسط سمپلر ۱۰۰۰ میکرولیتری مقدار ۱میلی لیتر جهت تهیه رقت‌های ۱۰ تایی متوالی در لوله‌های شیشه‌ای محتوی ۹ میلی لیتر محلول استریل سرم فیزیولوژی و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از رقت مورد نظر برداشت و در محیط تریپتیک سوی آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد. پس از ٤٨ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد شمارش شد [١٤].

۲-۹- تعیین باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیایی

به منظور ارزیابی رفتار باکتری استرپتوکوکوس اینیایی در روزهای ۱، ۳، ٦، ۹ و بعد از تلقیح باکتری، کشت باکتریایی جهت بررسی میزان رشد باکتری تلقیح شده در تمامی تیمارهای ذکر شده انجام شد. برای شمارش باکتری استرپتوکوکوس اینیایی، از محیط کشت اختصاصی تریپتیک سوی آگار (TSA) استفاده شد. ۰/۱ میلی لیتر از نمونه‌های تهیه شده، برروی محیط کشت به طور سطحی پخش گردید. پلیت‌های مربوط به باکتری بعد از ٢٤ تا ٤٨ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد شمارش شدند [۳].

۲-۱۰- تعیین کل باکتری‌های قابل رویت (TPC)

طبق روش (AOAC,۲۰۰۵) برای TPC از نمونه‌های تهیه شده، محیط کشت پلیت کانت آگار (PCA) استفاده شد [١٤].

۲-۱۱- تعیین باکتری‌های سرما دوست (PTC)

برای شمارش PTC از نمونه‌های تهیه شده، از محیط پلیت کانت آگار (PCA) استفاده شد. ۰/۱ میلی لیتر از نمونه رقت‌های تهیه شده، برروی محیط کشت به طور سطحی پخش شد. پلیت‌های مربوط به باکتری‌های سرمادوست بعد از ۱۰ روز انکوباسیون در دمای ٤ درجه سانتی گراد شمارش شدند [۳].

۲-۱۲- تعیین باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB)

برای شمارش LAB از محیط کشت agar(MRS) DeMan Rogosa and Sharpe استفاده شد. ۰/۱ میلی لیتر از نمونه رقت‌های تهیه شده، برروی محیط کشت به طور سطحی پخش شد. نمونه‌های اخیر در جار بی هوازی حاوی شمع قرار داده شده و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت۳-۲ روز نگهداری شدند. در همه موارد پس از اتمام زمان انکوباسیون، کلنی‌ها بعد از شمارش درعکس رقت مورد استفاده ضرب شد و سپس لگاریتم آنها گرفته شد تا لگاریتم تعداد کلنی درواحد وزن (log CFU/g) بدست آید [۳].

۲-۱۳- ارزیابی‌های حسی

جهت انجام ارزیابی حسی گوشت ماهی کپور نقره ای در طول دوره نگهداری از روش گلاس[1] و کنتومیناس[2] (۲۰۰۷) استفاده شد [۱۵]. بدین منظور از یک گروه پنل ۷ نفره نیمه آموزش دیده استفاده شد. ارزیابی حسی در مورد رنگ، بو، بافت و قابلیت پذیرش کلی انجام گرفت. نمونه‌ها در ۲۰- ذخیره گردیدند. زمان انجام ارزیابی حسی انجماد زدایی در دمای یخچال به مدت ۳ ساعت انجام شد. ارزیابی حسی تحت شرایط مشابه نور و دمایی انجام گرفت. برای جلوگیری از تداخل بو در زمان ارزیابی، ارزیابان قبل از هر آزمایش بویایی، مقداری قهوه بوییدند. جهت امتیاز دهی از یک مقیاس ۰ تا ۱۰ استفاده شد به نحوی که امتیاز ۱۰- ۷ امتیاز عالی تا کیفیت خوب، ٦ -۵ خوب تا قابل پذیرش و امتیازهای٤ - ۰ غیر قابل پذیرش تا بسیار بد را داشتند (محصول با امتیاز کمتر از ۵ به عنوان محصول غیر قابل پذیرش تعریف گردید).

۲-١٤- تجزیه و تحلیل آماری

برای انجام آنالیزهای آماری از نرم افزار SPSS و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصل از تیمارهای مختلف از آنالیز واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) و برای بررسی تفاوت‌های بین میانگین‌ها در زمان‌های مختلف برای یک تیمار و بین تیمارهای مختلف در یک زمان از آزمون دانکن (Duncan) استفاده گردید. لازم به ذکر است که در تمامی مراحل تجزیه و تحلیل، خطای مجاز برای رد فرض اول، ۵ درصد در نظر گرفته شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج ترکیبات شیمیایی عصاره های بره موم

ترکیبات شیمیایی عصاره آبی (WEP)[3] و اتانولی (EEP)[4] بره موم توسط دستگاه GC/MS شناسایی گردید. ترکیبات مهم این دو عصاره در جدول ۱ لیست گردید. نتایج وجود ترکیبات اسیدهای آروماتیک، فلاونوئیدها، آلدهیدها، سسکوئین ترپن ها، تری ترپن ها، الکل ها و هیدروکربن ها را تایید می نماید. از ترکیبات مهم می توان کافئیک اسید، تکتوسرین، آکاستین، سرین، پینوسمبرین، پینوبانکسین-۳-استات، نرول، لینلول،کاریفیلن اکسید، گالانجین-۳-متیل اتر و پینوسمبرین چالکون و ٤-هیدروکسی بنزالدهید را نام برد. درصد این ترکیبات در عصاره اتانولی بیشتر از عصاره آبی بود. این امر را می توان به قابلیت حلالیت بیشتر الکل ها در استخراج ترکیبات آلی نسبت داد. کو و همکاران (۲۰۰۰) اثبات کردند ترکیبات پینوسمبرین و گالانجین پتانسیل آنتی میکروبی بالایی دارند [١٦]. همچنین، وجود کافئیک اسید و استرهای آن، فنول ها، ترپنوئیدها و کریسین فعالیت آنتی میکروبی بالایی را آشکار می کنند [۱۷]. یاراحمدی و همکاران (۲۰۰۸) وجود ترکیبات فنلاونوئیدی در بره موم مرکبات را تایید کردند. همچنین، آنها وجود کریسین، تکتوکریسین، پینوبانکسین-۳-استات، پینوسمبرین، پینوسمبرین چالکون و گالانجین-۳-متیل اتر در بره موم مرکبات را گزارش نمودند [۱۸]. نتایج این محققین با نتایج حاضر مطابقت دارد.

۳-۲- مقادیر باکتری استرپتوکوکوس اینیایی در نمونه های فیله ماهی کپور نقره ای

باکتری استرپتوکوکوس اینیایی از جمله عوامل بیماریزای مشترک در بین انسان و ماهی می‌باشد. در سال ۱۹۹۵، گروهی از پزشکان کانادایی به بیماری استرپتوکوکوس در گروهی از ماهی‌فروشان سالخورده پرداختند. گزارشات متعددی از بروز بیماری توسط این باکتری در انسان با علائمی از قبیل سپتی سمی، کوری، التهاب سلولی، تهوع و مشکلات گوارشی در دست می‌باشد، که در این بین، میزان ابتلا ماهیگیران و افراد مرتبط با صنایع شیلاتی بیشتر به چشم می‌خورد [۷].

تغییرات مقادیر باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیایی در فیله های ماهی کپورنقره ای آغشته به عصاره های بره موم و مقایسه آنها در بین تیمارها در طی زمان ماندگاری در جدول ۲ آورده شده است. طبق نتایج، مقدار استرپتوکوکوس اینیایی در تمامی تیمارهای این آزمایش در روز ۹ بیشترین میزان و در روز اول کمترین میزان بود و بین روزهای مختلف آزمایش در همه تیمارها از نظر آماری اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (P < ۰/۰۵). در تیمارهای مختلف آبی و الکلی طی روز اول تا نهم رشد باکتری روند افزایشی و معنی دار داشت، اما نسبت به شاهد از تعداد باکتری‌ها کاسته شد. در روز اول تیمار۳٪ آبی

1. Goulas
2. Kontominas
3. Water extract of propolis
4. Ethanolic extract of propolis

تفاوت معنی داری با شاهد نداشت اما در بقیه تیمارها تفاوت معنی دار با شاهد مشاهده شد. همینطور در روز سوم بین شاهد با تیمارهای ۳٪ و ۵٪ آبی تفاوت معنی داری وجود نداشت، اما با بقیه تیمارها تفاوت معنی دار وجود داشت (از رشد باکتریها در مقایسه با شاهد کاسته شد). در روزهای ششم و نهم، تیمارهای ۵٪ و۷٪ الکلی نسبت به یکدیگر اختلاف معنی دار نداشتند.

Table 1 Important chemical compositions of Iranian propolis ethanolic and water extracts

Compound name	EEP[a] (%)	WEP[b] (%)	Compound name	EEP[a] (%)	WEP[b] (%)
Aromatic acids			***Flavonoids***		
Benzoic acid	0.68	0.57	Pinostrobin	2.09	1.98
4-Hydroxybenzoic acid	0.23	0.18	Aceacetin	2.87	2.59
Hydrocinnamic acid	0.17	0.15	Apigenin	1.38	1.10
trans-Cinnamic acid	0.48	0.37	Naringenin	0.09	0.07
trans-4-Methoxy cinnamic acid	0.27	0.19	***Aldehydes***		
cis-4-Coumaric acid	1.26	1.23	4-Hydroxybenzaldehyde	2.67	2.53
trans-4-Coumaric acid	1.86	1.62	2-hydroxy-5-methyl benzaldehyde	1.46	1.37
3,4-Dimethoxy cinnamic acid	1.87	1.75	***Sesquiterpenes***		
Isoferulic acid	0.72	0.48	Caryophyllene oxide	3.46	2.88
Ferulic acid	1.51	1.49	6-Hydroxy-1-oxogermacr-4,10(15),11(13)-trien-12,8-olide	0.24	0.19
Caffeic acid	7.02	5.89	***Triterpenes***		
Flavonoids			3,12-Oleandione	1.86	1.57
Tectochrysin	1.12	1.09	***Alcohols***		
Pinobanksin-3-acetate (Isomer 1)	0.31	0.28	Nerol	2.75	2.49
Pinobanksin-3-acetate (Isomer 2)	1.54	1.31	Linalool	9.53	7.48
Galangin-3-methyl ester	0.32	0.27	Geraniol	0.98	0.88
Pinocembrin chalcone	1.91	1.89	***Aromatic hydrocarbons***		
Chrysin	3.02	2.99	1,3,8-trihydroxy-6-methylanthracene-9,10-dione	2.37	2.06

[a] percentage of chemical compositions of EEP
[b] percentage of chemical compositions of WEP

موسسه پاستور فرانسه در سال (۱۹٦٤) فنلاونوئیدهای گلانژین و پینوسمبرین را به عنوان قوی ترین مواد دارای خاصیت ضد باکتریایی در بره موم شناخت [۱۰]. همچنین، اثر ضدباکتریایی پینوسمبرین و پارا-کوماریک اسید در تحقیق مارکوزی و همکاران (۱۹۹۵) اثبات گردیده است [۱۹]. عصاره های آبی و اتانولی بره موم در تحقیق حاضر حاوی پینوسمبرین چالکون و پارا-کوماریک اسید می باشند که می تواند دلیل خاصیت آنتی باکتریایی عصاره های مورد مطالعه باشد. همچنین، جعفرزاده کاشی و همکاران (۲۰۱۱) وجود کافئیک اسید را عامل آنتی باکتری عصاره بره موم اعلام کردند که در عصاره های تحقیق حاضر نیز موجود می باشد [۲۰]. در تحقیق چوی و همکاران (۲۰۰٦)، مشخص شد فعالیت ضد باکتریایی بره موم علیه استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتلیس و سانمونلا تیفی موریوم و کاندیدا آلبیکانس به علت ساختار شیمیایی آن از قبیل فنلاونوئیدها، اسیدهای آروماتیک و ترکیبات فنلی و استرهای آن بوده است [۲۱]. هوسین[1] و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند گیاه سیر دارای اثرات ضد باکتریایی قوی بر علیه باکتری استرپتوکوکوس اینیایی و گونه‌های آیروموناس در ماهی نیل تیلاپیا می‌باشد. در این مطالعه میزانMIC برای استرپتوکوکوس اینیایی ٦۳ میکروگرم در میلی‌لیتر و برای گونه‌های آیروموناس۵۰۰-۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین شد [۲۲]. چوبکار و همکاران (۲۰۱۰) اثر غلظت های مختلف اسانس *Zataria multiflora* بر رشد استافیلوکوکوس

1. Hussein

اینیایی در فیله نمک سود شده کپور نقره ای در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۱ روز مورد مطالعه قرار دادند. آنها دریافتند غلظت های بالاتر اسانس اثر مهار رشد باکتری بیشتری دارد که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد [٦].

Table 2 The effects of EEP and WEP on *Streptococcus iniae* (log CFU/g) of the samples during storage time at 4ºC

	Storage time (Days)			
Treatments	**1**	**3**	**6**	**9**
Control	4.32 ± 0.01^{aD}	4.71 ± 0.02^{cB}	6.53 ± 0.03^{aB}	7.22 ± 0.01^{aA}
3% WEP	4.21 ± 0.02^{abD}	4.71 ± 0.02^{cB}	6.51 ± 0.01^{aB}	6.95 ± 0.04^{bA}
5% WEP	4.18 ± 0.02^{bD}	4.71 ± 0.02^{cB}	6.51 ± 0.01^{aB}	6.86 ± 0.03^{bcA}
7% WEP	3.86 ± 0.03^{cD}	4.71 ± 0.02^{cB}	6.46 ± 0.01^{bcB}	6.76 ± 0.02^{cdA}
3% EEP	3.78 ± 0.01^{cD}	4.71 ± 0.02^{cB}	6.50 ± 0.01^{abB}	6.72 ± 0.04^{dA}
5% EEP	3.46 ± 0.07^{dC}	4.71 ± 0.02^{cB}	6.45 ± 0.01^{cA}	6.60 ± 0.01^{eA}
7% EEP	3.28 ± 0.05^{eC}	4.71 ± 0.02^{cB}	6.41 ± 0.01^{dA}	6.50 ± 0.04^{eA}

Results are means ± standard deviation of triplicates.
Differences between small letters in the columns indicate significant differences between treatments ($P \leq 0.05$).
Differences between capital letters in the rows indicate significant differences during storage time ($P \leq 0.05$).

۳-۳- مقادیر شمارش کل باکتری‌های (TPC) نمونه فیله ماهی کپور نقره ای

تغییرات مقادیر کل باکتری‌ها و مقایسه آنها در بین تیمارها در طی زمان ماندگاری در جدول ۳ آورده شده است. در تمامی تیمارهای این آزمایش مقادیر کل باکتری‌ها در روزهای نهم و اول به ترتیب بیشترین و کمترین میزان بودند. میزان TPCفیله ماهی کپور نقره ای در تمامی تیمارها در روزهای اول تا روز نهم روند افزایشی داشت و تفاوت معنی دار بود ($P <$ ۰/۰۵). در روز اول در رقت‌های ۳٪ و ۵٪ آبی تفاوت معنی داری با شاهد دیده نشد، ولی در بقیه تیمارها کاهش رشد باکتری وجود داشت و نسبت به شاهد تفاوت معنی دار مشاهده شد. در بقیه روزها با توجه به افزایش غلظت عصارهای آبی و اتانولی روند کاهش، افزایش داشته و تفاوت معنی دار با شاهد مشاهده شد. در روزهای ششم و نهم، میزان کل باکتری‌ها بین تیمارهای ۵٪ و۷ ٪ الکلی تفاوت معنی داری وجود نداشت ($P <$ ۰/۰۵). بیشترین حد مجاز پیشنهاد شده برای TPC در فیله ماهیان log CFU/g ۷ است [۲۳]. بیشترین TPC موجود در ورز نهم و تیمار ۳ ٪ آبی با مقدار log CFU/g ٦/٦٨ بدست آمد که در مقایسه با شاهد با TPC بیش از حد مجاز بهتر عمل نموده است (جدول ۳). این امر نشان دهنده این است که استفاده عصاره آبی و الکلی بره موم جهت کنترل بار میکروبی مفید واقع گردید. بطور کلی، تیمارهای الکلی در کنترل رشد باکتری‌ها نسبت به تیمارهای آبی موفق تر عمل نمودند. این امر نشان دهنده تاثیر حلال در خروج مواد موثره در عصاره گیری می‌باشد. بدین معنا که حلال اتانول در استخراج بیشتر ترکیبات ضد باکتریایی بهتر عمل نموده است. طبق جدول ۱ درصد ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره اتانولی بره موم بیشتر از عصاره آبی بود. تاج کریمی و همکاران (۲۰۱۰) و توکمنچی و همکاران (۲۰۱۰) فعالیت آنتی میکروبی و آنتی باکتریایی عصاره های بره موم را به حضور ترکیباتی همچون کافئیک اسید، استرهای کافئات و فلاونوئیدها نسبت دادند [٢٤ و ٤]. همچنین، یعقوبی و همکاران (۲۰۰۷) ترکیبات شیمیایی عصاره اتانولی بره موم را مورد بررسی قرار دادند. آنها حضور پینوسمبرین، کافئیک اسید، کامفرول، فنتیل کافئات، کریسین، گالانجین را عامل خاصیت ضدمیکروبی و ضد باکتریایی عصاره اتانولی بره موم دانستند [۲۵]. در این تحقیق نیز وجود پینوسمبرین چالکون، کافئیک اسید، کریسین، گالانجین-۳-متیل اتر در هر دو عصاره مشخص گردیده است. نتایج ضدباکتریایی بالای عصاره اتانولی بره موم در انطباق با نتایج بازیو و همکاران (۲۰۰۰)، اندراد فریره و همکاران (۲۰۰۷)، کالگروپوس و همکاران (۲۰۰۹) و محمدزاده و همکاران (۲۰۰۷) می باشد [۲۹-۲٦]. چوبکار و همکاران (۲۰۱۰) اثرات غلظت های مختلف اسانس *Zataria multiflora* بر رشد استافیلوکوکوس اینیایی در فیله نمک سود شده کپور نقره ای در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۱ روز مورد مطالعه قرار دادند [٦]. آنها دریافتند غلظت های بالاتر اسانس اثر مهار رشد باکتری بیشتری دارد که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد.

Table 3 The effects of EEP and WEP on total plate count (log CFU/g) of the samples during storage time at 4 ºC

Treatment	Storage time (Days) 1	3	6	9
Control	3.56 ± 0.00^{aD}	4.92 ± 0.04^{aC}	6.38 ± 0.01^{aB}	7.17 ± 0.03^{aA}
3% WEP	3.53 ± 0.02^{abD}	4.87 ± 0.02^{aC}	6.34 ± 0.02^{bB}	6.64 ± 0.04^{bcA}
5% WEP	3.51 ± 0.04^{abD}	4.85 ± 0.02^{abC}	6.30 ± 0.01^{cB}	6.64 ± 0.04^{bcA}
7% WEP	3.49 ± 0.01^{abcC}	4.78 ± 0.01^{bcB}	6.29 ± 0.01^{cdA}	6.38 ± 0.08^{cdA}
3% EEP	3.44 ± 0.01^{bcD}	4.79 ± 0.03^{bcB}	6.26 ± 0.01^{deB}	6.68 ± 0.08^{bA}
5% EEP	3.41 ± 0.02^{cdC}	4.72 ± 0.02^{cB}	6.23 ± 0.01^{eA}	6.38 ± 0.08^{cdA}
7% EEP	3.34 ± 0.04^{dC}	4.57 ± 0.02^{dB}	6.22 ± 0.01^{eA}	6.15 ± 0.15^{dA}

Results are means ± standard deviation of triplicates.
Differences between small letters in the columns indicate significant differences between treatments ($P \leq 0.05$).
Differences between capital letters in the rows indicate significant differences during storage time ($P \leq 0.05$).

۳-٤- مقادیرشمارش باکتری‌های سرمادوست نمونه فیله ماهی کپور نقره‌ای (PTC)

باکتری های سرماگرا به آن گروه از میکروارگانیسم ها گفته می شود که اگرچه دمای بهینه رشد اکثر آنها در محدوده مزوفیل قرار دارد ولی پس از هفت تا ده روز قادر به رشد و تکثیر در دمای یخچال بوده و کلنی های قابل رویت یا کدورت ایجاد می نمایند. همچنین به طور وسیعی در مواد غذایی حضور داشته و در شرایط مناسب سبب فساد آنها یا بیماری زایی می گردند. سرمادوست ها در محیط های اقیانوسی شناسایی شده اند و وجود آنها در آبزیان صید شده در آبهای سرد با اهمیت می باشد [۳۰].

تغییرات مقادیر باکتری‌های سرمادوست PTC و مقایسه آنها در بین تیمارها در طی زمان ماندگاری در جدول ٤ آورده شده است. طبق نتایج بدست آمده مقدار PTC در تمامی تیمارهای این آزمایش در روز نهم بیشترین و در روز اول کمترین مقدار بود. بین روزهای مختلف آزمایش در همه تیمارها از نظر آماری اختلاف معنی دار مشاهده شد (P<۰/۰۵). میزان PTC فیله ماهی کپور نقره ای در کلیه تیمارها به استثنای ۷٪ اتانولی در روز اول تفاوت معنی داری با شاهد نداشت (P < ۰/۰۵). در روز سوم و ششم تیمار ۳٪ آبی تفاوت معنی داری با شاهد نداشت ولی در بقیه تیمارها با توجه به افزایش غلظت عصاره آبی و اتانولی کاهش رشد باکتری تفاوت معنی داری با شاهد نشان داد. همینطور در روز نهم در تیمارهای ۳٪ و ۵٪ آبی کاهش معنی داری با شاهد مشاهده نشد. ولی در تیمار ۷٪ آبی و تیمارهای اتانولی روند رشد کاهشی باکتری نسبت به شاهد معنی دار بود که این افزایش خاصیت ضد باکتریایی به علت افزایش غلظت عصاره و بالتبع آن افزایش ترکیبات آنتی باکتریایی بر میزان خاصیت ضد باکتریایی تاثیر گذاشته است. جمیز فارنلی (۱۳۸۷)، در کتاب خود نوشته است عصاره آبی بره موم خاصیت ضد باکتریایی ندارد، در حالی که بر اساس نتایج آزمون این تحقیق عصاره آبی هم خاصیت ضد باکتریایی داشته و بین عصاره آبی و الکلی تفاوت معنی دار دیده شد [۱۰]. این تفاوت می تواند ناشی از نوع بره موم و ترکیبات موجود در آن باشد. شرایط اقلیمی بر ترکیبات موجود در عصاره ها تاثیر گذار می باشد. تاج کریمی و همکاران (۲۰۱۰) و توکمنچی و همکاران (۲۰۱۰) فعالیت آنتی میکروبی و آنتی باکتریایی عصاره های بره موم را به حضور ترکیباتی همچون کافئیک اسید، استرهای کافئات و فلاونوئیدها نسبت دادند [٤ و ٢٤]. همچنین، یعقوبی و همکاران (۲۰۰۷) حضور پینوسمبرین، کافئیک اسید، کامفرول، فنتیل کافئات، کریسین، گالانجین را عامل خاصیت ضدمیکروبی و ضد باکتریایی عصاره اتانولی بره موم دانستند [۲۵]. در این تحقیق نیز وجود پینوسمبرین چالکون، کافئیک اسید، کریسین، گالانجین-۳-متیل اتر در هر دو عصاره مشخص گردیده است.

در مطالعه ای اعتمادی و همکاران (۱۳۸۷)، به بررسی مطالعه پتانسیل آنتی باکتریایی و آنتی اکسیدانی عصاره رزماری در افزایش عمر ماندگاری ماهی قزل آلای رنگین کمان پرداختند که در شمارش باکتری‌های سرمادوست مشخص شد باکتری‌های سرمادوست در پایان دوره نگهداری ١٤ روزه در تیمار شاهد با تراکم بیشتری نسبت به تیمار عصاره رزماری وجود داشت که تیمار حاوی عصاره رزماری در انتهای دوره نگهداری زیر حد مجاز پیشنهادی قرار داشت و بطور معنی داری کمتر از نمونه شاهد بود [۳۱]. نتایج با یافته های تحقیق حاضر مطابقت دارد.

Table 4 The effects of EEP and WEP on *PTCs* (log CFU/g) of the samples during storage time at 4 ºC.

	Storage time (Days)			
Treatments	**1**	**3**	**6**	**9**
Control	3.53 ± 0.04^{aD}	4.98 ± 0.03^{aC}	6.12 ± 0.04^{aB}	7.43 ± 0.02^{aA}
3% WEP	3.46 ± 0.05^{aD}	4.69 ± 0.13^{abC}	6.10 ± 0.005^{abB}	7.41 ± 0.005^{aA}
5% WEP	3.46 ± 0.03^{aD}	4.63 ± 0.06^{bC}	6.09 ± 0.005^{abcB}	7.41 ± 0.00^{aA}
7% WEP	3.46 ± 0.03^{aD}	4.49 ± 0.13^{bcC}	6.07 ± 0.02^{bcB}	7.34 ± 0.02^{abA}
3% EEP	3.42 ± 0.01^{D}	4.67 ± 0.05^{bC}	6.07 ± 0.01^{bcB}	7.32 ± 0.08^{abA}
5% EEP	3.37 ± 0.05^{aD}	4.29 ± 0.06^{cdC}	6.05 ± 0.02^{cB}	7.09 ± 0.17^{bA}
7% EEP	2.9 ± 0.13^{bD}	4.03 ± 0.08^{bC}	5.99 ± 0.01^{dB}	7.26 ± 0.06^{abA}

Results are means ± standard deviation of triplicates.
Differences between small letters in the columns indicate significant differences between treatments ($P \leq 0.05$).
Differences between capital letters in the rows indicate significant differences during storage time ($P \leq 0.05$).

۳-۵- مقادیر شمارش باکتری‌های اسیدلاکتیک (LAB)

باکتری های اسید لاکتیک به طور گسترده در طبیعت پراکنده هستند، آن ها فلور میکروبی غالب در شیر و فرآورده های لبنی می باشند. تعدادی از گونه ها در تولید صنعتی محصولات لبنی دخالت دارند [۳۲]. در این گروه از باکتری ها، جنس هایی نظیر لاکتوباسیلوس، لاکتوکوکوس، پدیوکوکوس و لوکونوستوک قرار دارند [۳۳].

تغییرات مقادیر باکتری‌های اسیدلاکتیک (LAB) و مقایسه آنها در بین تیمارها در طی زمان نگهداری در جدول ۵ آورده شده است. میزان LAB فیله ماهی کپور نقره ای در تمامی تیمارها طی روزهای اول تا نهم روند افزایشی داشته است. به طور کلی بین روزهای مختلف آزمایش در هر تیمار از نظر آماری اختلاف معنی دار مشاهده شد ($P<$ ۰/۰۵). میزان LAB فیله ماهی کپور نقره‌ای در کلیه تیمارها به جز ۷٪ الکلی در روز اول تفاوت معنی داری با هم نداشت. این روند در تمامی تیمارها در طی روزهای نگهداری تکرار گردیده است. اما این افزایش در مقایسه باتعداد باکتری شاهد رشد کمتر داشت که دلیل بر اثر ضد باکتریایی عصاره مورد نظر می‌باشد. همینطور میزان کاهش باکتری در روز اول در تیمار ۳٪و۵٪ آبی و ۳٪ الکلی نسبت به شاهد معنی دار نبود ولی در بقیه تیمارها روند کاهش رشد باکتری نسبت به شاهد معنی دار بود. در روز سوم کاهش رشد باکتری اسید لاکتیک در همه تیمارها نسبت به شاهد معنی دار بود. اما این کاهش در تیمارهای مختلف آبی و اتانولی معنی دار نبود. این امر نشان دهنده این است که عصاره آبی و اتانولی تفاوت در تاثیرگذاری روی رشد باکتری اسیدلاکتیک نداشتند. در روز ششم و نهم این روند در همه تیمارها رشد کاهشی داشت و در مقایسه با شاهد معنی دار بود. همینطور تیمار حاوی عصاره ۷٪ اتانولی بره موم نیز دارای اختلاف معنی دار با سایر تیمارها می باشد و از لحاظ تعداد باکتری اسیدلاکتیک کمترین میزان را به خود اختصاص داد، که دلیل برافزایش خاصیت ضد باکتریایی عصاره مورد مطالعه با افزایش غلظت می‌باشد. با توجه به اینکه تیمارهای الکلی تفاوت چشمگیری در کنترل رشد باکتری‌های اسید لاکتیک نسبت به تیمارهای آبی نداشتند، این امر نشان دهنده وجود عوامل مشترک با تاثیرگذاری مشابه در هر دو عصاره همچون پینوسمبرین چالکون، کافئیک اسید، کریسین، گالانجین-۳-متیل اتر در مهار رشد باکتری های اسیدلاتیک بوده است.

صفری و سعیدی اصل (۱۳۹۰)، تاثیر نایسین A و بنزوات سدیم را بر رفتار لیستریامونوستیوژنز و برخی از پارامترهای میکروبی و شیمیایی در فیله ماهی فیتوفاگ نگهداری شده در دمای ٤ درجه سلسیوس بررسی کرند [۳٤]. طبق نتایج حاصله میزان اولیه LAB در این آزمایش در همه تیمارها تقریبا برابر log CFU/g (۲/۸٦ ±۰/۰٦) بود و تا پایان ۱۲ روز آزمایشات روند افزایشی در همه تیمارها مشاهده شد. اما روند رشد LAB در تیمارهای شاهد و تیمار دارای بنزوات سدیم به صورت منفرد سریع تر از تیمارهای دارای مواد نگهدارنده ترکیبی و تیمار نایسین به تنهایی بود. آنها روند کاهشی باکتری های گروه لاکتیک را به تاثیر مهار کننده بنزوات سدیم و تأثیر باکتریوسایدی[1] (باکتری کش) نایسین علیه اکثر باکتری های گروه لاکتیک دانستند. نتایج حاصله به یافته های تحقیق حاضر نزدیک می‌باشد [٦]. در مطالعه‌ای دیگر شیرازی نژاد و همکاران (۱۳۸۹)، به مطالعه اثر مهاری اسید لاکتیک و ترکیب آن با نایسین بر روی فساد باکتریایی میگو فرآوری شده پرداختند. نتایج حاصله بیانگر وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می‌باشد که این حاکی از موثربودن تیمارها در کاهش تراکم باکتریایی در مقایسه با شاهد می‌باشد [۳۵]. یافته های آن مطالعه با تحقیق حاضر نزدیک می‌باشد.

1. Bactericide

۳-٦- نتایج ارزیابی حسی در طول دوره نگهداری

در صنعت غذا پذیرش و مقبولیت یک فرآورده از سوی مصرف کنندگان، تضمین کننده تولید آن فرآورده و تداوم حضور آن در بازار مصرف است. بنابراین ارزیابی ویژگی های حسی در انتخاب بهترین فرمولاسیون، نقش اساسی دارد [۳٦].

Table 5 The effects of EEP and WEP on LAB (log CFU/g) of the samples during storage time at 4 ºC

Treatments	Storage time (Days) 1	3	6	9
Control	2.69±0.01^{aD}	4.07±0.02^{aC}	5.19±0.03^{aB}	5.69±0.01^{aA}
3% WEP	2.53±0.06^{abD}	4.07±0.04^{bC}	5.14±0.03^{abB}	5.62±0.05^{abA}
5% WEP	2.47±0.00^{abD}	3.58±0.11^{bC}	5.14±0.03^{abB}	5.59±0.02^{abA}
7% WEP	2.38±0.08^{bcD}	3.53±0.061^{bC}	5.1±0.02^{abcB}	5.56±0.1^{abA}
3% EEP	2.47±0.00^{abD}	3.60±0.00^{bC}	5.07±0.03^{bcB}	5.57±0.04^{abA}
5% EEP	2.38±0.05^{bcD}	3.58±0.11^{bC}	5.06±0.02^{bcB}	5.57±0.02^{abA}
7% EEP	2.15±0.15^{cD}	3.53±0.061^{bC}	5.04±0.01^{cB}	5.47±0.06^{bA}

Results are means ± standard deviation of triplicates.
Differences between small letters in the columns indicate significant differences between treatments ($P \leq 0.05$).
Differences between capital letters in the rows indicate significant differences during storage time ($P \leq 0.05$).

Table 6 The effects of EEP and WEP on sensory evaluation of the samples during storage time at 4 ºC

Sensory evaluation	Treatment	Days 1	3	6	9
Texture	3% WEP	9.00±0.28 ^{bA}	7.50±0.28 ^{dB}	6.00±0.00 ^{cC}	4.50±0.28 ^{bD}
	5% WEP	10.00±0.00 ^{aA}	7.75±0.25 ^{cdB}	6.5±0.28 ^{bcC}	4.75±0.25 ^{bD}
	7% WEP	10.00±0.00 ^{aA}	8.50±0.28 ^{bcB}	6.95±0.28 ^{aC}	5.65±0.00 ^{aD}
	3% EEP	10.00±0.00 ^{aA}	8.00±0.00 ^{bcdB}	6.50±0.28 ^{bcC}	5.00±0.00 ^{bD}
	5% EEP	10.00±0.00 ^{aA}	8.75±0.25 ^{bB}	7.00±0.00 ^{abC}	5.75±0.25 ^{aD}
	7%EEP	10.00±0.00 ^{aA}	9.5±0.25 ^{aA}	7.00±0.00 ^{abB}	6.00±0.00 ^{aC}
Color	3% WEP	9.00±0.75 ^{aA}	7.00±0.00 ^{aB}	5.50±0.28 ^{dC}	4.25±0.47 ^{bD}
	5% WEP	9.00±0.57 ^{aA}	7.25±0.25 ^{aB}	6.00±0.40 ^{cdC}	5.00±0.00 ^{abD}
	7% WEP	9.50±0.28 ^{aA}	7.00±0.00 ^{aB}	6.00±0.00 ^{cdC}	5.50±0.28 ^{abC}
	3% EEP	9.50±0.28 ^{aA}	7.00±0.00 ^{aB}	6.75±0.25 ^{bcB}	5.00±0.57 ^{abC}
	5% EEP	9.00±0.00 ^{aA}	7.50±0.28 ^{aB}	7.00±0.40 ^{abB}	5.25±0.47 ^{abC}
	7%EEP	9.00±0.00 ^{aA}	7.50±0.25 ^{aB}	7.75±0.25 ^{aB}	5.75±0.25 ^{aC}
Odor	3% WEP	8.00±0.00 ^{aA}	6.25±0.25 ^{cB}	5.00±0.00 ^{dC}	1.25±0.25 ^{dD}
	5% WEP	8.00±0.57 ^{aA}	6.50±0.28 ^{cB}	6.00±0.00 ^{cB}	1.50±0.28 ^{cdC}
	7% WEP	8.50±0.28 ^{aA}	7.25±0.25 ^{bcB}	6.50±0.28 ^{bcC}	2.25±0.25 ^{bcD}
	3% EEP	8.50±0.28 ^{aA}	7.25±0.47 ^{bcB}	6.75±0.25 ^{abcB}	2.50±0.28 ^{bC}
	5% EEP	8.50±0.28 ^{aA}	8.25±0.47 ^{abA}	7.00±0.40 ^{abB}	3.75±0.25 ^{aC}
	7%EEP	9.00±0.75 ^{aA}	8.50±0.28 ^{aA}	7.50±0.28 ^{aB}	3.50±0.28 ^{aC}
Overall acceptability	3% WEP	8.00±0.57 ^{aA}	6.00±0.00 ^{dB}	5.00±0.00 ^{dC}	2.00±0.40 ^{bD}
	5% WEP	8.50±0.28 ^{aA}	6.50±0.28 ^{cdB}	5.50±0.28 ^{cdC}	2.00±0.40 ^{bD}
	7% WEP	8.50±0.28 ^{aA}	7.25±0.25 ^{bcB}	6.25±0.25 ^{bC}	3.50±0.28 ^{aD}
	3% EEP	8.50±0.28 ^{aA}	7.25±0.47 ^{bcB}	6.00±0.00 ^{bcC}	2.50±0.28 ^{bD}
	5% EEP	9.00±0.00 ^{aA}	7.75±0.25 ^{abB}	6.50±0.28 ^{bC}	3.75±0.25 ^{aD}
	7%EEP	9.00±0.00 ^{aA}	8.50±0.28 ^{aA}	7.50±0.28 ^{aB}	3.75±0.25 ^{aC}

Results are means ± standard deviation.
Differences between small letters in the columns indicate significant differences between treatments ($P \leq 0.05$).
Differences between capital letters in the rows indicate significant differences during storage time ($P \leq 0.05$).

۳-٦-۱- شاخص بافت در فیله ماهی کپور نقره ای تیمار شده

جدول ٦ نتایج ارزیابی شاخص بافت در فیله ماهی کپور نقره ای در تیمارهای مختلف طی زمان نگهداری را نشان می دهد. نتایج ارزیابی شاخص بافت در فیله ماهی کپور نقره ای در تیمارهای مختلف نشان داد که مقدار عددی شاخص بافت در

تمامی تیمارهای این آزمایش در روز ۹ کمترین و در روز اول بیشترین میزان را به خود اختصاص دادند. میزان این شاخص در کلیه تیمارها باستثنای تیمار ۳٪ آبی در روز اول تفاوت معنی داری با هم نداشتند ($P < ۰/۰۵$). در روز سوم عدم اختلاف معنی دار شاخص بافت در تیمارهای ۳٪ و ۵٪ آبی و الکلی مشاهده شد، اما نسبت به بقیه تیمارها تفاوت معنی دار وجود داشت. در روز ششم، تفاوت این شاخص در تیمارهای ۳٪ و ۵٪ آبی و ۳٪ الکلی معنی دار نبود. همچنین، تیمارهای الکلی نسبت به یکدیگر تفاوت معنی داری نداشتند. در روز نهم، شاخص بافت در تیمارهای ۳٪آبی، ۵٪ آبی و ۳٪ اتانولی با یکدیگر و همچنین ۷٪ آبی، ۵٪ اتانولی و ۷٪ اتانولی نسبت به یکدیگر تفاوت معنی داری نداشت که با نتایج آزمون های میکروبی بدست آمده همخوانی دارد.

غلام زاده و همکاران (۱۳۹۱)، به تعیین زمان ماندگاری فیله ماهی کپور نقره‌ای تیمار شده با عصاره سیاه دانه در طول نگهداری در یخچال پرداختند [۳۷]. نتایج حاصل تاثیر ضد اکسیدانی و ضد میکروبی قوی سیاه دانه روی ماهی کپور نقره‌ای را نشان داد، بطوریکه زمان ماندگاری نمونه‌های غوطه ور شده در عصاره یک درصد سیاه دانه نسبت به نمونه شاهد، در شرایط نگهداری یخچال به دو برابر و نیم افزایش یافت. ارزیابی حسی ماهی‌های تیمار شده با عصاره سیاه دانه دارای کیفیت بالایی بود، بطوریکه بعد از پایان روز پانزدهم از امتیاز خوب جهت مصرف برخوردار بود.

۳-۶-۲- شاخص رنگ در فیله ماهی کپور نقره ای تیمار شده

جدول ٦ نتایج ارزیابی شاخص رنگ در فیله ماهی کپور نقره ای در تیمارهای مختلف طی زمان نگهداری را نشان می دهد. نتایج ارزیابی این شاخص نشان داد که مقدار عددی آن در کلیه تیمارهای این آزمایش در روز ۹ کمترین و در روز اول بیشترین میزان بود. بین روزهای مختلف آزمایش در اکثر تیمارها از نظر آماری اختلاف معنی دار وجود داشت ($P>۰/۰۵$). میزان شاخص رنگ در فیله ماهی کپور نقره ای در کلیه تیمارها در روز اول و سوم تفاوت معنی داری با هم نداشت ($P < ۰/۰۵$). همچنین شاخص رنگ در تیمارهای ۳، ۵، ۷٪ الکلی و ۳، ۵، ۷٪ آبی در روز ششم اختلاف معنی دار وجود نداشت. به طوریکه تیمارهای الکلی امتیاز بیشتری را به خود اختصاص داده بودند. در روز نهم شاخص رنگ در تیمارهای ۳٪ آبی با ۵٪ آبی تفاوت معنی دار نداشت. همینطور تیمارهای ۵٪ و۷٪ آبی با ۳٪ و۵٪ اتانولی عدم اختلاف معنی دار مشاهده گردید. تنها در تیمار۷٪ اتانولی تفاوت معنی دار بوده و امتیاز بیشتر را دارا بود. روند کلی تغییر رنگ به سمت بد تر شدن رنگ در طی روزهای ماندگاری پیش رفت.

در این راستا اعتمادی و همکاران (۱۳۸۷)، در مطالعه‌ای که بر روی پتانسیل آنتی باکتریایی و آنتی اکسیدانی عصاره رزماری در افزایش عمر ماندگاری ماهی قزل آلای رنگین کمان به مدت ۱۸ روز پرداخته بودند، فاکتورهای حسی نیز مورد بررسی قرار دادند. آنها مشاهده نمودند که ظاهر و رنگ ماهی در تیمار شاهد در روز ۱۵ کاهش کیفیت بیشتری نسبت به نمونه تیمار شده با رزماری داشته است که با نتایج حاضر انطباق دارد [۳۱].

شعبانپور و همکاران (۱۳۹۰)، اثر عصاره آویشن شیرازی را بر ماندگاری فیله قزل آلای رنگین کمان شور و بسته بندی شده در خلاء در شرایط یخچال را ازنظر میکروبی، شیمیایی و خصوصیات حسی مورد مطالعه قرار دادند [۳۸]. بدین منظور فیله‌های این ماهی تحت ۳ تیمار شور وکیوم شده (V)(بعنوان شاهد)، شورشده در آب نمک حاوی ۰/۵٪(w/w) عصاره آویشن شیرازی و وکیوم شده (A1) و شور شده در آب نمک حاوی ۱٪(w/w) عصاره آویشن شیرازی و وکیوم شده (A2) به مدت ۲۰ روز در شرایط یخچال نگهداری شده و تغییرات شاخص‌های اسید چرب آزاد (FFA)، شاخص تیوباربیتوریک اسید (TBA)، مجموع بارهای نیتروژنی فرار(TVN-N)، بارمیکروبی کل(TVC) و ارزیابی‌های حسی صورت پذیرفت. نتایج حاصله بیانگر کمتر بودن میزان TVC نسبت به تیمار V بود. طبق شاخص‌های شیمیایی، میکروبی و حسی بدست آمده در این پژوهش، عصاره آویشن شیرازی ماندگاری فیله ماهی مربوطه را حدود ٦-۵ روز افزایش داد. باتوجه به این نتایج عصاره آویشن شیرازی بعنوان یک نگهدارنده طبیعی در ترکیب با روش‌های شورکردن و بسته بندی در خلاء قادر به افزایش زمان مانگاری فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان در شرایط یخچال بوده و قابلیت جایگزینی به جای نگهدارنده‌های مصنوعی را داشت.

۳-۶-۳- شاخص بو در فیله ماهی کپور نقره ای تیمار شده

جدول ٦ نتایج ارزیابی شاخص بو در فیله ماهی کپور نقره ای در تیمارهای مختلف طی زمان نگهداری را نشان می دهد.

ارزیابی حسی فیله ماهی با شاخص بو انجام گرفت. نتایج ارزیابی شاخص بو در فیله ماهی کپور نقره‌ای در تیمارهای مختلف نشان داد که مقدار عددی شاخص بو در تمامی تیمارهای این آزمایش در روزهای نهم و اول به ترتیب کمترین و بیشترین میزان بودند. همچنین، بین روزهای مختلف آزمایش

در تیمارها از نظر آماری اختلاف معنی دار مشاهده شد ($P <$ ۰/۰۵). این شاخص در بیشتر تیمارها در روز اول تفاوت معنی داری با هم نداشت ($P <$ ۰/۰۵). همچنین، در روز سوم اختلاف معنی دار شاخص بو در تیمار ۷٪ اتانولی با بقیه تیمارها به جز ۵٪ الکلی دیده شد. در روز ششم و نهم بیشترین امتیاز شاخص بو به تیمار ۷٪ الکلی و کمترین آن به ۳٪ آبی تعلق گرفت. نهایتا بین روزهای ٦ تا ۹ بوی تعفن در تیمارهای مختلف کاملا مشهود بود. از روز ششم به بعد بوی تعفن قابل تحمل نبود که این نتیجه با نتایج آزمون میکروبی همخوانی داشت. جعفرزاده خالدی و همکاران (۱۳۸۹) به بررسی اثر اسانس رزماری بر روی روند رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در سوپ آماده تجارتی پرداختند که در خلال انجام این آزمایش، ارزیابی حسی نیز در خصوص فاکتورهای عطر، طعم و پذیرش کلی به عمل آمد که نتیجه حاصله حاکی از تغییرات مطلوب حسی ایجاد شده در تیمارهای حاوی اسانس بود که نتایج تحقیق حاضر را تایید می نماید [۳۹].

۳-٦-٤- قابلیت پذیرش کلی نسبت به فیله ماهی کپور نقره ای تیمار شده

نتایج ارزیابی قابلیت پذیرش کلی فیله ماهی کپور نقره ای در تیمارهای مختلف طی زمان نگهداری در جدول ٦ آمده است. نتایج این ارزیابی نشان داد که مقدار عددی قابلیت پذیرش کلی در تمامی تیمارهای این آزمایش در روز ۹ کمترین و در روز اول بیشترین میزان بود. بین روزهای مختلف آزمایش در همه تیمارها از نظر آماری اختلاف معنی دار مشاهده شد ($P <$ ۰/۰۵)، به استثنای تیمار ۷٪ الکلی در روز اول و سوم که اختلاف معنی دار وجود نداشت. میزان شاخص قابلیت پذیرش کلی فیله ماهی کپور نقره ای در کلیه تیمارها در روز اول تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند (P>۰/۰۵). در روز سوم شاخص قابلیت پذیرش کلی در تیمارهای ۳٪ و ۵٪ آبی با هم تفاوت معنی دار نبود. همینطور تیمارهای ۵٪ و ۷٪ آبی با تیمار ۳٪ اتانولی تفاوت معنی دار نداشتند. همچنین در تیمار ۵٪ اتانولی با ۷٪ اتانولی اختلاف معنی دار مشاهده نشد. در روز ششم شاخص قابلیت پذیرش کلی در تیمارهای ۳٪ و ۵٪ آبی و همچنین ۷٪ آبی و ۳٪ اتانولی با هم تفاوت معنی دار وجود نداشت. تیمار ۳٪ و ۵٪ اتانولی اختلاف معنی دار نبود، اما در تیمارهای ۵٪ و ۷٪ اتانولی اختلاف معنی دار دیده شد. در روز نهم شاخص قابلیت پذیرش کلی در تیمارهای ۳٪ و ۵٪ آبی و۳٪ اتانولی با هم اختلاف معنی داروجود نداشت. همچنین در تیمارهای ۷٪ آبی ، ۵٪ و۷٪ اتانولی نیز تفاوت معنی دار وجود نداشت. در تمامی روزها بیشترین امتیاز متعلق به تیمار ۷٪ اتانولی و کمترین آن مربوط به ۳٪ آبی بود. در نهایت با توجه به نتایج دست آمده تا روز ٦ نگهداری ماندگاری فیله ماهی کپور نقراه ای قابلیت پذیرش داشت، همچنین بین قابلیت پذیرش کلی و آنالیز میکروبی همبستگی بالایی وجود داشت و با نتایج آزمون میکروبی منطبق بود. ذوالفقاری و همکاران (۱۳۹۰)، در مطالعه‌ای به بررسی روند تغییرات شیمیایی، میکروبی و حسی فیله ماهی قزل‌آلای رنگین کمان جهت تعیین مدت زمان ماندگاری آن طی ۱۸ روز نگهداری در دمای یخچال پرداختند. ارزیابی حاصله بیانگر این مطلب بود که نمونه‌ها در روز ۵ به امتیاز محدوده قابلیت پذیرش کلی رسیدند و همچنین بین قابلیت پذیرش کلی و آنالیز میکروبی همبستگی بالایی وجود داشت که تاحدود زیادی نتایج حاصله با نتایج مطالعه حاضر دارای انطباق می‌باشد [٤٠]. در مطالعه ای دیگر، فرانگوس[1] و همکاران (۲۰۱۰) به بررسی اثر ترکیبی نمک سود کردن، استفاده از اسانس روغنی پونه کوهی و بسته بندی تحت شرایط خلا بر مدت ماندگاری فیله‌های قزل آلای رنگین کمان نگهداری شده در یخچال پرداختند. نتایج ارزیابی حسی نشان داد استفاده از تیمارها نسبت به نمونه کنترل در بهبود پذیرش کلی و افزایش زمان ماندگاری کمک می نماید که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد [٤١].

٤- نتیجه گیری

نتایج آنالیز GC/MS وجود ترکیبات آنتی میکروبی کافئیک اسید، تکتوسرین، آکاستین، سرین، پینوسمبرین، پینوبانکسین-۳-استات، نرول، لینلول، کاریفیلن اکسید، گالانجین-۳-متیل اتر و پینوسمبرین چالکون و ٤-هیدروکسی بنزالدهید را در هر دو عصاره آبی و اتانولی بره موم تایید نمود. مقایسه بار میکروبی در تمامی تیمارها حکایت از تاثیر گذار بودن مواد آنتی باکتریال استفاده شده در کاهش از حد مجاز بار باکتریایی داشت که در این بین هر یک از تیمارها به سهم خود برای کاهش این بار سهیم بودند. اما در میان تیمارهای موجود تیمار حاوی عصاره ۷٪ اتانولی بره موم با تاثیر گذاری بیشتر به عنوان سرآمد تیمارها در رسیدن به هدف کاهش بار میکروبی بود. پس از آن نیز ۵٪ اتانولی، ۳٪ اتانولی، ۷٪ آبی، ۵٪ آبی، ۳٪ آبی در رتبه‌های بعدی تاثیرگذاری قرار داشتند. شاخص های ارزیابی حسی شامل بافت، رنگ، بو و پذیرش کلی تاثیرگذاری بیشتر عصاره اتانولی را نسبت به عصاره آبی تایید نمود.

1. Frangos

بنابراین در مجموع می‌توان گفت عصاره الکلی بره موم دارای خاصیت آنتی باکتریایی بهتری نسبت به عصاره آبی آن بود.

۵- منابع

[1] Razavi Shirazi, H. 1380. Marine products technology, storage and processing principles (2). Naghsh Mehr publication, page 292.

[2] Eldar, A., Horovitcz, A., Bercovier, H., 1997. Development and efficacy of a vaccine againstStreptococcus iniae infection in farmed rainbow trout. *Journal of Veterinary Immunology and Immunopathology*, 56(1-2): 175-183.

[3] Mac Fadyn, G.1383. Biochemical tests to identify medical bacteria, Rahmati Translation, A. *Medical University publication of Tabris*. Pages 804-873.

[4] Tukmechi, A., Ownagh, A., and Mohebbat, A. 2010. In vitro antibacterial activities of ethanol extract of iranian propolis (EEIP) against fish pathogenic bacteria (*Aeromonas hydrophila, Yersinia ruckeri & Streptococcus iniae*). *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4):1086-1092.

[5] Yin, M. C., Cheng, W. S. 2003. Antioxidant and antimicrobial effects of four garlic-derived organosulfur compounds in ground beef. *Meat Science*, 63:23-28.

[6] Choobkar, N., Soltani, M., Ebrahimzadeh Mousavi, H., Akhonzadeh Basti, A., Matinfar, A. 2010. Effect of Zataria multiflora Boiss essential oil on the growth of Staphylococcus aureus in the light salted fillets of silver carp (Hypophthalmichthys molitrix). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 9(3):352-359.

[7] Wang, W., Wu, N., Zu, Y.G., Fu, Y.J. 2008. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis L.* essential oil compared to its main components. *Food Chemistry*, 108(3): 1019-1022.

[8] Zargari, A.1369. Medcinal plants, the fourth volume, First edition, Tehran University publication, Tehran, Iran, Poyes, 71-72.

[9] Naidu, S.A. 2000. Natural food antimicrobial system, (1st ed.) CRC press. Washington, USA.

[10] Farnly, James .1387. Natural medicinal propolis from bike. Translation from Seyyedi, S. Farshine Adl. Nasooh publication, 15, 229.

[11] Ashragy, S., Valafar, Sh. 1382. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*, 2:42-48.

[12] Zia, M., Mannani, R., Mahmoodi, M., Bayat, M., Mohaghegh, F. 1388. The Effects of alcoholic extract of propolis obtained from Iran bee hives on the growth of trichophyton mentagrophytis, trichophyton rubrum and trichophyton verrucosum. *Journal of Esfahan Medical School*, 95:232-241.

[13] Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Food Microbiology*, 26:118-122.

[14] AOAC. 2005. Afficial method of analysi. 17 edition, Washington , DC: association of official analytical chemistis, pp. 716-725.

[15] Goulas, A.E., Kontominas, M.G. 2007. Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*): Biochemical and sensory attributes. *Journal of Food Chemistry*, 100: 287–296.

[16] Koo, H., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Ambrosano, G.M.B., Murata, R.M., Yatsuda, R., Ikegaki, M., Alencar, S.M., Park, Y.K. 2000. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutans streptococci. *Current Microbiology*, 41:192-196.

[17] Kosalec, I., Bakmaz, M., Pepeljnjak, S. 2003. Analysis of propolis from continental and Adriatic region of Croatia. *Acta Pharmaceutica-zagreb*, 53(4):275-286.

[18] Yar Ahmadi, S., Ali Akbar, A.R., Hosseinpour, R. 2008. Flavonoids composition in propolis of citrus, forest trees and pines in Guilan province. *Journal of Agricultural Science and Technology* (In Persian), 18(1):195-203.

[19] Marcucci, M.C. 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26:83-99.

[20] Jafarzadeh Kashi, T.S., Kermanshahi, R.K., Erfan, M., Vahid Dastjerdi, E., Rezaei, Y., Tabatabaei, F.S. 2011. Evaluating the in-vitro antibacterial Effect of Iranian propolis on oral microorganisms. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 10(2):363-368.

[21] Choia, Y. M., Noh, D.O., Cho, S.Y., Suh, H. J., Kim, K.M., Kim, J.M. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT-Food Science and Technology*, 39: 756-761.

[22] Hussein, M.M.A., Hamdy Hassan, W., Ibrahim Moussa, I.M. 2011. Potential use of allicin (garlic, *Allium sativum* Linn, essential

oil) against fish pathogenic bacteria and its safety for monosex Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Food Agriculture and Environment*, 11(1):696-699.

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

[24] Tajkarimi, M., Ibrahim, S., and Cliver, D. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food control*, 21(9):1199-1218.

[25] Yaghoubi, M., Satari, R. 2007. Antimicrobial activity of Iranian propolis and its chemical composition. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences,* 15(1):45-48.

[26] Bosio, K., Avanzini, C., D'avolio, A., Ozino, O., Savoia, D. 2000. In vitro activity of propolis against Streptococcus pyogenes. *Letters in Applied Microbiology*, 31(2):174-177.

[27] De Andrade Ferreira, F.B., Torres, S.A., Da Silva Rosa, O.P., Ferreira, C.M., Garcia, R.B., Marcucci, M.C., Gomes, B.P. 2007. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endod*, 104(5):709-716.

[28] Kalogeropoulos, N., Konteles, S.J., Troullidou, E., Mourtzinos, I., Karathanos, V.T. 2009. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*, 116(2):452-461.

[29] Mohammadzadeh, S., Shariatpanahi, M., Hamedi, M., Ahmadkhaniha, R., Samadi, N., Ostad, S.N. 2007. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. *Food Chemistry*, 103(4):1097-1103.

[30] Standard Institute and indurtrial Research of Iran.1382. Food microbiology and Animal Feed- Counting cryophilic microorganisms–Testmethod, Standard No: 2629.

[31] Atemadi, H., Rezai, M., Abedian, A. 1387.Antibactend and antioxidant potential of rosemary extract (Rosemarinus officinalis) in increasing the shelf- life of rainbow trout (*Oncorhynchus mgjiss*). *Food Sicence quarter*, 5(4): 67-77.

[32] Ayad, E.H.E., Nashat, S., El-Sadek, N., Metwaly, H., El-Soda, M. 2004. Selection of wild lactic acid bacteria isolated from tradional Egyption dairy products according to production and technological criteria. *Journal of Food Microbiology*, 21: 715-725.

[33] Tserovska, L., Stefanova, S., Yordanova, T. 2002. Identification of lactic acid bacteria isolated from Katyk, goat's milk and cheese. *Journal of Culture Collection*, 3:48-52.

[34] Safari, R., Saeedi Asl, M. 1390. The effect of Nisin A and benzoic acid on listeria monocytogenes behaviour and some of biological and chemical parameters in silver carp fillets stored at 4°C. *Health Food*, 3:1-13.

[35] Shirazinejad, A.R., Noryati, I., Rosma, A., Darah, I. 2010. Inhibitory effect of lactic acid and nisin on bacterial spoilage of chilled shrimp. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 163-167.

[36] Kalantari, N., Ghafarpor, M. 1383. Comprehensive Study on Household Food Consumption pattern and nutritional status of the country. Country reports 1371-89, First publish, Research Institute of Nutrition and Food Industry, Tehran.

[37] Gholamzadeh, M., Hosseini, A., Eskandari, S., Hosseini, H. 2013. Determine the shelf life of *silver carp* treated with *Nigella sativa* during refrigerated storage. *Journal of Fisheries of Iran*, 22(1): 71-84.

[38] Shabanpur, B., Zulfighari, M., Fallahzadeh, S., Alipur, Gh. H. 1390. Effect of extract of *Zarariamultiflora boiss*. on shelf-life of salted vacuum packaged rainbow trout fillet (*Oncorhynchus mykiss*) in refrigerator conditions: microbial , chemical and sensory attributes as sessments. *Journal of Food Science and Technology,* 33(1):1-11.

[39] Jafarzadeh Khaledi, K., Aghazadeh Meshgi, M., Sharifan, A., Larijani, K. 1389. Investigation of effect of the Rosemary essential oil on growth of *Staphylococcus aureus* in commercial instant soup. *Journal of Comparative Pathology*, 7(2): 255-264 (In Persian).

[40] Zolfaghari, M., Shabanpour, B., Falahzadeh, S. 1390. Study of trend of chemical and microbial changes of *Rainbow Trout* (*Oncorhynchus Mykiss*) to determine the its optimum shelf-life during storage in refrigerator temperature (4°C). *Natural Resources*, 64(2):107-119.

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

Effect of different extracts of Iranian propolis on shelf-life of silver crap (*Hypophthalmichthys molitrix*) fillet in the refrigerator conditions: Chemical composition, evaluation of microbiological and sensory parameters

Sheikhi Koohsar, A. A.[1], Sayyed-Alangi, S. Z. [2*], Shamloofar, M. [3], Sharifian, S. [4]

1. Master graduate, Department of Food Science and Technology, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran.
2. Associate Professor, Department of Chemistry, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Fishery, Azadshahr Branch, Islamic azad university, Azadshahr, Iran.
4. Master graduate, Department of Food Science and Technology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.

(Received: 2016/04/16 Accepted:2016/11/07)

Propolis is similar to beeswax and it is production bumble bee. This study was evaluated the effect of different concentrations of the water and ethanolic extracts from Iranian propolis (WEP and EEP) on microbiological and sensory parameters of *Silver crap* fillets stored at 4°C during 9 days. Analysis of chemical compounds of of the extracts by GC/MS were also identified presence of high phenolic and flavonoid compounds including caffeic acid, tectochrysin, aceacetin, chrysin, pinostrobin, pinobanksin-3-acetate, galangin-3-methyl ester and pinocembrin chalcone. The WEP and EEP were revealed efficient against the spoilage microorganisms including: total plate counts, psychrotrophic populations, lactic acid bacteria; and eventually *Staphylococcus aureus*. There was significant difference in growth of bacteria between samples treated with WEP or EEP; and control samples ($p<0.05$) within 1 to 9 days of storage. Inhibitory effects were respectively 7%EEP>5%EEP>3% EEP>7%WEP>5%WEP>3% WEP within 1 to 9 days of storage. In all treatments, PTCs counts were higher 7 log CFU/g after the 6 day; as well as TPCs, LAB, and *S. aureus* population after the 9 day. Also, sensory evaluation was shown more improvement on sensory properties (color, odor, texture and overall acceptability) treated samples with the ethanolic extract of Iranian propolis than to its water extract.

Key Words: Extract, Propolis, Silver crap, Microbial spoilage, Chemical compounds.

* Corresponding Author E-mail Address: zalangi@gmail.com