نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 14، شماره 5، آذر- دی 1397، ص.815- 803

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 14, No. 5, Dec- Jan 2019, p. 803-815

ارزیابی اثر نایسین، استات سدیم و دما بر کیفیت فیله کپور علفخوار تلقیح شده با *استافیلوکوکوس اورئوس*

نادر چراغی[1]- ابراهیم علیزاده دوغیکلایی[*2]- محسن شهریاری مقدم[3]

تاریخ دریافت: 1396/09/10
تاریخ پذیرش: 1397/04/16

چکیده

استافیلوکوکوس اورئوس عامل بیماری‌زای مهمی در بروز مسمومیت‌های غذایی می‌باشد. هدف این پژوهش بررسی اثر نایسین، سدیم استات و دما بر رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1189) در فیله کپور علفخوار با استفاده از طرح آزمایش تاگوچی با آرایه ($L_4(2^3)$) می‌باشد. فیله‌ها پس از تلقیح با باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (10^3 CFU/g) و افزودن نایسین (750 IU/g و 1000) و استات سدیم (1 و 2%) در دماهای (4 و 8 درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. پارامتر های شیمیایی (پراکسید (PV)، تیوبار بیتوریک اسید (TBA) و مجموع بازهای نیتروژنی فرار (TVB-N)) و تعداد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در روزهای صفر، 3، 6 و 9 اندازه‌گیری شدند. کمترین و بیشترین میزان PV، TBA و TVB-N به‌ترتیب در تیمار 2 (استات سدیم 2%، نایسین 750 IU/g، دما 4 درجه سانتی‌گراد) و تیمار 4 (استات سدیم 1%، نایسین 750 IU/g، دما 8 درجه سانتی‌گراد) در انتهای دوره نگهداری مشاهده گردید. نتایج شمارش باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در تیمار 4 نسبت به سایر تیمار ها بیشتر بود. نتایج این تحقیق نشان داد که تیمار حاوی نایسین (750 IU/g)، استات سدیم (2%) و دما (4 درجه سانتی‌گراد) کارآمدی بیشتری در نگهداری فیله کپور علفخوار داشته در حالی که مدل‌سازی تاگوچی نایسین (1000 IU/g)، استات سدیم (2%) و دما (4 درجه سانتی‌گراد) را به‌عنوان شرایط بهینه نگهداری پیشنهاد می‌کند.

واژه‌های کلیدی: نایسین، سدیم استات، بافت، *استافیلوکوکوس اورئوس*، کپور علفخوار

مقدمه

در سال‌های اخیر کیفیت و سلامت مواد غذایی از دغدغه‌های اصلی مصرف‌کنندگان، صنایع غذایی و آژانس‌های جهانی بوده است. امروزه با توجه به ارزش غذایی بالای ماهی و دیگر غذاهای دریایی، مصرف آن ها در جیره غذایی انسان به‌صورت پیوسته افزایش یافته است (Hassoun and Coban, 2017). گوشت ماهی در مقایسه با گوشت مرغ و گوشت قرمز بسیار فسادپذیرتر بوده و حاوی مقادیر زیادی اسیدهای آمینه آزاد و بازهای نیتروژنی فرار در مقایسه با دیگر گوشت‌ها است (Ashie *et al.*, 1996). در طی دوره نگهداری، از کیفیت گوشت به دلیل فرآیندهای پیچیده فیزیکی، شیمیایی و میکروبی کاسته شده و فساد روی می‌دهد (Sallam, 2007). در نتیجه به یک و یا چندین روش نگهداری نیاز است تا کیفیت و سلامت محصول حفظ شده و زمان نگهداری فرآورده افزایش یابد (Hassoun and Caban, 2017). امروزه استفاده از باکتریوسین‌ها برای افزایش زمان ماندگاری فرآورده های غذایی افزایش یافته است. باکتریوسین‌ها پپتیدهای فعال ضدباکتریایی هستند که در ریبوزوم‌های سلول‌های برخی از باکتری‌ها در مقابل گروهی دیگر از باکتری‌ها تولید می‌شوند (Kaewklom *et al.*, 2013). نایسین نوعی از باکتریوسین‌ها است که توسط باکتری *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* تولید می شود و به‌صورت موفقیت آمیزی به‌عنوان یک ماده ضدباکتریایی در محصولات مختلف غذایی استفاده می شود. نایسین تنها باکتریوسینی است که به‌عنوان نگهدارنده مواد غذایی به‌صورت گسترده استفاده شده و توسط سازمان سلامت جهانی (WHO) به‌عنوان یک نگهدارنده زیستی پذیرفته شده است (Kaewklom *et al.*, 2013). باکتریوسین‌ها زمانی که به‌صورت همزمان با دیگر ترکیبات ضدباکتری از قبیل نگهدارنده های طبیعی، ترکیبات فنولی و دیگر پروتئین های ضدباکتریایی طبیعی استفاده می شوند، اثر سینرژیستی نشان می‌دهند (Sant'Anna *et al.*, 2014;

1- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل.
2- دانشیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل.
3- استادیار، گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل
(*- نویسنده مسئول: Email: alizadeh@uoz.ac.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.v14i5.69107

(Figueiredo and Almeida, 2017). مطالعات نشان داده‌اند ترکیبات ضدباکتریایی از قبیل سدیم استات نقش موثری در جلوگیری از رشد باکتری‌ها و افزایش زمان ماندگاری ماهی در شرایط مختلف نگهداری دارند (Kim *et al.*, 1995). سدیم استات توسط USFAD به‌عنوان ماده‌ای طعم‌دهنده و کنترل‌کننده pH تایید شده است. مطالعات گذشته نیز نشان داده است استفاده از سدیم استات نقش موثری در افزایش زمان ماندگاری فیله ماهی داشته است (Zhuang *et al.*, 1996). در روش های کلاسیک تعیین شرایط بهینه، یک فاکتور در هر آزمایش تغییر داده شده و دیگر فاکتورها ثابت نگه داشته می‌شوند، بنابراین این روش علاوه بر صرف هزینه بالا زمانبر بوده و در بررسی اثر همزمان فاکتورهای مختلف برهم نتایجی حاصل نمی‌شود. لذا با استفاده از روش‌های مبتنی بر طراحی آزمایش می‌توان با آزمایش و زمان کمتر به نتیجه مطلوب رسید. یکی از روش‌های شناخته شده طراحی آزمایش روش تاگوچی است. لذا با کاربرد این روش می‌توان با انجام آزمایش‌های کمتر به تاثیر همزمان فاکتورهای مختلف تعیین شرایط بهینه پرداخت (Moghadam *et al.*, 2014). بنابراین هدف پژوهش حاضر بررسی تاثیر همزمان نایسین، سدیم استات و دما بر رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* تلقیح شده در فیله کپور علفخوار با استفاده از طرح آزمایش تاگوچی است.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی

ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) پرورشی با میانگین وزن 5 ±1000 گرم و طول 35 سانتی‌متر به‌صورت زنده از مزارع پرورشی شهرستان زابل خریداری و به آزمایشگاه فرآوری محصولات شیلاتی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه زابل منتقل گردید. ماهی‌ها در حضور مقادیر کافی یخ، پس از گذراندن مراحل شستشو اولیه و تخلیه امعاء و احشاء فیله شدند. سپس فیله‌ها به‌صورت تصادفی برای تیماربندی تقسیم شدند.

آماده‌سازی و تلقیح باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) به فیله‌ها

باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1189) از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی (سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران-تهران) تهیه شد. باکتری لیوفلیزه به محیط BHI (Brain Heart Infusion broth) تلقیح و به مدت 18ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد فعال گردید. سپس باکتری به محیط کشت BHI انتقال داده شد و پس از 18 ساعت انکوباسیون در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به همراه 20% گلیسرول در دمای 80- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده منجمد شد. برای استفاده، محیطهای کشت بر روی محیط کشت تریپتون سویا آگار (TSA) منتقل و گرمخانه‌گذاری شدند. جهت تلقیح باکتری به فیله‌ها ابتدا باکتری از محیط کشت جامد توسط لوپ به محیط کشت BHI منتقل و به مدت 18 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. سپس مقداری از محیط کشت گرمخانه‌گذاری شده به محیط کشت جدید منتقل و مجدد در دمای 37 درجه سانتی‌گراد برای رسیدن به نیمه فاز لگاریتمی رشد انکوباسیون انجام شد. سپس مقداری از محیط کشت سانتریفوژ و پس از دوبار شستشوی باکتری‌ها با سرم نمکی، باکتری‌ها در سرم نمکی ورتکس و از آن جهت تلقیح فیله‌ها با 10^3 CFU/mL استفاده شد (Fernandez-Saiz *et al.*, 2010).

تعیین شرایط بهینه نگهداری فیله کپور علفخوار

به‌منظور بررسی اثر نایسین، سدیم استات و دما بر رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در فیله کپور علفخوار از طراحی آزمایش به روش تاگوچی با آرایه $L_4(2^3)$ استفاده و سه فاکتور هر کدام در دو سطح (بالا و پایین) انتخاب گردید. مقادیر مختلف فاکتورهای مورد نظر برای تعیین شرایط بهینه (دما، غلظت نایسین و استات سدیم) و همچنین آرایش ارتوگنال طراحی آزمایش در جداول 1و 2 نشان داده شده است. جهت حصول اطمینان از سترون بودن فیله ماهی تهیه شده، بررسی وجود یا عدم وجود باکتری *استافیلوکوکوس‌اورئوس* تست جداسازی *استافیلوکوکوس‌اورئوس* انجام شد. سپس فیله ماهی با 1×10^3 CFU/g باکتری *استافیلوکوکوس‌اورئوس* به‌صورت دستی مطابق روش ذکر شده در بخش قبل تلقیح گردید. بر اساس طراحی آزمایش تاگوچی سدیم استات و نایسین با غلظت مشخص به هر دو سطح فیله‌ها اضافه و پس از قراردادن فیله‌ها در کیسه‌های پلاستیکی استریل، فیله‌ها به آرامی با دست ماساژ تا پراکنش سدیم استات و نایسین بر سطح نمونه یکسان شود. سپس فیله‌ها در یخچال (دماهای 4 و 8 درجه سانتی‌گراد) نگهداری و در ساعات مختلف (صفر، 72، 144 و 216) میزان رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و پارامترهای شیمیایی بررسی گردید. همچنین تغییرات ایجاد شده در ساختار بافتی تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش توسط بافت شناسی کلاسیک مطالعه گردید. به‌منظور مطالعه میزان تاثیر مواد نگهدارنده بر میزان رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، از تیمارهای شاهد فاقد مواد نگهدارنده در دماهای 4 و 8 درجه سانتی‌گراد استفاده گردید. تمامی آزمایش‌ها با سه تکرار انجام گرفت.

شمارش باکتری *استافیلوکوکوس‌اورئوس*

10 گرم گوشت فیله با 90 میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی مخلوط و توسط دستگاه هموژنایزر (IKA T10 basic، Germany) همگن گردید. 0/1 میلی‌لیتر از مخلوط تهیه شده بر روی محیط کشت

Baird-Parker agar به‌طورسطحی پخش گردید. در صورت بالا بودن تعداد باکتری در یک پلیت رقیق‌سازی مخلوط (تا رقت نهایی 6) در محلول سرم فیزیولوژی انجام گردید. پلیت‌های کشت داده شده بعد از 48 ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای 37 درجه سانتی‌گراد شمارش شدند (Wu and Su, 2014).

پارامترهای شیمیایی

برای اندازه‌گیری pH، مقدار 5 گرم نمونه با 45 میلی‌لیتر آب مقطر در یک همزن به مدت 1 دقیقه به‌خوبی مخلوط شدند. سپس pH نمونه‌ها با دستگاه pHمتر دیجیتالی که در pH 4 و 7 کالیبره شده بود اندازه‌گیری گردید (AOAC, 2005). پراکسید مطابق روش AOAC (2002)، تیوبار بیتوریک اسید مطابق روش Namulema و همکاران (1999) و مجموع بازهای نیتروژنی فرار مطابق روش AOAC (2002) در کل دوره اندازه‌گیری شدند.

مطالعات بافت‌شناسی

با استفاده از تیغ نمونه‌های 5 میلی‌متری از فیله ماهی تهیه و در محلول کارنوی (60% اتانول خالص + 30% کلروفرم + 10% اسید استیک گلاسیال) به‌مدت 24 ساعت در 4 درجه سانتی‌گراد تثبیت شدند. آماده‌سازی نمونه‌ها برای ارزیابی ریزساختارهای بافتی، مشاهده فضای بین سلولی و تخریب فیبرها بر اساس روش Alizadeh و همکاران (2007) انجام شد. نمونه تثبیت شده برای آب‌زدایی به‌مدت 2 ساعت در اتانول خالص قرار داده شدند. در ادامه نمونه‌ها در مخلوطی از 50% اتانول خالص و 50 درصد تولوئن به مدت 24 ساعت و سپس به مدت 4 ساعت در تولوئن خالص قرار گرفتند. سپس در حمام پارافین/ تولوئن به‌ترتیب با مقدارهای (25%- 50%- 75%) و هر کدام به مدت یک ساعت قرار گرفتند. در انتها، نمونه‌ها به‌مدت 1 ساعت در حمام پارافین خالص (60 درجه سانتی‌گراد) غوطه‌ور گردیدند. نمونه‌های حاصله با استفاده از پارافین در قالب‌هایی به ابعاد 15×15×20 میلی‌متر قالب‌گیری و با استفاده از میکروتوم (RMT-30, Radical Microtome, India) با ضخامت 10 میکرومتر برش داده شدند. سپس نمونه‌ها با استفاده از متیل اورنژ و بلوآنلین رنگ‌آمیزی (Alizadeh *et al.*, 2007) و با استفاده از میکروسکوپ (CX21FS1, Olympus, Japan) مجهز به دوربین (Olympus, SP-500 UZ, Japan) مطالعه و عکس‌برداری شدند.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

از نرم‌افزار Statistica 8.0 برای طراحی آزمایش تاگوچی استفاده شد. جهت شناسایی فاکتورهای تاثیرگذار بر میزان فاکتورهای مختلف اندازه‌گیری شده از factorial ANOVA of the design module استفاده گردید.

جدول 1- فاکتورهای انتخاب شده جهت تعیین شرایط بهینه نگهداری فیله کپور علفخوار

فاکتور	سطح	
	1	2
دما (°C)	4	8
نایسین (IU/g)	1000	750
استات سدیم (%)	1	2

جدول 2- تیمارهای مختلف آزمایش شده جهت تعیین شرایط بهینه نگهداری فیله کپور علفخوار

تیمار	استات سدیم (%)	نایسین (IU/g)	دما (°C)
1	1	1	1
2	2	2	1
3	2	1	2
4	1	2	2

نتایج و بحث

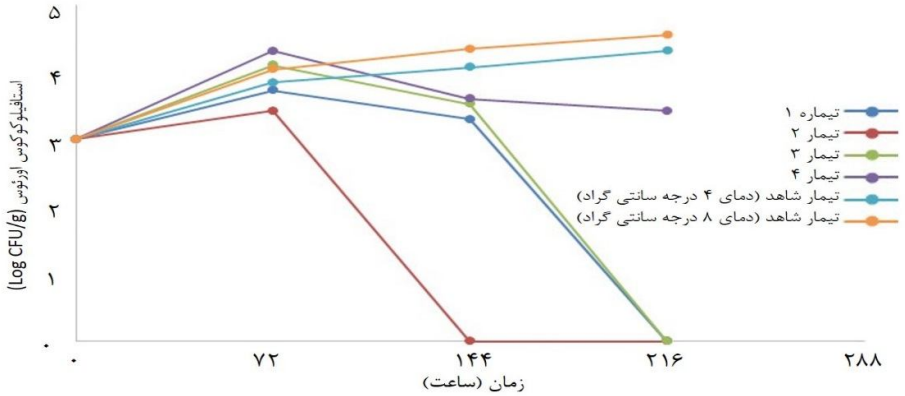
رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*

ظهور باکتری‌های پاتوژن مقاوم به اغلب آنتی‌بیوتیک‌های موجود، در کنار تقاضای بازار به مواد غذایی با ماندگاری بالا و فاقد نگهدارنده‌های شیمیایی بسیار مورد توجه صنایع غذایی است. این واقعیات موجب استفاده از موادی از قبیل باکتریوسین‌ها و نمک‌های اسیدهای آلی شده است (Figueiredo and Almeida, 2017). شکل 1، شمارش تعداد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* تلقیح شده به فیله کپور علفخوار را در تیمارها و زمان‌های مختلف نشان می‌دهد.

بیشترین میزان رشد باکتری در تیمار شاهد به‌ترتیب در دماهای 8 و 4 درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید. رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در تیمار 4 (استات سدیم 1%، نایسین 750 IU/g، دما 8 درجه سانتی‌گراد) نسبت به تیمارهای دیگر بیشتر بوده و کمترین میزان رشد در تیمار 2 (استات سدیم 2%، نایسین 750 IU/g، دما 4 درجه سانتی‌گراد) مشاهده گردید. نکته قابل توجه آن که تیمار 3 (استات سدیم 2%، نایسین 1000 IU/g، دما 8 درجه سانتی‌گراد) علی‌رغم نگهداری فیله‌ها در دمای 8 درجه سانتی‌گراد، رشد باکتری استافیلوکوکوس با ادامه زمان نگهداری کاهش یافت. که می‌تواند به دلیل کاربرد غلظت‌های بالای استات سدیم و نایسین به‌طور همزمان باشد. همچنین نتایج نشان داد که دما تاثیرگذارترین فاکتور در رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* بوده است و با گذشت زمان دیگر فاکتورها نیز تاثیر خود را نشان دادند (شکل 2).

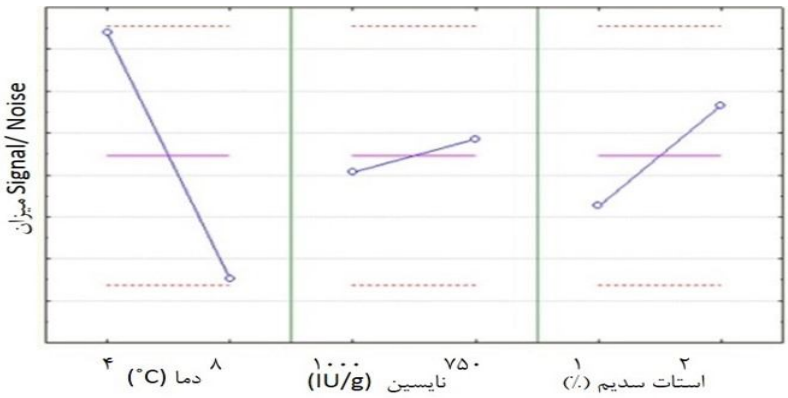
نتایج مطالعه تاثیر اسانس رزماری و نایسین بر رشد باکتری

استرپتوکوکوس اینیایی در دمای 4 و 8 درجه سانتی‌گراد نشان داد که نگهدارنده‌ها توانستند مانع رشد باکتری تا روز 9 و 3 به‌ترتیب در دمای 4 و 8 درجه سانتی‌گراد شوند (Roomiani *et al.*, 2017). در مطالعه حاضر نیز نگهدارنده‌ها به استثنای تیمار 4 (استات 1%، نایسین 750 IU/g و دمای 8 درجه سانتی‌گراد) توانستند جلوی رشد باکتری را گرفته و با افزایش زمان نگهداری اثر ممانعتی نایسین و استات سدیم بر رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* بهتر نمایان گردید. بررسی اثر نایسین بر رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* تلقیح شده در کوفته ماهی نشان داد که اثر ممانعتی نایسین بر رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با افزایش زمان انکوباسیون افزایش می‌یابد (Vongsawasdi *et al.*, 2012). به‌طوریکه خاصیت‌کشندگی نایسین بر باکتری *استافیلوکوکوس‌اورئوس* با افزایش زمان افزایش یافت (Zhao *et al.*, 2016). مطالعه اصغری و همکاران (1388) که نشان دهنده اثرات بازدارندگی نایسین و استات سدیم روی بار باکتریایی فیله کپور نقره ای هنگام نگهداری در دمای 4 درجه سانتی‌گراد می‌باشد نیز با تحقیق حاضر همخوانی دارد.



شکل1- میزان رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* تلقیح شده به فیله کپور علفخوار در تیمارها و زمان‌های مختلف

تیمار 1- استات سدیم 1%، نایسین 1000 IU/g، دما 4 درجه سانتی گراد؛ تیمار 2- استات سدیم 2%، نایسین 750 IU/g، دما 4 درجه سانتی گراد؛ تیمار 3- استات سدیم 2%، نایسین 1000 IU/g، دما 8 درجه سانتی گراد؛ تیمار 4- استات سدیم 1%، نایسین 750 IU/g، دما 8 درجه سانتی گراد؛ تیمار شاهد (دمای 4 درجه سانتی گراد)- فیله ماهی نگهداری شده در دمای 4 درجه سانتی گراد؛ تیمار شاهد (دمای 8 درجه سانتی گراد)- فیله ماهی نگهداری شده در دمای 8 درجه سانتی گراد



شکل2- تاثیر فاکتورهای مختلف بر میزان رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* تلقیح شده به فیله کپور علفخوار در پایان دوره آزمایش

مقادیر مجموع بازهای نیتروژنی فرار (TVB-N)

نتایج جدول 3 نشان داد که مجموع بازهای نیتروژنی فرار فیله هنگام نگهداری روند افزایشی داشته اما این افزایش در تیمار 2 نسبت به سایر تیمارها کمتر بود. که به علت نگهداری در دمای پایین وکاربرد غلظت بالای استات سدیم است. در پایان آزمایش به‌جز استات دیگر فاکتورها (دما و نایسین) تاثیر معنی‌داری ($p<0/05$) بر میزان TVB-N فیله‌ها داشته‌اند. به‌طوریکه بیشترین تاثیر مربوط به دما و پس از آن نایسین و استات بود (شکل 3).

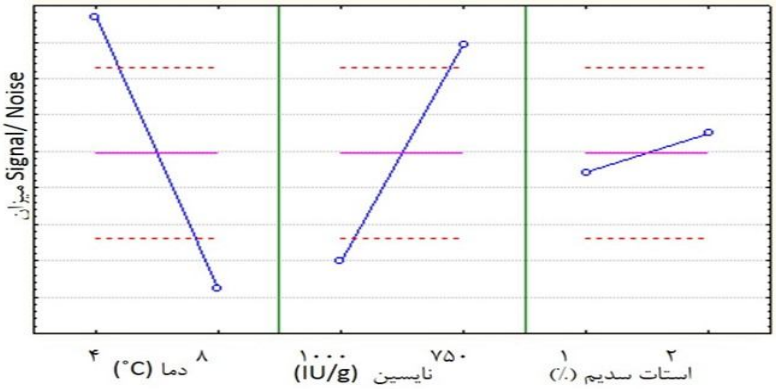
در اثر تجزیه گوشت ماهی به‌وسیله باکتری TVB-N بوجود می‌آید. لذا با افزایش بار میکروبی میزان TVB-N نیز افزایش می‌یابد

(Özyurt *et al*., 2009). بدین صورت که بازهای فرار با جدا شدن آمین‌ها از اسیدهای آمینه توسط آنزیم‌های میکروبی تولید می‌شوند (Muratore and Licciredello, 2005). علاوه براین، افزایش این شاخص طی نگهداری احتمالا می‌تواند در نتیجه دآمیناسیون اسیدهای‌آمینه باشد (Pacheco-Aguilar *et al*., 2000). در مطالعه حاضر بیشترین میزان TVB-N (30/33 میلی‌گرم نیتروژن در 100 گرم گوشت ماهی) در تیمار 4 پس از 216 ساعت نگهداری در دمای 8 درجه سانتی گراد مشاهده گردید که بالاتر از حد قابل قبول (25 میلی گرم نیتروژن در 100 گرم گوشت ماهی) بوده است (Giménez *et al*., 2002).

جدول3- تغییرات مقادیر TVB-N (میلی گرم نیتروژن در 100 گرم گوشت ماهی) در تیمار ها و زمان های مختلف

تیمار	زمان (ساعت)			
	0	72	144	216
1	7/33 ± 0/31	9/33 ± 0/57	12/13 ± 0/81	21/00 ± 2/42
2	7/47 ± 0/23	7/47 ± 0/72	10/27 ± 0/95	14/00 ± 1/54
3	7/33 ± 0/25	11/67 ± 0/71	14/00 ± 1/30	22/87 ± 1/62
4	7/07 ± 0/40	13/53 ± 1/27	16/33 ± 0/45	30/33 ± 2/91

تیمار 1- استات سدیم 1%، نایسین 1000 IU/g، دما 4 درجه سانتی گراد؛ تیمار 2- استات سدیم 2%، نایسین 750 IU/g، دما 4 درجه سانتی گراد؛ تیمار 3- استات سدیم 2%، نایسین 1000 IU/g، دما 8 درجه سانتی گراد؛ تیمار 4- استات سدیم 1%، نایسین 750 IU/g، دما 8 درجه سانتی گراد



شکل3- تاثیر فاکتورهای مختلف بر میزان TVB-N فیله کپور علفخوار در پایان دوره آزمایش

مقادیر پراکسید (PV)

پراکسید شاخص ارزشمندی جهت ارزیابی میزان اکسیداسیون لیپیدها در طول دوره نگهداری مواد غذایی است (Barbosa-Pereira *et al*., 2013). مقدار PV در شروع آزمایش در تمامی تیمارها پایین بود و با افزایش زمان نگهداری مقدار آن در فیله‌ها به تدریج افزایش یافت (جدول 4). به‌طوریکه بیشترین میزان PV در تیمار 4 (استات سدیم 1%، نایسین 750 IU/g، دما 8 درجه سانتی گراد) و کمترین آن در تیمار 2 (استات سدیم 2%، نایسین 750 IU/g، دما 4 درجه سانتی‌گراد) مشاهده گردید. ولی مقدار پراکسید در همه تیمارها ازحد قابل قبول پیشنهادی (5 میلی‌اکی‌والان O_2 در کیلوگرم چربی ماهی) کمتر بود (Sikorski, *et al*., 1990). همانطور که نتایج نشان داد میزان افزایشPV با افزایش درصد استات سدیم کاهش یافت. تاثیر آنتی‌اکسیدانی استات سدیم روی ورقه‌های ماهی آزاد (*Onchrhynchus nerka*) هنگام نگهداری در دمای 1 درجه سانتی‌گراد نشان داد که استفاده از استات سدیم به‌طور معنی‌داری موجب کاهش روند افزایشی میزان PV می‌گردد (Sallam , 2007).

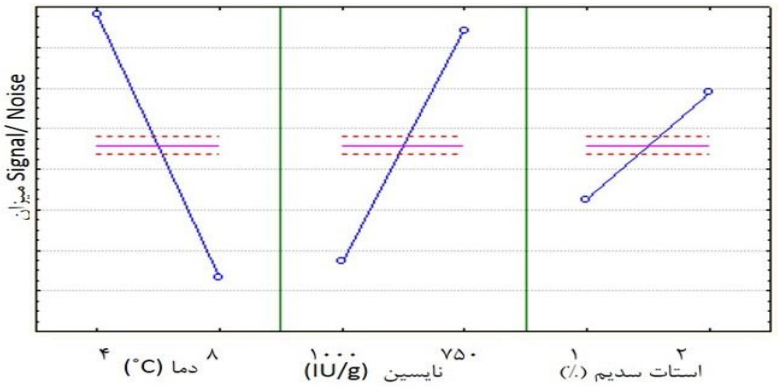
نتایج آزمون آماری نشان داد که در پایان آزمایش تمامی فاکتورها تاثیر معنی‌داری ($p<0/05$) بر تغییر میزان PV فیله‌ها داشته‌اند. به‌طوریکه دما بیشترین تاثیر را بر میزان PV و پس از آن نایسین و استات سدیم نشان دادند (شکل 4). میزان پراکسید در تیمار 1 و 2 نگهداری شده در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نسبت به تیمار 3 و 4 نگهداری شده در دمای 8 درجه سانتی‌گراد نگهداری کمتر بود، که نشان‌دهنده نقش موثر دما در جلوگیری از اکسیداسیون چربی‌ها می‌باشد. لذا نگهداری فیله‌ها در دمای کم و استفاده از غلظت بالاتر استات سدیم نقش مهمی در کنترل افزایش میزان PV در فیله‌ها ایفا می‌کنند. نایسین دارای اثرات سینرژیستی خوبی در کاهش

اکسیداسیون لیپیدها هنگام استفاده همزمان با استات سدیم دارد (اصغری و همکاران، 1388). نتایج Gao و همکاران (2014) نشان داد که استفاده از نایسین به تنهایی نمی‌تواند میزان PV فیله ماهی *Trachinotus ovatus* نگهداری شده در دمای 4 درجه سانتی‌گراد را کنترل کند. در حالی که استفاده ترکیبی نایسین با عصاره رزماری موجب افزایش کمتر میزان PV فیله‌ها می‌گردد.

جدول4- تغییرات مقادیر PV (میلی اکی والان O_2 در کیلوگرم چربی ماهی) در تیمارها و زمان‌های مختلف

تیمار	زمان (ساعت)			
	0	72	144	216
1	0/56 ± 0/03	0/85 ± 0/02	1/17 ± 0/06	2/93 ± 0/05
2	0/53 ± 0/02	0/56 ± 0/02	0/63 ± 0/04	1/12 ± 0/03
3	0/55 ± 0/03	1/74 ± 0/03	2/25 ± 0/28	3/21 ± 0/02
4	0/54 ± 0/05	1/98 ± 0/05	2/46 ± 0/53	4/57 ± 0/06

تیمار 1- استات سدیم 1%، نایسین 1000 IU/g، دما 4 درجه سانتی گراد؛ تیمار 2- استات سدیم 2%، نایسین 750 IU/g، دما 4 درجه سانتی گراد؛ تیمار 3- استات سدیم 2%، نایسین 1000 IU/g، دما 8 درجه سانتی گراد؛ تیمار 4- استات سدیم 1%، نایسین 750 IU/g، دما 8 درجه سانتی گراد



شکل4- تاثیر فاکتورهای مختلف بر میزان PV فیله کپور علفخوار در پایان دوره آزمایش

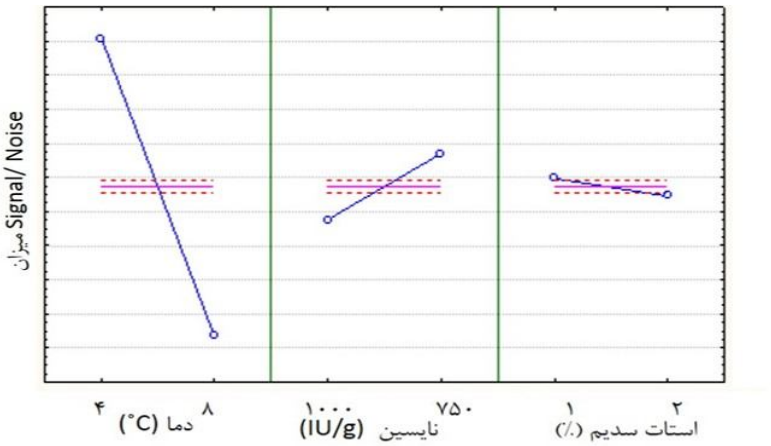
مقادیر تیوباربیتوریک اسید (TBA)

به‌منظور ارزیابی درجه اکسیداسیون چربی در ماهیان از شاخص TBA نیز استفاده می‌شود که میزان محصولات ثانویه اکسیداسیون به‌ویژه آلدئیدها (مالون آلدئید) را نشان می‌دهد (Nishimoto *et al.*, 1985). مقادیر TBA طی زمان نگهداری در تمامی تیمارها افزایش یافت که می‌تواند به علت تشکیل محصولات ثانویه هیدرولیز چربی‌ها باشد (Schillinger *et al.*, 1996). بیشترین و کمترین میزان به‌ترتیب در تیمار 4 و 2 مشاهده گردید (جدول 5). تاثیر نمک‌های سدیمی روی اکسیداسیون چربی استیک قزل آلای رنگین نگهداری شده در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نشان داد که کاربرد استات سدیم موجب افزایش کمتر TBA استیک‌ها در مقایسه با سایر نمک‌های سدیمی گردید (Haghparast *et al.*, 2010). همچنین کمتر بودن میزانTBA در تیمارهای حاوی درصد بالاتر استات سدیم می‌تواند به علت تاثیر آنتی‌باکتریایی استات سدیم روی باکتری‌هایی که در واکنش آنزیمی اکسیداسیون نقش دارند باشد (Etemadi *et al.*, 2013). Kashiri و همکاران (2011) نشان دادند که فیله‌های تاس ماهی ایرانی تیمار شده با استات‌سدیم منجر به تاخیر در اکسیداسیون چربی‌ها و افزایش زمان نگهداری در دمای 4 درجه سانتی‌گراد گردیدند. بیشترین حد پیشنهادی میزان تیوباربیتوریک اسید 2 میلی‌گرم مالون‌آلدهید بر کیلوگرم چربی ماهی می‌باشد (Lakshmanan, 2000). که در تحقیق ما تیمارهای 3 و 4 پس از 216 ساعت نگهداری از حد گذشتند ولی تیمارهای 1 و 2 به این میزان نرسیدند. شکل 5 نشان می‌دهد که تمامی فاکتورها تاثیر معنی‌داری ($p<0/05$) بر میزان TBA فیله‌ها داشته به‌طوریکه بیشترین تاثیر بر میزان TBA مربوط به دما و پس از آن نایسین و استات سدیم می باشد.

جدول5- تغییرات میزان TBA (میلی گرم مالون آلدهید بر کیلوگرم گوشت ماهی) در تیمارها و زمان‌های مختلف

تیمار	زمان (ساعت)			
	0	72	144	216
1	0/31 ± 0/012	0/52 ± 0/010	0/75 ± 0/040	0/96 ± 0/017
2	0/27 ± 0/006	0/45 ± 0/025	0/64 ± 0/025	0/81 ± 0/015
3	0/29 ± 0/015	0/57 ± 0/021	0/84 ± 0/035	2/09 ± 0/026
4	0/30 ± 0/021	0/82 ± 0/012	1/07 ± 0/035	2/77 ± 0/036

تیمار 1- استات سدیم 1%، نایسین 1000 IU/g، دما 4 درجه سانتی گراد؛ تیمار 2- استات سدیم 2%، نایسین 750 IU/g، دما 4 درجه سانتی گراد؛ تیمار 3- استات سدیم 2%، نایسین 1000 IU/g، دما 8 درجه سانتی گراد؛ تیمار 4- استات سدیم 1%، نایسین 750 IU/g، دما 8 درجه سانتی گراد



شکل5- تاثیر فاکتورهای مختلف بر میزان TBA فیله کپور علفخوار در پایان دوره آزمایش

مقادیر pH

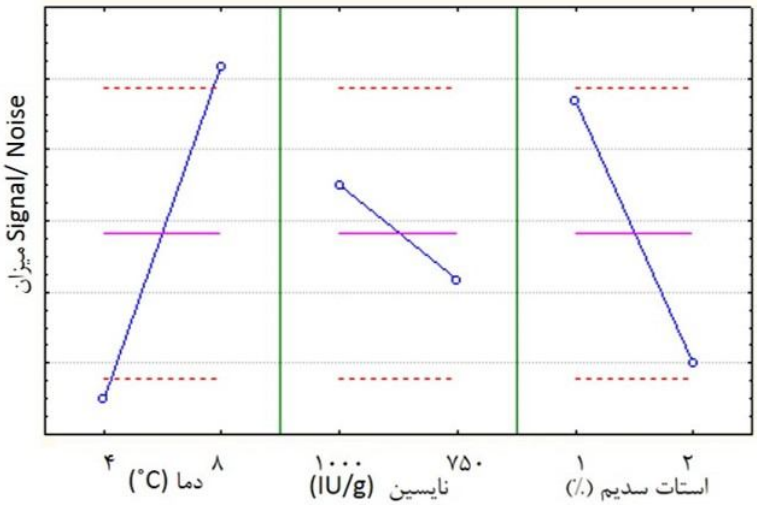
pH تیمارها طی نگهداری به تدریج کاهش یافت (جدول 6) که این روند به‌خوبی از 24 تا 144 ساعت نگهداری قابل مشاهده می‌باشد. کاهش اولیه pH می‌تواند به‌علت گلیکولیز بی‌هوازی پس از مرگ با تجمع اسید لاکتیک بین سلول‌های عضلانی باشد (Gatica *et al.*, 2008).

اما پس از 144ساعت میزان pH در تمامی تیمارها به‌جز تیمار 2 روند افزایش یافت. که علت آن نیز می‌تواند به‌دلیل افزایش غلظت ترکیبات آمونیوم و مولکول‌های قلیایی با گذشت زمان باشد که زمینه مناسبی را برای رشد و فعالیت میکروارگانیسم‌ها و آنزیم‌های اتولیتیک فراهم می‌کند و همچنین سبب فعالیت آنزیمی نیز می‌گردد و سبب افزایش pH می‌شود (Arashisar *et al.*, 2004). در پایان آزمایش به‌جز نایسین دیگر فاکتورها (دما و استات سدیم) تاثیر معنی‌داری ($p<0/05$) بر میزان pH فیله‌ها داشته‌اند. به‌طوریکه بیشترین تاثیر را دما و پس از آن استات سدیم و نایسین داشته‌اند (شکل 6).

جدول6- تغییرات مقادیر pH در تیمار ها و زمان های مختلف

تیمار	زمان (ساعت)			
	24	72	144	216
1	6/65 ± 0/03	6/44 ± 0/02	6/38 ± 0/03	6/42 ± 0/02
2	6/74 ± 0/04	6/56 ± 0/02	6/44 ± 0/03	6/37 ± 0/01
3	6/84 ± 0/03	6/63 ± 0/04	6/42 ± 0/01	6/45 ± 0/02
4	6/90 ± 0/02	6/60 ± 0/03	6/40 ± 0/05	6/43 ± 0/05

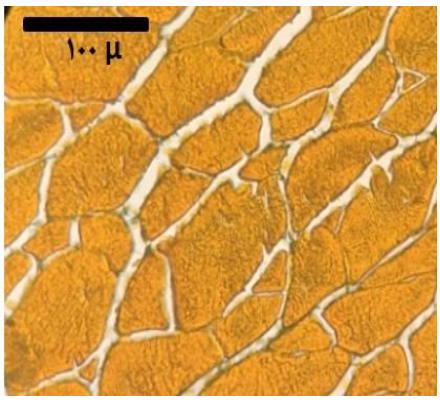
تیمار 1- استات سدیم 1%، نایسین 1000 IU/g، دما 4 درجه سانتی گراد؛ تیمار 2- استات سدیم 2%، نایسین 750 IU/g، دما 4 درجه سانتی گراد؛ تیمار 3- استات سدیم 2%، نایسین 1000 IU/g، دما 8 درجه سانتی گراد؛ تیمار 4- استات سدیم 1%، نایسین 750 IU/g، دما 8 درجه سانتی گراد



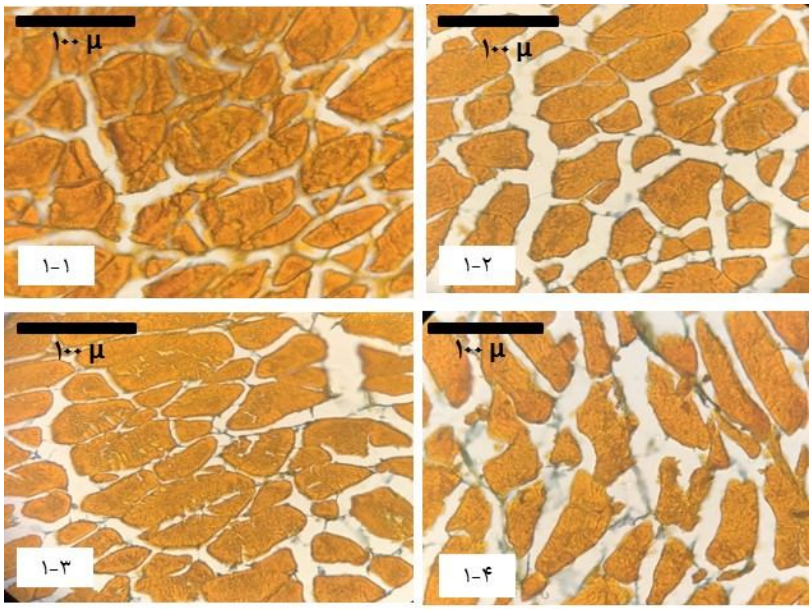
شکل6- تاثیر فاکتورهای مختلف بر میزان pH فیله کپور علفخوار در پایان دوره آزمایش

مطالعات بافت‌شناسی

شکل 7 ریزساختار عضله کپور علفخوار را هنگام شروع آزمایش نشان می‌دهد. فیبرهای ماهیچه‌ای نسبتا یکدست و با فرم‌های منظم می‌باشند. فضای بین سلولی کم شکستگی در فیبرها مشاهده نمی‌گردد. اما پس از پایان آزمایش فضای بین سلولی و شکستگی فیبرها افزایش یافت (شکل 8). به‌طوریکه این تغییرات در تیمارهای نگهداری شده در دمای 8 درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای 4 درجه سانتی‌گراد بیشتر بود. همچنین به علت تاثیر مواد نگهدارنده در دو دما، تغییرات ایجاد شده نسبت به گروه شاهد کمتر بوده است. نتایج مطالعه Sharifian و همکاران (2014) بر روی ریزساختار فیله ماهی هامور معمولی طی نگهداری در یخچال (4 درجه سانتی‌گراد) نشان داد که در نمونه شاهد آرایش فیبرها منظم و فاصله بین آن‌ها بسیار کم بود. اما با گذشت زمان نگهداری، چروکیدگی سطح فیبرها و فاصله بین آن‌ها افزایش یافت. که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. همچنین میکروارگانیسم‌ها نیز سبب تغییرات ساختار میوفیبریل‌های سلول می‌گردند (Chéret *et al.*,2005). لذا با توجه به ادامه رشد باکتری *استافیلوکوکوس‌اورئوس* در تیمار 4 این تغییرات نسبت به سایر تیمارها به‌خوبی قابل مشاهده است.



شکل 7- تصویر بافت شناسی عضله کپور علفخوار در شروع آزمایش



شکل 8- تصاویر بافت شناسی عضله کپور علفخوار در پایان دوره آزمایش

شکل 1-1- تیمار 1- استات سدیم 1٪، نایسین 1000 IU/g، دما 4 درجه سانتی گراد؛ شکل 2-1- تیمار 2- استات سدیم 2٪، نایسین 750 IU/g، دما 4 درجه سانتی گراد؛ شکل 3-1- تیمار 3- استات سدیم 2٪، نایسین 1000 IU/g، دما 8 درجه سانتی گراد؛ شکل 4-1- تیمار 4- استات سدیم 1٪، نایسین 750 IU/g، دما 8 درجه سانتی گراد

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی براساس شمارش تعداد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، استفاده از ترکیب نگهدارنده‌های نایسین و استات سدیم در هر دو دمای 4 و 8 درجه سانتی گراد می‌تواند کیفیت محصول را حفظ کند. اگرچه بر اساس شاخص TVB-N نگهداری در دمای بالا (8 درجه سانتی‌گراد) به شرط استفاده از غلظت بالاتر نایسین (1000 IU/g) و استات (2٪) امکان‌پذیر می‌باشد. در حالیکه بر اساس شاخص TBA نگهداری فیله‌ها در دمای 8 درجه سانتی‌گراد امکانپذیر نیست. همچنین بر اساس مدل‌سازی انجام شده با استفاده از آنالیز تاگوچی دمای 4 درجه سانتی‌گراد، نایسین با غلظت 1000 IU/g و استات سدیم با غلظت 2٪ به‌عنوان شرایط بهینه نگهداری فیله‌ها تعیین گردید.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حمایت مالی دانشگاه زابل (Grant code:UOZ-GR-9517-26) و همکاری کارشناسان محترم گروه شیلات و محیط زیست برای انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

اصغری، م.، علیزاده دوغی‌کلایی، ا.، صفری، ر.، ارشدی، ع.، سعیدی اصل، م. ر.، 1388، بررسی تاثیر نایسین Z و استات سدیم بر زمان ماندگاری فیله‌ی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) در طی نگهداری در دمای 4 درجه ی سانتی‌گراد. فصلنامه‌ی علوم و فناوری غذایی، 1(3)، 64-55.

Alizadeh, E., Chapleau, N., de Lamballerie, M. & Le-Bail, A., 2007, Effect of different freezing processes on the microstructure of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8(4), 493–499.

AOAC., 2002, Official Methods of Analysis of the Association of the Official Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemists, (14th ed.), Washington, DC.

AOAC., 2005, Official Methods of Analysis of the Association of the Official Analytical Chemists. Association of Official Analyticsl Chemists, (17th Ed), Washington, DC.

Arashisar, Ş., Hisar, O., Kaya, M. & Yanik, T., 2004, Effects of modified atmosphere and vacuum packaging on microbiological and chemical properties of rainbow trout (*Oncorynchus mykiss*) fillets. *International Journal of Food Microbiology*, 97(2), 209-214.

Ashie, I. N. A., Smith, J. P., Simpson, B. K. & Norman, F. H., 1996, Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36(1-2), 87–121.

Barbosa-Pereira, L., Cruz, J. M., Sendón, R., Bernaldo de Quirós, A. R., Ares, A., Castro-López, M., José Abad, M., Maroto, J. & Paseiro-Losada, P., 2013, Development of antioxidant active films containing tocopherols to extend the shelf life of fish. *Food Control*, 31(1), 236-243.

Chéret, R., Chapleau, N., Delbarre-Ladra, Ch., Verrez-Bagnis, V. & de Lamballerie, M., 2005, Effects of high pressure on texture and microstructure of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. *Journal of Food Science*, 70(8), e477-e483.

Etemadi, H., Rezaei, M., Abedian Kenari, A. M. & Hosseini, S. F., 2013, Combined effect of vacuum packaging and sodium acetate dip treatment on shelf life extension of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during refrigerated storage. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15(5), 929-939.

Fernandez-Saiz, P., Soler, C., Lagaron, J. M. & Ocio, M. J., 2010, Effects of chitosan films on the growth of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. in laboratory media and in fish soup. *International Journal of Food Microbiology*, 137, 287-294.

Figueiredo, A. C. L. & Almeida, R. C. C., 2017, Antibacterial efficacy of nisin, bacteriophage P100 and sodium lactate against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat sliced pork ham. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(4), 724-729.

Gao, M., Feng, L., Jiang, T., Zhu, J., Fu, L., Yuan, D. & Li, J., 2014, The use of rosemary extract in combination with nisin to extend the shelf life of pompano (*Trachinotus ovatus*) fillet during chilled storage. *Food Control*, 37, 1-8.

Gatica, M. C., Monti, G., Gallo, C., Knowles, T. G. & Warriss, P. D., 2008, Effects of well-boat transportation on the muscle pH and onset of rigor mortis in Atlantic salmon. *The Veterinary Record*, 163(4), 111-116.

Giménez, B., Roncalés, P. & Beltrán, J. A., 2002, Modified atmosphere packaging of filleted rainbow trout. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(10), 1154-1159.

Haghparast, S., Kashiri, H., Shabanpour, B. & Pahlavani, M. H., 2010, Antioxidant properties of sodium acetate, sodium citrate and sodium lactate on lipid oxidation in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) sticks during refrigerated storage (4°C). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 9(1), 73-86.

Hassoun, A. & Çoban, Ö. E., 2017, Essential oils for antimicrobial and antioxidant applications in fish and other seafood products. *Trends in Food Science and Technology*, 68, 26-36.

Kaewklom, S., Lumlert, S., Kraikul, W. & Aunpad, R., 2013, Control of *Listeria monocytogenes* on sliced bologna sausage using a novel bacteriocin, amysin, produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from Thai shrimp paste (Kapi). *Food Control*, 32(2), 552–557.

Kashiri, H., Haghparast, S. & Shabanpour, B., 2011, Effects of sodium salt solutions (sodium acetate, lactate and citrate) on physicochemical and sensory characteristics of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) fillets under refrigerated storage. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13(1), 89-98.

Kim, C. R., Hearnsberger, J. O., Vickery, A. P., White, C. H. & Marshall, D. L., 1995, Extending shelf life of refrigerated catfish fillets using sodium acetate and monopotassium phosphate. *Journal of Food Preservation*, 58(6), 644–647.

Lakshmanan, P. T., 2000, Fish spoilage and quality assessment. In T. S. G. Iyer, M. K. Kandoran, Mary Thomas, and P. T. Mathew (Eds.), Quality assurance in seafood processing. Cochin: Society Fisheries Technology, India, 26–40.

Moghadam, M. S., Ebrahimipour, G., Abtahi, B., Ghassempour, A. & Hashtroudi, M. S., 2014, Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 12(1), 114.

Muratore, G. & Licciredello, F., 2005, Effect of vacuum and modified atmosphere packaging on the shelf life of liquid-smoked swordfish (*Xiphias gladius*) slices. *Journal of Food Science*, 70(5), C359-C363.

Namulema, A., Muyonga, J. H. & Kaaya, A. N., 1999, Quality deterioration in frozen Nile perch (*Lates niloticus*) stored at –13 and –27˚C. *Food Research International*, 32(2), 151-156.

Nishimoto, J., Suwetja, I. K. & Miki, H., 1985, Estimation of keeping freshness period and practical storage life of mackerel muscle during storage at low temperatures. *Memoirs of the Faculty of fisheries Kagoshima University*, 34(1), 89–96.

Özyurt, G., Kuley, E., Özkütük, S. & Özogul, F., 2009, Sensory, microbiological and chemical assessment of the freshness of red mullet (*Mullus barbatus*) and goldband goatfish (*Upeneus moluccensis*) during storage in ice. *Food Chemistry*, 114, 505-510.

Pacheco-Aguilar, R., Lugo-Sánchez, M .E. & Robles-Burgueño, M. R., 2000, Postmortem Biochemical and Functional Characteristic of Monterey Sardine Muscle Stored at 0 °C. *Journal of Food Science*, 65(1), 40- 47.

Roomiani, L., Soltani, M., Basti, A. A. & Mahmoodi, A., 2017, Effect of *Rosmarinus officinalis* Essential Oil and Nisin on *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae* in a Food Model System. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 26(10), 1189-1198.

Sallam, K. I., 2007, Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Food control*, 18(5), 566-575.

Sant'Anna, V., Quadros, D. A. F., Motta, A. S. & Brandelli, A., 2014, Antibacterial activity of bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* in chicken sausage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(4), 1163-1167.

Schillinger, U., Geisen, R. & Holzapfel, W. H., 1996, Potential antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends in Food Science and Technology*, 7(5), 158-164.

Sharifian, S., Alizadeh, E., Mortazavi, M. S. & Moghadam, M. S., 2014, Effects of refrigerated storage on the microstructure and quality of Grouper (*Epinephelus coioides*) fillets. *Journal of Food Science and Technology*, 51(5), 929-935.

Sikorski, Z. E., Kolakowska, A. & Pan, B. S., 1990, The nutritive composition of the major groups of marine food organisms. In: Seafood: Resources, Nutritional Composition and Preservation, Sikorski, Z. E. (Ed.) CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 29-54.

Vongsawasdi, P., Nopharatana, M., Supanivatin, P. & Promchana, M., 2012, Effect of nisin on the Survival of *Staphylococcus aureus* inoculated in fish balls. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 5(01), 52-60.

Wu, X. & Su, Y., 2014, Growth of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin production in pre-cooked tuna meat. *Food Control*, 42, 63-70.

Zhuang, R. Y., Huang, Y. W. & Beuchat, L. R., 1996, Quality changes during refrigerated storage of packaged shrimp and catfish fillets treated with sodium acetate, sodium lactate or propyl gallate. *Journal of Food Science*, 61(1), 241-244.

Zhao, X., Shi, C., Meng, R., Liu, Z., Huang, Y., Zhao, Z. & Guo, N., 2016, Effect of nisin and perilla oil combination against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in milk. *Journal of Food Science and Technology*, 53(6), 2644-2653.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 14, No. 5, Dec- Jan 2019, p. 803-815

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 14، شماره 5، آذر- دی 1397، ص.815- 803

Evaluation of the effect of nisin, sodium acetate and temperature on the quality of *Ctenopharyngodon idella* fillet inoculated with *Staphylococcus aureus*

N. Cheraghi[1], E. Alizadeh doughikollaee[*2], M. Shahriari Moghadam [3]

Received: 2017.12.01
Accepted: 2018.07.07

Introduction: Recently, the high nutritional value of fish and other seafood has caused continuously increasing their consumption in human diet. The meat quality can be decreased during storage due to physical, chemical and microbial changes. Thus, the different methods of preservation should be used to improve the quality and increase the shelf-life of the product. The application of bacteriocinins has been increased to extend the shelflife of food products. Nisin is a kind of bacteriocinins that is produced by *Lactococcus lactis* bacteria and used as food preservatives. It is accepted such as food additive in many food commodities. Bacteriocinins showed synergistic effects when they used with other antibacterial compounds such as natural preservatives and phenolic compounds. Literature review showed that the antibacterial compounds such as sodium acetate play an important role in preventing the growth of bacteria and increasing the shelf life of fish during different storage conditions. Conventional optimization procedures are performed by altering one parameter at a time and keeping all other parameters at fixed levels. However, these procedures are time consuming and require more experimental data sets. Recently, the use of an orthogonal array approach called 'Taguchi method' has been successfully examined in the different field of sciences. Therefore the aim of this research was to investigate the effects of nisin, sodium acetate and temperature on the growth of *Staphylococcus aureus* in *Ctenopharyngodon idella* fillet using Taguchi experimental design with an array $L_4(2^3)$.

Materials and methods: The fresh *Ctenopharyngodon idella* with weight of 1 kg were purchased from market (Zabol, South east of Iran) and transported in isothermal iceboxes to the fish product processing laboratory at University of Zabol in 2016. The fishes were cleaned and filleted. Fillets after inoculated with *Staphylococcus aureus* (10^3 Log CFU/g) and added nisin (750 and 1000 IU/g) and sodium acetate (1 and 2 %) were stored in different temperatures (4 and 8 °C). Chemical parameters (pH, PV, TBA and TVB-N) and *Staphylococcus aureus* count were measured at 0, 3, 6 and 9 days. Microscopic analysis was used to observe the microstructure changes at end of storage. The experiments were performed in three replicates.

Results & discussion: The present study showed that the lowest and highest *Staphylococcus aureus* growth was observed in treatment 2 (sodium acetate 2%, nisin 750 IU/g, temperature 4°C) and control at 4 and 8° C, respectively. It is noticeable that the growth of *Staphylococcus aureus* decreased in treatment 3 (sodium acetate 2%, nisin 1000 IU/g, temperature 8° C) during storage at 8° C. Also, the results showed that the temperature was most important factor on the growth of *Staphylococcus aureus* in the beginning of experiment and the other factors showed their effect during storage. Therefore, the highest and lowest effect was related to temperature and nisin at the end of experiment, respectively. In the present study, the additives could be prevented the growth of bacteria with except in treatment 4 (sodium acetate 1%, nisin 750 IU/g, temperature 8° C). The inhibitory effects of nisin and sodium acetate on the growth of *Staphylococcus aureus* was better shown with increasing storage time. The TVB-N of fillets increased during storage but this increase was lower in treatment 2 than the other treatments. The temperature and nisin had a significant effect ($p < 0.05$) on the TVB-N of fillets at the end of experiment. The PV value was lower in all treatments at the beginning of experiment and gradually increased in fillets with increasing storage time. The highest and lowest of PV value was observed in treatment 4 (sodium acetate 1%, nisin 750 IU/g, temperature 8° C) and treatment 2 (sodium acetate 2%, nisin 750 IU/g, temperature 4°C) respectively. The PV value of all treatments was lower than the acceptable level (5 meq O_2/kg lipid) of fresh fillets at the end of storage. The temperature had more effect on the PV value between the

1. MSc. in Fish product processing, Faculty of Natural Resources, University of Zabol
2. Associate Prof, Faculty of Natural Resources, University of Zabol. Email:
3. Assistant Prof, Faculty of Natural Resources, University of Zabol
(*Corresponding Author Email: alizadeh@uoz.ac.ir)

other factors. So that the PV value increase with increasing of temperature. The TBA value increased in all treatments during storage but this increase was higher in treatments 3 and 4 than the treatments 1 and 2. Thus, these treatments were more than the acceptable level at the end of storage. The pH of treatments gradually decreased during storage. This process has been visible from 24 to 144 hours of storage. After this time the pH increases in all treatments except treatment 2. The microstructure of *Ctenopharyngodon idella* showed that the muscle fibers of control were relatively uniform and regular shapes of the cross-section. But the increase extra-cellular space and fibre shrinking were observed in treated samples at the end of storage in comparison to control. These changes were higher in the samples stored at 8° C than 4° C. The results of this research showed that the treatment contain nisin (750 IU/g), sodium acetate (2%) and temperature (4°C) was more efficacy during storage of *Ctenopharyngodon idella* fillet whereas Taguchi experimental design was propose nisin (1000 IU/g), sodium acetate (2%) and temperature (4°C) for best condition of storage.

Keywords: Nisin, Sodium acetate, Microstructure, *Staphylococcus aureus*, Taguchi experimental