مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال سوم، شماره چهارم، پیاپی دوازدهم، بهار ۱۳۹۴ (۶۵-۵۳)

تأثیر یخ ازنه بر افزایش ماندگاری قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) صید شده به روش غیرمنجمد

مریم لاریجانی[۱]، سید حسین خبازی خادر[۲]، محمدجواد یوسف‌نژاد[۳*]، زهره رحیمی کلاته[٤]
۱. استادیار ، دانشکده علوم محیط زیست، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۲. دکتری الکترومغناطیس، دانشگاه MIT آمریکا، معاونت پژوهشی و فناوری، شرکت تحقیقاتی مهندسی افرا صنعت کیمیا، مشهد، ایران
۳. کارشناسی ارشد محیط زیست، دانشکده علوم محیط زیست، دانشگاه پیام نور تهران، ایران
٤. کارشناس شیمی محض ،دانشکده شیمی، دانشگاه فردوسی مشهد،ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۱ - تاریخ تصویب: ۱۳۹٤/۳/۱۹)

چکیده
گوشت آبزیان علاوه بر ارزش غذایی بالا، فسادپذیری بالایی هم دارد. به همین خاطر بهبود کیفیت و افزایش زمان بازماندگی گوشت ماهی بسیار اهمیت دارد. لذا در این پژوهش سعی بر آن بود تا با یخ ازنه میزان ماندگاری و کیفیت گوشت بالا رود. ابتدا تعدادی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن ۱۰±۳۰۰ خریداری گردید و بلافاصله به آزمایشگاه ایران واقع در مشهد انتقال یافت. ماهیان به چهار گروه شاهد (A)، دوز ۳ گرم ازن (B) و ٤ گرم ازن (C) و ۵ گرم ازن به همراه آب نمک ۵٪ (D) در ۵۰ کیلو یخ تیمار گردیدند. روزانه تا روز دوازدهم میزان فساد بر اساس جدول WHO به دست آمد. همچنین نمونه‌گیری بافت پوست و گوشت و آبشش یک روز در میان تا روز دوازدهم برای بررسی میکروبی توسط محیط کشت (PCA) کشت و شمارش گردید و میزان هیستامین، پراکسید (PV) و TVN[۱] به دست آمد. نتایج حاصل نشان داد که نمونه A (شاهد) بیشترین فساد را داشته است و بیشترین تعداد باکتری را به صورت معنی‌داری در سطح و عمق بافت در روزهای دهم را داشته است (P<۰/۰۵). مقادیر پراکسید و TVN در نمونه ماهی های B کمتر بوده و نسبت به بقیه نمونه‌ها افزایش معنی‌داری نداشته (P<۰/۰۵) و تغییرات هیستامین در تمام نمونه‌ها معنی‌دار نبوده است (P<۰/۰۵). نمونه‌های با تیمار ازن کیفیت و طعم بهتری داشتند. بدین ترتیب می‌توان استنباط کرد، که یخ ازن ماده مؤثری برای افزایش ماندگاری آبزیان به شمار می‌آید.

واژه‌های کلیدی: یخ ازن، قزل‌آلای رنگین‌کمان، ماندگاری ماهی، فاکتورهای بیوشیمیایی.

The effect of ozone ice on increase shelf life of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (non-frozen)

M. Larijani[1], S. H. Khabbazi Khadar[2], M. J. Yousefnezhad[3]*, Z. Rahimi Kalate[4]
1. Assistant Professor, Faculty of Environment Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran
2. Ph.D. in Electromagnetism, Vice President of Research, Afra Sanat Kimia Research Engineering Company, Mashhad, Iran
3. M.Sc. Student of Environment, Faculty of Environment Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran
4: B.A in Chemistry, Technical Expert of Research, Afra Sanat Kimia Research Engineering Company, Mashhad, Iran
(Received: Feb. 20, 2015 - Accepted: Jun. 9, 2015)

Abstract
Fish meat has high nutritional value and putrescence. For this reason, it is very important increase the shelf life and fish meat quality. In this study tried to go up the shelf life and quality fish meat by ozon ice. The number of Rainbow trout with weight 300±10 purchased and transferred to the Mashhad laboratory (Iran) immediately. The fish was divided into four groups, control (A), dose of 3g (B) 4g (C) and 5g of ozone per 50 kg ice with the brine 5% (D). daily to the fourteenth day of corruption were used on the WHO chart. Moreover was sampled of skin and meat and gill tissue every day to the 12th day for check bacterial by (PCA) cultured and the amount of histamine (ELISA method), peroxide (PV) (Egan method) and TVN (Kldal distiller method), was obtained respectively. The results shown that A sample (control) had corrupted the most number of bacteria in depth and surface have existence ten days significantly (P <0.05). Amounts of peroxide and TVN in B sample lower than to the other fish samples and havnt increase significantly (P <0.05). Histamine changes was not significant in all samples (P <0.05) and all of the fishes ozone treated have better maintenace and quality. Thus we can infered that ozone is an effective mater to increase the durability of fish.

Keywords: Ozone ice, Rainbow trout, Shelf life, Biochemical factors.

* نویسنده مسئول: E-mail: javad4363@yahoo.com
1. Total Volatile Nitrogen

مقدمه

نیازهای تغذیه‌ای انسان، به خصوص نیاز به پروتئین حیوانی باعث شده است که انسان از دیر باز به پرورش دام، طیور و آبزیان همت گمارد. کیفیت برتر گوشت آبزیان از نظر تأمین اسید آمینه‌های ضروری، چربی‌ها، ویتامین‌ها، مواد معدنی و سایر مواد مغذی برای انسان، جایگاه ویژه‌ای به آبزیان درمقایسه با گوشت قرمز درتامین غذای سالم انسان داده است (Mumnasinghe *et al.*, 2005).

رشد اقتصادی و صنعتی و همچنین لزوم تغذیه جمعیت رو به افزایش و کیفیت برتر پروتئین آبزیان در مقایسه با سایر گوشت ها، موجب افزایش توجه به آبزیان و صید در دریاها و منابع آبی شده است. در این میان پرورش آبزیان با توجه به کیفیت بالای گوشت آنها و ارزش غذایی منحصر بفرد این محصولات از اهمیت به سزایی برخوردار بوده است.

ماهی منبع عمده پروتئین ماهیچه‌ای به شمار می‌رود که در مقایسه با سایر منابع پروتئین ماهیچه‌ای، ارزش غذایی بالاتری دارد. گزارش آبزی‌پروری جهان در سال ۲۰۱۰ نشان می دهد که تولید جهانی ماهی از طریق آبزی پروری بین سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۸ بیش از ۶۰ درصد رشد کرده و از ۳۲/۴ میلیون تن به ۵۲/۵ میلیون تن رسیده است و پیش بینی می شود در سال ۲۰۱۲ بیش از ۵۰ درصد مصرف ماهی جهان از طریق آبزی پروری تأمین شود (Eskash, 1991).

از این رو، یکی از دغدغه‌های تکنولوژی یافتن راهی مناسب برای تضمین حداکثر ماندگاری ماهی و سایر آبزیان طی حمل و نقل و البته استفاده از حداقل امکانات و مواد مصرفی می‌باشد. یکی از راه‌های حل این مشکل منجمد کردن ماهی در مکان صید و انتقال منجمد آن به سایر نقاط است با این حال ماهی منجمد شده کیفیت ماهی تازه را نداشته و از نظر ظاهری نیز باعث جلب رضایت مشتری نمی‌شود (Kharjzadeh, 2003). علاوه براین، آلودگی ثانوی هم باعث افزایش بار میکروبی آبزیان طی حمل و نقل می‌شود، که این موضوع هم کیفیت و سلامت این منبع غذائی را در خطر قرار می‌دهد. لذا روشی که بتواند ضمن افزایش ماندگاری ماهی تازه چه در مراکز فروش و توزیع و چه در جابه‌جایی ماهی‌ها سلامت ماهی‌ها را تضمین کند و باعث از بین بردن و کاهش بار آلودگی ماهی شود سبب عرضه بیشتر و تقاضای بالاتر ماهی در سبد کالای خرید خواهد شد. از این رو، نکته مهمی دیگری که نباید فراموش کرد این است که مشتریان همیشه رغبت به استفاده از ماهی تازه غیر منجمد دارند. به عنوان نمونه در ایران با توجه به ذائقه‌پسند بودن و استقبال مصرف‌کنندگان از قزل‌آلای رنگین‌کمان و پتانسیل‌های موجود، پرورش این گونه در طی سال‌های اخیر افزایش چشم گیری داشته است؛ و میزان تولید ماهی سرد آبی کشور از ۸۳۵ تن در سال ۱۳۷۲ به ۱۷۵/۵ میلیون قطعه در سال ۱۳۸۲ افزایش یافته است (Eskash, 1991). در حال حاضر سرانه مصرف ماهی در ایران ۷ کیلوگرم و در گیلان ۱۳کیلوگرم است؛ این در حالی که است که متوسط سرانه مصرف ماهی در جهان ۱۸ کیلوگرم اعلام شده است (Ritola *et al.*, 2000).

به دلیل اینکه ماهی یک ماده غذایی به شدت فاسد شدنی است، باید بلافاصله پس از صید اقدامات لازم برای پیشگیری از آلودگی‌های بعدی و فساد آن صورت گیرد یکی از راه‌های حل این مشکل منجمد کردن ماهی در مکان صید و انتقال ماهی منجمد به سایر نقاط است که در این وضعیت ماهی منجمد شده کیفیت ماهی تازه را نداشته و از نظر ظاهری مشتری پسند نمی‌باشد (Campos *et al.*, 2006; Vaz-Velho *et al.*, 2006). با وجود تغذیه جمعیت روبه افزایش آبزیان، شرایط و امکانات پرورش ماهی در همه جا وجود ندارد. لذا دراینجا با موضوع مهمی به نام حمل و نقل و جابجایی ماهی و سایر آبزیان صید شده به نقاط دور وجود دارد (Campos *et al.*, 2005).

ازن، گازی آبی رنگ با بویی تند و ناپایدار می‌باشد. ازن یک ماده ضدعفونی‌کننده مؤثر، جالب و

به مراتب بهتر از کلر، دی‌اکسید کلر، کلروآمین‌ها و رادیکال‌های هیدروکسیل می‌باشد و محصولات جانبی که در اثر ازناسیون آب ایجاد می‌شوند، در مقایسه با آنهایی که پس از کلراسیون به وجود می‌آیند، خطر کمتری دارد. می‌توان ازن را مکملی برای دستگاه‌های تولیدکننده Flake ice به حساب آورد به طوری که Flake ice به عنوان سردکننده سریع به همراه ازن نه تنها برای سردسازی فوری ماهی نقش مؤثری را ایفا می‌کند بلکه ازن همراه آن سبب می‌گردد که همواره ماهی به صورت تازه باقی مانده و هیچ‌گونه اثر سوئی بر جای نمی‌گذارد (Rodríguez *et al.*, 2006). در عمل‌آوری محصولات دریائی نظیر ماهی و میگو با استفاده از روش Flake ice & Ozone می‌توان مدت جمود نعشی ماهی را طولانی‌تر در نظر گرفت، به طوری که یکی از تجارب به دست آمده بر روی یکسری از گونه‌های ماهی نشان داده است که راندمان حفظ نگهداری ماهی در یخ آبکی ازن زنی شده نسبت به نگهداری ماهی در یخ آبکی بدون حضور ازن دو برابر شده است (Piñeiro *et al.*, 2004). این افزایش ماندگاری در مورد ماهیان کوچک‌تر که فسادپذیری بیشتری نسبت به ماهیان بزرگ‌تر دارند، بدیهی است که از اهمیت بیشتری برخوردار است. با توجه به اهمیت این موضوع در کشورهای اروپایی و شناخته شدن قدرت گندزدایی ازن و کاربردهای بی‌شماری که این ماده دارد، استفاده از این ماده در جوامع اروپایی رو به گسترش است. به طوریکه این روش سبب کاهش فساد ماهی گردیده است.

علاوه بر این بررسی‌های صورت گرفته حاکی از آن است که محصول نگهداری شده در یخ بدون حضور ازن از حیث کیفیت و تازگی تفاوت قابل ملاحظه‌ای با محصول حاصل از یخ ازن زنی شده دارد، به طوری که ازن نه تنها شرایط ماندگاری را طولانی می‌کند، بلکه با تبدیل شدن به اکسیژن طراوت و تازگی ماهی صید شده را نیز حفظ می‌کند (Aubourg *et al.*, 2009; Fei *et al.*, 2012). نمونه‌های تحقیقاتی انجام شده نشان می‌دهد که ماهی در شرایط یخ ازنه عمر مفیدتری داشته است، در همین راستا، اتحادیه تحقیقاتی آبزیان در آرژانتین به نتایج سودمندی دست یافته‌اند (Rice & Wrenn, 2007). در ایران نیز استفاده از ازن در افزایش ماندگاری و گند زدایی سابقه چندانی ندارد و در این پژوهش ماندگاری ماهی بر اساس اندازه‌گیری‌های مختلف باکتریایی، هیستامین، پراکسیداتیو و TVN[1] و درجه فساد در سطح و بافت‌های ماهی به عمل آمد و همچنین خواص اکسیداتیو ازن بر اثر حبس در یخ و اثرات سوء ازن بر کیفیت گوشت، مقرون به صرفه بودن اقتصادی در دوزهای بالا، حفظ خواص شیمیایی ازن و حفظ طعم و بوی ماهی پس از پخت بررسی گردید (Schuur, 2003). لذا در این پژوهش سعی بر آن بوده تا با استفاده از یخ ازنه و اندازه گیری های مختلف شیمیایی و میکروبی بتوان زمان ماندگاری ماهی را بدون منجمد سازی سنجید.

مواد و روش‌ها

ماهی

به تعداد ۱۰۰عدد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن متوسط ۱۰±۳۰۰ گرم از منطقه اکبر قوچان خراسان شمالی به صورت زنده خریداری شد و بلافاصله به آزمایشگاه ایران واقع در مشهد منتقل گردید و در یونولیت و پوشش یخ آب بافاصله ۵ cm از یک دیگر قرار داده شد (Hosseini *et al.*, 2003).

فرآیند عملیاتی

ابتدا فرآیند تولید یخ ازنه با استفاده از دستگاه ازن ژنراتور، دستگاه اکسیژن ژنراتور، سیستم اختلاط، دستگاه اندازه‌گیری ازن محلول، دستگاه یخ‌ساز لحظه‌ای و بسته‌های نگهداری نمونه‌ها (شرایط نسبتاً

1. Total Volatile Nitrogen

عایق) انجام گردید و سپس ماهی‌های تازه صید شده به ۴ گروه مختلف A، B، C و D تقسیم شدند و به تعداد مساوی ۲۵ عدد ماهی در هر یونولیت نگهداری شدند.

نمونه A: نمونه شاهد که تنها در شرایط یخ آب نگهداری شد.

نمونه B: نمونه تحت تیمار ازن که ۲۵ عدد ماهی در معرض یخ ازنه قرار گرفتند. برای ۲۵ عدد ماهی حدود ۴/۵ الی ۵ کیلوگرم یخ ازنه تهیه شد (۳ گرم ازن در ۵۰ کیلو یخ). تزریق ازن در آب با استفاده از سیستم ازن ژنراتور با ظرفیت مشخص و در مدت زمان ۳۰ دقیقه انجام شد.

نمونه‌های C: این نمونه‌ها نیز در شرایط تحت تیمار با ازن قرار گرفتند با دوز ۴ گرم ازن در ۵۰ کیلوگرم یخ به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. برای تهیه یخ از دستگاه یخ‌ساز و قالب‌های درب‌دار استفاده و در بستر ماهی قرار می گرفتند.

نمونه‌های D: در شرایط تحت تیمار با ازن قرار گرفتند با این تفاوت که از ازن با دوز بالاتر (۵ گرم ازن در ۵۰ کیلوگرم یخ) جهت تولید یخ ازنه استفاده شد. تفاوت دیگر بین نمونه‌های C و D، نوع آب مورد استفاده بود که در نمونه D از آب نمک ۵٪ استفاده شد.

نمونه‌گیری

نمونه‌گیری در روز صفر (۵ نمونه) و روزهای ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ به تعداد سه ماهی (۳ تکرار) از هر یونولیت برداشته شد، و برای آنالیز شیمیایی و میکروبی از بافت‌های گوشت، پوست و آبشش نمونه‌گیری صورت گرفت، همچنین فرآیند فساد ماهیان ثبت و مورد آنالیز آماری قرار گرفت.

شرایط کنترل محیطی

بستر ماهی تقریباً روزانه توسط یخ‌های جدید تعویض تا دمای بدن ماهی‌ها از $3^{\circ C}$ بالاتر نرود، در حالی که دمای هوای آزمایشگاه در حدود $15^{\circ C}$ بود. برای حفظ و نگهداری ماهی‌ها، بسترهای ماهی از یونولیت‌های یک اندازه به حجم ۲۵×۴۵×۳۵ سانتیمتر استفاده شد. یکی از تفاوت‌های فرآیند تولید یخ ازناید به روش صنعتی تولید سریع یخ ازنه بود. در صورتی که بتوان شرایطی را ایجاد نمود تا آب ازنه در کوتاه ترین زمان ممکن و کمتر از گذشت چند ثانیه منجمد شود، قابلیت کنترل ازن و دوز آن قابل پیش بینی است و اثر ضدعفونی کنندگی ازن کاملاً مشهود است (Connell, 2001).

شرایط کنترل کیفی

ماهی‌ها به طور روزانه توسط کارشناس معرفی شده اداره شیلات استان خراسان رضوی مورد بررسی قرار می‌گرفت. جهت بررسی و امتیازبندی به ماهی از جدول استاندارد جهانی WHO استفاده شد و ماهی‌ها در چهار گروه، از نظر کیفیت گوشت، پوست، آبشش، چشم و بوی آنها رده‌بندی شده و به آنها امتیاز داده می‌شد (Connell, 2001).

نتایج به دست آمده در جدول‌های جداگانه ثبت و توسط دو نرم‌افزار Excel 2010 و Spss 16 مورد آنالیز آماری قرار گرفتند.

در بازه آزمایشی، از هر یک از نمونه‌های آزمایشی یک نمونه انتخاب و در شرایط یکسان طبخ گردید و روزهای انتخابی جهت طبخ ماهی روز صفر، چهارم و هشتم از روزهای آزمایش بود که نتایج به صورت پرسش و پاسخ به تعداد بیش از ۱۰ نفر زن و مرد در سنین مختلف و دادن امتیاز جمع‌بندی شد و توسط نمودارهای فراوانی طعم، بو، نرمی و سفیدی مورد آنالیز قرار گرفت.

شرایط کنترل شیمیایی و میکروبی

از هر یک از گروه‌ها یک نمونه بافت ماهیچه‌ای ماهی با فاصله زمانی یک روز انتخاب و جهت اندازه‌گیری هیستامین پراکسید، TVN[1] (میزان ازت

1. Total Volatila Nitrogen

کل فرار) و بار میکروبی (سطحی و عمقی) در آزمایشگاه ایران مشهد صورت گرفت و تغییرات ایجاد شده اندازه‌گیری شد (Connell, 2001).
مراحل عملی به شرح زیر می باشد:

الف) آماده‌سازی نمونه‌ها

۵۰ گرم از آبشش، پوست و گوشت نواحی مختلف بدن هر نمونه ماهی قزل‌آلا برداشت شده و به آن ۵۰ml آب مقطر اضافه شد و با دستگاه هموژنیزاتور یکنواخت گردید. سپس ۱ml از محلول حاصل تحت دمای حرارت اتاق ($۲۰-۲۵^{oC}$) به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ میزان ۲۰µl از بخش میانی لوله برداشت شد و در ۱۰ml آب مقطر رقیق گردید (Kuda *et al.*, 2007).

ب) آسیلاسیون

جهت اندازه‌گیری میزان هیستامین در نمونه‌ها از کیت تجاری الایزا (روش رقابتی) RIDA SCREEN HISTAMIN شرکت (R-Biofarm) استفاده شد. ابتدا میزان ۱۰۰ml از محلول رقیق شده در پلیت مخصوص آسیلاسیون (حاوی ۹۶ چاهک) موجود در کیت ریخته شد و طبق دستورالعمل کیت، آزمایش انجام گرفت. بدین منظور بافر شست و شو که به میزان ۱۰ برابر تغلیظ شده بود در دمای اتاق به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر رقیق گردید. سپس معرف لیوفیلیزه آسیلاسیون با ۱ml رقیق کننده آسیلاسیون مخلوط شد، پس از آن ابتدا محلول استاندارد کنترل و نمونه‌های آماده شده ۱۰۰µl سپس معرف آسیلاسیون ۲۵µl و در نهایت بافر آسیلاسیون ۲۰۰µl به چاهک ها اضافه شد و طی ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت . جهت آزمون الایزا ۲۵µl از محتوی هر چاهک برداشته شد (Mashak *et al.*, 2011).

ج) آزمون الایزا (Enzyme Immunoassay)

اصول کیت الایزای رقابتی استیل-N بر اساس رقابت هیستامین جداسازی شده از نمونه و هیستامین متصل به پلیت میکروتیتر (Micro-Well) به چاهک‌های اتصال به آنتی‌بادی ضد هیستامین است. محلول مذکور پس از مجاور شدن با آنتی‌بادی‌های ثانویه نشان‌دار با پراکسیداز، شست و شو شد. بنابراین در نمونه‌هایی که میزان هیستامین بالا است آنتی‌بادی بیشتر به هیستامین مورد آزمایش متصل می‌شود و مقدار کمتری از آن به سطح چاهک می‌چسبد و در نهایت بر اثر واکنش با آنزیم پراکسید و معرف رنگ‌زا، جذب نوری معکوسی با غلظت هیستامین در نمونه خواهد داشت. بنابراین مراحل زیر بر پلیت صورت گرفت (Mashak *et al.*, 20011). این مراحل به شرح زیر می باشد:

- افزودن محلول‌های استاندارد، کنترل و نمونه‌های آسیله شده به هر چاهک ۲۵µl
- مجاور کردن با آنتی‌هیستامین در دمای اتاق به مدت ۴۰ دقیقه ۱۰۰µl
- خالی کردن چاهک‌ها و دو بار شست و شو با بافر ۲۵۰µl
- مجاور کردن با محلول آنتی‌بادی ضدآنتی‌بادی انسانی
- اتصال به آنزیم پراکسیداز به مدت ۲۰ دقیقه ۱۰۰µl
- خالی کردن چاهک‌ها و دو بار شست و شو با بافر ۲۵۰µl
- مجاور کردن با محلول سوبسترای رنگ‌زا
- اضافه نمودن پراکسید اوره و تترا متیل بنزیدین ۱۰۰µl (دردمای اتاق و دور از نور به مدت ۱۵ دقیقه)
- مجاور کردن با محلول متوقف‌کننده واکنش (Stop solution) ۱۰۰µl به مدت ۱۰ دقیقه
- قرائت جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰ nm در برابر بلانک هوا (Mashak *et al.*, 20011).

د) آزمون میکروبی

شمارش باکتری‌ها از محلول یکنواخت شده نمونه‌های ماهی با تهیه رقت‌های متوالی از آن، با استفاده از محلول پپتون و اتر و سپس کشت سطحی بر ۳۵^{oC} روی پلیت کانت آگار (PCA) و نگهداری در دو دمای ۲۵ و به مدت ۳ روز انجام گرفت (Harrigan, 1998).

هـ) آزمون TVN

به بالن تقطیر کلدال ۱۰ گرم از نمونه گوشت، ۲ گرم اکسید منیزیم و ۳۰۰ میلی‌لیتر آب و چند قطعه سنگ جوش اضافه شد. سپس در یک ارلن مایر بظرفیت ۵۰۰ تا ۷۰۰ سانتی‌متر مکعب که به عنوان ظرف گیرنده زیر قسمت سردکننده دستگاه تقطیر قرار می‌گیرد ۲۵ سانتی‌متر مکعب از محلول ۲ درصد اسید بوریک و چند قطره معرف متیل قرمز اضافه شد. دستگاه تقطیر را وصل کرده و محتوی بالن تقطیر را حرارت داده شد. به طوری که در مدت ۱۰ دقیقه به جوش آمد و باهمین مقدار حرارت مدت ۲۵ دقیقه عمل تقطیر صورت گرفت. پس از آن حرارت را قطع کرده داخل سرد کننده را با آب مقطر شسته شد و محلول تقطیر شده را بوسیله اسیدسولفوریک ۰/۱ نرمال تیتره شد (Salimi, 2012).

و) میزان پراکسید گوشت ماهی

میزان پراکسید به روش Egan *et al.* (1997) تعیین و به صورت میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم چربی بیان شد (Egan *et al.*, 1997, Khorramgah & Rezaei, 2012).

ی) تحلیل آماری داده‌ها

جهت تجزیه و تحلیل آماری در این مطالعه، داده‌ها با نرم‌افزار Excel 2010 و Spss16 و استفاده از برنامه ویندوز انجام شد و شاخص‌های مرکزی و پراکندگی و میزان همبستگی میزان هیستامین و شمارش باکتریایی میزان پراکسید و TVN در تمام نمونه ماهی مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

نتایج به دست آمده از آنالیز کیفی، ماهی‌ها را مطابق با آنالیز Tukey به دو دسته یک و دو تقسیم‌بندی کرد. در دسته بندی اول نمونه A و C در یک گروه و در دسته بندی دوم نمونه B، C وD در گروه دیگر قرار گرفت. در این دسته‌بندی و مقایسه صورت گرفته هر یک از نمونه‌ها با سه نمونه دیگر، تفاوت بین نمونه A با سه نمونه B، C و D قابل ملاحظه است. این تفاوت با استفاده از گراف‌های ترسیم شده نیز قابل بررسی و توجیح است. همچنین داده‌ها را با استفاده از آنالیز NP/K Independent Test نیز تحلیل کرده و P Value آن محاسبه شد. عدد محاسبه شده در مرحله اول بین چهار گروه ماهی‌ها ۰/۶۸ می‌باشد. این عدد در طبقه بالاتر از ۰/۵ نشان‌دهنده معنادار بودن داده‌ها می‌باشد.

P Value سه نمونه ماهی B، C و D نیز محاسبه شد. طی این محاسبه، عدد به دست آمده ۰/۸۷ اندازه‌گیری شد که نشان‌دهنده این است که بین سه گروه رابطه معنادار وجود دارد.

در بین چهار گروه، جمعیت ماهی‌ها با شناسه B، تا آخرین روز آزمایش و تست، در مقایسه با نمونه‌های دیگر بهترین کیفیت را داشته و از نظر ظاهری و تطابق با استاندارد WHO بیشترین و بالاترین امتیاز را به خود اختصاص دادند (جدول ۱ و نمودار ۱).

اندازه‌گیری بار میکروبی ماهی و مقدار آنها، طی سه آزمون میکروبی تعیین شد. یکی از آزمون‌ها اندازه‌گیری مقدار کلیفرم‌ها در هر گرم از بدن ماهی بود، دو آزمون دیگر جهت اندازه‌گیری بار میکروبی از سطح بیرونی بدن ماهی و سطح داخلی بدن ماهی (گوشت ماهی) برداشت و کشت داده شد. این آزمون‌ها با هدف مقدار بار میکروبی ماهی‌ها و اثر ازن در کاهش مقدار بار میکروبی بدن ماهی صورت گرفت. در این اندازه‌گیری، با توجه به داده‌های به دست آمده روند ثابت افزایشی و یا کاهشی مشاهده نمی‌شد و پراکندگی داده‌ها به نسبت وجود داشت. در اندازه‌گیری‌های انجام شده بر روی نمونه A به دلیل فساد کامل ماهی‌ها، ۶ مرتبه هر یک از پارامترهای میکروبی و شیمیایی اندازه‌گیری شد، در حالی که سایر نمونه‌ها ۷ مرتبه مورد آزمون قرار گرفتند (نمودارهای ۲، ۳ و ۴).

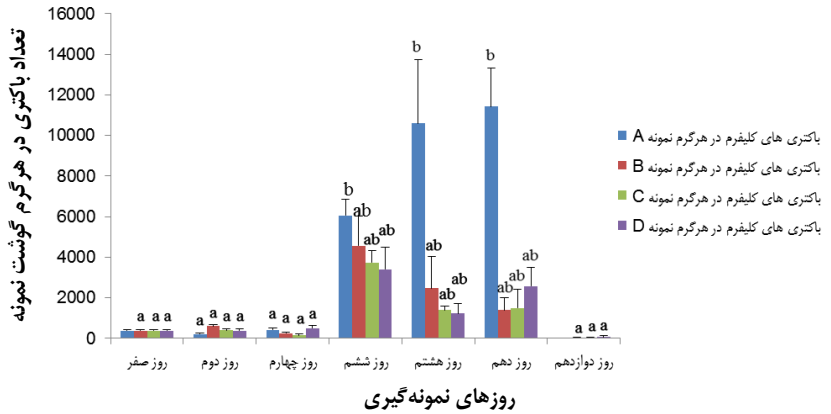
جدول ۱. مشخصات کیفی ماهی بر اساس منحنی جهانی WHO به صورت روزانه

امتیاز کیفی	درجه یک (۸–۱۰)	درجه دو (۸–۶)	درجه سه (۱–۴)	درجه چهار (فاسد)
پوست (ظاهری)	رنگ روشن–درخشان– پیگمان‌های بدون رنگ پریدگی و دارای رنگ طبیعی دارای موکوس شفاف، فلس‌ها کامل	پیگمان‌های روشن، بدون درخشندگی، مقدار کمی موکوس روی پوست، شفافیت کمتر، قسمت‌های کوچکی بدون فلس	پیگمان‌ها در حالت از دست دادن رنگ، مخاط شیری کدر روی پوست، قسمت‌های بیشتر بدن بدون فلس	پیگمان‌های رنگی دیده نمی‌شود، مخاط کاملاً کدر گردیده‌اند ـ از بین رفتن فلس‌ها به تعداد زیاد
چشم‌ها	محدب و برآمده، قرنیه روشن دارای مردمک زلال مشکی	کاهش تحدب چشم‌ها، رنگ مشکی و مردمک کاهش یافته و قرنیه کمی روشن است	چشم صاف و مسطح دارای مردمک قرنیه کور	عدسی در وسط قرار گرفته، قرنیه شیری، مردمک خاکستری رنگ
آبشش (رنگ)	روشن بدون مخاط	مقداری مخاط روشن ظاهر گردیده است	درحال رنگ پریدگی بی رنگ شدن دارای مخاط کور	بسیار نرم و یا پاره شده به رنگ کدر
آبشش (بو)	دارای بوی جلبک دریایی	بی‌بو، از دست رفتن بوی طبیعی	بوی ترشیدگی ضعیف	بوی ترشیدگی آمونیاک و گندیدگی
گوشت	دارای بافت سفت و محکم، حالت ارتجاعی شدید، ظاهری صاف بدون لکه های نرم	بافت سفت، کاهش حالت ارتجاعی، یک یا دو لکه نرم ممکن دیده شود.	بافت کمی سفت، تا حدودی نرم، حالت ارتجاعی خیلی کم، صافی خود را تا حدی از دست داده و چند لکه نرم	بافت نرم، بدون حالت ارتجاعی، ظاهری نسبتاً چروکیده، متخلخل آثار انگل بیماری در گوشت مشهود است

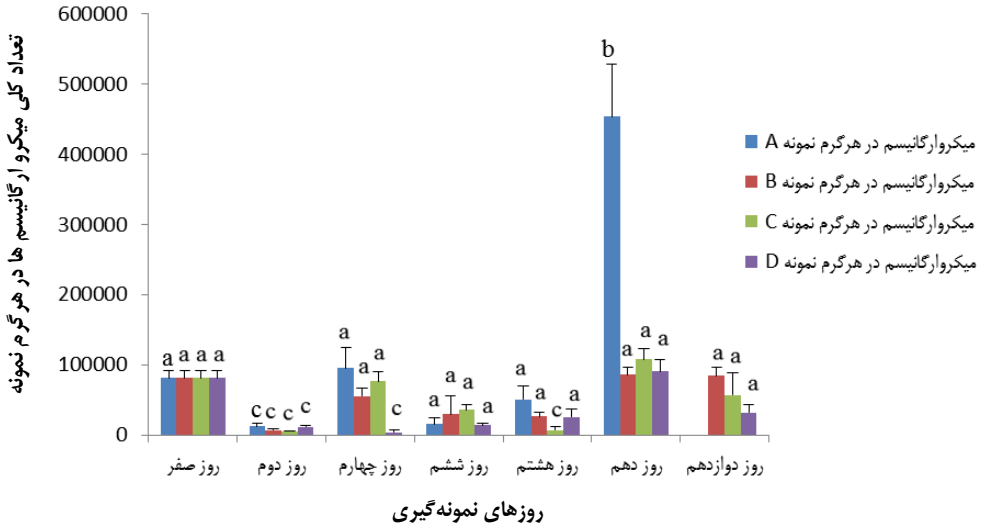
شکل ۱. درجه فساد با توجه به استاندارد WHO از روز صفر تا روز دوازدهم ماهی قزل آلای رنگین کمان بر اساس نمودار بالا به دست آمد و نمره ۱۰ بالاترین کیفیت و ۱ کمترین میزان کیفیت و بیشترین فساد می باشد، که در این آزمایش گروه شاهد نسبت به تیمار ازن بیشترین فساد را داشتند (نمره ۱۰ کمترین فساد و بالاترین کیفیت و نمره ۱ بیشترین فساد و کمترین کیفیت).

جدول ۲. میانگین (حاصل ده نفر از افراد مرد و زن) داده های طبخ ماهیان در روزهای مختلف، که نمونه شاهد بدترین طعم را داشته است. (نمره ۱۰ بالاترین طعم و نمره صفر پایین ترین طعم)

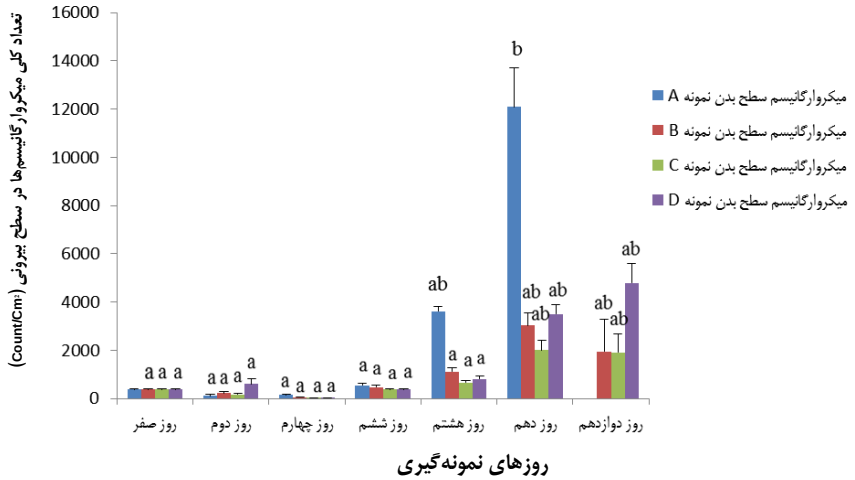
روزهای نمونه‌گیری / نمونه‌ها	روز صفر	روز دوم	روز چهارم	روز ششم	روز هشتم	روز دهم	روز دوازدهم
نمونه شاهد	۱۰	۸/۷۵	۶/۹۶	۵/۲۵	۲/۲۶	۰	۰
نمونه B	۱۰	۱۰	۹/۵۰	۸/۵۶	۶/۸۵	۵/۲۶	۴/۴۲
نمونه C	۱۰	۱۰	۹/۳۵	۸/۸۲	۷/۵۶	۵/۸۶	۴/۵۲
نمونه D	۱۰	۱۰	۹/۵۵	۸/۹۵	۷/۲۳	۶/۴۸	۵/۲۳



نمودار ۲. نمودار به دست آمده از لحاظ میکروبی (کلیفرم) (نمونه A= نمونه کنترل)، که گروه کنترل در روزهای ۶، ۸ و ۱۰ معنی‌دار می‌باشد و بیشترین میزان باکتری در هر گرم نمونه بافت عضلانی ماهی قزل‌آلا می‌باشد.

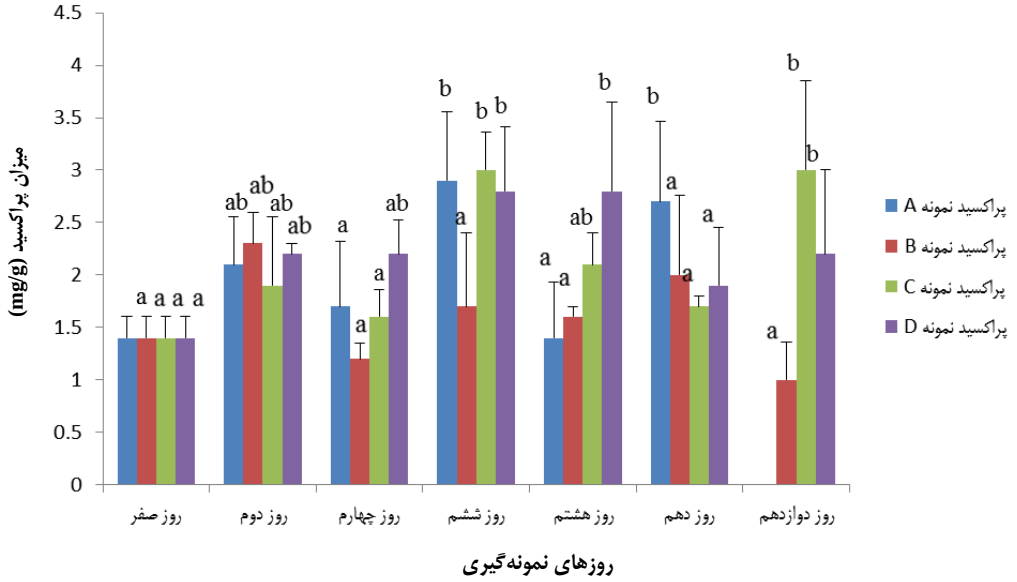


نمودار۳. نتایج بدست آمده از آزمایش میکروبی در هر گرم گوشت ماهی قزل‌آلا، که در روز دهم نمونه شاهد معنی‌دار بوده و بیشترین میزان می باشد. و یک کاهش معنی‌دار در روز دوم در تمام نمونه‌ها مشاهده می‌گردد.

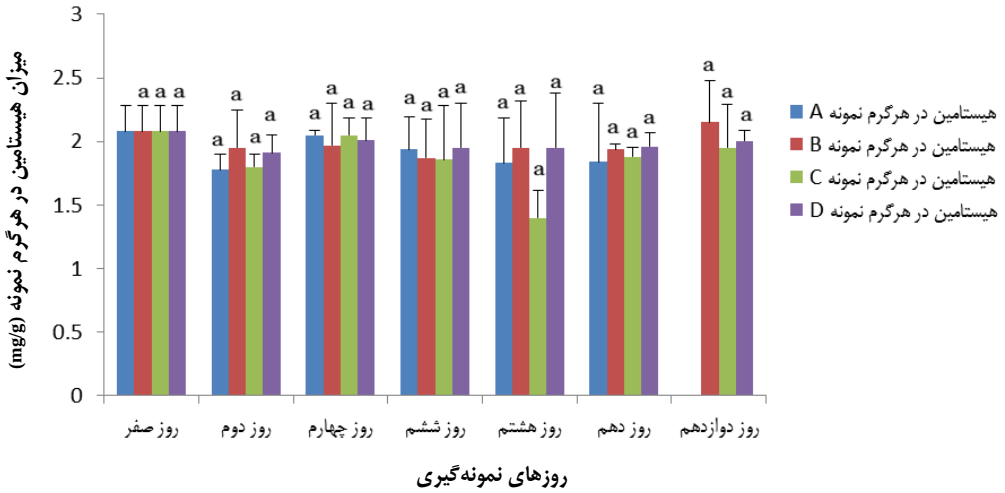


نمودار ٤. تعداد کلی میکروارگانیسم‌ها در سطح بیرونی ماهی در هر سانتی‌مترمربع که در روز دهم نمونه شاهد به شدت تعداد میکروارگانیسم‌های آن افزایش معنی‌داری داشته است.

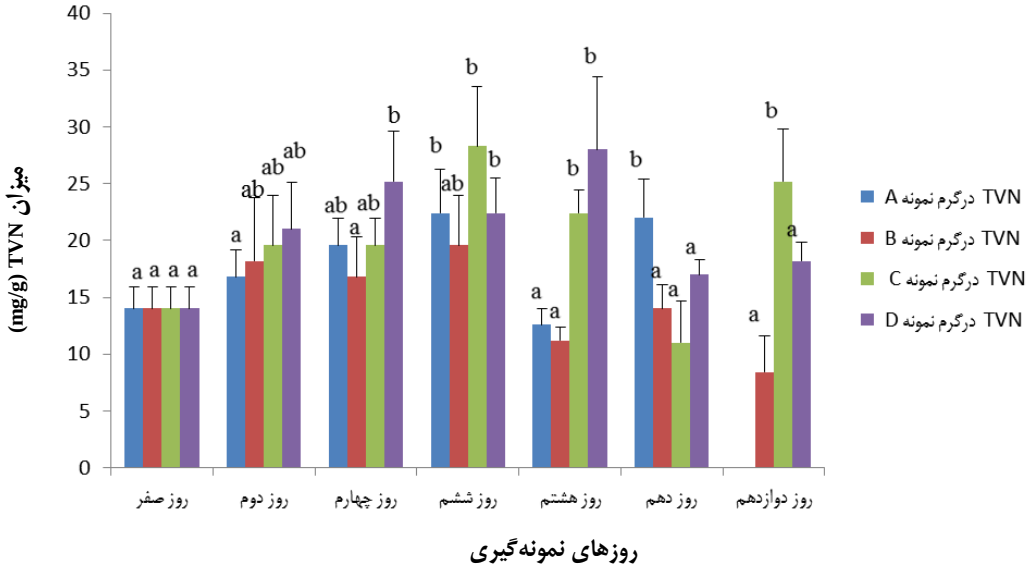
سه پارامتر شیمیایی TVN و پراکسید و هیستامین اندازه‌گیری و مقدار آنها به دست آمد. مطابق با داده‌های به دست آمده، با استفاده از نرم‌افزار 16 SPSS، آنالیز ناپارامتری و آنالیز تقریبی بر روی داده‌ها صورت گرفت. مقدار P Value محاسبه شده در هریک از پارامترهای اندازه‌گیری شده، نشان از معنادار نبودن داده‌ها و پراکندگی داده‌ها می‌باشد (شکل‌های ۵، ۶ و ۷).



نمودار ۵. میزان پراکسید در نمونه‌ها تا روز چهاردهم که نمونه B به صورت کمترین میزان می‌باشد و نمونه‌های شاهد در روزهای ششم و دهم افزایش معنی‌داری داشته است و نمونه‌های C روزهای ششم و هشتم و دوازدهم و نمونه‌های D در روزهای ششم و دوازدهم افزایش معنی‌دار داشته است.



نمودار ٦. میزان هیستامین در نمونه‌ها تا روز چهاردهم را نشان می دهد، که حد استاندارد آن ۲۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم گوشت می‌باشد. که نمونه B (۳ گرم ازن در ۵۰ کیلو یخ) و (۵D گرم ازن در ۵۰ کیلو یخ و آب نمک ۵٪) کمترین تغییرات را دارد، که بیشترین بازماندگی را نشان می‌دهد و در تمام نمونه‌ها تغییرات هیستامین معنی‌دار نبوده است.



نمودار ۷. میزان TVN ماهی در نمونه‌ها تا روز دوازدهم می‌باشد، که نمونه B (۳ گرم ازن در ۵۰ کیلو یخ) کمترین میزان TVN را در نمونه‌ها نشان می‌دهد. که نمونه B کمتر از ۱۹/۷ میلی‌گرم می‌باشد و به نسبت متناسب و قابل قبول می‌باشد و نمونه C و D در روزهای چهارم و ششم و هشتم افزایش معنی‌داری دارد و نمونه شاهد در روز ششم و دهم افزایش معنی‌داری دارد.

بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج به دست آمده (جدول ۱ و نمودار ۱) گروه شاهد (A) فساد بالاتری داشته و بر اساس مشاهدات آزمایش از روز ششم فساد کامل صورت گرفته و غیرقابل مصرف شده است. اما در نمونه‌های با تیمار یخ ازن ماندگاری ماهی افزایش چشمگیری داشته است. میزان میکرو ارگانیسم‌ها و باکتری‌ها بر اساس کشت میکروبی در محیط کشت (PCA) و شمارش آنها، در نمونه شاهد (A) از عمق گوشت در روز ششم شروع به افزایش و در روز دهم به حداکثر خود رسیده است (نمودار ۲). همچنین تعداد عوامل میکروبی در سطح بیرونی ماهی در نمونه شاهد (A) از روز ششم شروع به افزایش و در روز دهم به حداکثر خود رسیده است (نمودار ۴) و روزهای دوازدهم نمونه‌گیری در سطح بیرونی ماهی و گوشت غیرقابل انجام بود و ماهیان با فساد کامل مواجه شدند. در بررسی‌های طبخ ماهی (جدول۲) در روزهای مختلف نیز حفظ کیفیت و طعم ماهیان با تیمار یخ ازن غیرقابل انکار بود. و طبخ نمونه‌های با تیمار یخ ازن از طعم و کیفیت گوشت بالاتری برخوردار بودند و رنگ و مزه ماهی نیز تغییر نکرده است که با نتایج Aberoumand (2010)همخوانی دارد.

در بررسی‌های شیمیایی بافت‌های پوست، آبشش و گوشت ماهی میزان هیستامین کمترین تغییرات در نمونه‌های B و D می‌باشد. میزان پراکسید نیز در نمونه B کمترین میزان بوده است (نمودار ۵).

به طور کلی مطابق با آنالیز NP/K Independent Test و Host Poc و همچنین گراف‌های ترسیم شده نمونه A به عنوان نمونه شاهد تفاوت چشمگیری با سایر نمونه‌ها دارند (شکل ۱). این تفاوت ناشی از بارمیکروبی بالای نمونه شاهد نسبت به نمونه‌های تحت تیمار می‌باشد. در نمونه‌های B و C بار میکروبی نسبت به دو نمونه دیگر رشد افزایشی نداشته و در مقایسه با دو گروه دیگر از ماندگاری بیشتری برخوردار بوده است (شکل‌های ۲، ۳ و ۴).

هیستیدین یکی از مشتقات ازت‌دار غیرپروتئینی موجود در ماهی و سایر فرآورده‌های دریایی می‌باشد که میزان آن در انواع ماهیان از جمله خانواده سالمونیده که ماهی قزل‌آلا نیز از این دسته می‌باشد (به نسبت سایر

فرآورده‌های غذایی بالا می‌باشد). برخی از باکتری‌ها که فلور طبیعی این محصول می‌باشند از طریق دکربوکسیلاسیون آنزیمی خود هیستیدین را تبدیل به هیستامین می‌نمایند. مسمومیت حاصله از هیستامین برای انسان مخاطره‌آمیز می‌باشد. اندازه‌گیری میزان هیستامین با روشی سریع و دقیق می‌تواند در کاهش این خطرات مفید باشد. که میزان مجاز آن ۲۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم گوشت می‌باشد که تمام نمونه‌ها (تیمارها) کمتر از این مقدار و قابل قبول می‌باشد. در مطالعات Mashak *et al.* (2011) بر روی قزل آلای رنگین کمان بازار تهران فقط ۱۲/۵ درصد ماهیان بیشتر از حد مجاز بودند. همچنین در مطالعه Galarini & Emerson (1996) حدود ۱۰ درصد نمونه‌ها حاوی میزان بالاتر از حد مجاز بود. در این مطالعه نیز میزان هیستامین در سقف حد مجاز بودند و میزان هیستامین به نسبت بالا می‌باشد، اما افزایش معنی‌داری در هیچ یک از نمونه‌ها مشاهده نشد و به نظر می رسد که یخ ازنه و یخ آب توانسته از افزایش هیستامین جلوگیری نماید.

مواد ازته فرار در اثر تجزیه مولکول‌های پروتئینی به وجود می‌آیند. هرگاه مقدار ازت فرار از ۱۶/۵ میلی‌گرم و نسبت ازت فرار به قسمت بدون چربی گوشت TVN از ۱۹/۷ میلی‌گرم درصد تجاوز نکند گوشت قابل قبول خواهد بود (Vida, 2006). همان‌طور که مشاهده می‌شود نمونه B به نسبت قابل قبول می‌باشد (نمودار۷). بر اساس مطالعه Aberoumand (2010) با اندازه‌گیری TVN و پراکسید میزان بازماندگی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را در روزهای ۴ تا ۶ افزایش نشان داده است که با نتایج حاضر همخوانی دارد.

در نمودار ۲ یک کاهش معنی‌دار در تعداد کل میکروارگانیسم‌ها در روز دوم در تمام نمونه‌ها مشاهده می‌گردد، به نظر می‌رسد نمونه‌ها در شرایط آزمایشگاه قرار گرفته‌اند و کاهش جزئی ناشی از شرایط نگهداری اولیه در یخ آب می‌باشد و بعد از چند روز افزایش معنی‌دار به خصوص در روز دهم در نمونه شاهد (A) مشاهده گردید همچنین در نمونه D (یخ ازنه همراه نمک) به نظر می‌رسد وجود آب نمک نمی تواند شاهد مطمئنی برای کاهش فساد و تعداد کل میکروارگانیسم‌ها باشد. در تمام نمونه‌ها نمونه A (شاهد) در روز دوازدهم فساد کامل رخ داد و به طور کامل نمونه‌ها غیرقابل خوردن می‌باشد. همچنین با افزایش غلظت یخ ازنه در تیمارها میزان ماندگاری و کیفیت گوشت تغییر چندانی نداشته و علاوه بر آن گروه B با دوز کمتر ازن (۳ گرم ازن در ۵۰ کیلو یخ) به نسبت دچار تغییر شیمیایی و میکروبی کمتری بوده است. لذا با توجه به در نظر گرفتن وضعیت اقتصادی برای نگهداری ماهیان دوز کمتر ازن بدون نمک، گروه (B) برای افزایش ماندگاری و کیفیت گوشت و طعم پیشنهاد می‌گردد.

بر اساس نمودار ۳ در این تحقیق پیشنهاد می‌گردد به تأثیر محافظتی آب نمک بر برخی میکروارگانیسم‌ها نسبت به ازن بررسی گردد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از کارشناسان آزمایشگاه ایران واقع در مشهد و کارشناسان و مدیران سازمان شیلات خراسان رضوی و همچنین آبزی پروران کارگاه اکبر قوچان، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Aberoumand, A.; (2010). Use of modified atmosphere and ozone treatment in fish preservation. World Journal of Fish and Maarine Sciences, 2(3): 254-257.

Alavi, Y.; Sadegh, M.; (2007). Effect of dietary supplement marine Gammarus milled on growth and survival of larvae of rainbow trout. Journal of Animal Husbandry and Fisheries; 77. (In persian)

Aubourg, S.P.; Testi, S.; Sanxuás, M.; Gil, C.; Barros-Velázquez, J.; (2009).

Improved quality and shelf life of farmed trout (*Oncorhynchus mykiss*) by whole processing in a combined ozonised flow ice refrigeration system. International Journal of Food Science & Technology; 1595-1601.

Campos, C. A., Rodríguez, Ó., Losada, V., Aubourg, S.P., Velázquez, J. B., 2005. Effects of storage in ozonised slurry ice on the sensory and microbial quality of sardine (*Sardina pilchardus*). International Journal of Food Microbiology; 121-130.

Campos, C.A.; Losada, V.; Rodríguez, Ó.; Aubourg, S.P.; Velázquez, J.B.; (2006). Evaluation of an ozone–slurry ice combined refrigeration system for the storage of farmed turbot (Psetta maxima). Food Chemistry; 223-230.

Connell, J.J.; (2001). Quality Control in fish industry. FAO Torry Research Station in partnership with Support unit for International Fisheries and Aquatic Research, (SIFAR).

Egan, H.; Krik, R.S.; Sawyer, R.; (1997). Pearsons Chemical Analysis of Foods .(9th edn), pp. 609-634.

Eskash, R.; (1991). Food and Agriculture Organization of the United Nations' global pollution problem in the fishing industry, published Pillars of Budget and Planning Fisheries. (In persian).

Fei, L.; Shu-Lai, L.; Ran, L.; Yi-Cheng, D.; Yu-Ting, D.; (2012). Combined Effect of Ozonized Water Pretreatment and Ozonized Flake Ice on Maintaining Quality of Japanese Sea Bass (*Lateolabrax japonicus*). Journal of Aquatic Food Product Technology; 168-180.

Galarini, R.; Emerson, L.; (1996). Heavy metals and histamine in fish products. Histamine content during 1988-1995. Industries Alimentary; 35 (353): 1194-1198.

Harrigan, W.F.; (1998). Laboratory methods in food microbiology. 3rd Edition. Academic Press, California, USA, pp. 228-234.

Hosseini, S.V.; Rezaei, M.; Sahari, M.A.; Hosseini, H.; (2003). Effect of frozen storage on the sensory evaluation of the quality fat mullet golden (*Liza aurata*). Journal of Marine Sciences; 31-40. (In persian)

Kharjzadeh, D.; (2003). Health Food. published by the light of knowledge, Second Edition. (In persian)

Khorramgah, M.; Rezaei, M.; (2012). Chemical and sensory changes of kutum (*Rutilus frisii* kutum) during frozen storage (-18^{oC}). JFST; 37(9). (In persian)

Kuda, T.; Mihara, T.; Yano, T.; (2007). Detection of histamine and histamine-related bacteria in fish-nukazuke, a salted and fermented fish with rice-bran, by simple colorimetric microplate assay. Food Control; 677-681.

Mashak, Z.; Moradi, B.; Moradi B.; (2011). Determination of histamine in fish: Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss), Purchased from fish sales centers in Tehran. Journal of Food Hygiene; 39-47. (In persian)

Mumnasinghe, DM.S.; Ohkubo, T.; Sakai, T.; (2005). The lipid peroxidation induced changes of protein in refrigerated yellowtail minced meat. Fishcries Sience; 71: 462-464.

Piñeiro, C.; Barros-Velázquez, J.; Aubourg , S.P.; (2004). Effects of newer slurry ice systems on the quality of aquatic food products: a comparative review versus flake-ice chilling methods. Trends in Food Science & Technology; 575-582.

Rice, R.G.; Wrenn, R.H.; (2007). Improving Fish Quality By Means of Ozone at Fresher than Fresh, Inc. IOA Conference and Exhibition Valencia, 1-8.

Ritola, O.; Lyytikäinen, T.; Pylkkö, P.; Mölsä, H.; Lindström-Seppä, P.; (2000). Glutathione-dependent defence system and monooxygenase enzyme activities in Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.)

exposed to ozone. Aquaculture; 219-233.

Rodríguez, Ó.; Velázquez, J.B.; Piñeiro C.; Gallardo, J.M.; Aubourg, S.P.; (2006). Effects of storage in slurry ice on the microbial, chemical and sensory quality and on the shelf life of farmed turbot (*Psetta maxima*). Food Chemistry; 270-278.

Salimi, B.; (2012). Effects of different levels of the Total Volatile Nitrogen (TVN) diet on the growth and survival of Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Journal of veterinary labratoary research: 1: 74-74 (In persian).

Schuur, A.M.; (2003). Evaluation of biosecurity applications for intensive shrimp farming. Aquacultural Engineering; 3-20.

Vaz-Velho, M.; Silva, M.; Pessoa, J.; Gibbs, P.; (2006). Inactivation by ozone of *Listeria innocua* on salmon-trout during cold-smoke processing. Food Control; 609-616.

Vida, P.; (2006). Quality control and testing of food chemicals. University of Tehran Publication. P: 332. (In persian).