



# تأثیر فلوراتین بر حفظ کیفیت و کنترل میکروبی فیله قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

پریسا نورمحمدی<sup>۱</sup>، علیرضا میروافقی<sup>۲\*</sup>، سید ولی حسینی<sup>۳</sup>

۱. کارشناسی ارشد فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

۲. استاد، گروه علوم و مهندسی شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳. دانشیار، گروه علوم و مهندسی شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۱۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۱۳

## چکیده

فلوراتین یک فلاونوئید طبیعی است که دارای فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. گالیک اسید ترکیب دیگری از گروه فلاونوئیدها است که دارای مکانیسم ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی است و به‌عنوان کنترل مثبت در این آزمایش استفاده شد. هدف از این مطالعه بررسی عملکرد فلوراتین به‌عنوان عامل کاهنده فساد برای فیله‌های ماهی قزل‌آلای رنگین کمان طی دمای نگهداری در یخچال بود. این عملکرد نگهدارندگی از طریق بررسی شاخص‌های میکروبی، شیمیایی و فیزیکوشیمیایی در چهار نوبت نمونه‌برداری در روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در محلول فلوراتین (۱۵۰ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و گالیک‌اسید (۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) غوطه‌ور و سپس در دمای ۴ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۲۱ روز نگهداری شدند. بررسی‌های میکروبی انجام شده نشان داد که فیله‌های تیمار شده با فلوراتین ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در روزهای ۰، ۷ و ۱۴ به‌طور معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) بار میکروبی کل کمتری نسبت به تیمارهای کنترل داشتند. علاوه بر این فلوراتین ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اکسیداسیون پیشرفته‌تری، مقدار ترکیبات ازته فرار و محدوده تغییر pH که شاخص‌های شیمیایی فساد فیله قزل‌آلای هستند را در روزهای ۰، ۷ و ۱۴ به‌طور معنی‌داری کاهش داد ( $P < 0.05$ ). همچنین آنالیز شاخص‌های رنگی انجام شده روی فیله‌های تیمار شده نیز نشان داد ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در سطح معنی‌دار در روزهای ۰، ۷ و ۱۴ قادر به حفظ شاخص‌های رنگی نسبت به تیمار کنترل بود. همه فیله‌های ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تیمار شده از روز ۱۴ به بعد علائم فساد را داشتند و دیگر قابل استفاده نبودند. نتایج این آزمایش اثباتی بر مؤثر بودن غلظت فلوراتین ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر مکانیسم‌های ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با تیمارهای کنترل بود.

واژه‌های کلیدی: فلوراتین، اکسیداسیون، ضد میکروبی، نگهدارنده، فساد، قزل‌آلای رنگین کمان



## **Effect of Phloretin on microbial control and maintain the quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)**

**Parisa Noormohammadi<sup>1</sup>, Alireza Mirvaghefi<sup>2\*</sup>, Seyed Vali Hosseini<sup>3</sup>**

1. M.Sc. graduate, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

2. Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

3. Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

**Received: 03-Jun-2023**

**Accepted: 05-Dec-2023**

### **Abstract**

Phloretin is a natural flavonoid that has antimicrobial and antioxidant activities. Gallic acid is another combination of flavonoids group. The object of this study was to evaluate the function of phloretin as a preservative factor for rainbow trout fillets during storage temperature in the refrigerator. This performance has been investigated by examining microbial, chemical and physiochemical indices in four sampling times on days 0, 7, 14 and 21. Trout samples were dipped in phloretin solution (150 µg/ml and 250 µg/ml) and gallic acid solution (250 µg/ml), stored at 4°C for 21 days. Microbial tests showed that microbial load of trout fillet treated by phloretin 250 µg/ml lowered significantly ( $P<0.05$ ) compared to the control samples in 0, 7 and 14 days. In addition to, phloretin significantly ( $P<0.05$ ) reduces oxidation, total volatile basic nitrogen (TVB-N), hydrolysis of free fatty acids and the range of pH changes, which are chemical indicators of trout fillet spoilage in 0, 7 and 14 in comparison with control treatment and also the analysis of the color indicators performed on the treated fillets, showed that phloretin 250 µg/ml was able to maintain color indexes compared to control samples at a significant level of 0.05 in 0, 7 and 14 days. All rainbow trout fillets were treated from day 14 had symptoms of spoilage. The results of this experiment proved the effectiveness of phloretin 250 µg/ml on antimicrobial mechanisms, and inhibition of spoilage.

**Keywords:** Phloretin, Oxidation, Antimicrobial, Preservative, Spoilage, Rainbow trout

## ۱. مقدمه

اکسیداسیون لیپید و فساد را در طول دوره حمل‌ونقل و انبارداری افزایش دهد (Lu et al., 2015). طبق مطالعات انجام شده، فلوراتین دارای اثرات مهارکنندگی روی باکتری‌های غذازاد (*S. aureus* و *L. monocytogenes*) و باکتری‌های عامل فساد (*Bacillus subtilis*، *Pseudomonas* و *Photobacterium*) می‌باشد. فلوراتین یک نگهدارنده طبیعی برای حفظ ایمنی غذاهای دریایی می‌باشد (Wang et al., 2019).

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۲.۱. تعیین میزان MIC فلوراتین و گالیک اسید

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) به‌عنوان کمترین غلظت ترکیب فعال تعریف می‌شود که مانع رشد میکروارگانیسم‌ها می‌شود. برای تعیین مقادیر MIC به‌وسیله روش انتشار دیسک، سوسپانسیون باکتریایی سه سویه باکتریایی *Staphylococcus ATCC 25923*، *Escherichia coli ATCC 25922* و *Shigella flexneri ATCC 12022* با غلظت نیم مک فارلند تهیه شد. روی محیط کشت Muller-Hinton agar با سوآپ، از سوسپانسیون‌های باکتریایی تهیه شده کشت چمنی داده شد. سپس روی محیط کشت دیسک‌های بلانک آغشته به محلول فلوراتین یا گالیک اسید با غلظت‌های مختلف ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰ و ۳۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و همچنین دیسک کنترل منفی آغشته به آب مقطر و دیسک کنترل مثبت که دیسک آغشته به آنتی‌بیوتیک (آمپی‌سیلین و کانامایسین مونوسولفات به ترتیب به‌عنوان کنترل مثبت برای سویه‌های گرم مثبت و گرم منفی استفاده شد) به محیط اضافه شدند. سپس محیط کشت را در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده و بعد از آن نتیجه تست‌ها از نظر ایجاد هاله عدم رشد و مقایسه با نمونه کنترل مثبت، بررسی شد (Hudzicki, 2012).

استفاده از ترکیبات طبیعی به‌دلیل خواص کاهش‌دهنده سرعت فساد آن‌ها در حال افزایش جهانی است (Xu et al., 2018; Wang et al., 2019). مشتقات گیاهی طبق توضیح فوق برای مصارف غذایی توجه زیادی را به‌خود جلب کرده‌اند (Zielinska et al., 2023). فلاونوئیدها یک گروه از متابولیت‌های ثانویه هستند که در برگ، ریشه، ساقه و انواعی از میوه‌های گیاهان یافت می‌شوند (Barreca et al., 2014). دی‌هیدروکالکون‌ها یک گروه از فلاونوئیدها هستند که تاکنون در ۳۰ خانواده گیاهی گزارش شده‌اند (Gosch et al., 2009). فلوراتین (2,4,6-hydroxy-3-(4- (hydroxyphenyl) benzene acetone) یکی از بهترین و فراوان‌ترین دی‌هیدروکالکون‌هایی است که دارای فارماکوفور 2,6-dihydroxyacetophenone می‌باشد (Behzad et al., 2017). فلوراتین و مشتقات آن در سیب و بخش‌های مختلف آن، کامکوات، توت فرنگی و سبزیجات یافت می‌شود (Hilt et al., 2003; Tsao et al., 2003; Gosch et al., 2009; Barreca et al., 2014). فلوراتین حاوی مقادیر بالایی از ترکیبات فنولیک می‌باشد (Rana et al., 2015). به‌طورکلی فلوراتین دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی، ضد میکروبی و ضد سرطانی می‌باشد (Rezki et al., 2002; Yang et al., 2009; Chang et al., 2012; Barreca et al., 2014; Gu et al., 2022; Zhao et al., 2022). فلوراتین افزودنی غذایی مورد تأیید FDA می‌باشد (Gitzinger et al., 2012; Wieland and Fussenegger, 2012).

غذاهای دریایی بلافاصله پس از صید، فسادپذیری بالایی دارند (Hungerford, 2010). اکسیداسیون چربی یکی از اولین شاخص‌های تعیین کیفیت غذاها مخصوصاً غذاهای دریایی است که با تغییرات نامناسب در عطر و طعم، رنگ، بافت، ارزش تغذیه‌ای و تولید ترکیبات سمی مشخص می‌شود. اکسیداسیون چربی در عضله ماهی از سطح غشاء و در قسمت فسفولیپیدی درون سلولی آغاز می‌شود (Gray et al., 1996). کاهش کیفیت و مسئله فساد ناشی از میکروارگانیسم‌ها مشکل اصلی در صنایع غذایی است (Schuh et al., 2020). رشد میکروبی می‌تواند

به مدت ۲۴ ساعت یا در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت تعیین شد (Ojagh *et al.*, 2010).

#### ۴.۲. اندازه‌گیری pH

۱ گرم از نمونه چرخ‌شده با ۹CC آب مقطر مخلوط شد. بعد از هم‌وزن شدن و فیلترکردن، نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری و سپس توسط دستگاه pH متر اندازه‌گیری شد (Rahman *et al.*, 2022).

#### ۵.۲. شاخص FFA

۳۰ گرم نمونه ماهی در ۵۰ سی‌سی حلال هگزان (n-هگزان) به مدت ۲۴ ساعت Shake و سپس حلال و روغن صاف شده درون ارلن ریخته شد. بعد از آن درون بن‌ماری در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه حلال پرانی شد. به ازای ۵ گرم روغن ۳۰ سی‌سی الکل خنثی به درون ارلن ریخته و هم‌زده شد. سپس چند قطره فنل‌فالتین افزوده و با NaOH ۰/۰۱ نرمال تیتر شد (Jeyakumari *et al.*, 2023).

#### ۶.۲. محاسبه مقدار کل مواد نیتروژن‌دار فرار

##### (TVB-N)

۲ گرم نمونه ماهی قزل‌آلا با ۸ سی‌سی از محلول تری‌کلرواستیک اسید ۴٪ در ظرف مخصوص TBA ریخته و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت RPM ۱۸۰ هم‌زده شد. در ادامه به لوله فالکون‌های پلاستیکی منتقل شد و با دور RPM ۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. ۲ سی‌سی از سوپرناتانت برداشته شد و به حلقه بیرونی ظرف منتقل شد سپس ۲ سی‌سی از محلول اشباع کربنات پتاسیم به حلقه بیرونی و ۲ سی‌سی از بوریک‌اسید حاوی معرف متیل‌رد به حلقه مرکزی اضافه شد (Moosavi-Nasab *et al.*, 2021). نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در نهایت حلقه داخلی با HCl ۰/۰۱ نرمال تیتر شد.

#### ۲.۲. آماده‌سازی و تیمار فیله‌های ماهی قزل‌آلا

باتوجه به نتایج MIC بخش ۱-۲- محلول فلوراتین (۹۹٪) استخراج شده از پوست سیب، با دو غلظت ۱۵۰ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ساخته شد. ماهی‌های قزل‌آلا تازه از نزدیکترین فروشگاه زنجیره‌ای به آزمایشگاه خریداری شدند و در جعبه‌های استریل با نسبت یخ به ماهی ۱ به ۳ به آزمایشگاه فرآوری دانشگاه تهران منتقل شدند. ماهی‌های قزل‌آلا بلافاصله پس از رسیدن به آزمایشگاه به صورت اسپتیک فیله شده و به ۴۸ قطعه یکنواخت ۱۰۰ گرمی برش داده شدند و به پنج گروه تقسیم شدند. گروه اول کاملاً در محلول ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر فلوراتین به مدت ۱۰ ثانیه غوطه‌ور شدند (Wang *et al.*, 2019). گروه دوم در محلول فلوراتین ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۱۰ ثانیه غوطه‌ور شدند. در گروه سوم در محلول ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گالیک اسید به مدت ۱۰ ثانیه غوطه‌ور شدند. گروه چهارم به‌عنوان تیمار کنترل قرار گرفت. همه تیمارها برای جلوگیری از کاهش رطوبت، وکیوم و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. نمونه‌ها در روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ در سه تکرار برای آنالیز جمع‌آوری شدند. Ph150، Ga250 و C به ترتیب گروه‌های تیمار شده با فلوراتین ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، فلوراتین ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، گالیک اسید ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کنترل می‌باشند.

#### ۳.۲. ارزیابی میکروبیولوژیک نمونه‌های ماهی

##### قزل‌آلا

نمونه فیله قزل‌آلا (۱ گرم) به صورت اسپتیک با ۹ سی‌سی نرمال سالین استریل در RPM ۸۰۰۰ برای مدت ۲ دقیقه با هم‌وزنایزر تا ایجاد نسبت ۱:۱۰ (w:v) همگن شد. ترکیب هم‌وزن شده برای ۱۰ رقت پشت سر هم استفاده شد. رقت‌های مناسب در محیط کشت پلیت کانت آگار (Plate Count Agar) گسترش یافتند. شمارش تعداد کل باکتری‌های زنده (Total Viable Bacteria) با استفاده از محیط کشت بعد از کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

## ۷.۲. رنگ‌سنجی

مقدار  $L^*$ ،  $a^*$  و  $b^*$  فیله قزل‌آلا توسط دستگاه رنگ‌سنجی مدل M.A.H.3000، ساخت آمریکا اندازه‌گیری شد (Sriket and La-ongnual, 2018).

## ۸.۲. آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ انجام گرفت. برای مقایسه واریانس بین تیمارها از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد و وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح معنی‌دار ۰/۰۵ با کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گرفت. رسم نمودارها نیز در نرم‌افزار

Excel نسخه ۲۰۱۶ انجام شد.

## ۳. نتایج

### ۱.۳. حداقل غلظت‌های مهارکنندگی فلوراتین و

#### گالیک اسید

نتایج حاصل از این ارزیابی در جدول ۱ ارائه شده است. با توجه به نتایج، کمترین میزان MIC فلوراتین و گالیک اسید برای سه سویه باکتری بررسی شد که کمترین غلظت مهارکنندگی برای فلوراتین و گالیک اسید ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

جدول ۱. میزان MIC فلوراتین و گالیک‌اسید درمقابل باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس و باکتری‌های گرم منفی شیگلا و *E. coli*

گونه‌های باکتریایی	انواع	فلوراتین (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	گالیک‌اسید (میکروگرم بر میلی‌لیتر)
<i>Escherichia coli</i>	Gr <sup>-</sup>	۱۵۰	۲۰۰
<i>Shigella flexneri</i>	Gr <sup>-</sup>	۲۵۰	۲۵۰
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gr <sup>+</sup>	۲۵۰	۲۵۰

### ۳.۳. اثر فلوراتین بر تغییرات pH در فیله

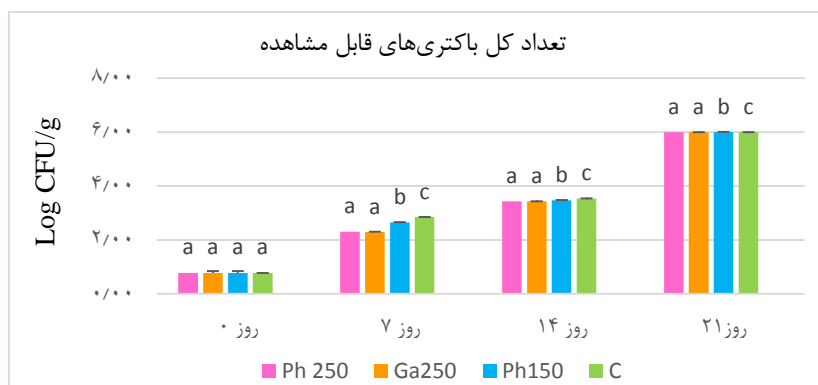
#### قزل‌آلای رنگین‌کمان

شکل ۲ روند تغییرات pH را نشان می‌دهد. در این نمودار به‌خوبی مشاهده می‌شود که در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ بین دو تیمار Ph250 و Ga250 اختلاف معنی‌دار نیست ( $P > 0.05$ ) در حالی که بین این دو تیمار و سایر تیمارها اختلافات معنی‌دار می‌باشد ( $P < 0.05$ ). در اولین روز نمونه‌برداری، pH همگی تیمارها بین مقادیر ۶/۴-۶/۳ بود که با گذشت زمان افزایش مقادیر pH در دو تیمار Ph250 و Ga250 نسبت به دو تیمار دیگر تا روز ۱۴ نمونه‌برداری در کمترین محدوده خود بود و تیمار C دارای بیشترین افزایش pH بود. بنابراین، دو تیمار Ph250 و Ga250 مؤثرترین تیمارها در زمینه حفظ تغییرات pH بودند.

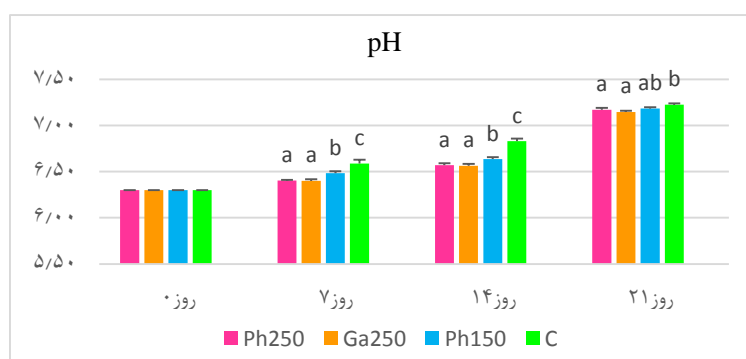
### ۲.۳. اثر فلوراتین بر بار میکروبی نمونه قزل‌آلای

#### رنگین‌کمان

شکل ۱ نشان می‌دهد در روز صفر بین هیچ یک از تیمارها اختلافات در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار نبود. روز ۷ و ۱۴ بین دو تیمار Ph250 و Ga250 هیچ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشده است ( $P > 0.05$ ) و بار باکتریایی هر دو تیمار معادل  $2/3 \log \frac{CFU}{gr}$  بود که سطح مناسبی از بار باکتریایی است و فساد محسوب نمی‌شود (Ogur, 2022). اما بین این دو تیمار و سایر تیمارها معنی‌دار می‌باشد ( $P < 0.05$ ). در روز ۲۱، TC در همه تیمارها  $6 \log \frac{CFU}{gr}$  بود که این تعداد فراتر از حد قابل قبول می‌باشد.



شکل ۱. اثر فلوراتین بر بار میکروبی فیله‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان در روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱، فیله‌های قزل‌آلای تیمار شده با Ph250 (غلظت فلوراتین ۲۵۰  $\frac{\mu g}{ml}$ ، رنگ صورتی)، Ga250 (غلظت گالیک‌اسید ۲۵۰  $\frac{\mu g}{ml}$ ، رنگ نارنجی)، Ph150 (غلظت فلوراتین ۱۵۰  $\frac{\mu g}{ml}$ ، رنگ آبی) و C (کنترل (سبز رنگ) برداشت ۳ گرم از هر تیمار و تکرار (۳ تکرار) در هر نوبت آزمایش



شکل ۲. اثر فلوراتین بر مقدار pH در فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان در روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱، فیله‌های قزل‌آلای تیمار شده با Ph250 (غلظت فلوراتین ۲۵۰  $\frac{\mu g}{ml}$ ، رنگ صورتی)، Ga250 (غلظت گالیک‌اسید ۲۵۰  $\frac{\mu g}{ml}$ ، رنگ نارنجی)، Ph150 (غلظت فلوراتین ۱۵۰  $\frac{\mu g}{ml}$ ، رنگ آبی) و C (کنترل (سبز رنگ) برداشت ۳ گرم از هر تیمار و تکرار (۳ تکرار) در هر نوبت آزمایش

### ۵.۳. اثر فلوراتین بر مقدار کل مواد نیتروژن‌دار

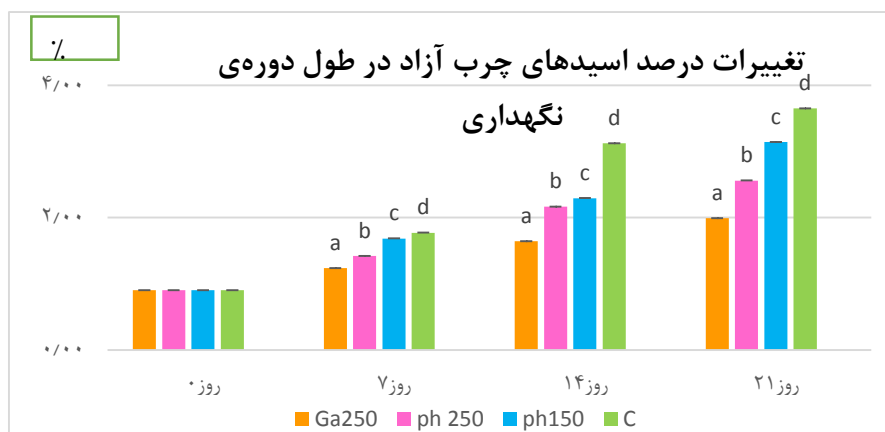
#### فرار (TVB-N) نمونه‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان

در شکل ۴ نتایج حاصل از اندازه‌گیری TVB-N نشان می‌دهد که گذشت زمان موجب افزایش تدریجی و معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) این شاخص در همه تیمارها شد. در طی دوره نگهداری به ترتیب دو تیمار Ph250 و Ga250 و تیمار C<sup>+</sup> دارای کمترین و بیشترین مقادیر مواد نیتروژن‌دار فرار بودند. معمولاً به‌عنوان حد قابل قبول در عضله ماهی  $\frac{25-40 mg TVB-N}{100 gr}$  در نظر گرفته می‌شود و فراتر از آن ماهی را فاسد در نظر می‌گیرند (Jeyakumari et al., 2023). در نتیجه در روز ۲۱ نمونه‌برداری مشاهده شد که تمامی تیمارها روند فساد

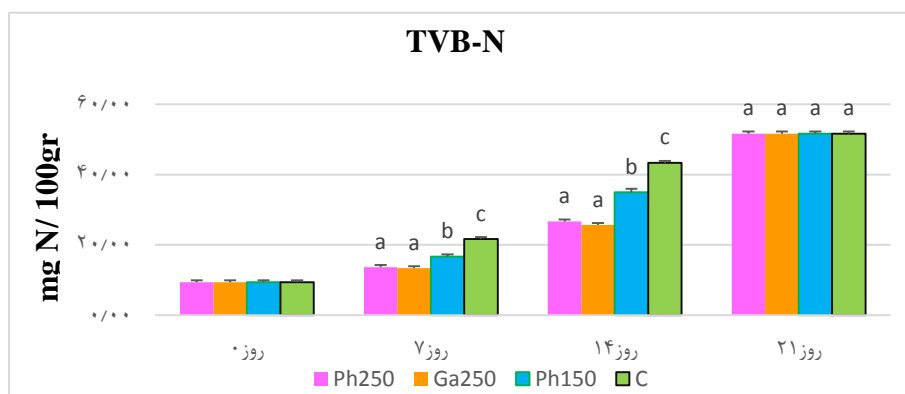
### ۴.۳. اثر فلوراتین بر تشکیل FFA در فیله‌های قزل‌آلای

شکل ۳ نشان می‌دهد که در روز صفر بین تیمارها اختلاف معنی‌دار نبود و در محدوده ۰/۹۰-۰/۸۶ اولئیک اسید بود در حالی که در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ بین سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود دارد ( $P < 0.05$ ). تیمارهای Ph250 و Ga250 دارای عملکرد کاهندگی اکسیداسیون و تجزیه اسیدهای چرب نزدیک به هم و در روز ۷ در محدوده ۱/۱-۲/۴ هستند و نیز دارای کمترین افزایش درصد اولئیک اسید می‌باشند. در روز ۲۱ به دلیل کاهش غلظت ترکیبات پلی‌فنول Ga250 و Ph250 روند تجزیه اسیدهای چرب آزاد افزایش یافته است.

را طی کرده‌اند.



شکل ۳. اثر فلوراتین بر کاهش تشکیل FFA در فیله‌های قزل آلا در روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱. فیله‌های قزل آلی تیمار شده با Ga250 (غلظت گالیک اسید  $250 \frac{mg}{ml}$  رنگ نارنجی)، Ph250 (غلظت فلوراتین  $250 \frac{mg}{ml}$  رنگ صورتی)، Ph150 (غلظت فلوراتین  $150 \frac{mg}{ml}$  رنگ آبی) و C (کنترل، رنگ سبز) برداشت ۹۰ گرم از هر تیمار و تکرار (۳ تکرار) در هر نوبت.



شکل ۴. اثر فلوراتین بر مقدار TVB-N در فیله قزل آلی رنگین کمان در روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱. فیله‌های قزل آلی تیمار شده با Ph250 (غلظت فلوراتین  $250 \frac{mg}{ml}$ ، رنگ صورتی)، Ga250 (غلظت گالیک اسید  $250 \frac{mg}{ml}$ ، رنگ نارنجی)، Ph150 (غلظت فلوراتین  $150 \frac{mg}{ml}$ ، رنگ آبی) و C (کنترل (سبز رنگ) برداشت ۶ گرم از هر تیمار و تکرار (۳ تکرار) در هر نوبت آزمایش.

هیچ کدام از تیمارها و نیز در روزهای ۷ و ۱۴ بین تیمارهای Ph250 و Ga250 اختلاف معنی‌دار وجود ندارد ( $P > 0.05$ ). در حالی که بین این دو تیمار و دیگر تیمارها و نیز سایر تیمارها با یکدیگر در سطح  $0.05$  اختلافات معنی‌دار می‌باشد. در روز ۲۱ بین همه تیمارها اختلافات معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ). در نتیجه کمترین و بیشترین تغییرات شاخص‌های رنگی به ترتیب در دو تیمار Ph250 و Ga250 و تیمار C بود.

### ۶.۳. اثر فلوراتین بر شاخص‌های رنگی در

#### فیله‌های قزل آلی رنگین کمان

بر اساس نتایج، افزایش دوره نگهداری موجب کاهش هر سه شاخص رنگی  $L^*$ ،  $a^*$  و  $b^*$  می‌شود. در شکل ۵ و نمودار شاخص‌های  $L^*$  و  $a^*$  مشاهده می‌شود که در روز صفر بین هیچ کدام از تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ( $P > 0.05$ ) همچنین در شاخص  $b^*$  در روز صفر بین

## ۴. بحث

### ۱.۴. حداقل غلظت‌های مهارکنندگی فلوراتین

همان‌طور که نتایج نشان داد، MIC فلوراتین در مقابل سویه باکتری *S. aureus* و دو سویه باکتری گرم منفی *E. coli* و *Sh. flexneri* به ترتیب ۲۵۰ و بین ۱۵۰ تا ۲۵۰ (میکروگرم بر میلی‌لیتر) که با مطالعات انجام شده در این زمینه مطابقت داشت (Barreca et al., 2014; Wang et al., 2020; Wei et al., 2019; al., 2019). فعالیت ضد میکروبی فلوراتین موجب کاهش سطح انرژی مورد نیاز برای متابولیسم میکروارگانیسم‌ها به واسطه تخریب اکسیداتیو دیواره سلولی باکتری و نیز کاهش فعالیت آنزیمی باکتری می‌شود. یک مطالعه پیشین روی فیله‌های ماهی سالمون که در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ روز نگهداری شدند، بیان داشته است که فلوراتین دارای فعالیت ضد میکروبی مناسبی در مقابل *S. aureus* و *E. coli* با MICهای به ترتیب ۳۰ و ۳۵۰ (میکروگرم بر میلی‌لیتر) می‌باشد (Wang et al., 2019). علت تفاوت با نتایج مطالعه حاضر در MIC این است که سویه‌های مختلف باکتری‌ها دارای حساسیت‌های متفاوتی در مقابل فلوراتین هستند.

### ۲.۴. کاهش بار باکتریایی در فیله‌ی قزل‌آلا به

#### وسیله‌ی فلوراتین

همان‌طور که در نتایج بیان شد، تیمار Ph250 نسبت به تیمار C بار باکتریایی موجود در فیله قزل‌آلای رنگین کمان را به خوبی کاهش داده است. علاوه بر این، تیمار Ph150 با وجود اینکه نسبت به تیمار Ph250، بار باکتریایی را به مقدار کمتری کاهش داده است، بار باکتریایی فیله را در مقایسه با تیمار C به صورت مناسبی کاهش داده است. با این وجود غلظت فلوراتین ۲۵۰ (میکروگرم بر میلی‌لیتر) به عنوان غلظت مؤثر شناخته شد. این موارد به دلیل فعالیت ضد میکروبی فلوراتین و اثرگذاری مؤثر آن در MIC تعیین شده روی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت می‌باشد. نتایج حاصل در این بخش با مطالعه انجام شده روی فعالیت ضد میکروبی فلوراتین موجود در سیب که قادر به مهار

رشد باکتری‌های گرم مثبت *S. aureus*، *L. monocytogenes* و سویه‌های بالینی *S. aureus* مقاوم به متی‌سیلین بود، مطابقت داشت. همچنین با مطالعه دیگری که مکانیسم ضد باکتریایی فلوراتین سیب در مقابل باکتری *L. monocytogenes* را بررسی کرده است (Barreca et al., 2014; Zhao et al., 2022).

### ۳.۴. کاهش محدوده‌ی تغییرات pH به وسیله‌ی

#### فلوراتین

در تیمار Ph250، pH به مقدار کمتری در مقایسه با تیمار C افزایش داشته است. pH بعد از سپری شدن فرآیند جمود نعشی بالا می‌رود و رشته‌های اکتین و میوزین از هم باز می‌شوند. این بالا رفتن pH به واسطه از بین رفتن حالت نیمه تراوایی غشای سلولی، رقیق شدن محتوای داخل سلول و نیز افزایش فساد بافتی در عضله در نتیجه آزاد شدن ترکیباتی از جمله ترکیبات نیتروژنی مثل آمونیاک و تری‌متیل‌آمین‌ها و نیز افزایش بار باکتریایی فیله که با عملکرد آنزیمی خود تجزیه پروتئین‌ها را افزایش داده و ترکیبات نیتروژن دار آزاد می‌کنند، می‌باشد (Ojagh et al., 2010). دو تیمار Ph250 و Ga250 دارای کمترین افزایش pH به دلیل عملکرد در به تأخیر انداختن عملکرد آنزیمی باکتری‌ها، کاهش بار باکتریایی فیله و کاهش سرعت فساد مربوط می‌باشند و با مطالعه صورت گرفته روی مکانیسم ضد باکتریایی فلوراتین و اثر آن روی DNA، پروتئین و محتوای ATP درون سلولی باکتری‌ها، همخوانی داشت (Zhao et al., 2022). بیشترین افزایش pH در تیمار C مشاهده شد.

### ۴.۴. کاهش تشکیل FFA در فیله‌های قزل‌آلای

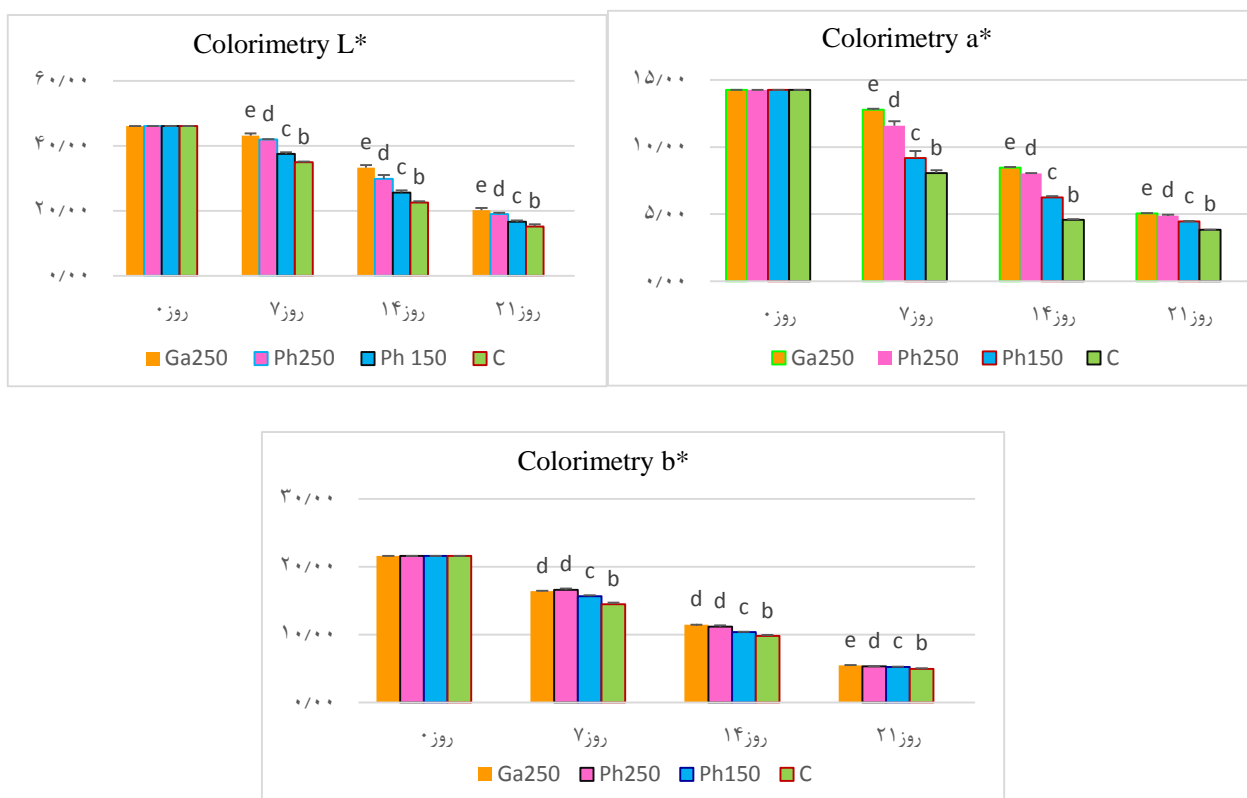
#### رنگین کمان به وسیله‌ی فلوراتین

تخریب لیپیدها همواره نگرانی کارشناسان شیلاتی بوده است که به دو دسته: اکسیداسیون لیپیدی و هیدرولیز لیپیدها به اسیدهای چرب آزاد، تقسیم می‌شود



مطالعه عملکرد آنتی‌اکسیدانی فلوراتین با آزمایش‌های FRAP (Ferric reducing antioxidant power) و ORAC (Oxygen radical absorbance capacity assay) بررسی شد. نتایج مطالعه فوق نشان داد فلوراتین در ۷/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتری داشته و دارای بالاترین فعالیت ضد میکروبی در مقابل باکتری‌های *S. aureus* و *E. coli* بوده است (Zhang *et al.*, 2016).

(Jeyakumari *et al.*, 2023). تیمار Ph250 تشکیل FFA در فیله قزل‌آلا را در مقایسه با تیمار C کاهش داده است و بیشترین افزایش در شاخص FFA در تیمار C بود. این اثر فلوراتین به دلیل عملکرد فلوراتین روی کاهش بار باکتریایی و کاهش فعالیت آنزیمی آن‌ها روی لیپیدها و هیدرولیز لیپیدی می‌باشد. نتایج حاصل با نتایج مطالعه انجام شده روی فعالیت ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولیک مثل فلوراتین مطابقت داشت که در این



شکل ۵. اثر فلوراتین بر شاخص رنگی L\*, a\* و b\* در فیله‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان در روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱. فیله‌های قزل‌آلای تیمار شده با Ga250 (غلظت گالیک‌اسید ۲۵۰  $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  رنگ نارنجی)، Ph250 (غلظت فلوراتین ۲۵۰  $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ ، رنگ صورتی)، و Ph150 (غلظت فلوراتین ۱۵۰  $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  رنگ آبی و C (کنترل، رنگ سبز).

باکتری‌ها روی آمینواسیدها در عضله ماهی منجر به تجمع آمونیاک و بازهای آلی فرار (Jeyakumari *et al.*, 2023) دیگر می‌شود. براساس نتایج بخش ۳-۵، در طول دوره نگهداری، به ترتیب کمترین و بیشترین میزان ترکیبات نیتروژنی در دو تیمار Ph250 و Ga250 و تیمار C مشاهده شد. علت اثرگذاری فلوراتین و گالیک‌اسید در این زمینه اثر آن‌ها روی کاهش فعالیت‌های آنزیمی باکتری‌ها و

۵.۴. کاهش مقدار کل مواد نیتروژن‌دار فرار

فیله‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان به وسیله فلوراتین

TVB\_N اندازه‌گیری مقدار بازهای فرار تشکیل شده از مشتقات نیتروژنی می‌باشد که این ارزیابی حاصل از تجزیه پروتئین‌ها می‌باشد. TVB\_N در ماهی از آمونیاک، آمین‌های اولیه و ثانویه تشکیل شده است. کاتابولیسم

نتایج این مطالعه مطابق با بررسی فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی فلوراتین در فیله‌های ماهی سالمون بود (Zielinska et al., 2017; Wang et al., 2019).

### نتیجه‌گیری نهایی

با اجرای این طرح و مطالعات انجام شده در زمینه استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی، نتایج حاصل نشان‌دهنده اثرات معنی‌دار فلوراتین در کاهش فساد فیله ماهی قزل‌آلا می‌باشد. فلوراتین ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای اثرات معنی‌دار روی کاهش بار باکتریایی فیله ماهی قزل‌آلا بود. بررسی‌های انجام شده در زمینه رنگ‌سنجی که جزء خواص ظاهری و نشان‌دهنده تازگی فیله قزل‌آلا هستند نشان می‌دهد که فلوراتین ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به صورت معنی‌دار عملکرد نزدیک به گالیک اسید در زمینه حفظ کیفیت ظاهری فیله و شاخص‌های بافتی داشته باشد. نتایج این پژوهش اثباتی بر این است که فلوراتین ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای فعالیت‌های ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد.

در نتیجه کاهش کاتابولیسم باکتری‌ها روی اسیدهای آمینه می‌باشد که با مطالعه انجام شده روی فیله‌های ماهی سالمون که تا ۱۸/۸۴ بار تشکیل آمین‌های بیوزن (جزء مواد نیتروژن‌دار) را کاهش داده است، مطابقت داشت (Wang et al., 2019).

### ۶.۴. حفظ خصوصیات رنگی در فیله‌های

#### قزل‌آلای رنگین‌کمان به وسیله فلوراتین

یکی از شاخص‌های فیزیکوشیمیایی مهم در فیله ماهی رنگ آن می‌باشد. تغییرات رنگی در فیله قزل‌آلا می‌تواند نتیجه تغییرات ایجاد شده به وسیله آنزیم‌های داخلی و نیز آنزیم‌های بعضی از باکتری‌ها روی رنگدانه‌های طبیعی فیله باشد. کمترین تغییرات منفی در جهت کاهش شاخص‌های رنگی در دو تیمار Ph250 و Ga250 به دنبال کاهش بار باکتریایی و مهار فعالیت‌های آنزیمی آن‌ها و همچنین عملکرد آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات که از تغییرات رنگی به واسطه اکسیداسیون چربی جلوگیری می‌کنند، می‌باشد که شاخص‌های رنگی را حفظ می‌کنند اما برخلاف این دو تیمار، بیشترین تغییرات رنگی در تیمار C مشاهده شد.

### ۵. منابع

### References

- Behzad, S., Sureda, A., Barreca, D., Nabavi, SF., Rastrelli, L., Nabavi, SM., 2017. Health effects of phloretin: from chemistry to medicine. *Phytochemistry Reviews* 16(3), 527-533. DOI: 10.1007/s11101-017-9500-x
- Barreca, D., Bellocco, E., Lagana, G., Ginestra, G., Bisignano, C., 2014. Biochemical and antimicrobial activity of phloretin and its glycosylated derivatives present in apple and kumquat. *Food Chemistry* 160, 292-297. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.03.118
- Chantararataporn, P., Tepkasikul, P., Kingcha, Y., Yoksan, R., Pichyangkura, R., Visessanguan, W., Chirachanchai, S., 2014. Water-based oligochitosan and nanowhisker chitosan as potential food preservatives for shelf-life extension of minced pork. *Food Chemistry* 159, 463-470. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.03.019
- Chang, W.T., Huang, W.C., Liou, C.J., 2012. Evaluation of the anti-inflammatory effects of phloretin and phlorizin in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages. *Food Chemistry* 134(2), 972-979. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.03.002
- Gitzinger, M., Kemmer, C., A Fluri, D., El-Baba, M.D., Weber, W., Fussenegger, M., 2012. The food additive vanillic acid controls transgene expression in mammalian cells and mice. *Nucleic Acids Research* 40(5). DOI:

10.1093/nar/gkr1251

Gosch, C., Halbwirth, H., Kuhn, J., Miosic, S., Stich, K., 2009. Biosynthesis of phloridzin in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Plant Science* 176(2), 223-231. DOI: 10.1016/j.plantsci.2008.10.011

Gray, J.I., Gomaa, E.A., Buckley, D.J., 1996. Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Science*, 43(Suppl. 1), 111-123. DOI: 10.1016/0309-1740(96)00059-9

Gu, L., Sun, R., Wang, W., Xia, Q., 2022. Nanostructured lipid carriers for the encapsulation of phloretin: preparation and in vitro characterization studies. *Chemistry and Physics of Lipids* 242(2021) 105150. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2021.105150

Hudzicki, J., 2009. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol Author Information. *American Society for Microbiology* 2009, 1–13.

Hungerford, J.M., 2010. Scombroid poisoning: A review. *Toxicon* 56(2), 231–243. DOI: 10.1016/j.toxicon.2010.02.006

Hilt, P., Schieber, A., Yildirim, C., Arnold, G., Klaiber, I., Conrad, J., Beifuss, U., Carle, R., 2003. Detection of phloridzin in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) by HPLC-PDA-MS/MS and NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(10), 2896-2899. DOI: 10.1021/jf021115k

Jeyakumari, A., Murthy, L.N., Kumar, A., Laly, S.J., 2023. 12 . BIOCHEMICAL QUALITY ASSESSMENT OF FISH AND FISHERY PRODUCTS. pp. 51-62.

Lu, S., Ji, H., Wang, Q., Li, B., Li, K., Xu, C., Jiang, C., 2015. The effects of starter cultures and plant extracts on the biogenic amine accumulation in traditional Chinese smoked horsemeat sausages. *Food Control*, 50, 869–875. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.08.015

Moosavi-Nasab, M., Khoshnoudi-Nia, S., Azimifar, Z., Kamyab, S., 2021. Evaluation of the total volatile basic nitrogen (TVB-N) content in fish fillets using hyperspectral imaging coupled with deep learning neural network and meta-analysis. *Scientific Reports* 11(1), 1-11. DOI: 10.1038/s41598-021-84659-y

Ogur, S., 2022. Pathogenic bacteria load and safety of retail marine fish Carga de bactérias patogênicas e segurança de peixes marinhos de varejo. 82, 1-9.

Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H., Hosseini, S.M.H., 2010. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry* 122(1), 161–166. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.02.033

Rahman, M.M., Shibata, M., Nakazawa, N., Rithu, N.A., Nakauchi, S., Hagiwara, T., Osako, K., Okazaki, E., 2022. Non-destructive Approach for the Prediction of pH in Frozen Fish Meat Using Fluorescence Fingerprints in Tandem with Chemometrics. *Fishes* 7(6). DOI: 10.3390/fishes7060364

Schuh, V., Schuh, J., Fronza, N., Foralosso, F.B., Verruck, s., Junior, A.V., 2020. Evaluation of the microbiological quality of minimally processed vegetables. *Food Science and Technology (Brazil)* 40(2), 290–295. DOI: 10.1590/fst.38118

Sriket, P., La-ongnual, T., 2018. Quality Changes and Discoloration of Basa (*Pangasius bocourti*). *Journal of Chemistry* 2018, 1-8.

Rana, S., Gupta, S., Rana, A., Bhushan, S., 2015. Functional properties, phenolic constituents and antioxidant potential of industrial apple pomace for utilization as active food ingredient. *Food Science and Human*

*Wellness* 4(4), 180-187. DOI: 10.1016/j.fshw.2015.10.001

Rezk, B.M., Haenen, G.R.M.M., Vijgh, W.J.F.D., Bast, A., 2002. The antioxidant activity of phloretin: The disclosure of a new antioxidant pharmacophore in flavonoids. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 295(1), 9–13. DOI: 10.1016/S0006-291X(02)00618-6

Tsao, R., Yang, R., Young, J.C., Zhu, H., 2003. Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(21), 6347–6353. DOI: doi.org/10.1021/jf0346298

Wei, L., Zhao, J., Meng, Y., Luo, C., 2020. Antibacterial activity, safety and preservative effect of aminoethyl-phloretin on the quality parameters of salmon fillets. *Lwt* 118, 108874. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.108874

Wang, J., Fang, J., Wei, L., Zhang, Y., Deng, H., Gue, Y., Hu, C., Meng, Y., 2019. Decrease of microbial community diversity, biogenic amines formation, and lipid oxidation by phloretin in Atlantic salmon fillets. *Lwt* 101, 419-426. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.11.039

Wieland, M., Fussenegger, M., 2012. Reprogrammed cell delivery for personalized medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 64(13), 1477–1487. DOI: 10.1016/j.addr.2012.06.005

Xu, F., Wang, C., Wang, H., Xiong, Q., Wei, Y., Shao, X., 2018. Antimicrobial action of flavonoids from *Sedum aizoon* L. against lactic acid bacteria in vitro and in refrigerated fresh pork meat. *Journal of Functional Foods* 40, 744-750. DOI: 10.1016/j.jff.2017.09.030

Yang, K.C., Tasi, C.Y., Wang, Y.J., Lee, C.H., Chen, J.H., Wu, C.H., Ho, Y.S., 2009. Apple polyphenol phloretin potentiates the anticancer actions of paclitaxel through induction of apoptosis in human Hep G2 cells. *Molecular Carcinogenesis* 48(5), 420-431. DOI: 10.1002/mc.20480

Zielinska, D., Zielinski, H., Szawara-nowak, D., 2023. Role of Apple Phytochemicals, Phloretin and Phloridzin, in Modulating Processes Related to Intestinal Inflammation. pp. 1–14.

Zhao, P., Zhang, Y., Deng, H., Meng, Y., 2022. Antibacterial mechanism of apple phloretin on physiological and morphological properties of *Listeria monocytogenes*. *Food Science and Technology (Brazil)* 42, 1–9. DOI: 10.1590/fst.55120

Zhang, T., Wei, X., Miao, Z., Hassan, H., Song, Y., Fan, M., 2016. Screening for antioxidant and antibacterial activities of phenolics from Golden Delicious apple pomace. *Chemistry Central Journal* 10(1), 1-9. DOI: 10.1186/s13065-016-0195-7