

## تعیین حداقل غلظت بازدارندگی عصاره اتانولی پوست پرتقال و تاثیر آن بر فلور باکتری‌های مولد فساد در فیله فیل ماهی (*Huso huso*) در زمان نگهداری در یخچال

فرشته اورعی<sup>۱</sup>، سید ابراهیم حسینی<sup>۱</sup>، سید محمد جلیل ذریه زهرا<sup>۲\*</sup>، رضا صفری<sup>۳</sup>

\*zorrieh@yahoo.com

- ۱- گروه مهندسی کشاورزی، علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- ۲- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
- ۳- پژوهشکده اکولوژی آبزیان دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۷

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۸

### چکیده

امروزه استفاده از عصاره‌های طبیعی به منظور بهبود کیفیت ماهی به دلیل داشتن ویژگی‌های ضد میکروبی رو به افزایش است. در این تحقیق به منظور تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) از عصاره اتانولی پوست پرتقال، روش رقیق‌سازی در آگار بر باکتری‌های سودوموناس آئروجینوزا، اشرشیاکلی و آئروموناس هیدروفیلا استفاده شد. سپس فیله‌های فیل ماهی با محلول‌های عصاره اتانولی پوست پرتقال (بترتیب به نسبت ۵، ۶ و ۷ درصد وزنی/ وزنی) و نمونه شاهد در آب مقطر به مدت ۳۰ دقیقه تیمار شدند. نمونه‌ها در فواصل زمانی معین (صفر، ۵، ۱۰ و ۱۵ روز) از نظر ویژگی‌های میکروبی (شمارش کل باکتری‌های هوازی مزوفیل، سرماگرا و کلی فرم) مورد بررسی قرار گرفتند. میزان MIC عصاره اتانولی پوست پرتقال در شرایط *in vitro* برای هر سه باکتری، ۵ درصد تعیین گردید. بر اساس تجزیه و تحلیل آزمون میکروبی، عصاره‌های پوست پرتقال به طور معنی‌داری سبب کاهش بار میکروبی در فیله فیل ماهی در مقایسه با نمونه کنترل شدند ( $p < 0.01$ ) بطوریکه روند افزایش بار میکروبی در فیله‌های مورد تیمار با عصاره پوست پرتقال ۷٪ کندتر از تیمارهای عصاره پوست پرتقال ۶٪ و عصاره پوست پرتقال ۵٪ بود و توانست زمان ماندگاری ماهی را در مقایسه با نمونه کنترل ۲ برابر کند. لذا، عصاره پوست پرتقال به علت دارا بودن خاصیت ضد میکروبی می‌تواند به عنوان نگهدارنده طبیعی سبب افزایش زمان ماندگاری نمونه‌های ماهی در طول نگهداری در دمای یخچال گردد.

**لغات کلیدی:** عصاره پوست پرتقال، فیل ماهی، حداقل غلظت بازدارندگی، فعالیت ضد باکتریایی

\*نویسنده مسئول

## مقدمه

ماهیان به سبب دارا بودن چربی‌های غیراشباع، پروتئین نسبتاً بالا و همچنین مقادیر قابل ملاحظه ویتامین و مواد معدنی، اهمیت بسیار زیادی در رژیم غذایی انسان دارند (Simopoulos, 1999). ولی محصولات دریایی به دلیل محتوای بالای اسیدهای آمینه آزاد، بازهای نیتروژنه فرار و اسیدهای چرب غیر اشباع، بسیار فسادپذیرتر از گوشت قرمز و مرغ می باشند (Sallam, 2007). ماهی بعد از مرگ به دلیل فعالیت میکروبی، آنزیمی و واکنش‌های اکسیداتیو سرعت فاسد می‌شود. در بین عوامل موثر بر فساد ماهی، آنزیم‌های باکتریایی از مهمترین عواملی هستند که موجب تغییرات نامطلوب در طعم، بو و ظاهر آن می‌گردند (Debbarma et al., 2012). میکروارگانیسم‌های عامل فساد در آبزیان هنگام تجزیه پروتئین‌ها محصولاتی مانند، آمونیاک، ایندول، متان تیول، پوتری سین، تری متیل آمین و سایر ترکیبات بدبو را تولید می‌کنند (Olafsdottir et al., 1997; Davidson et al., 2002). امروزه تمایل مصرف کنندگان به استفاده از افزودنی‌های طبیعی مانند متابولیت‌های میکروبی، عصاره و اسانس‌های گیاهی که می‌توانند به عنوان ترکیبات ضد میکروبی طبیعی در غذاها بکار روند، افزایش یافته است (Debbarma et al., 2012).

اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی به روش‌های متفاوتی بر عوامل میکروبی اثر می‌گذارند که می‌توان به مختل کردن سیستم آنزیمی و تاثیر بر لایه فسفولیپیدی غشاء سلولی آن‌ها اشاره نمود (Burt et al., 2007). مکانیسم عمل آنها مشابه سایر ترکیبات فنولیک است و سبب اختلال در نیروی محرک پروتون، جریان الکترون، انتقال فعال و انعقاد محتوای سلول می‌شوند (Burt, 2004). برخی از اجزاء تشکیل‌دهنده عصاره‌ها، آب‌گریز هستند. این ویژگی آن‌ها را قادر می‌سازد که در لایه لیپیدی غشاء سلول باکتری و میتوکندری پراکنده شوند و ساختار آن‌ها را تغییر دهند که این امر منجر به نشت محتوای سلول می‌شود (Viuda-Martos et al., 2011). ترکیبات فنولی موجود در عصاره‌های گیاهی، غشاء خارجی میکروارگانیسم‌ها را تخریب می‌کنند و سبب خروج لیپوساکاریدها و افزایش نفوذپذیری غشاء سیتوپلاسمی به ATP می‌شوند. خروج ATP منجر به اتمام ذخیره انرژی

سلول و در نتیجه مرگ آن می‌شود (Rezaei et al., 2008).

مرکبات دارای فعالیت ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای بوده و دارای مقادیر بالایی از فلاونوئید می‌باشند (Mokbel et al., 2006). بیشترین تولید مرکبات مربوط به پرتقال (۴۳ میلیون تن) می‌باشد. معروف‌ترین گونه اصلاح شده پرتقال در دنیا تامسون ناول می‌باشد. امروزه کشورهای برزیل و آمریکا بزرگترین تولید کننده پرتقال هستند که حدود ۶۰ درصد پرتقال جهان را تولید کرده و ۸۵ درصد این مقدار را فرآوری می‌کنند (Johnson, 1994). محتوای کل پلی‌فنول‌ها و اسید آسکوربیک در پوست میوه مرکبات از جمله پرتقال بیشتر از میوه پوست‌گیری شده است (Fernandez-Lopez et al., 2004).

Chia-Min و همکاران (۲۰۱۰) به بررسی تاثیر ضد باکتریایی اسانس روغنی استخراجی از پوست پرتقال در مقابل باکتری‌های *Vibrio parahaemolyticus*، *Escherichia coli*، *Salmonella typhimurium* و *Staphylococcus* پرداختند. نتایج نشان داد که اسانس روغنی پوست پرتقال به طور موثری می‌تواند باکتری‌های مذکور را غیر فعال کند. هدف از انجام این تحقیق بررسی خصوصیات ضد میکروبی عصاره الکلی پوست پرتقال در افزایش زمان ماندگاری فیل ماهی در کشور بود.

## مواد و روش‌ها

## آماده‌سازی ماهیان مورد آزمایش

نمونه‌های ماهی از یکی از مزارع پرورش فیل ماهی در استان مازندران (منطقه ساری) در پائیز سال ۱۳۹۵ خریداری و در مجاورت یخ قرار داده شد و انتقال آن‌ها به آزمایشگاه در زنجیره سرد در کوتاهترین زمان صورت گرفت. سپس عملیات شستشو با آب تمیز بهداشتی، سر و دم زنی، تخلیه شکمی و فیله کردن ماهیان (وزن تقریبی هر فیله حدود ۱۰۰ گرم) انجام شد.

## تهیه عصاره پوست پرتقال

پرتقال تامسون سالم و فاقد هرگونه آلودگی قارچی از مرکز تحقیقات مرکبات ساری در همان سال خریداری و عملیات پوست گیری انجام و پوست حاصله به مدت ۲۰ دقیقه در اتانول مطلق جوشان قرار داده شد. سپس در اون

(Rammler, 1967).

### آماده‌سازی و تیمار کردن ماهی‌ها

در این تحقیق در مجموع چهار تیمار (همراه با گروه شاهد) و هر یک با ۳ تکرار در نظر گرفته شد. ماهیان به ۴ بخش تقسیم شدند. یک بخش به عنوان نمونه شاهد در کیسه‌های پلی استر (لایه بیرونی پلی استر و لایه داخلی پلی اتیلن) بسته‌بندی شده و در دمای یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سایر بخش‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در غلظت‌های ۵، ۶ و ۷ درصد عصاره استخراجی از پوست پرتقال غوطه‌ور و بسته‌بندی شدند. سپس نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ روز نگهداری شدند و در روزهای ۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ سه ماهی از هر تیمار به طور تصادفی انتخاب و مورد آزمایش قرار گرفتند.

### آماده‌سازی نمونه‌ها

۲/۵ سانتی‌متر مربع از پوست ناحیه قدامی پشت ماهی با اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی شد. سپس با پنس و اسکالپل استریل پوست‌کنی انجام و ۱۰ گرم از گوشت قسمت زیرین برداشته شده و در ۹۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۸۵ درصد کلرید سدیم استریل قرار داده شده و به مدت ۶۰ ثانیه در یک مخلوط کن آزمایشگاهی همگن شد. سپس، رقت‌های استاندارد ۱/۱۰، ۱/۱۰۰، ۱/۱۰۰۰ جهت کشت تهیه و در طول دوره بطوری عمل شد که در صورت نیاز (بالا بودن بار باکتری و بالا بودن تراکم کلنی‌ها درون پلیت‌ها) از رقت‌های بالاتر نیز استفاده شود. در هر دوره آزمون سه ماهی از هر تیمار به طور جداگانه نمونه برداری شد (استاندارد ۳-۸۹۲۳ ایران، ۱۳۸۵).

### شمارش کلی باکتری‌های هوازی مزوفیل

یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون اولیه و سایر رقت‌های مورد نیاز، به پلیت‌های استریل منتقل شد (برای هر رقت ۲ پلیت در نظر گرفته شد). سپس حدود ۱۵-۱۲ میلی‌لیتر از محیط کشت پلیت کانت آگار با دمای حدود ۴۴ درجه سانتی‌گراد به هر یک از پلیت‌ها افزوده شد. سپس محتوای پلیت‌ها با حرکت چرخشی مخلوط و روی سطح افقی و خنک قرار گرفتند تا کاملاً منعقد شوند. سپس پلیت‌های آماده به صورت وارونه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به ۲۷

با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت خشک گردید. جهت افزایش سطح تماس با حلال ابتدا توسط آسیاب خرد و از الک با مش ۱۴ عبور داده شد. نمونه‌های خشک شده تا زمان آزمایش در دمای زیر صفر درجه نگهداری شد. ۵۰ گرم پوست پرتقال خشک شده با ۳۰۰ میلی لیتر اتانول خالص در یک دکانتور مخلوط و پس از ۲۴ ساعت در دمای اتاق، فاز الکلی با کاغذ واتمن شماره ۱ از مواد گیاهی جدا شد، سپس فرآیند حلال پراکنی با دستگاه تبخیرکننده چرخان انجام شد و نمونه‌ها در در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد بمدت ۴۸ ساعت قرار گرفت. پس از تهیه عصاره خشک، نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ظرف درب‌دار و تیره رنگ استریل نگهداری شد (قره خانی و همکاران، ۱۳۸۸).

### تعیین MIC عصاره اتانولی پوست پرتقال بر باکتری‌های شاخص

به منظور بررسی اثر ضد میکروبی عصاره استخراجی، سویه‌های استاندارد میکروبی شامل باکتری‌های *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC27853)، *colli* *Escherichia* (PTCC8739) و *Aeromonas hydrophila* (PTCC7966)، از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه گردید. برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی عصاره، از روش رقیق سازی بر محیط آگار استفاده شد. غلظت‌های مورد نظر از عصاره (۱-۱۰ درصد) در دی متیل سولفوکسید ۱۰ درصد حل شد و با فیلتر سرنگی ۰/۲۵ میکرون استریل، به محیط کشت استریل "مولر هینتون آگار" اضافه شد. سپس پلیت‌ها در انکوباتور ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شدند. سپس از میکروارگانیزم‌های مزبور کشت‌های تازه تهیه و سوسپانسیونی با غلظت نیم مک فارلند ( $10^8$  cfu/ml) بدست آمد و از آن ۳ میکرولیتر به پلیت‌های مذکور به روش خطی تلقیح گردید، سپس پلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در درگاه نگهداری شدند. بررسی رشد و عدم رشد نمونه‌ها در مقایسه با شاهد صورت گرفت. در آزمایش‌های MIC برای کنترل مثبت از میکروارگانیزم بدون حضور ترکیب ضد میکروبی و از DMSO استریل به عنوان کنترل منفی استفاده شد

## نتایج

### نتایج آزمایش‌های میکروبی در طول دوره نگهداری مقادیر شمارش کلی باکتری‌های هوازی مزوفیل (TVC) *Total Viable Count*

تغییرات TVC گوشت ماهی فیل ماهی در طول دوره نگهداری در شکل ۱ ارائه شده است. شمارش اولیه کل باکتری‌ها در مطالعه حاضر  $\log \text{CFU/g}$  ۳/۳۳-۳/۴۵ بود که بیانگر کیفیت خوب ماهی مورد مطالعه است. مطابق شکل ۱ شمارش کل باکتری‌ها برای همه تیمارها با گذشت زمان به طور معنی‌داری افزایش یافت ( $p < 0.01$ ) بطوریکه این افزایش در تیمار کنترل شدت بیشتری داشت. شمارش کل باکتری‌های هوازی مزوفیل در نمونه‌های تیمار شده با عصاره و نمونه کنترل، در زمان صفر با یکدیگر تفاوت معنی‌دار نداشتند ( $p \geq 0.01$ ). میزان این شمارش در تیمار کنترل تا روز ۵،  $\log \text{CFU/g}$  ۶/۲۷ بود در حالیکه در روز ۱۰ به  $\log \text{CFU/g}$  ۸/۳۹ رسید که فراتر از حد قابل قبول ( $\log \text{CFU/g}$  ۷) بود. میزان TVC در تیمار حاوی عصاره های ۵، ۶ و ۷ درصد از پوست پرتقال در روز ۱۰، بترتیب به  $\log \text{CFU/g}$  ۷/۴۸ و  $\log \text{CFU/g}$  ۶/۶۶ و  $\log \text{CFU/g}$  ۶/۳۷ بود بطوریکه تیمار عصاره پوست پرتقال ۶ و ۷ درصد در حد قابل قبول قرار داشتند و در روز ۱۵، همه تیمارها فراتر از حد قابل قبول ( $\log \text{CFU/g}$  ۷) بود.

### مقادیر شمارش باکتری‌های سرماگرا *Psychrotrophic Bacteria Count* (PTC)

تغییرات PTC گوشت فیل ماهی در طول دوره نگهداری در شکل ۲ نشان داده شده است. میزان ابتدایی شمارش باکتری‌های سرماگرا در مطالعه حاضر  $\log \text{CFU/g}$  ۳/۳۲-۳/۳۷ بود که بیانگر کیفیت خوب ماهی مورد مطالعه است. مطابق شکل ۲ میزان PTC برای همه تیمارها با گذشت زمان به طور معنی‌داری افزایش یافت بطوریکه این افزایش در تیمار کنترل شدت بیشتری داشت.

مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه قرار گرفتند. بعد از پایان این زمان، پلیت‌هایی که حداقل ۳۰ و حداکثر ۳۰۰ پرگنه داشتند، انتخاب و شمارش شدند (Ben-Gigirey *et al.*, 1998).

### شمارش باکتری‌های سرماگرا

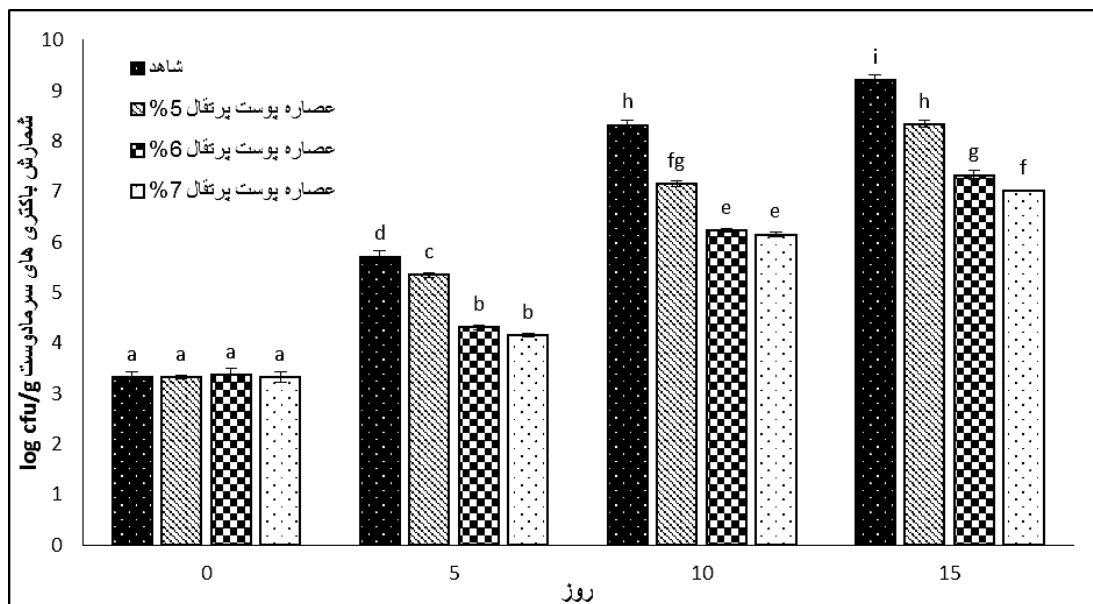
یک میلی لیتر از سوسپانسیون اولیه و سایر رقت‌های مورد نیاز با استفاده از سرمپلرهای استریل به پلیت‌های استریل منتقل گردید. سپس حدود ۱۵-۱۲ میلی‌لیتر از محیط کشت پلیت کانت آگار با دمای حدود ۴۴ درجه سانتی‌گراد به هر یک از پلیت‌ها افزوده شد. سپس محتوای پلیت‌ها بوسیله حرکت چرخشی مخلوط شدند و روی سطح افقی و خنک قرار گرفتند تا کاملاً منعقد شوند. سپس پلیت‌های آماده به صورت وارونه در دمای ۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ روز در گرمخانه قرار گرفتند. سپس پرگنه‌ها شمارش شدند (Ben-Gigirey *et al.*, 1998).

### شمارش باکتری‌های کلی فرم

برای کشت این گروه از باکتری‌ها، از محیط کشت ویولت رد بایل لاکتوز آگار (VRBL) و روش کشت دو لایه استفاده شد. بدین ترتیب، پس از کشت پورپلیت اولیه و سفت شدن محیط، مجدداً محیط اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه قرار گرفتند و پرگنه‌های قرمز شمارش شدند (استاندارد ۹۲۶۳ ایران، ۱۳۸۶).

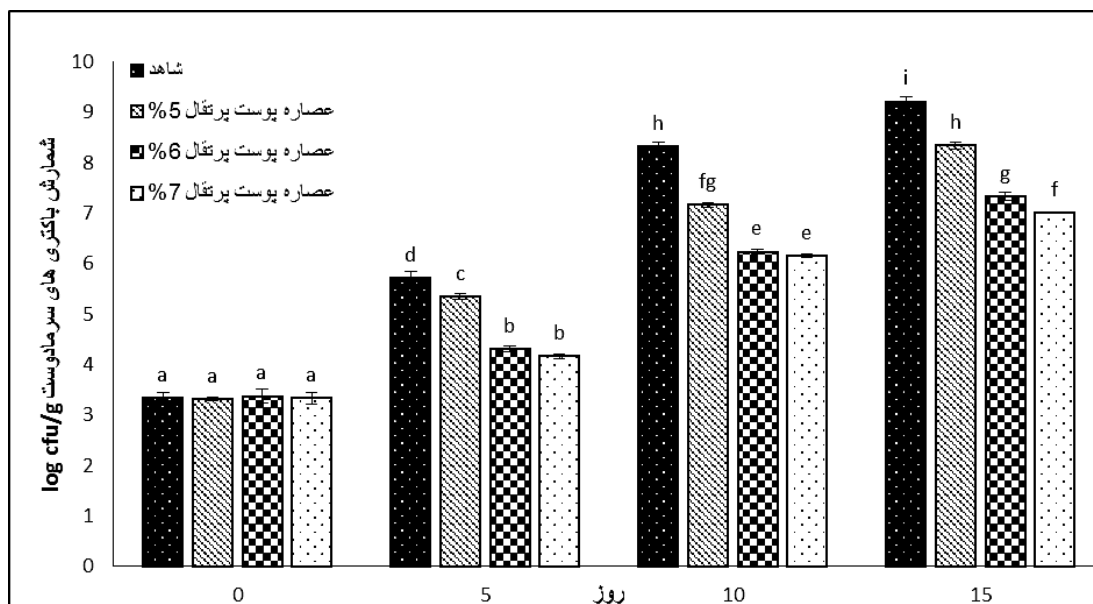
### تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۷ با کمک تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال ۱ درصد انجام گرفت.



شکل ۱: مقادیر شمارش کل باکتری (TVC) برای تیمارهای مختلف نسبت به زمان (log cfu/g)

Figure 1: The Total Viable Count (TVC) for different treatments relative to time in terms of log cfu/g.



شکل ۲: مقادیر باکتری های سرما دوست (PTC) برای تیمارهای مختلف نسبت به زمان (log cfu/g)

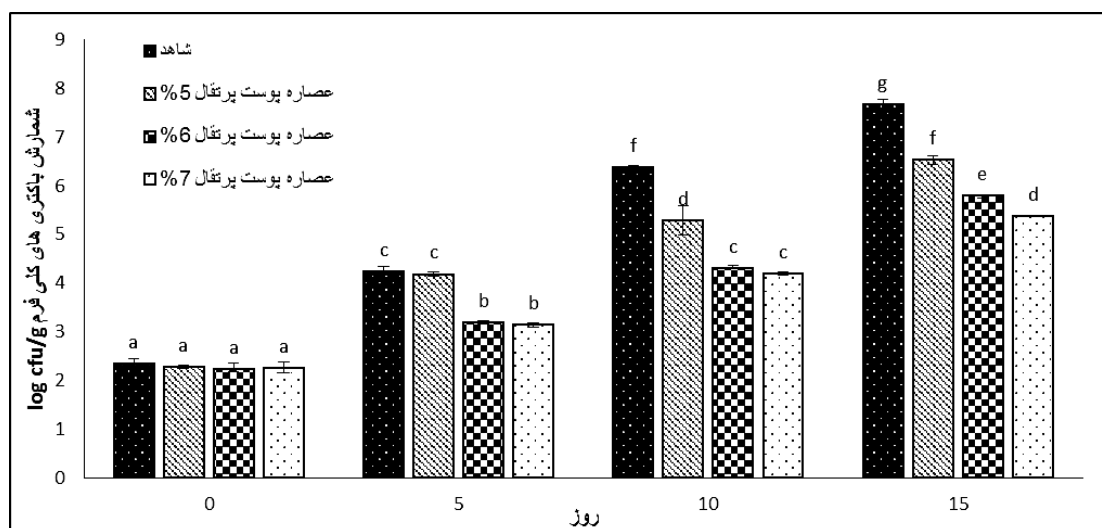
Figure 2: The Psychrotrophic Bacteria Count (PTC) for different treatments relative to time in terms of log cfu/g.

هم از نظر میزان اولیه کلی‌فرم‌ها اختلاف معنی‌داری نداشتند ( $p \geq 0.05$ ). طبق نتایج حاصله، میزان کلی‌فرم‌ها در تمامی تیمارها در طول زمان روندی افزایشی داشت (در روز صفر کمترین و در روز ۱۵ دارای بیشترین مقدار بود) ( $p < 0.05$ ) بطوریکه این افزایش در نمونه شاهد شدت بیشتری داشت و مقدار آن به  $7.67 \log \text{CFU/g}$  رسید. در پنجمین روز از دوره نگهداری، شمارش باکتری‌های کلی‌فرم در تیمار کنترل به  $4.23 \log \text{CFU/g}$  رسید و در روز دهم از  $5 \log \text{CFU/g}$  که حداکثر شمارش قابل قبول باکتری‌های کلی‌فرم می‌باشد، تجاوز کرد (ICMSF., 1986; زارع گشتی و همکاران، ۱۳۹۳). تیمار عصاره پوست پرتقال ۶ و ۷ درصد، شمارش باکتری‌های کلی‌فرم در روز دهم به ترتیب به  $4.30 \log \text{CFU/g}$  و  $4.20 \log \text{CFU/g}$  و در روز ۱۵ به بالاتر از حد مجاز باکتری‌های کلی‌فرم رسید.

میزان این شمارش در تیمار کنترل تا روز ۵،  $5.71 \log \text{CFU/g}$  بود در حالیکه در روز ۱۰ به  $8.32 \log \text{CFU/g}$  رسید که فراتر از حد قابل قبول ( $7 \log \text{CFU/g}$ ) است. میزان PTC در تیمار حاوی غلظت های ۵ و ۶ درصد در روز ۱۰، برترتیب به  $7.16 \log \text{CFU/g}$  و  $7.16 \log \text{CFU/g}$  رسید ولی با این وجود، در روز ۱۵ از خارج از دامنه استاندارد بود در حالیکه در تیمار حاوی عصاره ۷ درصد، این میزان تا روز ۱۵ در حد قابل قبول ( $7 \log \text{CFU/g}$ ) قرار داشت.

### مقادیر شمارش باکتری‌های کلی‌فرم (Coliform Count)

تغییرات کلی‌فرم‌های گوشت فیل ماهی در طول دوره نگهداری در شکل ۳ ارائه شده است. میزان اولیه باکتری‌های کلی‌فرم فیله‌های فیل ماهی در این تحقیق در تمامی تیمارها تقریباً برابر  $2.24 - 2.34$  بود و تیمارها با



شکل ۳: مقادیر باکتری‌های کلی‌فرم برای تیمارهای مختلف نسبت به زمان ( $\log \text{cfu/g}$ )  
Figure 3: The Coliform Count for different treatments relative to time in terms of  $\log \text{cfu/g}$

می‌گردد (Burt, 2004). به طور کلی، هر چه مقادیر مواد فنولی در اسانس یا عصاره بالاتر باشد، خواص آنتی باکتریال آنها بر ضد پاتوژن‌های غذایی نیز بیشتر خواهد بود. مکانیسم اثر این ترکیبات شامل اختلال در غشاء سیتوپلاسمی، بر هم زدن نیروی حرکت پروتونی، جریان

### بحث

از ویژگی‌های مهم اسانس‌ها و اجزاء تشکیل‌دهنده آنها خاصیت آنتی‌باکتریال آنهاست که موجب نفوذ این مواد به لایه‌های غشاء سلول باکتری‌ها و میتوکندری‌ها شده و سبب اختلال در ساختمان آنها و ایجاد نفوذ پذیری بیشتر

v/v ۰/۶۲۵ بود. نتایج حاصله مشخص نمود که آب لیمو غنی از خواص آنتی میکروبی و آنتی اکسیدانی است. مقاومت بیشتر باکتری گرم منفی نسبت به گرم مثبت به دلیل وجود غشاء دو لایه و پیچیده تر در باکتری های گرم منفی می باشد. در دیواره باکتری های گرم مثبت فقط لایه پپتیدوگلیکان ضخیم وجود دارد. بر عکس، باکتری های گرم منفی علاوه بر لایه پپتیدوگلیکان داخلی دارای لایه خارجی از جنس لیپوپروتئین، فسفوپروتئین و پروتئین هستند (Lang and Buchbauer, 2012). این موضوع موجب کاهش اثر عصاره بر باکتری های گرم منفی می شود. وجود ترکیبات فلاونوئیدی، پکتین، کاروتنوئید و ترکیبات فنولی در پوست پرتقال گزارش شده است. با توجه به گزارش هایی که در رابطه با اثرات ضد میکروبی فلاونوئید ها وجود دارد (Yun-Chen *et al.*, 2008)، احتمال می رود بخشی از فعالیت ضد میکروبی پوست پرتقال مربوط به وجود این ترکیبات در آن باشد.

بخشی از فساد در ماهیان تازه به دلیل فعالیت و رشد ارگانیسم های ویژه عامل فساد<sup>۱</sup> (SSOs) می باشد که با تولید متابولیت هایی منجر به نامطلوب شدن طعم و بوی ماهیان و در نهایت غیرقابل مصرف شدن آن ها می شود (Gram and Huss, 1996). بی شک تغییرات میکروبی که به کمک آنزیم ها صورت می گیرد، در نهایت منجر به فساد شده و در نتیجه رشد و فعالیت میکروارگانیسم های عامل فساد، متابولیت هایی تولید می شود که منجر به نامطلوب شدن طعم و بوی ماهیان و در نهایت غیرقابل مصرف شدن آنها می گردد (Gram and Dalgaard, 2002). نتایج مطالعات متعدد نشان داده است که فلور میکروبی جداسازی شده از غذاهای دریایی متفاوت است (Gelman *et al.*, 2001). آلودگی میکروبی اولیه، وضعیت نگهداری و بسته بندی (بسته بندی در هوا، خلاء یا اتمسفر اصلاح شده) و دمای نگهداری، نقش مهمی در تعیین عمر ماندگاری محصولات شیلاتی ایفاء می کند (Arashisara *et al.*, 2004). میزان بار میکروب های عامل فساد در بافت، ارتباط مستقیمی با عمر ماندگاری ماهی دارد (Gram and Huss, 1996).

الکتریکی و انعقاد محتویات سلولی می باشد (Tajkarim *et al.*, 2010). در این پژوهش، میزان MIC عصاره اتانولی پوست پرتقال برای هر سه باکتری (w/w) ۵٪ تعیین گردید.

Espina و همکاران (۲۰۱۱) به بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس روغنی مرکبات و ارزیابی فعالیت ضد میکروبی آنها پرداختند و دریافتند که لیمون ۸۵/۵٪ درصد اسانس روغنی پرتقال را تشکیل می دهد و همچنین MIC اسانس روغنی پرتقال برای باکتری اشرشیاکلی ۳۰ μl/ml و برای باکتری سودوموناس آئروژینوزا بیشتر از ۳۰ μl/ml تعیین شد.

در تحقیق Pittman و همکاران (۲۰۱۱) به بررسی فعالیت اسانس روغنی پوست پرتقال در مقابل اشرشیاکلی و سالمونلا و تاثیر آن بر لاشه گاو نگهداری شده در سرما پرداخته شد. در این تحقیق، MIC برای گونه های مختلف سالمونلا ۰/۸ - ۰/۲ درصد و برای گونه های مختلف اشرشیاکلی ۰/۴ - ۰/۲ درصد اسانس روغنی پرتقال بدون ترپن گزارش شد. در تحقیقی دیگر، Debbarma و همکاران (۲۰۱۲) به بررسی فعالیت ضد میکروبی اسانس های روغنی جدا شده از زنجبیل، اکالیپتوس و پوست پرتقال پرداخته شد و تاثیر آن بر باکتری های بیماری زا با استفاده از روش های انتشار در آگار و روش رقیق سازی مورد ارزیابی قرار گرفت. فعالیت ضد باکتری اسانس پوست پرتقال در ۱۰۰ μl بررسی شد. در این حجم اسانس، باسیلوس سوبتیلیس دارای بیشترین حساسیت بوده و پس از آن استافیلوکوکوس اورئوس و لوکونوستوک منوسیتوزنز در مراتب بعدی قرار داشتند. همچنین اثر ممانعت کنندگی کمی بر سودوموناس آئروژینوزا، سالمونلا تیفی موریوم و اشرشیا کلی داشت و مقاوم ترین باکتری ها به این اسانس ویبریو پاراهمولیتیکوس و آئروموناس هیدروفیلا بود.

در تحقیق Kumari و همکاران (۲۰۱۴) فعالیت ضد میکروبی بر دو باکتری *Escherchia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* بررسی شد. مقدار MIC برای *E. coli* v/v ۰/۶۲۵ برای آب لیمو رسیده و نارس بود. مقدار MIC برای *Pseudomonas aeruginosa* v/v ۰/۳۱۲۵ و برای آب لیمو نارس

<sup>1</sup> Specific Spoilage Organisms (SSOs)

TVC ابتدایی در این تحقیق با نتایج مطالعات انجام شده Fan و همکاران (۲۰۰۸) بر ماهی کپور نقره‌ای غوطه‌ور شده در محلول ترکیبات پلی‌فنولی چای در طول نگهداری در یخ ( $3/1 \log \text{CFU/g}$ ) مطابقت دارد. ذوالفقاری و همکاران (۱۳۹۰) در تحقیقی روند تغییرات میکروبی، شیمیایی و حسی فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را طی نگهداری در دمای یخچال بررسی کردند. در این تحقیق میزان TVC اولیه فیله‌ها ( $3/54 \log \text{cfu/g}$ ) محاسبه شد که به نتایج تحقیق حاضر نزدیک می‌باشد. اکثر محققین معتقدند که فساد ماهیان آب شیرین ظرف مدت ۵-۸ روز نگهداری در دمای یخچال اتفاق می‌افتد (Barakat et al., 2004). کمیته بین‌المللی ویژگی‌های میکروبی غذاها، حداکثر میزان قابل قبول شمارش کل باکتری‌ها را  $7 \log \text{CFU/g}$  پیشنهاد داد (ICMSF, 1986). میزان TVC در مطالعه حاضر در طول زمان نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. افزایش بار باکتریایی با گذشت زمان نگهداری ماهی در دمای یخچال به اثبات رسیده است (Mexis et al., 2009). در تحقیقی میزان شمارش کل باکتری‌ها، در فیله‌های شاهد و فیله‌های ماهی کپور تیمار شده با محلول کارواکرول و تیمول در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد بترتیب به مدت ۴ و ۱۲ روز در حد قابل قبول قرار داشت (Barakat et al., 2004). نتایج تحقیق حاضر با نتیجه مطالعه مذکور مطابقت دارد. Chanthaphon و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعه خود بیان نمودند که لیمون، بتا پنین، گاما تربپنین از ترکیبات اصلی موجود در عصاره پوست پرتقال بودند که نقش موثر و بازدارنده بر رشد میکروارگانیسم‌ها داشتند. از سوی دیگر، Tan و همکاران (۲۰۱۱) بیان کردند که ترکیبات فرار اسانس پوست پرتقال که شامل لیمون، بتا میرسن، آلفا پنین، دکانال، سابینن، لینالول، آلفا-ترپینول بودند، از جمله ترکیبات موثر و بازدارنده بر رشد و فعالیت میکروارگانیسم‌ها هستند. باکتری‌های سرماگرا به عنوان گروهی از باکتری‌ها از گونه‌های مختلف تعریف می‌شوند که به رغم اینکه دمای بهینه رشد و فعالیت متابولیک آنها در محدوده ۲۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد است، قادرند در دمای ۷ درجه سانتی‌گراد یا کمتر رشد کنند (Samaržija et al., 2012). باکتری‌های گرم منفی، گروه اصلی میکروارگانیسم‌های

مسئول فساد ماهی تازه نگهداری شده به صورت سرد هستند (Sallam et al., 2007). سیف زاده و همکاران (۱۳۸۶) به بررسی وجود باکتری‌های سرمادوست در فیله فیل ماهی پرورشی بسته‌بندی شده به روش sous vide پرداختند و میانگین شمارش باکتری‌های سرمادوست را در نمونه شاهد  $3/6 \log \text{CFU/g}$  در دمای ۲ درجه سانتی‌گراد گزارش کردند که با تحقیق حاضر مطابقت دارد. در زمان صفر شمارش باکتری‌های سرماگرا در نمونه‌های تیمار شده با عصاره و نمونه شاهد با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند ( $P > 0/01$ ). محققین از جمله Hozbor و همکاران (۲۰۰۶) و انوری و همکاران (۱۳۸۸) در شمارش باکتری‌های سرمادوست در روز اولیه آزمایش‌ها بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری مشاهده نکردند. بار باکتریایی مجاز برای سایکروتروفیک‌های هوازی (سرماگرا)  $7 \log \text{CFU/g}$  گزارش شده است (Gimenez et al., 2002).

باکتری‌های کلی‌فرم، گرم منفی، بدون اسپور و بی‌هوازی اختیاری می‌باشند. این باکتری‌ها نشانگر کیفیت بهداشتی غذا و آب هستند و در خاک، آب و مدفوع حیوانات خونگرم نیز یافت می‌شوند. این باکتری‌ها بیماری‌زا نیستند، اما حضور آنها در مواد غذایی نشان‌دهنده سایر میکروارگانیسم‌های پاتوژن مدفوعی است (Adams and Moss., 2002). کاهش شمارش باکتری‌های کلی‌فرم و در نتیجه افزایش زمان ماندگاری در نمونه‌های تیمار شده با عصاره، نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار عصاره بکار برده شده به عنوان ترکیب ضد باکتریایی می‌باشد ( $p > 0/01$ ). شمارش باکتری‌های سرماگرا بویژه بوسیله عصاره پوست پرتقال ۷٪ و پس از آن عصاره پوست پرتقال ۶٪ تحت تأثیر قرار گرفت.

زارع گشتی و همکاران (۱۳۹۳) به بررسی اندازه‌گیری تازگی ماهی تیلاپیا با استفاده از روش QIM پرداختند و شمارش باکتری‌های کلی‌فرم در تیمارهای ماهی تیلاپیا شکم خالی در زمان صفر  $\log \text{CFU/g}$  ۲/۱۹ - ۲/۲۰ گزارش کردند و این شمارش با گذشت زمان به طور معنی‌داری افزایش یافت به طوری که بعد از ۹ روز به  $8/4 \log \text{CFU/g}$  رسید.

کامکار و همکاران (۱۳۸۰) به بررسی مقایسه تأثیر روش‌های بسته‌بندی (معمولی و اتمسفر اصلاح شده) بر قابلیت

## منابع

استاندارد ملی ایران، ۳-۸۹۲۳، سال ۱۳۸۵، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام، آماده سازی آزمایش، سوسپانسیون اولیه و رقت اعشاری برای آزمون میکروبیولوژی - قسمت سوم - مقررات ویژه برای آماده سازی ماهی و فراورده های آن.

استاندارد ملی ایران، ۳-۸۹۲۳، سال ۱۳۸۶، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام، روش جامع برای شمارش کلی فرمها - روش شمارش کلنی ها انوری، م.، بهنام، ش.، رضایی، م.، سلطانیان، س. و صفری، ر.، ۱۳۸۸. پتانسیل آنتی باکتریایی و آنتی اکسیدانی باکتریوسین Z در افزایش زمان ماندگاری فیله ماهی قزل آلا (Oncorhynchus mykiss) بسته بندی شده در خلأ در دمای ۴ °C. ششمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، مرداد ۱۳۸۸.

ذوالفقاری، م.، شعبانپور، ب. و فلاح زاده، س.، ۱۳۹۰. بررسی روند تغییرات شیمیایی، میکروبی و حسی فیله ماهی قزل آلا رنگین کمان جهت تعیین مدت زمان ماندگاری آن در دمای یخچال. نشریه شیلات، مجله منابع طبیعی ایران، ۶۴: ۱۰۷۲-۱۱۹.

زارع گشتی، ق.، مطلبی، ع.، مرادی، ی.، خانی پور، ع.ا.، مشائی، ن.، جلیلی، ح.، سیف زاده، م.، رفیع پور، ف. و گلزایی، ف.، ۱۳۹۳. بررسی اندازه گیری تازگی ماهی تیلایا با استفاده از روش Quality Index Method (QIM). مجله علمی شیلات ایران. سال ۲۳. شماره ۳.

سیف زاده، م.، شجاعی آرانی، ا. و مظفری، ن.ا.، ۱۳۸۶. مقایسه و بررسی وجود باکتری های سرمادوست در فیله فیل ماهی پرورشی بسته بندی شده به روش sour vide در یخچال و انجماد. مجله علوم و فنون دریایی. دوره ۶. شماره ۳ و ۴. صفحات ۵۰-۳۹.

قره خانی، م.، قربانی، م.، قره خانی، ا.، صادقی ماهونک، ع.، جبرائیلی، ش. و قاسمی، ی.، ۱۳۸۸. اثر عصاره های پوست و گوشت میوه پرتقال تامسون با پایه های مختلف در جلوگیری از اکسیداسیون روغن

نگهداری گوشت تازه و سرد پرداختند. طبق نتایج حاصله میزان اولیه شمارش باکتری های کلی فرم در این آزمایش در همه تیمارها تقریباً برابر  $3/12 \log CFU/g$  بود و تا پایان زمان آزمایش ها روند افزایشی در همه تیمارها مشاهده شد. Ashie (۱۹۹۶) تحقیقی در رابطه میزان پیشرفت فساد در مدت نگهداری ماهیان پرورشی در شرایط یخ پوش شده انجام داد و نتیجه گرفت که افزایش شمارش تعداد کل باکتری های هوازی از  $5/3 \log CFU/g$  در روز اول به  $6/2 \log CFU/g$  پس از ۱۲ روز افزایش یافته و همچنین در این تحقیق شمارش باکتری های کلی فرم نیز افزایش داشته که نسبت مستقیمی با افزایش ازت آزاد فرار در نمونه ماهی داشته است. نتایج تحقیق حاضر با نتایج مطالعات مذکور مطابقت دارد. به طور کلی، آلودگی از جهت کلی فرمها و اشرشیاکلی نشان می دهد که در مرحله صید و سردسازی یا حمل و نقل بهداشت بخوبی رعایت نشده است (Suvanich et al., 2000).

## نتیجه گیری

با توجه به اینکه پوست پرتقال به عنوان مواد زائد در کارخانه های تولید کننده آبمیوه و کنسانتره تولید می شوند و ترکیبات فنولی زیادی دارند که برای محیط زیست مضر است، اما تاثیرات مثبتی بر سلامت انسان دارند. بنابراین، استفاده از آن به عنوان نگهدارنده طبیعی دارای توجیه اقتصادی است.

به طور کلی، غوطه ور کردن فیله های فیل ماهی در عصاره پوست پرتقال ۷٪ و در درجه بعد عصاره پوست پرتقال ۶٪ و عصاره پوست پرتقال ۵٪ می تواند به طور مؤثری سبب کاهش رشد میکروبی و در نتیجه افزایش زمان ماندگاری فیله های فیل ماهی در مقایسه با نمونه شاهد طی نگهداری در دمای یخچال شود بطوریکه عصاره های مذکور توانستند زمان ماندگاری نمونه ها را نسبت به نمونه شاهد به مدت ۱۰-۵ روز افزایش دهند. بنابراین، افزودن این عصاره گیاهی با دارا بودن خواص ضد میکروبی می تواند به عنوان روشی برای افزایش زمان ماندگاری فیله های فیل ماهی مورد استفاده قرار گیرد.

- applications in foods- a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253. Doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
- Burt, S., Der Zee, R., Koets, A. and De Graaff, A., 2007.** Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 4484-4490. Doi: 10.1128/AEM.00340-07
- Chanthaphon, S., Chanthachum, S. and Hongpattarakere, T., 2008.** Antimicrobial activities of essential oils and crude extract from tropical *Citrus* spp. against food related microorganism. *Songklanakarin Journal of Science Technology*, 30(1): 125-131.
- Chia-Min, L., Shane-Rong, S., Shu-Chen, H. and Yung-Hsiang, T., 2010.** Determination of bactericidal efficacy of essential oil extracted from orange peel on the food contact surfaces. *Food Control*, 21(2): 1710-1715. DOI: 10.1016/j.foodcont.2010.06.008
- Davidson, P.M. and Harrison, M.A., 2002.** Resistance and adaptation of food antimicrobials, sanitizers and other process control. *J. Food Technology*, 59(11): 69-78.
- Debbarma, J., Kishre, P., Nayak, B., Kannuchamy, N. and Gudipati, V., 2012.** Antibacterial activity of Ginger, Eucalyptus, Sweet orange peels essential oils on fish-borne bacteria. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37(5): 1745-4549. DOI: 10.1111/j.1745-4549.2012.00753.x
- سویا. فصلنامه گیاهان دارویی. سال دهم، دوره دوم، شماره ۳۸.
- کامکار، ا.، رضایی مجاز، م. و علی پزند، ن.، ۱۳۸۰.** مقایسه تاثیر روشهای بسته‌بندی (معمولی و اتمسفرهای اصلاح شده) بر قابلیت نگهداری گوشت تازه و سرد نیمچه‌های گوشتی. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. دوره ۵۶. شماره ۳. صفحات ۱۷-۲۲.
- Adams, M.R. and Moss, M.O., 2002.** Food Microbiology, 3rd Edition, The Royal Society of Chemistry, Cambridge. 463 P.
- Arashisara, S., Hisara, O., Kayab, M. and Yanik, T., 2004:** Effects of modified atmosphere and vacuum packaging on microbiological and chemical properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. *Food Microbiology*, 97: 209-214. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.024
- Ashie, I., 1996.** Spoilage and shelf life extension of fresh fish and shellfish. *Journal of Food Science*. pp.36-121. Doi: 10.1080/10408399609527720
- Barakat, S.M., Mahmoud Yamazaki, K., Milyasita, K., Il- Shik, Sh., Dong-Suk, Ch. and Suzuki, T., 2004.** Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds. *Food Microbiology*, 21: 657-666.
- Ben-Gigirey, B., Vieites Baptista de Sousa, J.M., Villa, T.G. and Barros-Velazquez, J., 1998.** Change in biogenic amines and microbiological analysis in albacore (*Thunnus alalunga*) muscle during frozen storage. *Journal of Food Protection*, 61: 608-615.
- Burt, S., 2004.** Essential oils: Their antibacterial properties and potential

- Espina, L., Somolinos, M., Loràn, S., Conchello, P., García, D. and Pagàn, R., 2011. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control*, 22: 896-902. Doi: 10.1016/j.foodcont.2010.11.021
- Fan, W., Chi, Y. and Zhang, S., 2008. The use of a tea polyphenol dip to extend the shelf life of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) during storage in ice. *Food Chemistry*, 108: 148–153. Doi: 10.1016/j.foodchem.2007.10.057.
- Fernández-López, J., Fernández-Ginés, J.M., Aleson-Carbonell, L., Sendra, E., Sayas-Barberá, E. and Pérez-Alvarez, J.A., 2004. Application of functional citrus by-products to meat products. *Trends in Food Science and Technology*, 15(3-4): 176-185.
- Gelman, A., Glatman, L., Drabkin, V. and Harpaz, S., 2001. Effects of storage temperature and preservative treatment on shelf life of the pond raised freshwater fish, silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Journal of Food Protect*, 64: 1584–1591. Doi: 10.4315/0362-028X-64.10.1584
- Gimenez, B., Roncale, P. and Beltran, J.A., 2002. Modified atmosphere packaging of filleted rainbow trout. *Journal of Science and Food Agriculture*, 84: 1154–1159. Doi: 10.1002/jsfa.1136.
- Gram, L. and Dalgaard, P., 2002. Fish spoilage bacteria – problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 262–266. Doi: 10.1016/0168-1605(96)01134-8
- Gram, L. and Huss, H.H., 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 121–137. Doi: 10.1016/0168-1605(96)01134-8
- Hozbor, M.C., Saiz, A.I., Yeannes, M.I. and Fritz, R., 2006. Microbiological changes and its correlation with quality indices during aerobic iced storage of sea salmon (*Pseudoperca semifasciata*). *LWT Food Science and Technology*, 39: 99–104. Doi: 10.1016/j.lwt.2004.12.008
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods), 1986. Microorganisms In foods. 2. Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications (2nd ed.). Buffalo, NY: University of Toronto Press.
- Johnson, T.M., 1994. Trends in citrus juice processing. *Citrus Magazine*, 75(6): 42\_50.
- Kumari, S., Neelanjana, S. and Handique, A.K., 2014. Antioxidant and antimicrobial potential of ripen and unripe juice of *Citrus limon*. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention*, 3(6): 18-20.
- Lang, G. and Buchbauer, G., 2012. A review on recent research results (2008\_2010) on essential oils an antimicrobials and antifungals. *Flavour and Fragrance Journal*, 27: 13-39. Doi: 10.1002/ffj.2082.
- Mexis, S.F., Chouliara, E. and Kontominas, M.G., 2009. Combined effect of an oxygen absorber and oregano essential oil on shelf life extension of rainbow trout fillets stored at 4°C. *Journal of Food Microbiology*, 26: 598-605. Doi: 10.1016/j.fm.2009.04.002.

- Mokbel, M.S., Watanabe, Y., Hashinaga, F. and Suganuma, T., 2006.** Purification of antioxidant and antimicrobial substance of ethyl acetate from Buntan (*Citrus grandisosbeck*) fruit peel. *Pakistan Journal of Biological Science*, 9(1): 50-1445.
- Olafsdottir, G., Martinsdottir, E., Oehlenschlager, J., Dalgaard, P., Jensen, B., Undeland, I., Mackie, I.M., Henahan, G., Nielsen, J. and Nilsen, H., 1997.** Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends in Food Science and Technology*, 8(8): 258-265.
- Pittman, C., Pendieton, S., Bledar, B., Obryan, C.A., Keith, E., Goodridge, L. and Grandall, G., 2011.** Activity of citrus essential oils against *Escherichia Coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. and effect on beef subprimal cuts under refrigeration. *Journal of Food Science*, 76(6): 433-438. Doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02253.x
- Rammler, D.H., 1967.** The effect of DMSO on several enzyme systems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 141(1), 291-299.
- Rezaei, M. and Hosseini, S., 2008.** Quality assessment of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chilled storage. *Journal of Food Science*, 73: 93-6. Doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00792.
- Sallam, K.I., 2007.** Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Journal of Food Control*, 18: 566-75. Doi: 10.1016/j.foodcont.2006.02.002
- Sallam, K.I., Ahmed, A.M., Elgazzar, M.M. and Eldaly, E.A., 2007:** Chemical quality and sensory attributes of marinated Pacific saury (*Cololabis saira*) during vacuum-packaged storage at 4°C. *Food Chemistry*, 102: 1061-1070. Doi: 10.1016/j.foodchem.2006.06.044
- Samaržija, D., Zamberlin, Š. and Pogačić, T., 2012.** Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. *Mijekarstvo*, 62(2): 77-95.
- Simopoulos, A.P., 1999.** Essential fatty acids in health and chronic disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70(3): 560-569. Doi: 10.1093/ajcn/70.3.560s
- Suvanich, V., Marshall, D.L. and Jahncke, M.L., 2000.** Microbiological and color quality changes of channel catfish frame mince during chilled and frozen storage. *Journal of Food Science*, 65(1): 151-4. Doi: 10.1111/j.1365-2621.2000.tb15971
- Tajkarim, M.M., Ibrahim, S.A. and Cliver, D.O., 2010.** Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21: 1118-1199. Doi: 10.1016/j.foodcont.2010.02.003
- Tan, Q., Ai, M. and Minh, N., 2011.** Volatile constituents of essential oils from *citrus sinensis* grown in tine giant province, Vietnam. *Asian Journal of Food and Agro Industry*, 4(3): 183-186.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J. and Perez-Alvarez, J., 2008.** Antibacterial activity of Lemon (*Citrus lemon* L.), Mandarin (*Citrus reticulata* L.), Grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and Orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Journal of Food Safety*, 28(4): 567-576. Doi: 10.1007/s11258-013-0196-8.

## Determination of minimum inhibitory concentration of the ethanolic extract of orange peel and the effects on the growth inhibition of *Huso huso* filet bacteria during refrigerated storage

Oraii F.<sup>1</sup>; Hosseini S.E.<sup>1</sup>; Zorriehzahra S.M.J.<sup>2</sup>; Safari R.<sup>3</sup>

\*zorrieh@yahoo.com

1-Department of Agricultural Engineering, Food Science and Technology, Islamic Azad University, Science and Research Branch of Tehran, Iran

2- Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

3- Caspian Sea Ecology Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Sari, Iran

### Abstract

Using natural extracts, as a source of anti-microbial, to improve the quality of fish is increasing. In this study, the ethanolic extract of orange (*Citrus sinensis* L.) was used due to having this property. Agar dilution method was employed in order to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of the ethanolic extract of orange peel on *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* and *Aeromonas hydrophila* bacteria. The fish fillets were treated with aqueous solution of orange peel extract (5, 6 and 7% w/w) and dipped in distilled water for 30 minutes. These samples were analyzed during storage (0, 5, 10 and 15 days) for the total viable count (TVC), psychrotrophic count, coliform count. The MIC of the ethanolic extract of orange peel on the bacteria was 5%. The results of the microbial analysis indicated that the orange peel extracts reduced the growth of the bacterial counts in contrast control sample ( $p<0.01$ ). The ethanol extract of orange peel as a natural preservative could increase shelf life during refrigerated storage because of having antimicrobial properties.

**Keywords:** Orange peel extract, *Citrus sinensis*, *Huso huso*, Minimum Inhibitory Concentration, Antibacterial activity

---

\*Corresponding author