

## **2. הדו"ח המפורט**

### **א. דף פותח לדו"ח**

**שם התוכנית:** פיתוח ציפוי פולימרי חדשני בעל פעילות אנטימיקרוביאלית להארכת חיי מדף של דגים טריים.

**קוד הזיהוי:** 421-0235-12

השנה הקלנדרית עליה מוגש הדו"ח: 2012

שנת הדו"ח שנייה מתוך סה"כ שנתיים.

### **שמות החוקרים בקבוצות המחקר:**

**ד"ר משה שמש,** המחלקה לאיכות מזון ובטיחות, מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני (עובד תקן).  
moshesh@volcani.agri.gov.il

**פרופ' שנאן הרפז,** המחלקה לעופות ומדגה, מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני (עובד תקן).  
harpaz@volcani.agri.gov.il

**ד"ר ילנה פוברנוב,** המחלקה לאיכות מזון ובטיחות, מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני (עובדת תקן).  
elenap@volcani.agri.gov.il

**גב' ורדה זקין,** המחלקה לאיכות מזון ובטיחות, מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני (עובדת תקן).  
veredz@volcani.agri.gov.il

### **התקציר:**

#### **1. הצגת הבעיה**

כיום, ישנם הפסדים משמעותיים לענף המדגה בישראל עקב זיהומים מיקרוביאליים בדגים לאחר שלייתם מן הבריכות הגורמים לקלקול הדגים תוך תקופה קצרה יחסית. הארכת חיי המדף תאפשר הגדלת זמן שיווק הדגים באופן שיקטין משמעותית את ההפסדים הנובעים מקלקול, המוערכים ב-10-15% מכלל הדגים המשווקים (נזק של 2000-3000 טון בשנה). תוכנית מחקר זו נועדה לפתח ציפוי האנטי-מיקרוביאלי לעיכוב מיקרואורגניזמים אשר מזהמים דגים טריים ומסוגלים להתרבות בתנאי האחסון.

#### **2. מטרת המחקר** כפי שהופיעו בהצעת המחקר

מטרת המחקר היא לפתח אריזה אנטימיקרוביאלית חדשנית הכוללת ציפוי פולימרי בשילוב שמנים אתריים.

#### **3. שיטות העבודה**

דגי בריכות ממדגה מינהל המחקר החקלאי ומדגה דור, לאחר שלייתם, צוננו במי קרח, צופו בציפוי ואוחסנו בטמפרטורה של  $2-4^{\circ}\text{C}$ . הציפוי האנטימיקרוביאלי משלב פולימר מסוג כיטוזן יחד עם שמן אתרי שמקורו מצמח התבלין אורגנו. במהלך האחסון, נעשה דיגום של רקמות הדג מדי מספר ימים לצורך אנליזה מיקרוביאלית וסנסורית.

#### 4. תוצאות עיקריות

פותח ציפוי אנטי-מיקרוביאלי שמראה תכונות פיסיקליות וויזואליות משביעות רצון. הציפוי הראה עיכוב משמעותי בהתרבות אוכלוסיית חיידקים שעל פני דגי אמנון. אך פעילותו האנטי-מיקרוביאלית הייתה פחות יעילה בדגי מכלוא של באס הסלע ובאס לבן מברכות משק דור. בנוסף, אנליזה סנסורית הצביעה כי הדגים ללא ציפוי כיטוזן נראו איכותיים יותר מבחינת מדדים אורגנולפטיים.

#### 5. מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות

הממצאים מצביעים כי העומס המיקרוביאלי התחלתי משפיע מאוד על יעילות האנטימיקרוביאלית של הציפוי. כמו כן, זנים מסוימים המאכלסים את פני שטח הדגים יכולים להיות עמידים יותר לציפוי. ככל הנראה, הפעילות האנטימיקרוביאלית של הציפוי נובעת בעיקר הודות לשמן האתרי, לכן עדיף להתמקד בשימוש בו לצורך עיכוב התרבות מיקרואורגניזמים ולהארכת חיי מדף של דגים טריים. כמוכן, צריך לקחת בחשבון שהציפוי עלול להשפיע על שינוי אוכלוסיות החיידקים של הדגים אשר מהווה נקודה בעייתית בדרך לפיתוח הציפוי.

#### הצהרת החוקר הראשי:

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: **פ-\*** / לא (מחק את המיותר)

\* במידה וכן, על החוקר להמציא פרטים על הגוף שבאמצעותו מופץ הידע (כמו: שה"ם)

חתימת החוקר \_\_\_\_\_ תאריך: 29.5.14

עמוד	תוכן העניינים
1.....	דף פותח לדו"ח.....
1.....	שמות החוקרים בקבוצת מחקר.....
1.....	התקציר.....
4.....	גוף דו"ח מחקר.....
4.....	מבוא.....
6.....	מטרות המחקר.....
6.....	פירוט עיקרי הניסויים שבוצעו וכלל התוצאות שהתקבלו לתקופת הדו"ח.....
10.....	דיון.....
12.....	רשימת ספרות.....

### מבוא

דגים טריים כמוצר מזון. דגים הינם מוצרי מזון חיוניים ומומלצים לתזונת האדם. במקומות רבים בעולם משמש הדג כמקור עיקרי לחלבון וליסודות מזון נוספים. ישנן מדינות שכלכלתן מתבססת באופן ניכר על יצוא של דגים (Motalebi et al., 2009). צריכת דגים טריים או מצוננים מספקת לגוף האדם ויטמינים ומינרלים, וביניהם חומצות שומניות מסוג אומגה 3. בין מגוון מיני הדגים המגודלים במדגה בבריכות בארץ, הנפוצים ביותר הם אמנון וקרפיון (Harpaz et al., 2003; Zakin & Gollop, 2008). לאחר שליית הדגים מהבריכות, הם מועברים לבית אריזה, לאחסון קצר טווח, בקרח ולאחר מכן מאוחסנים בקירור  $4^{\circ}\text{C}$ . משך חיי המדף של דגים בתנאי אחסון אלו הוא בין 9-14 ימים ומשתנה בהתאם לסוג הדג ולעומס המיקרוביאלי ההתחלתי.

כיום, ישנם הפסדים משמעותיים לענף המדגה בישראל עקב זיהומים מיקרוביאליים המתפתחים בדגים לאחר שלייתם מן הבריכות וגורמים לקלקולם. הארכת חיי המדף תאפשר הגדלת זמן שיווק הדגים באופן שיקטין משמעותית את ההפסדים הנובעים מקלקול, המוערכים ב-10-15% מכלל הדגים המשוקים (נזק של 2000-3000 טון בשנה). על מנת להקטין את ההפסדים הכלכליים שנובעים מקלקול דגים וסוגי מזונות אחרים על ידי מיקרואורגניזמים, ישנה חשיבות רבה בפיתוח גישות אנטימיקרוביאליות חדשניות לשימור המזון.

מיקרופלורה של דגים למאכל. לכל מוצר מזון ישנה מיקרופלורה ייחודית המשתנה בהתאם לתהליכי עיבוד המוצר. דגים הינם מוצר מזון המתקלקל מהר במהלך אחסון במקרר, זאת עקב התרבות חיידקים הנמצאים באופן טבעי על פני הדגים או כתוצאה מזיהום משני (Gomez-Estaca et al., 2010). דגי המאכל, כמו מוצרי מזון אחרים, מהווים סביבה נוחה להתרבות מיקרואורגניזמים שונים. פעילות מיקרוביאלית של חיידקים הינה גורם מרכזי המשפיע על קלקול של דגים טריים באחסון (Harpaz et al., 2003; Gram & Huss, 1996). מיני המיקרואורגניזמים מושפעים מהסביבה בה גדלים הדגים, מתנאי התברואה להם נחשפים הדגים מרגע שלייתם ומתנאי האחסון בהמשך, עד לצריכתם. האיכות המיקרוביאלית של הדגים, וכמו כן, משך חיי המדף, תלויים באופן ישיר רמות זיהום מיקרוביאלי של בריכות הגידול ובטמפרטורת האחסון (Gelman et al., 2001; Hozbor et al., 2006).

במהלך האחסון, משתנה הרכב המיקרו-פלורה בהתאם למיני החיידקים המסוגלים לשרוד בתנאי האחסון. לעיתים קרובות, סוג אחד של חיידק משתלט על כל האוכלוסייה ויוצר מטבוליטים שמשנים את המרקם, הטעם והריח של הדג. גורמים נוספים, בלתי ידועים, עלולים להשפיע אף הם על התפתחות אוכלוסיית החיידקים ומשנים את המיקרופלורה של דגי המאכל ותורמים לתהליך הקלקול (Hozbor et al., 2006). אוכלוסיית החיידקים ההתחלתית ברובה מורכבת מחיידקים מזופילים וחיידקים גרם חיוביים כמו: *Bacillus*, *Micrococcus* ו-*Corynebacterium*. דווח שבמגוון דגים לאחר כ-10 ימים אוכלוסיית

החיידקים מתחלפת ומתפתחים המקלקלים העיקריים של דגים טריים כמו-*Shewanella* ו-*Pseudomonas* (Gelman et al., 2001; Gram & Huss, 1996).

**ציפויי מזון לשיפור איכות מיקרוביאלית.** ציפויים אכילים יכולים לעזור בשמירה על איכות ואורך חיי המזדף של מוצרי המזון (Valencia-Chamorro et al., 2011). ציפויים מבוססים על חומרים טבעיים ולכן בטוחים ואינם מזהמים, בעלי עלות נמוכה ומראה אסתטי. ציפויים מפחיתים את קצב איבוד הנוזלים והחלפת הגזים. בנוסף ניתן לקבל ציפויים בעלי פעילות אנטימיקרוביאלית (Gennadios et al., 1997). הציפויים האכילים מהווים מערכות אריזה אלטרנטיביות, שיכולות להחליף אריזות מחומרים סינטטיים, או להקטין חלקית השימוש בהם (Valencia-Chamorro et al., 2011). כיום, קיימות אסטרטגיות רבות בתחום האריזות, המאפשרות עיכוב של קלקול המזון והתפתחות פתוגנים, אך לא קיים פתרון אוניברסאלי המאפשר לשפר איכות מיקרוביאלית של דגים (Gomez-Estaca et al., 2010).

לפיכך, הרעיון המרכזי במחקר הנוכחי הינו לפתח ציפוי אנטימיקרוביאלי חדשני המשלב כיטוזן ושמן אתריים. השאיפה היא שהציפוי יביא לעיכוב משמעותי של התרבות חיידקים המזהמים דגים טריים מבלי לפגוע באיכות המוצר. על כן, פיתוח הציפוי יאפשר הקטנת קצב התרבות חיידקים זאת ללא זיהום של המזון עם חומרים משמרים. טיפול מעין זה יהפוך את מוצרי המזון לאטרקטיביים יותר ובכך יגדיל את היקפי המכירות.

**כיטוזן כמרכיב הציפוי האנטימיקרוביאלי.** כיטוזן הינו הנגזר של כיטין, פוליסכריד המורכב מיחידות של  $\beta$ -(1-4)-linked D-glucosamine ו-N-acetyl-D-glucosamine, אכיל ובעל פעילות אנטימיקרוביאלית טבעית (Dutta et al., 2009). במחקר קודם נמצא כי כיטוזן יכול לשמש כציפוי לדגים, המצמצם שינויים באיכות במשך האחסון (Mohan et al., 2012). כיטוזן הוא חומר היפואלרגני ויציב. בשל פעילותו, בטיחותו והתכלותו הביולוגית, כיטוזן זכה ליישומים נרחבים בתעשיית המזון; נמצא כי כיטוזן יכול לקלוט שומנים, לנטרל מתכות רעילות ולפעול כחומר אנטימיקרוביאלי (Rabea et al., 2003).

באופן כללי, נמצא כי כיטוזן יעיל יותר נגד חיידקים גרם חיוביים מאשר נגד גרם שליליים (Devlieghere et al., 2004). סבורים כי מנגנון הפעולה האנטימיקרוביאלי של כיטוזן כולל עלייה בחדירות של הממבראנה הציטופלזמטית (Dutta et al., 2012). בחיידקים גרם שליליים הממבראנה החיצונית אינה מאפשרת, כנראה, לכיטוזן לבוא במגע עם הממבראנה הציטופלזמטית ולכן היעילות שלו יותר נמוכה. מספר מחקרים הראו שהפעילות הביולוגית של כיטוזן תלוי באופן משמעותי במשקלו המולקולארי (MW) ומידת אצטילציה. שני הפרמטרים משפיעים על הפעילות מיקרוביאלית של כיטוזן באופן עצמאי, למרות הסברה כי ההשפעה של משקל מולקולארי על פעילות מיקרוביאלית גדולה מהשפעה של אחוז אצטילציה. בנוסף הם משפיעים גם על תכונות אחרות כמו מסיסות במים וצמיגות (Goy et al., 2009).

**שמן אתרי.** הפעילות האנטימיקרוביאלית של שמנים צמחיים ידועה כבר שנים רבות. שימוש בתכונות אנטימיקרוביאליות ואנטיפונגליות של שמנים אתרים צמחיים נפוץ בשימור תוצרת חקלאית (Burt, et al., 2004). התכונות האנטימיקרוביאליות של השמנים האתרים מיוחסות לקבוצות פנוליות (Royo et al., 2003). בעבודה קודמת נמצא כי שמן אורגנו מעכב ביעילות מיקרואורגניזמים על פני דגים טריים (Harpaz et al., 2003). מלבד זאת שמן אתרי אורגנו נחשב כאפקטיבי ביותר כנגד החיידקים הגורמים לקלקול בדגים (Burt, 2004). אף על פי כן, השימוש בשמנים אתריים במזון מוגבל עקב יכולתם להעניק למזון טעמים וריחות שונים מטבעיים, כמו במקרה של דגים (Gomez-Estaca et al., 2010).

### מטרות המחקר

מטרת המחקר הייתה לפתח אריזה אנטימיקרוביאלית חדשנית הכוללת ציפוי פולימרי בשילוב שמנים אתריים; זאת על ידי מציאת שילוב מתאים של כיטוזן ושמן אתרי בעל פעילות אנטימיקרוביאלית להארכת חיי המדף של דגי בריכות בישראל.

### פירוט עיקרי הניסויים שבוצעו וכלל התוצאות שהתקבלו לתקופת הדו"ח

**הכנת ציפוי אנטימיקרוביאלית.** כיטוזן עם 75% דהאצטילציה, בעל משקל מולקולרי בינוני (Sigma) שימש כחומר גלם לציפוי. זאת, על מנת לקבל תכונות פיסיקליות אופטימאליות כגון כושר מעבר אוויר, כושר איטום, רמות טובות של מסיסות ואלסטיות של שכבת הציפוי. כחומר פעיל טבעי השתמשנו בשמן אתרי ממקור צמח אורגנו, המכיל אחוז גבוה של קרבקרול (carvacrol) אשר התקבל מד"ר נתיב דודאי (מנהל המחקר החקלאי). הקרבקרול מהווה החומר הפעיל העיקרי בשמן אתרי אורגנו, לכן הוא שימש גם כביקורת חיובית בחלק מהניסויים. הכנת תמיסת הציפוי נעשתה על ידי המסה של כיטוזן (1%) במים חומציים והוספת שמן אתרי פעיל (0.05%), אשר עבר הומוגניזציה לקבלת מרקם ציפוי אחיד.

**יישום הציפוי.** בניסויים מקדימים נבדקו שתי דרכי יישום: מריחה על ידי מברשת וריסוס הציפוי על דגים. מכיוון שריסוס הציפוי היה בעייתי עקב צמיגות יחסית גבוהה של כיטוזן, דרך יישום זאת נדחתה. ציפוי הדג התבצע ע"י מריחה של הציפוי בעזרת מברשת משני צדדיו, על כל שטח פניו של הדג. ציפוי הדג עם שמן אתרי בלבד נעשה ע"י טפטוף ופיזור השמן על שטח פניו של הדג. לאחר היישום, הדג הועבר למנדף לצורך ייבוש הציפוי, למשך כשעה. הדגים הוכנסו לשקיות פוליאאתילן, כל דג בנפרד, ואוחסנו ב-2-4°C עד ליום הדיגום. בנוסף, הוכנו דוגמאות ביקורת בהן הדגים (ללא ציפוי כיטוזן) כוסו בשקיות פוליאאתילן אשר אוחסנו גם כן בתא קירור. לפיכך, בסה"כ הוכנו 4 קבוצות שונות של דוגמאות: (א) דג עטוף בשקית פוליאאתילן, (ב) דג מצופה בשמן אתרי ועטוף בשקית פוליאאתילן, (ג) דג מצופה בכיטוזן ועטוף בשקית פוליאאתילן, (ד) דג מצופה בכיטוזן ושמן אתרי ועטוף בשקית פוליאאתילן.

**הדגים.** דגי בריכות התקבלו ממדגה מינהל המחקר החקלאי (האמנון, *Oreochromis aureus*) וחוות דור (מכלוא של באס הסלע ובאס לבן, hybrid striped bass). יש לציין שדגי מכלוא הבאס נכנסו בהצלחה רבה לשיווק מקומי ומהווים כעת דגים נפוצים מאוד לשיווק בארץ. לאחר שלייתם, הדגים הוכנסו לתוך מיכלים עם מי קרח והועברו למעבדה בה עברו טיפול מתאים. כמו כן נקנו דגי דניס (*Sparus aurata*)

בחנות דגים מקומית לצורך ביצוע של ניסויים ראשוניים. הדוגמאות אוחסנו בחדר קור בטמפרטורה של בין 2 ל-4°C.

**דיגום רקמת הדג.** הדיגום נעשה באזור הנמצא בין סנפיר הגב לבין סנפיר הבטן, בחלק העליון של הדג, באזור שבו רקמת השריר היא העבה ביותר. בדיקת רקמת הדג נעשה ע"י חיתוך פיסת רקמה ע"י להב סטרילי. אזור הדיגום מוגדר ע"י מסגרת מתכת, שעברה חיטוי, ובעלת שטח  $6.25 \text{ cm}^2$  וגובה של 1cm. רקמת הדג המצופה מועברת לשקיות סטומכר עם פילטר בתוך תמיסת NaCl 0.9% ועוברת ריסוק ליצירת תרחיף במכשיר סטומכר למשך 5 דקות.

אנליזה מיקרוביאלית. הערכת רמת זיהום הדוגמאות נעשתה ע"י ספירה כללית של מושבות החיידקים (CFU) לאחר זריעת הדגימות על צלחות אגר עם מצע גידול עשיר. לזיהוי המיקרואורגניזמים העיקריים שמזהמים את הדוגמאות השתמשנו בשיטות מולקולאריות. לשם כך נעשתה הפקת DNA ממושבות מבודדות ע"י (Sigma) GenElute Bacterial Genomic DNA Kit. זיהוי התבדידים נעשה על ידי PCR בעזרת פריימרים אוניברסאליים של 16S rDNA ואנליזה של רצף.

**קביעת ריכוז אנטימיקרוביאלי של כיטוזן ושמן אתרי.** קביעת פעילות אנטימיקרוביאלית תעשה בשיטת minimal inhibitory concentration (MIC) על נציגים של אוכלוסיית החיידקים הדומיננטית. לתרבית טרייה של חיידקים בפאזה סטציונארית, בפלטות של פוליסטרין עם 96 באריות, מוסיפים ריכוזים עולים של החומר הנבדק, במצע גידול נוזלי (Lambert et al., 2001). הפלטות מוכנסות לאינקובציה ב-30°C למשך לילה והריכוז המינימלי שבו ישנו עיכוב בגידול החיידקים נקבע כ-MIC. אנליזה סנסורית של הדוגמאות. במקביל לבדיקות המיקרוביאליות נעשתה גם אנליזה איכות הדגים במדדים המתבססים על חוש הראיה, הריח והמישוש. המדדים העיקריים שנבדקו הם: שינויים בצבע העור, צבען וצורתן של העיניים, טונוס השריר, צבעם של הזימים ומצבו של חלל הבטן.

### תמצית התוצאות העיקריות

כשלב התחלתי של הפרויקט, פותח ציפוי אנטי-מיקרוביאלי המשלב כיטוזן ושמן אתרי שהראה תכונות פיסיקליות וויזואליות משביעות רצון (איור 1). הציפוי השתלב בצורה טובה על פני הדגים ללא היווצרות גושים או קמטים. לפי הסתכלות ויזואלית לא נראו הבדלים משמעותיים בין דג מצופה לבין הדג ללא ציפוי (איור 1).

**ללא ציפוי**

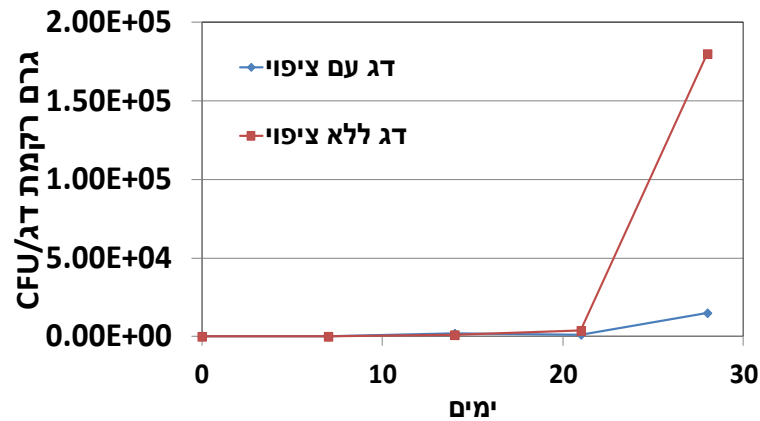


**עם ציפוי**

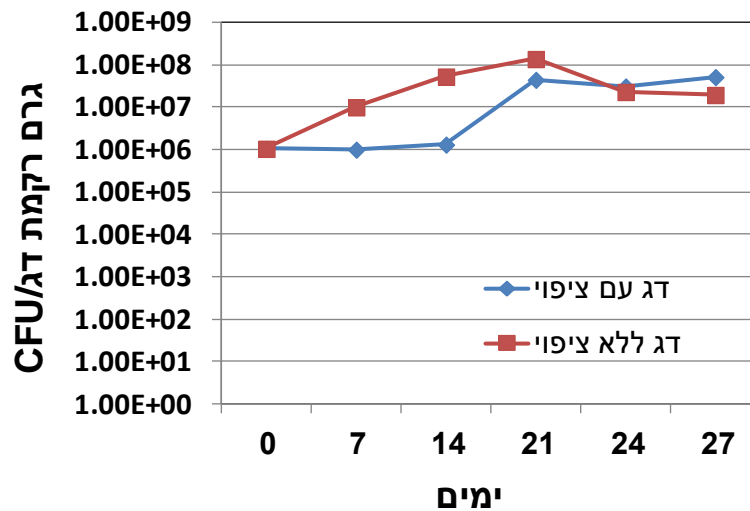


**איור מס' 1.** פיתוח ציפוי אנטי-מיקרוביאלי המשלב כיטוזן ושמן אתרי על דגי דניס (*Sparus aurata*).

בהמשך, מצאנו שהציפוי (המשלב כיטוזן ושמן אתרי) שפותח הראה עיכוב משמעותי בהתרבות אוכלוסיית חיידקים שעל פני דגי אמנון (איור 2). אך פעילותו אנטי מיקרוביאלית של הציפוי לא הייתה מספיק יעילה בדגי מכלוא הבאס מברכות חוות דור (איור 3). ניתן לראות שבמקרה של דגי אמנון הציפוי עיכב כמעט לחלוטין את התרבות החיידקים (איור 2). ואילו בניסוי עם דגי מכלוא הבאס השפעת הציפוי הייתה מתונה יחסית (איור 3). יחד עם זאת, ניתן לראות שיש עיכוב התרבות חיידקים (כשני סדרי גודל) במשך 14 יום מתחילת הניסוי (איור 3).



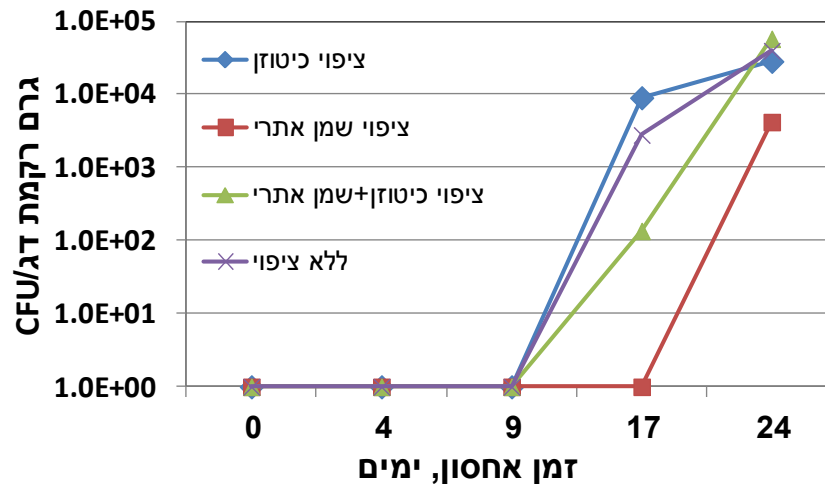
**איור מס' 2.** פעילות אנטימיקרוביאלית של הציפוי (כיטוזן המשלב שמן אתרי) על דגי אמנון באחסון ב-3°C. הדגים עם וללא ציפוי כוסו בשקיות פוליאיתילן אשר אוחסנו בתא קירור.



**איור מס' 3.** פעילות אנטימיקרוביאלית של הציפוי (כיטוזן המשלב שמן אתרי) על דגי מכלוא של באס הסלע ובאס לבן (hybrid striped bass) באחסון ב-3°C. הדגים עם וללא ציפוי כוסו בשקיות פוליאיתילן אשר אוחסנו בתא קירור.



מכיוון שדגי מכלוא הבאס הם בין הדגים המשווקים ביותר בארץ חשוב היה לשפר את היעילות האנטימיקרוביאלית של הציפוי עבורם. על מנת לשפר את היעילות האנטימיקרוביאלית של הציפוי הוחלט לבצע: (א) הורדת עומס מיקרוביאלית התחלתי על דגי מכלוא של באס הסלע ובאס לבן (להורדת עומס מיקרוביאלית התחלתי הדגים עברו שטיפה במי ברז זורמים), (ב) שיפור בתכונות אנטימיקרוביאליות של הציפוי ע"י שינוי בריכוזים של מרכיבי הציפוי כגון ריכוז שמן אתרי (אשר הועלה ל-0.1% ממשקל הדג).



**איור מס' 4.** פעילות אנטימיקרוביאלית של הציפוי על דגי מכלוא של באס הסלע ובאס לבן ( hybrid striped bass) באחסון ב-3°C. הדגים עם וללא ציפוי כוסו בשקיות פוליאיתילן אשר אוחסנו בתא קירור.

תוצאות הניסוי, אשר מוצגות באיור 4, מראות כי הציפוי המשלב את כיטוזן יחד עם השמן האתרי הצליח לעכב בצורה משמעותית את התרבות החיידקים ברקמת הדג במשך 17 ימים של אחסון. אך, התוצאות מצביעות כי לכיטוזן אין תרומה משמעותית ביעילות אנטימיקרוביאלית של הציפוי. זאת מכיוון שכיטוזן לבדו לא הצליח לעכב את התרבות המיקרואורגניזמים בהשוואה לביקורת (ללא ציפוי), ואילו הפעילות האנטימיקרוביאלית של השמן האתרי הייתה משמעותית מאוד.

מעקב אחרי שינויים אורגנולפטיים לאורך ניסויים הצביע על כך שדגים מצופים בכיטוזן התאפיינו בריחה לא אופייני לדגים. בנוסף, אנליזה סנסורית של הדוגמאות הצביעה כי הדגים ללא ציפוי כיטוזן נראו איכותיים יותר מבחינת מדדים אורגנולפטיים שנבדקו (טבלא 1).

טבלא מס' 1. אנליזה סנסורית של דגי מכלוא באס הסלע ובאס לבן (hybrid striped bass) לאחר אחסון ב-3°C.

פרמטרים אורגנולפטיים	ללא ציפוי כיטון	עם ציפוי כיטון	עם ציפוי כיטון + שמן אתרי	עם ציפוי שמן אתרי
מראה חיצוני (צבע, ריר, ריח, מרקם)	סביר	בינוני	בינוני	סביר
עיניים (קרנית, צורה)	סביר	בינוני	בינוני	סביר
זימים (צבע, ריר, ריח)	סביר	בינוני	בינוני	בינוני
חלל הבטן (הפרשות, ריח)	סביר	סביר	סביר	סביר

## דיון

האתגר המרכזי בתחום המיקרוביולוגיה של המזון הוא הארכת חיי המדף של מזון שמקורו מהחי, זאת מאחר והחיידיקים הפתוגנים ומקלקלי המזון יכולים לא רק לשרוד אלא לגדול ולהתרבות בו. לפיכך, יש צורך לפתח גישות יעילות לעיכוב התרבות החיידיקים הבעייתיים לאורך זמן. מחקר זה בא לתת מענה לצורך הקיים בתחום – הארכת חיי המדף של דגים טריים ושיפור משמעותי באיכות המזון. על כן, עסקה תכנית מחקר זו בפיתוח ציפוי אנטי-מיקרוביאלי לעיכוב מיקרואורגניזמים אשר מזהמים דגים טריים ומסוגלים להתרבות בתנאי האחסון.

במחקר זה, פותח ציפוי אנטי-מיקרוביאלי על בסיס כיטון המשלב שמן אתרי עם תערובת קרבקרולית. כמו-כן, נעשה יישום והתאמת הציפוי למיני דגים שונים בעיקר אלו שנפוצים בבריכות גידול בישראל. לפיכך, בחרנו לעבוד עם דגי אמנון ומכלוא הבאס אשר בין הדגים המשווקים בארץ. דגי מכלוא הבאס נכנסו לשיווק מקומי בהצלחה, ככל הנראה, הודות קצב הגידול הגבוה שלהם בתנאי סביבה משתנים והודות איכות וטעם הבשר. זאת הייתה אחת הסיבות שהוחלט לעבוד עם דגי מכלוא הבאס במקום דגי קרפיון (לפי תוכנית מקורית) בתוכנית הנוכחית.

לפי הממצאים שהתקבלו, הציפוי שפותח מראה תכונות פיסיקליות וויזואליות טובות על מיני דגים שונים שנבדקו בעבודה. ישנם הבדלים ביעילות אנטימיקרוביאלית של הציפוי בין מיני דגים שנבדקו (איור 5). אמנם מצאנו שהיעילות של הציפוי הייתה טובה בדגי אמנון, חשוב לציין שדגים אלו התקבלו מבריכות המינהל והתאפיינו עם עומס מיקרוביאלי נמוך. לעומת זאת, במקרה של דגי מכלוא הבאס, העומס המיקרוביאלי ההתחלתי היה גבוה מאוד ועובדה זו יכולה להסביר את העיכוב המתון של התרבות אוכלוסיית החיידיקים המאכלסים את פני הדגים (איור 3). ככל הנראה, ההשפעה האנטימיקרוביאלית העיקרית של הציפוי הייתה משמעותית במשך 14 יום מתחילת הניסוי, בהם נצפה עיקר העיכוב בהתרבות חיידיקים (כשני סדרי גודל) (איור 3). נקודה מעניינת נוספת הינה הירידה שחלה במספר המיקרואורגניזמים לאחר 21 יום של אחסון בדוגמת ביקורת (איור 3). ההסבר לכך יכול להיות התחרות בין סוגי חיידיקים שונים שבדג. תחרות זו יכולה להוריד את כמות כללית של מיקרואורגניזמים. הסבר נוסף הוא אפשרות לחוסר במרכיבי מזון מסוימים (עקב אחסון ממושך) הדרושים להתרבות אוכלוסיות המיקרואורגניזמים המאכלסות את הדגים.

בהסתמך על התוצאות הנ"ל, השערנו הייתה שהורדת העומס המיקרוביאלי ההתחלתי לאחר שליית הדגים עשויה לשפר את היעילות האנטימיקרוביאלית של הציפוי. בנוסף לכך, בודדנו מספר זנים ממיקרופלורת הדגים המצופים, כגון זני ויבריו ובצילוס, אשר הראו עמידות מוגברת למרכיבי הציפוי. כך למשל, מצאנו שה-MIC (minimal inhibitory concentration) של שמן אתרי אורגנו עבור חלק מהזנים שבודדו היה 0.05%, שזה גבוה משמעותית מה-MIC של אותו שמן עבור זני מעבדה.

על סמך הממצאים הנ"ל, החלטנו לשפר את יעילות האנטימיקרוביאלית של הציפוי שפותח ע"י הורדת עומס מיקרוביאלי התחלתי על הדגים וע"י הגדלת ריכוז השמן האתרי בציפוי. על פי התוצאות אשר מוצגות באיור 4, אכן הציפוי הראה יעילות אנטימיקרוביאלית משביעת רצון לעיכוב התרבות מיקרופלורה על דגי מכלוא של באס הסלע ובאס לבן. יחד עם זאת, התוצאות מצביעות כי היעילות האנטימיקרוביאלית של הציפוי נבעה בעיקר מפעילות של השמן האתרי (איור 4). לפיכך, ניתן להסיק כי אין תרומה משמעותית לכיטוזן בעיכוב התרבות מיקרואורגניזמים שעל דגי מכלוא של באס הסלע ובאס לבן. לכן, ככל הנראה, עדיף להתמקד בשימוש בשמן האתרי לצורך עיכוב התרבות מיקרואורגניזמים שעל הדגים פעולה אשר תתרום להארכת חיי מדף של דגים טריים. בנוסף, אנו סבורים שניתן לשפר את יעילות האנטימיקרוביאלית של הציפוי שפותח תוך התאמתו למין הדג והרכב המיקרופלורה שלו אשר מושפע רבות מתנאי הגידול שבברכות.

יש לציין כי הדגים שצופו בכיטוזן ושמן אתרי לא הראו תוצאות משביעות רצון מבחינה אורגנולפטית וזאת נקודה בעייתית מאוד כאשר מדובר בפיתוח מוצר מזון חדש יחד עם הארכת חיי מדף מבחינה מיקרוביאלית. השיפור בתכונות האנטימיקרוביאלית של הציפוי אמנם אפשרי חשוב מאוד לשפר את התכונות האורגנולפטיות שלו אשר נראית משימה לא פשוטה.

נקודה חשובה נוספת היא השפעת הציפוי על שינוי אוכלוסיות החיידקים על הדגים. מהממצאים עולה שישנה הטיה של הרכב אוכלוסיית החיידקים לטובת חיידקים עמידים יותר לטיפול אנטימיקרוביאלי, כגון לחיידקי ויבריו ובצילוס. תבדידים של חיידקים אלו הראו בצורה עקבית עמידות מוגברת למרכיבים של הציפוי האנטימיקרוביאלי. לפיכך, צריך לקחת בחשבון כי הציפוי שפותח עלול להשפיע על הרכב מיקרוביאלי של הדגים.

## יעילות הציפוי

## סוג הדג

טובה



דניס

טובה



אמנון

בינונית



מכלוא  
הבאס

איור מס' 5. יעילות אנטי-מיקרוביאלית של הציפוי על מיני דגים שונים.

חשוב לציין גם שישנן מספר בעיות שהתעוררו במהלך הפרויקט, כגון בעיות לוגיסטיות של טיפול ראשוני בדגים והבאת הדגים מבריכות למינהל המחקר החקלאי. בנוסף, ישנן תקופות מסוימות שרק בהן אפשרית שליית הדגים מהבריכות, כלומר עיקר הניסויים צריכים להיות מכוונים מאמצע אביב עד אמצע סתיו. כמוכן, בשל המדגם הקטן של הדגים שנדגמו לא נעשה סטטיסטיקה על התוצאות שהתקבלו.

## רשימת ספרות

Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int J Food Microbiol* 94, 223-253.

Dutta, J., Tripathi, S., Dutta, P.K., 2012. Progress in antimicrobial activities of chitin, chitosan and its oligosaccharides: a systematic study needs for food applications. *Food Sci Technol Int* 18, 3-34.

Dutta, P.K., Tripathi, S., Mehrotra, G.K., Dutta, J. 2009. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry* 114, 1173-1182.

Devlieghere, F., Vermeulen, A., Debevere, J. 2004. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiol* 21, 703-714.

Gelman, A., Glatman, L., Drabkin, V., Harpaz, S. 2001. Effects of storage temperature and preservative treatment on shelf life of the pond-raised freshwater fish silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *J Food Prot* 64, 1584-1591.

- Gennadios, A., Hanna, M. A., Kurth, L.B. 1997. Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: a review. *LWT Food Sci Technol* 30, 337–350.
- Gram, L., Huss, H.H. 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int J Food Microbiology* 33, 121–137.
- Gómez-Estaca, J., LópezDeLacey, A., López-Caballero, M.E., Gómez-Guillén, M.C., Montero P. 2010. Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiol* 27, 889–896.
- Goy, R.C., Britto, D., Assis, O.B.G. 2009. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros: Ciênc Tecnol* 19, 241–247.
- Harpaz, S., Glatman, L., Drabkin, V., Gelman, A., 2003. Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwater-reared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). *J Food Prot* 66, 410-417.
- Hozbor, M.C., Saiz, A.I., Yeannes, M.I., Fritz, R. 2006. Microbiological changes and its correlation with quality indices during aerobic iced storage of sea salmon (*Pseudoperca semifasciata*). *LWT Food Sci Technol* 39, 99–110.
- Lambert, R.J., Skandamis, P.N., Coote, P.J., Nychas, G.J. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol* 91, 453-462.
- Mohan, C.O., Ravishankar, C. N., Lalitha, K.V., Srinivasa-Gopal, T.K. 2012. Effect of chitosan edible coating on the quality of double filleted Indian oil Sardine (*Sardinella longiceps*) during chilled storage. *Food Hydrocolloids* 26, 167–174.
- Motalebi, A.A., Hasanzati Rostami, Khanipour, A.A., Soltani, M. 2009. Impacts of whey protein edible coating on chemical and microbial factors of gutted kilka during frozen storage. *Iran J Fish Sci* 9, 255-264.
- Rabea, E.I., Badawy, M.E.-T., Stevens, C.V., Smagghe, G., Steurbaut, W. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules* 4, 1457–1465.

Royo, M., Fern´andez-Pan, I., Mat´e, J.I. 2010. Antimicrobial effectiveness of oregano and sage essential oils incorporated into whey protein films or cellulose-based filter paper. *J Sci Food Agr* 90, 1513–1519.

Valencia-Chamorro, S.A., Palou, L., Del Rio, M.A., Perez-Gago, M.B., 2011. Antimicrobial edible films and coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 51, 872-900.

Zakin, V., Gollop, N. 2008. Characterization of the bacterial microflora on aquaculture fish in Israel. *Fish and Fisheries in Israel* 3-4, 1239-1245. (In Hebrew).

### 3. סיכום עם שאלות מגחות

נא להתייחס לכל השאלות בקצרה ולעניין, ב-3 עד 4 שורות לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת).

שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר.

**הערה:** נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
מטרת המחקר הייתה לפתח ציפוי אנטימיקרוביאלי חדשני המשלב כיטוזן ושמינים אתריים לעיכוב מיקרואורגניזמים אשר מזהמים דגים טריים ומסוגלים להתרבות בתנאי האחסון.
עיקרי התוצאות.
פותח ציפוי אנטי-מיקרוביאלי שמראה תכונות פיסיקליות וויזואליות משביעות רצון. הציפוי הראה עיכוב משמעותי בהתרבות אוכלוסיית חיידקים שעל פני דגי אמנון. אך פעילותו האנטי מיקרוביאלית הייתה פחות יעילה בדגי מכלוא של באס הסלע ובאס לבן. בנוסף, אנליזה סנסורית הצביעה כי הדגים ללא ציפוי כיטוזן נראו איכותיים יותר מבחינת מדדים אורגנולפטיים.
מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדו"ח?
הציפוי שפותח מראה תכונות פיסיקליות וויזואליות טובות על מיני דגים שונים שנבדקו בעבודה. ישנם הבדלים ביעילות אנטימיקרוביאלית של הציפוי בין מיני דגים שנבדקו. ככל הנראה, ההשפעה האנטימיקרוביאלית העיקרית של הציפוי הינה משמעותית במשך 14 יום במהלך האחסון ותלויה בעומס המיקרוביאלי ההתחלתי לאחר שלית הדגים. אנו חושבים שמטרות הפרויקט אכן הושגו.
בעיות שנתרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר ניתן לשפר את יעילות האנטימיקרוביאלית של הציפוי שפותח תוך יישום הידע שהצטבר במחקר זה.
לפי תוצאותינו נראה כי יש שוני במיקרופלורה במינים שונים של הדגים. לכן, אחד הכיוונים הוא להתאים את הציפוי לסוג הדג המצופה למשל ע"י שינוי בריכוזים של מרכיבי הציפוי על מנת לשפר את יעילות הציפוי. כמוכן, צריך לקחת בחשבון שהציפוי עלול להשפיע על שינוי אוכלוסיות החיידקים של הדגים אשר מהווה נקודה בעיתית בדרך לפיתוח הציפוי.
הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: <b>פרסומים בכתב</b> - ציטט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי;
פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)
<input checked="" type="radio"/> ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט) <input type="radio"/> חסוי - לא לפרסם
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כן* - לא -

\*יש לענות על שאלה זו רק בדו"ח שנה ראשונה במחקר שאושר לשנתיים, או בדו"ח שנה שניה במחקר שאושר לשלוש שנים