Archive of SID

بررسی مقایسه ای اثر پوشش ژلاتین غنی شده با اسانس پونه کوهی خالص و نانولیپوزوم شده بر کیفیت میکروبی فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان نگهداری شده در شرایط سرد (۴±۲°C)

سید مهدی اجاق[۱*]، محسن کاظمی[۲]، حجت میرصادقی[۲]

۱- دانشیار گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲- دانشجوی دکتری فرآوری محصولات شیلاتی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
(تاریخ دریافت: ۹۵/۰۱/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۸/۰۵)

چکیده

اثر پوشش ژلاتین حاصل از فلس ماهی کپور معمولی غنی شده با ٪۲ اسانس پونه کوهی نانولیپوزوم شده و خالص، بعنوان نگهدارنده روی فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان طی مدت ۱٦ روز نگهداری در دمای یخچال ارزیابی شد. نمونه‌های شاهد، پوشش داده شده با ژلاتین خالص و همچنین پوشش داده شده با ژلاتین حاوی اسانس (خالص و نانولیپوزوم شده)، بصورت دوره ای از نظر شاخص های باکتریایی (بار باکتریایی کل، بار باکتریایی سرمادوست، جنس سودوموناس و خانواده انتروباکتریاسه) و شیمیایی (TVB-N و pH) ارزیابی شدند. سریع‌ترین روند رشد شاخص های باکتریایی مختلف در تیمار شاهد و کندترین آن در تیمار حاوی اسانس نانولیپوزوم شده مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). شاخص های TVB-N و pH در طول زمان نگهداری افزایش نشان دادند. ارتباط شاخص های شیمیایی و میکروبی به خوبی مشهود بوده که نشان می دهد TVB-N و pH می توانند بعنوان شاخص های مفید در بررسی فساد فیله های ماهی استفاده شوند. بطور کلی نتایج نشان داد که پوشش های ژلاتین محتوی ٪۲ اسانس پونه کوهی نانولیپوزوم شده و خالص توانستند زمان ماندگاری فیله های ماهی قزل آلا را در مقایسه با تیمار شاهد به شکل معنی داری افزایش دهند ($p<۰/۰۵$). تیمار محتوی اسانس نانولیپوزوم شده خصوصا در روزهای نخست، در تمامی آزمون های صورت گرفته بهتر از اسانس خالص بود که نشان می دهد نانولیپوزوم ها اساسا تا حدود یک هفته پس از اعمال پوشش کارایی و پایداری اثر ضد میکروب اسانس را افزایش دادند.

کلید واژگان: ژلاتین، اسانس، نانولیپوزوم، نگهداری، قزل آلای رنگین کمان

* مسئول مکاتبات: mahdi_ojagh@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

۱- مقدمه

ماهی و سایر آبزیان به سبب فعالیت آبی بالا، PH خنثی، نسبت بالای اسید آمینه آزاد، اسیدهای چرب چند غیراشباع و همچنین حضور آنزیم های اتولیتیک، درگیر مکانیسم های مختلف فساد از قبیل پیشرفت میکربی، اکسیداسیون چربی و همچنین قهوه ای شدن آنزیمی شده و متعاقبا کیفیت و مدت ماندگاری آنها کاهش میابد [۳-۱]. بنابراین بکار گرفتن اقدامات لازم جهت به تاخیر اندختن فساد این محصولات امری ضروری است. بطور کلی اصول و هدف نگهداری ماهی تاخیر فساد بوسیله کاهش یا ممانعت از فعالیت میکروارگانیسم های عامل فساد است [۳]. یکی از روش هایی که در این زمینه در دو دهه اخیر توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده است، استفاده از پوشش ها و فیلم های خوراکی با قابلیت ضد میکروبی می باشد که کاربرد آنها، از مزایای گوناگونی از جمله، داشتن ارزش تغذیه ای [٤] و حاملی برای مواد افزودنی [٥] برخوردار است. ژلاتین به دلیل فراوانی و ارزش غذایی برای تولید پوشش های خوراکی مورد توجه است. در سال های اخیر باتوجه به شیوع بیماری های ناشی از مصرف ژلاتین گاوی و همچنین عدم پذیرش ژلاتین خوک نزد گروه‌های مذهبی، تحقیق روی منابع خام دیگر ژلاتین افزایش یافته است [٦]. عمل آوری آبزیان معمولا منجر به تولید مقادیر زیادی ضایعات (فلس، پوست، استخوان و....) می شود که می توانند برای تولید ژلاتین استفاده شوند [۷]. ماهی کپور معمولی از جمله ماهیانی است که در ایران به سهولت پرورش میابد و به دلیل فراوانی و قیمت مناسب در طول سال مصرف می شود [۸]. در نتیجه عمل آوری و فیله کردن آن مقدار زیادی فلس حاصل می شود که پتانسیل استفاده به عنوان یک منبع مهم تولید ژلاتین را داراست. از طرفی با توجه به مشکلات ناشی از مصرف نگهدارنده های شیمیایی، مواد ضد میکروبی طبیعی توجه خاصی را به خود جلب کرده اند [۹]. یک دسته از مواد ضدمیکروبی طبیعی، اسانس های گیاهی مثل پونه کوهی می باشند که ترکیب، ساختار و گروه های عاملی این ترکیبات می توانند نقش مهمی در فعالیت ضدمیکروبی آنها ایفا نمایند [۱۰]. کارواکرول و تیمول از مهم ترین ترکیبات فنلی اسانس پونه کوهی هستند که بیشترین فعالیت ضدمیکربی را دارند [۱۱]. با توجه به بوی تند پونه کوهی و اثر نامطلوب آن روی ماده غذایی و همچنین به منظور طولانی تر کردن اثر بخشی و جلوگیری از تبخیر ناشی فرار بودن اسانس های طبیعی می توان آن را برای کاربردهای غذایی ریز پوشانی کرد [۱۲، ۱۳]. یکی از روشهای ریزپوشانی استفاده از سیستم های کلوئیدی و تولید ریزامولسیون ها است که می توانند به منظور بهبود خواص کارکردی مخلوطهای روغن و آب استفاده شوند. ریزامولسیون ها مخلوط هایی با پایداری ترمودینامیکی هستند که از ترکیب موادی مثل آب، روغن و همچنین مواد فعال در سطح که داری خواص ایزوتروپیک هستند تشکیل می شوند [١٤]. لیولیوس و همکاران (۲۰۰۹) [١٥] مشاهده کردند که ریزپوشانی کردن دو ترکیب کارواکرول و تیمول در لیپوزوم سبب ارتقا خاصیت ضد میکروبی آنها نسبت به شکل ریزپوشانی نشده این ترکیبات شد. بنابر مطالب عنوان شده، در تحقیق حاضر پوشش ژلاتین حاصل از فلس ماهی کپور معمولی غنی شده با اسانس پونه کوهی ریزپوشانی شده و خالص روی فیله های تازه ماهی قزل آلای رنگین کمان اعمال شده و اثر آنها بر کیفیت میکروبی و شیمیایی فیله‌ها طی مدت ١٦ روز نگهداری در یخچال ارزیابی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- استخراج ژلاتین از فلس ماهی کپور معمولی

استخراج ژلاتین از فلس کپور بر اساس روش ونگ همکاران (۲۰۱٤) [١٦] با اندکی اصلاح انجام شد. ابتدا به منظور حذف چربی و پروتئین های غیر کلاژنه، فلس ها در محلولی مرکب از NaOH (۰/۰۵ مولار)، ۲۵٪ الکل و ۱/۵٪ H_2O_2 با نسبت ٤:۱ فلس/محلول (وزنی/حجمی) به مدت یک شب در دمای حدود ۱۰°C قرار داده شدند. سپس فلس ها بوسیله شستن با آب مقطر خنثی سازی شدند. زدودن مواد معدنی از فلس ها با استفاده از محلول HCl (۰/۰۵ مولار) با نسبت ۵:۱ (وزنی/حجمی) فلس/محلول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انجام شد، سپس فلس ها به منظور خنثی سازی pH با آب مقطر شسته شدند. بعد از انجام پیش تیمار، فلس های متورم در pH ۵ خیسانده و به

www.SID.ir

Archive of SID

منظور استخراج ژلاتین، در دمای ۸۰°C به مدت ۱ ساعت حرارت داده شدند. بعد از این مرحله، محلولهای مورد نظر به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰°C در دور ۱۵۰۰۰ (rpm) سانتریفیوژ شدند (Eppendorf 5810R). سوپرناتانت جداسازی و فریز درایر شده و ماده خشک بدست آمده به عنوان پودر ژلاتین در دمای ۱۸°C- تا زمان استفاده ذخیره شد.

۲-۲- روش تهیه نانولیپوزوم‌های اسانس پونه

نانولیپوزوم ها طبق روش خیمنز و همکاران (۲۰۱٤) [۱۳] با کمی اصلاح تولید شدند [۱٤]. ابتدا ۲گرم لسیتین + ۲ گرم توئین ۸۰ در ۳۸ گرم آب مقطر مخلوط و برای ۵h توسط شیکر (IKA, Germany) تکان داده شدند. در مرحله بعد٤ گرم اسانس پونه کوهی به دیسپرسیون آبی اضافه شده و کل مخلوط به مدت ٦۰۰ ثانیه (۱ثانیه روشن و ۱ ثانیه خاموش) در ٤۰KHz و ٤۰٪ قدرت دستگاه (Misonix, S-4000, USA) تحت شرایط سونیکاسیون قرار گرفت. نانولیپوزوم های تولیدی تا زمان استفاده در بطری های استریل و در شرایط تاریک نگهداری شدند.

۲-۳- بررسی سایز و پتانسیل زتا نانولیپوزوم‌ها

میانگین اندازه و پتانسیل زتا نانولیپوزوم ها با استفاده از دستگاه مالورن زتاسایزر (نانو ZS) (Malvern Instruments, Worcestershire, U.K.) بوسیله روش پخش نور لیزر بررسی شد. قبل از اندازه گیری نمونه توسط آب دیونایز رقیق شد (۱:۱۰۰). در مرحله بعد نمونه درون یک سلول استوانه ای ریخته شده و به شکل عمودی در دستگاه قرار گرفت. اندازه گیری در ۵ تکرار صورت پذیرفت [۱۳].

۲-٤- تولید پوشش‌های فعال

پوشش های ژلاتینی بر اساس روش ونگ و همکاران (۲۰۱٤) [۱٦] تولید شدند. پودر ژلاتین به مدت ۳۰ دقیقه در آب مقطر متورم شده و سپس در دمای ٦۰°C به منظور تولید محلول تشکیل فیلم با غلظت پروتئین ۲ درصد (وزنی/حجمی) حل شد سپس گلیسرول به عنوان پلاستی سایزر به محلول افزوده شد. برای تولید محلول های پوششی فعال، اسانس پونه کوهی با غلظت ۲٪ (حجمی/حجمی) به محلول فیلم ساز افزوده شده [۲] و برای ایجاد امولسیونی یکنواخت به مدت ۲ دقیقه در دور ۱۳۵۰۰rpm تحت عمل هم زدن قرار گرفت [۱۷]. همچنین برای تهیه پوشش های محتوی اسانس نانولیپوزوم شده، پس از تهیه محلول ژلاتین، نانولیپوزوم ها به محلول اضافه شدند تاحدی که غلظت نهایی اسانس در آن ۲٪ (حجمی/حجمی) باشد سپس محلول حاصل به مدت ۲h در دور ۳۰۰ rpm تکان داده شد تا همگن شود [۱۳].

۲-۵- آماده سازی ماهی و اعمال پوشش‌ها

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تازه با میانگین وزنی ٤۰ ± ۳۰۰ گرم تهیه و به شکل کاملا یخ پوشی شده به آزمایشگاه فرآوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شد. بعد از مراحل تخلیه شکمی و سرزنی، فیله‌های تهیه شده به خوبی شست و شو و جهت حذف آب اضافی سطح زیر هود قرار گرفتند. جهت ایجاد پوشش، ابتدا فیله ها به مدت ۳۰ ثانیه در محلول مربوطه غوطه شده سپس خارج شدند و پس از گذشت تقریبا ۲ دقیقه مجددا ۳۰ ثانیه دیگر در محلول قرار گرفتند. نمونه های کنترل بدون پوشش باقی ماندند. پس از اتمام آب چک نمونه ها جهت خشک شدن و تشکیل پوشش روی آنها در صفحات مشبک استریل قرار گرفته و زیر هود میکروبیولوژی قرار داده شدند. در پایان ٤ تیمار شاهد، پوشش داده شده با ژلاتین خالص و همچنین پوشش داده شده با ژلاتین حاوی ۲٪ اسانس خالص و نانولیپوزوم شده در ظروف مخصوص قرار گرفته و به یخچال منتقل شدند و به مدت ۱٦ روز در فواصل زمانی ٤ روز مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۲-٦- بررسی میزان بار باکتریایی

نخست میزان ۵ گرم از نمونه فیله ماهی تحت شرایط استریل با ٤۵ میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژی مخلوط و سپس هموژن گردید. در ادامه رقت‌های مورد نیاز تهیه و میزان ۱ میلی‌لیتر از هرکدام جهت کشت و بررسی بار باکتریایی کل، سرمادوست، سودوموناس و انتروباکتریاسه به روش پورپلیت به ترتیب در محیط های کشت پلیت کانت آگار (PCA)، ستریماید آگار (CA) و وی آر بی جی آگار (VRBGA)، مورد استفاده قرار گرفتند. شمارش بار باکتریایی سرمادوست و کل به ترتیب در دمای ۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ روز و دمای ۳۰ درجه

www.SID.ir

Archive of SID

سانتی‌گراد به مدت ۲ روز انجام گرفت [۲]. همچنین بررسی تعداد باکتری های سودوموناس و انتروباکتریاسه به ترتیب در دماهای ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ روز انجام پذیرفت [۱۸].

۲-۷- آزمون‌های شیمیایی

۲-۷-۱- اندازه گیری pH نمونه‌ها

نخست ۵ گرم از نمونه ها به مدت ۱ دقیقه با ٤٥ میلی لیتر آب دیونایز همگن شده سپس میزان pH آن ها بوسیله دستگاه pH سنج که در pH های ٤ و ۷ استاندارد شده بود اندازه گیری شد [۱۹].

۲-۷-۲- اندازه گیری میزان بازهای نیتروژنی فرار (TVB-N)

میزان TVB-N به روش کلدال و با قرار دادن ۱۰ گرم گوشت همراه با ۲ گرم اکسید منیزیم در حضور ۳۰۰ میلی لیتر آب مقطر در داخل بالن و در نهایت جمع آوری بازهای ازته فرار در داخل یک ارلن مایر محتوی ۲۵ میلی لیتر محلول اسید بوریک ۲٪ و چند قطره متیل رد بعنوان شاخص، تا گذشت ٤٥ دقیقه از زمان جوشش ادامه یافت. در نهایت تیتر محلول زرد رنگ حاصل با اسید سولفوریک (۰/۱ نرمال) تا حاصل شدن رنگ ارغوانی انجام گرفت و میزان TVB-N طبق فرمول زیر محاسبه و به صورت میلی گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم گوشت ماهی بیان شد.

TVB-N = ۱٤×حجم اسید سولفوریک مصرفی

۲-۸- تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام گرفت. ابتدا بررسی نرمال بودن و همگنی واریانس داده ها به ترتیب با استفاده از آزمون های کولموگراف-اسمیرنوف (Kolomogorav-Smirnov) و لون (Leven) انجام گرفت. سپس به منظور تجزیه و تحلیل مقادیر کمی به دست آمده از آنالیزهای میکروبی و شیمیایی از تجزیه واریانس (ANOVA) و همچنین برای مقایسه میانگین ها از آزمون Duncan استفاده شد. مقایسه‌های آماری در سطح اطمینان ۹۵٪ انجام پذیرفت و تمامی نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی خواص نانولیپوزوم‌ها (اندازه ذرات و پتانسیل زتا)

نمودارهای مرتبط با توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتا نانولیپوزوم ها در شکل۱ نشان داده شده است. طبق نتایج بیشینه توزیع اندازه نانوذرات در محدوده زیر ۱۰۰nm بود. بنابراین سایز نانولیپزوم با آنچه که برای کاربردهای غذایی و دارویی نیاز است مطابق بود [۲۰]. اندازه نانولیپوزوم ها بدلیل تاثیر بر پایداری و ظرفیت آزادسازی ترکیبات محصور شده در هسته آنها مورد توجه است. درحالت کلی سایز کوچک بدلیل تاثیر بر فراهم شدن محلول همگن‌تر و پایدارتر مطلوب است. از طرفی سایز نانوذرات (نانولیپوزوم ها) از آنجایی می توانند برای انسان و محیط زیست سمی باشند باید کنترل شود [۱۳]. در این تحقیق نتایج مرتبط با اندازه ذرات نانولیپوزوم ها با کارهای مشابه انجام شده توسط ژانگ و همکاران (۲۰۱۲) و همچنین خیمنز و همکاران (۲۰۱٤) مطابقت داشت [۱۳، ۲۱] و اندک تفاوت مشاهده شده در نتایج (کوچکتر بودن سایز نانولیپوزوم ها در این تحقیق) می تواند بدلیل تفاوت در زمان سونیکاسیون و همچنین مواد شرکت کننده در دیسپرسیون باشد. بر طبق گزارش خیمنز و همکاران (۲۰۱٤) [۱۳] به ۳۰۰ ثانیه سونیکاسیون برای ریزپوشانی کامل ترکیبات ضد میکروب (اسانس ها) در داخل این نوع از نانولیپوزوم ها احتیاج است. همچنین گزارش شده است که نانولیپوزوم های بارگذاری شده با ترکیبات ضد میکروب روغنی (اسانس) سایز کمتری را نسبت به نانولیپوزوم های بدون این ترکیبات نشان دادند که همین عامل می تواند در بروز سایز نسبتا کوچک این نانوذرات در تحقیق حاضر موثر بوده باشد [۱۳].

پتانسیل زتا فاکتوری مهم در تولید نانولیپوزوم ها محسوب می شود که برای توضیح میزان بار موجود در دیسپرسیون بکار رفته و بر پایداری نانولیپوزوم های تولید شده موثر است. همانطور که مشهود است دامنه پتانسیل زتا نانولیپوزوم های تولید شده در ناحیه منفی قرار دارد و بیشینه میزان آن در نقطه (mv) ۳٦/٦- واقع است. این منفی بودن اساسا ناشی از حضور گروه های انتهایی زنجیره های چربی است. بطور کلی گزارش شده است که

www.SID.ir

Archive of SID

اگر میزان مطلق پتانسیل زتا بین (mv) ٦۰-۳۰ باشد به دلیل دافعه الکترواستاتیک ایجاد شده، سیستم نانولیپوزومی پایدار است [۲۰]. بنابر بر مطالب ذکر شده می توان نتیجه گرفت که نانولیپوزوم های محتوی اسانس پونه کوهی تولید شده، به منظور شرکت داده شدن در محلول پوشش موردنظر و همچنین کاربرد در سایر سیستم های غذایی به اندازه کافی پایدار بودند.

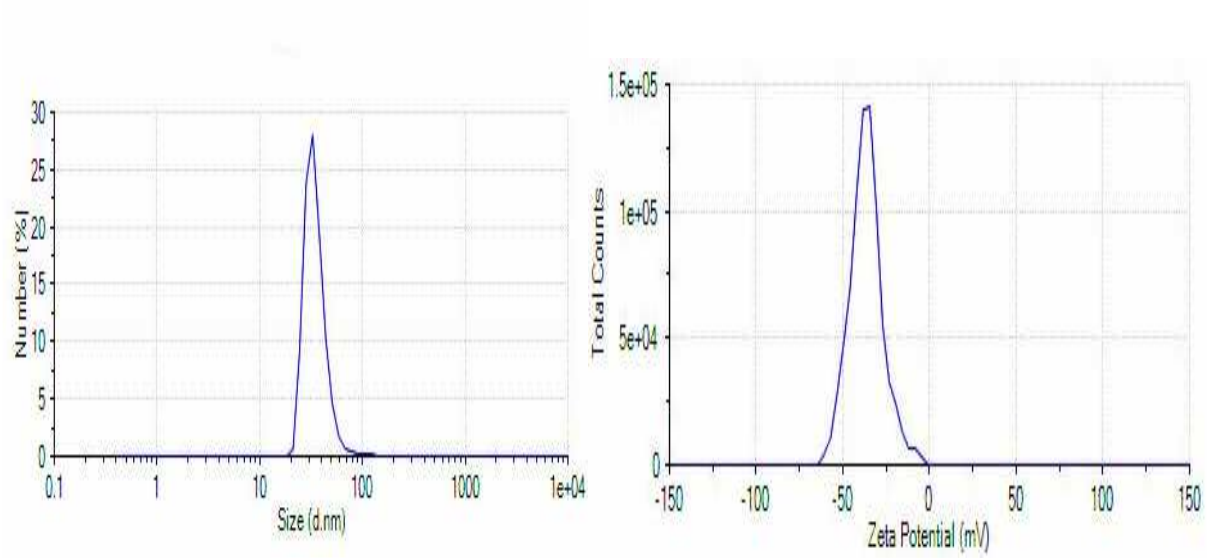

Fig 1 Typical particle size distribution and zeta potential curves of the oregano essential oil (OEO) nanoliposomes.

۳-۲- آزمون‌های میکروبی

در ماهی تازه، میکروارگانیسم های عامل فساد بخش کوچکی از کل فلور میکروبی را تشکیل می دهند. در طول زمان نگهداری این ارگانیسم ها سریعتر از باقی میکروفلور موجود رشد کرده و سبب تولید متابولیت هایی می شوند که مسئول طعم و بوی بد و به تبع آن رد کیفیت تغذیه ای آن توسط مصرف کننده می شوند. جنس سودوموناس و باکتری های لاکتیک اسید بطور کلی در فلور عامل فساد ماهی غالب اند. باکتری های گرم منفی مختلفی از قبیل انتروباکتریاسه نیز در این زمینه مطرح هستند [۲۲، ۲۳].

نتایج مرتبط با تغییرات بارباکتریایی کل (TVC) تیمارهای مختلف در جدول۱ نشان داده شده است. این شاخص در روز صفر در تمامی تیمارها به میزان مشابه (log cfu/g) ۲/۸۷ بود که نشان دهنده کیفیت میکروبی مناسب فیله های مورد استفاده است. میزان پایین TVC فیله ماهی قزل آلا در روز صفر در کارهای مشابه مختلف گزارش شده است [۲، ۲۲، ۲٤]. بار باکتریایی کل تمام تیمارها با گذشت زمان نگهداری به شکل معنی دار افزایش نشان داد بطوری که تیمار شاهد و پوشش دهی شده با ژلاتین خالص به بالاتر از میزان مجاز تعیین شده (log CFU/g ۷) برای ماهی قزل آلا [۲۵] در روز ۸ رسیدند. افزیش بار باکتریایی کل در طول زمان نگهداری سرد توسط اجاق و همگاران (۲۰۱۰) [۲٤] گزارش شده است. این روند افزایش در تیمارهای پوششی محتوی اسانس خالص و نانولیپوزوم شده به شکل معنی دار نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت و متعاقبا زمان ماندگاری در این تیمارها تا روز ۱۲ افزیش پیدا کرد ($p<۰/۰۵$). همچنین میزان این شاخص در پوشش های محتوی اسانس نانولیپوزوم شده نسبت به اسانس خالص در روز ۸ بطور قابل ملاحظه ای کمتر بود ($p<۰/۰۵$) که این می تواند ناشی از اثر سینرژیستی و یا پایدار کنندگی نانولیپوزوم بر اسانس پونه کوهی باشد [۲۰، ۱۵]. نتایج مشابهی در زمینه کاربرد اسانس های گیاهی در کنترل بار باکتریایی کل توسط دیگر محققان گزارش شده است [۲۲، ۲٤]. بعلاه اینکه اثر ضد میکروبی اسانس پونه کوهی برابر میکروارگانیسم های مختلف توسط سایر محققان به اثبات رسیده است [۲، ۲٦، ۲۷، ۲۸].

www.SID.ir

Archive of SID

Table 1 Changes in the total viable count of Rainbow trout fillets, Control: uncoated samples; Gelatin: samples coated with Gelatin; G+2%OEO: samples coated with Gelatin+2% oregano essential oil; G+L.2%OEO: samples coated with Gelatin+oregano essential oil (2%) nanoliposomes during storage at 4°C for 16 days.

Samples	storage time (day)				
	0	4	8	12	16
Control	2.87 ± 0.19^{aE}	5.14 ± 0.16^{aD}	7.37 ± 0.20^{aC}	8.45 ± 0.07^{aB}	9.82 ± 0.24^{aA}
Gelatin	2.87 ± 0.19^{aE}	5.02 ± 0.04^{aD}	7.13 ± 0.16^{aC}	8.65 ± 0.08^{aB}	9.45 ± 0.01^{bA}
G+2%OEO	2.87 ± 0.19^{aE}	4.53 ± 0.36^{bD}	6.38 ± 0.05^{bC}	7.53 ± 0.15^{bB}	8.67 ± 0.12^{cA}
G+L.2%OEO	2.87 ± 0.19^{aE}	4.38 ± 0.08^{bD}	5.86 ± 0.21^{cC}	7.15 ± 0.09^{cB}	8.71 ± 0.18^{cA}

Different lowercase letters (a, b, c,..) in each column represent significant differences between treatments and Different capital letters (A, B, C,..) in each row represent significant differences between times; Data are expressed as mean ± standard deviation (n = 3).

فساد میکروبی ماهی و فرآورده های حاصل آن حین نگهداری در یخچال عمدتا توسط باکتریهای سرمادوست گرم منفی هوازی نظیر سودوموناس ها، آلتروموناس ها، شیوانلا و فلاووباکتریوم ها شکل می گیرد [۲۹]. در واقع باکتری های گرم منفی سرمادوست (PTC) گروه اصلی از میکروارگانیسم های عامل فساد هوازی ماهیان تازه ذخیره سازی شده در دمای سرد می باشند [۲۲، ۲۳، ۲٤]. در مطالعه حاضر میزان اولیه باکتری های سرمادوست در حدود (log cfu/g) ۲/٦۳ مشاهده شد (جدول۲). روند رشد باکتری های سرمادوست در تیمارهای مختلف مشابه بار باکتریایی کل بود بطوری که بالاترین میزان آن در تیمار شاهد و کمترین آن در تیمار پوششی محتوی اسانس نانولیپوزوم شده مشاهده شد. نتایج مشابهی در این رابطه توسط جوکی و همکاران (۲۰۱٤) [۲] گزارش شد که نشان دادند رشد باکتری های سرمادوست در فیله های تیمار شده با فیلم های فعال حاوی اسانس پونه کوهی در قیاس با تیمار شاهد در طول ۱۸ روز نگهداری در دمای یخچال به شکل معنی داری کاهش یافت. اجاق و همکاران (۲۰۱۰) [۲٤] مشاهده نمودند که میزان این شاخص میکروبی در تیمار شاهد (بدون پوشش) فیله ماهی قزل آلای رنگین‌کمان طی ۱۲ روز نگهداری از حد مجاز مصرف انسانی فراتر رفت درحالی که بکارگیری پوشش کیتوزان حاوی اسانس دارچین، مدت ماندگاری فیله ها را تا روز ۱٦ افزایش داد. احمد و همکاران (۲۰۱۲) [۳۰] نیز مشاهده کردند که روند رشد باکتری‌های سرمادوست فیله‌های ماهی باس دریایی پوشش داده شده با فیلم-های حاوی اسانس نسبت به تیمارهای دیگر کندتر شد. همچنین کاظمی و همکاران (۲۰۱۵) [۲۲] نیز نتایج مشابهی را در این زمینه گزارش کردند.

Table 2 Changes in Psychrotrophic counts of Rainbow trout fillets during storage at 4°C for 16 days.

Samples	storage time (day)				
	0	4	8	12	16
Control	2.63 ± 0.13^{aE}	4.96 ± 0.12^{aD}	7.50 ± 0.01^{aC}	8.67 ± 0.08^{aB}	9.60 ± 0.08^{aA}
Gelatin	2.63 ± 0.13^{aE}	4.90 ± 0.25^{abD}	7.42 ± 0.14^{aC}	8.51 ± 0.17^{aB}	9.40 ± 0.09^{bA}
G+2%OEO	2.63 ± 0.13^{aE}	4.62 ± 0.10^{bD}	6.83 ± 0.07^{bC}	8.22 ± 0.06^{bB}	9.06 ± 0.26^{bA}
G+L.2%OEO	2.63 ± 0.13^{aE}	4.21 ± 0.08^{cD}	6.18 ± 0.12^{cC}	7.94 ± 0.14^{cB}	8.80 ± 0.16^{bA}

Different lowercase letters (a, b, c,..) in each column represent significant differences between treatments and Different capital letters (A, B, C,..) in each row represent significant differences between times; Data are expressed as mean ± standard deviation (n = 3).

باکتری‌های سودوموناس از مهم‌ترین گروه‌های ایجاد کننده فساد در فرآورده‌های غذایی مختلف از قبیل گوشت، مرغ، شیر و ماهی نگهداری شده در شرایط هوازی و سرد می‌باشند [۳۱]. باکتری-های سودوموناس جزء گروه‌های باکتریایی غالب در گوشت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به شمار می‌آید و در واقع گزارش شده است که سودوموناس ها مهمترین گروه از باکتری های

www.SID.ir

Archive of SID

عامل فساد هوازی ماهیان تازه ذخیره سازی شده در سرما هستند [۲۲، ۳۲]. میزان این باکتریها در روز صفر برای تیمارهای مختلف (log cfu/g) ۲/۵۷ مشاهده شد (جدول۳). بررسی روند کلی رشد این نوع از باکتری ها نیز نشان داد که تیمار شاهد بالاترین میزان رشد را در طول زمان نگهداری نشان داد. فیله های تیمار شده با پوشش های مختلف شرایط بهتری داشتند و کمترین میزان رشد این جنس از باکتری ها به ترتیب در تیمارهای محتوی اسانس پونه کوهی ریزپوشانی شده و خالص مشاهده شد. هرچند در برخی تحقیقات گزارش شده است که سودوموناس ها در بین باکتری های گرم منفی کمترین حساسیت را به اسانس های گیاهی نشان می دهند [۳۰] اما در این تحقیق اسانس خالص و نانولیپوزوم شده تا حدی اثر بازدارندگی نشان دادند. نتایج مشابهی در زمینه اثر بازدارندگی فیلم و پوشش های غنی شده با اسانس پونه بر سودوموناس ها توسط محققان دیگر گزارش شده است [۲، ۲۲، ۲۸، ۳۳].

Table 3 Changes in Pseudomonas SPP. Counts of Rainbow trout fillets during storage at 4°C for 16 days.

Samples	storage time (day)				
	0	4	8	12	16
Control	2.57 ± 0.07^{aE}	4.73 ± 0.09^{aD}	6.68 ± 0.03^{aC}	8.12 ± 0.09^{aB}	8.49 ± 0.18^{abA}
Gelatin	2.57 ± 0.07^{aE}	4.64 ± 0.22^{aD}	6.70 ± 0.11^{aC}	7.77 ± 0.16^{bB}	8.63 ± 0.13^{aA}
G+2%OEO	2.57 ± 0.07^{aE}	4.13 ± 0.08^{bD}	5.86 ± 0.13^{bC}	6.55 ± 0.23^{cB}	8.23 ± 0.19^{bcA}
G+L.2%OEO	2.57 ± 0.07^{aE}	4.05 ± 0.05^{bD}	5.83 ± 0.15^{bC}	6.78 ± 0.20^{cB}	8.07 ± 0.22^{cA}

Different lowercase letters (a, b, c,..) in each column represent significant differences between treatments and Different capital letters (A, B, C,..) in each row represent significant differences between times; Data are expressed as mean ± standard deviation (n = 3).

انتروباکتریاسه بعنوان یک شاخص بهداشتی در مواد غذایی و همچنین بخشی از فلور میکروبی عامل فساد فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان مطرح هستند [۲]. بررسی وجود این باکتری‌ها در موادغذایی از جمله فراورده‌های شیلاتی حیاتی است، چرا که این خانواده بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا نظیر سالمونلا را در بر می‌گیرد که در صورت مصرف مواد غذایی آلوده به آن سلامتی فرد به طور جدی در معرض خطر قرار می گیرد. محققان حضور باکتری‌های مذکور در آبزیان را به دلایلی نظیر صید از مناطق آلوده، تاخیر در یخ‌گذاری آبزیان صید شده و همچنین دستکاری پس از صید (آلودگی ثانویه) نسبت داده اند [۲۵، ۳٤، ۳۵]. پایین بودن این شاخص باکتریایی در بررسی روز صفر تیمارهای مختلف (جدول٤) نشان دهنده کیفیت بهداشتی مناسب فیله ها در اثر کیفیت مناسب زنجیره انتقال و نگهداری ماهی است. میزان این شاخص در طول زمان نگهداری در تمامی تیمارها به شکل معنی داری افزایش نشان داد اما پوشش های فعال در برابر انتروباکتریاسه نیز اثر بازدارنگی موثر نشان دادند ($p<۰/۰۵$). پوشش ژلاتین خالص در قیاس با تیمار شاهد تفاوتی نشان نداد. در مقایسه تیمارهای فعال مشخص شد که پوشش محتوی اسانس ریزپوشانی شده در مقایسه با اسانس خالص در روزهای نخست اثر بهتری داشت ($p<۰/۰۵$) اما با گذشت زمان (بعد از روز ۱۲) روندی مشابه پیدا کردند. در پایان زمان نگهداری تیمارهای فعال در قیاس با تیمار شاهد میزان این شاخص را تقریبا به اندازه ۱ سیکل لگاریتیمی کاهش دادند. این نتایج با مشاهدات حاصل از مطالعات مشابه در این زمینه که توسط احمد و همکاران (۲۰۱۲) [۳۰] روی فیله ماهی باس‌دریایی، گومز-استاکا و همکاران (۲۰۱۰) [۱۸] روی فیله ماهی کاد، کاظمی و همکاران (۲۰۱۵) و جوکی و همکاران (۲۰۱٤) [۲، ۲۲] روی فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام گرفت، مطابقت داشت.

www.SID.ir

Archive of SID

Table 4 Changes in Enterobacteriaceae of Rainbow trout fillets during storage at 4°C for 16 days.

Samples	storage time (day)				
	0	4	8	12	16
Control	1.96 ± 0.11^{aD}	3.90 ± 0.09^{aC}	5.88 ± 0.04^{aB}	6.87 ± 0.27^{aA}	7.10 ± 0.21^{aA}
Gelatin	1.96 ± 0.11^{aD}	3.90 ± 0.07^{aC}	5.46 ± 0.08^{bB}	6.84 ± 0.15^{aA}	6.93 ± 0.13^{aA}
G+2%OEO	1.96 ± 0.11^{aE}	3.53 ± 0.04^{bD}	4.63 ± 0.12^{cC}	5.74 ± 0.07^{bB}	6.12 ± 0.31^{bA}
G+L.2%OEO	1.96 ± 0.11^{aD}	3.07 ± 0.04^{cC}	4.15 ± 0.23^{dB}	6.08 ± 0.26^{bA}	6.18 ± 0.13^{bA}

Different lowercase letters (a, b, c,..) in each column represent significant differences between treatments and Different capital letters (A, B, C,..) in each row represent significant differences between times; Data are expressed as mean ± standard deviation (n = 3).

بطور کلی در تحقیق حاضر مشخص شد که تیمارهای پوششی فعال محتوی اسانس خالص و نانولیپوزوم شده قادرند به طور موثر از فعالیت و رشد باکتری های مختلف عامل فساد جلوگیری کنند. فعالیت ضد میکروبی اسانس پونه کوهی و اثر تقویت کنندگی و پایدار کنندگی ریزپوشانی (نانولیپوزوم) بر اسانس های مختلف در تحقیقات مشابه انجام شده گزارش شده است [۲، ۱۵، ۲۰، ۲۲]. فعالیت ضد میکروبی اسانس پونه کوهی به اجزای تشکیل دهنده آن ها و اساسا ترکیبات فنولیک مثل ترپن هایی از قبیل کارواکرول (2-methyl-5-[1-methylethyl] phenol) و تیمول (5-methyl-2-[1-methylethyl] phenol) نسبت داده می شود [۱۸]. کارواکرول و تیمول دیواره بیرونی باکتری های گرم منفی را متلاشی کرده و سبب آزاد شدن لیپوپلی ساکاریدها می شوند که در نتیجه آن نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی به آدنوزین تری–فسفات افزایش میابد. در واقع فعالیت ضد میکروبی بیشتر ترپنوئیدها با گروه های عاملی آنها مرتبط است، و مشخص شده است که جایگاه و تعداد گروه های هیدروکسیل ترپنوئیدهای فنولیک و حضور الکترون های متحرک از جنبه فعالیت ضد میکروبی آن ها مهم است [۲، ۳۶]. گروه های هیدروکسیل توانایی آب دوستی این ترکیبات افزایش داده و به حل شدن آنها در غشای سیتوپلاسمی میکروب و تخریب آن کمک می کنند. در حالت کلی، مکانیسم ضد میکروبی اسانس ها با اختلال در غشای سیتوپلاسمی، مختل کردن نیروی انتقال پروتن، جریان الکترون، انتقال فعال و انعقاد محتویات درونی سلول مرتبط است [۱۸، ۳۲]. در رابطه با بهبود و پایدارتر شدن اثر ضدمیکروبی تیمار محتوی اسانس نانولیپوزوم شده در قیاس با اسانس خالص، وو و همکاران (۲۰۱٤) [۲۰] طی یک بررسی مقایسه ای، اثر ضد میکروبی فیلم های خوراکی محتوی اسانس دارچین خالص و ریزپوشانی شده را مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که تیمارهای محتوی اسانس نانولیپوزم شده در طول زمان انکوباسیون (به مدت ۳۰ روز) اثر پایدارتر و بیشتری را نشان دادند که این مشاهدات می تواند تاحدی نتایج مطالعه حاضر را تایید کند. با هدف توضیح بیشتر این پدیده می توان گفت، طبق نتایج گزارش شده توسط محققان دیگری در این زمینه، روش تماس مستقیم اسانس با محیط کشت و نفوذ در محیط آگاردار برای تخمین ویژگی‌های ضدباکتریایی اسانس راه کار مناسبی نیست. از آنجایی که به نظر می‌رسد همزمان با پخش شدن اسانس در محیط کشت، ترکیبات فرار و فعال آن تبخیر شده و فقط بخش قطبی آنهاست که از رشد باکتری ممانعت می کند [۳۷، ۳۸]. بنابراین با توجه به مشابهت محیط کشت آگاردار با سیستم‌های غذایی جامد با فعالیت آبی بالا، می توان عنوان کرد که نانولیپوزوم ها با کنترل رهایش اسانس در محیط و هدایت بیشتر ترکیبات فرار موجود در آن به سمت فلور باکتریایی موجود اثر آن را بهبود داده و تا مدت طولانی تر حفظ کرده اند. همچنین در زمینه کاهش اندک بارباکتریایی در فیله های پوشش داده شده با ژلاتین خالص ادعا شده است که ژلاتین تشکیل دهنده پوشش و یا فیلم می تواند محتوی پپتیدهایی با فعالیت ضدمیکروبی باشد [۱۸، ۳۹].

۳-۲- آزمون‌های شیمیایی

بازهای نیتروژنی فرار کل (TVB-N) بعنوان یک شاخص برای بررسی تخریب و فساد محصولات گوشتی مطرح است و میزان آن به رشد میکروارگانیسم ها براساس تشکیل ترکیبات ناشی از متابولیسم آنها و همچنین فعالیت آنزیم های داخلی وابسته است [۲۲]. الگوی تغییرات این شاخص در تیمارهای مختلف در شکل۲ نشان داده شده است. میزان اولیه TVB-N در تیمارهای مختلف (۱۰۰ گرم گوشت/میلی گرم نیتروژن) ۱۰/۳٦ بود که

www.SID.ir

Archive of SID

نشان دهنده کیفیت اولیه مناسب فیله های ماهی است. TVB-N در طول زمان نگهداری تیمارهای مختلف افزایش نشان داد و در روز ۱٦ به بالاترین میزان خود در تیمار شاهد رسید (۷۳/٦٤). تیمارهای پوششی مختلف از این نظر متفاوت بودند و روند افزایش و همچنین میزان نهایی این شاخص در فیله های دارای پوشش فعال نسبت به تیمار شاهد پایین تر بود بطوری که در تیمار محتوی اسانس نانولیپوزوم شده در روز ۱٦ به ۵۵/۸۹ رسید. ماهی محتوی تعدادی زیادی از باکتری ها در سیستم هاضمه است و همچنین آنزیم های قوی هضم کننده طی دوره تغذیه در این سیستم تولید می شوند که می توانند تخریب و تجزیه عضله را در مرحل ذخیره سازی و نگهداری سرد شدت بخشند. این تغییرات بر ایجاد و تشدید طعم و بوی بد در محصول که اغلب با شکست پروتئین ها و تولید مواد نیتروژنی فرار مرتبط است موثراند. TVB-N در این رابطه کمیت ترکیبات متشکل از آمونیاک و همچنین آمین های اولیه، دومین و سومین را تعیین می کند و از آنجایی که اساسا بدلیل تجزیه و تخریب باکتریایی ماهی تازه تولید می شود، بالاتر بودن میزان باریاکتریایی کل در فیله های بدون پوشش می تواند بعنوان دلیل افزایش سریع TVB-N در این تیمار در نظر گرفته شود [۲، ۲٤]. پایین تر بودن محتوی TVB-N در نمونه های محتوی اسانس نیز می تواند به کاهش سرعت رشد جمعیت باکتریایی و یا کاهش ظرفیت و توانایی باکتری ها برای آمین زدایی اکسیدانی از ترکیبات نیتروژنی غیر پروتئینی و یا هردو نسبت داده شود [۲٤] که این ناشی از تاثیر حضور اسانس پونه کوهی است. نتایج مشابهی در زمینه کاربرد فیلم و پوشش های غنی شده با اسانس های گیاهی در کنترل روند افزایش میزان TVB-N گزارش شده است [۲، ۲۲، ۲٤، ۲۸].

pH شاخصی است که بدلیل تاثیر بر فعالیت میکروارگانیسم ها و آنزیم ها بر روند فساد موثر است. بطور کلی می توان عنوان کرد که افزایش pH در فیله تازه ماهی بدلیل فعالیت باکتری های تجزیه کننده پروتئین و چربی اتفاق می افتد [۲۲]. بررسی تغییرات pH تیمارهای مختلف طی زمان نگهداری در دمای یخچال حاکی از افزایش میزان آن در تیمارهای مختلف بود و بالاترین میزان تغییرات (افزایش) در تیمار شاهد مشاهده شد. روند افزایش و میزان نهایی pH در تیمارهای حاوی پوشش فعال نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت. این نتایج می تواند با اثر ضد میکروبی اسانس خالص و نانولیپوزوم شده پونه مرتبط باشد که از فعالیت میکروارگانیسم ها و در نتیجه تولید متابولیت های بازی حاصل از آن ممانعت می کند. نتایج مشابهی در این رابطه توسط دیگر محققان گزارش شده است [۲۲، ۲۸].

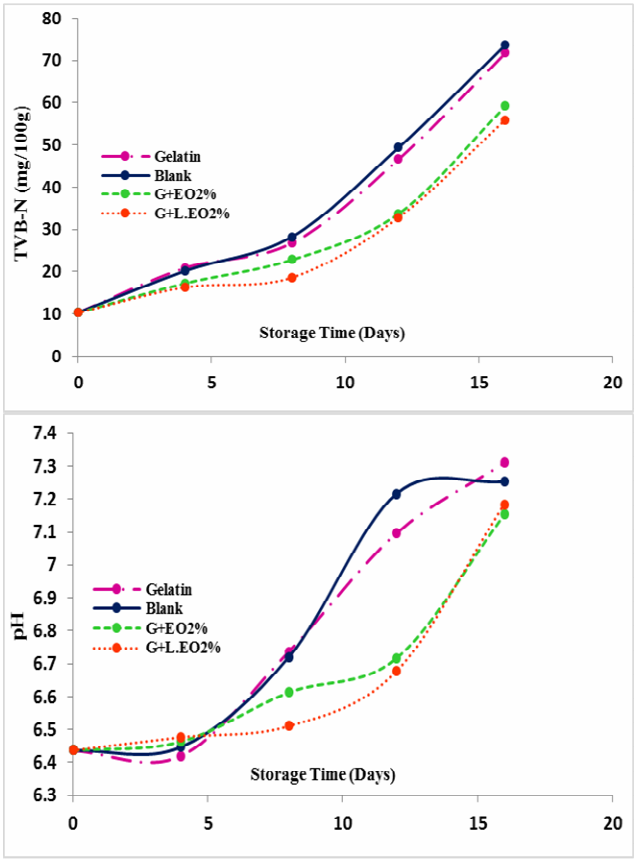

Fig 2 Changes in the total volatile basic nitrogen (TVB-N) and pH value of Rainbow trout fillets, Blank: uncoated samples; Gelatin: samples coated with Gelatin; G+EO2%: samples coated with Gelatin+2% oregano essential oil; G+L.EO2%: samples coated with Gelatin+oregano essential oil (2%) nanoliposomes during storage at 4°C for 16 days.

٤- نتیجه‌گیری کلی

نتایج آزمون های مختلف میکروبی و شیمیایی نشان داد که اعمال پوشش ژلاتینی استخراج شده از فلس ماهی کپور معمولی هرچند

www.SID.ir

Archive of SID

که در حالت خالص تاثیر چندانی بر کنترل عوامل باکتریایی فساد نداشت اما فعال سازی آن بوسیله اسانس پونه کوهی در حالت خالص و ریزپوشانی شده توانست روند رشد باکتری های مختلف را طی زمان نگهداری کنترل کرده و مدت ماندگاری تکه های فیله ماهی قزل آلا را در قیاس با تیمار شاهد از جنبه شاخص‌های باکتریایی تاحد قابل قبولی افزایش دهد. بطور کلی تاثیر ممانعتی پوشش های فعال در طول و پایان زمان نگهداری در شاخص‌های بارباکتریایی کل و انتروباکتریاسه نمود بیشتری داشت. اعمال پوشش های محتوی اسانس ریزپوشانی شده بویژه در روزهای نخست (تا روز ۸) تاثیر بهتری نسبت به اسانس خالص داشت. همچنین کمتر بودن میزان TVB-N و pH تیمارهای فعال در قیاس با تیمار شاهد و ژلاتین خالص همسو با تغییرات مشاهده شده در آزمون های میکروبی بوده و در واقع تایید دیگری بر خواص ضد میکروبی موثر پوشش های بکار رفته بود.

۵- منابع

[1] Cai, L., Cao, A., Li, Y., Song, Z., Leng, L., and Li, J. 2015. The effects of essential oil treatment on the biogenic amines inhibition and quality preservation of red drum (*Sciaenops ocellatus*) fillets. Food Control, 56, 1-8.

[2] Jouki, M., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., Koocheki, A., and Khazaei, N. 2014. Effect of quince seed mucilage edible films incorporated with oregano or thyme essential oil on shelf life extension of refrigerated rainbow trout fillets. International journal of food microbiology, 174, 88-97.

[3] Jeyasekaran, G., Ganesan, P., Anandaraj, R., Shakila, R. J., and Sukumar, D. 2006. Quantitative and qualitative studies on the bacteriological quality of Indian white shrimp (*Penaeus indicus*) stored in dry ice. Food microbiology, 23(6), 526-533.

[4] Dewettinck, K., Deroo, L., Messen, W. and Huyghebaert, A. 1998. Agglomeration tendency during top-spray fluidized bed coating with gums. Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie, 31: 576-584.

[5] Shaw, N.B., Monahan, F.J., O'Riordan, E. D. and O'sullivan, M. 2001. Effect of soy oil and glycerol on physical properties of composite WPI films. Food Engineering, 51: 299-304.

[6] Pranoto, Y., Lee, C. M., and Park, H. J. 2007. Characterizations of fish gelatin films added with gellan and κ-carrageenan. LWT-Food Science and Technology, 40(5), 766-774.

[7] Kelleher, K. 2005. Discards in the world's marine fisheries: an update (No. 470). Food and Agriculture Org.

[8] Yeganeh, S., Shabanpour, B., Hosseini, H., Imanpour, M.R., and Shabani, A. 2010. An investigation of spawning effect on lipid quality changes of cultured Common carp (*Cyprinus carpio*) fillet during frozen storage. Journal of Fisheries (Iranian Journal of Natural Resources), Vol. 63, No. 1, 20. pp. 57-69.

[9] Davidson, PM. and Zivanovic, S. 2003. The use of natural antimicrobials. Food preservation techniques, 5-30.

[10] Holley, R. A. and Patel, D. 2005. Improvement in shelf-life and safty of perishable foods by plant essential oils and smoke antibacterials: A Review. Food Microbiology, 22: 273-292.

[11] Castilho, P.C., Savluchinske-Feio, S., Weinhold, T.S. and Gouveia, S.C. 2012. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of essential oils, extracts and their main components from oregano from Madeira Island, Portugal. Food Control, 23(2): 552-558.

[12] Cho, Y.H., Shim, H. K. and Park, J. 2003. Encapsulation of fish oil by an enzymatic gelation process using transglutaminase cross-linked proteins. Food Science, 68: 2717–2723.

[13] Jiménez, A., Sánchez-González, L., Desobry, S., Chiralt, A. and Tehrany, Elmira Arab. 2014. Influence of nanoliposomes incorporation on properties of film forming dispersions and films based on corn starch and sodium caseinate. Food Hydrocolloids, 35: 159-169.

[14] Ma, Q., Zhang, Y., Critzer, F., Davidson, P. M., Zivanovic, S., and Zhong, Q. 2016. Physical, mechanical, and antimicrobial properties of chitosan films with microemulsions of cinnamon bark oil and soybean oil. Food Hydrocolloids, 52, 533-542.

[15] Liolios, C. C., Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J., and Chinou, I. 2009. Liposomal

www.SID.ir

Archive of SID

[24] Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., and Hosseini, S. M. H. 2010. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. Food chemistry, 120(1), 193-198.

[25] Ibrahim Sallam, K. 2007. Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon, Food Control, 18, 566–575.

[26]Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M., and Farahmandghavi, F. 2015. Bio-based composite edible films containing *Origanum vulgare L.* essential oil. Industrial Crops and Products, 67, 403-413.

[27] Wu, J., Ge, S., Liu, H., Wang, S., Chen, S., Wang, J., and Zhang, Q. 2014. Properties and antimicrobial activity of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin-chitosan films incorporated with oregano essential oil for fish preservation. Food Packaging and Shelf Life, 2(1), 7-16.

[28] Emiroğlu, Z. K., Yemiş, G. P., Coşkun, B. K., and Candoğan, K. 2010. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. Meat Science, 86(2), 283-288.

[29] Hubbs, J. 1991. Fish: microbiological spoilage and safety. LWT- Food Science and Technology,5: 166-173.

[30] Ahmad, M., Benjakul, S., Sumpavapol, P., and Nirmal, N, P. 2012. Quality changes of sea bass slices wrapped with gelatin film incorporated with lemongrass essential oil. International Journal of Food Microbiology, 155: 171-178.

[31] Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J, B., Christensen, A, B., and Givskov, M. 2002. Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. International Journal of Food Microbiology, 78: 79-97.

[32] Sousa, J. A., Romalde, J. L., Ledo, A., Eiras, J. C., Barja, J. L., and Toranzo, A. E. 1996. Health status of two salmonid aquaculture facilities in North Portugal: characterization of the bacterial and viral pathogens causing notificable diseases. Journal of Fish Disease, 19: 83-90.

[33] Mexis, S. F., Chouliara, E., and Kontominas, M. G. 2009. Combined effect of incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. Food chemistry, 112(1), 77-83.

[16] Weng, W., Zheng, H., and Su, W. 2014. Characterization of edible films based on tilapia (*Tilapia zillii*) scale gelatin with different extraction pH. Food Hydrocolloids, 41, 19-26.

[17] Pires, C., Ramos, C., Teixeira, B., Batista, I., Nunes, M. L., and Marques, A. 2013. Hake proteins edible films incorporated with essential oils: Physical, mechanical, antioxidant and antibacterial properties. Food Hydrocolloids, 30(1): 224-231.

[18] Gómez-Estaca, J., de Lacey, A. L., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., and Montero, P. 2010. Biodegradable gelatin–chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. Food Microbiology, 27(7), 889-896.

[19] Hernández, M.D., López, M.B., Álvarez, A., Ferrandini, E., García García, B., and Garrido, M.D. 2009. Sensory, physical, chemical and microbiological changes in aquacultured meagre (*Argyrosomus regius*) fillets during ice storage, Food Chemistry 114, 237–245.

[20] Wu, J., Liu, H., Ge, S., Wang, S., Qin, Z., Chen, L., and Zhang, Q. 2015. The preparation, characterization, antimicrobial stability and in vitro release evaluation of fish gelatin films incorporated with cinnamon essential oil nanoliposomes. Food Hydrocolloids, 43, 427-435.

[21] Zhang, H. Y., Tehrany, E. A., Kahn, C. J. F., Ponçot, M., Linder, M., and Cleymand, F. 2012. Effects of nanoliposomes based on soya, rapeseed and fish lecithins on chitosan thin films designed for tissue engineering. Carbohydrate Polymers, 88(2), 618-627.

[22] Kazemi, S. M., and Rezaei, M. 2015. Antimicrobial Effectiveness of Gelatin–Alginate Film Containing Oregano Essential Oil for Fish Preservation. Journal of Food Safety, 35(4), 482-490.

[23] Gram, L., and Huss, H. H. 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. International journal of food microbiology, 33(1), 121-137.

www.SID.ir

Archive of SID

an oxygen absorber and oregano essential oil on shelf life extension of rainbow trout fillets stored at 4 C. Food Microbiology, 26(6), 598-605.

[34] Papadopoulos, V., Chouliara, I., Badeka, A., Savvaidis, I. N., and Kontominas, M. G. 2003. Effect of gutting on microbiological, chemical, and sensory properties of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. Food Microbiology, 20, 411–420.

[35] Jeevanandam, K., Kakatkar, A., Doke, S. N., Bongirwar, D. R., and Venugopal, V. 2001. Influence of salting and gamma irradiation on the shelf-life extension of threadfin bream in ice. Food Research International, 34(8), 739-746. [36]Ahmad, M., Benjakul, S., Prodpran, T., and Agustini, T. W. 2012. Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. Food Hydrocolloids, 28(1), 189-199.

[37] Kalemba, D., and Kunicka, A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medicinal Chemistry, 10: 813-829.

[38] Kubo, I., Muroi, H., and Kubo, A. 1995. Structural functions of antimicrobial long-chain alcohols and phenols. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 3: 873-880.

[39] Gunlu, A., and Koyun, E. 2012. Effects of vacuum packaging and wrapping with chitosan-based edible film on the extension of the shelf life of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets in cold storage (4°C). Food Bioprocess Technol. 6, 1713–1719.

www.SID.ir

Archive of SID

Comparative evaluation of the effect of gelatin coating enriched with pure and nanoliposome Oregano essential oil on microbial quality of Rainbow trout fillet during cold storage (4 ± 2°C)

Ojagh, S. M.[1*], Kazemi, M.[2], Mirsadeghi, S. H.[2]

1. Associate Professor, Department of Seafood Processing, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan
2. Ph. D. Student, Department of Seafood Processing, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan

(Received: 2016/04/18 Accepted: 2016/10/26)

The effects of gelatin derived from Common carp scales enriched with pure and nanoliposome Oregano essential oil (OEO) (2% oil) as a preservative coating on shelf life extension of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during refrigerated storage (4 °C) were evaluated over a period of 16 days. The control and coated fillet samples with pure gelatin and gelatin contained OEO and OEO nanoliposoms were analyzed periodically for microbiological (total viable count, psychrotrophic count, Pseudomonas spp., and Enterobacteriaceae) and chemical (TVB-N, pH) characteristics. Bacteria grew most quickly in trout fillets control, followed by those coated with gelatin and the lowest counts were in coated samples with gelatin contained OEO nanoliposoms ($p<0.05$). The TVB-N and pH increased with time of storage. TVB-N and pH correlated well with the microbiological data that indicating TVB-N and pH may serve as a useful index for fillets spoilage. In generally, results shown that the gelatin coatings contained OEO and OEO nanoliposoms, resulted in a significant shelf life extension of the trout fillets as compared to the control samples ($p<0.05$). Treatment contained OEO nanoliposoms especially in the early days, in all analyses was better than pure essential oil. These results shown that nanoliposoms mainly until about a week after storage, enhanced the effectiveness and sustainability antibacterial properties of essential oils.

Keywords: Gelatin, Essential oil, Nanoliposome, Storage, Rainbow trout

* Corresponding Author E-Mail Address: mahdi_ojagh@yahoo.com

www.SID.ir