

بررسی مقایسه ای اثر پوشش ژلاتین غنی شده با اسانس پونه کوهی خالص و نanolipozom شده بر کیفیت میکروبی فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان نگهداری شده در شرایط سرد ($4 \pm 2^\circ\text{C}$)

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 فلز ماهی کپور معمولی غنی شده با ۲٪ اسانس پونه کوهی Nanolipozom شده و خالص، بعنوان نگهدارنده روی فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان طی مدت ۱۶ روز نگهداری در دمای ۴°C پوشش داده شاهد، پوشش داده شده با ژلاتین خالص و همچنین پوشش داده شده با ژلاتین حاوی اسانس (خالص و Nanolipozom 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. سریع ترین روند رشد شاخص های باکتریایی مختلف در تیمار شاهد و کندرتین آن در تیمار حاوی اسانس Nanolipozom شده مشاهده شد ($p < 0.05$). 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 N-TVB 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 Nanolipozom شده و خالص توانستند زمان ماندگاری فیله های ماهی قزل آلا را در مقایسه با تیمار شاهد به شکل معنی داری افزایش دهند ($p < 0.05$). تیمار محتوی اسانس Nanolipozom شده خصوصاً در روزهای نخست، در تمامی آزمون های صورت گرفته بهتر از اسانس خالص بود که نشان می دهد Nanolipozom ها اساساً تا حدود یک هفته پس از اعمال پوشش کارایی و پایداری اثر ضد میکروب اسانس را افزایش دادند.

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

*مسئول مکاتبات: mahdi_ojagh@yahoo.com

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 کلوبیدی و تولید ریزامولسیون ها است که می تواند 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 [۱۴]. لیولیوس و همکاران (۲۰۰۹) [۱۵] مشاهده کردن 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 فیله ها طی مدت ۱۶ روز نگهداری در یخچال ارزیابی شد.

۲- مواد و روش ها

۱-۱- استخراج ژلاتین از فلس ماهی کپور معمولی

استخراج ژلاتین از فلس کپور بر اساس روش ونگ همکاران (۲۰۱۴) [۱۶] با اندکی اصلاح انجام شد. ابتدا به منظور حذف چربی و پروتئین های غیر کلارزنه، فلس ها در محلولی مرکب از چربی و پروتئین های غیر کلارزنه، فلس ها در محلولی مرکب از NaOH ۰/۰۵ مolar)، H_2O_2 ۱/۵٪ و HCl ۰/۰۵ مolar) با نسبت ۱:۱ قرار داده شدند. سپس فلس ها بوسیله شستن با آب مقطر خشی سازی شدند. زدودن مواد معدنی از فلس ها با استفاده از محلول HCl ۰/۰۵ مolar) با نسبت ۱:۵ (وزنی/حجمی) به مدت یک شب در دمای حدود 10°C قرار داده شدند. سپس فلس ها بوسیله شستن با آب مقطر خشی سازی شدند. زدودن مواد معدنی از فلس ها با استفاده از محلول HCl ۰/۰۵ مolar) با نسبت ۱:۵ (وزنی/حجمی) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتان انجام شد، سپس فلس ها به منظور خشی سازی pH با آب مقطر شسته شدند. بعد از انجام پیش تیمار، فلس های متورم در pH ۵ خیسانده و به

۱- مقدمه

ماهی و سایر آبزیان به سبب فعالیت آبی بالا، PH خشی، نسبت بالای اسید آمینه آزاد، اسیدهای چرب چند غیراشبع و همچنین حضور آنزیم های اتوکتیک، درگیر مکانیسم های مختلف فساد از قبیل پیشرفت میکروبی، اکسیداسیون چربی و همچنین قهوه ای شدن آنزیمی شده و متعاقباً کیفیت و مدت ماندگاری آنها کاهش میابد [۱-۳]. 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 میکرووارگانیسم 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 [۴] و حاملی برای مواد افزودنی [۵] برخوردار است. ژلاتین به دلیل فراوانی و ارزش غذایی برای تولید پوشش های خوراکی مورد توجه است. در سال های اخیر با توجه 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 [۶]. عمل آوری آبزیان معمولاً 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 دارد. 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 ضد میکروبی طبیعی، اسانس های گیاهی مثل پونه کوهی می باشند که ترکیب، ساختار و گروه های عاملی این ترکیبات می توانند نقش مهمی در فعالیت ضد میکروبی آنها ایفا نمایند [۱۰]. کارواکرول و تیمول از مهم ترین ترکیبات فنلی اسانس پونه کوهی هستند که بیشترین فعالیت ضد میکروبی را دارند [۱۱]. با توجه به بُوی تند پونه کوهی

و برای ایجاد امولسیونی یکنواخت به مدت ۲ دقیقه در دور ۱۳۵۰۰ rpm تحت عمل هم زدن قرار گرفت [۱۷]. همچنین برای تهیه پوشش‌های محتوی اسانس نانولیپوزوم شده، پس از تهیه محلول ژلاتین، نانولیپوزوم‌ها 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].

۵-۲- آماده سازی ماهی و اعمال پوشش‌ها

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تازه با میانگین وزنی 40 ± 300 گرم تهیه و به شکل کاملاً بخ پوشی شده به آزمایشگاه فرآوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شد. بعد از مراحل تخلیه شکمی و سرزنجی، فیله‌های تهیه شده به خوبی شست و شو و جهت حذف آب اضافی سطح زیر هود قرار گرفتند. جهت ایجاد پوشش، ابتدا فیله‌ها به مدت ۳۰ ثانیه در محلول مربوطه غوطه شده سپس خارج شدند و پس از گذشت تقریباً ۲ دقیقه مجدداً ۳۰ ثانیه دیگر در محلول قرار گرفتند. نمونه‌های کنترل بدون پوشش باقی ماندند. پس از اتمام آب چک نمونه‌ها جهت خشک شدن و تشکیل پوشش روی آنها در صفحات مشبك استریل قرار گرفته و زیر هود میکروبیولوژی قرار داده شدند. در پایان ۴ 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 ۱۶ روز در فواصل زمانی ۴ روز مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۶- بررسی میزان بار باکتریایی

نخست میزان ۵ گرم از نمونه فیله ماهی تحت شرایط استریل با ۴۵ میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژی محلول و سپس هموژن گردید. در ادامه رقت‌های مورد نیاز تهیه و میزان ۱ میلی‌لیتر از هر کدام جهت کشت و بررسی بار باکتریایی کل، سرمادوست، سودوموناس و انتروباكتریاسه به روش پورپلیت به ترتیب در محیط‌های کشت پلیت کانت آگار (PCA)، ستريمايد 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

منظور استخراج ژلاتین، در دمای 80°C به مدت ۱ ساعت حرارت داده شدند. بعد از این مرحله، محلولهای مورد نظر به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 20°C در دور ۱۵۰۰۰ rpm (Eppendorf 5810R). سوپریناتانت جداسازی و فریز درایر شده و ماده خشک بدست آمده به عنوان پودر ژلاتین در دمای 18°C -تا زمان استفاده ذخیره شد.

۲- روش تهیه نانولیپوزوم‌های اسانس پونه

نانولیپوزوم‌ها طبق روش خیمنز و همکاران (۲۰۱۴) [۱۳] با کمی اصلاح تولید شدند [۱۴]. ابتدا ۲ گرم لیستین + ۲ گرم توئین ۸۰ در ۳۸ گرم آب مقطمر مخلوط و برای ۵h توسط شیکر (IKA, Germany) تکان داده شدند. در مرحله بعد ۴ گرم اسانس پونه کوهی به دیسپرسیون آبی اضافه شده و کل مخلوط به مدت ۶۰۰ ثانیه (۱ ثانیه روشن و ۱ ثانیه خاموش) در 40 KHz و $\frac{۴۰}{۴۰}$ قدرت دستگاه (Misonix, S-4000, USA) تحت شرایط سونیکاسیون قرار گرفت. نانولیپوزوم‌های تولیدی تا زمان استفاده در بطری‌های استریل و در شرایط تاریک نگهداری شدند.

۳- بررسی سایز و پتانسیل زتا نانولیپوزوم‌ها

میانگین اندازه و پتانسیل زتا نانولیپوزوم‌ها با استفاده از دستگاه Malvern Zetasizer (نانو ZS) (Worcestershire, U.K.) بوسیله روش پخش نور لیزر بررسی شد. قبل از اندازه گیری نمونه توسط آب دیونایز رقيق 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].

۴- تولید پوشش‌های فعال

پوشش‌های ژلاتینی بر اساس روش ونگ و همکاران (۲۰۱۴) [۱۶] تولید شدند. پودر ژلاتین به مدت ۳۰ دقیقه در آب مقطمر متورم شده و سپس در دمای 60°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 محلول‌های پوششی فعال، اسانس پونه کوهی با غلظت ۲٪ (حجمی/حجمی) به محلول فیلم ساز افروده شده [۲].

۳- نتایج و بحث

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

نمودارهای مرتبط با توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتا نanolipozomها در شکل ۱ نشان داده شده است. طبق نتایج بیشینه توزیع اندازه نانوذرات در محدوده زیر 100 nm بود. بنابراین سایز نanolipozom با آنچه که برای کاربردهای غذایی و دارویی نیاز است مطابق بود [۲۰]. اندازه نanolipozomها بدلیل تاثیر بر پایداری و ظرفیت آزادسازی ترکیبات محصور شده در هسته آنها مورد توجه است. در حالت کلی سایز کوچک بدلیل تاثیر بر فراهم شدن محلول همگن‌تر و پایدارتر مطلوب است. از طرفی سایز نانوذرات (nanolipozomها) از آنجایی می‌توانند برای انسان و محیط زیست سمی باشند باید کنترل شود [۱۳]. در این تحقیق نتایج مرتبط با اندازه ذرات نanolipozomها با کارهای مشابه انجام شده توسط ژانگ و همکاران (۲۰۱۲) و همچنین خیمنز و همکاران (۲۰۱۴) مطابقت داشت [۱۳، ۲۱] و اندک تفاوت مشاهده شده در نتایج (کوچکتر بودن سایز نanolipozomها در این تحقیق) می‌تواند بدلیل تفاوت در زمان سونیکاسیون و همچنین مواد شرکت کننده در دیسپرسیون باشد. بر طبق گزارش خیمنز و همکاران (۲۰۱۴) [۱۳] به 300 ثانیه سونیکاسیون برای ریزپوشانی کامل ترکیبات ضد میکروب (اسانس‌ها) در داخل این نوع از نanolipozomها احتیاج است. همچنین گزارش شده است که نanolipozom‌های بارگذاری شده با ترکیبات ضد میکروب روغنی (اسانس) سایز کمتری را نسبت به نanolipozom‌های بدون این ترکیبات نشان دادند که همین عامل می‌تواند در بروز سایز نسبتاً کوچک این نانوذرات در تحقیق حاضر موثر بوده باشد [۱۳].

پتانسیل زتا فاکتوری مهم در تولید نanolipozomها محسوب می‌شود که برای توضیح میزان بار موجود در دیسپرسیون بکار رفته و بر پایداری نanolipozom‌های تولید شده موثر است. همانطور که مشهود است دامنه پتانسیل زتا نanolipozom‌های تولید شده در ناحیه منفی قرار دارد و بیشینه میزان آن در نقطه (mv) $-36/6$ واقع است. این منفی بودن اساساً ناشی از حضور گروه‌های انتهای زنجیره‌های چربی است. بطور کلی گزارش شده است که

سانتی‌گراد به مدت 2 روز انجام گرفت [۲]. همچنین بررسی تعداد باکتری‌های سودومonas و انتروباکتریا به ترتیب در دماهای 25 و 30 درجه سانتی‌گراد به مدت 2 روز انجام پذیرفت [۱۸].

۷- آزمون‌های شیمیایی

۱-۷-۲- اندازه گیری pH نمونه‌ها

نخست 5 گرم از نمونه‌ها به مدت 1 دقیقه با 45 میلی لیتر آب pH دیونایز همگن شده سپس میزان pH آن‌ها بوسیله دستگاه سنج که در pH‌های 4 و 7 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 10 گرم گوشت همراه با 2 گرم اکسید منیزیم در حضور 300 میلی لیتر آب مقطر در داخل بالن و در نهایت جمع آوری بازهای ازته فرار در داخل یک ارلن مایر محتوی 25 میلی لیتر محلول اسید بوریک 2% و چند قطره متیل رد بعنوان شاخص، تا گذشت 45 دقیقه از زمان جوشش ادامه یافت. در نهایت تیتر محلول زرد رنگ حاصل با اسید سولفوریک ($1/0$ نرمال) تا حاصل شدن رنگ ارغوانی انجام گرفت و میزان TVB-N طبق فرمول زیر محاسبه و به صورت میلی گرم نیتروژن در 100 گرم گوشت ماهی بیان شد.

$$\text{TVB-N} = 14 \times \text{حجم اسید سولفوریک مصرفی}$$

۸- تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام گرفت. ابتدا بررسی نرمال بودن و همگنی واریانس داده‌ها به ترتیب با استفاده از آزمون های کولموگراف- اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov) و لون (Leven) (Kolomogorav-Smirnov) سپس به منظور تجزیه و تحلیل مقادیر کمی به دست آمده از آنالیزهای میکروبی و شیمیایی از تجزیه واریانس (ANOVA) و همچنین برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون Duncan استفاده شد. مقایسه‌های آماری در سطح اطمینان 95% انجام پذیرفت و تمامی نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه گردید.

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.

اگر میزان مطلق پتانسیل زتا بین (mv) $30\text{--}60$ باشد به دلیل دافعه الکترواستاتیک ایجاد شده، سیستم نanolipozomی پایدار است [۲۰]. بنابر بر مطالب ذکر شده می توان نتیجه گرفت که

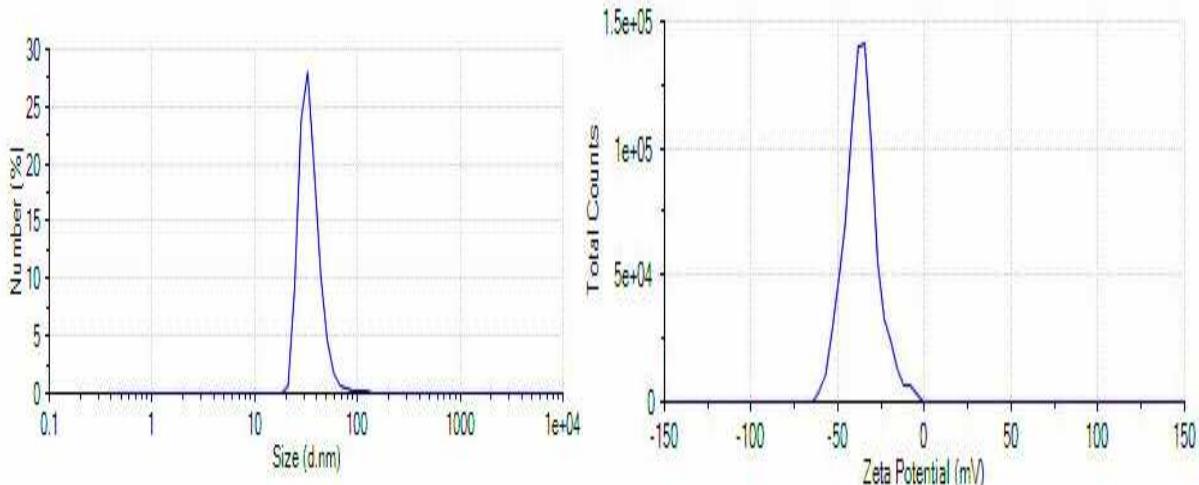


Fig 1 Typical particle size distribution and zeta potential curves of the oregano essential oil (OEO) nanoliposomes.

شده با ژلاتین خالص به بالاتر از میزان مجاز تعیین شده ($\log CFU/g$) ۷ برای ماهی قزل آلا [۲۵] در روز ۸ رسیدند. افزایش بار باکتریایی کل در طول زمان نگهداری سرد توسط اجاق و همگاران (۲۰۱۰) [۲۶] گزارش شده است. این روند افزایش در تیمارهای پوششی محتوی اسانس خالص و نanolipozom شده به شکل معنی دار نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت و متعاقباً زمان ماندگاری در این تیمارها تا روز ۱۲ افزایش پیدا کرد ($p<0.05$). همچنین میزان این شاخص در پوشش های محتوی اسانس نanolipozom شده نسبت به اسانس خالص در روز ۸ بطور قابل ملاحظه ای کمتر بود ($p<0.05$) که این می تواند ناشی از اثر سینثزیستی و یا پایدار کنندگی نanolipozom 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 [۲۴، ۲۲]. بعلاوه اینکه اثر ضد میکروبی اسانس پونه کوهی برابر میکروگانیسم های مختلف توسط سایر محققان به اثبات رسیده است [۲، ۲۷، ۲۸].

۲-۳- آزمون های میکروبی

در ماهی تازه، میکروگانیسم 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 متabolit هایی می شوند که مسئول طعم و بوی بد و به تبع آن رد کیفیت تعزیه ای آن توسط مصرف کننده می شوند. جنس سودوموناس و باکتری های لاكتیک اسید بطور کلی در فلور عامل فساد ماهی غالب اند. باکتری های گرم منفی مختلفی از قبیل انتروباکتریاسه نیز در این زمینه مطرح هستند [۲۳، ۲۲]. نتایج مرتبط با تغییرات بارباکتریایی کل (TVC) تیمارهای مختلف در جدول ۱ 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، ۲۴]. بار باکتریایی کل تمام تیمارها با گذشت زمان نگهداری به شکل معنی دار افزایش نشان داد بطوری که تیمار شاهد و پوشش دهی

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).

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. احاق و همکاران (۲۰۱۰) [۲۴] 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 ۱۶ افزایش داد. احمد و همکاران (۲۰۱۲) [۳۰] نیز مشاهده کردند که روند رشد باکتری های سرمادوست فیله های ماهی باس دریابی پوشش داده شده با فیلم-های حاوی اسانس نسبت به تیمارهای دیگر کنترل شد. همچنین کاظمی و همکاران (۲۰۱۵) [۲۲] نیز نتایج مشابهی را در این زمینه گزارش کردند.

فساد میکروبی ماهی و فرآورده های حاصل آن حین نگهداری در یخچال عمدها توسط باکتریهای سرمادوست گرم منفی هوایی نظیر سودوموناس ها، آلتروموناس ها، شیوانلا و فلاووباكتریوم ها شکل می گیرد [۲۹]. در واقع باکتری های گرم منفی سرمادوست (PTC) گروه اصلی از میکرووارگانیسم های عامل فساد هوایی ماهیان تازه ذخیره سازی شده در دمای سرد می باشند [۲۲، ۲۳، ۲۴]. در مطالعه حاضر میزان اولیه باکتری های سرمادوست در حدود (log cfu/g) ۲/۶۳ مشاهده شد (جدول ۲). روند رشد باکتری های سرمادوست در تیمارهای مختلف مشابه با برآوردیابی کل بود بطوری که بالاترین میزان آن در تیمار شاهد و کمترین آن در تیمار پوششی محتوى اسانس نانولیپوزوم شده مشاهده شد. نتایج مشابهی در این رابطه توسط جوکی و همکاران (۲۰۱۴) [۲] گزارش شد که نشان دادند رشد باکتری های سرمادوست در فیله

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).

های سودوموناس جزء گروههای باکتریابی غالب در گوشت ماهی قزل آلای رنگین‌کمان به شمار می‌آید و در واقع گزارش شده است که سودوموناس ها مهمترین گروه از باکتری های

باکتری های سودوموناس از مهمترین گروههای ایجاد کننده فساد در فرآورده های غذایی مختلف از قبیل گوشت، مرغ، شیر و ماهی نگهداری شده در شرایط هوایی و سرد می باشند [۳۱]. باکتری-

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 نانولپیزوم 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، ۲۸، ۲۲، ۳۳].

عامل فساد هوایی ماهیان تازه ذخیره سازی شده در سرما هستند [۲۲، ۳۲]. میزان این باکتریها در روز صفر برای تیمارهای مختلف ۲/۵۷ مشاهده شد (جدول ۳). 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

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).

معنی داری افزایش نشان داد اما پوشش های فعال در برابر انترباکتریا سه نیز اثر بازدارنگی موثر نشان دادند ($p < 0.05$). 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 ($p < 0.05$) 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 تقریباً به اندازه ۱ سیکل لگاریتمی کاهش دادند. این نتایج با مشاهدات حاصل از مطالعات مشابه در این زمینه که توسط احمد و همکاران (۲۰۱۲) [۳۰] روی فیله ماهی باس دریایی، گومز-استاکا و همکاران (۲۰۱۰) [۱۸] روی فیله ماهی کاد، کاظمی و همکاران (۲۰۱۵) و جوکی و همکاران (۲۰۱۴) [۲۲] روی فیله ماهی قزلآلای رنگین کمان انجام گرفت، مطابقت داشت.

انترباکتریا سه بعنوان یک شاخص بهداشتی در مواد غذایی و همچنین بخشی از فلور میکروبی عامل فساد فیله ماهی قبل آلای رنگین کمان مطرح هستند [۲]. بررسی وجود این باکتری ها در موادغذایی از جمله فراورده های شیلاتی حیاتی است، چرا که این خانواده بسیاری از باکتری های بیماری زا نظیر سالمونلا را در بر می گیرد که در صورت مصرف مواد غذایی آلوده به آن سلامتی فرد به طور جدی در معرض خطر قرار می گیرد. محققان حضور باکتری های مذکور در آبزیان را به دلایلی نظیر صید از مناطق آلوده، تاخیر در یخ گذاری آبزیان صید شده و همچنین دستکاری پس از صید (آلودگی ثانویه) نسبت داده اند [۲۵، ۳۴، ۳۵]. پایین بودن این شاخص باکتریا سی در بررسی روز صفر تیمارهای مختلف (جدول ۴) 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

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).

این نتیجه رسیدند که تیمارهای محتوی اسانس نanolipozom شده در طول زمان انکوباسیون (به مدت ۳۰ روز) اثر پایدارتر و بیشتری را نشان دادند که این مشاهدات می‌تواند تاحدی نتایج مطالعه حاضر را تایید کند. با هدف توضیح بیشتر این پدیده می‌توان 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 ضدبакتریایی اسانس راه کار مناسبی نیست. از آنجایی که به نظر می‌رسد همزمان با پخش اسانس در محیط کشت، ترکیبات فرار و فعال آن تبخیر شده و فقط بخش قطبی آنهاست که از رشد بакتری ممانعت می‌کند [۳۷، ۳۸]. بنابراین با توجه به مشابهت محیط کشت آگاردار با سیستم‌های غذایی جامد با فعالیت آبی بالا، می‌توان عنوان کرد که Nanolipozom ها با کنترل رهایش اسانس در محیط و هدایت بیشتر ترکیبات فرار موجود در آن به سمت فلور بакتریایی موجود اثر آن را بهبود داده و تا مدت طولانی تر حفظ کرده‌اند. همچنین در زمینه کاهش اندک باربکتریایی در فیله‌های پوشش داده شده با ژلاتین خالص ادعا شده است که ژلاتین تشکیل دهنده پوشش و یا فیلم می‌تواند محتوی پیتیدهایی با فعالیت ضدمیکروبی باشد [۱۸، ۳۹].

۲-۳ - 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 میکرووارگانیسم‌ها براساس تشکیل ترکیبات ناشی از متابولیسم آنها و همچنین فعالیت آنزیم‌های داخلی وابسته است [۲۲]. الگوی تغییرات این شاخص در تیمارهای مختلف در شکل ۲ نشان داده شده است. میزان اولیه TVB-N در تیمارهای مختلف (۱۰۰ گرم گوشت/میلی گرم نیتروژن) ۱۰/۳۶ بود که

بطور کلی در تحقیق حاضر مشخص شد که تیمارهای پوششی فعال محتوی اسانس خالص و Nanolipozom شده قادرند به طور موثر از فعالیت و رشد بакتری‌های مختلف عامل فساد جلوگیری کنند. فعالیت ضد میکروبی اسانس پونه کوهی و اثر تعویت کنندگی و پایدار کنندگی ریزپوشانی (Nanolipozom) بر اسانس‌های مختلف در تحقیقات مشابه انجام شده گزارش شده است [۲، ۱۵، ۲۰، ۲۲]. فعالیت ضد میکروبی اسانس پونه کوهی به اجزای تشکیل دهنده آن‌ها و اساساً ترکیبات فنولیک مثل ترپن‌هایی از (2-methyl-5-[1-methylethyl] phenol) و (5-methyl-2-[1-methylethyl] phenol) نسبت داده می‌شود [۱۸]. کارواکرول و تیمول دیواره بیرونی بакتری‌های گرم منفی را متلاشی کرده و سبب آزاد شدن لیپولی ساکاریدها می‌شوند که در نتیجه آن نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی به آدنوزین تری-فسفات افزایش می‌آید. در واقع فعالیت ضد میکروبی بیشتر ترپن‌های با گروه‌های عاملی آنها مرتبط است، و مشخص شده است که جایگاه و تعداد گروه‌های هیدروکسیل ترپن‌های فنولیک و حضور الکترون‌های متحرک از جنبه فعالیت ضد میکروبی آن‌ها مهم است [۳۶، ۲]. گروه‌های هیدروکسیل توانایی آب دوستی این ترکیبات افزایش داده و به حل شدن آنها در غشای سیتوپلاسمی میکروب و تخریب آن کمک می‌کنند. در حالت کلی، مکانیسم ضد میکروبی اسانس‌ها با اختلال در غشای سیتوپلاسمی، مختلط کردن نیروی انتقال پروتون، جریان الکترون، انتقال فعال و انقاد محتويات درونی سلول مرتبط است [۳۲، ۱۸]. در رابطه با بهبود و پایدارتر شدن اثر ضدمیکروبی تیمار محتوی اسانس Nanolipozom شده در قیاس با اسانس خالص، وو و همکاران (۲۰۱۴) [۲۰] طی یک بررسی مقایسه‌ای، اثر ضد میکروبی فیلم‌های خوراکی محتوی اسانس دارچین خالص و ریزپوشانی شده را مورد بررسی قرار دادند و به

روند افزایش و میزان نهایی pH در تیمارهای حاوی پوشش فعال نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت. این نتایج می‌تواند با اثر ضد میکروبی اسانس خالص و نanoliposomes شده پونه مرتبط باشد که از فعالیت میکرورگانیسم‌ها و در نتیجه تولید متabolit‌های بازی حاصل از آن ممانعت می‌کند. نتایج مشابهی در این رابطه توسط دیگر محققان گزارش شده است [۲۲، ۲۸].

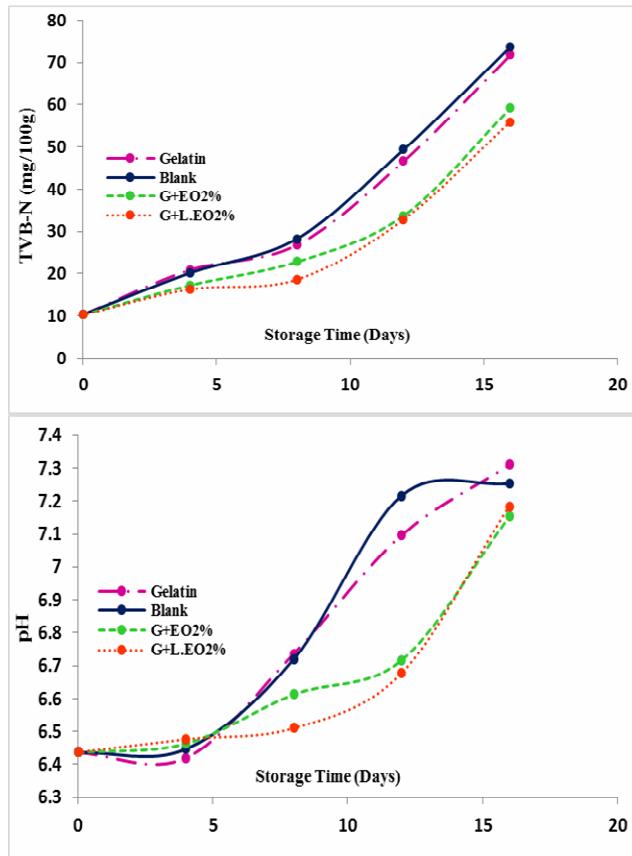


Fig 2 Changes in the total volatile basic nitrogen (TVB-N) and pH value of Rainbow trout fillets, Blank: uncoated samples; Gelatin: samples coated with Gelatin; G+EO2%: samples coated with Gelatin+2% oregano essential oil; G+L EO2%: samples coated with Gelatin+oregano essential oil (2%) nanoliposomes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

۴- نتیجه‌گیری کلی

نتایج آزمون‌های مختلف میکروبی و شیمیایی نشان داد که اعمال پوشش زلائینی استخراج شده از فلس ماهی کپور معمولی هرچند

نشان دهنده کیفیت اولیه مناسب فیله‌های ماهی است. TVB-N در طول زمان نگهداری تیمارهای مختلف افزایش نشان داد و در روز ۱۶ به بالاترین میزان خود در تیمار شاهد رسید (۷۳/۶۴). تیمارهای پوششی مختلف از این نظر متفاوت بودند و روند افزایش و همچنین میزان نهایی این شاخص در فیله‌های دارای پوشش فعال نسبت به تیمار شاهد پایین تر بود بطوری که در تیمار محتوی اسانس نanoliposomes شده در روز ۱۶ به ۵۵/۸۹ رسید. ماهی محتوی تعدادی زیادی از باکتری‌ها در سیستم هاضمه است و همچنین آنزیم‌های قوی هضم کننده طی دوره تغذیه در این سیستم تولید می‌شوند که می‌توانند تخریب و تجزیه عضله را در مرحل ذخیره سازی و نگهداری سرد شدت بخشنند. این تغییرات بر ایجاد و تشديد طعم و بوی بد در محصول که اغلب با شکست پروتئین‌ها و تولید مواد نیتروژنی فرار مرتبط است موثراند. TVB-N در این رابطه کمیت ترکیبات مشکل از آمونیاک و همچنین آمین‌های اولیه، دومین و سومین را تعیین می‌کند و از آنجایی که اساساً بدلیل تجزیه و تخریب باکتری‌ای ماهی تازه تولید می‌شود، بالاتر بودن میزان بارباکتری‌ای کل در فیله‌های بدون پوشش می‌تواند عنوان دلیل افزایش سریع TVB-N در این تیمار در نظر گرفته شود [۲۴]. پایین تر بودن محتوی TVB-N در نمونه‌های محتوی اسانس نیز می‌تواند به کاهش سرعت رشد جمعیت باکتری‌ای و یا کاهش ظرفیت و توانایی باکتری‌ها برای آمین زدایی اکسیدانی از ترکیبات نیتروژنی غیر پروتئینی و یا هردو نسبت داده شود [۲۴] که این ناشی از تاثیر حضور اسانس پونه کوهی است. نتایج مشابهی در زمینه کاربرد فیلم و پوشش‌های غنی شده با اسانس‌های گیاهی در کنترل روند افزایش میزان TVB-N گزارش شده است [۲۸، ۲۴، ۲۲].

pH شاخصی است که بدلیل تاثیر بر فعالیت میکرورگانیسم‌ها و آنزیم‌ها بر روند فساد موثر است. بطور کلی می‌توان عنوان کرد که افزایش pH در فیله تازه ماهی بدلیل فعالیت باکتری‌های تجزیه کننده پروتئین و چربی اتفاق می‌افتد [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.

- [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., Shabani, 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, P.M. 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 safety 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

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 شاخص های باکتریایی تاحد قابل قبولی افزایش دهد. بطور کلی تاثیر ممانعی پوشش های فعال در طول و پایان زمان نگهداری در شاخص های بار باکتریایی 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., Ganeshan, 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 und Technologie*, 31: 576-584.

- [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 Candogân, 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 notifiable 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 Lace, 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.

- 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.
- 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

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 ($4 \pm 2^{\circ}\text{C}$)

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 nanoliposomes 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 nanoliposomes ($p<0.05$). 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 nanoliposomes, resulted in a significant shelf life extension of the trout fillets as compared to the control samples ($p<0.05$). Treatment contained OEO nanoliposomes especially in the early days, in all analyses was better than pure essential oil. These results shown that nanoliposomes 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