مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

بررسی اثر ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی پوشش خوراکی دولایه ژلاتین-کیتوزان حاوی نانوامولسیون اسانس برازمبل روی کنترل رشد باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* تلقیح شده به فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان

کتایون احمدی[۱]، محمد محسن زاده[۲*]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بهداشت وکنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.

۲-استاد گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۱۷

کلمات کلیدی:

نانو امولسیون،

برازمبل،

کیتوزان،

زمان ماندگاری،

آئروموناس هیدروفیلا،

ژلاتین، ماهی قزل آلا،

پوشش، بسته بندی.

DOI: 10.22034/FSCT.19.133.29

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.133.3.8

* مسئول مکاتبات:

mohsenzadeh@um.ac.ir

چکیده

در این مطالعه اثر پوشش خوراکی دو لایه ی ژلاتین-کیتوزان حاوی نانوامولسیون اسانس برازمبل بر روی کنترل رشد باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* تلقیح شده به فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان طی یک دوره ی ۱۲ روزه در دمای ٤ °C بررسی شده است. ترکیبات شیمیایی اسانس با دستگاه طیف سنج جرمی، خاصیت ضد باکتریایی به روش های انتشار در دیسک، چاهک پلیت و میکرو دایلوشن براثوخاصیت آنتی اکسیدانی با روش احیاء رادیکال آزاد مورد ارزیابی قرارگرفت. تیمارها شامل گروه های کنترل، پوشش ژلاتین، کیتوزان، ژلاتین+اسانس، کیتوزان+اسانس و ژلاتین-کیتوزان+اسانس بودند. نمونه ها پس از آماده سازی در کیسه های استریل پلی اتیلنی در شرایط آزمایشگاه بسته بندی و ۱۲روز در ٤°C نگهداری و به فاصله ۳ روز مورد ارزیابی میکروبی، شیمیایی و حسی قرار گرفتند. نتایج آنالیز اسانس نشان داد که بیشترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس شامل اکالیپتول (۲٤/۵۱ درصد) و کامفور(۲۲/۰۲ درصد) می باشند. حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی نانوامولسیون اسانس برازمبل به ترتیب ۰/۰٦۲۵ و ۰/۱۲۵ درصد گزارش گردید. میزان بازهای ازته ی فرار و اندیس پراکسید در طول دوره ی مطالعه روند افزایشی داشته است. طبق نتایج حاصل از اندازه گیری شاخص پراکسید و pH، بین تمام تیمار ها و تیمار کنترل اختلاف معنی داری وجود داشت($P<0/05$). میانگین لگاریتم کاهش باکتری در بین گروه ها تفاوت معنی داری داشت و بیشترین اثر ضد باکتریایی در پوشش کیتوزان-ژلاتین حاوی نانوامولسیون اسانس برازمبل مشاهده شد. بر اساس نتایج بدست آمده مشخص گردید که پوشش خوراکی دولایه ژلاتین-کیتوزان حاوی نانوامولسیون اسانس برازمبل دارای اثر ضدمیکروبی مؤثری بر علیه باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* داشته و سبب حفظ ویژگی های حسی و افزایش ماندگاری ماهی قزل آلای رنگین کمان شده و می تواند پوشش مناسبی جهت افزایش عمر ماندگاری محصولات غذایی باشد.

۱-مقدمه

امروزه گوشت ماهی به عنوان یکی از منابع مهم رژیم غذایی انسان محسوب می شود. بزرگ ترین نگرانی در مصرف گوشت ماهی، سرعت بالای فساد و افت کیفیت اولیه ی آن است؛ از این رو شرایط نگهداری و نوع بسته بندی آن از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد [۱-۳]. ماهی قزل آلای رنگین کمان[1] به عنوان یکی از گونه هایپر مصرف ماهیان چرب پرورشی در بیشتر نقاط جهان و حتی ایران شناخته شده است[۳]. روش هایی همانند انجماد و افزودن ترکیبات نگهدارنده به طور کافی توانایی کنترل واکنش های فساد ماهی را ندارند. بر اساس مطالعات اخیر، استفاده از ترکیبات نگهدارنده طبیعی و روش های مناسب بسته بندی،نه تنها محصول را در برابر آسیب های فیزیکی و فساد میکروبی حفظ می کند و سبب افزایش زمان ماندگاری آن می شود بلکه به لحاظ بازار پسندی و جلب مشتری نیز اهمیت ویژه ای دارد [۱، ٤، ٥]. امروزه به دلیل تقاضای بیشتر بسته بندی های کوچکتر، راحت تر و ایمن تر، استفاده از فیلم ها و پوشش های خوراکی به منظور افزایش زمان ماندگاری ماهی رواج پیدا کرده است. پوشش های خوراکی[2]، لایه های نازک با ضخامت کمتر از ۰/۱ میلی متر از موادی قابل مصرف و بی خطر برای انسان می باشند که به طور مستقیم برای پوشش قسمت خارجی انواع محصولات به کار می روند و علاوه بر خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی، قابلیت بسیاری در حفظ بو، رنگ، طعم و عطر، ممانعت از ورود رطوبت و اکسیژن به آن را دارند که زمان ماندگاری محصول را افزایش می دهند.پوشش های خوراکی می توانند به تنهایی یا به صورت مرکب به کار روند. ژلاتین یک پروتئین حاصل از هیدرولیز کلاژن موجوددر استخوان و یا پوست می باشد وکیتوزانپلی ساکاریدی است که از طریق استیل اسیونکیتین به دست می آید و کاربردهای مختلفی در صنایع غذایی، کشاورزی و پزشکی دارد. خصوصیات مکانیکی پوشش ها یا فیلم های ژلاتینی به تنهایی به خاطر خصوصیت جذب رطوبت در طی تماس با سطح مواد غذایی ضعیف می باشد. از این رو با افزودن پلیمرهایی چون کیتوزان و تهیه فیلم مخلوط می توان پوشش های خوراکی با ویژگیهای فیزیکی و مکانیکی مناسب تهیه کرد [۱، ٦-۸]. تاکنون برای افزایش زمان نگهداری محصولات غذایی از ترکیبات نگهدارنده ی شیمیایی استفاده می شد که با توجه به خطرات بهداشتی و سلامتی این ترکیبات، در دو دهه ی اخیر، استفاده از ترکیبات طبیعی همانند اسانس هایگیاهی افزایش یافته است[۷]. با افزودن اسانس ها خواص ضدمیکروبی پوشش های خوراکی افزایش پیدا می کند. اسانس های گیاهی ترکیباتی معطر و آب گریز می باشند که توسط روش های فیزیکی از بخش های مختلف گیاهان استخراج می شوند و خواص ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی آنها امروزه به اثبات رسیده است[۱۰]. گیاه برازمبل[3] با نام بومی گل کبود متعلق بـه خـانواده ی نعنائیـان[4] می باشد که در ایران و برخی کشورهای همسایهدر اقلیم سرد و خشکبه‌صورت خودرو رشد می کند.به دلیل خواص درمانی متفاوت این اسانس مانند کاهش دردهای روماتیسمی، بیماری سالک، اثرات ضددرد، خنک‌کننده و ضدالتهابی، دارای ارزش اقتصادی نیز می باشد. عصاره ی این گیاه دارای ترکیباتی مانند سزکوییترپنها و مونوترپنها می باشد که سبب ایجاد خواص ضدمیکروبی علیه پاتوژنها میشود[۱۱، ۱۲]. برای بهبود ویژگی های ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی و رفع مشکل فراریت و میزان مصرف بالای اسانس ها می توان از نانوامولسیون آنها استفاده کرد[۱۳]. باکتری *آئروموناس هیدروفیلا*[5]به طور گسترده در اکوسیستم آبی وجود دارد و به طور طبیعی بخشی از فلور روده ی آبزیان به حساب می آید که به هنگام تنش بیماری زامی گردد و در صنعت پرورش ماهی از اهمیت زیادی برخوردار است. *آئروموناس هیدروفیلا* یک باکتری همه جایی، فرصت طلب، گرم منفی، میله ای شکل، به طور عمده متحرک، بی هوازی اختیاری، اکسیداز و کاتالاز مثبت و تخمیر کننده گلوکز است و می تواند سبب آلودگی زخمها، عفونت خون و گاستروانتریت در انسان گردد[١٤]. مطالعه ی حاضر با هدف بررسی اثر ضد باکتریایی پوشش خوراکی ژلاتین-کیتوزان حاویانوامولسیون اسانس برازمبل به منظور کنترل رشد باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* تلقیح شده به فیله ماهی قزل آلای رنگین

1. *Oncorhynchusmykiss*
2. ediblecoating
3. *Perovskiaabrotanoides*Kar.
4. lamiaceae
5. *Aeromonas hydrophila*

کمان نگهداری شده در دمای ٤ درجه ی سلسیوس انجام گردید.

۲-مواد و روش ها

۲-۱- مواد مصرفی

گیاه برازمبل از مناطق شمالی استان خراسان رضوی تهیه و توسط پژوهشکده ی علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد تایید گردید. باکتری *آئرومونواس هیدروفیلا* (ATCC7966) از گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد. محیط کشت آبگوشت قلب_مغز آگار[6] از شرکت کیولب[7]، کیتوزان با وزن مولکولی ۱/٦×۱۰^۵ و درجه دی استیلاسیون ۸۵ درصد، توئین ۸۰، متانول، معرف DPPH[8]، ترکیب BHT[9]،معرف تری فنیل تترازولیوم کلرید[10]، ژلاتین پوست ماهیان سردآبی[11] از شرکت سیگما آلدریچ[12]خریداری شد.

۲-۲- استخراج اسانس و تهیه ی نانومولسیون اسانس

استخراج اسانس از گیاه برازمبل به روش تقطیر آبی[13] و با کمک دستگاه کلونجر انجام شد. اسانس تهیه شده در شیشه های غیرقابل نفوذ به نور و در دمای یخچال به منظور استفاده در پوشش خوراکی نگه داری شد. اجزای تشکیل دهنده ی اسانس توسط دستگاه گازکروکاتوگرافی مدل ٦٨٩٠ Agilent متصل به طیف سنج جرمی از نوع Agilent٥٩٧٣(GC-MS) تعیین گردید[۱۵]. نانومولسیون اسانس برازمبل با غلظت ۱۰ درصد (۱۰گرم اسانس برازمبل+۵ گرم توین۸۰+آب مقطر دیونیزه، به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد) تهیه شد و به کمک دستگاه اولتراتوراکس (IKA T18digital) با دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه و دستگاه اولتراسوند (W HF-power۲۰۰، شرکت Bandelin آلمان) با فرکانس ۲۰ کیلو هرتز به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰ درجه ی سلسیوس، تهیه گردید. نانومولسیون تهیه شده در ظرف غیر قابل نفوذ به نور و دمای٤ درجه ی سلسیوس نگهداری گردید[١٦].

۲-۳- تهیه ی باکتری و سوسپانسیون میکروبی

باکتری*آئرومونواس هیدروفیلا* در محیط کشت آبگوشت قلب - مغز آگارکشت داده شد و در جار بی هوازی در دمای ۲۵ درجه ی سلسیوس به مدت ٤٨-٢٤ ساعت انکوبه گردید. برای تهیه ی سوسپانسیون میکروبی از دستگاه اسپکتروفوتومتر استفاده گردید. غلظت معادل نیم مک فارلند (۱/۵ ×۱۰^۸CFU/mL) از باکتری رشد کرده به مدت یک شب تهیه شد و سپس از آن غلظت معادل ۱۰^۵ CFU/mL به منظور تلقیح به فیله ماهی تهیه گردید[۹].

۲-٤- تعیین اندازهذرات(PSA) نانومولسیون برازمبل

اندازه ذرات نانومولسیون با استفاده از دستگاه اندازه گیری اندازه ذرات (DLS) (Dynamic Light Scattering) (NanoS، شرکت Malvern انگلستان)، تعیین شد[۱۷].

۲-۵- تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) نانومولسیون اسانس برازمبل

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی، از روش میکرودایلوشن براث در محیط کشت آبگوشت قلب و مغز و با استفاده از میکروپلیت ۹٦ خانه ای استفاده شد. غلظت های مختلف نانومولسیون اسانس(۰/۰۰۷، ۰/۰۱۵، ۰/۰۳، ۰/۰٦، ۰/۱۲، ۰/۲۵، ۰/۵۰، ۱ درصد) تهیه گردید. به هر یک از چاهک ها، ۱٦۰ میکرولیتر محیط کشت قلب و مغز و ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت معادل ۱۰^۵ CFU/mL و ۲۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف نانومولسیون اسانس اضافه گردید. تعدادی از چاهک ها نیز به عنوان کنترل مثبت و منفی در نظر گرفته شدند. میکروپلیت کشت شده در جار بی هوازی با دمای ۲۵ درجه ی سلسیوس به مدت ٤٨-٢٤ ساعتگرمخانه گذاری گردید. کنترل رشد یا عدم رشد باکتری با استفاده از معرف تری فنیل تترازولیوم کلرید و مشاهده چشمی انجام شد. کمترین غلظتی که در آن هیچ گونه رشد باکتری و یا عدم تغییر

6. Brain Heart Infusion(BHI) agar
7. Q-LAB
8. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH)
9. Butylated hydroxytoluene (BHT)
10. Triphenyltetrazolium(TTC) chloride
11. Gelatin from cold water fish skin
12. SIGMA-Aldrich
13. Hydro distillation

رنگ به رنگ قرمز وجود نداشت، به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) در نظر گرفته شد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی نیز از غلظت های بالاتر حداقل غلظت مهارکنندگی، در پلیت های حاوی محیط کشت آگار قلب و مغز کشت داده شد. کمترین غلظت از نانوامولسیون اسانس که در آن باکتری رشد نداشته (کمتر از پنج پرگنه)، به عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد[۱۸].

۲-۶- ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی اسانس برازمبل

ظرفیت آنتی اکسیدانی با روش احیاء رادیکال آزاد(DPPH) تعیین شد. غلظت های مختلفی از اسانس برازمبل و محلول ۰/۰۰٤درصد از معرف DPPH در متانول تهیه شد. سپس به میزان ۵ میلی لیتر از محلول ذکر شده به غلظت های مختلف اسانس افزوده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه ی سلسیوس و در تاریکی گرمخانه گذاری شد. پس از این مدت جذب نوری نمونه ها در مقایسه با بلانک در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. برای کنترل مثبت نیز از آنتی اکسیدان سنتزی BHT استفاده شد[۱۹]. درصد مهار رادیکال DPPH بر اساس فرمول زیر محاسبه و غلظتی از اسانس که دارای ۵۰ درصد مهار رادیکالی (IC_{50}) باشد تعیین گردید.

DPPH=درصد مهار رادیکال

$$\frac{\text{میزان جذب نوری به جز اسانس}}{\text{میزان جذب نوری به جز اسانس - میزان جذب نوری غلظت های مختلف تهیه شده ی اسانس}} \times ۱۰۰$$

۲-۷- آماده سازی و تلقیح باکتری به فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان

فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان از مرکز عرضه ی معتبر خریداری و در یونولیت های حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل شد. بعد از شستشو با آب مقطر استریل از آن قطعات ۱۰ گرمی تهیه و در الکل ۷۰ درصد استریل گردید. میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری تهیه شده با غلظت $۱۰^{۶}$CFU/mL به قطعات تهیه شده به صورت سطحی تلقیح و با کمک میله ی شیشه ای L شکل استریل پخش گردید و جهت تثبیت باکتری به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد[۲۰].

۲-۸- تهیه ی پوشش مخلوط ژلاتین-کیتوزان

به منظور تهیه پوشش، محلول کیتوزان ۲ درصد(وزنی/حجمی) در اسید استیک ۱ درصد و محلول ۳ درصد (وزنی/حجمی) ژلاتین در آب مقطر استریل به همراه گلیسرول و نانوامولسیون اسانس برازمبل و توئین ۸۰ تهیه شدند، سپس با بن ماری به دمای ۵۰±۲ رسیده و با دستگاه اولتراتوراکس(IKA T18digital) در دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه هم زده شدند[۲۱].

۲-۹- تهیه ی تیمارهای مختلف

به منظور ایجاد پوشش روی فیله ماهی، قطعات به مدت ۲ دقیقه در تیمارهای مختلف مطابق جدول شماره ی ۱ غوطه ور شدند. سپس قطعات را از محلول خارج کرده و پس از خشک شدن، به مدت ۳ دقیقه در محلول آبی ۳ درصد (وزنی/حجمی) کلسیم کلرید و سپس در محلول ژلاتین به صورت دولایه پوشش داده شدند. در محیط آزمایشگاه، قطعات در کیسه های پلی اتیلنی استریل بسته بندی و به مدت ۱۲روز در دمای ٤ درجه ی سلسیوس نگهداری شدند. آزمون های مختلف میکروبی و شیمیایی در فواصل زمانی معین(روز ۰، ۳، ٦، ۹ و ۱۲) در ۳ تکرار بر روی قطعات نگهداری شده انجام گرفتند.

Table 1 The treatments studied

NO	Traetments	Description
1	Control (Con)	Uncoated fish pieces
2	CH	Fish fillets + 2% chitosan solution
3	G	Fish fillets + 3% gelatin solution
4	CH+1 % PANEO	Fish fillets + 2% chitosan solution+ 1% PA[1]nanoemulsion of EO(NEO[2])
5	G+ 1%PANEO	Fish fillets + 3% gelatin solution+ 1% PA nanoemulsionof EO (NEO)
6	CH+G+1%PANEO	Fish fillets + 2% chitosan + 3% gelatin + 1% PA nanoemulsionof EO (NEO)

[1]PA (*Perovskiaabrotanoides*), [2]NEO (nanoemulsion of essential oil)

۲-۱۰- شمارش باکتریایی

به منظور بررسی وضعیت رشد باکتری آئروموناس هیدروفیلا تلقیح شده، در روز های ۰، ۳، ٦، ۹ و ۱۲، هر یک از قطعات ۱۰ گرمی مربوط به هر تیمار با ۹۰ میلی لیتر آب پپتونه۰/۱ درصد استریل مخلوط شدند و به مدت ۵ دقیقه با استفاده از دستگاه بگ میکسر کاملا یکنواخت شدند. سپس از سوسپانسیون بدست آمده رقت های متوالی تهیه شد و در محیط کشت اختصاصی *آئروموناس هیدروفیلا* کشت داده شد و به مدت ٤٨-٢٤ ساعت در دمای ۲۵ درجه ی سلسیوس گرمخانه گذاری گردید.

۲-۱۱- آزمون های شیمیایی

۲-۱۱-۱- اندازه گیری pH

۱۰گرم از نمونه ماهی با ۹۰ میلیلیتر آب مقطر مخلوط و هموژن گردید و سپس با کمک دستگاه pH متر(Metrohm, Switzerland)، pH نمونه ها در ۳ تکرار اندازه گیری شد[۲۲].

۲-۱۱-۲- اندازه گیری بازهای ازته ی فرار

اندازه گیری بازهای ازته فرار با استفاده از سیستم تقطیر کلدال انجام گرفت و به صورت میلی گرم نیتروژن در۱۰۰گرم نمونه ماهی بیان شد[۲۳].

بازهای ازته ی فرار(میلی گرم درصد) = ۱۰۰×١٤×غلظت اسید × میزان اسید/۱۰

۲-۱۱-۳- اندازه گیری شاخص پراکسید

برای جداسازی چربی نمونه های ماهی از n-هگزان به عنوان حلال استفاده شد سپس مقدار ید آزاد شده با تیتراسیون و با استفاده از فرمول زیر میزان پراکسید برحسب میلی اکی والان پراکسید در۱۰۰۰گرم چربی، محاسبه گردید[۲۲].

= اندیس پراکسید

(g)وزن چربی /۱۰۰۰× نرمالیته تیوسولفات × میلی لیتر تیوسولفات جهت تیتراسیون

۲-۱۲- ارزیابی حسی نمونه ها

فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان از مراکز عرضه ی معتبر تهیه و پس از استریل کردن به قطعات ۱۰ گرمی تقسیم شدند. تیمارها طبق جدول شماره ی ۱ تهیه شدند و درون کیسه های پلی اتیلنی استریل قرار داده شدند. تیمارهای شاهد و پوشش داده شده به مدت ۱۲ روز با فاصله زمانی ۳ روز، به صورت خام و در شرایط مناسب مورد ارزیابی قرار گرفتند.ارزیابی حسی نمونه ها توسط ۸ ارزیاب آموزش دیده از لحاظ شاخص های رنگ، بو، بافت و پذیرش کلی با استفاده از مقیاس امتیاز دهی ۹ نقطه ای هدونیک انجام گرفت. امتیاز ۱ معادل فوق العاده ناخوشایند و ۹ معادل فوق العاده خوشایند بود. حد قابل پذیرش امتیاز ۵، معادل نه خوشایند و نه ناخوشایند(بی تفاوت) تعیین شد. نمونه های با امتیاز کمتر از ٤، غیر قابل مصرف تلقی شدند[٢٤].

۲-۱۳- آنالیز آماری

کلیه آزمایش ها در ۳ تکرار انجام گردید. تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS16 انجام شد. تحلیل داده ها و مقایسه ی میانگین داده ها در تیمار های مختلف براساس آزمون تحلیل واریانس با اندازه گیری های مکرر (Repeated measure ANOVA) انجام شد. در تمامی ارزیابی ها($P<$۰/۰۵) به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱-ترکیب شیمیایی اسانس برازمبل

اسانس برازمبل پس از استخراج با استفاده از دستگاه گازکروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی، مورد آنالیز قرار گرفت. بر طبق این بررسی، ۲۱ ترکیب شیمیایی در این اسانس مورد شناسایی قرار گرفت (جدول۲). در بین ترکیبات شناسایی شده، اوکالیپتول (Eucalyptol) با ٢٤/٥١ درصد، کامفور(Camphor) با ۲۲/۰۲ درصد، آلفا پینن(α-Pinene) با ۱۷/۳۵ و ۳-کارن(3-Carene) با ۱۱/۰۵ درصد به عنوان بیشترین ترکیبات مؤثره ی این گیاه شناخته شدند.در مطالعه ای توسط صفائی قمی و بتولی (۲۰۱۰)، ترکیبات شیمیایی اسانس برازمبل جداسازی شد که آلفا-کادینول، ۱و۸- سینئول و کامفور از اجزای عمده و اصلی آن بودند[۲۵]. در مطالعه انجام شده توسط مرتضی-سمنانی (۲۰۰٤)، ترکیبات شیمیایی اسانس برازمبل توسط طیف سنج جرمی بررسی شد که طبق نتایج ۲۱ نوع جزء از این اسانس جداسازی شد و کامفور با ٣٤/١ درصد، ۸,۱-سینئول با ۱۸ درصد، b-کاریوفیلن با ۸/۲ درصد

و a-هومولن با ٦/٥ درصد، مهم ترین ترکیبات تشکیل دهنده آن بودند که میزان کامفور به عنوان جزء مهم در این اسانس با نتایج حاصل از مطالعه ی حاضر مطابقت داشت[٢٦]. تفاوت در نوع و میزان این ترکیبات به عواملی مثل ژنتیک، محل رویش، بخش های مختلف گیاه و نحوه ی اسانس گیری وابسته اند، که می تواند به عنوان دلایل اختلاف نتایج مطالعه ی حاضر با سایر پژوهش ها می باشد[١٢].

Table 2 Chemical composition of *Perovskiaabrotanoides*Kar.essential oil

No	Phytochemicals	Percent	RT
1	α-Pinene	17.35	10.37
2	Camphene	5.88	11.17
3	β-Pinene	0.50	12.61
4	β-Myrcene	0.83	13.32
5	3-Carene	11.05	14.27
6	o-Cymene	1.45	15.24
7	Limonene	2.09	15.44
8	Eucalyptol	24.51	15.64
9	γ-Terpinene	0.26	17.11
10	Terpinolene	0.18	18.62
11	Linalool	0.27	19.59
12	Camphor	22.02	22.28
13	endo-Borneol	0.77	23.65
14	α-Terpineol	1.08	25.02
15	Bornyl acetate	2.81	29.91
16	3-Methyl-4-isopropylphenol	0.89	30.86
17	Thymol	1.17	33.27
18	β-Guaiene	0.15	34.59
19	Caryophyllene	3.24	36.83
20	Humulene	2.46	38.64
21	tau.-Cadinol	0.94	46.24
22	Total	99.90	

٣-٢- حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) و حداقل غلظت کشندگی(MBC)

برای تعیین میزان حداقل غلظت مهارکنندگی، از روش میکرو دایلوشن براث استفاده شد که نتایج آن در جدول٣ بیان شده است.طبق نتایج بدست آمده، باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* نسبت به نانوامولسیون اسانس برازمبل حساسیت بالایی داشت و اسانس برازمبل در جلوگیری از آلودگی این میکروارگانیسم موثر بوده است که این نتایج با مطالعه صفائی قمی و بتولی (٢٠١٠) مطابقت دارد[٢٥].

Table 3 MIC and MBC of Nanoemulsion of *Perovskiaabrotanoides*essential oil against*Aeromonas hydrophila*

MBC(%)	MIC(%)	Essential oil nanoemulsion	Microorganism
0.125	0.0625	Nanoemulsion of *Perovskiaabrotanoides* Kar.essential oil	*Aeromonas hydrophila*(ATCC 7966)

٣-٣- اندازه ذرات نانوامولسیون اسانس برازمبل

اندازه ذرات نانوامولسیون اسانس برازمبل با ٥ تکرار اندازه گیری شد که در جدول ٤ گزارش شده است. هاتاناکا[14]و همکاران (٢٠١٠) و همچنین سورینو[15]و همکاران (٢٠١٥)، در مطالعاتشان محدوده کمتر از ٥٠٠ نانومتر را در ابعاد نانو درنظرگرفتند که با نتایج مطالعه ی حاضر مطابقت داشت[٢٧، ٢٨].

14. Hatanaka

15. Severino

Table 4 Particle size (PSA) of *Perovskiaabrotanoides* EO nanoemulsion

PDI	Z-average(nm)	Formulation
0.26±0.03	162.32±11.43	Nanoemulsion of *Perovskiaabrotanoides* Kar.essential oil

۳-٤- تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی به روش احیاء رادیکال آزاد

مهار رادیکال آزاد DPPH توسط اسانس برازمبل در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. بر طبق یافته ها، با افزایش غلظت اسانس، قدرت مهار رادیکال آزاد نیز افزایش می یابد. غلظتی از اسانس که سبب مهار ۵۰ درصد رادیکال شد در مقایسه با آنتی اکسیدان سنتزی BHT، برابر ٤٦/٤٤ میلی گرم بر میلی لیتربود.بر اساس نتایج بدست آمده، اسانس برازمبل از خواص آنتی اکسیدانی خوبی برخوردار می باشد که با نتایج مطالعه های انجام شده توسط غفوریان و مازندرانی(۲۰۱۷) و اشرف و همکاران(۲۰۱٤) مطابقت دارد [۲۹، ۳۰].

۳-۵- آزمون شمارش میکروبی

میانگین لگاریتم تعداد باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در قطعات فیله‌ی ماهی طی۱۲ روز نگهداری در دمای یخچال هرسه روز تعیین و نتایج بدست آمده در شکل ۱ نشان داده شده است.طبق نتایج بدست آمده، در تیمار های مختلف، روند رشد باکتری به صورت افزایشی بوده ولی تیمار کیتوزان-ژلاتین به همراه نانومولسیون اسانس، به خوبی روند رشد باکتری را کنترل کرده است. تیمار کیتوزان حاوی نانومولسیون اسانس برازمبل نسبت به پوشش کیتوزان به تنهایی توانایی بیشتری در کنترل رشد باکتری داشته است. یافته های فوق با نتایج مطالعه‌ی اجاقو همکاران(۲۰۱۰) و یگان محمدی و همکاران (۲۰۱٦) مطابقت دارد [۵، ۳۱]. پوشش ژلاتین به همراه نانومولسیون اسانس در مقایسه با پوشش ژلاتین به تنهایی در کنترل رشد باکتری موثر تر بود که با نتایج مطالعه ی فضل آرا و همکاران (۲۰۱۷) مطابقت دارد[۳۲]. بررسی مقایسه ای پوشش های کیتوزان و ژلاتین نیز به علت خاصیت ضد میکروبی کیتوزان، بطور موثرتری توانسته است روند رشد باکتری را کنترل کند که با نتایج بدست آمده در مطالعه‌ی فن و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت دارد[٤]. تیمار حاوی ژلاتین به تنهایی تأثیری بر کنترل رشد باکتری نداشته است که با مطالعه‌ی فضل آرا و همکاران(۲۰۱۷) و رضایی و تقی زاده اندواری(۲۰۱۱) مطابقت دارد[۳۲، ۳۳]. بیگ محمدی و همکاران (۲۰۲۱)، اثر فیلم خوراکی بر پایه کیتوزان-ژلاتین حاوی اسانس چویر(*Ferulago angulate*)را بر ویژگی های گوشت بوقلمون در دمای ٤ درجه ی سلسیوس بررسی کردند. مطابق نتایج بدست آمده، افزودن اسانس چویر به فیلم کیتوزان – ژلاتین سبب افزایش ماندگاری گوشت بوقلمون در یخچال می شود[۳٤]. ساکی و همکاران (۲۰۱۷) نیز تأثیر پوشش و فیلم مخلوط خوراکی کیتوزان-ژلاتین را بر ویژگیهای ماهی نگهداری شده در دمای یخچال بررسی کردند. نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر نشان داد که پوشش ژلاتین-کیتوزان حاوی ۱ درصد نانومولسیون اسانس برازمبل دارای اثر خوبی در کنترل رشد باکتری آئروموناس هیدروفیلا تلقیح شده به گوشت ماهی قزل آلای رنگین کمان داشت که نشان دهنده اثر خوب ضد میکروبی اسانس و خصوصیات مناسب پوشش مخلوط ژلاتین-کیتوزان می باشد [۳۵].

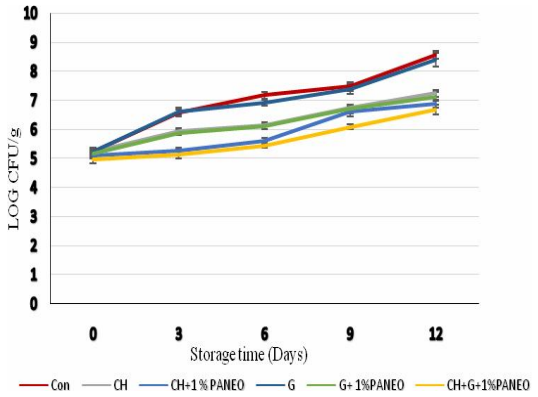

Fig 1 Changes of *Aeromonas hydrophila* in different treatments

مقایسه دوتایی میانگین کاهش لگاریتم تعداد باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* تلقیح شده به فیله ماهی طی دوره ی نگهداری در یخچال در جدول ۵ آمده است.بر اساس نتایج بدست آمده هیچگونه اختلاف معنی داری بین میانگین لگاریتم کاهش رشد باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در تیمارهای کنترل و واجد پوشش ژلاتین به تنهایی و تیمارهای کیتوزان به تنهایی و ژلاتین واجد ۱ درصد نانومولسیون اسانس برازمبل مشاهده نگردید ($P> 0.05$) (جدول ۵).

Table 5 Double comparison of logarithm reduction of *Aeromonas hydrophila* in the studied treatments

Treatment I	Mean difference I-J				
	Treatment J				
	CH	CH+ 1% PANEO	G	G+ 1% PANEO	CH+G+ 1% PANEO
Control	0.76*	1.11*	0.10	0.80*	1.33*
CH		0.35*	-0.65*	0.04	0.57*
CH+1 %PANEO			-1.01*	-0.31*	0.22*
G				0.69*	1.23*
G+ 1% PANEO					0.53*

*The difference is significant (P<0.05)

۳-٦- آزمون های شیمیایی

۳-٦-۱- اندازه گیری pH

در شکل ۲ میانگین تغییرات pH تیمارهای مختلف در طول دوره ی نگهداری بیان شده است.

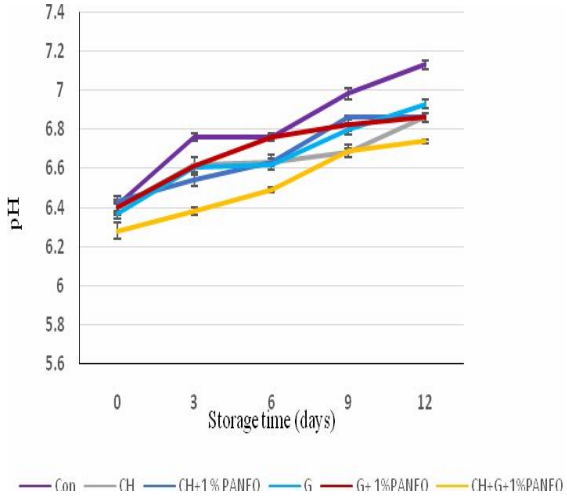

Fig 2 pH changes in different treatments

فن و همکاران (۲۰۰۹)، در مطالعه ای تاثیر پوشش کیتوزان بر ماندگاری ماهی کپور نقره ای نگهداری شده در دمای فریزر را بررسی کردند و گزارش کردندکه در طول دوره نگهداری میزان بازهای ازته ی فرار به تدریج افزایش و pH در نمونه ها ابتدا کاهش و سپس افزایش یافت که این نتایج با یافته های مطالعه ی حاضر مطابقت دارد[٤]. در مطالعه ای گومز-استاکا و همکاران(۲۰۱۰)، اثر پوشش خوراکی حاوی اسانس میخک را بر تعدادی از باکتریها ارزیابی کردند و نشان دادند که pH ابتدا افزایش و سپس ثابت ماند. در این مطالعه میزان بازهای ازته ی فرار به طور کلی تا پایان دوره دارای روند افزایشی بود. این نتایج با یافته های مطالعه ی حاضر مطابقت دارد[۳٦].

۳-٦-۲- اندازه گیری اندیس پراکسید

میانگین تغییرات اندیس پراکسید در تیمار های مختلف در شکل ۳ گزارش شده است.

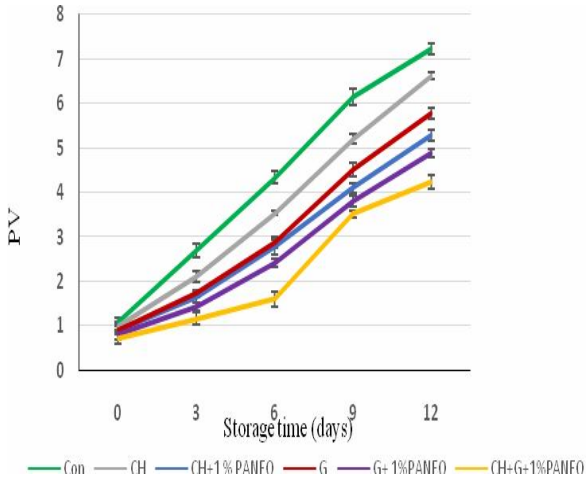

Fig 3 PV changes in different treatments

در پژوهشی ساکی و همکاران (۲۰۱۷) تأثیر پوشش و فیلم خوراکی کیتوزان-ژلاتین را بر ویژگیهای نوعی ماهی نگهداری شده در یخچال بررسی کردند. بر طبق یافته ها، آزمونهای شاخص اکسیداسیون چربی (اسید چرب آزاد) حاکی از کمتر بودن میزان اکسیداسیون در نمونه های دارای فیلم و پوشش کیتوزان ژلاتین نسبت به نمونهٔ شاهد (فیلهٔ فاقد پوشش و فیلم) بودکه این نتیجه با یافته های مطالعه ی حاضر مطابقت دارد[۳۵].

۳-٦-۳- اندازه گیری بازهای ازته ی فرار

میانگین تغییرات بازهای ازته ی فرار در تیمار های مختلف در شکل ٤ گزارش شده است.

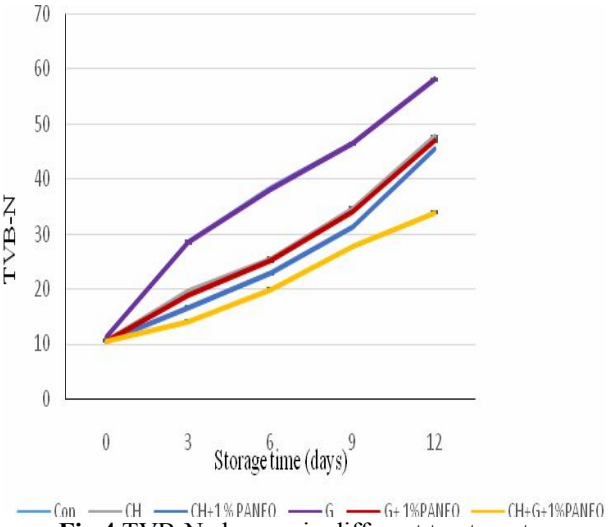

Fig 4 TVB-N changes in different treatment

فرج زاده و همکاران (۲۰۱۶)، در پژوهشی تاثیر پوشش کیتوزان-ژلاتین را بر کیفیت نوعی میگو در شرایط یخچالی بررسی کردند. طبق یافته ها، تشکیل ازت کل فراردر ۵۷ درصد میگو های با این پوشش، کمتر بود. همچنین این پوشش سبب کاهش میزان اکسیداسیون و اندیس پراکسید در طول دوره ی نگهداری گردید[۳۷]. فضل آرا و همکاران(۲۰۱۷) تاثیر پوشش ژلاتین حاوی آویشن شیرازی بر خصوصیات شیمیایی فیله ی شتر مرغ در دمای ٤ درجه ی سلسیوس را طیک دوره ی ۱۵ روزه بررسی کردند. بر طبق یافته ها، از نظر فاکتورهای شیمیایی، تیمار ژلاتین-آویشن شیرازی نسبت به سه گروه دیگر میزان ازت کل فرار وpH کمتری را در مدت زمان نگهداری نشان داد که این نتایج با یافته های مطالعه ی حاضر مطابقت دارد[۳۲].

۳-۷- ارزیابی حسی

نتایج ارزیابی حسی قطعات فیله ماهی پخته شده در طول دوره ی نگهداری در یخچال در جدول ٦گزارش شده است. همانطور که مشاهده میشود، ویژگیهای بافت، بو، رنگ و پذیرش کلی تمامی تیمارها با گذشت زمان کاهش می یابد. پوشش کیتوزان-ژلاتین واجد نانوامولسیون اسانس برازمبل سبب حفظ بیشتر ویژگی های کیفی ماهی گردیده است. در تیمارهای بدون اسانس، پوشش ژلاتین به علت خواص مکانیکی خود سبب حفظ استحکام بافت نمونه ها گردید. در نمونه های حاوی اسانس به دلیل خاصیت ضدمیکروبی اسانس نسبت به نمونه های بدون اسانس، ویژگی نمونه ها به میزان بیشتری حفظ گردید. ساکی و همکاران (۲۰۱۷) تأثیر پوشش و فیلم مخلوط خوراکی کیتوزان-ژلاتین را بر ویژگیهای فیله ی ماهی شوریده ی بلانگ نگهداری شده در دمای یخچال به مدت ۱٦ روز بررسی کردند. بر اساس گزارش آنها فیلمها و پوششهای به کار رفته سبب افزایش ٤ روز ماندگاری فیله های نگهداریشده در یخچال و افزایش عمر ماندگاری و حفظ خواص حسی محصولات غذایی گردید که با یافته های مطالعه ی حاضر مطابقت دارد[۳۵]. در مطالعه‌ی انجام شده توسط فن و همکاران (۲۰۰۹)، تاثیر پوشش کیتوزان بر کیفیت و ماندگاری ماهی کپور نقره ای در شرایط نگهداری در دمای فریزر به مدت ۳۰ روز بررسی شد و مشخص شد که این پوشش ها سبب افزایش عمر نگهداری نمونه ها شده است که با یافته های مطالعه ی حاضر مطابقت دارد[٤]. گومز-استاکا و همکاران (۲۰۱۰)، اثر پوشش خوراکی حاوی اسانس میخک را بر خواص حسی نوعی ماهی بررسی کردندو نشان دادند که خواص حسی نمونه ها حفظ شده است که با یافته های مطالعه ی حاضر مطابقت دارد[۳٦]. همچنین فرج زاده و همکاران (۲۰۱٦)، تاثیر پوشش کیتوزان-ژلاتین را بر ویژگی های حسی نوعی میگو در شرایط یخچالی بررسی کردند و نشان دادند که عمر نگهداری و حفظ خواص حسی نمونه ها به مدت ٦ روز افزایش یافت[۳۷]. فضل آرا و همکاران(۲۰۱۷)،نیز تاثیر پوشش ژلاتین حاوی آویشن شیرازی را بر ویژگی های حسی فیله ی شتر مرغ در دمای یخچال بررسی کردند و نشان دادند که تیمارهای حاوی اسانس سبب افزایش مدت زمان ماندگاری فیله شتر مرغ شدند که با یافته های مطالعه ی حاضر مطابقت دارد[۳۲].

Table 6 Sensory evaluation values of fish fillets stored at 4 ° C

Storage time (day)					Treatment	Sensory attributes
12	9	6	3	0		
2.46±0.33 Ed	3.85±0.22 Db	5.51±0.25 Cc	6.44±0.51 Bc	7.36±0.29 Ab	Control	**Color**
3.51±0.31 Dc	5.39±0.17 Ca	6.53±0.23 Ba	7.21±0.26 Aab	7.66±0.35 Ab	CH	
2.82±0.30 Ed	4.11±0.21 Db	5.90±0.25 Cbc	6.64±0.30 Bbc	7.73±0.25 Ab	G	
4.06±0.16 Eab	5.57±0.23 Da	6.27±0.25 Cab	7.15±0.29 Bab	8.51±0.35 Aa	CH+1 % PANEOG+ 1%PANEO	
3.91±0.11 Ebc	5.44±0.25 Da	6.26±0.26 Cab	7.22±0.35 Bab	8.42±0.37 Aa		
4.48±0.28 Ea	5.79±0.20 Da	6.48±0.36 Ca	7.67±0.38 Ba	8.53±0.41 Aa	CH+G+1%PANEO	
2.87±0.32 Dc	4.10±0.22 Cd	5.80±0.30 Bc	7.08±0.18 Ad	7.50±0.50 Ab	Control	**Texture**
3.32±0.32 Ebc	5.20±0.20 Db	6.41±0.29 Cab	7.27±0.25 Bd	8.59±0.52 Aa	CH	
3.10±0.11 Ebc	4.73±0.25 Dc	5.77±0.30 Cc	8.02±0.16 Bbc	8.81±0.27 Aa	G	
3.53±0.22 Eb	5.29±0.28 Db	6.53±0.23 Cab	7.79±0.26 Bc	8.82±0.28 Aa	CH+1 % PANEOG+ 1%PANEO	
3.37±0.24 Eb	5.31±0.19 Db	6.15±0.16 Cbc	8.28±0.33 Bab	8.84±0.17 Aa		
4.13±0.26 Da	5.78±0.22 Ca	6.83±0.19 Ba	8.66±0.17 Aa	8.88±0.14 Aa	CH+G+1%PANEO	
2.43±0.30 Dd	4.50±0.33 Ce	6.10±0.30 Bd	7.22±0.27 Acd	7.68±0.28 Ab	Control	**Odor**
3.38±0.37 Ec	5.27±0.25 Dcd	6.96±0.15 Cbc	7.53±0.32 Bd	8.51±0.23 Aa	CH	
2.80±0.20 Ed	5.00±0.11 Dd	6.66±0.20 Cc	7.17±0.18 Bbcd	8.37±0.37 Aa	G	
4.09±0.21 Eab	5.96±0.16 Dab	7.13±0.18 Cab	7.76±0.25 Bab	8.58±0.37 Aa	CH+1 % PANEOG+ 1%PANEO	
3.76±0.25 Ebc	5.71±0.25 Dbc	6.98±0.22 Cbc	7.70±0.24 Bbc	8.73±0.24 Aa		
4.43±0.19 Ea	6.40±0.36 Da	7.45±0.34 Ca	8.20±0.26 Ba	8.79±0.26 Aa	CH+G+1%PANEO	
2.83±0.32 Dc	3.61±0.45 Cc	5.20±0.26 Bc	6.76±0.25 Ac	7.26±0.36 Aa	Control	**Overall**
3.51±0.27 Eb	4.05±0.27 Dbc	6.71±0.20 Cb	7.77±0.25 Bb	8.31±0.20 Aa	CH	
3.50±0.18 Db	3.86±0.31 Dbc	6.51±0.18 Cb	7.68±0.30 Bb	8.27±0.17 Aa	G	
3.76±0.25 Eab	4.28±0.15 Dab	6.81±0.26 Cab	7.74±0.25 Bb	8.66±0.28 Aa	CH+1 % PANEOG+ 1%PANEO	
3.78±0.13 Dab	4.16±0.17 Dbc	6.52±0.26 Cb	7.72±0.24 Bb	8.60±0.32 Aa		
4.19±0.22 Da	4.76±0.25 Ca	7.23±0.25 Ba	8.71±0.28 Aa	8.75±0.25 Aa	CH+G+1%PANEO	

Means within the same row (A, B, C, D) and the same column (a, b, c, d, e, f) with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

٤- نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از پوششکیتوزان-ژلاتین حاوی نانوامولسیون اسانس برازمبل سبب کاهش تعداد باکتری*آئرومونا*س *هیدروفیلا* در فیله ی ماهی قزل آلای رنگین کمان نگهداری شده در یخچال گردید. این نتیجه در پوشش دولایه به همراه نانوامولسیون اسانس برازمبل نسبت به هر ترکیب به تنهایی، مؤثر تر عمل نمود و مشخص شد اینپوشش خوراکی می تواند به عنوان بسته بندی فعال در صنعت غذا مورد استفاده قرار گیرد.

٥- منابع

[1] Ehsani A, Jasour MS, Hashemi M, Mehryar L, Khodayari M. Zataria multiflora Boiss essential oil and sodium acetate: how they affect shelf life of vacuum‐packaged trout burgers. International journal of food science & technology. 2014 Apr; 49(4):1055-62.

[2] El-Shamery GE. Studies on contamination and quality of fresh fish meats during storage. Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, G. Microbiology. 2010 Oct 1;2(2):65-74.

[3] Tabatabaei Moradi L, Sharifan A, Larijani K. Antimicrobial activity of lemon and peppermint essential oil in edible coating containing chitosan and pectin on rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fillets. Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases. 2015 *Jan 10; 3(1):38-43.*

[4] Fan W, Sun J, Chen Y, Qiu J, Zhang Y, Chi Y. Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage.

Gram-negative Bacteria of *Escherichia coli*: A Laboratory Study. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences. 2019 Aug 10; 18(6):515-28.*

[14] Yogananth, N., Bhakyaraj, R., Chanthuru, A., Anbalagan, T., &Nila, K. M. (2009). Detection of virulence gene in *Aeromonas hydrophila* isolated from fish samples using PCR technique. *Global J Biotech Biochem, 4, 51-53.*

[15] Kayode RM, Afolayan AJ. Cytotoxicity and effect of extraction methods on the chemical composition of essential oils of *Moringa oleifera* seeds. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B. 2015 Aug;16(8):680-9.*

[16] Nouri M, Ghorbani MR, Tatar A, Mehrnia MA. Effect of clove essential oil nanoemulsion on performance of broiler chickens fed diet based on wheat. *Animal Production. 2018 Jul 23;20(2):315-27.*

[17] Shin JH, Chang S, Kang DH. Application of antimicrobial ice for reduction of foodborne pathogens (*Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes*) on the surface of fish. *Journal of applied microbiology. 2004 Nov;97(5):916-22.*

[18] Zhang Y, Liu X, Wang Y, Jiang P, Quek S. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control. 2016 Jan 1;59:282-9.*

[19] Hussain AI, Anwar F, Sherazi ST, Przybylski R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimumbasilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food chemistry. 2008 Jun 1;108(3):986-95.*

[20] Rabiey S, Hosseini H, Rezaei M. The H urdle Effect of *B uiumpersicum* Essential Oil, Smoke and NaCl for Controlling the *L isteria monocytogenes* Growth in Fish Model Systems. *Journal of Food Safety. 2013 May;33(2):137-44.*

[21] Poverenov E, Rutenberg R, Danino S, Horev B, Rodov V. Gelatin-chitosan composite films and edible coatings to enhance the quality of food products: Layer-by-layer vs. Blended formulations. *Food and bioprocess technology. 2014 Nov;7(11):3319-Food chemistry. 2009 Jul 1;115(1):66-70.*

[5] Ojagh SM, Rezaei M, Razavi SH, Hosseini SM. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food chemistry. 2010 May 1; 120(1):193-8.*

[6] Baldwin EA, Hagenmaier R, Bai J, editors. Edible coatings and films to improve food quality. *CRC press; 2011 Aug 24.*

[7] Raghav, P. K., Agarwal, N., & Saini, M. (2012). *Edible coating of fruits and vegetables: A review. Education, 2014.*

[8] Mortazavian, S.A.M., Azizi, M.H., Sohrab Wandi, S., 2010, Review of the use of food wrappers in foodstuffs, *Journal of Food Science and Technology, TarbiatModares University, 111-1-131*

[9] MerrikhiArdebili E, Mohsenzadeh M. Evaluation of methyl cellulose edible coating incorporated with *Carum copticum L.* essential oil and Turmeric (*Curcuma longa L.*) extract on growth control of *Listeria monocytogenes* inoculated to chicken meat portions storaged at 4˚ C. *Food Science and Technology. 2018 Dec 10;15(83):315-28.*

[10] São Pedro A, Santo I, Silva C, Detoni C, Albuquerque E. The use of nanotechnology as an approach for essential oil-based formulations with antimicrobial activity. *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them (Méndez-Vilas, A., Ed.) Formatex Research Center Pulisher. 2013; 2:1364-74.*

[11] Shahraki, Saeedeh and Mahdavi, SeyedehKhadijeh and Hosseini (Habib), Seyed Ali and Mazandarani, Masoumeh, 2013, Phytochemical study of *Proveskiaabrotanoides*karel Case study of Golestan National Park, *the first regional conference on medicinal plants in the north of the country, Gorgan*.[in Persian]

[12] Pourhosseini SH, Mirjalili MH, Nejad Ebrahimi S, Sonboli A. Essential oil quantity and quality of different plant organs from *Perovskiaabrotanoides* Karel in natural habitat of North Khorasan province. *Journal of Plant Productions (Agronomy, Breeding and Horticulture). 2018 Feb 20; 40(4):53-62.*

[13] Heydari M, Bagheri M. The Antimicrobial Effects of Hydro-Extract of *Mentha Piperita Lamiaceae* Essential Oil Nanoemulsion on

RB, Rasool N, Zia-Ul-Haq M, Ercisli S. Compositional studies and Biological activities of *Perovskiaabrotanoides* Kar. oils. *Biological research. 2014 Dec;47(1):1-9.*

[31] Khanjari A, Akhondzadeh Basti A, Bokaie S, Cheraghi N, Fayazfar S, Ghadami F. Evaluation of the antimicrobial effect of chitosan and whey proteins isolate films containing free and nanoliposomal garlic essential oils against *Listeria monocytegenes*, *E. coli* O157: H7 and *Staphylococcus aureus*. *Iranian Journal of Medical Microbiology. 2016 Dec 10;10(5):45-51.*

[32] Fazlara A, POURMAHDI BM, Molaei F. The effect of gelatin-Avishan Shirazi (*Zataria multiflora Bioss*) coating on microbial, chemical and sensorial characteristics of ostrich fillets in refrigerated condition.

[33] Andevari GT, Rezaei M. Effect of gelatin coating incorporated with cinnamon oil on the quality of fresh rainbow trout in cold storage. *International Journal of Food Science & Technology. 2011 Nov;46(11):2305-11.*

[34] Beigmohammadi F, Naseri HR, Mohammadi R, Sadeghi E. Production of edible film based on chitosan-gelatin, containing *Ferulago angulate* essential oil and evaluation of optical, sensory features and shelf life of packaged Turkey meat in it. *Journal of Food Research. 2021 Jan 20;30(4):169-79.*

[35] Saki J, Khodanazary A, Hosseini SM. The Effect of Chitosan-Gelatin Composition and Bi-Layer Coating and Film on Physicochemical, Microbial and Sensory Properties of JohniusBelangerii Stored at Refrigerator. *Research and Innovation in Food Science and Technology. 2017 May 22;6(1):71-86.*

[36] Gómez-Estaca J, De Lacey AL, López-Caballero ME, Gómez-Guillén MC, Montero P. Biodegradable gelatin–chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food microbiology. 2010 Oct 1;27(7):889-96.*

[37] Farajzadeh F, Motamedzadegan A, Shahidi SA, Hamzeh S. The effect of chitosan-gelatin coating on the quality of shrimp (*Litopenaeusvannamei*) under refrigerated condition. *Food Control. 2016 Sep 1; 67:163-70.*

27.

[22] Suvanich V, Jahncke ML, Marshall DL. Changes in selected chemical quality characteristics of channel catfish frame mince during chill and frozen storage. *Journal of food science. 2000 Jan;65(1):24-9.*

[23] Khedri N, Roomiani L. Effects of *zataria multiflora* essential oil nanoemulsion on chemical, microbial and sensory properties of silver carp fillets. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology. 2019 Sep 10;14(3):63-74.*

[24] LashgariCharmi M, Mohsenzadeh M, Azizzadeh M, Maleki M. Antimicrobial effect of *Lavandula angustifolia* essential oil and NaCl on growth control of *Escherichia coli* O157: H7 inoculated into minced beef during storage. Food Science and Technology. 2020 May 10;17(101):145-53.

[25] Safaeighomi JA, Batooli H. Determination of bioactive molecules from flowers, leaves, stems and roots of *Perovskiaabrotanoides* Karel growing in central Iran by nano scale injection. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures. 2010 Jun 1;5:551-6.*

[26] Morteza-Semnani K. The essential oil composition of *Perovskiaabrotanoides* from Iran. Pharmaceutical biology. 2004 Jan 1;42(3):214-6.

[27] Hatanaka J, Chikamori H, Sato H, Uchida S, Debari K, Onoue S, Yamada S. Physicochemical and pharmacological characterization of α-tocopherol-loaded nano-emulsion system. *International Journal of Pharmaceutics. 2010 Aug 30;396(1-2):188-93.*

[28] Severino R, Ferrari G, Vu KD, Donsì F, Salmieri S, Lacroix M. Antimicrobial effects of modified chitosan based coating containing nanoemulsion of essential oils, modified atmosphere packaging and gamma irradiation against *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella Typhimurium* on green beans. *Food control. 2015 Apr 1;50:215-22.*

[29] Ghafourian M, Mazandarani M. Ethnopharmacology, ecological requirements, antioxidant and antimicrobial activities of *Perovskiaabrotanoides* Karel. extract for vaginal infections from semnan province. *International journal of womenls health and reproduction sciences. 2017;5(4):295-300.*

[30] Ashraf SN, Zubair M, Rizwan K, Tareen

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Evaluation of antibacterial and antioxidant effect of gelatin-chitosan bilayer edible coating containing nanoemulsion of *Perovskiaabrotanoides* Kar. essential oil on growth control of *Aeromonas hydrophila* inoculated into rainbow trout fillet

Ahmadi, K. [1], Mohsenzadeh, M. [2*]

1. MSc. student, Department of Food Hygiene and Aquaculture, Factultyof Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), Mashhad, Iran.
2. Professor, Department of Food Hygiene and Aquaculture, Factulty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), Mashhad, Iran.

ABSTRACT

In this study, the effect of bilayer edible coating of gelatin-chitosan containing nanoemulsion of *Perovskiaabrotanoides*Kar. essential oil on growth control of *Aeromonas hydrophila* inoculated into rainbow trout fillets over a 12-day period at 4 °C was investigated.The chemical composition of the essential oil was evaluated by GC-MS, its antibacterial properties by disk diffusion, plate well and micro-dilution broth, and its antioxidant properties by DPPH.Treatments included control, gelatin, chitosan, gelatin+essential oil, chitosan+essential oil and gelatin-chitosan+essential oil.After preparation, the treatments were packed in sterile polyethylene bags in laboratory conditions and stored for 12 days at 4 °C and their microbial, chemical and sensorial properties were evaluated every 3 days. The results of GC-MS showed that eucalyptol (24.51%) and camphor (22.02%) are the main components. The MIC and MBC of *Perovskiaabrotanoides*Kar. essential oil nanoemulsions were reported to be 0.0625 and 0.125%, respectively. The amount of TVB-N and POV increased during the study period. According to the results of POV and pH measurements, there was a significant difference between all treatments and control treatment (P<0.05). The mean reduction log of bacteria was significantly different between all treatments and the highest antibacterial effect was observed in the gelatin-chitosan coating containing nanoemulsion of *Perovskiaabrotanoides*Kar. essential oil. According to the results,*Perovskiaabrotanoides*Kar. essential oil has good antioxidant and antimicrobial properties and according to the test results, it was found that chitosan-gelatin coating containing nanoemulsion of *Perovskiaabrotanoides*Kar. essential oil has an effective antimicrobial effect against *Aeromonas hydrophila* and can protect sensory properties and increase shelf life of rainbow trout fillets as well as useful coating to increase the shelf life of food products.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2021/ 12/ 03
Accepted 2022/ 04/ 06

Keywords:

Nanoemulsion,
Perovskiaabrotanoides,
chitosan,
Shelf life,
Aeromnashydrophila,
Gelatin,
Rainbow trout,
Coating,
Packaging.

DOI: 10.22034/FSCT.19.133.29
DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.133.3.8

*Corresponding Author E-Mail:
mohsenzadeh@um.ac.ir