ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی نانوامولسیون عصاره زرشک (*Berberis vulgaris*) به عنوان نگهدارنده طبیعی در یک مدل غذایی

بهروز دست پیمان[1]، امیر شاکریان [2] ، زهره مشاک [3]*، ابراهیم رحیمی [1]، رضا شرافتی چالشتری[4]
[1] گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
[2]مرکز تحقیقات تغذیه و فرآورده های ارگانیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
[3]گروه بهداشت مواد غذایی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
[4]مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماریهای متابولیک،دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان،ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: mashak@kiau.ac.ir

چکیده

در دهه‌های اخیر، ترجیح مصرف کننده بیشتر به سمت غذاهای نگهداری شده با نگهدارنده‌های طبیعی گیاهی (مانند عصاره و اسانس‌های روغنی) است. در این مطالعه پتانسیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریال نانو امولسیون عصاره زرشک ارزیابی شد. در مجموع سیزده ترکیب فنلی در عصاره شناسایی شد. خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره و نانو امولسیون عصاره زرشک با دو روش DPPH و ATBS به ترتیب ۰/۰۲ mg/g - ۲/۱۴ و ۰/۰۲ mg/g و ۲/۱۰ بود. همچنین خاصیت ضدمیکروبی آن روی باکتری‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز*) و باکتری‌های گرم منفی (*اشریشیاکلی* و *سالمونلا انتریتیدیس*) تأیید شدو باکتری‌های گرم مثبت نسبت به هر دو فرم عصاره آزاد و نانوامولسیون عصاره حساسیت بالاتری داشتند. مقاوم‌ترین و حساس‌ترین پاتوژن ها نسبت به عصاره آزاد و نانوامولسیون عصاره زرشک به ترتیب *سالمونلا انتریتیدیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* و بود. در ادمه پتانسیل اکسیداتیو (اکسیداسیون لیپید و پروتئین) و آنتی‌باکتریال نانوامولسیون‌ها بر روی فیله ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii*) به عنوان یک مدل غذایی فسادپذیر استفاده شد. نتایج نشان دهنده افزایش پایداری اکسیداتیو،تشکیل کمتر ترکیبات نیتروژن فرار و کاهش بار میکروبی نمونه‌های فیله ماهی پوشش‌دهی بود. بطوریکه استفاده از نانوامولسیون عصاره زرشک توانست طی ۶ روز کیفیت فیله‌های ماهی در دمای یخچال را حفظ کند. در مجموع می‌توان گفت استفاده از نانوامولسیون عصاره زرشک به عنوان یک نگهدارنده طبیعی برای برای افزایش عمر مفید و حفظ کیفیت مواد غذایی پیشنهاد می‌شود.

کلمات کلیدی: نانوامولسیون، ماندگاری مواد غذایی، نگهدارنده‌های طبیعی، *Berberis vulgaris*، *Rutilus frisii*

مقدمه

حفظ مواد غذایی از تمدن باستان یک دغدغه بزرگ بوده است. جوامع باستانی روش‌های نگهداری مختلفی مانند خشک کردن و نمک سود کردن را برای نگهداری طولانی‌تر غذا استفاده کردند. با پیشرفت جوامع، نگهدارنده‌های شیمیایی مانند بنزوات‌ها، نیترات‌ها، نیتریت‌ها و سوربات‌ها به طور گسترده‌ای برای افزایش ماندگاری مواد غذایی استفاده می‌شوند. با این حال، نگرانی‌هایی در مورد تأثیر منفی بالقوه استفاده بیش از حد از مواد نگهدارنده بر سلامت انسان وجود دارد (Cedillo-Olivos *et al*., 2024). در نتیجه، مصرف‌کنندگان به‌طور فزاینده‌ای خواستار افزودنی های ایمن، کارآمد و طبیعی هستند که دارای پتانسیل گسترده‌ای برای مهار رشد پاتوژن‌های غذایی باشند (Dong *et al*., 2024). برای غلبه بر نگرانی مصرف‌کننده، در سال‌های اخیر تمرکز محققان بر استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی مانند اسانس و عصاره های گیاهی در مدل آزمایشگاهی و همچنین مدل غذایی بوده است. تنوع نگهدارنده‌های طبیعی استخراج شده از گیاهان، علاوه بر امکان انتخاب متنوع، می‌تواند ماندگاری، ویژگی‌های تغذیه‌ای و خواص فیزیکوشیمیایی مواد غذایی را بهبود دهد (Soutelino *et al*., 2024).

زرشک با نام علمی *(Berberis vulgaris* L.*)* یک گیاه بوته‌ای، با رنگ قرمز و طعم ترش از خانواده *Berberidaceae* است و تقریباً ۱۹۰ گونه در سراسر جهان وجود دارد و در اروپا، آسیا و به ویژه ایران کشت می شود. میوه‌های زرشک تقریباً ۷ تا ۱۰ میلی‌متر طول و ۳ تا ۵ میلی‌متر پهنا دارند و ظاهری بیضی شکل و ساختاری شبیه زغال اخته دارند و به دلیل محتوی آلکالوئیدی، کاروتنوئیدها و ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، محتوای ویتامین‌ها (C و E) و اسیدهای آلی یکی از قدیمی‌ترین گیاهان مورد استفاده در طب سنتی است (Tacer-Tanas *et al*., 2024; Homayoonfal *et al*., 2021). همچنین میوه‌های زرشک به دلیل داشتن آنتوسیانین و کاروتنوئید بالا به عنوان یک رنگدانه طبیعی و عوامل آنتی‌اکسیدانی طبیعی استفاده می‌شود. علاوه بر این، به دلیل حضور آلکالوئید بربرین[1] و سایر ترکیبات زیست فعال (مانند پلی‌فنول‌ها و فلاوونوییدها)، عصاره زرشک فعالیت ضدمیکروبی قابل توجهی علیه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی را نشان می‌دهد (Parseghian *et al*., 2024). با این حال، ترکیبات زیست فعال موجود در عصاره زرشک، به شرایط محیطی حساس هستند و مهمتر از آن، گروه های هیدروکسیل فنلی آنتوسیانین‌ها به راحتی به فرم کینون اکسید می‌شوند و باعث کاهش فعالیت بیولوژیکی آنها می‌شود. از این رو، پایداری پایین کاربرد آنها را در فرآیندهای مختلف محدود کرده است که این امر در سال‌های اخیر به عنوان یک چالش جدی در صنایع غذایی مطرح می‌باشد (Jawed Khan *et al*., 2023). بر این اساس، استراتژی‌های مختلفی پیشنهاد شده‌اند که کپسوله‌سازی کاربردی‌ترین تکنیک است. اساساً، کپسوله‌سازی باعث حفاظت و افزایش پایداری، فراهمی زیستی و همچنین هدف‌گیری، رهاسازی کنترل‌شده یا طولانی‌مدت ترکیبات زیست فعال از طریق چسباندن آنها در داخل یک پوشش یا دیواره لایه نازک به صورت میکرو یا نانوذرات می‌باشد (Taouzinet *et al*., 2023). نانومولسیون‌ها به دلیل اندازه قطرات کوچکشان از نظر نوری شفاف یا نیمه شفاف هستند و پایداری ترمودینامیکی بالایی

[1] Berberine

در برابر بارش و تجمع نشان می‌دهند. همچنین نانوامولسیون‌ها از نظر ترمودینامیکی به سمت میکروارگانیسم‌هایی که در غشای خود ساختار لیپیدی دارند رانده می شوند و این اتصال با گرانش الکتروا ستاتیکی بین بارهای کاتیونی ذرات نانوامولسیون و بارهای آنیونی غشای خارجی میکروارگانیسم‌ها بهبود می‌یابد؛ از طرفی به دلیل افزایش نسبت سطح به حجم، فعل و انفعالات مولکولی با سطوح سلولی باکتری‌ها را تسهیل می‌کند. هنگامی‌که نانوامولسیون به پاتوژن متصل می‌شود، انرژی آن آزاد می شود. بنابراین غشای لیپیدی پاتوژن ناپایدار شده و مرگ سلولی رخ می‌دهد (Pandey *et al*., 2024). مطالعات مختلفی اثرات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها و اسانس های روغنی را نشان داده‌اند (Mutlu, 2023; Gholamhosseinpour *et al*., 2023; da Silva *et al*., 2023). ماهی سفید دریای خزر *(Rutilus frisii kutum)* متعلق به خانواده کپور ماهیان است. صرف نظر از اهمیت اقتصادی، تغذیه‌ای، حضور پروتئین‌های حیاتی، محتوی اسید چرب غیر اشباع بالا (خصوصاً ω6 و ω3)، پروفایل اسیدهای آمینه و لذیذ بودن گوشت این ماهی سبب شده که بسیار مورد استقبال مصرف کننده باشد (Hedayatifard *et al*., 2017). عمر مفید و کیفیت آبزیان به دلیل حضور پروتئین بالا، pH خنثی، وجود آنزیم‌های اتولیتیک و پتانسیل فساد شیمیایی بسیار کم است. بنابراین ایمنی افزایش ارتقاء کیفیت و کنترل کیفی فرآورده آبزی جهت جلوگیری و کاهش دور ریز این محصول ذی قیمت مهم می‌باشد (Huss, 2007). از این رو در این مقاله ابتدا ویژگی‌های نانوامولسیون عصاره زرشک ارزیابی شد و سپس فعالیت ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون‌های تهیه شده جهت پایداری اکسیداتیو و میکروبی فیله ماهی دریای خزر *(Rutilus frisii)*، به عنوان یک مدل غذایی با فسادپذیری بالا، طی ۹ روز نگهداری در دمای یخچال بررسی شده است .

مواد و روش کار

تهیه مواد اولیه: میوه تازه زرشک از بازار محلی (قاین، خراسان جنوبی، ایران) تهیه شد. همچنین سویه‌های میکروبی پاتوژن های *اشریشیاکلی* (PTCC 25922)، *سالمونلا انتریتیدیس* (PTCC 13076)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 7644) و *لیستریا مونو سیتوژنز* (PTCC 13565) مورد بررسی بصورت ویال‌های لیوفیلیزه ۱ گرمی (10^{12} CFU/Sachet) از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران تهیه شدند. مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق از شرکت Merck (آلمان) و محیط‌های کشت استفاده شده از شرکت Q-Lab (کانادا) خریداری شدند.

تهیه عصاره میوه زرشک: میوه تازه رسیده درون آون (Memmert، آلمان) با دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت خشک و پودر شد. پس از آن، اتانول (با خلوص ۹۹ درصد) به نسبت ۱:۱۰ (وزن / حجم) اضافه شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق به کمک شیکر (IKA، آلمان) هم زده شد. سپس، مخلوط از طریق کاغذ صافی Whatman شماره ۱ فیلتر شد و اتانول توسط یک اواپراتور چرخشی (Heidolph، آلمان) تبخیر شد. عصاره میوه زرشک جهت انجام آزمایشات (کمتر از دو هفته) در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند (Shekarabi *et al*., 2022).

تهیه نانو امواسیون عصاره زرشک: جهت تهیه نانوامولسیون، عصاره به نسبت مساوی با توین ۸۰، به عنوان سورفکانت، به خوبی مخلوط شدند. سپس فاز آبی (آب مقطر) به وسیله اسید سیتریک ۰/۳در صد اسیدی شده و مخلوط فاز روغنی (روغن آفتابگردان، لادن، ایران) با

پلی‌گلیسرول پلی‌ریسینولئات مخلوط شد و سورفکتانت بر روی همزن مغناطیسی با سرعت دورانی ۷۰۰ دور در دقیقه به آرامی به فاز آبی، به منظور تهیه پیش مخلوط امولسیونی، اضافه شد. پیش مخلوط امولسیونی تهیه شده به مدت ۲۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک (Greatultrasonic، چین) با توان ۱۰۰وات و ۴۰ کیلوهرتز برای تهیه نانو امولسیون‌ها قرار گرفتند (Fallah *et al*., 2022). به این ترتیب نانو امولسیون مورد نظر تهیه شد.

شناسایی ترکیبات عصاره میوه زرشک با HPLC[1]: آنالیز HPLC با Beckman HPLC با پمپ مدل ۱۲۷، آشکار ساز UV مدل ۱۶۶ و سیستم عامل ۳۲ KARAT Sotware انجام شد. ترکیبات فنلی در طول موج ۲۸۰ نانومتر با سرعت کم ۱ میلی‌لیتر در دقیقه شناسایی شدند. کارکرد ستون دستگاه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد تنظیم شده بود. جداسازی در یک سیستم پمپاژ دوگانه با تغییر نسبت ۲/۵ در صد (v/v) اسید استیک در آب (فاز متحرک A) و ۷۰ درصد متانول در آب (فاز متحرک B) انجام شد. برنامه شستشوی گرادیان حلال به شرح زیر بود: ۱۰تا ۲۶ در صد (v/v) B در ۱۰ دقیقه، تا ۷۰ در صد B در ۲۰ دقیقه و در نهایت تا ۹۰ در صد B در ۲۵ تا ۳۱ دقیقه. حجم تزریق برای همه نمونه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر بود. ترکیبات فنلی با تطبیق زمان ماند و ویژگی‌های طیفی آن‌ها با استانداردها آنالیز شدند (Och *et al*., 2023).

اندازه‌گیری کارایی ریزپوشانی (EE)[2]: نانوامولسیون با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ ساعت اولتراسانتریفیوژ شد، مایع رویی جمع آوری و با بافر فسفات رقیق شد تا غلظت آزاد مربوط به عصاره زرشک محاسبه شود. نمونه‌ها مجدداً سانتریفیوژ شدند و فرآیند فوق سه بار تکرار شد. سوپرناتانت‌ها توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۳۵ نانومتر برای تعیین غلظت عصاره زرشک ریزپوشانی شده جمع‌آوری گردید. درصد راندمان به دام افتادن به صورت زیر محاسبه و گزارش شد (Ananingsih *et al*., 2024):

% Entrapment efficiency = Total extract added - free extract/Total extract added × 100 رابطه (۱)

اندازه‌گیری محتوی فنل کل: ۲۵ میکرولیتر از نانو امولسیون عصاره با ۲۵ میکرولیتر معرف Folin-Ciocalteu (۲۵ در صد وزنی/وزنی) و ۲۰۰ میکرولیتر آب مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه قبل از مخلوط کردن ۲۵ میکرولیتر کربنات سدیم ۱۰ درصد انکوبه (شیماز- ایران) شد. مجدداً مخلوط به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق در تاریکی انکوبه شد و جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر با اسپکتوفتومتر (Shimatzo- ژاپن) ثبت شد. نتایج به عنوان میلی‌گرم اسید گالیک (۰-۲۰۰ میکروگرم بر گرم) معادل در هر گرم نمونه (mg GAE/g) گزارش شد (Ali *et al*., 2021).

اندازه‌گیری محتوی فلاونوئید: نانو امولسیون عصاره در یک تیوپ ۸۰ میکرولیتری ریخته و پس از افزودن ۸۰ میکرولیتر محلول کلرید آلومینیوم (۲ درصد) و استات سدیم ۱۲۰ میکرولیتر (۵۰ گرم در لیتر) تکان داده شد. سپس مخلوط واکنش به مدت ۲/۵ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در تاریکی نگهداری شد. جذب در طول موج ۴۴۰ نانومتر اندازه‌گیری و تمام نمونه‌ها در سه تکرار آنالیز شدند. منحنی استاندارد (۰-۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کوئرستین) رسم شد و نتایج به صورت mg QE/g ارائه شد (Suleria *et al*., 2020).

[1] High-performance liquid chromatography

[2] Encapsoulation Efficiency

اندازه‌گیری توزیع اندازه ذرات: به منظور اندازه‌گیری میانگین قطر حجمی قطرات ابتدا همه نانو امولسیون ها به منظور جلوگیری از پراکنش متعدد ذرات[1] با نسبت ۱ به ۵۰ رقیق شده و به وسیله دستگاه Malvern DLS[2]، اندازه قطرات در دمای ۲۵ °C نگهداری و با زاویه ۹۰ درجه مشخص گردید (Rezaei Savadkouhi *et al*., 2020).

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی:

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH[3]: ۱ میلی‌لیتر عصاره با ۱ میلی‌لیتر DPPH ۰/۰۰۲درصد متانول مخلوط گردید. بعد از انکوباسیون برای ۳۰ دقیقه در تاریکی در دمای اتاق، جذب در ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. آسکوربیک اسید به عنوان کنترل مثبت استفاده شد و از فرمول زیر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ارزیابی بر اساس µg/mL و گزارش شد (Ganesan and Shanmugam, 2020).

I% = (A control – A sample) / A control × 100

رابطه (۲)

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش ATBS: ۳۰ میکرولیتر از نمونه تهیه شده با متانول در ۳ میلی‌لیتر محلول رادیکال $ABTS^{\bullet+}$، اضافه شد و جذب واکنش پس از ۶ دقیقه در طول موج ۷۳۴ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. آب به عنوان نمونه بلانک واکنش استفاده شد. محلول رادیکال $ABTS^{\bullet+}$ از واکنش بین ۵ میلی‌لیتر محلول ذخیره ABTS (7 mmol/L) و ۸۸ میکرولیتر پر سولفات پتاسیم (140 mmol/L) تهیه شد که هر دو در آب مقطر تهیه شده بودند. مخلوط به مدت ۱۶ ساعت در تاریکی در دمای اتاق نگهداری شد. این محلول با اتانول تا جذب ۰/۷ در ۷۳۴ نانومتر رقیق شد. یک منحنی استاندارد Trolox در اتانول، ساخته شده در شرایط واکنش مشابه، برای تعیین کمیت کل فعالیت آنتی‌اکسیدانی استفاده شد (Ganesan and Shanmugam, 2020).

I% = (A control – A sample) / A control × 100

رابطه (۳)

اندازه‌گیری فعالیت ضدمیکروبی:

تهیه سوسپانسیون میکروبی: پاتوژن‌های *اشریشیاکلی*، *سالمونلا انتریتیدیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* برای آزمایش انتخاب شدند زیرا مهم‌ترین پاتوژن‌های مرتبط با بیماری‌های ناشی از غذا هستند. پاتوژن‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر دو بار در محیط کشت Brain Heart Infusion فعال شدند که به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. پس از این، کلنی‌های پاتوژن‌ها بر روی آگارهای انتخابی مختلف (شامل EMB agar برای *اشریشیاکلی*، XLD برای *سالمونلا انتریتیدیس*، Listeria Oxford Agar برای *لیستریا مونوسیتوژنز* و Baird Parker Agar همراه با تلوریت زرده تخم مرغ برای *استافیلوکوکوس اورئوس*) جداشدند و به لوله‌های آزمایش حاوی ۵ میلی‌لیتر محلول نمک استریل در ۰/۸۵ درصد (m/v) منتقل شدند. کدورت با محلول سولفات باریم استاندارد (استاندارد نیم مک فارلند برابر با غلظت log ۸ CFU/mL) مقایسه شد (da Silva *et al*., 2023).

تعیین قطر هاله عدم رشد: برای تعیین فعالیت ضد میکروبی نانوامولسیون عصاره در برابر باکتری‌های مورد بررسی، از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد. دیسک‌ها به قطعات ۱۰ میلی‌متری بریده شدند و پس از آغشته شدن به نانوامولسیون‌ها (۰/۴ mg/ml، ۰/۸، ۱/۶، ۳/۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰) روی پلیت‌های Mueller Hinton

[1] Multiple Scattering
[2] Dynamic light scattering
[3] DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Broth که قبلاً با کلنی‌های CFU/ml 10^8 × ۱/۵ پاتوژن‌ها آغشته شده بود، قرار داده شدند و سپس در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد (Ansarifar and Moradinezhad, 2022).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)[1] و حداقل غلظت کشندگی (MBC):[2] MIC برای هر پاتوژن به روش میکرودیلوشن تعیین شد. برای این منظور، عصاره نانومولسیون عصاره در محلول ۴ درصد دی متیل سولفوکسید[3] رقیق و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت درون ۱۰ لوله آزمایش در غلظت‌های (mg/ml ۰، ۰/۱۹، ۰/۳۹، ۰/۷۸، ۱/۵۶، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵۰ و ۵۰) ریخته شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی به طور جداگانه تلقیح شد. سپس پلیت‌های چندخانه به دقت مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس گرمخانه‌گذاری (شیماز – ایران) شدند. پایین‌ترین غلظت مهار رشد میکروارگانیسم‌ها به عنوان MIC گزارش شد. جهت تعیین میزان MBC، از هر چاهک به کمک سمپلر ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و روی محیط کشت Mueller Hinton Agar کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری انجام شد. پایین‌ترین غلظت کشنده کامل میکروارگانیسم‌ها (کاهش ۹/ ۹۹ درصدی در Log CFU /ml) به عنوان MBC گزارش شد (El Hamdaoui *et al*., 2018).

تهیه فیله ماهی و پوشش‌دهی با نانومولسیون عصاره زرشک: تعداد ۵ عدد ماهی سفید از بازار بندر انزلی از بین ماهی‌های صید شده، بطور تصادفی خریداری شد. سپس ماهیان تازه در داخل جعبه‌های یونولیت همراه با یخ قرار داده شد و طی مدت ۶ ساعت به آزمایشگاه منتقل گردید. به منظور جداسازی مواد زائد خارجی از سطح بدن ماهیان، شستشوی آن‌ها با آب شیرین انجام پذیرفت. پس از سرزنی، تخلیه شکمی و فیله نمودن ماهیان مجدداً شسته شدند. فیله‌ها به وزن ۵۰ گرم تهیه شدند. جهت تهیه تیمارها، ابتدا نمونه‌های فیله ماهی در محلول پوشش‌دهی (نانومولسیون) به مدت ۳۰ ثانیه غوطه‌ور شدند. نهایتاً، در زیر هود قرار داده شده تا خشک شدند. سپس هر قطعه فیله به طور جداگانه در یک ظرف پلی اتیلنی استریل شده به وسیله اشعه UV قرار داده شده و در یخچال با دمای ۱±۴ درجه سلسیوس به مدت ۹ روز نگهداری شدند (Mezhoudi *et al*., 2022).

آزمون پایداری اکسیداتیو: اکسیداسیون لیپید (ماده واکنش دهنده با اسید تیوباربیتوریک) نمونه‌ها به روش کالریمتریک (Efendi *et al*., 2023) و اکسیداسیون پروتئین (اکسیداسیون پروتئین با واکنش بین گروه‌های کربونیل و هیدرازون‌های پروتئینی تشکیل‌دهنده دی‌نی‌تروفنیل هیدرازین) نمونه‌ها به روش جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر (Monteiro *et al*., 2020) و تشکیل ترکیبات ازت فرار به روش تیتراسیون با اسید سولفوریک ۰/۱ نرمال (Mehrabi *et al*., 2024) به مدت ۹ روز (روز ۰، ۳، ۶ و ۹) تعیین شد.

آزمون میکروبی: پس از آماده‌سازی سوسپانسیون فیله‌های ماهی، باکتری‌های کل سایکروتروف در محیط کشت Nutrient agar (گرمخانه‌گذاری در دمای ۶/۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ روز) (ISIRI, 2024)، باکتری‌های کل مزوفیل در محیط کشت Nutrient agar (گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴-۴۸ ساعت)

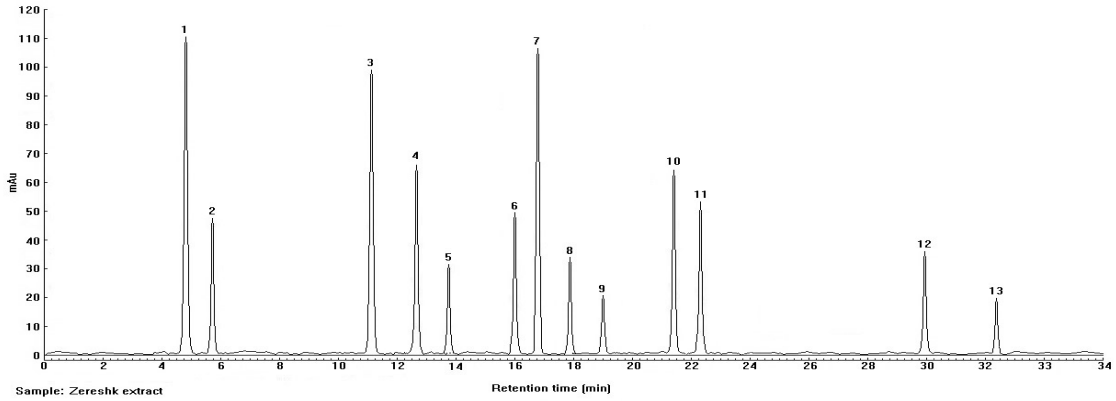
[1] Minimum Inhibitory Concentration
[2] Minimum Bactericidal Concentration
[3] Dimethyl sulfoxide

(ISIRI, 2015)، و باکتری‌های انتروباکتریاسه در محیط کشت Violet Red Bile Lactose Agar (گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت) (Khanzadi *et al*., 2020). به مدت ۹ روز (روز ۰، ۳، ۶ و ۹) انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری: نتایج به دست آمده در آزمایشات، برای داده‌های تجربی (آزمایشی) به صورت میانگین ± انحراف معیار در سه بار تکرار بیان شدند. داده‌های آزمایشات با تجزیه و تحلیل واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) مقایسه و تفاوت‌های معنی‌دار آماری بین مقادیر میانگین‌ها (در مواردی که اثر کلی تیمارها معنی‌دار باشد) با استفاده از آزمون تعقیبی چند دامنه‌ای دانکن تعیین شد. نتایج آزمون‌های آماری به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSSنسخه ۲۶ انجام شد. سطح معنی‌داری $p\leq$ ۰/۰۵ برای مقایسه داده‌ها در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج بررسی ترکیبات فنلی موجود در عصاره زرشک استخراج شده با HPLC در شکل ۱ نشان داده شده است. در مجموع ۱۳ ترکیب در عصاره زرشک شناسایی شد.

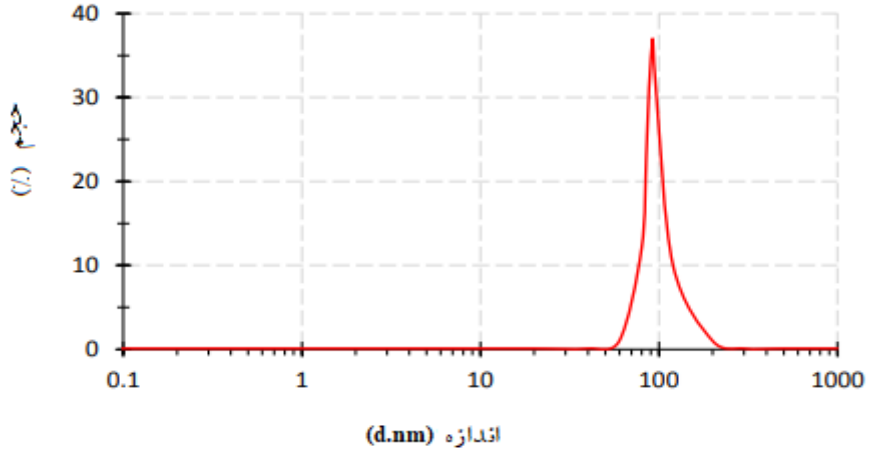


شکل ۱- ترکیبات فنلی شناسایی شده در عصاره زرشک با HPLC

جدول ۱- ترکیبات شناسایی شده و فراوانی آنها در عصاره زرشک با HPLC

ترکیب شناسایی شده	فراوانی (µm/g)	ترکیب شناسایی شده	فراوانی (µm/g)
اسید کلروژنیک	۸/۳۱	گالیک اسید	۳/۲۰
اپی‌کاتچین گالات	۷/۷۲	کامفرول	۲/۵۸
کاتچین هیدرات	۶/۶۰	اسید فولیک	۲/۲۶
پروتوکاتکویک اسید	۴/۳۳	اسید کافئیک	۱/۹۵
کوئرستین	۴/۱۴	ایزورامنتین	۱/۶۳
میریستین	۳/۶۶	ترانس اسید سینامیک	۱/۵۵
اسید p-کوماریک	۳/۴۵		

نتایج میانگین قطر ذرات (شکل ۲) نشان داد یک پیک با پنهای ۳۱ نانومتر مشاهده شد. میانگین اندازه ذرات نانوامولسیون‌ها ۹۲ نانومتر با PDI برابر ۰/۳۴۵ گزارش شد.



شکل ۲- توزیع اندازه ذرات نانوامولسیون‌ها

در این مطالعه میزان کارائی ریزپوشانی عصاره زرشک برابر با ۸۷ درصد بود. نتایج محتوی فنل و فلاونوئید نانوامولسیون عصاره زرشک در مقایسه با فرم آزاد (جدول ۲) نشان داد محتوی فنل و فلاونوئید در عصاره زرشک بطورمعناداری از نانوامولسیون بالاتر بود ($p<0.05$). همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز نشان دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر در فرم آزاد عصاره بود ($p<0.05$).

جدول ۲- میانگین نتایج محتوی فنلی، فلانوئیدی و آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون عصاره زرشک و عصاره آزاد

تیمار	فنل (mg/g)	فلاونوئید (mg/g)	DPPH (mg/g)	ATBS (mg/g)
عصاره زرشک	۴۳/۲۶ ± ۰/۳۶ ^{a}	۲۴/۵۸ ± ۱/۰۲ ^{a}	۰/۰۲ ± ۰/۰۰ ^{b}	۰/۰۲ ± ۰/۰۰ ^{b}
نانوامولسیون عصاره زرشک	۹/۱۹ ± ۰/۰۱ ^{b}	۲/۹۷ ± ۰/۰۵ ^{b}	۲/۱۴ ± ۰/۰۷ ^{a}	۲/۱۰ ± ۰/۰۲ ^{a}

*حروف کوچک متفاوت نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ستون می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

نتایج فعالیت ضدمیکروبی نانوامولسیون عصاره زرشک در مقایسه با عصاره (جدول ۳) در برابر گونه‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* و لیستریامنو سیتوژنز) و گونه‌های گرم منفی (*شریشیاکلی* و *سالمونلا انتریتیدیس*) نشان داد نانوامولسیون‌ها فعالیت ضدمیکروبی کمتری نسبت به عصاره نشان دادند ($p<0.05$). همچنین نتایج نشان داد باکتری‌های گرم مثبت حساسیت بیشتری نسبت عصاره و نانوامولسیون داشتند ($p<0.05$). مقاوم‌ترین و حساس‌ترین پاتوژن‌ها

[1] polydispersity index

نسبت به عصاره و نانوامولسیون عصاره زرشک به ترتیب مربوط به *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا انتریتیدیس* بود ($p<0.05$).

جدول ۲- میانگین نتایج ضدمیکروبی (log cfu/ml) نانوامولسیون عصاره زرشک و عصاره

	تیمار	*اشریشیاکلی*	*لیستریا مونوسیتوژنز*	*سالمونلا انتریتیدیس*	*استافیلوکوکوس اورئوس*
MIC (mg/ml)	عصاره زرشک	۱۲/۵۰ ± ۰/۰۰ ^{a}	۱۰/۴۱ ± ۰/۰۵ ^{a}	۱۲/۵۰ ± ۰/۰۰ ^{a}	۸/۳۳ ± ۲/۹۴ ^{a}
	نانوامولسیون عصاره زرشک	۱۰/۴۱ ± ۲/۹۴ ^{a}	۸/۳۳ ± ۱/۰۲ ^{b}	۶/۲۵ ± ۲/۹۴ ^{b}	۸/۳۳ ± ۲/۹۴ ^{a}
MBC (mg/ml)	عصاره زرشک	۱۲/۵۰ ± ۰/۰۰ ^{a}	۱۲/۵۰ ± ۰/۰۰ ^{a}	۵۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{a}	۱۰/۴۱ ± ۲/۹۴ ^{a}
	نانوامولسیون عصاره زرشک	۱۰/۴۱ ± ۲/۹۴ ^{a}	۸/۳۳ ± ۱/۰۲ ^{b}	۲۵/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{b}	۸/۳۳ ± ۲/۹۴ ^{b}
رشد هاله عدم (mm)	عصاره زرشک	۱۰/۰۵ ± ۱/۱۸ ^{a}	۱۱/۶۴ ± ۱/۱۵ ^{a}	۱۰/۶۴ ± ۲/۰۲ ^{a}	۱۲/۶۶ ± ۱/۳۱ ^{a}
	نانوامولسیون عصاره زرشک	۷/۲۷ ± ۱/۰۵ ^{b}	۱۰/۸۱ ± ۱/۵۶ ^{b}	۴/۹۱ ± ۱/۱۱ ^{b}	۶/۶۶ ± ۱/۰۵ ^{b}

*حروف کوچک متفاوت نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ستون می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

نتایج اکسیداسیون چربی نمونه‌های فیله ماهی پوشش‌دهی شده با نانوامولسیون عصاره زرشک در مقایسه با عصاره (جدول ۳) نشان داد در روز اول اختلاف آماری معناداری بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد ($p>0.05$). با این حال از روز سوم اختلاف آماری معنادار بین تیمارهای پوشش‌دهی شده با نمونه شاهد مشاهده شد ($p<0.05$). همچنین نتایج نشان داد طی ۹ روز نگهداری روند افزایشی معنادار اکسیداسیون لیپید در همه گروه‌های مورد بررسی مشاهده شد ($p<0.05$). نتایج نشان داد اکسیداسیون لیپید وابسته به تیمارهای پوشش‌دهی بود ($p<0.05$).

محتوای کربونیل (اکسیداسیون پروتئین نشان داده شده در جدول ۳) رفتار مشابهی با اکسیداسیون لیپید با در نظر گرفتن دوره نگهداری و تفاوت بین تمام تیمارها بود ($p<0.05$). پوشش‌دهی با نانوامولسیون عصاره زرشک بطورمعناداری روند اکسیداسیون پروتئین نمونه‌های فیله ماهی را کاهش داد ($p<0.05$).

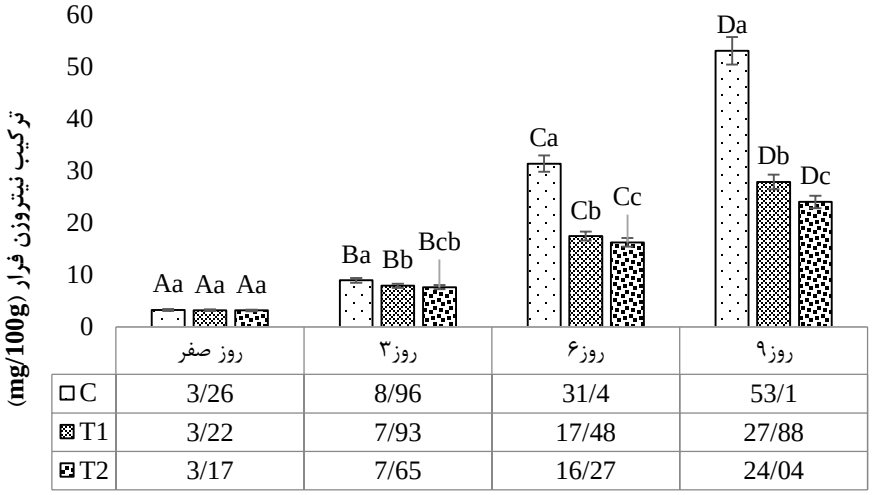
جدول ۳- میانگین نتایج پایداری اکسیداتیو نمونه‌های فیله ماهی پوشش‌دهی شده با عصاره و نانوامولسیون عصاره زرشک

	تیمار	روز صفر	روز سوم	روز ششم	روز نهم
اکسیداسیون لیپید (mg MAL/Kg)	Co	۰/۱۱ ± ۰/۰۰ ^{Aa}	۰/۲۳ ± ۱/۰۲ ^{Ba}	۰/۵۶ ± ۰/۰۴ ^{Ca}	۰/۸۷ ± ۰/۰۱ ^{Da}
	T1	۰/۱۲ ± ۰/۰۰ ^{Aa}	۰/۱۹ ± ۰/۰۰ ^{Bb}	۰/۴۵ ± ۰/۰۲ ^{Cb}	۰/۷۱ ± ۰/۰۱ ^{Db}
	T2	۰/۱۱ ± ۰/۰۰ ^{Aa}	۰/۱۳ ± ۰/۰۰ ^{Bb}	۰/۳۰ ± ۰/۰۰ ^{Cc}	۰/۶۰ ± ۰/۰۲ ^{cD}
اکسیداسیون پروتئین (nmol)	Co	۱/۳۳ ± ۰/۱۷ ^{Aa}	۳/۳۴ ± ۰/۲۴ ^{Ba}	۴/۴۶ ± ۰/۳۱ ^{Ca}	۵/۱۶ ± ۰/۹۴ ^{b}
	T1	۱/۳۰ ± ۰/۱۴ ^{Aa}	۲/۴۸ ± ۰/۱۹ ^{Bb}	۲/۸۴ ± ۰/۱۳ ^{Cb}	۳/۳۴ ± ۰/۲۸ ^{b}

T2	۱/۳۰ ± ۰/۱۲ ^{Aa}	۱/۸۴ ± ۰/۱۴ ^{Bb}	۲/۰۶ ± ۰/۱۲ ^{Cb}	۲/۵۳ ± ۰/۳۴ ^{b}

*Co: نمونه شاهد/ T1: نمونه پوشش‌داده شده با عصاره زرشک/ T2: نمونه پوشش‌داده شده با نانومولسیون عصاره زرشک
*حروف کوچک متفاوت نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ستون می‌باشد ($p<0.05$).
*حروف بزرگ متفاوت نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر سطر می‌باشد ($p<0.05$).

نتایج تشکیل ترکیبات ازت فرار در نمونه‌های فیله ماهی پوشش‌دهی شده با نانومولسیون عصاره زرشک در مقایسه با عصاره (شکل ۳) نشان داد در روز اول اختلاف آماری معناداری بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد ($p>0.05$). با این حال از روز سوم اختلاف آماری معنادار بین تیمارهای پوشش‌دهی شده با نمونه شاهد مشاهده شد ($p<0.05$). همچنین نتایج نشان داد طی ۹ روز نگهداری روند افزایشی معنادار تشکیل ترکیبات ازت فرار در همه گروه‌های مورد بررسی مشاهده شد ($p<0.05$). افزایش سریع تشکیل ترکیبات ازت فرار در نمونه شاهد (تیمار C) مشاهده شد که به مقدار ۵۳/۱۰ mg/100g در روز ۹ نگهداری رسید. بطورکلی استفاده از عصاره و نانومولسیون عصاره زرشک سبب کاهش معنی‌دار افزایش این پارامتر شد ($p<0.05$).



	روز صفر	روز۳	روز۶	روز۹
C	3/26	8/96	31/4	53/1
T1	3/22	7/93	17/48	27/88
T2	3/17	7/65	16/27	24/04

شکل ۳- میانگین نتایج تغییرات تشکیل ترکیبات ازت فرار نمونه فیله‌های ماهی طی ۹ روز

*Co: نمونه شاهد/ T1: نمونه پوشش‌داده شده با عصاره زرشک/ T2: نمونه پوشش‌داده شده با نانومولسیون عصاره زرشک
*حروف کوچک متفاوت نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ستون می‌باشد ($p<0.05$).
*حروف بزرگ متفاوت نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر سطر می‌باشد ($p<0.05$).

نتایج بار میکروبی نمونه‌های فیله ماهی پو شش‌دهی شده با نانوامولسیون عصاره زرشک در مقایسه با عصاره (جدول ۴) نشـــان داده شـــده اســـت. نتایج باکتری‌های ســـایکروتروف فیـله های ماهی نشـــان دهـنده اختلاف معـنادار در بین تیمارهای مختلف بود ($p<0.05$). در بین گروه های مختلف درروز اول، از نظر میزان جمعیت باکتری ســـایکروفیل در گروه‌هـای تحقیق (میـانگین ۳/۱۴ Log cfu/g) اختلاف معنی‌دار وجود نداشت ($p>0.05$). درصورتیکه از روز ۳ تا روز ۹ روند افزایشی مستمر در جمعیت باکتری‌های مورد بررسی در تیمارهای تحقیق گزارش شـد ($p<0.05$). باتوجه به نتایج نمونه‌های فیله ماهی پوشـــش داده شـــده با نانوامولســـیون عصـــاره زرشـــک (تیمار T3) کمترین روند افزایش میزان باکتری‌های سرمادوست را داشتند ($p<0.05$).

نتایج باکتری‌های مزوفیل (جدول۴) نیز روند افزایشـــی را نشـان داد در روز اول اختلاف آماری معنادار (میانگین Log ۳/۳۴ cfu/g) بین گروه‌های مورد بررســـی مشـــاهده نشـــد ($p>0.05$). همچنین روند افزایش معنادار در تمام گروه‌های مورد بررسی گزارش شد ($p<0.05$). مطابق نتایج استفاده از عصـــاره و نانوامولســـیون عصـــاره زرشـــک بطور معنادار روند افزایشی باکتری‌های مزوفیل را مهار کرد ($p<0.05$).

برر سی نتایج باکتری‌های انتروباکتریا سه ن شان دهنده روند مشـابه باکتری‌های مزوفیل و سـایکروتروف (جدول ۴) بود و نتایج نشـان داد اسـتفاده از عصـاره و نانوامولسـیون عصـاره زرشـــک بطورمعناداری ســـبب کاهش آلودگی باکتری‌های انتروباکتریاسه در نمونه فیله ماهی شدند ($p<0.05$).

جدول ۴- میانگین نتایج میکروبی نمونه‌های فیله ماهی پوشش‌دهی شده با عصاره آزاد و نانوامولسیون عصاره زرشک

	تیمار	روز صفر	روز سوم	روز ششم	روز نهم
باکتری‌های سایکروتروف (Log cfu/g)	Co	۳/۱۴ ± ۰/۰۱ ^{Aa}	۳/۳۸ ± ۰/۰۰ ^{Ba}	۵/۳۴ ± ۰/۰۱ ^{Ca}	۷/۸۷ ± ۰/۰۱ ^{Da}
	T1	۳/۱۵ ± ۰/۰۲ ^{Aa}	۳/۳۰ ± ۰/۰۱ ^{Bb}	۴/۲۳ ± ۰/۰۲ ^{Cb}	۵/۷۱ ± ۰/۰۱ ^{Db}
	T2	۳/۱۵ ± ۰/۰۲ ^{Aa}	۳/۲۱ ± ۰/۰۱ ^{Bb}	۳/۸۴ ± ۰/۰۴ ^{Cc}	۴/۶۱ ± ۰/۰۲ ^{cD}
باکتری‌های مزوفیل (Log cfu/g)	Co	۳/۳۴ ± ۰/۰۱ ^{Aa}	۴/۳۹ ± ۰/۰۰ ^{Ba}	۶/۲۸ ± ۰/۳۱ ^{Ca}	۹/۰۷ ± ۰/۰۴ ^{Db}
	T1	۳/۳۵ ± ۰/۰۱ ^{Aa}	۴/۲۸ ± ۰/۰۱ ^{Bb}	۵/۳۴ ± ۰/۱۳ ^{Cb}	۷/۲۰ ± ۰/۰۸ ^{Db}
	T2	۳/۳۴ ± ۰/۰۱ ^{Aa}	۴/۲۱ ± ۰/۰۱ ^{Bb}	۵/۱۵ ± ۰/۱۲ ^{Cb}	۶/۳۴ ± ۰/۰۱ ^{Cc}
باکتری‌های انتروباکتریاسه (Log cfu/g)	Co	۲/۵۴ ± ۰/۰۹ ^{Aa}	۴/۱۸ ± ۰/۰۲ ^{Ba}	۴/۳۱ ± ۰/۶۱ ^{Ca}	۶/۳۵ ± ۰/۰۴ ^{b}
	T1	۲/۳۸ ± ۰/۱۳ ^{Aa}	۳/۰۶ ± ۰/۰۳ ^{Bb}	۳/۸۴ ± ۰/۲۲ ^{Cb}	۵/۸۱ ± ۰/۰۲ ^{b}
	T2	۲/۳۴ ± ۰/۰۸ ^{Aa}	۲/۵۴ ± ۰/۰۳ ^{Bb}	۲/۴۰ ± ۰/۰۷ ^{Cb}	۴/۲۳ ± ۰/۰۳ ^{b}

*Co: نمونه شاهد/ T1: نمونه پوشش‌داده شده با عصاره زرشک/ T2: نمونه پوشش‌داده شده با نانوامولسیون عصاره زرشک

*حروف کوچک متفاوت نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ستون می‌باشد ($p<0.05$).

*حروف بزرگ متفاوت نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر سطر می‌باشد ($p<0.05$).

بحث

مطالعات نشان داده که عصاره میوه زرشک حاوی فیتوکمیکال‌هایی مانند ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، ترکیبات فنولی، آلکالوئیدی و آنتوسیانین است (Homayoonfal *et al*., 2021). در این مطالعه طی بررسی ترکیبات فنلی (شکل ۱) عصاره میوه زرشک، سیزده ترکیب فنولی به ترتیب فراوانی شامل اسید کلروژنیک (۸/۳۱ µm/g)، اپی‌کاتچین گالات (۷/۷۲ µm/g)، کاتچین هیدرات (۶/۶۰ µm/g)، پروتوکاتکویک اسید (۴/۳۳ µm/g)، کوئرستین (۴/۱۴ µm/g)، میریستین (۳/۶۶ µm/g)، اسید p-کوماریک (۳/۴۵ µm/g)، گالیک اسید (۳/۲۰ µm/g)، کامفرول (۲/۵۸ µm/g)، اسید فولیک (۲/۲۶ µm/g)، اسید کافئیک (۱/۹۵ µm/g)، ایزورامنتین (۱/۶۳ µm/g) و ترانس اسید سینامیک (۱/۵۵ µm/g) شناسایی شد. Bhardwaj و همکاران (۲۰۲۳) طی بررسی ترکیبات عصاره زرشک در مجموع ۳۳ ترکیب شناسایی کردند. همچنین آنها گزارش کردند در میان اجزای شناسایی شده پلی‌فنل‌ها، فلاونوئیدها (آگلیکون‌ها و گلوکوزیدها)، مشتقات اسیدهای بنزوئیک و سینامیک بالاترین غلظت را داشتند. همچنین وجود اسیدهای فنولیک ساده مانند گالیک اسید، اسید وانیلیک، اسیدهای کلروژنیک، اسید هیدروکسی بنزوئیک، اسید فرولیک یا کافئیک اسیدید در عصاره زرشک گزارش شد. El-Zahar و همکاران (۲۰۲۲) طی بررسی ترکیبات عصاره زرشک اسید گالیک، بربرین، اسید کلروژنیک، اسید وانیلیک، اسید کافئیک، اسید سیرینجیک، روتین، اسید p-کوماریک، کاتچین، میریستین و کامفرول در غلظت‌های بالا یافت شد. تفاوت در ترکیبات شناسایی شده در این مطالعه و مطالعات انجام شده تأثیر شرایط جغرافیایی را تأیید می‌کند. مطالعات نشان داده است که نوع، میزان ترکیبات و مواد مؤثره موجود در اسانس و عصاره گیاهان تابع موقعیت جغرافیایی، تغییرات فصلی، فاز رویشی یا زایشی گیاه است (Al-Askar *et al*., 2023).

اندازه ذرات بر حسب نانومتر، مقدار آن‌ها بر حسب درصد همچنین پیک منتخب نانوامولسیون در شکل ۲ ارائه شده‌اند. مقدار شاخص چند پراکندگی (PDI)[1] برابر با ۰/۳۴۵ گزارش شد. PDI نشان دهنده همگنی اندازه قطرات در نانو امولسیون است. مقدار پراکندگی بالاتر، نشان دهنده یکنواختی کمتر اندازه قطرات نانوامولسیون است (Parseghian *et al*., 2023). در این مطالعه میزان PDI نانوامولسیون بدست آمده مقدار پایینی داشت که نشان دهنده پایداری کلی و همگنی خوب آن می‌باشد. ریز بودن اندازه قطرات و ویژگی‌های منحصر به فرد نانوامولسیون‌ها مزیت‌هایی برای استفاده از آن‌ها را در بسیاری از فناوری‌های کاربردی ایجاد نموده و منجر به طولانی‌تر شدن دوره پایداری فیزیکی آن‌ها گردیده است. به واسطه ریز بودن قطرات، سطح ویژه نانوامولسیون ها زیاد شده ، قابلیت نفوذ آنها افزایش می یابد و این ویژگی آن ها را به یک سامانه انتقالی مؤثر تبدیل کرده است (Parseghian *et al*., 2023). Afroozandeh و همکاران (۲۰۲۴) طی بررسی توزیع اندازه ذارت دو گونه بربرین (ترکیب آلکالوئیدی عصاره زرشک) کنژوگه با پلی‌اتیلن گلیکول و دی اتیلن گلیکول مونو متیل اتر نشان دادند توزیع اندازه ذرات به ترتیب برابر با ۲۹/۱ نانومتر (PDI =۰/۲۱۵) و ۹۵/۵ نانومتر (PDI =۰/۱۰۸) بود. این محققان همگن با پایداری و پراکندگی مناسب نانوامولسیون‌ها را تأیید کردند.

گیاهان منابع غنی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند. در میان ترکیبات زیست فعال موجود در گیاهان، فنل‌ها از

[1] polydispersity index

اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند زیرا تمام گروه‌های پلی فنل (فنولیک، فلاونوئید و پرو-آنتوسیانیدین) ظرفیت ساختاری از بین بردن رادیکال های آزاد را دار ند (Omar *et al*., 2023). جدول ۳ محتوی ترکیبات فنولی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون عصاره زرشک در مقایسه با عصاره را نشان می‌دهد. مطابق با نتایج اختلاف آماری معنی داری بین محتوی فنولی عصاره (۴۳/۲۶ mg/g) و نانوامولسیون (۹/۱۹ mg/g) گزارش شد ($P<0.05$). همچنین تست‌های ABTS و DPPH روش‌های گسترده‌ای برای ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی محصولات طبیعی هستند. هر دو روش اسپکتروفتومتری مبتنی بر مهار رادیکال های رنگی پایدار (ABTS یا DPPH) هستند و توانایی مهار آنتی‌اکسیدان‌ها را حتی در صورت وجود در مخلوط‌های بیولوژیکی پیچیده مانند عصاره‌های گیاهی یا غذایی نشان می‌دهند. اصل این آزمایش‌ها این است که آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند اتم‌ها یا الکترون‌های هیدروژن را به رادیکال‌ها اهدا کنند و آن‌ها را به شکل پایدار خود کاهش دهند. درجه کاهش رادیکال با کاهش جذب در یک طول موج خاص اندازه‌گیری می‌شود (Omar *et al*., 2023). خاصیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH در عصاره و نانوامولسیون عصاره زرشک به ترتیب ۰/۰۲ mg/g و ۲/۱۴ همچنین خاصیت آنتی‌اکسیدانی به روش ATBS به ترتیب ۰/۰۲ mg/g و ۲/۱۰ تعیین شد. نتایج بدست آمده قابل انتظار بود زیرا محتوی ترکیبات فنلی در عصاره بالاتر بود، افزایش غلظت ترکیبات فنولی بطور مستقیم میزان توانائی نمونه های مختلف را در مهار رادیکال های آزاد افزایش می‌دهد. کمتر بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی در نانوامولسیون عصاره زرشک به دلیل عاری بودن فاز بیرونی نانو امولسیون‌از هرگونه ترکیبات فنولیک می‌باشد. افزایش غلظت ترکیبات فنولی بطور مستقیم میزان توانائی نمونه‌های مختلف را در مهار رادیکال های آزاد افزایش می‌دهد. در واقع خاصیت آنتی‌اکسیدانی آنها به رهایش مواد فرار از فاز درونی به فاز بیرونی مربوط می گردد (El-Sayed and El-Sayed, 2021).

بر اساس نتایج جدول ۲ عصاره و نانوامولسیون عصاره زرشک فعالیت ضد میکروبی بر روی هر دو باکتری‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* و لیستریامنوسیتوژنز) و باکتری‌های گرم منفی (*اشریشیاکلی* و *سالمونلا انتریتیدیس*) نشان دادند. نتایج نشان داد باکتری‌های گرم مثبت نسبت به هر دو فرم عصاره و نانوامولسیون عصاره حساسیت بالاتری داشتند. حساس‌ترین و مقاوم‌ترین پاتوژن‌ها نسبت به عصاره و نانوامولسیون عصاره زرشک به ترتیب *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا انتریتیدیس* بود. تفاوت بین دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دلیل مقاومت بیشتر باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت است. باکتری‌های گرم مثبت فقط یک لایه پپتیدوگلیکان در دیواره سلولی خود دارند. در مقابل، علاوه بر این لایه پپتیدوگلیکان داخلی، باکتری‌های گرم منفی دارای یک لایه خارجی متشکل از لیپوپروتئین، فسفوپروتئین و پروتئین نیز هستند که باعث کاهش نفوذ آنتی‌بیوتیک‌ها و اثر مواد ضد میکروبی نظیرعصاره بر روی باکتری‌های گرم منفی می شود (Mollaei *et al*., 2010). همچنین، به دلیل وجود گروه‌های شیمیایی مختلف، اثر ضد میکروبی یک عصاره را نمی‌توان به یک مکانیسم مشخص نسبت داد. مطالعات نشان داده که ترکیبات فنلی که به وفور در عصاره وجود دارند، از طریق مکانیسم‌های مختلفی از جمله تغییر در انتشار سلول میکروبی، تداخل با عوامل غشایی (مانند انتقال الکترون و از دست دادن مواد مغذی)، تداخل در سنتز پروتئین و اسید نوکلئیک و فعالیت آنزیمی، برهمکنش بر روی پروتئین‌های غشایی و جایگزینی آلکیل با هسته فنلی در امر ضد میکروبی

نقش دار ند (Lima *et al*., 2019). همچنین برای اع مال خا صیت MIC، MBC و قطر هاله عدم ر شد کمتر فرم نانو امولسیون ع صاره زر شک در مقایسه با فرم ع صاره م شاهده شد که ن شان دهنده قوی‌تر بودن خا صیت ضدمیکروبی نانو ع صاره زر شک ا ست. که این امر به دلیل اندازه ذرات با ابعاد نانو اســت که می‌توانند به دیواره ســلولی باکتری نفوذ کنند، غشـــای ســـلولی را از بین ببرند و فعالیت ضـــد باکتریایی بیشتری نسبت به ذرات بزرگتر نشان دهند (Amiri *et al*., 2023). El-Zahar و همکاران (۲۰۲۲) فعالیت ضدمیکروبی عصـــاره زرشـــک را بر روی هر دو باکتری‌های گرم مثبت *(استافیلوکوکوس اورئوس)* و گرم منفی *(اشریشیاکلی)* با قطر هاله عدم رشد به ترتیب ۱/۷۵ cm و ۲/۳ نشان دادند.

به منظور برر سی ع صاره و نانوامول سیون ع صاره زر شک به عنوان نگهدارنده طبیعی، عصـــاره و نانوامولســـیون بر روی فیله‌های پو شش‌دهی شده و پایداری اک سیداتیو و میکروبی فیله‌ها طی ۹ روز نگهداری برر سی شد. اک سیدا سیون لیپید (بررســـی تیوباربیتوریک اســـید) یک معیار کیفی مهم در محصولات گوشتی است. اکسیداسیون لیپید در طول فرآیند و ذخیره سازی باعث تغییرات نامطلوب در رنگ، طعم، عطر و با فت و همچنین از دســـت دادن ارزش غذایی می‌شـــود (Mezhoudi *et al*., 2019). مطابق با نتایج تیوباربیتوریک اسید نشان داده شده در جدول ۳، در روز اول اختلاف آماری معناداری بین تیمارهای مختلف م شاهده نشد. با این حال از روز ســوم اختلاف آماری معنادار بین تیمارهای پوشـــش‌دهی شده با نمونه شاهد م شاهده شد. علاوه بر این، طی ۹ روز نگهداری روند افزای شی معنادار اک سیدا سیون لیپید در همه گروه‌های مورد بررســـی مشـــاهده شـــد. بطوریکه محتوی تیوباربیتوریک ا سید با میانگین ۰/۱۱ mg MAL/kg از روز اول باروند افزایشـــی شـــاخص تیوباربیتوریک اســـید به mg MAL/kg ۰/۸۷، ۰/۷۱ و ۰/۶۰ (به ترتیب در تی مار های Co، T1 و T2) رســـید. با این حال، نمونه‌های پوشـــش‌دهی شـــده با عصـــاره زرشـــک عدد تیوباربیتوریک اســـید با کمتری نســـبت به نمونه شـــاهد داشـــتند. ســـطح قابل قبول تیوباربیتوریک اســـید ۰/۴۵ mg MAD/Kg گزارش شـــده ا ست (Maghami *et al*., 2019). بر این ا ساس، نمونه‌های پو شش‌دهی شده با ع صاره و نانوامولسیون ع صاره طی شش روز سطح قابل قبولی از تیوباربیتوریک ا سید را ن شان دادند. فرآورده‌های اولیه اک سیدا سیون چربی‌ها، هیدروپروک سیدها هســـتند که ترکیباتی ناپایدارند و نقشـــی در طعم نامطلوب ماهی ندار ند؛ ا ما در مرحله دوم اتواکســـیداســـیون، که هیدروپراکسیدها به آلدهید و کتون اکسیده می شوند، مالون دی آلدهید تشـــکیل می‌شـــود که طعم و بوی نامطلوب در محصـــول ایجاد می‌کند (Idumah *et al*., 2020). حملات اکســـیژن علیه پیوند دوگانه در اســـیدهای چرب غیر اشـــباع مانند دوکوزاهگزانوئیک اســـید و ایکوزاپنتانوئیک اســـید می‌تواند باعث شـــروع واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکال آزاد در اکســـیداســـیون لیپید شـــود. روند افزایشـــی کندتر شـــاخص تیوباربیتوریک ا سید فیله‌های پو شش‌دهی شده با ع صاره و نانوامولسیون عصاره زرشک در مقایسه با تیمار شاهد ممکن است مرتبط با ویژگی‌های شناخته شده و مستند شده عالی ممانعت از تبادل اکسیژن پوشش‌ها باشد (Nguyen *et al*., 2021). همچنین، اعتقاد بر این اســـت که مقدار شـــاخص تیوباربیتوریک ا سید پایین در نمونه‌های پو شش‌دهی شده با ع صاره و نانوامولسیون ع صاره زر شک به دلیل محتوای فنلی موجود در عصـــاره زرشـــک باشـــد. مطالعات نشـــان داده که آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند پراکسیداسیون لیپیدی را با از بین بردن رادیکال‌های آزاد، قطع واکنش‌های زنجیره‌ای، شکستن پراکســـیدها، کاهش غلظت موضـــعی اکســـیژن و اتصـــال به کا تالیزور های آ غازگر زنجیره مانند یون های فلزی کاهش دهند (Topcu and Gamze, 2024). همراســـتا با نتایج

بدست آمده Jaberi و همکاران (۲۰۲۰)، نشان دادند استفاده از عصاره زرشک در فرمولاسیون فرانکفورت مرغ سبب کاهش معنادار شاخص تیوباربیتوریک اسید نمونه‌ها شده بود.

اکسیداسیون پروتئین مسیری مشابه اکسیداسیون لیپید را دنبال می‌کند که یک واکنش زنجیره‌ای رادیکال آزاد را از طریق انتزاع یک اتم هیدروژن از یک پروتئین، عمدتاً از گروه‌های عاملی به زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه ایجاد می‌کند. بسته به اسید آمینه اکسید شده، باقیمانده‌های کربونیل، پیوند متقابل و باقی‌مانده‌های حاوی گوگرد می‌تواند منجر به اثرات نامطلوب بر روی اسید آمینه، رنگ و بافت فرآورده‌های گوشتی شود (Mozaffarzogh., 2020). به این ترتیب، افزایش محتوای کربونیل به طور طبیعی در طول نگهداری گونه‌های ماهی در یخچال اتفاق می‌افتد که با نتایج بدست آمده در این مطالعه منطبق است. تفاوت بین تیمارها ممکن است با همان دلایلی که برای اکسیداسیون لیپید ذکر شد در ارتباط با این واقعیت توضیح داده شود که اکسیداسیون پروتئین و لیپید واکنش همزمان هستند. مالون دی آلدئید از اکسیداسیون لیپید می‌تواند به باقی‌مانده‌های اسید آمینه به میوگلوبین و به برخی از مکان‌ها به پروتئین های میوفیبریلار متصل شود و آن را در برابر اکسیداسیون پروتئین حساس‌تر کند. از طرف دیگر، اکسیداسیون پروتئین، مقادیر زیادی آهن غیر متصل آزاد می‌کند که عامل‌های پرواکسیدانی برای اکسیداسیون لیپید هستند (Monteiro *et al.*, 2019).

نیتروژن کل فرار به طور گسترده برای تعیین کیفیت غذاهای دریایی استفاده می‌شود زیرا ارتباط مستقیمی با رشد میکروارگانیسم‌ها و تشکیل ترکیبات اساسی ناشی از متابولیسم آنها مانند آمونیاک، تری متیل آمین، دی اتیل آمین و متیل آمین دارد (Maghami *et al.*, 2019). مطابق شکل ۳، میزان تشکیل ترکیب نیتروژن فرار فیله‌های ماهی در تمام گروه‌های مورد بررسی با افزایش مدت زمان نگهداری افزایش معنادار یافت. در روز اول اختلاف آماری معنی‌دار بین میزان ترکیب نیتروژن فرار تیمارها گزارش نشد و مقدار آن در تمامی گروه‌های مورد بررسی تقریباً برابر با mg/100g ۳/۲۳ بود. افزایش تشکیل ترکیب نیتروژن فرار در نمونه‌های مورد بررسی مشاهده شد. استفاده از عصاره تأثیر مثبت بر روند جلوگیری از افزایش تشکیل ترکیب نیتروژن فرار تیمارها داشت و به ترتیب میزان ترکیب نیتروژن فرار در روز ۹ نگهداری در تیمارهای T2 و T3 به ترتیب mg/100g ۲۷/۸۸ و ۲۴/۰۴ بود. همانطورکه در دستور اجرایی کنترل و نظارت بهداشتی بر فرآورده‌های خام دامی سازمان دامپزشکی ایران و همچنین انجمن بین المللی تولیدکنندگان پودر و روغن ماهی (IFOMA) مشخص شده است، اندازه‌گیری احتمالی تشکیل ترکیب نیتروژن فرار برای ماهی تازه و منجمد mg/100g ۲۰ است و محدوده قابل استفاده بین mg/100g ۲۱ تا ۲۵ و مجموع غیرقابل استفاده آن بیش از mg/100g ۲۵ است (Azari *et al.*, 2022). بر این اساس استفاده از عصاره تا ۶ روز و نانوامولسیون عصاره زرشک تا ۹ روز سطح تشکیل ترکیبات نیتروزن فرار فیله‌های ماهی را در سطح قابل قبول نگهداشتند. از آنجاییکه تشکیل ترکیب نیتروژن فرار عمدتاً با تجزیه باکتریایی گوشت ماهی تولید می‌شود، مقادیر بالاتر تعداد کل باکتری‌ها در نمونه شاهد نشان‌دهنده فساد بالاتر است. مقادیر پایین‌تر تشکیل ترکیب نیتروژن فرار نمونه‌های پوشش دهی شده با عصاره و نانو امولسیون عصاره زرشک، می‌تواند به کاهش سریع‌تر جمعیت باکتریایی یا کاهش ظرفیت باکتری‌ها برای دِآمیناسیون اکسیداتیو ترکیبات نیتروژن غیر پروتئینی یا هر دو نسبت داده شود (Ibrahim *et al.*, 2024). Sayadi و همکاران (۲۰۲۱)، نشان دادند استفاده از عصاره زرشک سبب کاهش

تشکیل ترکیب نیتروژن فرار در گوشت بوقلمون طی نگهداری در یخچال شد.

بر اساس نتایج به دست آمده (در جدول ۴) بین گروه‌های مختلف درروز اول، از نظر میزان جمعیت باکتری سایکروفیل، مزوفیل و انتروباکتریاسه در گروه‌های تحقیق (به ترتیب ۳/۱۴ Log CFU/g، ۳/۳۴ و ۲/۴۲) اختلاف معنی‌دار وجود نداشت. در صورتیکه از روز ۳ تا روز ۹ روند افزایشی مستمر در جمعیت تمام باکتری‌های مورد بررسی در تیمارهای تحقیق گزارش شد. باکتری‌های سرمادوست، گرم منفی و گروه اصلی میکروارگانیسم‌های مسئول فساد ماهی تازه نگهداری شده به صورت سرد هستند و محدوده فساد باکتری‌های سرمادوست در فرآورده‌هایی همچون فیله ماهی بین ۶ Log CFU /g تا ۷ است (Erkan *et al*., 2006). باتوجه به نتایج استفاده از عصاره و نانومولسیون عصاره زرشک جمعیت باکتری‌های سرمادوست، فیله‌های ماهی طی ۹ روز و تا انتهای زمان نگهداری را در حد مجاز نگهداشت. افزایش باکتری‌های سرمادوست در بسته‌بندی معمولی نشانگر وجود اکسیژن کافی برای رشد این گونه از باکتری‌ها می‌باشد. کاهش سرعت رشد این باکتری‌ها در پوشش‌های عصاره زرشک به ممانعت‌کنندگی اکسیژن این فیلم‌ها (Indumathi *et al*., 2019) و همچنین به ترکیبات آنتی باکتریالی عصاره زرشک نسبت داده شده است (Sayadi *et al*., 2021). باکتری‌های انتروباکتریاسه نیز به عنوان یک شاخص بهداشتی و همچنین بخشی از میکروفلور ماهی تازه می‌باشند. نتایج جدول ۴، تأثیر خاصیت ضدمیکروبی عصاره و نانومولسیون عصاره زرشک بر انتروباکتریاسه‌ها را نشان داد. همچنین در بررسی باکتری‌های مزوفیل در روز ۹ میزان این باکتری‌ها درنمونه شاهد بیشتر از ۷ Log CFU /g بودند که بیشتر از حداکثر محدوده توصیه شده در ماهی خام است. نتایج کاهش شمارش باکتری‌ها و در نتیجه افزایش زمان ماندگاری در نمونه‌های تیمار شده با عصاره‌ها، تأیید تأثیر معنی‌دار عصاره گیاهی به کار برده شده به عنوان ترکیب ضد باکتریایی می‌باشد (Perricone *et al*., 2015). Sayadi و همکاران (۲۰۲۱)، نیز گزارش کردند استفاده از عصاره زرشک سبب کاهش بار میکروبی گوشت بوقلمون در یخچال شد. این محققان علت این امر را به حضور ترکیبات فنولی و آلکالوئیدی موجود در عصاره زرشک گزارش کردند.

نتیجه گیری

مطالعه حاضر به منظور بررسی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریالی نانومولسیون عصاره زرشک پرداخته شد. در مجموع سیزده ترکیب فنولی عصاره زرشک با HPLC شناسایی شد. نانو امولسیون‌ها PDI برابر ۰/۳۴۵ داشتند که نشان دهنده همگنی و پایداری خوب نانومولسیون‌های عصاره زرشک بود. همچنین نتایج پتانسیل اثر آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره و نانومولسیون زرشک بر روی باکتری‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* و لیستریامنوسیتوژنز) و باکتری‌های گرم منفی (*اشریشیاکلی* و *سالمونلا انتریتیدیس*) را تأیید کرد. همچنین افزایش پایداری اکسیداتیو (اکسیداسیون لیپید و اکسیداسیون پروتئین)، کاهش تشکیل ترکیبات نیتروژن فرار و نیز کاهش بار میکروبی فیله‌های ماهی دریای خزر پوشش‌دهی شده با عصاره و نانومولسیون عصاره زرشک نشان داده شد. نتایج این مطالعه تأیید کرد عصاره و نانومولسیون عصاره زرشک می‌تواند به عنوان یک نگهدارنده طبیعی مواد غذایی استفاده کرد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچگونه تعارض منافع برای اعلام ندارند.

منابع

Afroozandeh, Z., Rashidi Ranjbar, P., Khoobi, M., Forootanfar, H., Ameri, A., & Foroumadi, A. (2024). New Berberine Conjugates with Self-Assembly and Improved Antioxidant/Neuroprotection Properties: Effect of the Anchored Part on CMC, Shape and Size of the Nanomicelles. *Journal of Cluster Science*, 1-11.

Al-Askar, A. A., Bashir, S., Mohamed, A. E., Sharaf, O. A., Nabil, R., Su, Y., ... & Behiry, S. I. (2023). Antimicrobial efficacy and HPLC analysis of polyphenolic compounds in a whole-plant extract of Eryngium campestre. *Separations*, *10*(6), 362.

Ali, A., Wu, H., Ponnampalam, E. N., Cottrell, J. J., Dunshea, F. R., & Suleria, H. A. (2021). Comprehensive profiling of most widely used spices for their phenolic compounds through LC-ESI-QTOF-MS2 and their antioxidant potential. *Antioxidants*, *10*(5), 721.

Amiri, E., Aminzare, M., Azar, H. H., & Mehrasbi, M. R. (2019). Combined antioxidant and sensory effects of corn starch films with nanoemulsion of Zataria multiflora essential oil fortified with cinnamaldehyde on fresh ground beef patties. *Meat Science*, *153*, 66-74.

Ananingsih, V. K., Pratiwi, A. R., Soedarini, B., & Putra, Y. A. S. (2024). Formulation of nanoemulsion parijoto fruit extract (Medinilla Speciosa) with variation of tweens stabilizers. *Frontiers in Nutrition*, *11*, 1398809.

Ansarifar, E., & Moradinezhad, F. (2022). Encapsulation of thyme essential oil using electrospun zein fiber for strawberry preservation. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, *9*, 1-11.

Azari, A., Ahari, H., & Anvar, A. A. (2022). Increased shelf life of Oncorhynchus mykiss (Rainbow trout) through Cu-Clay nanocomposites. *Food Science and Biotechnology*, *31*(3), 295-309.

Bhardwaj, D., & Kaushik, N. (2023). HPLC–DAD fingerprinting coupled with chemometric analysis can successfully differentiate Indian Berberis species and its plant parts. *3 Biotech*, *13*(7), 254.

Cedillo-Olivos, A. E., Juárez-Chairez, M. F., Cid-Gallegos, M. S., Sánchez-Chino, X., & Jiménez-Martínez, C. (2024). Natural preservatives used in foods: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-17.

da Silva, B. D., do Rosário, D. K. A., Neto, L. T., Lelis, C. A., & Conte-Junior, C. A. (2023). Antioxidant, antibacterial and antibiofilm activity of nanoemulsion-based natural compound delivery systems compared with non-nanoemulsified versions. *Foods*, *12*(9), 1901.

Dong, H., Xu, Y., Zhang, Q., Li, H., & Chen, L. (2024). Activity and safety evaluation of natural preservatives. *Food Research International*, 114548.

Efendi, R., Harahap, N. A., Ayu, D. F., Saputra, E., & Nopiani, Y. (2023, September). The shelf life of smoked catfish coated with edible coating chitosan with an addition horticultural product (red ginger and red galangal) essential oil using the acceleration method. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 1241, No. 1, p. 012084). IOP Publishing.

El Hamdaoui, A., Msanda, F., Boubaker, H., Leach, D., Bombarda, I., Vanloot, P., ... & El Mousadik, A. (2018). Essential oil composition, antioxidant and antibacterial

activities of wild and cultivated Lavandula mairei Humbert. *Biochemical Systematics and Ecology*, *76*, 1-7.

El-Sayed, S. M., & El-Sayed, H. S. (2021). Antimicrobial nanoemulsion formulation based on thyme (Thymus vulgaris) essential oil for UF labneh preservation. *Journal of Materials Research and Technology*, *10*, 1029-1041.

Erkan, N., Özden, Ö., Alakavuk, D. Ü., Yildirim, Ş. Y., & İnuğur, M. (2006). Spoilage and shelf life of sardines (Sardina pilchardus) packed in modified atmosphere. *European Food Research and Technology*, *222*, 667-673.

Fallah, A. A., Sarmast, E., Dehkordi, S. H., Isvand, A., Dini, H., Jafari, T., ... & Khaneghah, A. M. (2022). Low-dose gamma irradiation and pectin biodegradable nanocomposite coating containing curcumin nanoparticles and ajowan (Carum copticum) essential oil nanoemulsion for storage of chilled lamb loins. *Meat Science*, *184*, 108700.

Ganesan, A. R., & Shanmugam, M. (2020). Isolation of phycoerythrin from Kappaphycus alvarezii: a potential natural colourant in ice cream. *Journal of Applied Phycology*, *32*, 4221-4233.

Gholamhosseinpour, A., Hashemi, S. M. B., & Jafarpour, D. (2023). Nanoemulsion of Satureja sahendica bornm essential oil: Antibacterial and antioxidant activities. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *17*(1), 317-323.

Homayoonfal, M., Mousavi, S. M., Kiani, H., Askari, G., Desobry, S., & Arab-Tehrany, E. (2021). Encapsulation of berberis vulgaris anthocyanins into nanoliposome composed of rapeseed lecithin: A comprehensive study on physicochemical characteristics and biocompatibility. *Foods*, *10*(3), 492.

Hedayatifard, M., Alinezhad, M. A., & Hashemi Karouei, M. (2017). Individual and combined effects of nisin-Z and sodium citrate on the chemical attributes and lactic acid, mesophyll and psychrophill bacteria communities of Caspian Kutum fillets (Rutilus frisii kutum) Stored at 4 ºC. *Aquatic Animals Nutrition*, *3*(2), 19-34.

Huss, H. H. (2007). *Assessment and management of seafood safety and quality* (No. 444). Daya Books.

Ibrahim, S. Y., Abd El-kader, S. A., Gomaa, W. M., Arab, W. S., & Elsabagh, R. (2024). Assessment of the potential impacts of garlic and/or sage essential oils on quality enhancement of chilled tilapia fish kofta. *Journal of Advanced Veterinary Research*, *14*(2), 282-285.

Idumah, C. I., Zurina, M., Ogbu, J., Ndem, J. U., & Igba, E. C. (2020). A review on innovations in polymeric nanocomposite packaging materials and electrical sensors for food and agriculture. *Composite Interfaces*.

Indumathi, M. P., Sarojini, K. S., & Rajarajeswari, G. R. (2019). Antimicrobial and biodegradable chitosan/cellulose acetate phthalate/ZnO nano composite films with optimal oxygen permeability and hydrophobicity for extending the shelf life of black grape fruits. *International journal of biological macromolecules*, *132*, 1112-1120.

Institute of Standards and Industrial Research of Iran [Internet]. (2024). Microbiology of food and animal feed - Enumeration of psychrophilic microorganisms - Test method. ISIRI no 2690. 1st.edition, Karaj: ISIRI; [in Persian]. Available from: https://standard.inso.gov.ir

Institute of Standards and Industrial Research of Iran [Internet]. (2015). Microbiology of the food chain —Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Part 2:

Colony count at 30 °C by the surface plating technique. ISIRI no 5272-2. 1st.edition, Karaj: ISIRI; [in Persian]. Available from: https://standard.inso.gov.ir

Jaberi, R., Kaban, G., & Kaya, M. (2020). The effect of barberry (Berberis vulgaris L.) extract on the physicochemical properties, sensory characteristics, and volatile compounds of chicken frankfurters. *Journal of Food Processing and Preservation*, *44*(7), e14501.

Jawed Khan, M., Hafeez, A., & Aftab Siddiqui, M. (2023). Nanocarrier based delivery of berberine: a critical review on pharmaceutical and preclinical characteristics of the bioactive. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *24*(11), 1449-1464.

Khanzadi, S., Keykhosravy, K., Hashemi, M., & Azizzadeh, M. (2020). Alginate coarse/nanoemulsions containing Zataria multiflora Boiss essential oil as edible coatings and the impact on microbial quality of trout fillet. *Aquaculture Research*, *51*(3), 873-881.

Lima, M. D. C., De Sousa, C. P., Fernandez-Prada, C., Harel, J., Dubreuil, J. D., & De Souza, E. L. (2019). A review of the current evidence of fruit phenolic compounds as potential antimicrobials against pathogenic bacteria. *Microbial pathogenesis*, *130*, 259-270.

Maghami, M., Motalebi, A. A., & Anvar, S. A. A. (2019). Influence of chitosan nanoparticles and fennel essential oils (Foeniculum vulgare) on the shelf life of Huso huso fish fillets during the storage. *Food science & nutrition*, *7*(9), 3030-3041.

Mezhoudi, M., Salem, A., Abdelhedi, O., Fakhfakh, N., Mabrouk, M., Khorchani, T., ... & Zouari, N. (2022). Development of active edible coatings based on fish gelatin enriched with Moringa oleifera extract: Application in fish (Mustelus mustelus) fillet preservation. *Food Science & Nutrition*, *10*(11), 3979-3992.

Mehrabi, E., Bonyadian, M., & Fallah, A. A. (2024). Investigating the Effect of Chitosan Coating Along with Ginger Essential oil on Shelf life of Salmon Fish in Refrigerator Temperature. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, *20*(4), 447-463.

Maghami, M., Motalebi, A. A., & Anvar, S. A. A. (2019). Influence of chitosan nanoparticles and fennel essential oils (Foeniculum vulgare) on the shelf life of Huso huso fish fillets during the storage. *Food science & nutrition*, *7*(9), 3030-3041.

Monteiro, M. L., Mársico, E. T., Rosenthal, A., & Conte-Junior, C. A. (2019). Synergistic effect of ultraviolet radiation and high hydrostatic pressure on texture, color, and oxidative stability of refrigerated tilapia fillets. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *99*(9), 4474-4481.

Monteiro, M. L. G., Mársico, E. T., & Conte-Junior, C. A. (2020). Application of active packaging in refrigerated rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fillets treated with UV-C radiation. *Applied Sciences*, *10*(17), 5787.

Mozaffarzogh, M., Misaghi, A., Shahbazi, Y., & Kamkar, A. (2020). Evaluation of probiotic carboxymethyl cellulose-sodium caseinate films and their application in extending shelf life quality of fresh trout fillets. *Lwt*, *126*, 109305.

Mutlu, N. (2023). Effects of grape seed oil nanoemulsion on physicochemical and antibacterial properties of gelatin-sodium alginate film blends. *International Journal of Biological Macromolecules*, *237*, 124207.

Nguyen, H. L., Tran, T. H., Hao, L. T., Jeon, H., Koo, J. M., Shin, G., ... & Oh, D. X. (2021).

Biorenewable, transparent, and oxygen/moisture barrier nanocellulose/nanochitin-based coating on polypropylene for food packaging applications. *Carbohydrate polymers*, *271*, 118421.

Och, A., Olech, M., Bąk, K., Kanak, S., Cwener, A., Cieśla, M., & Nowak, R. (2023). Evaluation of the antioxidant and anti-lipoxygenase activity of Berberis vulgaris L. leaves, fruits, and stem and their LC MS/MS polyphenolic profile. *Antioxidants*, *12*(7), 1467.

Omar, A. A. A. H., Gad, M. F., Abdelhafez, H. M., Ebrahem Mersal, A. T., & Mossa, A. T. H. (2023). Phytochemical Study, Antioxidant Potential and Preparation of a Clove Nanoemulsion Loaded with Pomegranate Peel Extract. *Egyptian Journal of Chemistry*, *66*(13), 21-37.

Pandey, V. K., Srivastava, S., Dash, K. K., Singh, R., Dar, A. H., Singh, T., ... & Kovacs, B. (2024). Bioactive properties of clove (Syzygium aromaticum) essential oil nanoemulsion: A comprehensive review. *Heliyon*.

Parseghian, L., Kahrarian, N., Arabanian, A. S., Alvand, Z. M., Massudi, R., Rahimi, M., & Rafati, H. (2024). Berberine-loaded nanoemulsions as a natural food preservative; the impact of femtosecond laser irradiation on the antibacterial activity. *Heliyon*, *10*(17).

Perricone, M., Arace, E., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. (2015). Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. *Frontiers in microbiology*, *6*, 76.

Rezaei Savadkouhi, N., Ariaii, P., & Charmchian Langerodi, M. (2020). The effect of encapsulated plant extract of hyssop (Hyssopus officinalis L.) in biopolymer nanoemulsions of Lepidium perfoliatum and Orchis mascula on controlling oxidative stability of soybean oil. *Food Science & Nutrition*, *8*(2), 1264-1271.

Sayadi, M., Langroodi, A. M., & Pourmohammadi, K. (2021). Combined effects of chitosan coating incorporated with Berberis vulgaris extract and Mentha pulegium essential oil and MAP in the shelf life of turkey meat. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *15*, 5159-5169.

Shekarabi, S. P. H., Mehrgan, M. S., Ramezani, F., Dawood, M. A., Van Doan, H., Moonmanee, T., ... & Kari, Z. A. (2022). Effect of dietary barberry fruit (Berberis vulgaris) extract on immune function, antioxidant capacity, antibacterial activity, and stress-related gene expression of Siberian sturgeon (Acipenser baerii). *Aquaculture Reports*, *23*, 101041.

Soutelino, M. E. M., de Paiva Vieira, G., Goulart, M. B., Miranda, K. C., da Conceição, R. P., Pimentel, T. C., ... & da Silva Rocha, R. (2024). Natural food dyes on dairy products: A critical approach between 2012-2023 literature regarding the technological and functional aspects, health benefits and future trends. *Trends in Food Science & Technology*, 104370.

Suleria, H. A., Barrow, C. J., & Dunshea, F. R. (2020). Screening and characterization of phenolic compounds and their antioxidant capacity in different fruit peels. *Foods*, *9*(9), 1206.

Tacer-Tanas, S., Oguzhan-Yildiz, P., & Arslan, M. (2024). How fillet quality changes in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fed diets supplemented with barberry (Berberis vulgaris) fruit extract. *Journal of Food Composition and Analysis*, 106986.

Taouzinet, L., Djaoudene, O., Fatmi, S., Bouiche, C., Amrane-Abider, M., Bougherra, H., ... &

Madani, K. (2023). Trends of nanoencapsulation strategy for natural compounds in the food industry. *Processes*, *11*(5), 1459.

Topcu, K. C., & Gamze, U. G. U. R. (2024). Effect of Berberis vulgaris L. Extract on Beef Patties Quality Parameters. 10:1-16.

JFM

مجله میکروب شناسی مواد غذایی

Evaluation of antioxidant and antibacterial activity of barberry *(Berberis vulgaris)* extract Nano emulsion as a natural preservative in a food model

Behrouz Dast Peyman, Amir Shakerian[2], Zohreh Mashak[3*], Ebrahim Rahimi[1] and Reza Sharafati Chaleshtori[4]

[1] *Department of Food Hygiene, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran*
[2] *Research Center of Nutrition and Organic Products, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran*
[3] *Department of Food Hygiene, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.*
[4]*Research Center for Biochemistry and Nutrition in Metabolic Disease, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran*

Corresponding Author: Mashak@Kiau.ac.ir

Abstract

Recently, consumer preference has been more toward foods preserved with natural plant preservatives (such as extracts and essential oils). In this study, the potential of antioxidant and antibacterial activity of barberry extract nano emulsions was evaluated. A total of thirteen phenolic compounds were identified in the extract. The antioxidant properties of barberry extract and nano emulsion by DPPH and ATBS methods were 0.02-2.14 mg/g and 0.02 -2.10 mg/g, respectively. Also, the antibacterial properties on gram positive (*Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*) and gram-negative bacteria (*Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*) were confirmed. The most resistant and sensitive pathogens to barberry extract and it nano emulsion were *Staphylococcus* aureus and *Salmonella enteritidis*, respectively. In the following, the oxidative (lipid and protein oxidation) and antibacterial potential of Nano emulsions was evaluated on Caspian Sea fish fillets as a perishable food model. The results showed increased oxidative stability, lower formation of volatile nitrogen compounds, and reduced microbial load of coated fish fillet. Thus, the barberry extract Nano emulsion was able to maintain the quality of fish fillets in the refrigerator for 6 days. In summary, it can be said that the barberry extract Nano emulsion as a natural preservative is recommended to increase the shelf life and maintain the quality of food.

Key words: Nano emulsion, Food Shelf Life, Natural Preservatives, *Berberis vulgaris*, *Rutilus frisii*