

Study of carboxymethyl cellulose-based edible coatings containing nanoliposomes, free *Rosemarinus officinalis* essential oil on the microbial, chemical properties of rainbow trout

Noei, F.¹, Mirzaei, H.^{*2}, Anarjan, N.³, Javadi, A.⁴, A. Behnajady, M⁵.

1. Ph.D. Graduate of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
2. Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
3. Assistant Professor, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
- 4- Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
5. Professor, Department of Chemistry, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

*Corresponding author's email: hmirzaei@iaut.ac.ir

(Received: 2024/2/4 Accepted: 2024/4/22)

Abstract

In this study, we examined the effects of free and microencapsulated liposomes containing rosemary essential oil (REO) on the microbiological and physicochemical properties of rainbow trout meat coated with carboxymethyl cellulose (CMC). The essential oil was extracted using a Clevenger, and nanoliposomes of the essential oil were produced through a combination of thin-layer hydration and ultrasound waves. Gas chromatography-mass spectrometry analysis revealed that the main components of REO were compounds 1-8, cineole (30.03%), and alpha-pinene (13.09%). Antioxidant activities measured by the DPPH method were 72.21% for free REO and 71.8% for microencapsulated REO. Both types of REO nanoliposomes were separately applied with CMC to create an edible coating for rainbow trout meat, which was stored at 4°C for 15 days. Our findings on the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of REO and its nanoliposomes against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* showed that REO nanoliposomes had a significantly lower effect compared to free REO ($p < 0.05$). Moreover, the growth of live bacteria, psychotropic bacteria, lactic acid bacteria, and enteric bacteria in samples coated with CMC and REO nanoliposomes was significantly reduced compared to other samples and was lower than in samples with free essential oil ($p < 0.05$). Overall, using CMC with either free REO or REO nanoliposomes effectively reduces the microbial and chemical deterioration of rainbow trout during storage.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Rosemary essential oil, Nanoliposome, Rainbow trout, Length of storage period, Quality

«مقاله پژوهشی»

DOI: 10.71876/jfh.2024.4021443

اثر پوشش‌های خوراکی مبتنی کربوکسی متیل سلولز حاوی نانولیپوزوم و فرم آزاد اسانس رزماری بر ویژگی‌های میکروبی و شیمیایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در طول دوره نگهداری

اثر ضد میکروبی نانولیپوزوم‌های اسانس رزماری در گوشت ماهی

فرزاد نوعی^۱، حمید میرزایی^{۲*}، نویده انرجان^۳، افشین جوادی^۴، محمدعلی به‌نژادی^۵

۱. دانش‌آموخته دکتری بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۲. استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۳. استادیار گروه مهندسی شیمی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۴. استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۵. استاد گروه شیمی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

*نویسنده مسئول مکاتبات: hmirzaei@iaut.ac.ir

(دریافت مقاله: // پذیرش نهایی: //)

چکیده

در این پژوهش تأثیر دو فرم آزاد و نانولیپوزوم اسانس رزماری بر ویژگی‌های میکروبی و شیمیایی گوشت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پوشش داده‌شده با کربوکسی متیل سلولز (CMC) مورد بررسی قرار گرفت. اسانس با کمک دستگاه کلونجر استحصال گردید. نانولیپوزوم‌های اسانس با استفاده از روش ترکیبی هیدراسیون لایه نازک و امواج فراصوت تولید شد. نتایج حاصل از کروماتوگرافی گاز-طیف‌سنج جرمی نشان داد که بیشترین ترکیب موجود در اسانس رزماری مربوط به ترکیب ۸۱ سینئول و آلفا-پینن به ترتیب به میزان ۳۰/۰۳ و ۱۳/۰۹ درصد بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی فرم آزاد و نانولیپوزوم اسانس رزماری به روش DPPH به ترتیب ۷۲/۲۱ و ۷۱/۸ درصد به دست آمد. در ادامه، اسانس و نانولیپوزوم رزماری هرکدام به صورت جداگانه به همراه CMC جهت تولید پوشش خوراکی گوشت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان طی دوره نگهداری (۱۵ روز در ۴ درجه سلسیوس) مورد استفاده قرار گرفت. حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی نانولیپوزوم رزماری بر *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به طور معنی‌دار کمتر از اسانس آزاد بود ($p < 0.05$). شمارش کلی باکتری‌های زنده، سرمادوست، اسیدلاکتیک و انتروباکتریاسه در نمونه‌های پوشش یافته شده با CMC همراه با اسانس و نانولیپوزوم رزماری به طور معنی‌دار ($p < 0.05$) کمتر از سایر نمونه‌ها بود و در نمونه‌های حاوی نانولیپوزوم به طور معنی‌دار کمتر از نمونه‌های حاوی اسانس آزاد بود ($p < 0.05$). در مجموع می‌توان گفت که استفاده از CMC همراه با اسانس آزاد و بخصوص همراه با نانولیپوزوم اسانس رزماری در طول دوره نگهداری، افت کیفیت میکروبی و شیمیایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را به طور معنی‌دار کاهش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: اسانس رزماری، نانولیپوزوم، قزل‌آلای رنگین‌کمان، طول دوره نگهداری، کیفیت

۱۲ الی ۱۵ ساعت در دمای محیط (۲۵ درجه

سلسیوس) نگهداری نمود، زیرا به سرعت دچار فساد میکروبی و شیمیایی می‌گردد (Shakila et al, 2005).

پوشش‌های خوراکی بیوپلیمرهای مواد هستند که می‌توانند کیفیت محصولات گوشتی را بهبود ببخشند و گاهی اوقات سبب افزایش کیفیت می‌گردند. این بیوپلیمرها می‌توانند به‌عنوان یک عامل بسیار مهم برای کاربردهای بسته‌بندی مدرن مورد استفاده قرار گیرند (Mojaddar Langroodi et al. 2018). پوشش‌ها و فیلم‌های خوراکی دارای خواص مکانیکی مناسب دارای اثرات محافظت‌کنندگی در برابر اکسیژن، رطوبت و انتقال چربی هستند (Ebrahimi hemmati kaykha et al, 2021). پوشش‌های خوراکی را می‌توان از مواد مختلفی از جمله پلی‌ساکاریدها، لیپیدها و پروتئین‌ها تهیه نمود. پلی‌ساکاریدها، مانند کربوکسی متیل سلولز (CMC) (Carboxy Methyl Cellulose)، مواد اولیه پوشش مورد استفاده در صنایع غذایی را تشکیل می‌دهند (Rezaeifar et al, 2020).

مواد نگهدارنده سنتتیک اغلب در بین مصرف‌کنندگان به دلیل اثرات مضرشان محبوبیتی ندارند. امروزه ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی به‌خوبی شناخته شده است و تقاضای مصرف‌کنندگان برای افزودنی‌های طبیعی و کاربردی افزایش یافته است (Noshad et al, 2020). گیاهان دارویی دارای ترکیبات مفید و با ارزش زیادی هستند که این ترکیبات سبب افزایش کیفیت مواد غذایی می‌گردد. گیاهان دارویی از گذشته مورد توجه جوامع بشری بوده است به‌گونه‌ای که تمامی قسمت‌های مختلف آن‌ها (برگ، ساقه، ریشه، پوست و میوه) برای مصارف دارویی و غذایی مورد استفاده می‌گرفته است

کیفیت و ایمنی مواد غذایی از مهم‌ترین اهداف تولیدکنندگان و تقاضای مصرف‌کنندگان می‌باشند. زیرا مواد غذایی به دلیل داشتن مواد مغذی فراوان به سرعت دچار فساد شده و می‌توانند باعث بروز بیماری‌های عفونی و نیز مسمومیت غذایی گردند (Jooyandeh et al, 2022). گوشت تازه یکی از مواد غذایی فسادپذیر است که حتی در شرایط نگهداری در یخچال نیز به سرعت دچار فساد می‌شود. این ماده غذایی با ارزش علاوه بر فساد میکروبی، به دلیل پایداری کم اکسیداتیو و ترکیب خاص، به اکسیداسیون نیز حساس است (Noshad et al, 2021). باین‌حال، گوشت عنصر مهمی از رژیم غذایی انسان است و طیف گسترده‌ای از مواد مغذی را فراهم می‌کند که نقشی حیاتی در تکامل انسان ایفا می‌نماید. در سال‌های اخیر قیمت گوشت قرمز در ایران به دلیل کمبود عرضه به شدت افزایش یافته است (Jooyandeh et al, 2022). از این رو تمایل مردم به مصرف گوشت سفید افزایش یافته است. مواد غذایی دریایی به دلیل داشتن پروتئین‌ها، ویتامین‌های محلول در چربی و اسیدهای چرب غیراشباع امگا ۳ و نسبت به سایر مواد غذایی دیگر از اهمیت زیادی در رژیم غذایی برخوردار است (Perez-Alonso et al, 2004). یکی از مشکلات این دسته از مواد غذایی فساد-پذیر بالای آن است و معمولاً سریع‌تر از مواد غذایی گوشتی دیگر دچار فساد می‌گردند. همان‌گونه که اشاره شد در غذاهای دریایی، مقادیر زیادی پروتئین و اسیدهای چرب وجود دارد که این ترکیبات رشد باکتری و اکسیداسیون لیپید را تسهیل می‌کنند (Hosseini and Gómez-Guillén, 2018). بنابراین نمی‌توان مواد غذایی دریایی به‌ویژه ماهی را بیش از

نانولیپوزوم‌ها نانوساختارهایی هستند که قادر هستند یک لایه محافظتی را ایجاد نمایند و با به دام انداختن ترکیبات آب‌دوست و آب‌گریز از تجزیه این مواد جلوگیری نمایند. با توجه به این که نانولیپوزوم‌ها دارای خواص غیر سمی و سازگار با محیط‌زیست هستند در این پژوهش اثر پوشش خوراکی بر پایه کربوکسی متیل سلولز حاوی فرم آزاد و نانولیپوزوم اسانس رزماری بر ویژگی‌های میکروبی و شیمیایی گوشت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مدت‌زمان ۱۵ روز در دمای ۴ درجه سلسیوس مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

- مواد

در این پژوهش فسفولیپید (لسیتین حاصل از تخم‌مرغ)، کلسترول و گلیسرول از شرکت مرک، آلمان تهیه گردید. DPPH مورد استفاده از شرکت آلدریچ، آلمان خریداری شد. تمامی حلال‌ها و آب دیونیزه شده مربوط به شرکت دکتر مجلالی (تهران، ایران) بود. سویه‌های میکروبی *اشریشیا کلی* (ATCC 25922) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923) از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی (PTCC، تهران، ایران) تهیه شدند. محیط‌های کشت استفاده شده در این پژوهش شامل نوترینت برات، مولر هیتون آگار، آم‌ار اس آگار و آر بی جی آگار از شرکت (مرک-آلمان) بود. گیاه رزماری از فروشندگان محلی تهیه و توسط متخصصین مربوطه شناسایی شد.

(Ebrahimi hemmati kaykha et al, 2020). یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی که از دیرباز مورد توجه بسیاری از پژوهشگران و محققان قرار گرفته است گیاه رزماری است. گیاه رزماری با نام علمی *Rosmarinus officinalis L* از خانواده نعناعیان است (Ebrahimi hemmati kaykha et al, 2020, Mavalizadeh et al, 2022). به‌طور کلی این گیاه بومی سواحل مدیترانه است اما به دلیل داشتن خواص درمانی و تزئینی بسیار در مناطق مختلفی از جهان از جمله ایران کشت می‌گردد. از جمله خواص مهم این گیاه می‌توان به خواص آنتی‌اکسیدانی آن اشاره نمود که این خواص را به ترکیبات دی‌ترپن‌های فنلی نسبت داده‌اند. بیشترین گزارشی که در مورد میزان دی‌ترپن‌ها موجود در این گیاه گزارش شده است اسید کارنوزول، رزمانول، کارنوسیک، اپیرزمانول، ایزورزمانول است، اما با وجود مزایای ذکر شده، استفاده از اسانس گیاهان محدودیت‌هایی مانند ناپایداری، تبخیر و تجزیه در مقابل شرایط محیطی و شیمیایی (نور، اکسیژن، رطوبت، pH) را دارد (Ebrahimi hemmati kaykha et al, 2022, Mavalizadeh et al, 2022). از طرف دیگر اسانس‌های گیاهی دارای عطر و طعم شدیدی هستند و همین علت سبب شده است که از این ترکیبات نتوان به‌صورت مستقیم در مواد غذایی استفاده کرد (Noshad et al, 2022). در روشی جهت رفع این مشکلات ماده مؤثره در محفظه یا پوسته کوچک به‌اندازه نانو بسته‌بندی می‌گردد. این پوسته از سوی ترکیب شیمیایی را از آسیب عوامل خارجی محافظت می‌کند (Alejandro and Rubiales 2009).

-تهیه اسانس

حلال زدایی و تشکیل فیلم نازک در انتهای بالن ته گرد با استفاده از روتاری با دور RPM ۸۰ در دمای ۴۵ درجه سلسیوس انجام گرفت. لایه‌ی نازک تشکیل شده توسط ۵۰ میلی‌لیتر آب هیدراته شد. سپس محلول به مدت ۳۰ دقیقه توسط همزن مغناطیس هم زده شد. در نهایت محلول حاصل درون بشر ریخته شده و در حمام آب یخ قرار داده شد و به دفعات (۳، ۲ و ۱ مرتبه) به مدت ۵ دقیقه تحت پروب فراصوت (توان ۷۰ درصد و سیکل ۵/۰) و ۵ دقیقه همزن مغناطیسی قرار گرفت. به این صورت لیپوزوم‌های تک لایه‌ای در مقیاس نانومتریک تولید شدند (Mohammadi et al., 2014).

- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس رزماری

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس رزماری از روش میکرو برات دایلوژن در محیط کشت مولر هینتون برات و از پلیت‌های ۹۶ خانه استفاده شد. در این روش از مواد مورد بررسی (اسانس و نانولیپوزوم) محلول استوک با غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با استفاده از محیط کشت نوترینت برات تهیه شد. سری رقتی از نمونه‌ها در نوترینت برات با حجم ۱۰۰ میکرولیتر تهیه گردید. سوسپانسیونی از کشت تازه باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی در سرم فیزیولوژی تهیه و کدورت آن‌ها با لوله‌ی نیم مک‌فارلند تنظیم شد. سوسپانسیون‌های حاصل به نسبت ۱:۱۰۰ با نوترینت برات رقیق و به هر چاهک میزان ۱۰۰ میکرولیتر اضافه شد. پس از گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت چاهک‌ها از لحاظ داشتن کدورت بررسی شده و اولین چاهک بدون کدورت به عنوان حداقل غلظت مهارکننده‌ی رشد تعیین شد. سپس از هر یک از غلظت‌های پایین‌تر از حداقل غلظت مهارکنندگی، میزان

اسانس مورد استفاده در این پژوهش با کمک دستگاه کلونجر (ساخت شرکت Heidolph آلمان مدل laborota 4003) تهیه گردید. برای این منظور ۱۰۰ گرم از گیاه رزماری پودر شده را در بالن ۲۰۰۰ میلی‌لیتر ریخته و به آن به نسبت ۱:۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و عمل استخراج اسانس در مدت زمان ۳ ساعت انجام شد. پس از جمع‌آوری، اسانس مورد نظر درون ظروف شیشه‌ای تیره‌رنگ استریل در دمای ۴ درجه سلسیوس و به دور از نور جهت آزمایش‌های مختلف نگهداری شد (Jafari sales and Pashazadeh, 2020).

-شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس رزماری با استفاده از GC-MS

برای شناسایی ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس رزماری، از دستگاه‌های کروماتوگرافی گازی (Agilent 7890 Technologies A، آمریکا) و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنجی جرمی (Agilent 5975 C، آمریکا) استفاده گردید (Ebrahimi Hemmati Kaykha et al, 2022).

-تهیه نانولیپوزوم

نانولیپوزوم‌های اسانس رزماری با استفاده از روش ترکیبی هیدراسیون لایه نازک و امواج فراصوت بر اساس روش تشریح شده در تحقیق دیگری با اندکی تغییرات تولید گردید (Mohammadi et al., 2014). فرآیند تولید لیپوزوم شامل انحلال لسیتین سویا در مقدار (۲/۴ گرم) و کلسترول در مقادیر (۰/۳ گرم) و گلیسرول در مقادیر (۰/۳ گرم) و (۰/۲ گرم) اسانس رزماری در ترکیبی از حلال‌های متانول و دی‌کلرومتان به نسبت مساوی بود. سپس محلول به مدت ۳۰ دقیقه توسط همزن مغناطیسی هم زده شد. در مرحله‌ی بعد،

اتاق خشک شدند. سپس نانولیپوزوم‌ها با استفاده از دستگاه TEM (مدل Hitachi, Japan) با ولتاژ ۲۰۰ کیلوولت مورد بررسی قرار داده شدند (Hu et al., 2015).

- روش تهیه پوشش خوراکی

برای تهیه پوشش‌های خوراکی کربوکسی متیل سلولز یک گرم پودر کربوکسی متیل سلولز به ۹۸ میلی لیتر آب مقطر اضافه گردید. سپس ۱ میلی لیتر گلیسرول به عنوان پلاستی سایزر به محلول اضافه شد. برای حل بهتر کربوکسی متیل سلولز محلول حاصله به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از آماده شدن محلول مورد نظر به نمونه‌هایی که حاوی اسانس رزماری بودند ۰/۴ درصد اسانس اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط (۲۵ درجه سلسیوس) توسط همزن مغناطیسی هم زده شدند. همچنین برای تهیه پوشش‌های خوراکی حاوی نانولیپوزوم اسانس رزماری به محلول اولیه ۰/۴ درصد نانولیپوزوم اسانس رزماری اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه با استفاده از همزن، هم زده شد. در مرحله بعدی قطعات تازه برش داده شده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به مدت ۱ دقیقه به روش غوطه‌وری در هر یک از پوشش‌های تهیه شده قرار داده شدند. پس از خروج قطعات گوشت به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس خشک شدند. در نهایت قطعات پوشش دهی شده جهت انجام آزمون‌های بعدی به مدت ۱۵ روز در یخچال در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند (Raeisi et al., 2014). فرمولاسیون مربوط به پوشش‌های خوراکی در جدول ۱ نشان داده شده است.

۵ میکرولیتر برداشته و در پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار، کشت سطحی انجام داده و مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. سپس اولین غلظتی که در آن هیچ‌گونه باکتری رشد نکرده بود به عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد (Ebrahimi hemmati kaykha et al., 2020).

- ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس رزماری

فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس قبل و بعد از کپسولاسیون اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه، ۱/۵ میلی لیتر از هر نمونه با ۱/۵ میلی لیتر از محلول اتانولی DPPH (۰/۱۵ mM) به اتانول ۹۵ درصد اضافه شد. سپس محلول حاصل به صورت دستی به مدت ۲۰ ثانیه هم زده شد. مخلوط حاصل با دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شد. در نهایت جذب نوری نمونه‌های مورد نظر در دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۱۷ nm قرائت شد. مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Wu et al., 2003):

معادله ۱

$$I (\%) = \left[\frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}} \right] \times 100$$

$A_{control}$ جذب شاهد (حجم یکسانی از آب مقطر به جای نمونه با محلول DPPH مخلوط می‌شود) و A_{sample} جذب نمونه است.

- روش تعیین مورفولوژی نانولیپوزوم‌های رزماری

مورفولوژی نانولیپوزوم‌های رزماری بهینه‌سازی شده توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) ارزیابی شد. نمونه‌ها ابتدا با آب رقیق شدند و در دمای

جدول ۱- فرمولاسیون پوشش‌های خوراکی تهیه‌شده

نام	اسانس رزماری (درصد وزنی)	فسفولپید و پایدارکننده‌ها (درصد وزنی)	کربوکسی متیل سلولز (درصد وزنی)	گلیسرول (درصد وزنی)	آب (درصد وزنی)
Control	۰	۰	۰	۰	۱۰۰
CMC	۰	۰	۱	۱	۹۸
CMC+EO	۰/۴	۰	۱	۱	۹۷/۶
CMC+NEO	۰/۴	۳ درصد کل مواد	۱	۱	۹۴/۶

Control: فاقد پوشش، CMC: پوشش خوراکی بر پایه کربوکسی متیل سلولز، CMC+EO: پوشش خوراکی حاوی اسانس آزاد رزماری، CMC+NEO: پوشش خوراکی حاوی نانولیپوزوم‌های اسانس رزماری

- اندازه‌گیری pH

اکسیژن فعال در هر کیلوگرم نمونه محاسبه شد (AOAC, 2002).

برای اندازه‌گیری pH ابتدا ۱۰ گرم نمونه گوشت چرخ شده ماهی به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد. سپس برای اختلاط و همگن‌سازی بهتر نمونه‌ها، آن‌ها را درون شیکر لوله‌ای (Lab Dragon، مدل S-MX، ساخت آمریکا) قرار داده و مدت ۱ دقیقه همگن شدند. در نهایت، pH نمونه‌ها توسط pH متر (Metrohm، مدل ۸۲۶، ساخت سوئیس) در دمای ۲۵ درجه سلسیوس اندازه‌گیری شد (Raeisi et al., 2014).

- اندازه‌گیری پراکسید

- تعیین فعالیت ضد میکروبی

برای انجام آنالیز میکروبی در ابتدا ۱۰ گرم فیله ماهی به ۹۰ میلی‌لیتر آب پپتونه ۱ درصد اضافه شد و با کمک همزن به مدت ۱ دقیقه با ۲۰۰ دور در دقیقه مخلوط گردید. از محلول حاصله جهت تهیه رقت‌های متوالی و شمارش میکروارگانیزم‌های موردنظر در دما و محیط کشت هر ارگانیزم استفاده گردید. برای شمارش کلی باکتری‌ها و باکتری‌های سرمادوست از محیط کشت پلیت کانت آگار به ترتیب در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت و دمای ۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ روز استفاده شد. شمارش باکتری‌های اسیدلاکتیک و باکتری‌های اینترباکتریاسه با استفاده از روش پورپلیت و محیط کشت‌های آم آر اس آگار و آر بی جی آگار در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت انجام شد (Noshad et al., 2022).

- تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش تمامی آزمون‌ها در ۳ تکرار انجام و نتایج آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه آنالیز شدند. جهت مقایسه دو

برای اندازه‌گیری عدد پراکسید در ابتدا ۳ گرم از فاز لیپیدی نمونه‌های گوشت ماهی با ۲۵ میلی‌لیتر مخلوط اسید استیک + کلرو فرم (۴۰ درصد کلروفرم + ۶۰ درصد اسید استیک) و ۰/۵ میلی‌لیتر یدور پتاسیم اشباع به آن اضافه نموده و به مدت یک دقیقه توسط همزن با دور آهسته هم زده شد، سپس ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه نموده و مجدد با کمک همزن هم زده شد. در نهایت به آن ۰/۵ میلی‌لیتر نشاسته ۱ درصد به آن اضافه کرده و ید آزادشده توسط تیوسولفات ۰/۰۱ نرمال تیتر شد. در نهایت مقدار پراکسید را برحسب میلی

یافته‌های حاصل از شناسایی ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس رزماری با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنجی جرمی در جدول ۲ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود ۳۲ ترکیب در رزماری شناسایی شد که ۸۶/۹۶ درصد از اسانس‌های رزماری را تشکیل می‌دهند. ترکیبات عمده موجود در اسانس به ترتیب اوکالیپتول (۳/۰۳٪) و آلفا پینن (۶۹/۱۳٪) بودند.

به دوی گروه‌ها از آزمون تعقیبی دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. برای مقایسه میانگین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی مربوط به نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس و اسانس آزاد نسبت به باکتری‌های مورد آزمایش از آزمون آماری تی جهت‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد.

یافته‌ها

- ترکیبات شیمیایی اسانس رزماری

جدول ۲- ترکیبات شیمیایی اسانس رزماری

ردیف	ترکیبات	درصد	زمان بازداری (دقیقه)	ردیف	ترکیبات	درصد	زمان بازداری (دقیقه)
۱	Tricyclo	۰/۴۴	۹/۲۱	۱۷	1,6-Octadien-3-ol	۱/۲۲	۱۷/۰۷
۲	alpha.-Pinene	۱۳/۶۹	۱۳/۶۰	۱۸	ALPHA.-TERPINOLENE	۲/۰۸	۱۷/۵۱
۳	Camphene	۵/۰۲	۱۳/۸۷	۱۹	Bicyclo	۷/۳۷	۱۷/۶۷
۴	beta.-Pinene	۰/۵	۱۴/۰۵	۲۰	heptan-3-one	۱/۹۳	۱۷/۹۵
۵	beta.-Myrcene	۱	۱۴/۳۳	۲۱	Isoborneol	۰/۴۴	۱۸/۲۳
۶	beta.-Myrcene	۲/۷۴	۱۴/۶۷	۲۲	endo-Borneol	۰/۲۵	۱۸/۶۸
۷	3-Octanol	۰/۵	۱۴/۸۴	۲۳	Borneol	۰/۱۱	۱۸/۸۱
۸	Eucalyptol	۳۰/۰۳	۱۵/۰۵	۲۴	Cyclohexene	۶/۴۳	۱۹/۲۱
۹	1,3,6-Octatriene	۰/۱۲	۱۵/۱۷	۲۵	Bicyclo	۰/۸۶	۱۹/۳۳
۱۰	1,4-Cyclohexadiene	۰/۰۹	۱۵/۲۶	۲۶	D-Verbenone	۰/۹۷	۱۹/۷۸
۱۱	2-(1-methyl propyl)	۰/۱۶	۱۵/۳۴	۲۷	Bicyclo	۵/۰۷	۲۰/۱۵
۱۲	2-Furanmethanol	۰/۳۳	۱۵/۷۸	۲۸	Phenol	۰/۱	۲۱/۲۴
۱۳	Benzene	۰/۰۴	۱۶/۰۲	۲۹	4-Picolinium	۱/۲۸	۲۱/۵۶
۱۴	2-methyl-1-propenyl	۱/۲۹	۱۶/۲۹	۳۰	cis-Myrtanol	۰/۳۹	۲۱/۹۲
۱۵	4,7-Methano-1H-indene	۰/۹۱	۱۶/۴۴	۳۱	2,6-Octadien-1-ol	۰/۲۳	۲۱/۳۶
۱۶	2H-Indene	۲/۴۱	۱۶/۹۳	۳۲	2,6-Octadienal	۰/۱۳	۲۱/۶۵

- فعالیت ضد میکروبی

نتایج مربوط به حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی فرم آزاد و نانولیپوزوم اسانس رزماری در جدول ۳ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل

غلظت کشندگی نانولیپوزوم حاوی اسانس رزماری در هر دو باکتری گرم منفی و گرم مثبت به‌طور معنی‌دار کمتر از اسانس آزاد می‌باشد ($p < 0/05$) به‌عبارت‌دیگر قدرت ضد میکروبی نانولیپوزوم حاوی اسانس رزماری در هر دو باکتری گرم منفی و گرم مثبت به‌طور معنی‌دار

بیشتر از اسانس آزاد می‌باشد ($p < 0/05$). همچنین، نتایج نشان داد که مقادیر حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشندگی در باکتری‌های گرم منفی بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت است.

جدول ۳- نتایج مربوط به حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس و نانو لیپوزم گیاه رزماری

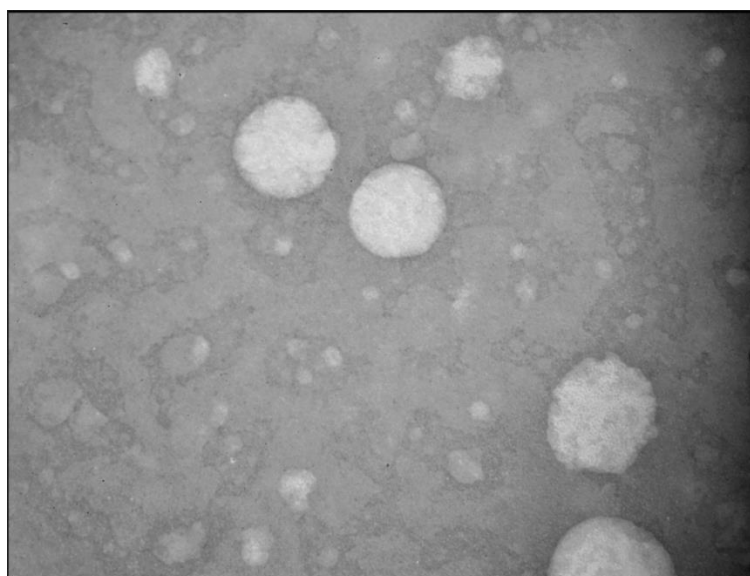
MBC		MIC		باکتری
اسانس رزماری	نانولیپوزوم حاوی اسانس رزماری	اسانس رزماری	نانولیپوزوم حاوی اسانس رزماری	
$20 \pm 0/01^*$	$14 \pm 0/0$	$15 \pm 0/2$	$18 \pm 0/03^*$	اشریشیا کلی
$10 \pm 0/02^*$	$5 \pm 0/01$	$5 \pm 0/04$	$10 \pm 0/01^*$	استافیلوکوکوس اورئوس

*: در هر ردیف و در هر کدام از MIC و MBC میانگین نانولیپوزوم به‌طور معنی‌دار کمتر از میانگین اسانس رزماری است ($p < 0/05$).

- مورفولوژی

به اینکه کلیه نمونه‌ها دارای شکل یکسانی بودند، یکی از تصاویر به‌عنوان نمونه نمایش داده شده است (شکل ۱).

مورفولوژی نانو لیپوزوم‌ها قبل از مرحله پوشش دهی به وسیله میکروسکوپ الکترونی اتمی مورد بررسی قرار گرفت و حضور لیپوزوم‌ها در تمام نمونه‌ها قابل مشاهده بود و تشکیل لیپوزوم‌ها به تأیید رسید. نظر



شکل ۱ - تصویر SEM نانولیپوزوم اسانس رزماری

-فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس رزماری

بی‌رنگ شدن آن می‌گردد. هر چه میزان قدرت آنتی‌اکسیدان نمونه بیشتر باشد کاهش رنگ سریع‌تر اتفاق می‌افتد که نشان‌دهنده آن است که قدرت آنتی‌اکسیدانی رابطه مستقیم با میزان کاهش رنگ

در طی فرآیند مربوط به DPPH آنتی‌اکسیدان‌های موجود در نمونه‌های مورد استفاده با رادیکال‌های DPPH وارد واکنش می‌شوند که سبب کم‌رنگ یا

محدوده ۶/۴۰ بود. به طور کلی، pH در طول مدت زمان نگهداری در تمام تیمارها افزایش یافت، همان گونه که در جدول ۴ نشان داده شده است بیشترین میزان تغییرات pH مربوط به نمونه شاهد است که در انتهای دوره نگهداری میزان pH به ۷/۸۰ رسید اما کمترین افزایش برای نمونه های تیمار شده کربوکسی متیل سلولز حاوی فرم آزاد و نانولیپوزوم اسانس رزماری مشاهده گردید.

دارد (kamkar et al., 2010). در این مطالعه میزان فعالیت آنتی اکسیدانی به روش DPPH اسانس و نانولیپوزوم رزماری به ترتیب ۷۲/۲۱ و ۷۱/۸ درصد به دست آمد.

- تغییرات pH در طی مدت زمان نگهداری

تغییرات مربوط به pH در تیمارهای مختلف پوشش دهی شده ماهی قزل آلائی رنگین کمان در طول نگهداری (۱۵ روز در دمای ۴ درجه سلسیوس) در جدول ۴ ارائه شده است. pH ولیه تمامی تیمارها در

جدول ۴- تغییرات pH نمونه کنترل و تیمار شده در طول مدت زمان نگهداری (۱۵ روز)

تیمار	۰	۳	۶	۹	۱۲	۱۵
Control	۶/۴۰ ± ۰/۱۰ ^{Ae}	۶/۵۵ ± ۰/۲۰ ^{ABd}	۶/۹۰ ± ۰/۱۱ ^{Cc}	۷/۳۰ ± ۰/۱۰ ^{Dbc}	۷/۵۰ ± ۰/۲۰ ^{Db}	۷/۸۰ ± ۰/۱۴ ^{Da}
CMC	۶/۴۰ ± ۰/۱۰ ^{Ae}	۶/۵۰ ± ۰/۱۰ ^{ABde}	۶/۷۰ ± ۰/۱۰ ^{Bd}	۷/۰۰ ± ۰/۲۰ ^{Cc}	۷/۳۰ ± ۰/۱۱ ^{Cb}	۷/۶۰ ± ۰/۲۰ ^{Ca}
CMC+EO	۶/۴۰ ± ۰/۱۰ ^{Ac}	۶/۴۰ ± ۰/۱۵ ^{Ac}	۶/۵۰ ± ۰/۰۳ ^{Abc}	۶/۶۰ ± ۰/۱۵ ^{Ab}	۶/۹۰ ± ۰/۱۳ ^{Aab}	۷/۱۲ ± ۰/۱۲ ^{Aa}
CMC+NEO	۶/۴۰ ± ۰/۱۰ ^{Ac}	۶/۴۵ ± ۰/۱۰ ^{Ac}	۶/۵۵ ± ۰/۲۰ ^{ABbc}	۶/۷۵ ± ۰/۰۵ ^{Bb}	۷/۱۰ ± ۰/۱۵ ^{Bab}	۷/۲۳ ± ۰/۱۰ ^{Ba}

Control: فاقد پوشش، CMC: پوشش خوراکی بر پایه کربوکسی متیل سلولز، CMC+EO: پوشش خوراکی حاوی اسانس آزاد رزماری، CMC+NEO: پوشش خوراکی حاوی نانولیپوزوم های اسانس رزماری

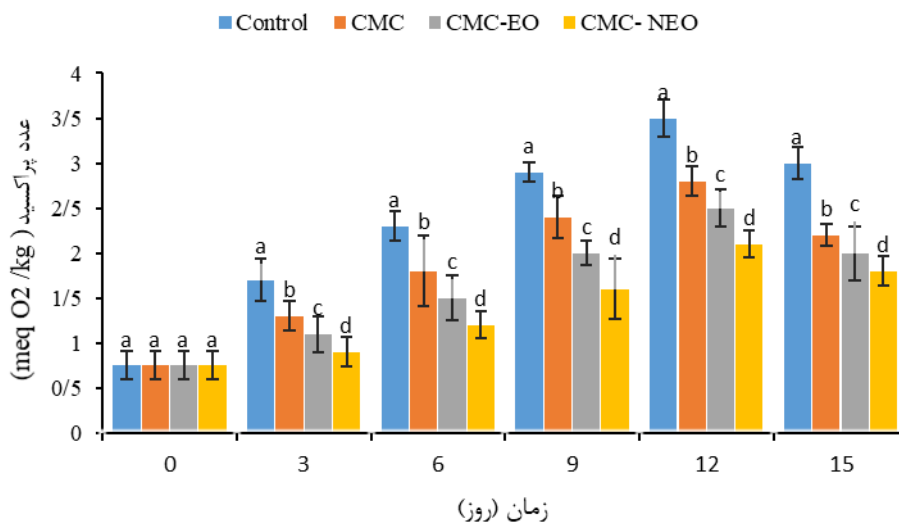
a, b, c و d: در هر ردیف تفاوت بین میانگین های دارای حروف غیرمشابه معنی دار می باشد ($p < 0/05$).

A, B, C و D: در هر ستون (هرکدام از روزهای مورد آزمایش) تفاوت بین میانگین های دارای حروف غیرمشابه معنی دار می باشد ($p < 0/05$).

افزایش و بعد از روز ۱۲ کاهش یافت. همان گونه که نتایج نشان می دهد بعد از روز اول در تمام روزهای دوره نگهداری میانگین مقدار عدد پراکسید در نمونه های پوشش شده با کربوکسی متیل سلولز حاوی نانولیپوزوم اسانس رزماری به طور معنی داری ($p < 0/05$) کمتر از سایر تیمارها بود.

- تغییرات پراکسید در طی مدت زمان نگهداری

نتایج مربوط به عدد پراکسید در نمونه های پوشش دهی شده فیله ماهی حاوی فرم آزاد و نانولیپوزوم اسانس رزماری و نمونه شاهد در طی مدت ۱۵ روز در نمودار ۱ آورده شده است. عدد پراکسید اولیه همه نمونه ها ۰/۷۵ میلی اکی والان بود که نشان دهنده قابل قبول بودن فیله های تازه است. میانگین عدد پراکسید تیمارها در طول ۱۲ روز دوره نگهداری



نمودار ۱- تغییرات مربوط به عدد پراکسید نمونه‌های فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان طی دوره نگهداری (۱۵ روز در دمای ۴ درجه سلسیوس)

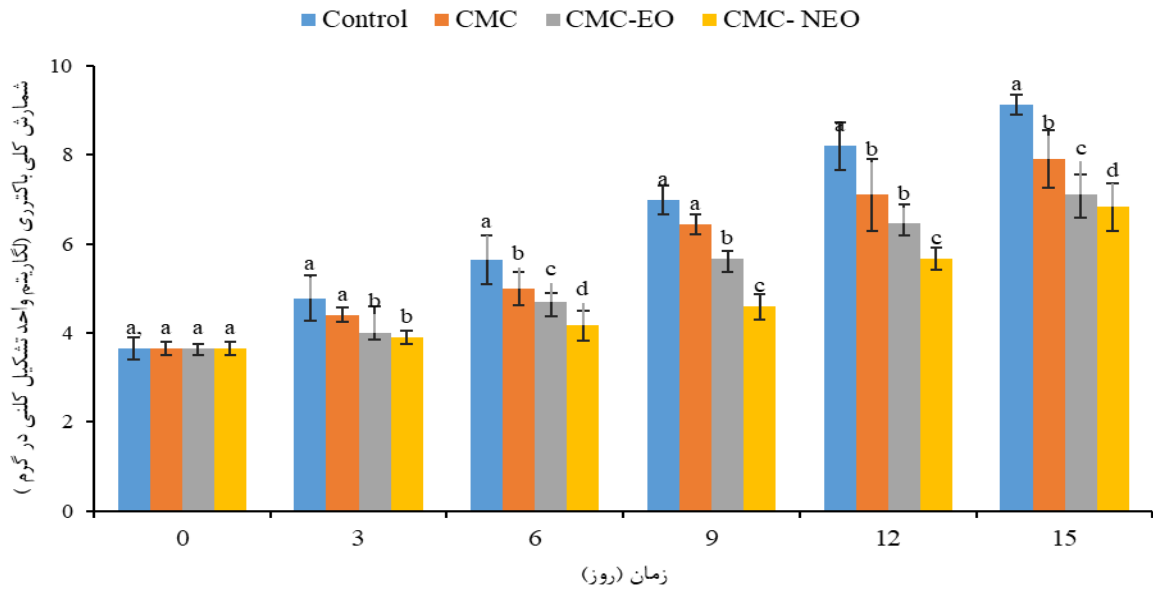
a, b, c, d: تفاوت بین ستون‌های دارای حروف غیرمشابه در هرکدام از روزهای مورد آزمایش معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$).

Control: فاقد پوشش، CMC: پوشش خوراکی بر پایه کربوکسی متیل سلولز، CMC+EO: پوشش خوراکی حاوی اسانس آزاد رزماری، CMC+NEO: پوشش خوراکی حاوی نانولیپوزوم‌های اسانس رزماری

-تغییرات میکروبی در طی مدت زمان نگهداری

تغییرات مربوط به شمارش کلی باکتری‌ها (TBC) (Total Bacterial Count) در نمونه‌های گوشت ماهی پوشش دهی شده در دمای ۴ درجه سلسیوس در نمودار ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان TBC در طول مدت زمان نگهداری ۱۵ روز در تمامی نمونه‌ها افزایش یافته است. همان‌طوری که مشاهده می‌شود شمارش کلی باکتری‌ها در تمام

نمونه‌های تیمار شده حاوی پوشش کربوکسیل متیل سلولز در طی مدت زمان نگهداری (۱۵ روز) به طور قابل معنی‌داری کمتر از شاهد ($p < 0.05$) و از طرف دیگر در نمونه‌های حاوی نانولیپوزوم‌های اسانس رزماری به‌طور معنی‌دار کمتر از سایر تیمارها بود ($p < 0.05$).



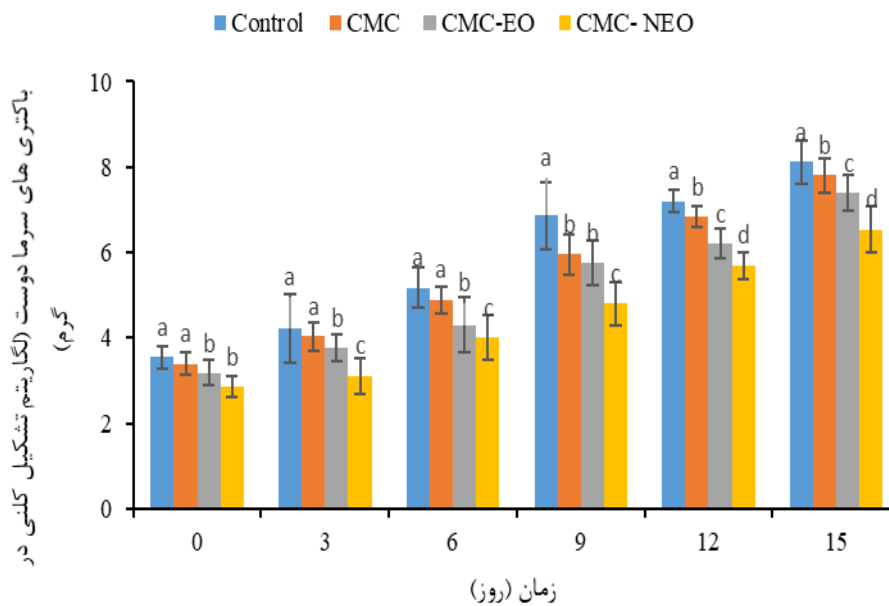
نمودار ۲- تغییرات مربوط به شمارش کلی باکتری‌ها در نمونه‌های فیله ماهی قزل‌الای رنگین‌کمان طی دوره نگهداری (۱۵ روز در دمای ۴ درجه سلسیوس)

a, b, c, d: تفاوت بین ستون‌های دارای حروف غیرمشابه در هرکدام از روزهای مورد آزمایش معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$).

Control: فاقد پوشش، CMC: پوشش خوراکی بر پایه کربوکسی متیل سلولز، CMC+EO: پوشش خوراکی حاوی اسانس آزاد رزماری، CMC+NEO: پوشش خوراکی حاوی نانولیپوزوم‌های اسانس رزماری

مربوط به نمونه پوشش دهی شده حاوی نانولیپوزوم اسانس رزماری به میزان $6/54 \text{ Log CFU/g}$ بود.

نتایج مربوط به باکتری‌های سرمادوست در نمودار ۳ نشان داده شده است. تعداد اولیه باکتری‌های سرمادوست در نمونه شاهد $3/55 \text{ Log CFU/g}$ و در نمونه‌ی پوشش دهی شده با کربوکسی متیل سلولز، پوشش دهی شده با کربوکسی متیل سلولز فرم آزاد و نانولیپوزوم اسانس رزماری به ترتیب $3/40$ ، $3/18$ و $2/85 \text{ Log CFU/g}$ بود. روند رشد این باکتری‌ها شبیه شمارش کلی باکتری‌ها بود، به گونه‌ای که بیشترین میزان این باکتری‌ها در روز ۱۵ نگهداری مربوط به نمونه شاهد ($8/12 \text{ Log CFU/g}$) مشاهده شد. همچنین کمترین میزان رشد این باکتری‌ها در روز ۱۵ نگهداری

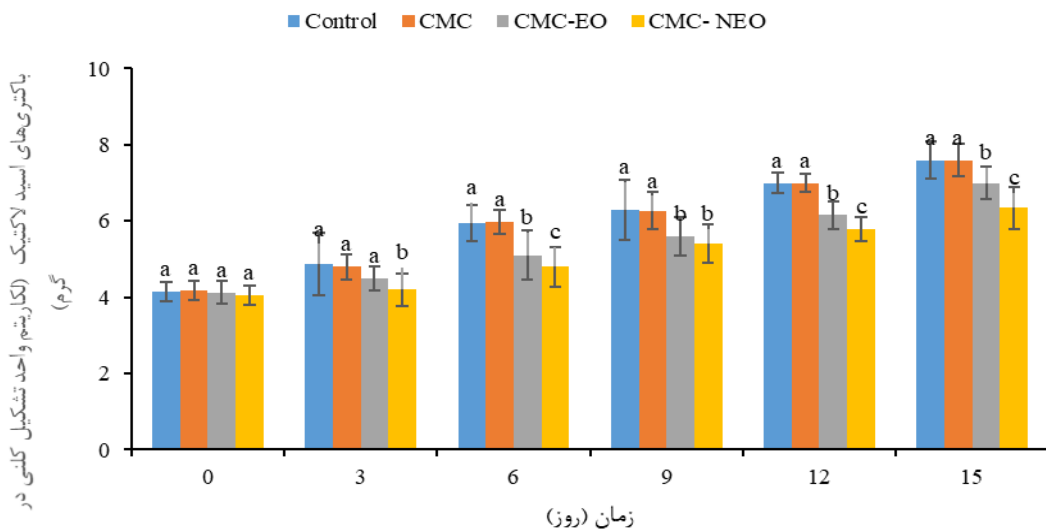


نمودار ۳- تغییرات مربوط به تعداد باکتری‌های سرمادوست نمونه‌های فیله ماهی قزل‌الای رنگین‌کمان طی دوره نگهداری (۱۵ روز در دمای ۴ درجه سلسیوس)

a, b, c, d: تفاوت بین ستون‌های دارای حروف غیرمشابه در هرکدام از روزهای مورد آزمایش معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$).

Control: فاقد پوشش، CMC: پوشش خوراکی بر پایه کربوکسی متیل سلولز، CMC+EO: پوشش خوراکی حاوی اسانس آزاد رزماری، CMC+NEO: پوشش خوراکی حاوی نانولیپوزوم‌های اسانس رزماری

نتایج مربوط به باکتری‌های اسیدلاکتیک در نمودار ۴ نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود تعداد باکتریهای اسیدلاکتیک نمونه‌های پوشش دهی شده با کربوکسی متیل سلولز حاوی نانولیپوزوم‌های اسانس رزماری در روزهای سوم به بعد به‌طور معنی‌دار کمتر از سایر نمونه‌ها بود ($P < 0.05$).

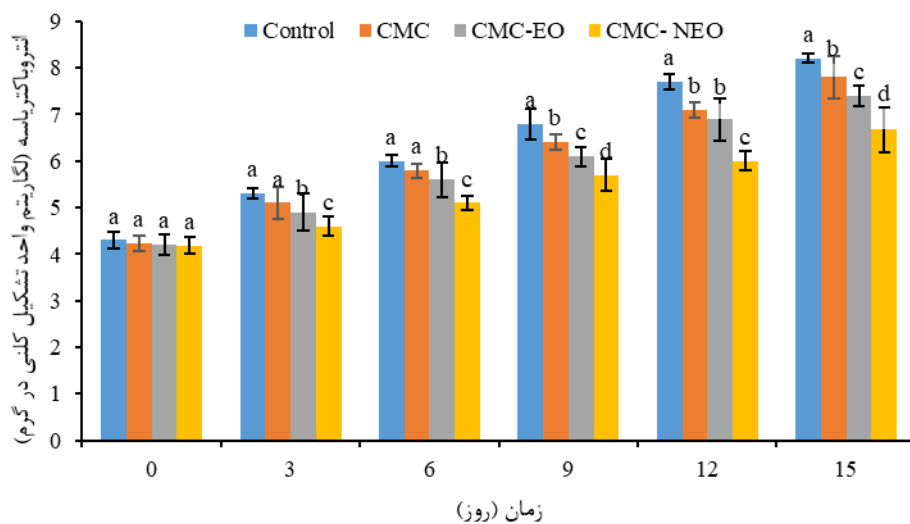


نمودار ۴- تغییرات مربوط به تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک نمونه‌های فیله ماهی قزل‌الای رنگین‌کمان طی دوره نگهداری (۱۵ روز در ۴ درجه سلسیوس) نمودار ۴- تفاوت بین ستون‌های دارای حروف غیرمشابه در هرکدام از روزهای مورد آزمایش معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$).

Control: فاقد پوشش، CMC: پوشش خوراکی بر پایه کربوکسی متیل سلولز، CMC+EO: پوشش خوراکی حاوی اسانس آزاد رزماری، CMC+NEO: پوشش خوراکی حاوی نانولیپوزوم‌های اسانس رزماری

دارای بیشترین تعداد و نمونه‌های پوشش دهی شده با کربوکسی متیل سلولز حاوی نانولیپوزوم‌های اسانس رزماری دارای کمترین تعداد از باکتری‌های انتروباکتریاسه بود.

نتایج مربوط به شمارش تعداد انتروباکتریاسه در نمودار ۵ نشان داده شده است. در طی مدت زمان نگهداری تعداد انتروباکتریاسه در تمامی نمونه‌های افزایش یافت. در روزهای نهم به بعد نمونه‌های شاهد



نمودار ۵- تغییرات مربوط به تعداد انتروباکتریاسه نمونه‌های فیله ماهی قزل‌الای رنگین‌کمان طی دوره نگهداری (۱۵ روز در دمای ۴ درجه سلسیوس) نمودار ۵- تفاوت بین ستون‌های دارای حروف غیرمشابه در هرکدام از روزهای مورد آزمایش معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$).

Control: فاقد پوشش، CMC: پوشش خوراکی بر پایه کربوکسی متیل سلولز، CMC+EO: پوشش خوراکی حاوی اسانس آزاد رزماری، CMC+NEO: پوشش خوراکی حاوی نانولیپوزوم‌های اسانس رزماری

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر، ترکیب عمده موجود در اسانس رزماری اوکالیپتول (۸۱ سینثول) بود، که با پژوهش ابراهیمی همتی کیخا و همکاران (۲۰۲۲) و جعفری ثالث و همکاران (۲۰۲۰) همخوانی داشت (Ebrahimi et al., 2022; Jafari-sales, 2020). در طی مطالعه‌ای گزارش شده که بیشترین ترکیب موجود در اسانس رزماری مربوط به ترکیب آلفا-پینن به میزان ۱۹ درصد بود (Roomiani et al., 2016). تفاوت در نوع رزماری مصرفی و شرایط رشد محیطی می‌تواند بر تعداد ترکیبات شیمیایی تأثیر بگذارد (Ebrahimi hemmati kaykha et al., 2022). پژوهش دیگری گزارش شده است که بیشترین ترکیب موجود در اسانس رزماری مورد مطالعه به ترتیب آلفا-پینن (۱۲/۲۶ درصد) و اوکالیپتول با میزان (۹/۵۵ درصد) بود (Alipour et al., 2019). در تحقیق دیگری که در مورد ترکیبات موجود در اسانس رزماری انجام شده گزارش شده است که اسانس مورد استفاده در پژوهش مربوطه دارای ۲۰ ترکیب بود که ۸۲/۰۹ درصد از ترکیبات حاصله را اوکالیپتول، آلفا-پینن، و ربنون، کامفور، بربونون و لیمونن را تشکیل می‌دادند (Malakootian and Hatami, 2013).

اندازه نانولیپوزوم‌های به دست آمده به وسیله میکروسکوپ الکترونی اتمی با اندازه‌های به دست آمده از طریق تفرق نور پویا تطابق داشت. با توجه به شکل ۱ و زیگول‌های تولیدی کروی، دارای سطوحی به نسبت صاف و هموار و دارای اشکال به نسبت یکسان بودند. مورفولوژی لیپوزوم‌های تولیدی در این پژوهش با لیپوزوم‌های اسانس رزماری تولیدی در پژوهش دیگر متفاوت بود که به صورت توده‌های فشرده و به هم

چسبیده بودند. این تفاوت می‌تواند به دلیل تفاوت در فرمولاسیون و روش تولید لیپوزوم‌ها باشد (Salari et al., 2019).

در مطالعه حاضر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آزاد و نانولیپوزوم حاوی اسانس رزماری به ترتیب ۷۲/۲۱ و ۷۱/۸ درصد بود. در طی پژوهشی اثر ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی دو نوع اسانس (رزماری و پونه کوهی) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که اسانس رزماری دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی برابر با ۳۹/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود (Alvarcez et al., 2010). در طی مطالعه دیگر گزارش شده که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه رزماری بومی مازندران برابر با ۴۲/۶۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود (Jamshidi et al., 2010). در طی پژوهش دیگری روی ترکیبات شیمیایی، قدرت آنتی‌اکسیدانی، محتوای تام فنل و فلاونوئید کل و سمیت سلولی اسانس رزماری گزارش شده که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس رزماری به روش DPPH برابر با ۷۸/۷۴ درصد بود که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد (Ebrahimi et al., 2022).

حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی نانولیپوزوم حاوی اسانس رزماری در هر دو سویه باکتریایی گرم منفی و گرم مثبت به طور معنی‌دار کمتر از فرم آزاد بود ($p < 0.05$). به عبارت دیگر قدرت ضد میکروبی نانولیپوزوم حاوی اسانس رزماری در هر دو باکتری گرم منفی و گرم مثبت به طور معنی‌دار بیشتر از اسانس آزاد می‌باشد ($P < 0.05$). این نتایج نشان داد که با توجه به کمتر بودن یافته‌های حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی مربوط به نانولیپوزوم اسانس رزماری در مقایسه با فرم آزاد آن می‌توان به این نتیجه

دارد (Mojaddar Langroodi *et al.*, 2018). افزایش pH می‌تواند ناشی از تولید بازهای فرار مانند تری متیل آمین و آمونیاک باشد که به دلیل وجود آنزیم‌های درون‌زا یا میکروبی است (Kakaei *et al.*, 2016). از سوی دیگر، کاهش pH می‌تواند به دلیل تولید گلیکولیز پس از مرگ در لاشه ماهی باشد. pH ماهی تازه تقریباً ۷ است. به‌طور کلی، تغییرات pH پس از مرگ تا حد زیادی به گونه و فصل بستگی دارد (Cakli *et al.*, 2014). نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج رئیسی و همکاران (۲۰۱۴) همخوانی داشت (Raeisi *et al.*, 2014). در مطالعه‌ای اثر کیتوزان حاوی اسانس زیره سبز نانوکپسوله شده بر ماندگاری گوشت گوساله در بسته‌بندی اتمسفر اصلاح‌شده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که نمونه‌های حاوی نانوامولسیون دارای کمترین میزان pH در میان سایر نمونه‌ها بوده است (Fattahian1 *et al.*, 2022).

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به دلیل داشتن میزان بالایی از اسیدهای چرب تک غیراشباع (حدود ۵۰ درصد) و اسیدهای چرب چند غیراشباع (حدود ۲۶ درصد) به اکسیداسیون چربی حساسیت بالایی دارد که همین امر سبب کاهش عمر ماندگاری آن می‌شود (Hamzeh *et al.*, 2011). در نمونه‌های اولیه در طی اکسیداسیون لیپیدها، به اکسیژن مولکولی به پیوندهای دوتایی اسیدهای چرب غیراشباع اضافه می‌شود و در نتیجه هیدروپراکسیدها تولید می‌شود. این هیدروپراکسیدها ناپایدار هستند و به کتون‌ها و آلدئیدها تجزیه می‌شوند که ویژگی‌های ارگانولپتیکی ناخوشایندی را در فیله ماهی ایجاد می‌نمایند. میزان پراکسید در نمونه تیمار نشده نسبت به نمونه‌های تیمار

رسید که با توجه به وجود حفراتی موجود در سطح غشای باکتری‌ها که محل ورود و خروج مواد می‌باشد، هرچه اندازه ذرات تولیدی دارای سایز کمتری باشد راحت می‌تواند از این حفرات عبور نماید و ماده زیست فعال خود را آزاد نماید (Gharenaghadeh *et al.*, 2017). فقدان لایه لیپوپلی ساکارید در دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت علت حساسیت باکتریایی به ترکیبات ضد باکتری است که در باکتری‌های گرم منفی می‌تواند از ورود ترکیبات فعال به غشای سیتوپلاسمی جلوگیری کند. علاوه بر این، باکتری‌های گرم منفی به دلیل وجود لایه لیپوپلی ساکارید دیواره سلولی در اثر نفوذ مولکول‌های مختلف آنتی‌بیوتیک و همچنین آنزیم‌هایی که باعث تجزیه مولکول‌های واردشده به فضای پری پلاسم می‌شوند، در برابر ترکیبات ضد باکتری مقاوم هستند (Tometri *et al.*, 2020). محققین در طی مطالعه‌ای گزارش نمودند که کپسوله‌سازی مواد فعال در نانولیپوزوم‌ها باعث افزایش فعالیت ضد میکروبی این دسته از مواد نسبت به فرم آزاد آن‌ها می‌شود (Fattahian1 *et al.*, 2022).

در پژوهش حاضر pH اولیه تمامی نمونه‌ها در محدوده ۶/۴۰ بود. به‌طور کلی، این پارامتر در طول مدت‌زمان نگهداری در تمامی تیمارها افزایش یافت، بیشترین میزان تغییرات pH مربوط به نمونه شاهد است که در انتهای دوره نگهداری میزان pH به ۷/۸۰ رسید اما کمترین افزایش برای نمونه‌های تیمار شده کربوکسی متیل سلولز حاوی فرم آزاد و نانولیپوزوم اسانس رزماری مشاهده گردید. افزایش مقدار pH تأثیر نامناسبی بر کیفیت نمونه‌ها در طول زمان نگهداری به‌ویژه در خواص ارگانولپتیکی مانند رنگ، بافت و بو

شده با سرعت بیشتری افزایش یافت. اندیس پراکسید در تمامی نمونه‌ها از روز ۶ به بعد با سرعت بیشتری افزایش یافت اما از روز ۱۲ به بعد اندیس پراکسید کاهش یافت. همان‌گونه که اشاره شده هیدرو پراکسید بسیار ناپایداری است که پس از تولید به سایر ترکیبات ثانویه دیگر تبدیل می‌شوند و همین امر سبب روند کاهشی در آن‌ها می‌شود (Ozogul et al., 2005). حد مجاز اندیس پراکسید در حدود ۱۰ الی ۲۰ میلی اکی والان گرم پراکسید بر کیلوگرم چربی می‌باشد (Ghomi et al., 2011). که میزان آن در تیمارهای پوشش دهی شده مورد بررسی در طول مدت زمان نگهداری (۱۵ روز ۴ درجه سلسیوس) کمتر از ۱۰ میلی اکی والان بود که می‌تواند نشان‌دهنده تأثیر هم‌افزایی بین کربوکسیل متیل سلولز و فرم آزاد و نانولیپوزوم اسانس رزماری باشد (Li et al., 2017).

گزارش شده است که بالاترین میزان TBC قابل قبول در گوشت ماهی در حدود 10^7 Log CFU/g - (Ozgul et al., 2004). مقدار اولیه TBC در تمامی نمونه‌ها برابر با $3/65$ Log CFU/g بود که در طول مدت زمان نگهداری این میزان برای تمامی نمونه‌ها افزایش یافت اما با این وجود سرعت رشد در نمونه‌های پوشش دهی شده کمتر از نمونه کنترل بود. میزان افزایش TBC در پایان دوره نگهداری ۱۵ روز در نمونه‌های شاهد، نمونه‌ی پوشش دهی شده با کربوکسی متیل سلولز، پوشش خوراکی فعال حاوی فرم آزاد و نانولیپوزوم‌های اسانس رزماری به ترتیب به حدود $9/12$ ، $7/90$ ، $7/12$ و $6/83$ Log CFU/g بود. در تحقیقی گزارش شده که TVC ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در طی ۲۰ روز دوره نگهداری در دمای ۳ درجه سلسیوس از مقدار اولیه

4 Log CFU/g به $7/04$ افزایش یافت (Rezaei et al., 2008). در مطالعه دیگر بیان شده که استفاده از پوشش خوراکی مکمل با اسانس می‌تواند از رشد میکروارگانیسم‌ها جلوگیری نماید زیرا این ترکیبات قادر به تخریب ساختاری لپیدها در غشای میتوکندری و سلولی باکتری‌ها می‌گردند (Mojaddar et al., 2018). اسانس رزماری حاوی مقدراری از عوامل فنولیک و ترپنوئیدها است که دارای فعالیت ضد میکروبی می‌باشد. در مطالعه دیگری از پوشش ژلاتین ماهی حاوی اسانس پونه کوهی برای کاهش شمارش کلی باکتری‌ها در فیله‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان در یخچالی استفاده نمودند. نتایج آن‌ها نشان داد که شمارش کلی باکتری‌ها در نمونه‌های با پوشش ژلاتین حاوی اسانس پونه کوهی در طول ۱۲ روز به حدود 6 log CFU/g افزایش یافت در حالیکه در نمونه‌های شاهد در طول ۸ روز به این عدد رسید (Hosseini et al., 2016).

باکتری‌های سرمادوست، باکتری‌هایی هستند که در دمای ۷ درجه سانتی‌گراد یا کمتر از آن به خوبی رشد می‌کنند و دمای بهینه‌شان برای رشد بین ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد است (El-Tawab et al., 2019). این دسته از باکتری‌ها از جمله مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های عامل فساد ماهی در طول مدت زمان نگهداری دماهای سرد هستند (Ibrahim Sallam, 2007). اعداد اولیه باکتری‌های سرمادوست در نمونه شاهد $3/55$ Log CFU/g و در نمونه‌ی پوشش دهی شده با کربوکسی متیل سلولز، پوشش دهی شده با کربوکسی متیل سلولز فرم آزاد و نانولیپوزوم اسانس رزماری به ترتیب $3/40$ ، $3/18$ و $2/85$ Log CFU/g بود. بیشترین تعداد این باکتری‌ها در روز ۱۵ نگهداری مربوط در نمونه شاهد $Log CFU/g$

پژوهش آنها نشان داد که تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک در طی مدت‌زمان نگهداری روند افزایشی داشت به گونه‌ای که در انتهای روز ۹ تعداد این باکتری‌ها به 5 Log CFU/g رسید (Tajik et al., 2015).

یکی از میکروفلورهای مهم موجود در گوشت باکتری‌های بی‌هوازی انتروباکتریاسه می‌باشد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد در طی مدت‌زمان نگهداری تعداد میکروارگانسیم‌های بی‌هوازی انتروباکتریاسه در تمامی نمونه‌ها افزایش یافت. در روزهای نهم به بعد نمونه‌های شاهد دارای بیشترین تعداد و نمونه‌های پوشش دهی شده با کربوکسی متیل سلولز حاوی نانولیپوزوم‌های اسانس رزماری دارای کمترین تعداد از باکتری‌های انتروباکتریاسه بود (نمودار ۵). در طی پژوهشی گزارش شده است که اسانس و پوشش‌های خوراکی قادر به مهار باکتری‌های انتروباکتریاسه می‌باشند (Dahham et al., 2010). در مطالعه دیگری گزارش شده است که اسانس‌های روغنی می‌توانند سبب جلوگیری از رشد باکتری‌های انتروباکتریاسه گردند (Tajik et al., 2015). نتایج مطالعه حاضر با نتایج سالام (۲۰۰۷) نیز مطابقت داشت (Sallam, 2007). شایان ذکر است که اثرات ضدباکتریایی اسانس‌های میخک، دارچین و رزماری علیه انتروباکتریاسه در مطالعه دیگری نیز نشان داده شده است (López et al., 2005).

موجودات دریایی در طی مدت‌زمان نگهداری به تغییرات ناشی از اکسیداسیون حساس می‌باشند. همچنین به دلیل بالا بودن مواد مغذی موجود در این گونه از فرآورده‌ها به سرعت تحت تأثیر فعالیت میکروارگانسیم‌ها و اکسیداسیون چربی قرار می‌گیرند. با

مشاهده شد. در تحقیقی گزارش شده که تعداد کل باکتری‌های سرمادوست در ماهی پوشش دهی شده با فیلم در روزهای ششم و هفتم نگهداری به حدود Log CFU/g $6/64 - 6/69$ می‌رسد (Erkan et al., 2007). در طی مطالعه‌ای اثر تیمارهای جداگانه و ترکیبی نایسین، اسانس رزماری (نانوامولسیون و فرم آزاد) و پوشش کیتوزان بر ماندگاری فیله مرغ در یخچال موردبررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که باکتری‌های سرمادوست، در پایان دوره نگهداری ۱۲ روزه، در تیمار بهینه با کیتوزان می‌تواند از رشد باکتری‌های سرمادوست جلوگیری کند (Mavalizadeh et al, 2022).

یکی دیگر از باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری باکتری‌های اسیدلاکتیک می‌باشد که به‌عنوان فلور میکروبی گوشت نیز شناخته می‌شوند. گروهی از باکتری‌های اسیدلاکتیک قادر به ایجاد فساد در گوشت می‌باشند (Giatrakou & Savvaidis, 2012). همان‌گونه که در نمودار ۴ مشاهده می‌شود تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک نمونه‌های پوشش دهی شده با کربوکسی متیل سلولز حاوی نانولیپوزوم‌های اسانس رزماری در روزهای سوم به بعد به‌طور معنی‌دار کمتر از سایر نمونه‌ها بود ($P < 0/05$). در تحقیقی گزارش شده که رزماری و آویشن دارای اثرات بازدارنده قوی علیه رشد باکتری‌های اسیدلاکتیک هستند (Badia et al, 2019). در مطالعه دیگری دریافتند که کمترین تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک مربوط به تیمارهای حاوی کربوکسیل متیل سلولز حاوی اسانس رزماری (۸۰۰ میلی‌گرم کل فنل در لیتر) بود (Choulitoudi et al, 2017). در طی مطالعه‌ای تأثیر عصاره انگور و اسانس آویشن شیرازی بر روی گوشت قرمز موردبررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از

توجه به فعالیت میکروارگانیسم‌ها و تغییرات ناشی از فعالیت آن‌ها در هنگام نگهداری در روش سرد و مشکلات ناشی از استفاده از نگهدارنده‌های سنتزی کاربرد مواد طبیعی که سبب افزایش کیفیت و ماندگاری این نوع از فرآورده‌ها شود ضرورت دارد. بنابراین بر اساس نتایج مطالعه حاضر، به‌طور کلی می‌توان گفت که پوشش‌های غذایی ترکیب‌شده با اسانس‌های گیاهی مانند رزماری گامی مؤثر در حفظ کیفیت میکروبی، شیمیایی و ارگانولپتیک مواد غذایی در طول دوره ذخیره‌سازی هستند. این مطالعه همچنین نشان داد که فرم آزاد و نانومولسیون اسانس رزماری هر دو نقش مؤثری در افزایش ماندگاری فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را دارند. همچنین یافته‌ها نشان داد که اسانس رزماری در هر دو فرم آزاد و نانولیپوزوم دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی مناسبی می‌باشد. حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی نانولیپوزوم حاوی اسانس رزماری بر علیه هر دو باکتری گرم منفی و گرم مثبت به‌طور معنی‌دار کمتر از اسانس آزاد بود. پوشش حاوی نانولیپوزوم اسانس رزماری اثر مهار

بیشتری بر روی کنترل تغییرات pH نمونه‌های گوشت قزل‌آلا در طول دوره نگهداری در شرایط یخچال دارد. این اسانس در هر دو فرم آزاد و نانولیپوزوم دارای خاصیت ضد میکروبی معنی‌دار بر علیه شمارش کلی باکتری‌ها، باکتری‌های سرمادوست، باکتری‌های گروه لاکتیک اسید و باکتری‌های گروه انتروباکتریاسه در نمونه‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در طول دوره نگهداری در شرایط یخچال می‌باشد و این خاصیت در پوشش حاوی نانولیپوزوم اسانس رزماری به‌طور معنی‌دار بیشتر از پوشش حاوی اسانس آزاد بود. در مجموع می‌توان گفت که اسانس رزماری را می‌توان به‌عنوان یک ماده نگهدارنده طبیعی در گوشت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان استفاده نمود و تبدیل اسانس آزاد به‌صورت ذرات نانولیپوزوم خاصیت نگهدارندگی این اسانس را به‌طور معنی‌دار تقویت می‌نماید.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی ندارند.

منابع

- Alejandro, P. and Diego, R. (2009). Nanotechnology for parasitic plant control. *Pest Management Science*, 65(5): 540–45.
- Alvarez, M.V., Ortega-Ramirez, L.A., Silva-Espinoza, B.A., Gonzalez-Aguilar, G.A. and Ayala-Zavala, J.F. (2019). Antimicrobial, antioxidant, and sensorial impacts of oregano, rosemary essential oils over broccoli florets. *Journal of Food Processing, Preservation*, 43(3): e13889.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2002). Peroxide value of oils, fats method 965.33. *Official Methods of Analysis* (17th ed). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Badia, V., de Oliveira, M. S. R., Polmann, G., Milkiewicz, T., Galvão, A. C. and da Silva Robazza, W. (2020). Effect of the addition of antimicrobial oregano (*Origanum vulgare*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils on lactic acid bacteria growth in refrigerated vacuum-packed

- Tuscan sausage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51, 289-301.
- Cakli, S., Kilinc, B., Cadun, A., Dincer, T. and Tolasa, S. (2014). Effect of gutting, uncutting on microbiological, chemical, sensory properties of aquacultured sea Bream (*Sparus aurata*), sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Critical Reviews in Food Science, Nutrition*, 46(7):519-27.
 - Choulitoudi, E., Ganiar, S., Tsiron, T., Ntzimani, A., Tsimogiannis, D., Taoukis, P. et al., (2017). Edible coating enriched with rosemary extracts to enhance oxidative, microbial stability of smoked eel fillets. *Food Packag Shelf Life*, 12:107-113.
 - Dahham, S.S., Ali, M.N., Tabassum, H. and Khan, M. (2010). Studies on antibacterial, antifungal activity of pomegranate (*Punica granatum L.*). *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 9: 273-281.
 - Ebrahimi Hemmati Kaykha, M., Jooyandeh, H., Alizadeh Behbahani, B. and Noshad, M. (2022). Identification of chemical compounds, antioxidant activity, total phenolic, flavonoid contents, cytotoxicity effect of *Rosmarinus officinalis* essential oil. *Iranian Food Science, Technology Research Journal*, 18(4): 467-482. [In Persian]
 - Ebrahimi Hemmati Kaykha, M., Jooyandeh, H., Behbahani, B.A. and Noshad, M. (2022). Optimization of mucilage extraction from Sepestan fruit, evaluation of its physicochemical, antioxidant activity. *Journal of Food Measurement, Characterization*, 16(6): 4331-4344.
 - Ebrahimi Hemmati Kaykha, M., Jooyandeh, H., Behbahani, B.A. and Noshad, M. (2020). Antimicrobial Activity of Rosemary Essential Oil, its Interaction with Common Therapeutic Antibiotics on some Gram Positive and Gram Negative Bacteria. *Iranian Journal of Infectious Disease*, 24(87): 25-34. [In Persian]
 - Ebrahimi, M., Jooyandeh, H. and Noshad, M. (2020). Antimicrobial potential of *Cordia myxa* fruit on pathogenic bacteria: A study "in vitro" laboratory conditions. *Journal of food science, technology (Iran)*, 17(101): 71-80.
 - El-Tawab, A., Awad, A., Kabil, A., Elhofy, F., Soliman, E. and Nada, S. (2019). Bacteriological studies on psychrotrophic bacteria, *Pseudomonas* isolated from frozen fish. *Benha Veterinary Medical Journal*, 37(1): 118-121.
 - Erkan, N., Özden, O. and İnuğur M. (2007). The effects of modified atmosphere, vacuum packaging on quality of chub mackerel. *Int J Food Sci Technol*, 42(11):1297-304.
 - Fattahian, A., Fazlara, A., Maktabi, S., Pourmahdi, M. and Bavarsad, N. (2022). The effects of chitosan containing nano-capsulated *Cuminum cyminum* essential oil on the shelf-life of veal in modified atmosphere packaging. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16(1): 920-933.
 - Gharenaghadeh, S., Samadlouie, H., Sowti, M., Hamisekar, H. and Mokaram, R. (2017). Evaluation of the antimicrobial, antioxidant properties of *Salvia* essential oil nano liposome (*Salvia multicaulis*). *Journal of Food Science, Technology*, 14(62): 271-82.
 - Ghomi, M.R., Nikoo, M., Heshmatipour, Z., Jannati, A. A., Ovissipour, M. et al., (2011). Effect of sodium acetate, nisin on microbiological, chemical changes of cultured grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) during refrigerated storage. *Journal of Food Safety*, 31(2): 169-175.
 - Giatrakou, V. and Savvaiddis, I.N. (2012). Bioactive packaging technologies with chitosan as a natural preservative agent for extended shelf-life food products. In: Arvanitoyannis I. *Modified Atmosphere, Active Packaging Technologies*. Ed. Boca Raton: Taylor & Francis. PP: 685-730.
 - Hamzeh A. and Rezaei M. (2011). Antioxidant, antibacterial effects of sodium alginate coating enriched with thyme essential oil on rainbow trout fillets during refrigerated storage. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 6 (3):11-20.
 - Hosseini, S.F. and Gómez-Guillén, M. C. (2018). A state-of-the-art review on the elaboration of fish gelatin as bioactive packaging: Special emphasis on nanotechnology-based approaches. *Trends in Food Science & Technology*, 79: 125-135.
 - Hosseini, S.F., Rezaei, M., Zandi, M. and Ghavi, F.F. (2016). Effect of fish gelatin coating enriched with oregano essential oil on the quality of refrigerated rainbow trout fillet. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 25(6): 835-842.

-
- Hu, K., Huang, X., Gao, Y., Huang, X., Xiao, H. and McClements, D. J. (2015). Core-shell biopolymer nanoparticle delivery systems: Synthesis, characterization of curcumin fortified zein-pectin nanoparticles. *Food Chemistry*, 182: 275-281.
 - Ibrahim Sallam, K. (2007). Antimicrobial, antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, , sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Food Control*, 18: 566–575.
 - Jafari-sales, A. and Pashazadeh, M. (2020). Study of chemical composition, antimicrobial properties of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* in vitro. *International Journal of Life Sciences, Biotechnology*, 3(1): 62-69.
 - Jamshidi, M., Ashtiani, H.R., Rezazade, S.H., Fathiazad, F., Maz,arani, M. and Khaki, A. (2010). Evaluation, Comparison of phenolic compounds, antioxidant activity of some plant species in maz,aran. *Journal of Medicinal Plants*, 34(2): 177-183. [In Persian].
 - Jooyandeh, H., Ebrahimi Hemmati Kaykha, M., Alizadeh Behbahani, B. and Noshad, M. (2023). Evaluating the quality of mutton meat coated with *Cordia myxa* fruit mucilage containing *Rosmarinus officinalis* essential oil during cold storage. *Journal of Food Measurement, Characterization*, 17: 2062–2074.
 - Jouki, M., Yazdi, F.T., Mortazavi, S.A., Koocheki, A. and Khazaei, N. (2014). Effect of quince seed mucilage edible films incorporated with oregano or thyme essential oil on shelf life extension of refrigerated rainbow trout fillets. *International Journal of Food Microbiology*, 174: 88–97.
 - Kakaei, S. and Shahbazi, Y. (2016). Effect of chitosan-gelatin film incorporated with ethanolic red grape seed extract, *Ziziphora clinopodioides* essential oil on survival of *Listeria monocytogenes*, chemical, microbial, sensory properties of minced trout fillet. *LWT-Food Science, Technology*, 72: 432–438.
 - Kamkar, A., Shariatifar, N., Jamshidi, A. H. and Mohammadian, M. (2010). Study of antioxidant functional of the water, methanol, ethanol extracts of Endemic *Cuminum cyminum* L., *Cardaria draba* L. in the In-vitro Systems. *Internal Medicine Today*, 16(3): 37-45. [In Persian].
 - Langroodi, A.M., Tajik, H., Mehdizadeh, T., Moradi, M., Kia, E. M. and Mahmoudian, A. (2018). Effects of sumac extract dipping, chitosan coating enriched with *Zataria multiflora* Boiss oil on the shelf-life of meat in modified atmosphere packaging. *Lwt*, 98: 372-380.
 - Li, T., Jiang, Y., Li, J. and Hu, W. (2017). An investigation on quality of Japanese sea bass (*lateolabrax japonicas*) using chitosan assisted with *Origanum vulgare* oil, allicin. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(3): e12918.
 - Lopez, P., Sanchez, C., Batlle, R. and Nerin, C. (2005). Solid-and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(17): 6939-6946.
 - Malakootian, M. and Hatami, B. (2013). Survey of chemical composition, antibacterial activity of *Rosmarinus Officinalis* Essential oils on *Escherichia Coli*, Its Kinetic. *The Journal of Toloo-e-behdasht*, 12(1): 1-13. [In Persian].
 - Mavalizadeh, A., Fazlara, A., PourMahdi, M. and Bavarsad, N. (2022). The effect of separate and combined treatments of nisin, *Rosmarinus officinalis* essential oil (nanoemulsion and free form) and chitosan coating on the shelf life of refrigerated chicken fillets. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16(6): 4497-4513.
 - Mohammadi, M., Ghanbarzadeh, B. and Hamishehkar, H. (2014). Formulation of nanoliposomal vitamin D3 for potential application in beverage fortification. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 4(2): 569.
 - Mojaddar Langroodi, A.M., Tajik, H. and Mehdizadeh, T. (2018). Preservative effects of sumac hydro-alcoholic extract, chitosan coating enriched along with *Zataria multiflora* Boiss essential oil on the quality of beef during storage. *Veterinary Research Forum*, 9: 153–161.
 - Noshad, M., Alizadeh Behbahani, B., Jooyandeh, H., Rahmati-Joneidabad, M., Hemmati Kaykha, M.E. and Ghodsi Sheikhjan, M. (2021). Utilization of *Plantago major* seed mucilage containing *Citrus limon* essential oil as an edible coating to improve shelf-life of buffalo meat under refrigeration conditions. *Food Science & Nutrition*, 9(3): 1625-1639.
 - Noshad, M., Alizadeh, B., Jooyandeh, H., Rahmati, M., Ghodsi, M., Ghorani, R. et al., (2022). The use

- of Okra gum-Peppermint essential oil bioactive edible coating to improve shelf-life of buffalo meat. *Journal of Food Research*, 32(4): 13-36. [In Persian]
- Noshad, M., Jooyandeh, H., Rahmati-Joneidabad, M., Ebrahimi hemati kaykha, M. and Ghodsi Sheikhjan, M. (2021). In vitro investigation of the antimicrobial activity of Dezfuli orange peel essential oil with, without common antibiotics on some pathogenic bacteria. *Journal of Food Science, Technology (Iran)*, 18(111): 159-167. [In Persian]
 - Ozgul, F., Polat, A. and Ozgul, Y. (2004). The effects of modified atmosphere packaging, vacuum packaging on chemical, sensory, and microbiological changes of sardines (*Sardina pilchardu*). *Food Chemistry*, 85(1): 49-57.
 - Ozogul, Y., zyurt, O., zogul, F., Kuley, E. and Polat, A. (2005). Freshness assessment of European eel (*Anguilla anguilla*) by sensory, chemical, microbiological methods. *Food Chemistry*. 92: 745-751.
 - Perez-Alonso, F., Aubourg, S.P., Rodriguez, O. and Barros-Velazquez, J. (2004). Shelf life extension of Atlantic pomfret (*Brama brama*) fillets by packaging under a vacuum-skin system. *Journal of Food Research Technological*, 218: 313-317.
 - Pisoschi, A.M., Pop, A., Georgescu, C., Turcuş, V., Olah, N.K. and Mathe, E. (2018). An overview of natural antimicrobials role in food. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143: 922-935.
 - Raeisi, M., Tajik, H., Aliakbarlu, J. and Valipour, S. (2014). Effect of carboxymethyl cellulose edible coating containing *Zataria multiflora* essential oil, grape seed extract on chemical attributes of rainbow trout meat. In *Veterinary research forum: an international quarterly journal Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran*, 5(2): 89
 - Rezaei, M. and Hosseini, S.F. (2008). Quality assessment of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chilled storage. *Journal of Food Science*. 73(6): H93-H96.
 - Rezaeifar, M., Mehdizadeh, T., Mojaddar Langroodi, A. and Rezaei, F. (2020). Effect of chitosan edible coating enriched with lemon verbena extract, essential oil on the shelf life of vacuum rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Food Safety*, 40(3): e12781.
 - Roomiani, L., Soltani, M. and Akhondzadeh Basti, A. (2016). Effect of *Rosmarinus officinalis* essential oil, nisin on Log P% of *Streptococcus iniae* in BHI broth. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, 10(1): 35-43. [In Persian].
 - Salari, S. and Salari, R. (2019). Nanoliposomal system of rosemary essential oil made by specific human cell phospholipids, evaluation of its anti-cancer properties. *Applied Nanoscience*, 9(8): 2085-2089.
 - Sallam, K.I. (2007). Antimicrobial, antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, , sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Food Control*. 18: 566-575.
 - Shakila, R., Jeyasekaran, G. and Vijayalakshmi, S. (2005) Effect of vacuum packaging on the quality characteristics of seer fish (*Scomberomorus commersonii*) chunks during refrigerated storage. *Journal of Food Science and Technology*, 42: 438-443
 - Tajik, H., Aminzare, M., Mounesi, T., Hashemi, M., Hassanzad, H. and Raeisi, M. et al., (2015). Effect of *zataria multiflora* boiss essential oil, grape seed extract on the shelf life of raw buffalo patty, fate of inoculated *listeria monocytogenes*. *Journal of Food Processing, Preservation*, 6: 5-13.
 - Tometri, S.S., Ahmady, M., Ariaii, P. and Soltani, M.S. (2020). Extraction, encapsulation of *Laurus nobilis* leaf extract with nano-liposome, its effect on oxidative, microbial, bacterial, sensory properties of minced beef. *Journal of Food Measurement, Characterization*, 14: 3333-3344.
 - Wu, H.C., Chen, H.M. and Shiau, C.Y. (2003). Free amino acids, peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*, 36(9-10): 949-957.