Food Hygiene, Vol. 13, No. 52, Winter 2024

"Research article: 1443"

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, M[5].

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: ۱۴۴۳»

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) موردبررسی 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 ۱و۸ 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 به‌صورت جداگانه به همراه CMC جهت تولید پوشش خوراکی گوشت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان طی دورهٔ نگهداری (۱۵ روز در ۴ درجهٔ سلسیوس) مورداستفاده قرار گرفت. حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی نانولیپوزوم رزماری بر *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌طور معنی‌دار کمتر از اسانس آزاد بود ($p<۰/۰۵$). شمارش کلی باکتری‌های زنده، سرمادوست، اسیدلاکتیک و انتروباکتریاسه در نمونه‌های پوشش یافته شده با CMC همراه با اسانس و نانولیپوزوم رزماری به‌طور معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) کمتر از سایر نمونه‌ها بود و در نمونه‌های حاوی نانولیپوزوم به‌طور معنی‌دار کمتر از نمونه‌های حاوی اسانس آزاد بود ($p<۰/۰۵$). درمجموع می‌توان گفت که استفاده از CMC همراه با اسانس آزاد و بخصوص همراه با نانولیپوزوم اسانس رزماری در طول دوره نگهداری، افت کیفیت میکربی و شیمیایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را به‌طور معنی‌دار کاهش می‌دهد.

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

مقدمه

کیفیت و ایمنی مواد غذایی از مهم‌ترین اهداف تولیدکنندگان و تقاضای مصرف‌کنندگان می‌باشند. زیرا مواد غذایی به دلیل داشتن مواد مغذی فراوان به‌سرعت 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 به‌سرعت 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). بااین‌حال، 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 به‌شدت افزایش‌یافته است (Jooyandeh *et al*, 2022). از این رو تمایل مردم به مصرف گوشت سفید افزایش‌یافته 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 ۱۲ الی ۱۵ ساعت در دمای محیط (۲۵ درجه سلسیوس) نگهداری نمود، زیرا به‌سرعت دچار فساد میکربی 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 مورداستفاده 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 ازجمله پلی‌ساکاریدها، لیپیدها و پروتئین‌ها تهیه نمود. پلی‌ساکاریدها، مانند کربوکسی متیل سلولز (Carboxy Methyl Cellulose) (CMC)، مواد اولیه پوشش مورداستفاده 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 ضدمیکروبی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی به‌خوبی شناخته‌شده است و تقاضای مصرف‌کنندگان برای افزودنی‌های طبیعی و کاربردی افزایش‌یافته 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 موردتوجه جوامع بشری بوده است به‌گونه‌ای که تمامی قسمت‌های مختلف آن‌ها (برگ، ساقه، ریشه، پوست و میوه) برای مصارف دارویی و غذایی مورداستفاده می‌گرفته است

(Ebrahimi hemmati kaykha *et al, 2020*). یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی که از دیرباز موردتوجه بسیاری از پژوهشگران و محققان قرارگرفته 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). به‌طورکلی این گیاه بومی سواحل مدیترانه است اما به دلیل داشتن خواص درمانی و تزئینی بسیار در مناطق مختلفی از جهان ازجمله ایران کشت می‌گردد. ازجمله 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 گزارش‌شده است اسید کارنوزول، رزمانول، کارنوسیک، اپیرزمانول، ایزورزمانول است، اما باوجود مزایای ذکرشده، 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 سویی ترکیب شیمیایی را از آسیب عوامل خارجی محافظت می‌کند (Alejandro and Rubiales 2009).

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 این‌که 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 موردبررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

- مواد

در این پژوهش فسفولیپید (لسیتین حاصل از تخم‌مرغ)، کلسترول و گلیسرول از شرکت مرک، آلمان تهیه گردید. DPPH مورداستفاده 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 استفاده‌شده در این پژوهش شامل نوترینت براث ، مولر هینتون آگار، آم ار اس آگار و آر بی جی آگار از شرکت (مرک-آلمان) بود. گیاه رزماری از فروشندگان محلی تهیه و توسط متخصصین مربوطه شناسایی شد.

-تهیه اسانس

اسانس مورداستفاده در این پژوهش با کمک دستگاه کلونجر (ساخت شرکت Heidolph آلمان مدل4003 laborota) 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 مدت‌زمان ۳ ساعت انجام شد. پس از جمع‌آوری، اسانس موردنظر 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 Technologies 7890 A، آمریکا) و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنجی جرمی (Agilent Technologies 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، 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 تشکیل‌شده توسط ۵۰ میلی‌لیتر آب هیدراته شد. سپس محلول به مدت ۳۰ دقیقه توسط همزن مغناطیس هم زده شد. درنهایت محلول حاصل درون بشر ریخته شده و در حمام آب یخ قرار داده شد و به‌دفعات (۳، ۲ و ۱ مرتبه) به مدت ۵ دقیقه تحت پروب فراصوت (توان ۷۰ درصد و سیکل ۰/۵) 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 براث دایلوشن در محیط کشت مولرهینتون براث و از پلیت‌های ۹۶ خانه استفاده شد. در این روش از مواد موردبررسی (اسانس و نانولیپوزوم) محلول استوک با غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با استفاده از محیط کشت نوترینت براث تهیه شد. سری رقتی از نمونه‌ها در نوترینت براث 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 براث رقیق و به هر چاهک میزان ۱۰۰ میکرولیتر اضافه شد. پس از گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت چاهک‌ها ازلحاظ داشتن کدورت بررسی‌شده و اولین چاهک بدون کدورت به‌عنوان حداقل غلظت مهارکننده‌ی رشد تعیین شد. سپس از هر یک از غلظت‌های پایین‌تر از حداقل غلظت مهارکنندگی، میزان

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 به‌عنوان 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 میلی‌لیتر از هر نمونه با ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول اتانولی DPPH (۰/۱۵ mM) به اتانول ۹۵ درصد اضافه شد. سپس محلول حاصل به‌صورت 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. درنهایت جذب نوری نمونه‌های موردنظر در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۵۱۷ nm قرائت شد. درصد مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Wu *et al.*, 2003):

معادله ۱

$$I\ (\%) = [\frac{Acontrol - Asample}{Acontrol}] \times 100$$

$A_{control}$ جذب شاهد (حجم یکسانی از آب‌مقطر به‌جای 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 اتاق خشک شدند. سپس نانولیپوزوم‌ها با استفاده از دستگاه TEM (مدل Hitachi, Japan) با ولتاژ ۲۰۰ کیلوولت موردبررسی 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 میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید. سپس ۱ میلی‌لیتر گلیسرول به‌عنوان 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 موردنظر 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 نانولیپوزم 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 داده‌شده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به مدت ۱ دقیقه به‌روش غوطه‌وری در هر یک از پوشش‌های تهیه‌شده قرار داده شدند. پس از خروج قطعات گوشت به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس خشک شدند. درنهایت 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 داده‌شده است.

جدول ۱- فرمولاسیون پوشش‌های خوراکی تهیه‌شده

نام	اسانس رزماری (درصد وزنی)	فسفولیپید 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

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

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. درنهایت به آن ۰/۵ میلی‌لیتر نشاسته ۱ درصد به آن اضافه کرده و ید آزادشده توسط تیوسولفات ۰/۰۱ نرمال تیتر شد. درنهایت مقدار پراکسید را برحسب میلی اکی‌والان اکسیژن فعال در هر کیلوگرم نمونه محاسبه شد (AOAC, 2002).

-تعیین فعالیت ضدمیکروبی

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 میکروارگانیسم‌های موردنظر در دما و محیط کشت هر ارگانیسم 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 ار اس آگار و آر بی جی آگار در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت انجام شد (Noshad *et al.*, 2022).

-تجزیه‌وتحلیل 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

بـه دوی گروه‌هـا از آزمـون تعقیبـی دانکـن در سـطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شـد. بـرای مقایسـه میـانگین حداقل غلظت مهارکنندگی و حـداقل غلظـت کشـندگی مربوط به نانولیپوزوم های حاوی اسانس و اسـانس آزاد نسبت به باکتری‌های مورد آزمایش از آزمون آماری تـی جهت‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد.

یافته‌ها

- ترکیبات شیمیایی اسانس رزماری

یافته‌های حاصل از شناسایی ترکیبات شـیمیایی موجـود در اسانس رزماری با استفاده از دسـتگاه کروماـتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنجی جرمـی در جـدول ۲ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود ۳۲ ترکیـب در رزماری شناسایی شد کـه ۸۶/۹۶ درصـد از اسـانس‌های رزماری را تشکیل می‌دهند. ترکیبات عمـده موجـود در اسـانس بـه ترتیـب اوکـالیپتول (۳۰/۰۳٪) و آلفـا پیـنن (۱۳/۶۹ ٪) بودند.

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 ضدمیکروبی

نتایج مربوط بـه حـداقل غلظـت مهـار کننـدگی و حداقل غلظت کشندگی فرم آزاد و نـانو لیپـوزم اسـانس رزماری در جدول ۳ نشان داده‌شده است. همان‌طور کـه مشاهده می‌شود حداقل غلظـت مهارکننـدگی و حـداقل غلظت کشندگی نانولیپوزوم حاوی اسانس رزمـاری در هر دو باکتری گرم منفی و گرم مثبـت بـه‌طور معنـی‌دار کمتر از اسانس آزاد می‌باشـد ($p<۰/۰۵$) بـه‌عبارت‌دیگر قدرت ضد میکروبی نانولیپوزوم حاوی اسانس رزماری در هر دو باکتری گرم منفی و گرم مثبت به‌طور معنی‌دار

بیشتر از اسانس آزاد می‌باشد ($p<۰/۰۵$). همچنین، نتایج نشان داد که مقادیر حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشندگی در باکتری‌های گرم منفی بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت است.

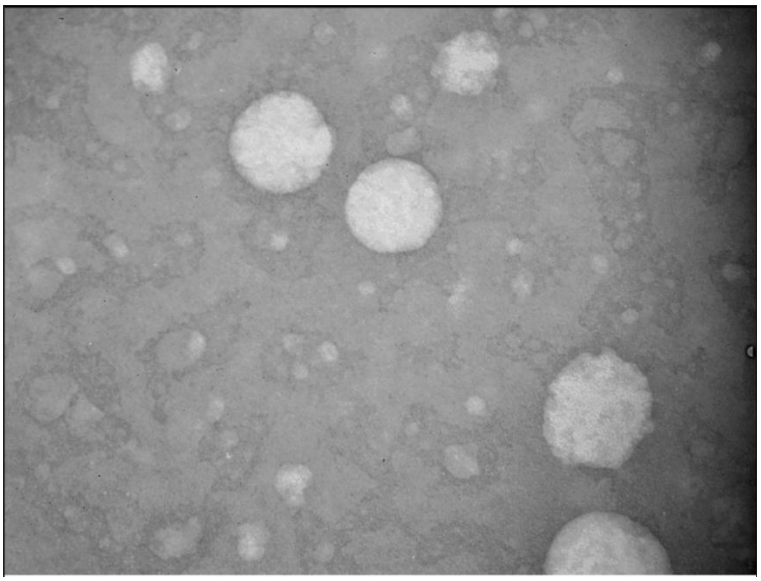
جدول ۳- نتایج مربوط به حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس و نانو لیپوزم گیاه رزماری

باکتری	MIC		MBC	
	اسانس رزماری	نانولیپوزوم حاوی اسانس رزماری	اسانس رزماری	نانولیپوزوم حاوی اسانس رزماری
اشریشیا کلی	۲۰ ±۰/۰۱ *	۱۵ ±۰/۲	۱۸ ±۰/۰۳*	۱۴ ±۰/۰
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۰ ± ۰/۰۲*	۵ ±۰/۰۴	۱۰±۰/۰۱*	۵ ± ۰/۰۱

*: در هر ردیف و در هرکدام از MIC و MBC میانگین نانولیپوزوم به‌طور معنی‌دار کمتر از میانگین اسانس رزماری است ($p<۰/۰۵$).

- مورفولوژی

مورفولوژی نانو لیپوزوم‌ها قبل از مرحله پوشش دهی به وسیله میکروسکوپ الکترونی اتمی موردبررسی قرار گرفت و حضور لیپوزوم‌ها در تمام نمونه‌ها قابل‌مشاهده بود و تشکیل لیپوزوم‌ها به تأیید رسید. نظر به اینکه کلیه نمونه‌ها دارای شکل یکسانی بودند، یکی از تصاویر به‌عنوان نمونه نمایش داده‌شده است (شکل ۱).



شکل ۱ - تصویر SEM نانولیپوزوم اسانس رزماری

-فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس رزماری

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

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

- تغییرات pH در طی مدت‌زمان نگهداری

تغییرات مربوط به pH در تیمارهای مختلف پوشش دهی شده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در طول نگهداری (۱۵ روز در دمای ۴ درجه سلسیوس) در جدول ۴ ارائه‌شده است. pH ولیه تمامی تیمارها در محدوده ۶/۴۰ بود. به‌طور کلی، pH در طول مدت‌زمان نگهداری در تمام تیمارها افزایش یافت، همان‌گونه که در جدول ۴ نشان داده‌شده 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 نمونه‌های تیمار شده کربوکسی متیل سلولز حاوی فرم آزاد و نانولیپوزوم اسانس رزماری مشاهده گردید.

جدول ۴- تغییرات pH نمونه کنترل و تیمار شده در طول مدت‌زمان 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}

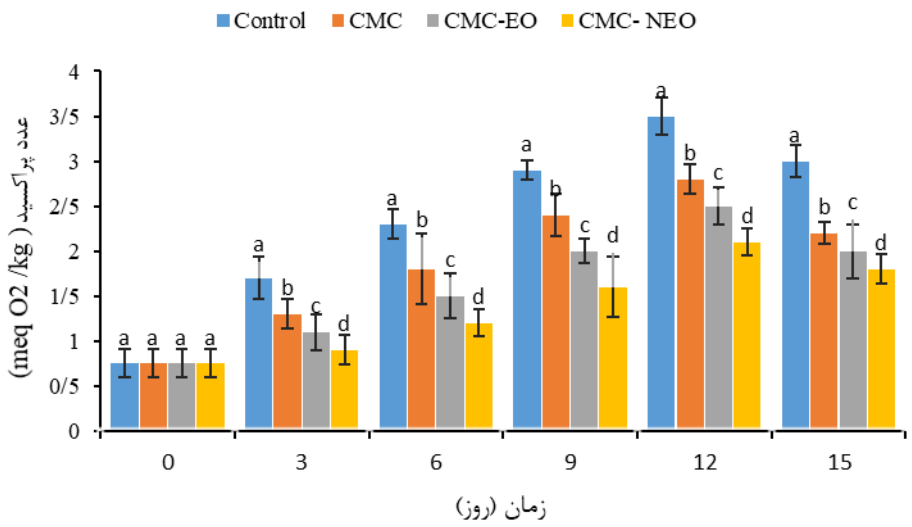
Control: فاقد پوشش، CMC: پوشش خوراکی بر پایه کربوکسی متیل سلولز، CMC+EO : پوشش خوراکی حاوی اسانس آزاد رزماری، CMC+NEO: پوشش خوراکی حاوی نانولیپوزوم‌های اسانس رزماری

a، b، c و d: در هر ردیف تفاوت بین میانگین‌های دارای حروف غیرمشابه معنی‌دار می‌باشد (***p*** <۰/۰۵).

A، B، C و D: در هر ستون (هرکدام از روزهای مورد آزمایش) تفاوت بین میانگین‌های دارای حروف غیرمشابه معنی‌دار می‌باشد (***p*** <۰/۰۵).

-تغییرات پراکسید در طی مدت‌زمان نگهداری

نتایج مربوط به عدد پراکسید در نمونه‌های 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 نمونه‌ها ۰/۷۵ میلی اکی والان بود که نشان‌دهنده قابل‌قبول بودن فیله‌های تازه است. میانگین عدد پراکسید تیمارها در طول ۱۲ روز دوره نگهداری افزایش و بعد از روز ۱۲ کاهش یافت. همان‌گونه که نتایج نشان می‌دهد بعد از روز اول در تمام‌روزهای دوره نگهداری میانگین مقدار عدد پراکسید در نمونه‌های پوشش شده با کربوکسی متیل سلولز حاوی نانولیپوزوم اسانس رزماری به‌طور معنی‌داری (*P*<۰/۰۵) کمتر از سایر تیمارها بود.



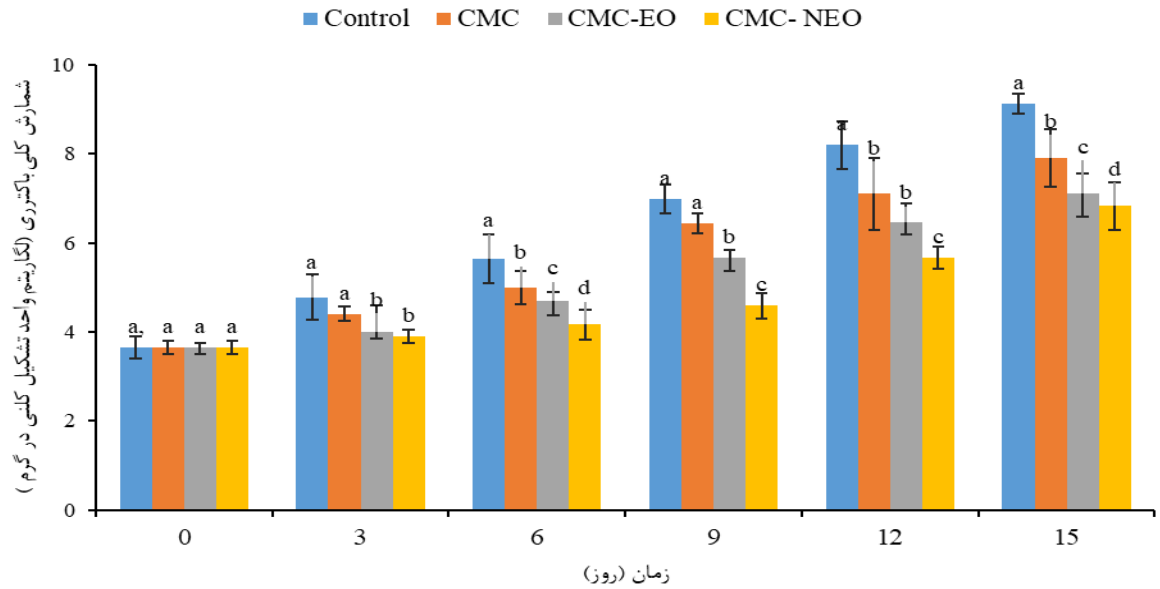
نمودار۱- تغییرات مربوط به عدد پراکسید نمونه‌های فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان طی دورهٔ نگهداری (۱۵ روز در دمای ۴ درجه سلسیوس)

a، b، c و d: تفاوت بین ستون‌های دارای حروف غیرمشابه در هرکدام از روزهای مورد آزمایش معنی‌دار می‌باشد (p <۰/۰۵).

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 مدت‌زمان 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 داده‌شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان TBC در طول مدت‌زمان نگهداری ۱۵ روز در تمامی نمونه‌ها افزایش‌یافته است. همانطوری که مشاهده می‌شود شمارش کلی باکتری‌ها در تمام نمونه‌های تیمار شده حاوی پوشش کربوکسیل متیل سلولز در طی مدت‌زمان نگهداری (۱۵ روز) به طور قابل معنی‌داری کمتر از شاهد (p<۰/۰۵) و از طرف دیگر در نمونه‌های حاوی نانولیپوزوم‌های اسانس رزماری به‌طور معنی‌دار کمتر از سایر تیمارها بود (p<۰/۰۵).

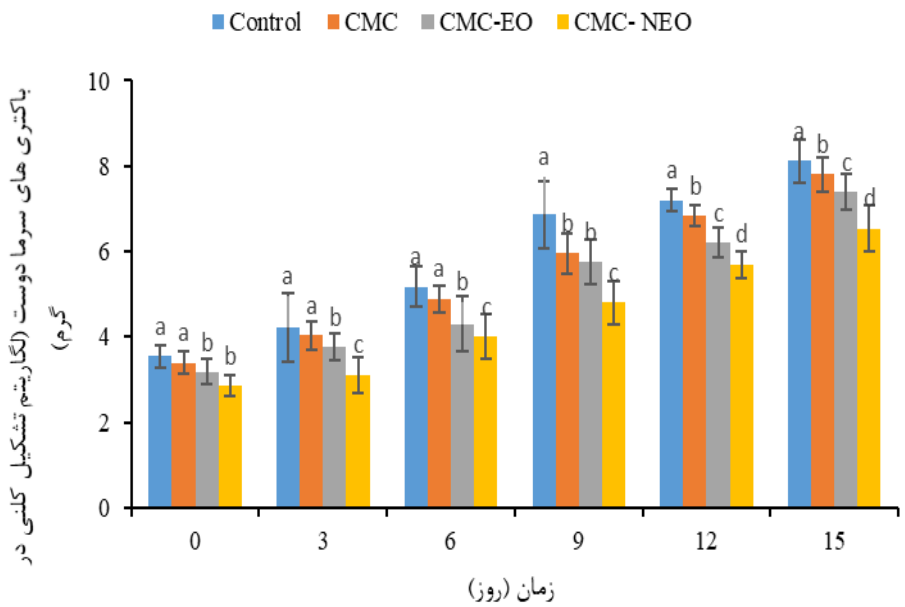


نمودار ۲- تغییرات مربوط به شمارش کلی باکتری‌ها در نمونه‌های فیله ماهی قزل الای رنگین‌کمان طی دورهٔ نگهداری (۱۵ روز در دمای ۴ درجه سلسیوس)

a، b، c و d: تفاوت بین ستون‌های دارای حروف غیرمشابه در هرکدام از روزهای مورد آزمایش معنی‌دار می‌باشد (P <۰/۰۵).

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 سرمادوست در نمودار ۳ نشان داده‌شده است. تعداد اولیه باکتری‌های سرمادوست در نمونه شاهد ۳/۵۵ 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 ۳/۴۰، ۳/۱۸ و ۲/۸۵ Log CFU/g بود. روند رشد این باکتری‌ها شبیه شمارش کلی باکتری‌ها بود، به‌گونه‌ای که بیشترین میزان این باکتری‌ها در روز ۱۵ نگهداری مربوط به نمونه شاهد (۸/۱۲ Log CFU/g) مشاهده شد. همچنین کمترین میزان رشد این باکتری‌ها در روز ۱۵ نگهداری مربوط به نمونه پوشش دهی شده حاوی نانولیپوزوم اسانس رزماری به میزان ۶/۵۴ Log CFU/g بود.

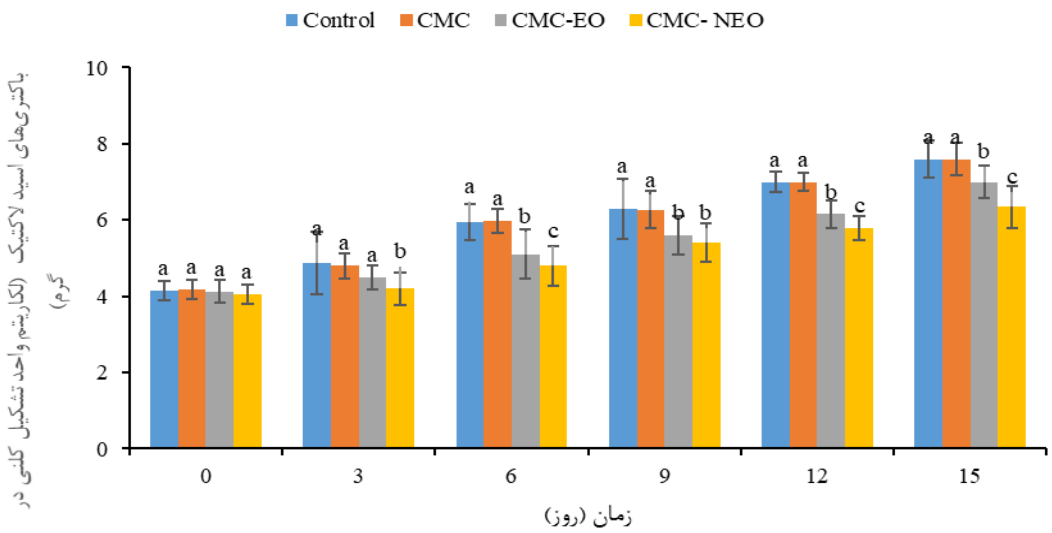


نمودار ۳- تغییرات مربوط به تعداد باکتری‌های سرمادوست نمونه‌های فیله ماهی قزل الای رنگین‌کمان طی دورهٔ نگهداری (۱۵ روز در دمای ۴ درجه سلسیوس)

a، b، c و d: تفاوت بین ستون‌های دارای حروف غیرمشابه در هرکدام از روزهای مورد آزمایش معنی‌دار می‌باشد (P <۰/۰۵).

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 نمودار۴ نشان داده‌شده 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 <۰/۰۵).

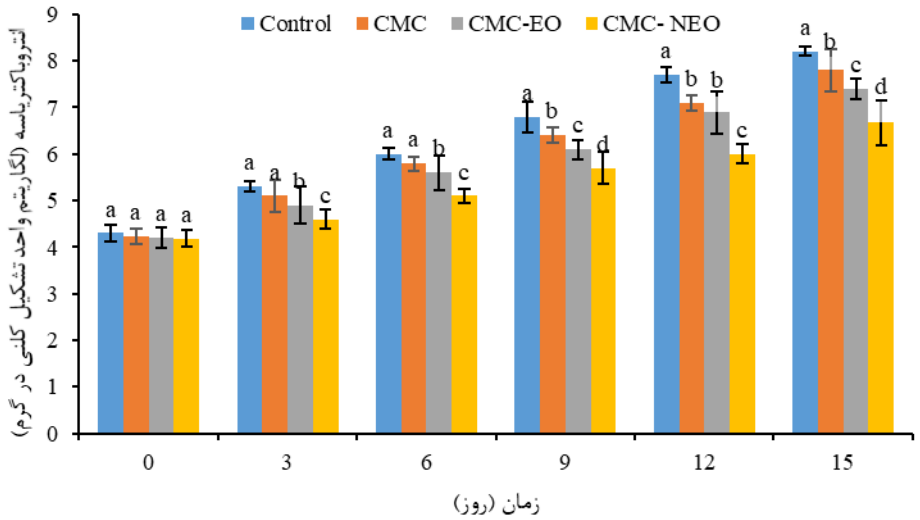


نمودار ۴- تغییرات مربوط تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک نمونه‌های فیله ماهی قزل الای رنگین‌کمان طی دورهٔ نگهداری (۱۵ روز در ۴ درجه سلسیوس)

a، b، c و d: تفاوت بین ستون‌های دارای حروف غیرمشابه در هرکدام از روزهای مورد آزمایش معنی‌دار می‌باشد (P <۰/۰۵).

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 شمارش تعداد انتروباکتریاسه در نمودار ۵ نشان داده‌شده است. در طی مدت‌زمان نگهداری تعداد انتروباکتریاسه در تمامی نمونه‌های 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 انتروباکریاسه بود.



نمودار ۵- تغییرات مربوط به تعداد انتروباکتریاسه نمونه‌های فیله ماهی قزل الای رنگین‌کمان طی دورهٔ نگهداری (۱۵ روز در دمای ۴ درجه سلسیوس)

a، b، c و d: تفاوت بین ستون‌های دارای حروف غیرمشابه در هرکدام از روزهای مورد آزمایش معنی‌دار می‌باشد (p <۰/۰۵).

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 نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، ترکیب عمده موجود در اسانس رزماری اوکالیپتول (۱و۸ سینئول) بود، که با پژوهش ابراهیمی همتی کیخا و همکاران (۲۰۲۲) و جعفری ثالث و همکاران (۲۰۲۰) همخوانی داشت (Ebrahimi hemmati kaykha *et al.*, 2022; Jafari-sales, 2020). در طی مطالعه‌ای گزارش‌شده 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). در پژوهش دیگری گزارش‌شده است که بیشترین ترکیب موجود در اسانس رزماری موردمطالعه 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 انجام‌شده گزارش‌شده است که اسانس مورداستفاده در پژوهش مربوطه دارای ۲۰ ترکیب بود که ۸۲/۰۹ درصد از ترکیبات حاصله را اوکالیپتول، الفا-پینن، وربنون، کامفور، بربونون و لیمونن را تشکیل می‌دادند (Malakootian and Hatami, 2013).

اندازه نانولیپوزوم‌های به‌دست‌آمده به وسیله میکروسکوپ الکترونی اتمی با اندازه‌های به‌دست‌آمده از طریق تفرق نور پویا تطابق داشت. با توجه به شکل ۱ وزیکول‌های 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 به‌صورت 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 ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی دو نوع اسانس (رزماری و پونه کوهی) موردبررسی 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 گزارش‌شده 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 گزارش‌شده که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس رزماری به روش DPPH برابر با ۷۸/۷۴ درصد بود که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد (Ebrahimi hemmati kaykha *et al.*, 2022).

حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی نانولیپوزوم حاوی اسانس رزماری در هر دو سویه باکتریایی گرم منفی و گرم مثبت به‌طور معنی‌دار کمتر از فرم آزاد بود ($p<۰/۰۵$) به‌عبارت‌دیگر قدرت ضدمیکروبی نانولیپوزوم حاوی اسانس رزماری در هر دو باکتری گرم منفی و گرم مثبت به‌طور معنی‌دار بیشتر از اسانس آزاد می‌باشد ($P<۰/۰۵$). 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

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 لیپوپلی‌ساکارید 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 لیپوپلی‌ساکارید دیواره سلولی در اثر نفوذ مولکول‌های مختلف آنتی‌بیوتیک و همچنین آنزیم-هایی 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 دارد (Mojaddar Langroodi *et al.*, 2018). افزایش pHمی‌تواند 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. به‌طورکلی، 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 موردبررسی 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 درنتیجه 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

شده با سرعت بیشتری افزایش یافت. انـدیس پراکسـید در تمامی نمونه‌ها از روز ۶ به بعد بـا سـرعت بیشـتری افزایش یافت امـا از روز ۱۲ بـه بعـد انـدیس پراکسـید کاهش یافت. همان‌گونه که اشاره‌شـده هیـدرو پراکسـید بسیار ناپایداری است که پس از تولید به سایر ترکیبـات ثانویه دیگر تبدیل می‌شـوند و همـین امـر سـبب رونـد کاهشی در آن‌ها می‌شـود (Ozogul *et al.*, 2005). حـد مجاز اندیس پراکسید در حدود ۱۰ الـی ۲۰ میلـی اکـی والان گرم پراکسید بر کیلوگرم چربی می‌باشد (Ghomi *et al.*, 2011). که میزان آن در تیمارهای پوشـش دهـی شده موردبررسی در طول مدت‌زمان نگهـداری (۱۵ روز ۴ درجه سلسیوس) کمتر از ۱۰ میلی اکی والان بـود کـه می‌تواند نشان‌دهنده تأثیر هم‌افزایی بین کربوکسیل متیـل سلولز و فرم آزاد و نـانولیپوزوم اسـانس رزمـاری باشـد (Li *et al.*, 2017).

گزارش‌شـده اسـت کـه بـالاترین میـزان TBC قابل‌قبول در گوشت ماهی در حدود 10^{7} Log CFU/g– 10^{6} در مدت ۳ روز ذخیره‌سازی اسـت (Ozgul *et al.*, 2004). مقدار اولیه TBC در تمامی نمونـه‌هـا برابـر بـا ۳/۶۵ Log CFU/g بـود کـه در طـول مـدت‌زمان نگهداری این میزان برای تمامی نمونه‌ها افـزایش یافـت اما بااین‌وجود سرعت رشد در نمونه‌های پوشـش دهـی شده کمتر از نمونه کنترل بـود. میـزان افـزایش TBC در پایـان دوره نگهـداری ۱۵ روز در نمونـه‌هـای شـاهد، نمونه‌ی پوشش دهی شـده بـا کربوکسـی متیـل سـلولز، پوشش خوراکی فعال حاوی فرم آزاد و نانولیپوزوم‌های اسانس رزماری به ترتیب به حـدود ۹/۱۲ ، ۷/۹۰، ۷/۱۲ و ۶/۸۳ Log CFU/g بود. در تحقیقی گزارش‌شده کـه TVC ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در طـی ۲۰ روز دوره نگهداری در دمای ۳ درجه سلسـیوس از مقـدار اولیـه ۴ Log CFU/g به ۷/۰۴ Log CFU/g افزایش یافت (Rezaei *et al.*, 2008). در مطالعه دیگر بیـان شـده کـه استفاده از پوشش خوراکی مکمل با اسانس مـی‌توانـد از رشـد میکروارگانیسـم‌هـا جلـوگیری نمایـد زیـرا ایـن ترکیبات قادر به تخریـب سـاختاری لیپیـدها در غشـای میتوکندری و سلولی باکتری‌ها مـی‌گردنـد (Mojaddar Langroodi *et al.*, 2018). اسـانس رزمـاری حـاوی مقداری از عوامل فنولیک و ترپنوئیدها اسـت کـه دارای فعالیت ضـدمیکروبی مـی‌باشـد. در مطالعـه دیگـری از پوشش ژلاتین ماهی حاوی اسـانس پونـه کـوهی بـرای کاهش شمارش کلی باکتری‌هـا در فیلـه‌هـای قـزل‌آلای رنگین‌کمان در یخچـالی اسـتفاده نمودنـد. نتـایج آن‌هـا نشان داد که شمارش کلـی باکتری‌هـا در نمونـه‌های بـا پوشش ژلاتین حاوی اسانس پونـه کـوهی در طـول ۱۲ روز به حدود log CFU/g ۶ افزایش یافت در حالیکـه در نمونه‌های شاهد در طول ۸ روز به این عـدد رسـید (Hosseini *et al.*, 2016).

باکتری‌های سرمادوست، باکتری‌هایی هستند که در دمای ۷ درجه سانتی‌گراد یا کمتـر از آن بـه‌خوبی رشـد می‌کنند و دمای بهینه‌شان برای رشد بین ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد است (El-Tawab *et al.*, 2019). این دسـته از باکتری‌ها ازجمله مهم‌تـرین میکروارگانیسـم‌هـای عامـل فساد ماهی در طول مدت‌زمان نگهـداری دماهـای سـرد هستند (Ibrahim Sallam, 2007). اعداد اولیه باکتری‌های سرمادوسـت در نمونـه شـاهد ۳/۵۵ Log CFU/g و در نمونه‌ی پوشش دهی شـده بـا کربوکسـی متیـل سـلولز، پوشش دهی شده با کربوکسی متیـل سـلولز فـرم آزاد و نانولیپوزوم اسـانس رزمـاری بـه ترتیـب ۳/۴۰، ۳/۱۸ و ۲/۸۵ Log CFU/g بود. بیشترین تعداد ایـن بـاکتری‌هـا در روز ۱۵ نگهـداری مربـوط در نمونـه شـاهد (Log CFU/g

۸/۱۲) مشاهده شد. در تحقیقی گزارش‌شده که تعداد کل باکتری‌های سرمادوست در ماهی پوشش دهی شده با فیلم در روزهای ششم و هفتم نگهداری به حدود Log CFU/g ۶/۶۹- ۶/۶۴ می‌رسد (Erkan *et al.*, 2007). در طی مطالعه‌ای اثر تیمارهای جداگانه و ترکیبی نایسین، اسانس رزماری (نانومولسیون 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 <۰/۰۵). در تحقیقی گزارش‌شده 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 پژوهش آن‌ها نشان داد که تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک در طی مدت‌زمان نگهداری روند افزایشی داشت به‌گونه‌ای که در انتهای روز ۹ تعداد این باکتری-ها به Log CFU/g ۵ 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 میکروارگانیسم‌های 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 انتروباکریاسه بود (نمودار ۵). در طی پژوهشی گزارش‌شده است که اسانس و پوشش‌های خوراکی قادر به مهار باکتری‌های انتروباکتریاسه می-باشند (Dahham *et al.*, 2010). در مطالعه دیگری گزارش‌شده 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 داده‌شده 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 این‌گونه از فرآورده‌ها به سرعت تحت تأثیر فعالیت میکروارگانیسم‌ها و اکسیداسیون چربی قرار می‌گیرند. با

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، به‌طورکلی 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 نانوامولسیونی 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 برعلیه هر دو باکتری گرم منفی و گرم مثبت به‌طور معنی‌دار کمتر از اسانس آزاد بود. پوشش حاوی نانولیپوزوم اسانس رزماری اثر مهاری 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 برعلیه 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. درمجموع 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 منافعی 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., Milkievicz, 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, ungutting 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 Savvaidis, 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.