بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد پنجم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۵
http://japu.gau.ac.ir

اثر فیلم زیست نانوکامپوزیت فعال شده با اسانس پونه کوهی خالص و نانولیپوزوم شده بر کیفیت و ماندگاری فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykis*)

*محسن کاظمی[۱]، بهاره شعبانپور[۲] و پرستو پورعاشوری[۳]
[۱]کارشناس‌ارشد فرآوری محصولات شیلاتی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[۲]استاد گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[۳]استادیار گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/٤/۱۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/٦/۲۱

چکیده

سرعت فسادپذیری بالا در ماهی سبب می‌گردد تا دوره ماندگاری آن محدود باشد. یکی از راهکارهای مورد توجه در این رابطه استفاده از فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی به‌عنوان حامل افزودنی‌های طبیعی با خواص ضد میکروبی و ضد اکسیدانی است. در این تحقیق از فیلم نانوکامپوزیتی پروتئین میوفیبریل ماهی- نانوفیبرسلولز غنی شده با اسانس پونه کوهی خالص و ریزپوشانی شده (۲ درصد اسانس) به‌عنوان عامل نگهدارنده روی فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان استفاده شد. ریزپوشانی به‌منظور تقویت اثر و بهبود پایداری اسانس در محیط طبیعی به‌کار گرفته شد. نتایج حاصل از آزمون‌های میکروبی (بارباکتریایی کل، سرمادوست، انتروباکتریاسه و سودوموناس) نشان داد که فیلم‌های فعال روند رشد و میزان نهایی باکتری‌های مختلف عامل فساد را به شکل معنی‌داری کاهش دادند. مشاهدات حاصل از آزمون حسی نیز همسو با آزمون‌های میکروبی بود و در واقع تحت تأثیر کنترل رشد میکروبی، تیمارهای فعال نمره حسی بالاتری نسبت به تیمار شاهد نشان دادند. فیلم محتوی اسانس ریزپوشانی شده به‌ویژه در روزهای ابتدایی (تا روز ۸) از جنبه آزمون‌های مختلف شرایط بهتری نسبت به پوشش محتوی

*مسئول مکاتبه: kazemi_mohsen@yahoo.com

اسانس خالص داشت که این مطلب نشان دهنده تقویت اثر ضد میکروب و بهبود پایداری اسانس در محیط طبیعی عمدتاً تا حدود یک هفته پس از اعمال فیلم‌ها بود.

واژه‌های کلیدی: پروتئین میوفیبریل، فیلم، اسانس پونه کوهی، نانولیپوزوم، قزل‌آلای رنگین‌کمان

مقدمه

ماهی و سایر آبزیان به سبب فعالیت آبی بالا، PH خنثی، نسبت بالای اسیدهای آمینه آزاد، اسیدهای چرب چند غیراشباع و همچنین حضور آنزیم‌های اتولیتیک، درگیر مکانیسم‌های مختلف فساد از قبیل پیشرفت میکروبی، اکسیداسیون چربی و همچنین قهوه‌ای شدن آنزیمی شده و متعاقباً کیفیت و مدت ماندگاری آن‌ها کاهش می‌یابد (جیاسیکاران و همکاران، ۲۰۰٦؛ جوکی و همکاران، ۲۰۱٤؛ کای و همکاران، ۲۰۱۵). بنابراین به‌کار گرفتن اقدامات لازم جهت به تأخیر اندختن فساد این محصولات امری ضروری است. به‌طور کلی یکی از اصول و اهدف نگهداری ماهی تأخیر فساد به‌وسیله کاهش یا ممانعت از فعالیت میکروارگانیسم‌های عامل فساد است (جیاسیکاران و همکاران، ۲۰۰٦). یکی از روش‌هایی که در این زمینه در دو دهه اخیر توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده است، استفاده از پوشش‌ها و فیلم‌های خوراکی با قابلیت ضد میکروبی می‌باشد که کاربرد آن‌ها، از مزایای گوناگونی از جمله، داشتن ارزش تغذیه‌ای (دیوتینک و همکاران، ۱۹۹۸) و حاملی برای مواد افزودنی (شاو و همکاران، ۲۰۰۱)، برخوردار است. پروتئین‌های میوفیبریل حاصل از عضله ماهی می‌توانند در تولید فیلم‌های خوراکی به‌کار گرفته شوند، این پروتئین‌ها کاملاً کشسان بوده و قابلیت پیوند با یکدیگر را دارا هستند، بنابراین قادر به تشکیل ماتریکسی پیوسته در فیلم می‌باشند (شیکو و همکاران، ۲۰۰۳). با این وجود، به‌طور کلی خصوصیات مکانیکی فیلم‌های پروتئینی ضعیف است و در مقابل بخار آب بازدارندگی پایینی دارند. یکی از جدیدترین روش‌ها به‌منظور بهبود خواص فیلم‌های پروتئینی استفاده از فناوری نانو و تولید نانوکامپوزیت‌ها می‌باشد (آرورا و پاردوآ، ۲۰۰۹). سلولز یکی از فراوانترین پلی ساکاریدهای موجود در طبیعت است (خان و همکاران، ۲۰۱۲). به‌دلیل ویژگی‌های فیزیکو شیمیایی مطلوب، تجدیدپذیری و پایداری خوب، قیمت پایین، دسترسی آسان، وزن کم، ابعاد در مقیاس نانو و ویژگی های مورفولوژی منحصر به فرد امروزه به‌طور گسترده به‌عنوان یک عامل تقویت کننده و یا پرکننده در نانوکامپوزیت‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (لیو و همکاران، ۲۰۱۰). همچنین اخیراً محققان بر استفاده از نانوکامپوزیت‌ها در تولید انواع جدیدی از بسته‌بندی‌های فعال با شرکت ترکیبات ضد میکروب تمرکز داشته‌اند (وو و همکاران، ۲۰۱٤) و با توجه به مشکلات ناشی از

مصرف نگهدارنده‌های شیمیایی، مواد ضد میکروب طبیعی در این رابطه توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند (داویدسون و زیوانوویچ، ۲۰۰۳). یک دسته از مواد ضدمیکروب طبیعی، اسانس‌های گیاهی مثل پونه کوهی می‌باشند که ترکیب، ساختار و گروه‌های عاملی این ترکیبات می‌توانند نقش مهمی را در فعالیت ضدمیکروبی آن‌ها ایفا نمایند (هالی و پاتل، ۲۰۰۵). با توجه به بوی تند پونه کوهی و اثر نامطلوب آن روی ماده غذایی و همچنین به‌منظور طولانی تر کردن اثر بخشی و جلوگیری از تبخیر ناشی فرار بودن اسانس‌های طبیعی می‌توان آن‌ها را برای کاربردهای غذایی ریز پوشانی کرد (چو و همکاران، ۲۰۰۳؛ خیمنز و همکاران، ۲۰۱٤). ریز پوشانی تکنولوژی پوشش دهی مواد جامد، مایع و گازی در محفظه‌های کوچک به‌منظور دستیابی به دامنه کنترل شده و مطلوب آزاد شدن ماده است (کلی پرادیت و هوانگ، ۲۰۰۸). ریز پوشانی کردن اسانس‌ها در محیط آبی به ترکیبی آمفیفیلیک (دارای دو سر آبدوست و آبگریز) مثل لسیتین نیاز دارد و همچنین با توجه به خواص آب دوستی پوشش‌های حاصل از پروتئین و کربوهیدرات، استفاده از لیپیدها به‌عنوان لیپوزوم ریزپوشاننده می‌تواند به‌عنوان ترکیبی آبگریز در اصلاح خواص آب دوستی آن‌ها مؤثر باشد (خیمنز و همکاران، ۲۰۱٤). در این راستا لیولیوس و همکاران (۲۰۰۹) مشاهده کردند که ریزپوشانی دو ترکیب کارواکرول و تیمول در ریزامولسیون‌ها (لیپوزوم) سبب ارتقا خاصیت ضد میکروبی آن‌ها نسبت به شکل ریزپوشانی نشده این ترکیبات شد. بنابر مطالب عنوان شده، در تحقیق حاضر فیلم‌های نانوکامپوزیتی پروتئین‌میوفیبریل ماهی- نانوفیبرسلولز در ترکیب با اسانس پونه کوهی ریزپوشانی شده و خالص بهینه تعیین شده از مراحل قبل، تولید شده و اثر آن‌ها بر حفظ کیفیت و افزایش زمان ماندگاری فیله تازه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان طی مدت نگهداری در یخچال، بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تولید پروتئین میوفیبریل: ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) به‌صورت تازه از بازار ماهی فروشان شهر گرگان تهیه شده و پس از شست و شو با آب، استخوان‌گیری شد. گوشت چرخ شده حاصله به‌منظور استخراج پروتئین‌های میوفیبریل مورد استفاده قرار گرفت (لیمپان و همکاران، ۲۰۱۲). بدین منظور ابتدا گوشت چرخ شده ماهی با ۳ برابر حجم خودش آب مقطر سرد مخلوط شده و در دور ۱۳۰۰۰ به‌مدت ۲ دقیقه هموژن شد. سپس توسط یک پارچه نایلونی آبگیری شده و در مرحله بعد گوشت چرخ شده با ۵ برابر حجم خودش آب نمک ۰/۵ میلی‌مولار مخلوط و متعاقباً هموژن و آبگیری گردید. فرآیند شست و شو دو بار تکرار شد.

روش تهیه نانولیپوزوم‌های اسانس پونه کوهی: نانولیپوزم‌ها طبق روش خیمنز و همکاران (۲۰۱٤) با کمی تغییر تولید شدند. ابتدا ۲ گرم لسیتین + ۲ گرم توئین ۸۰ در ۳۸ گرم آب مقطر مخلوط و برای ۵ ساعت تکان داده شدند. در مرحله بعد ٤ گرم اسانس پونه کوهی به دیسپرسیون آبی لسیتین اضافه شده و کل مخلوط به‌مدت ٤۰۰ ثانیه (۱ ثانیه روشن و ۱ ثانیه خاموش) در ٤۰ KHz و ٤۰ درصد قدرت دستگاه تحت شرایط سونیکاسیون قرار گرفت. ترکیب ضد میکروب با هدف تقویت و پایدارتر شدن اثر ضدمیکروبی آن به فرمولاسیون اضافه شد. نانولیپزوم‌های تولیدی تا زمان استفاده در بطری‌های استریل و در شرایط تاریک نگهداری شدند.

بررسی سایز نانولیپوزوم‌ها: میانگین اندازه ذرات نانولیپوزوم‌ها با استفاده از دستگاه مالورن زتاسایزر (نانو ZS) (Malvern Instruments, Worcestershire, U.K.) به‌وسیله روش پخش نور لیزر بررسی شد. قبل از اندازه‌گیری نمونه توسط آب دوبار تقطیر رقیق شد (۱:۱۰۰). سپس نمونه درون یک سلول استوانه‌ای ریخته شده و به‌شکل عمودی در دستگاه قرار گرفت. اندازه‌گیری در ۵ تکرار صورت پذیرفت (خیمنز و همکاران، ۲۰۱٤).

تولید فیلم‌های فعال: تولید محلول فیلم‌ساز پروتئینی به روش لیمپان و همکاران (۲۰۱۲) با کمی اصلاح انجام شد و در مرحله بعد محلول ژلی سفید رنگ و اولتراسوند شده نانوفیبرهای سلولز با نسبت (وزن پروتئین/ وزن) ۰/٤ درصد (بهینه مراحل قبل) به محلول پروتئینی افزوده شده و به‌منظور توزیع مناسب نانوذرات، محلول در دور ۱۸۰۰۰rpm همگن شد (تروواتی و همکاران، ۲۰۱۲). اسانس پونه کوهی خالص و نانولیپوزوم شده با غلظت ۲ درصد (حجمی/ حجمی) (بهینه مراحل قبل) به محلول فیلم‌ساز افزوده شدند. در مرحله بعد محلول‌های فیلم ساز، حباب‌زدایی شده و در پلیت‌های کاملاً مسطح در دمای ۲٦ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۵۰ درصد به‌مدت ۲٤ ساعت خشک شدند.

آماده‌سازی ماهی و اعمال فیلم‌ها: ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تازه با میانگین وزنی ٤۰ ± ۳۰۰ گرم تهیه و به شکل کاملاً یخ‌پوشی شده به آزمایشگاه فرآوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شد. بعد از مراحل تخلیه شکمی و سرزنی، فیله‌های تهیه شده به خوبی شستشو و جهت حذف آب اضافی زیر هود قرار گرفتند. در مرحله بعد فیله‌ها با فیلم‌های موردنظر پوشانده شده و تیماربندی بدین شکل صورت گرفت: شاهد (فاقد فیلم)؛ نمونه‌های پوشش داده با نانوکامپوزیت پروتئین- نانوفیبر سلولز؛ نانوکامپوزیت پروتئین- نانوفیبر سلولز محتوی ۲ درصد اسانس؛

نانوکامپوزیت پروتئین- نانوفیبر سلولز محتوی ۲ درصد اسانس نانولیپوزوم شده. در پایان فیله‌های مربوطه در ظروف مخصوص قرار گرفته و به یخچال منتقل شدند و به‌مدت ۱٦ روز در فواصل زمانی ٤ روز مورد ارزیابی قرار گرفتند.

بررسی میزان بار میکروبی: نخست میزان ۵ گرم از نمونه فیله ماهی تحت شرایط استریل با ٤۵ میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژی مخلوط و سپس هموژن گردید. در ادامه رقت‌های موردنیاز تهیه و میزان ۱ میلی‌لیتر از هرکدام جهت کشت و بررسی بار باکتریای کل، سرمادوست، سودوموناس و انتروباکتریاسه به روش پور پلیت به‌ترتیب در محیط‌های کشت پلیت کانت آگار (PCA)، ستریماید آگار (CA) و وی آر بی جی آگار (VRBGA)، مورد استفاده قرار گرفتند. شمارش بار باکتریایی سرمادوست و کل به‌ترتیب در دمای ۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ روز و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ روز انجام گرفت (جوکی و همکاران، ۲۰۱٤). همچنین بررسی تعداد باکتری‌های سودوموناس و انتروباکتریاسه به‌ترتیب در دماهای ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ روز انجام پذیرفت (گومز- استاکا و همکاران، ۲۰۱۰).

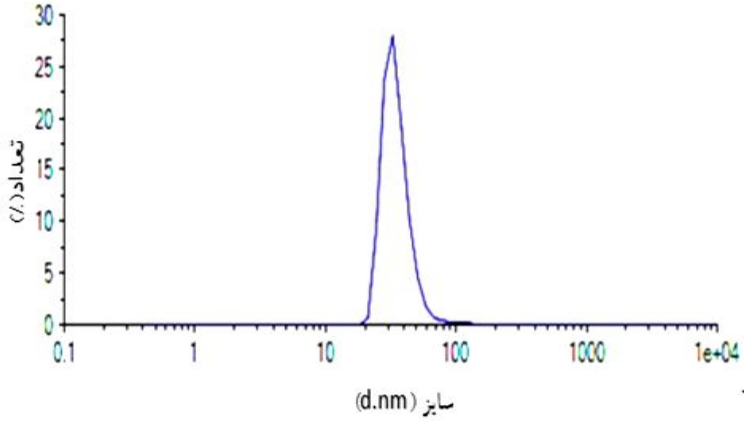
ارزشیابی حسی: ارزشیابی حسی نمونه‌ها توسط ۷ فرد که قبل از تست آموزش دیده بودند (افراد نیمه آموزش دیده)، و با آزمون ۵ امتیازی انجام شد. امتیازدهی به هریک از ویژگی‌ها به‌صورت زیر انجام گرفت: بافت (۵، بافت محکم و سفت؛ ۱، بافت خیلی نرم)، رنگ (۵، بدون تغییر رنگ؛ ۱، کاملاً بی‌رنگ)، بو (۵، کاملاً مطبوع؛ ۱، بوی فساد)، مقبولیت کلی (۵، کاملاً مقبول، ۱؛ کاملاً نامقبول). نقطه بحرانی مقبولیت هر یک از ویژگی‌ها ۳ در نظر گرفته شد و پایین‌تر از آن به معنای رد خصوصیات حسی موردنظر بود (اجاق و همکاران، ۲۰۱۰).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام گرفت. ابتدا بررسی نرمال بودن و همگنی واریانس داده‌ها به‌ترتیب با استفاده از آزمون‌های کولموگراف- اسمیرنوف (Kolomogorav-Smirnov) و لون (Leven) انجام گرفت. سپس به‌منظور تجزیه و تحلیل مقادیر کمی به‌دست آمده از آنالیزهای میکروبی و حسی از تجزیه واریانس (ANOVA) و همچنین برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده شد. مقایسه‌های آماری در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام پذیرفت و تمامی نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه گردید.

نتایج و بحث

بررسی سایز نانولیپوزوم‌ها: نمودارهای مرتبط با توزیع اندازه ذرات و همچنین پتانسیل زتا نانولیپوزوم‌های تولید شده در شکل ۱ نشان داده شده است. طبق نتایج بیشینه توزیع اندازه نانوذرات در محدوده زیر ۱۰۰ نانومتر بود. بنابراین سایز نانولیپزوم با آنچه که برای کاربردهای غذایی و دارویی نیاز است مطابق بود (وو و همکاران، ۲۰۱٤). اندازه نانولیپوزوم‌ها به‌دلیل تأثیر بر پایداری، ظرفیت آزادسازی ترکیبات محصور شده در هسته و همچنین تأثیر بر خواص مختلف فیلم‌های تولیدی حاوی آن‌ها مورد توجه است. گزارش شده است که اندازه ذرات چربی موجود در امولسیون تشکیل دهنده فیلم، بر خواص مختلفی از قبیل مکانیکی و سد کنندگی فیلم‌های حاصل مؤثر است. در حالت کلی سایز کوچک به‌دلیل تأثیر بر افزایش انعطاف‌پذیری و ظرفیت سد کنندگی فیلم و همچنین فراهم شدن ساختار همگن تر در آن ها مطلوب است. از طرفی سایز نانوذرات (نانولیپوزوم‌ها) از آنجایی که می‌تواند بر سلامت انسان و محیط‌زیست مؤثر باشد باید کنترل شود (خیمنز و همکاران، ۲۰۱٤). در این تحقیق نتایج مرتبط با اندازه ذرات نانولیپوزوم با کارهای مشابه انجام شده توسط ژانگ و همکاران (۲۰۱۲) و همچنین خیمنز و همکاران (۲۰۱٤) مطابقت داشت و اندک تفاوت مشاهده در نتایج (کوچکتر بودن اندازه نانولیپوزوم‌ها در این تحقیق) می‌تواند به‌دلیل تفاوت در زمان سونیکاسیون و همچنین مواد شرکت کننده در دیسپرسیون باشد به‌دلیل آن‌که گزارش شده است که نانولیپوزوم‌های بارگذاری شده با ترکیبات ضد میکروبی (اسانس روغنی) سایز کمتری را نسبت به نانولیپوزوم‌های بدون این ترکیبات نشان دادند (خیمنز و همکاران، ۲۰۱٤).

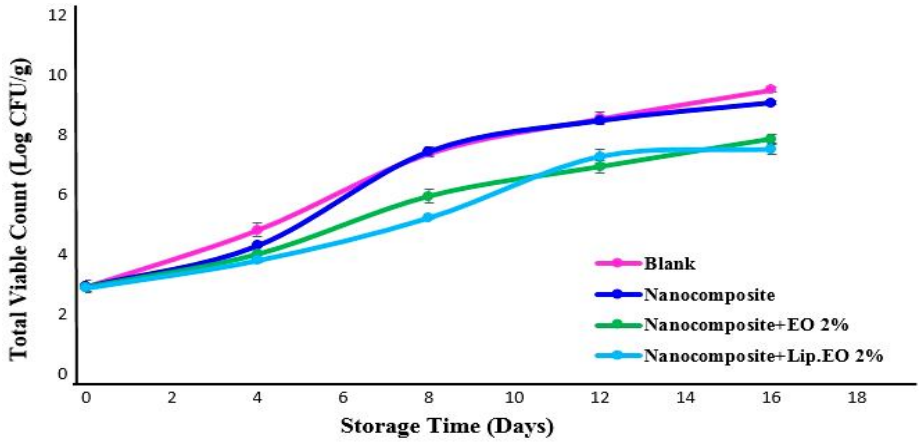


شکل ۱- نمودار مرتبط با توزیع اندازه ذرات نانولیپوزوم‌های محتوی اسانس پونه کوهی.

آزمون‌های میکروبی: در ماهی تازه، میکروارگانیسم‌های عامل فساد بخش کوچکی از کل فلور میکروبی را تشکیل می‌دهند. در طول زمان نگهداری این ارگانیسم‌ها سریع‌تر از باقی میکروفلور موجود رشد کرده و سبب تولید متابولیت‌هایی می‌شوند که مسئول طعم و بوی بد و به تبع آن رد کیفیت تغذیه‌ای آن توسط مصرف‌کنندگان می‌شوند. جنس سودوموناس و باکتری‌های اسید لاکتیک به‌طور کلی در فلور عامل فساد ماهی غالب‌اند. باکتری‌های گرم منفی مختلفی از قبیل انتروباکتریاسه نیز در این زمینه مطرح هستند (گرم و هوس، ۱۹۹٦؛ کاظمی و همکاران، ۲۰۱۵).

نتایج مرتبط با تغییرات بارباکتریایی کل (TVC) تیمارهای مختلف در شکل ۲ نشان داده شده است. تمامی تیمارها در روز صفر شرایط تقریباً مشابهی نشان دادند و بین آن‌ها اختلاف چندانی مشاهده نشد. میزان کم بار باکتریای کل در روز صفر نگهداری نشان‌دهنده کیفیت بهداشتی مناسب ماهی از مرحله صید تا مصرف است. میزان پایین TVC فیله ماهی قزل‌آلا در روز صفر در کارهای مشابه مختلف گزارش شده است (اجاق و همکاران، ۲۰۱۰؛ جوکی و همکاران، ۲۰۱٤؛ کاظمی و همکاران، ۲۰۱۵). با گذشت زمان میزان بار باکتریایی کل برای تمامی نمونه‌ها روند افزایشی نشان داد به‌طوری که به بالاترین سطح خود در روز ۱٦ رسید. افزایش بار باکتریایی کل در طول زمان نگهداری سرد توسط اجاق و همکاران (۲۰۱۰) گزارش شده است. در بررسی مقایسه‌ای بین تیمارهای مختلف مشخص شد که نانوکامپوزیت فاقد اسانس تأثیر اندکی در کنترل روند رشد این نوع از باکتری‌ها داشت. تیمارهای حاوی اسانس و اسانس نانولیپوزوم شده در طول زمان نگهداری به شکل معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) نسبت به دو تیمار دیگر سبب کنترل و کندتر شدن روند افزایشی میزان بار باکتریایی کل شدند. ICMSF (۲۰۰۲) بار باکتریایی کل در حد ۷ Log CFU/g را به‌عنوان آخرین میزان مجاز پذیرش برای گونه‌های ماهی آب شور و شیرین معرفی کرده است. بنابراین در این تحقیق فیلم‌های فعال از نظر این شاخص سبب افزایش زمان ماندگاری فیله‌ها تا روز دوازدهم شدند. این افزایش احتمالاً ناشی از اثر اسانس خالص و نانولیپوزوم شده بر رشد باکتری‌های موجود در فیله و ممانعت از آن است. نتایج مشابهی در زمینه کاربرد اسانس‌ها در کنترل بارباکتریایی کل فیله ماهی توسط دیگر محققان گزارش شده است (اجاق و همکاران، ۲۰۱۰؛ احمد و همکاران، ۲۰۱۲؛ جوکی و همکاران، ۲۰۱٤؛ کاظمی و همکاران، ۲۰۱۵). همچنین میزان این شاخص در پوشش‌های محتوی اسانس نانولیپوزوم شده نسبت به اسانس خالص در روز ۸ به‌طور قابل ملاحظه‌ای کمتر بود که این می‌تواند

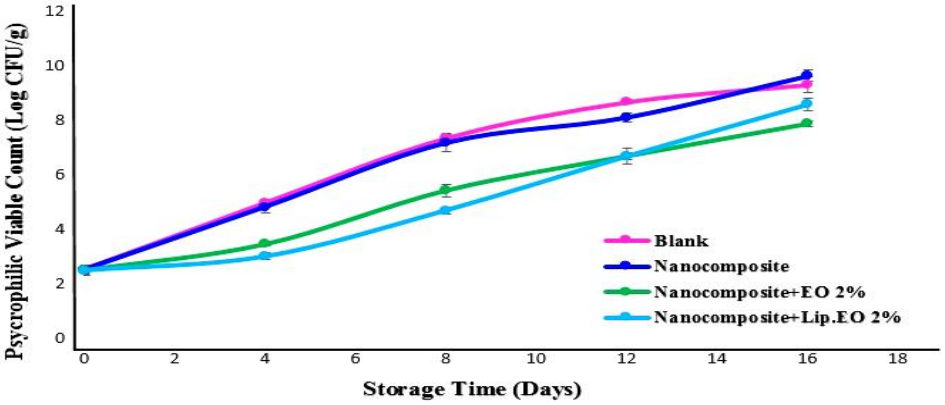
ناشی از اثر سینرژیستی و یا پایدارکنندگی نانولیپوزوم بر اسانس پونه کوهی باشد (لیولیوس و همکاران، ۲۰۰۹؛ وو و همکاران، ۲۰۱٤).



شکل ۲- تغییرات باریاکتریایی کل فیله‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تیمار شده با فیلم‌های مختلف طی مدت نگهداری در یخچال (٤±۲°C)؛ Balnk: شاهد؛ Nanocomposite: نمونه‌های پوشش داده شده با فیلم نانوکامپوزیت پروتئین میوفیبریل- نانوفیبر سلولز؛ Nanocomposite+EO 2%: نمونه‌های پوشش داده شده با فیلم نانوکامپوزیت محتوی ۲ درصد اسانس پونه کوهی؛ Nanocomposite+Lip.EO 2%: نمونه‌های پوشش داده شده با فیلم نانوکامپوزیت محتوی ۲ درصد اسانس پونه کوهی نانولیپوزوم شده؛ داده‌ها به‌صورت میانگین (حداقل ۳ تکرار)± انحراف معیار گزارش شده است.

باکتری‌های گرم منفی سرمادوست (PTC) گروه اصلی از میکروارگانیسم‌های عامل فساد هوازی ماهیان تازه ذخیره‌سازی شده در دمای سرد می‌باشند (گرم و هوس، ۱۹۹٦؛ اجاق و همکاران، ۲۰۱۰؛ کاظمی و همکاران، ۲۰۱۵). میزان اولیه (شکل ۳) آن‌ها در تیمارهای مختلف پایین بود که نشان دهنده رعایت نکات بهداشتی و شرایط مناسب ماهی قبیل از تیماربندی است. این شاخص در طول دوره نگهداری در تمامی تیمارها به شکل معنی‌داری افزایش یافت اما روند افزایشی آن در تیمارهای محتوی اسانس خالص و نانولیپوزوم نسبت به شاهد شیب کمتری نشان داد ($p<۰/۰۵$). از طرفی در روزهای میانی شرایط تیمارهای محتوی اسانس نانولیپوزوم نسبت به خالص بهتر بود اما در روزهای پایانی این دو تیمار عملاً اختلافی باهم نداشتند ($p>۰/۰۵$). این پدیده می‌تواند با توانایی نانولیپوزوم‌ها در پایدار کردن اثر اسانس تا روز ۷ مرتبط باشد که احتمالاً در روزهای بعد تأثیر آن کاهش یافته و اختلاف موجود بین دو تیمار کم

شده است. به‌طور کلی اعمال تیمارهای فعال روی فیله ماهی سبب شد بالاترین حد مجاز بارباکتریایی سرمادوست (۷Log CFU/g) از روز ۸ در تیمار شاهد به روز ۱۲ افزایش یابد. احمد و همکاران (۲۰۱۲) نتایج مشابهی را در زمینه کاهش بارباکتریایی سرمادوست به‌وسیله اعمال فیلم‌های خوراکی فعال شده با اسانس علف لیمو[1] گزارش کردند. همچنین فیلم‌های کیتوزانی حاوی اسانس دارچین در کاهش میزان رشد باکتری‌های سرمادوست فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تأثیر معنی‌داری داشتند (اجاق و همکاران، ۲۰۱۰). از طرفی جوکی و همکاران (۲۰۱٤) و کاظمی و همکاران (۲۰۱۵) اثر مثبت اسانس پونه کوهی را بر کاهش روند رشد باکتری‌های سرمادوست نشان دادند.

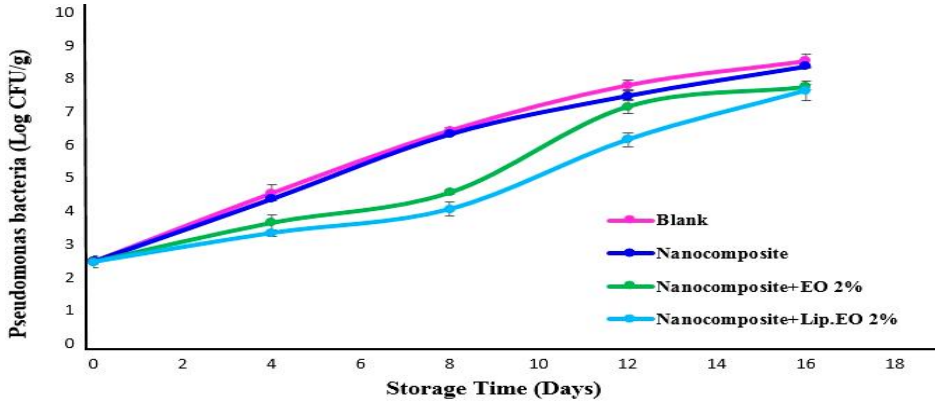


شکل ۳- تغییرات بارباکتریایی سرمادوست (PTC) فیله‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تیمار شده با فیلم‌های مختلف طی مدت نگهداری در یخچال (٤±۲°C)؛ Balnk: شاهد؛ Nanocomposite: نمونه‌های پوشش داده شده با فیلم نانوکامپوزیت پروتئین میوفیبریل- نانوفیبر سلولز؛ Nanocomposite+EO 2%: نمونه‌های پوشش داده شده با فیلم نانوکامپوزیت محتوی ۲ درصد اسانس پونه کوهی؛ Nanocomposite+Lip.EO 2%: نمونه‌های پوشش داده شده با فیلم نانوکامپوزیت محتوی ۲ درصد اسانس پونه کوهی نانولیپوزوم شده؛ داده‌ها به‌صورت میانگین (حداقل ۳ تکرار)± انحراف معیار گزارش شده است.

نمودار الگوی رشد باکتری‌های سودوموناس موجود در فیله‌های ماهی تیمار شده با فیلم‌های مختلف در شکل ٤ مشخص است. با افزایش طول دوره نگهداری میزان این شاخص در تمامی تیمارها به شکل معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) افزایش یافت. بین تیمار شاهد و فیلم نانوکامپوزیت اختلاف معنی‌داری یافت نشد اما طبق انتظار تیمارهای محتوی اسانس خالص و نانولیپوزوم شده در ممانعت و کاهش

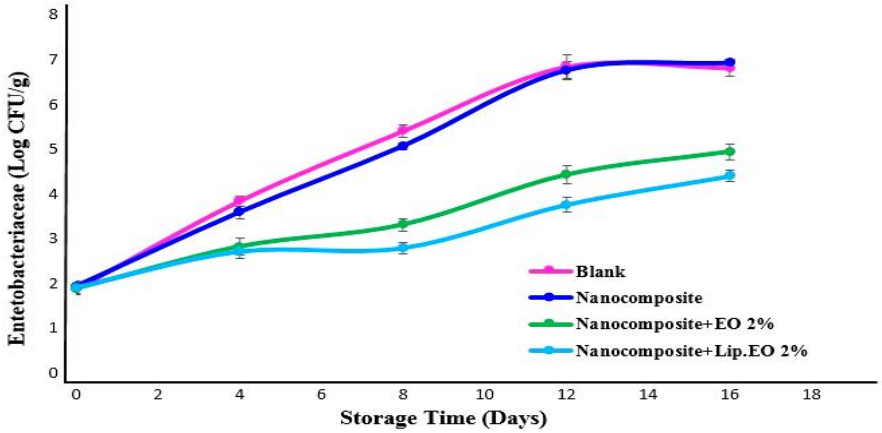
1- Lemongrass oil

روند رشد این باکتری‌ها طی دوره نگهداری اثر معنی‌دار داشتند. همچنین مشخص شد که فیلم‌های محتوی اسانس نانولیپوزوم شده نسبت به اسانس خالص اثر پایدارتر و بهتری در کنترل روند رشد این نوع از باکتری‌ها داشتند. سودوموناس‌ها میکروارگانیسم‌های هوازی و گرم منفی بوده و مهمترین عوامل فساد میکروبی در ماهیان آب‌های شیرین محسوب می‌شوند. این باکتری‌ها در طول زمان نگهداری ماهی ترکیباتی مثل متیل مرکاپتان، دی متیل سولفید، کتون، استر، آمین، آلدهید و هیپوگزانتین را تولید کرده وسبب غیرقابل مصرف شدن محصول می‌شوند (گرم و هوس، ۱۹۹٦؛ گرم و دالگارد، ۲۰۰۲). نتایج مشابهی در زمینه اثر بازدارندگی فیلم و پوشش‌های فعال شده با اسانس پونه کوهی بر سودوموناس‌ها توسط محققان دیگر گزارش شده است (مکسیز و همکاران، ۲۰۰۹؛ امیراوغلو و همکاران، ۲۰۱۰؛ جوکی و همکاران، ۲۰۱٤؛ کاظمی و همکاران، ۲۰۱۵). همچنین پیرگوتوس و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که سودوموناس‌ها در مقایسه با سایر باکتری‌های عامل فساد کمترین حساسیت را در برابر اسانس پونه کوهی نشان دادند که این نتیجه در مطالعه حاضر چندان نمودی نداشت. گومز- استاکا و همکاران (۲۰۱۰) نیز کاهش میزان رشد باکتری‌های سودوموناس را از طریق به کارگیری فیلم کیتوزان- ژلاتین حاوی اسانس میخک در فیله ماهی کاد گزارش کردند.



شکل ٤- مقادیر شمارش باکتری‌های سودوموناس فیله‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تیمار شده با فیلم‌های مختلف طی مدت نگهداری در یخچال (٤±۲°C)؛ Balnk: شاهد؛ Nanocomposite: نمونه‌های پوشش داده شده با فیلم نانوکامپوزیت پروتئین میوفیبریل- نانوفیبر سلولز؛ Nanocomposite+EO 2%: نمونه‌های پوشش داده شده با فیلم نانوکامپوزیت محتوی ۲ درصد اسانس پونه کوهی؛ Nanocomposite+Lip.EO 2%: نمونه‌های پوشش داده شده با فیلم نانوکامپوزیت محتوی ۲ درصد اسانس پونه کوهی نانولیپوزوم شده؛ داده‌ها به‌صورت میانگین (حداقل ۳ تکرار) ± انحراف معیار گزارش شده است.

نتایج مرتبط با بررسی میزان انتروباکترهای شمارش شده از فیله‌های ماهی قزل‌آلای رنگین طی روزهای مختلف نگهداری در شکل ۵ نشان داده شده است. تیمارهای مختلف از نظر این شاخص در روز صفر شرایط مشابهی داشتند و پایین بودن آن در روز صفر تیمارهای مختلف نشان دهنده کیفیت مناسب بهداشتی فیله‌ها در اثر کیفیت مناسب زنجیره انتقال و نگهداری ماهی است. فیلم‌های محتوی اسانس خالص و نانولیپوزوم شده بر کنترل روند رشد انتروباکترها مؤثر بوده و سبب کاهش آن شدند. این کاهش نسبت به تیمار شاهد و فیلم نانوکامپوزیت طی زمان نگهداری معنی دار بود. همچنین فیلم‌های محتوی اسانس نانولیپوزوم شده نسبت به اسانس خالص به‌ویژه در روزهای میانی نگهداری شرایط بهتری داشتند. انتروباکترها گروهی دیگر از باکتری‌ها می‌باشند که در فرآیند فساد فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان طی زمان نگهداری در شرایط سرد تاثیر گذارند. بررسی وجود و روند رشد این باکتری‌ها در مواد غذایی از جمله فرآورده‌های شیلاتی ضروری است چرا که این خانواده بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا نظیر سالمونلا را دربر می‌گیرد. انتروباکترها در واقع خانواده بزرگی از باکتری‌های گرم منفی هستند که به‌عنوان شاخص بهداشتی شناخته می‌شوند (مکزیس و همکاران، ۲۰۰۹). این باکتری‌ها در زمان نگهداری ترکیباتی مانند تری متیل آمین، سولفید هیدروژن، کتون‌ها، استرها، آلدهیدها، هیپوگزانتین و اسید تولید می‌کنند (گرم و هوس، ۱۹۹٦). محققان دلیل حضور این نوع از باکتری‌ها را در آبزیان با عواملی نظیر صید از مناطق آلوده، تاخیر در یخ‌گذاری آبزیان صید شده و همچنین شرایط بهداشتی نامناسب پس از صید و زمان نگهداری مرتبط دانسته‌اند (جیواناندیم و همکاران، ۲۰۰۱؛ پاپادوپولوس و همکاران، ۲۰۰۳). در واقع پتانسیل ایجاد فساد توسط باکتری‌های انتروباکتریاسه به‌ویژه در موارد آب آلوده و یا به تأخیر افتادن سردسازی ماهیان پس از صید می‌بایست مدنظر قرار گیرد (ایبراهیم سلام، ۲۰۰۷). در رابطه با بررسی اثر اسانس‌های گیاهی در بازدارندگی رشد انتروباکترهای فیله ماهی نتایج مشابهی با یافته‌های تحقیق حاضر گزارش شده است (اجاق و همکاران، ۲۰۱۰؛ احمد و همکاران، ۲۰۱۲؛ جوکی و همکاران، ۲۰۱٤).



شکل ۵- مقادیر شمارش انتروباکترهای فیله‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تیمار شده با فیلم‌های مختلف طی مدت نگهداری در یخچال (٤±۲°C)؛ Balnk: شاهد؛ Nanocomposite: نمونه‌های پوشش داده شده با فیلم نانوکامپوزیت پروتئین میوفیبریل- نانوفیبر سلولز؛ Nanocomposite+EO 2%: نمونه‌های پوشش داده شده با فیلم نانوکامپوزیت محتوی ۲ درصد اسانس پونه کوهی؛ Nanocomposite+Lip.EO 2%: نمونه‌های پوشش داده شده با فیلم نانوکامپوزیت محتوی ۲ درصد اسانس پونه کوهی نانولیپوزوم شده؛ داده‌ها به‌صورت میانگین (حداقل ۳ تکرار)± انحراف معیار گزارش شده است.

به‌طور کلی در تحقیق حاضر مشخص شد که تیمارهای فیلم فعال محتوی اسانس خالص و نانولیپوزوم شده قادرند به‌طور مؤثر از فعالیت و رشد باکتری‌های مختلف عامل فساد جلوگیری کنند. در این رابطه فعالیت ضد میکروبی اسانس پونه کوهی و اثر تقویت کنندگی و پایدار کنندگی نانولیپوزوم‌ها بر اسانس‌ها در منابع مختلف گزارش شده است (جوکی و همکاران، ۲۰۱٤؛ کاظمی و همکاران، ۲۰۱۵؛ وو و همکاران، ۲۰۱٤؛ لیولیوس و همکاران، ۲۰۰۹). فعالیت ضد میکروبی اسانس پونه کوهی به اجزای تشکیل‌دهنده آن‌ها و اساساً ترکیبات فنولیک مثل ترپن‌هایی از قبیل کاواکرول (2-methyl-5-[1-methylethyl] phenol) و تیمول (5-methyl-2-[1-methylethyl] phenol) نسبت داده می‌شود (گومز- استاکا و همکاران، ۲۰۱۰). کاواکرول و تیمول دیواره بیرونی باکتری‌های گرم منفی را متلاشی کرده و سبب آزاد شدن لیپوپلی ساکاریدها می شوند که در نتیجه آن نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی به آدنوزین تری- فسفات افزایش می‌یابد. در واقع فعالیت ضد میکروبی بیشتر ترپنوئیدها با گروه‌های عاملی آن‌ها مرتبط است و مشخص شده است که جایگاه و تعداد گروه‌های

هیدروکسیل ترپنوئیدهای فنولیک و حضور الکترون‌های متحرک از جنبه فعالیت ضد میکروبی آن‌ها مهم است (احمد و همکاران، ۲۰۱۲؛ جوکی و همکاران، ۲۰۱٤). گروه‌های هیدروکسیل توانایی آب دوستی این ترکیبات را افزایش داده و به حل شدن آن‌ها در غشای سیتوپلاسمی میکروب و تخریب آن کمک می‌کنند. در حالت کلی، مکانیسم ضد میکروبی اسانس‌ها با اختلال در غشای سیتوپلاسمی، مختل کردن نیروی انتقال پروتن، جریان الکترون، انتقال فعال و انعقاد محتویات درونی سلول مرتبط است (گومز و همکاران، ۲۰۱۰؛ گونلو و کویون، ۲۰۱۲). به‌علاوه ذکر این نکته ضروری است که اثر ضد میکروبی پوشش‌ها و فیلم های فعال محتوی اسانس می‌تواند با نوع گونه و ترکیب شیمیایی بدن ماهی مرتبط باشد و گزارش شده است که محتوای بالای چربی اثر و عمل ضد میکروبی اسانس‌ها را بر میکروارگانیسم‌های مختلف در محصولات گوشتی کاهش می‌دهد (کاظمی و همکاران، ۲۰۱۵).

نتایج مرتبط با ارزیابی حسی: نتایج ارزیابی حسی تیمارهای مختلف با بررسی چهار ویژگی بافت، بو، رنگ و پذیرش کلی در جدول ۱ نشان داده شده است. در ابتدا تمامی تیمارها از نظر ٤ شاخص مورد بررسی قابل قبول بودند و اعمال فیلم‌های مختلف روی فیله ماهی در روزهای نخست تأثیر نامطلوبی بر خواص حسی آن‌ها نداشت. با گذشت زمان اختلاف بین تیمارها بیشتر شد و کیفیت ویژگی‌های حسی در نمونه شاهد و فیلم‌های نانوکامپوزیت با سرعت بیشتری کاهش یافتند به‌طوری که در روز ۱۲ نگهداری تیمار شاهد و فیلم نانوکامپوزیت از نظر ویژگی‌های مختلف به زیر ۳ که حد قابل قبول برای مصرف انسانی است نزول کردند اما در دو تیمار دیگر شاخص‌های مرتبط همچنان عدد بالای ۳ را نشان دادند. این افزایش ماندگاری و حفظ کیفیت حسی را می‌توان به خواص ضد میکروبی فیلم‌های فعال نسبت داد. در واقع این نتایج به نوعی با نتایج آزمون‌های میکروبی همسو بودند. همچنین در بررسی نتایج فیلم‌های محتوی اسانس خالص و نانولیپوزوم شده مشخص شد که فیلم‌های نانولیپوزوم دار امتیاز پایین‌تری در شاخص بافت کسب کردند که این می‌تواند نشان‌دهنده تأثیر نامطلوب فیلم‌های محتوی لسیتین بر بافت فیله باشد که علت آن مشخص نیست. از طرفی فیلم‌های محتوی نانولیپوزم بالاترین شاخص بو، رنگ و پذیرش کلی را ارائه دادند. در بررسی‌های چشمی نیز مشخص شد که این فیم‌ها تأثیر مثبتی بر خواص ظاهری (رنگی) فیله دارند. نتایج مشابهی در زمینه به‌کارگیری فیلم‌های فعال محتوی اسانس در بهبود ماندگاری و حفظ کیفیت فیله ماهی و بروز اثرات آن در ارزیابی حسی توسط سایر محققان گزارش شده است (اجاق و همکاران، ۲۰۱۰؛ اندواری و رضایی، ۲۰۱۱؛ جوکی و همکاران، ۲۰۱٤).

جدول ۱- تغییر شاخص‌های حسی فیله‌های شاهد و تیمار شده با فیلم نانوکامپوزیت پروتئین- نانوفیبر سلولز و همچنین فیلم‌های نانوکامپوزیت محتوی اسانس پونه کوهی ۲ درصد نانولیپوزوم شده و خالص طی مدت ۱۶ روز نگهداری در یخچال (۴±۲°C).

		زمان نگهداری (روز)				
شاخص حسی	تیمار	۰	۴	۸	۱۲	۱۶
بافت	شاهد	۵/۰۰±۰/۰۰^{aA}	۴/۲۸±۰/۴۸^{aB}	۳/۱۴±۰/۴۸^{bC}	۱/۴۲±۰/۵۳^{bD}	۱/۰۰±۰/۰۰^{bE}
	پ-سلولز٪۰/۴	۵/۰۰±۰/۰۰^{aA}	۴/۲۸±۰/۴۸^{aB}	۳/۲۸±۰/۴۸^{bC}	۲/۱۴±۰/۸۹^{bD}	۱/۱۴±۰/۳۷^{bE}
	پ-سلولز٪۰/۴-پونه٪۲	۵/۰۰±۰/۰۰^{aA}	۴/۷۱±۰/۴۸^{aAB}	۴/۱۴±۱/۰۶^{aB}	۳/۲۸±۰/۴۸^{aC}	۲/۴۲±۰/۵۳^{aD}
	پ-سلولز٪۰/۴-لیپوزوم پونه٪۲	۵/۰۰±۰/۰۰^{aA}	۴/۵۷±۰/۷۸^{aAB}	۴/۱۴±۰/۳۷^{aBC}	۳/۴۲±۱/۱۳^{aC}	۲/۱۴±۰/۳۷^{aD}
بو	شاهد	۵/۰۰±۰/۰۰^{aA}	۴/۱۴±۰/۴۸^{aB}	۲/۸۵±۰/۳۷^{cC}	۱/۴۲±۰/۵۳^{cD}	۱/۰۰±۰/۰۰^{bD}
	پ-سلولز٪۰/۴	۵/۰۰±۰/۰۰^{aA}	۴/۴۲±۰/۷۸^{aA}	۳/۲۸±۰/۷۵^{bcB}	۲/۰۰±۰/۵۷^{bC}	۱/۱۴±۰/۳۷^{bD}
	پ-سلولز٪۰/۴-پونه٪۲	۵/۰۰±۰/۰۰^{aA}	۴/۷۱±۰/۴۸^{aA}	۳/۸۵±۰/۶۹^{abB}	۳/۱۴±۰/۳۸^{aC}	۲/۱۴±۰/۳۷^{aD}
	پ-سلولز٪۰/۴-لیپوزوم پونه٪۲	۵/۰۰±۰/۰۰^{aA}	۴/۸۵±۰/۳۷^{aA}	۴/۴۲±۰/۷۸^{aA}	۳/۲۸±۰/۴۸^{aB}	۲/۴۲±۰/۵۳^{aC}
رنگ	شاهد	۵/۰۰±۰/۰۰^{aA}	۴/۴۲±۰/۵۳^{bB}	۳/۲۸±۰/۴۸^{cC}	۱/۸۵±۰/۸۹^{bD}	۱/۰۰±۰/۰۰^{bE}
	پ-سلولز٪۰/۴	۵/۰۰±۰/۰۰^{aA}	۴/۵۷±۰/۴۹^{abB}	۳/۱۴±۰/۳۷^{cC}	۱/۷۱±۰/۴۸^{bD}	۱/۰۰±۰/۰۰^{bE}
	پ-سلولز٪۰/۴-پونه٪۲	۵/۰۰±۰/۰۰^{aA}	۴/۴۲±۰/۵۳^{bB}	۴/۰۰±۰/۵۷^{bB}	۳/۱۴±۰/۳۷^{aC}	۲/۲۸±۰/۷۸^{aD}
	پ-سلولز٪۰/۴-لیپوزوم پونه٪۲	۵/۰۰±۰/۰۰^{aA}	۵/۰۰±۰/۰۰^{aA}	۴/۷۱±۰/۴۸^{aA}	۳/۷۱±۰/۴۸^{aB}	۲/۴۲±۰/۵۳^{aC}
پذیرش کلی	شاهد	۵/۰۰±۰/۰۰^{aA}	۴/۱۴±۰/۳۷^{bB}	۳/۰۰±۱/۰۰^{cC}	۱/۸۵±۰/۷۵^{bD}	۱/۰۰±۰/۰۰^{bE}
	پ-سلولز٪۰/۴	۵/۰۰±۰/۰۰^{aA}	۴/۲۸±۰/۵۳^{abB}	۳/۱۴±۰/۳۷^{bcC}	۱/۷۱±۰/۸۹^{bD}	۱/۰۰±۰/۰۰^{bE}
	پ-سلولز٪۰/۴-پونه٪۲	۵/۰۰±۰/۰۰^{aA}	۴/۷۱±۰/۴۸^{aA}	۳/۸۵±۰/۶۹^{abB}	۳/۰۰±۰/۵۷^{aC}	۲/۱۴±۰/۳۷^{aD}
	پ-سلولز٪۰/۴-لیپوزوم پونه٪۲	۵/۰۰±۰/۰۰^{aA}	۴/۷۱±۰/۷۸^{aAB}	۴/۲۸±۰/۴۸^{aB}	۳/۴۲±۰/۵۳^{aC}	۲/۴۲±۰/۵۳^{aD}

حروف متفاوت (a، b، c و ...) در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها و حروف متفاوت بزرگ (A، B، C و ...) در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین زمان‌ها در سطح $p<۰/۰۵$ است.

داده‌ها به‌صورت میانگین (حداقل ۳ تکرار) ± انحراف معیار بیان شده‌اند. پ: پروتئین

نتیجه‌گیری کلی

نتایج آزمون‌های مختلف میکروبی و حسی نشان داد که اعمال فیلم نانوکامپوزیت پروتئین- نانوفیبرسلولز هرچند که در حالت خالص تأثیر چندانی از جنبه افزایش مدت ماندگاری و کنترل عوامل فساد نداشت اما فعال‌سازی آن به‌وسیله اسانس پونه کوهی در حالت خالص و ریزپوشانی شده توانست روند رشد باکتری‌های مختلف را در طی زمان نگهداری کنترل کرده و مدت ماندگاری تکه‌های فیله ماهی قزل‌آلا را در قیاس با تیمار شاهد تاحد قابل قبولی افزایش دهد. اعمال پوشش‌های محتوی اسانس ریزپوشانی شده به‌ویژه در روزهای نخست (تا روز ۸) تأثیر بهتری نسبت به اسانس خالص داشت. همچنین بررسی خواص حسی تیمارهای مختلف نیز به نوعی همسو با آزمون‌های

میکروبی بوده و تیمارهای پوشش داده شده با فیلم‌های فعال نسبت به تیمار شاهد در طول زمان نگهداری نمره حسی بالاتری را دریافت کردند.

منابع

1.Ahmad, M., Benjakul, S., Sumpavapol, P., and Nirmal, N.P. 2012a. Quality changes of sea bass slices wrapped with gelatin film incorporated with lemongrass essential oil. International Journal of Food Microbiology. 155: 171-178

2.Ahmad, M., Benjakul, S., Prodpran, T., and Agustini, T.W. 2012b. Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. Food Hydrocolloids. 28: 189-199.

3.Andevari, T.Gh., and Rezaei, M. 2011. Effect of gelatin coating incorporated with cinnamon oil on the quality of fresh rainbow trout in cold storage. International Journal of Food Science and Technology. 46: 2305-2311.

4.Arora, A., and Padua G. 2009. Nanocomposites in Food Packaging: A review, Food Science. 75: 43-49.

5.Cai, L., Cao, A., Li, Y., Song, Z., Leng, L., and Li, J. 2015. The effects of essential oil treatment on the biogenic amines inhibition and quality preservation of red drum (*Sciaenops ocellatus*) fillets. Food Control. 56: 1-8.

6.Cho, Y.H., Shim, H.K., and Park, J. 2003. Encapsulation of fish oil by an enzymatic gelation process using transglutaminase cross-linked proteins. Food Science. 68: 2717–2723.

7.Davidson, P.M., and Zivanovic, S. 2003. The use of natural antimicrobials. Food preservation techniques. 5-30.

8.Dewettinck, K., Deroo, L., Messen, W., and Huyghebaert, A. 1998. Agglomeration tendency during top-spray fluidized bed coating with gums. Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie. 31: 576-584.

9.Emiroğlu, Z.K., Yemiş, G.P., Coşkun, B.K., and Candoğan, K. 2010. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. Meat Science. 86: 283-288.

10.Gómez-Estaca, J., de Lacey, A.L., López-Caballero, M.E., Gómez-Guillén, M.C., and Montero, P. 2010. Biodegradable gelatin–chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. Food Microbiology. 27: 889-896.

11.Gram, L., and Dalgaard, P. 2002. Fish spoilage bacteria–problems and solutions. Current opinion in biotechnology. 13: 262-266.

12.Gram, L., and Huss, H.H. 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. International journal of food microbiology. 33: 121-137.

13.Günlü, A., and Koyun, E. 2013. Effects of vacuum packaging and wrapping with chitosan-based edible film on the extension of the shelf life of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets in cold storage (4 C). Food and Bioprocess Technology. 6: 1713-1719.
14.Holley, R.A., and Patel, D. 2005. Improvement in shelf-lifeand safty of perishable foods by plant essential oils and smoke antibacterials: A Review. Food Microbiology. 22: 273-292.
15.Ibrahim Sallam, K. 2007. Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon, Food Control. 18: 566–575.
16.ICMSF. Microorganisms in Foods 7. Kluwer Academic/Plenum Publishers New York; 2002. 17. Jeevanandam, K., Kakatkar, A., Doke, S.N., Bongirwar, D.R., and Venugopal, V. 2001. Influence of salting and gamma irradiation on the shelf-life extension of threadfin bream in ice. Food Research International. 34: 739-746.
18.Jeyasekaran, G., Ganesan, P., Anandaraj, R., Shakila, R.J., and Sukumar, D. 2006. Quantitative and qualitative studies on the bacteriological quality of Indian white shrimp (*Penaeus indicus*) stored in dry ice. Food microbiology. 23: 526-533.
19.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.
20.Jouki, M., Yazdi, F.T., Mortazavi, S.A., and Koocheki, A. 2014. Quince seed mucilage films incorporated with oregano essential oil: physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. Food Hydrocolloids. 36: 9-19. 21.Kazemi, S.M., and and Rezaei, M. 2015. Antimicrobial Effectiveness of Gelatin–Alginate Film Containing Oregano Essential Oil for Fish Preservation. Journal of Food Safety. 35: 482-490.
22.Khan, A., Khan, R.A., Salmieri, S., Tien, C.L., Riedl, B., Bouchard, J., Chauve, G., Tan, V., Kamal, M.R., and Lacroix, M. 2012. Mechanical and barrier properties of nanocrystalline cellulose reinforced chitosan based nanocomposite films. Carbohydrate Polymers. 90: 1601-1608.
23.Klaypradit, W., and Huang, Y. 2008. Fish oil encapsulation with chitosan using ultrasonic atomizer. LWT-Food Science and Technology. 41: 1133-1139.
24.Limpan, N., Prodpran, T., Benjakul, S., and Prasarpran, S. 2012. Influences of degree of hydrolysis and molecular weight of poly (vinyl alcohol) (PVA) on properties of fish myofibrillar protein/PVA blend films. Food Hydrocolloids. 29: 226-233.
25.Liolios, C.C., Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J., and Chinou, I. 2009. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of

Origanum dictamnus L. and in vitro antimicrobial activity. Food chemistry. 112: 77-83.
26. Liu, H., Liu, D., Yao, F., and Wu, Q. 2010. Fabrication and properties of transparent polymethylmethacrylate/cellulose nanocrystals composites. Bioresource Technology. 101: 5685-5692.
27. Mexis, S.F., Chouliara, E., and Kontominas, M.G. 2009. Combined effect of an oxygen absorber and oregano essential oil on shelf life extension of rainbow trout fillets stored at 4 C. Food Microbiology. 26: 598-605.
28. Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H., and Hosseini, S.M.H. 2010b. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. Food chemistry. 120: 193-198.
29. Papadopoulos, V., Chouliara, I., Badeka, A., Savvaidis, I.N., and Kontominas, M.G. 2003. Effect of gutting on microbiological, chemical, and sensory properties of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. Food Microbiology. 20: 411–420.
30. Pyrgotou, N., Giatrakou, V., Ntzimani, A., and Savvaidis, I.N. 2010. Quality assessment of salted, modified atmosphere packaged rainbow trout under treatment with oregano essential oil. Journal of food science. 75: M406-M411.
31. Shaw, N.B., Monahan, F.J., O'Riordan, E.D., and O'sullivan, M. 2001. Effect of soy oil and glycerol on physical properties of composite WPI films. Food Engineering. 51: 299-304.
32. Shiku, Y., Hamaguchi, P.Y., Tanaka, M. 2003. Effect of pH on the preparation of edible films based on fish myofibrillar proteins. Fisheries Science. 69: 1026–1032.
33. Trovatti, E., Fernandes, S.C., Rubatat, L., da Silva Perez, D., Freire, C.S., Silvestre, A.J., and Neto, C.P. 2012. Pullulan–nanofibrillated cellulose composite films with improved thermal and mechanical properties. Composites Science and Technology. 72: 1556-1561.
34. Wu, J., Ge, S., Liu, H., Wang, S., Chen, S., Wang, J., and Zhang, Q. 2014. Properties and antimicrobial activity of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin-chitosan films incorporated with oregano essential oil for fish preservation. Food Packaging and Shelf Life. 2: 7-16.
35. Wu, J., Liu, H., Ge, S., Wang, S., Qin, Z., Chen, L., and Zhang, Q. 2014. The preparation, characterization, antimicrobial stability and in vitro release evaluation of fish gelatin films incorporated with cinnamon essential oil nanoliposomes. Food Hydrocolloids. 43: 427-435.
36. Zhang, H.Y., Tehrany, E.A., Kahn, C.J.F., Ponçot, M., Linder, M., and Cleymand, F. 2012. Effects of nanoliposomes based on soya, rapeseed and fish lecithins on chitosan thin films designed for tissue engineering. Carbohydrate Polymers. 88: 618-627.