www.journals.rifst.ac.ir
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال ۱۳۹۶، جلد ۶، شماره ۴، صفحات ۳۵۰-۳۳۵

JRIFST

بررسی اثر فیلم خوراکی پروتئین میوفیبریل ماهی ـ نانوفیبر سلولز حاوی نانولیپوزوم‌های اسانس پونۀ کوهی بر کیفیت میکروبی فیلۀ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نگهداری‌شده در شرایط سرد

محسن کاظمی[1*]، بهاره شعبانپور[2]، پرستو پورعاشوری[3]

۱- دانش آموختۀ کارشناسی ارشد فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

* نویسندۀ مسئول (kazemi_mohsen@yahoo.com)

۲- استاد، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۳- استادیار، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۷/۰۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۳/۲۹

واژه‌های کلیدی
اسانس پونۀ کوهی
پروتئین میوفیبریل ماهی
قزل‌آلای رنگین‌کمان
نانوکامپوزیت
نانولیپوزوم

چکیده

در این تحقیق فیلم‌های نانوکامپوزیت غنی‌شده با اسانس پونۀ کوهی خالص و نانولیپوزوم‌شده (۲ درصد اسانس) به‌عنوان عامل نگهدارندۀ روی فیلۀ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌کارگرفته شدند. به‌منظور تیماربندی، فیله‌ها به ۴ گروه تقسیم شدند: فیله‌های بدون‌پوشش، پوشش‌داده‌شده با فیلم نانوکامپوزیت پروتئین میوفیبریل-نانوفیبر سلولز و پوشش‌داده‌شده با فیلم‌های نانوکامپوزیت حاوی اسانس پونۀ کوهی خالص و ریزپوشانی‌شده. فیله‌های ماهی از جنبۀ ویژگی‌های میکروبی (بارباکتریایی کل و سرمادوست، جنس سودوموناس و خانوادۀ انتروباکتریاسه)، شاخص‌های حسی و رنگ مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از آزمون‌های میکروبی نشان داد که بالاترین روند رشد شاخص‌های مختلف به‌ترتیب در تیمار شاهد، پوشش‌داده‌شده با فیلم نانوکامپوزیت و نانوکامپوزیت‌های حاوی اسانس پونۀ کوهی خالص و نانولیپوزوم‌شده مشاهده شد (P<۰/۰۵). دراین‌رابطه، فیلم‌های حاوی اسانس خالص و نانولیپوزوم‌شده زمان ماندگاری میکروبی را حدوداً تا روز ۱۲ افزایش (۴ روز) دادند. تیمار حاوی اسانس نانولیپوزوم‌شده به‌ویژه در روزهای نخست تا میانی (روز ۱۰) نگهداری، ازنظر شاخص‌های میکروبی نسبت به تیمار حاوی اسانس خالص وضعیت بهتری داشت. شاخص‌های رنگ (L^*، a^* و b^*) و حسی فیله‌ها، در تیمارهای پوششی فعال نسبت به تیمار شاهد تغییرات کمتری را در طول زمان نگهداری نشان دادند (P<۰/۰۵).

مقدمه

ماهی و سایر آبزیان به سبب فعالیت آبی بالا، pH خنثی، نسبت بالای اسیدآمینۀ آزاد، اسیدهای چرب چند غیراشباع و همچنین حضور آنزیم‌های درونی، تحت تأثیر مکانیسم‌های مختلف فساد از قبیل فساد میکروبی، اکسیداسیون چربی و همچنین قهوه‌ای‌شدن آنزیمی قرار گرفته و درنتیجه کیفیت و مدت ماندگاری آنها کاهش می‌یابد (Jeyasekaran *et al*., 2006; Jouki *et al*., 2014b; Cai *et al*., 2015). میکروارگانیسم‌ها مسئول اصلی فسادپذیری شدید

ماهیان در طول نگهداری سرد می‌باشند که این اساساً ناشی از مساعدبودن شرایط عضلهٔ ماهی جهت رشد سریع میکروارگانیسم‌های فلور طبیعی ماهی و آلودگی‌های ثانویه است (Gómez-Estaca *et al*., 2010). بنابراین به‌کارگرفتن اقدام‌های لازم جهت به‌تأخیراندختن فساد این محصولات امری ضروری است. زمان ماندگاری گوشت (ماهی) تازه می‌تواند با استفاده از پوشش‌ها و فیلم‌های زیستی حاوی ترکیبات ضداکسیدان و ضدباکتری افزایش یابد (Barbosa-Pereira *et al*., 2014). ازجمله خواص کاربردی این فیلم‌ها می‌توان به محافظت از محصول غذایی در مقابل صدمه‌های مکانیکی و فیزیکی، فعالیت‌های میکروبی و شیمیایی اشاره کرد. همچنین خوراکی‌بودن، زیست‌سازگاری، خواص سدکنندگی در مقابل اکسیژن، رطوبت و ترکیبات فرار از قبیل بو، ممانعت از تخریب رنگ و عدم ایجاد سمیت و آلودگی از دیگر مزایای استفاده از فیلم‌های خوراکی است (Günlü & Koyun, 2013; Nowzari *et al*., 2013; Jouki *et al*., 2014a). پروتئین‌های میوفیبریل ماهی[1] (عمدهٔ آنها میوزین (۲۰۰ کیلودالتون) و اکتین (۴۲ کیلودالتون)) ازجمله منابعی هستند که می‌توانند برای تهیهٔ فیلم‌هایی با شفافیت و استحکام مناسب استفاده شوند، زیرا این پروتئین‌ها کاملاً رشته‌ای و کشسان بوده و به سبب داشتن گروه‌های عاملی جهت ایجاد پیوندهای درون‌مولکولی و بین‌مولکولی[2] در سیستم غذایی نقش عملکردی را به عهده دارند (Limpan *et al*., 2012; Blanco-Pascual *et al*., 2014). همچنین پروتئین‌های میوفیبریل ماهی از جنبهٔ نیاز به یافتن روش اقتصادی و مناسب به‌منظور بهره‌گیری از ضایعات و محصولات جنبی برجای‌مانده از خط تولید و عمل‌آوری آبزیان مدنظر هستند (Hamaguchi *et al*., 2007; Pires *et al*., 2013). فیلم‌های پروتئینی خواص سدکنندگی مناسبی را نسبت به اکسیژن، چربی‌ها و ترکیبات منشأ طعم و بو نشان داده‌اند اما خواص مکانیکی آنها نسبت به پلیمرهای سنتزی ضعیف است. این فیلم‌ها در محیط‌های آبی نسبتاً ناپایدارند و نفوذپذیری بالایی به بخار آب نشان می‌دهند (Condés *et al*., 2015). زیست‌نانوکامپوزیت‌ها مفهوم جدیدی از مواد ترکیبی و کاربردی هستند که به‌وسیلهٔ شرکت‌دادن تقویت‌کننده‌هایی با حداقل یک بُعد در مقیاس نانو در بستر پلیمر طبیعی تولید می‌شوند و می‌توانند تا حدود زیادی برطرف‌کنندهٔ ضعف‌های پلیمرهای زیستی باشند (Savadekar *et al*., 2012). نانوفیبرهای سلولز با قطر زیر ۱۰۰ نانومتر از دیوارهٔ سلولی منابع مختلف طبیعی گیاهی به‌وسیلهٔ تیمارهای شیمیایی، مکانیکی و یا ترکیبی از این تیمارها استخراج می‌شوند. نانوفیبرهای طبیعی سلولز به سبب ویژگی‌های مثبتی از قبیل زیست‌تخریب‌پذیری، تجدیدپذیربودن، فراوانی و هزینهٔ ارزان، دانسیتهٔ پایین، استحکام و دوام بالا (خواص مکانیکی عالی) و همچنین امکان مشتق‌شدن از ضایعات کشاورزی و صنعت غذا به‌عنوان گزینه‌ای مناسب جهت ارتقاء خواص کیفی زیست‌پلیمرها محسوب می‌شوند (Savadekar *et al*., 2012; Jensen *et al*., 2015; Panaitescu *et al*., 2015). پلیمرهای نانوکامپوزیت می‌توانند در ترکیب با ترکیبات ضدمیکروب و ضداکسیدان در تولید نوع جدیدی از بسته‌بندی‌های فعال به‌کارگرفته شوند. بسته‌بندی ضدمیکروب نویدبخش‌ترین نوع از بسته‌بندی‌های فعال است که هدف آن دستیابی به توسعهٔ زمان ماندگاری در چارچوب یک تکنیک نگهداری ملایم است به‌طوری‌که حفظ خواص حسی و کیفیت تغذیه‌ای محصول غذایی حفظ شود (Wen *et al*., 2016). دراین‌رابطه افزایش نگرانی‌ها دربارهٔ پتانسیل خطرآفرینی نگهدارنده‌های سنتزی برای سلامتی، مجدداً سبب افزایش تمایل به استفاده از ترکیبات آلی و طبیعی (اصطلاحاً مصرف سبز) نظیر اسانس‌ها به‌عنوان ترکیبات فعال شده است (Gómez-Estaca *et al*., 2010; Barbosa-Pereira *et al*., 2014). پونهٔ کوهی[3] حاوی یکی از مؤثرترین اسانس‌های شناخته‌شده از جنبهٔ خواص ضدمیکروبی و ضداکسیدانی است (Zinoviadou *et al*., 2009; Aguirre *et al*., 2013; Jouki *et al*., 2014a). این گیاه به‌عنوان گزینه‌ای مناسب برای استفاده در نگهداری غذا و بهبوددهندهٔ سلامتی بشمار می‌آید.

[1] Fish Myofibrillar Protein
[2] Intramolecular and Intermolecular bonds
[3] *Oreganum vulgar*

کارواکرول[1] و تیمول[2] دو ترکیب فنولی اصلی تشکیل‌دهندهٔ اسانس پونهٔ کوهی می‌باشند (Khanjari *et al*., 2013). گروه‌های هیدروکسیل حاضر در ساختار ترکیبات فنولیک عامل بروز فعالیت ضدمیکروبی آنها هستند و موقعیت نسبی آنها در ساختار ترکیب، نقش حیاتی در کارآمدی و مؤثربودن آنها دارد که این مسأله می‌تواند فعالیت ضدمیکروبی بالاتر کارواکرول در مقایسه با دیگر ترکیبات فنولی گیاهی را توضیح دهد (Zinoviadou *et al*., 2009). بااین‌وجود، کاربرد اسانس‌ها در پلیمرهای فعال با محدودیت‌هایی از قبیل؛ عدم حلالیت آنها در آب، تغییر ماهیت در اثر واکنش‌های شیمیایی و اکسیداسیون، فرّاریت و تبخیرشدن آنها در طول فرایند تولید و نگهداری فیلم و همچنین توزیع ناهمگن و حرکت کُند به سمت جایگاه هدف مواجه است. ریزپوشانی این ترکیبات در مقیاس نانو قبل از به‌کاربردن آنها در سیستم‌های غذایی راهکاری مناسب جهت برطرف‌کردن این محدودیت‌ها محسوب می‌شود. به‌علاوه اخیراً بهبود فعالیت و اثربخشی ترکیبات ضدمیکروب نانومقیاس در مقایسه با حالت سنتی توجه بیشتری را به خود جلب کرده است (Jiménez *et al*., 2014; Wu *et al*., 2015; Ma *et al*., 2016; Wen *et al*., 2016). یکی از روش‌های ریزپوشانی استفاده از سیستم‌های کلوئیدی و تولید ریزامولسیون‌هاست. ریزامولسیون‌ها مخلوط‌هایی با پایداری ترمودینامیکی هستند که از ترکیب موادی مثل آب، روغن و همچنین مواد فعال در سطح که دارای خواص ایزوتروپیک هستند، تشکیل می‌شوند (Ma *et al*., 2016). تکنیک ریزپوشانی ترکیبات روغنی در نانولیپوزوم‌ها نوعی از ریزامولسیون‌های کاربردی دراین‌زمینه محسوب می‌شود. نانولیپوزوم‌ها واکنش اسانس را با فاکتورهای محیطی (آب، اکسیژن و نور) کاهش داده، از تبخیر و انتقال آنها به محیط (هدر رفت) ممانعت کرده و توانایی انتقال یا جابجایی آنها را بالا می‌برند. همچنین این کار زمانی که مادهٔ هدف در مقیاس پایین مورد استفاده قرار می‌گیرد، می‌تواند به توزیع یکنواخت و مناسب آن در محصول نهایی کمک کند و اثربخشی آن را تقویت کند (Liolios *et al*., 2009). دراین‌رابطه Wu و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که اسانس دارچین نانولیپوزوم‌شده موجود در بستر فیلم ژلاتینی در مقایسه با اسانس خالص اثر ضدمیکروبی بسیار پایدارتری را در مقابل باکتری‌های مورد آزمایش در مدت زمان ۳۰ روز انکوباسیون نشان داد. همچنین Liolios و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که فعالیت ضدمیکروبی ترکیبات تیمول و کارواکرول پس از نانولیپوزوم‌شدن در مقایسه با شکل خالص این ترکیبات بهبود یافت. بنابر مطالبی که عنوان شد، در تحقیق حاضر فیلم‌های نانوکامپوزیتی پروتئین میوفیبریل ماهی-نانوفیبر سلولز در ترکیب با اسانس پونهٔ کوهی نانولیپوزوم‌شده و خالص تولید شدند. تمامی مراحل انتخاب درصد بهینهٔ نانوذرات سلولز و همچنین انتخاب درصد مناسب و بهینهٔ اسانس (نانولیپوزوم‌شده و خالص) و همچنین تولید فیلم‌ها، براساس مطالعه‌های مقدماتی و پیشین تحقیق حاضر صورت گرفت (کاظمی، ۱۳۹۴). در مرحلهٔ بعد و پس از تولید فیلم‌های مربوطه، اثر آنها بر حفظ کیفیت و افزایش زمان ماندگاری فیلهٔ تازهٔ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان طی مدت نگهداری در یخچال بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تولید پروتئین میوفیبریل

ماهی *فیتوفاگ*[3] به‌صورت تازه از بازار ماهی‌فروشان شهر گرگان تهیه شده و پس از شست‌وشو با آب، استخوان‌گیری شد. گوشت چرخ‌شدهٔ حاصله به‌منظور استخراج پروتئین‌های میوفیبریل مورد استفاده قرار گرفت (Limpan *et al*., 2012). بدین‌منظور ابتدا گوشت چرخ‌شدهٔ ماهی با ۳ برابر حجم خودش آب‌مقطر سرد مخلوط‌شده و در دور ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه هموژن شد. سپس توسط یک پارچهٔ نایلونی آب‌گیری‌شده و در مرحلهٔ بعد گوشت چرخ‌شده با ۵ برابر حجم خودش آب‌نمک ۵۰ میلی‌مولار (۰/۲۹ درصد) مخلوط و سپس هموژن و آب‌گیری گردید. فرایند شست‌وشو ۲ بار تکرار شد.

[1] Carvacrol
[2] Thymol
[3] *Hypophthalmichthys molitrix*

روش تهیهٔ نانولیپوزوم‌های اسانس پونه

نانولیپوزوم‌ها طبق روش Jiménez و همکاران (۲۰۱۴) با کمی تغییر تولید شدند. ابتدا ۲ گرم لستین + ۲ گرم توئین ۸۰ در ۳۸ گرم آب‌مقطر مخلوط و برای ۵ ساعت توسط شیکر (مدل IKA، ساخت آلمان) تکان داده شدند. در مرحلهٔ بعد ۴ گرم اسانس پونهٔ کوهی به دیسپرسیون آبی اضافه‌شده و کل مخلوط به مدت ۶۰۰ ثانیه (۱ ثانیه روشن و ۱ ثانیه خاموش) در ۴۰ کیلوهرتز و ۴۰ درصد قدرت دستگاه (Misonix، S-4000، ساخت آمریکا) تحت شرایط سونیکاسیون قرار گرفت. نانولیپوزوم‌های تولیدی تا زمان استفاده در بطری‌های استریل و در شرایط تاریک نگهداری شدند.

بررسی سایز و پتانسیل زتا نانولیپوزوم‌ها

میانگین اندازه و پتانسیل زتا نانولیپوزوم‌ها با استفاده از دستگاه مالورن زتاسایزر (نانو ZS) (Malvern Instruments, Worcestershire, U.K.) به‌وسیلهٔ روش پخش نور لیزر بررسی شد. قبل از اندازه‌گیری نمونه، توسط آب دیونایز رقیق شد (۱:۱۰۰) سپس نمونه درون یک سلول استوانه‌ای ریخته شد و به شکل عمودی در دستگاه قرار گرفت. اندازه‌گیری در ۵ تکرار صورت پذیرفت (Jimenez *et al*., 2014).

تولید فیلم‌های فعال

تولید محلول فیلم‌ساز پروتئینی به روش Limpan و همکاران (۲۰۱۲) با کمی اصلاح انجام شد، گوشت چرخ‌شدهٔ شسته‌شدهٔ ماهی (حاوی پروتئین ۸۶/۸۲±۲/۵۶ درصد براساس وزن خشک) با آب‌مقطر جهت تولید محلول ۲ درصد پروتئین مخلوط‌شده و به‌وسیلهٔ هموژنایزر در دور ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه همگن شد. گلیسرول به میزان ۵۰ درصد (وزنی/وزنی پروتئین) به محلول فیلم‌ساز افزوده شده سپس مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در شیکر با دور ملایم قرار گرفت. در مرحلهٔ بعد pH مخلوط با هدف محلول‌شدن پروتئین‌ها توسط HCl (۱ نرمال) روی ۳ تنظیم شد و به‌منظور حذف بقایای نامحلول، محلول فیلم‌ساز به‌وسیلهٔ یک پارچهٔ نایلونی فیلتر شد. در مرحلهٔ بعد محلول ژلی سفید رنگ و التراسوندشدهٔ نانوفیبرهای سلولز با نسبت (وزنی/وزنی پروتئین) ۰/۴ درصد (کاظمی، ۱۳۹۴) به محلول پروتئینی افزوده شده و به‌منظور توزیع مناسب نانوذرات، محلول در دور ۱۸۰۰۰ دور در دقیقه همگن شد (Trovatti *et al*., 2012). اسانس پونهٔ کوهی با غلظت ۲ درصد (حجمی/حجمی) به محلول فیلم‌ساز افزوده شده و برای ایجاد امولسیونی یکنواخت به مدت ۲ دقیقه در دور ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه تحت عمل هم‌زدن قرار گرفت (Pires *et al*., 2013).

برای تهیهٔ فیلم‌های نانوکامپوزیت حاوی اسانس نانولیپوزوم‌شده، پس از تهیهٔ محلول فیلم‌ساز نانولیپوزوم‌ها به محلول فیلم‌ساز اضافه شدند به‌طوری‌که غلظت نهایی اسانس در آنها ۲ درصد (حجمی/حجمی) باشد (کاظمی، ۱۳۹۴). محلول‌های فیلم‌ساز به مدت ۲ ساعت در دور ۳۰۰ دور در دقیقه تکان داده شدند تا همگن شوند. قبل از اینکه محلول‌های فیلم‌ساز به داخل پتری‌دیش ریخته شوند، تحت شرایط خلأ حباب‌زدایی شدند. محلول‌ها در دمای ۲۶ درجهٔ سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۵۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت خشک‌شده و فیلم‌های حاصل به‌منظور انجام آزمون‌های مربوطه در کیسه‌های پلی‌اتیلنی نگهداری شدند.

آماده‌سازی ماهی و اعمال فیلم‌ها

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تازه با میانگین وزنی ۴۰ ± ۳۰۰ گرم تهیه و به شکل کاملاً یخ‌پوشی‌شده به آزمایشگاه فرآوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شد. بعد از مراحل تخلیهٔ شکمی و سرزنی، فیله‌های تهیه‌شده به خوبی شست‌وشو و جهت حذف آب اضافی زیر هود قرارگرفتند. در مرحلهٔ بعد فیله‌ها با فیلم‌های مورد نظر پوشانده‌شده و تیماربندی بدین‌شکل صورت گرفت: شاهد (فاقد فیلم)؛ نمونه‌های پوشش‌داده با نانوکامپوزیت پروتئین-نانوفیبر سلولز؛ نانوکامپوزیت پروتئین-نانوفیبر سلولز حاوی ۲ درصد اسانس؛ نانوکامپوزیت پروتئین-نانوفیبر سلولز حاوی ۲ درصد اسانس نانولیپوزوم‌شده. در پایان فیله‌های مربوطه در ظروف مخصوص قرارگرفته و به یخچال منتقل شدند و به مدت ۱۶ روز در فواصل زمانی ۴ روز مورد ارزیابی قرار گرفتند.

بررسی میزان بار میکروبی

نخست میزان ۵ گرم از نمونهٔ فیلهٔ ماهی تحت شرایط استریل با ۴۵ میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژی مخلوط و سپس هموژن گردید. در ادامه رقت‌های مورد نیاز تهیه و میزان ۱ میلی‌لیتر از هرکدام جهت کشت و بررسی بار باکتریایی کل، سرمادوست، سودوموناس[1] و انتروباکتریاسه[2] به روش پورپلیت به‌ترتیب در محیط‌های کشت پلیت کانت آگار[3]، ستریماید آگار[4] و وی‌آربی‌جی آگار[5]، مورد استفاده قرار گرفتند. شمارش بار باکتریایی سرمادوست و کل به‌ترتیب در دمای ۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۰ روز و دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲ روز انجام گرفت (Jouki *et al*., 2014b). همچنین بررسی تعداد باکتری‌های سودوموناس و انتروباکتریاسه به‌ترتیب در دماهای ۲۵ و ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲ روز انجام پذیرفت (Gómez-Estaca *et al*., 2010).

سنجش تغییرات رنگ

شاخص‌های مرتبط با رنگ (L^* (شفافیت)، a^* (+ قرمز/- سبز) و b^* (+ زرد/- آبی)) با استفاده از دستگاه رنگ‌سنج (loviband CAM-System 500) بررسی شدند. پس از کالیبره‌کردن دستگاه توسط کاشی مخصوص، ارزیابی مستقیماً در تیمارهای مختلف طی زمان نگهداری انجام گرفت و نتایج به‌صورت میانگین ۹ نقطه از هر نمونه گزارش شد (Juki *et al*., 2014c).

ارزیابی حسی

ارزیابی حسی نمونه‌ها توسط ۷ فرد که قبل از تست آموزش دیده بودند، 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). نقطهٔ بحرانی مقبولیت هریک از ویژگی‌ها ۳ در نظر گرفته شد و پایین‌تر از آن به معنای رد خصوصیات حسی مورد نظر بود (Ojagh *et al*., 2010).

تجزیه‌وتحلیل آماری

تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام گرفت. ابتدا بررسی نرمال‌بودن و همگنی واریانس داده‌ها به‌ترتیب با استفاده از آزمون‌های کولموگراف-اسمیرنوف[6] و لون[7] انجام گرفت. سپس به‌منظور تجزیه‌وتحلیل مقادیر کمی به‌دست‌آمده از آنالیزهای میکروبی و حسی از تجزیهٔ واریانس[8] و همچنین برای مقایسهٔ 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

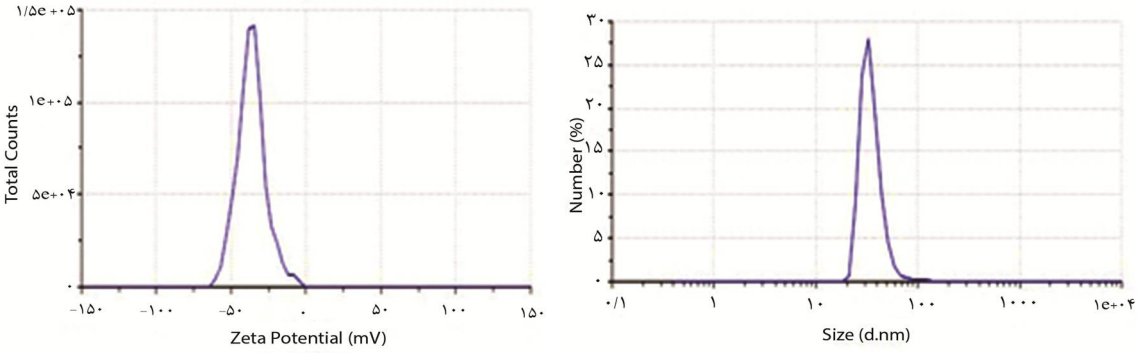
بررسی خواص نانولیپوزوم (اندازهٔ ذرات و پتانسیل زتا)

نمودارهای مرتبط با توزیع اندازهٔ ذرات و همچنین پتانسیل زتا نانولیپوزوم‌های تولیدشده در شکل (۱) نشان داده شده است. طبق نتایج بیشینهٔ توزیع اندازهٔ نانوذرات در محدودهٔ زیر ۱۰۰ نانومتر بود. بنابراین سایز نانولیپوزوم‌ها با آنچه که برای کاربردهای غذایی و دارویی نیاز است، مطابق بود (Wu *et al*., 2015). اندازهٔ نانولیپوزوم‌ها به‌دلیل تأثیر بر پایداری، ظرفیت آزادسازی ترکیبات محصورشده در هسته و همچنین تأثیر بر خواص مختلف فیلم‌های حاوی آنها مورد توجه است. درحالت‌کلی سایز کوچک به‌دلیل تأثیر بر افزایش انعطاف‌پذیری و ظرفیت سدکنندگی فیلم و همچنین فراهم‌شدن ساختار همگن‌تر در آنها مطلوب است (Jimenez *et al*., 2014). نتایج مرتبط با بررسی اندازهٔ ذرات نانولیپوزوم در این تحقیق با مشاهده‌های حاصل از کارهای مشابه انجام‌شده مطابقت داشت (Zhang *et al*., 2012; Jiménez *et al*., 2014) و اندک تفاوت مشاهده‌شده در نتایج می‌تواند به‌دلیل تفاوت در زمان سونیکاسیون و همچنین مواد شرکت‌کننده در دیسپرسیون باشد. طبق گزارش Jiménez و همکاران (۲۰۱۴) به ۳۰۰ ثانیه سونیکاسیون برای ریزپوشانی

[1] Pseudomonas
[2] Enterobacteriaceae
[3] Plate Count Agar
[4] Cetrimide Agar
[5] Violet Red Bile Glucose Agar
[6] Kolomogorav-Smirnov
[7] Leven
[8] Analysis of variance

کامل ترکیبات ضدمیکروب (اسانس‌ها) در داخل این نوع از نانولیپوزوم‌ها احتیاج است. همچنین گزارش شده است که نانولیپوزوم‌های بارگذاری‌شده با ترکیبات ضدمیکروبی (اسانس روغنی) سایز کمتری را نسبت به نانولیپوزوم‌های بدون این ترکیبات نشان دادند که همین عامل می‌تواند در بروز سایز نسبتاً کوچک این نانوذرات در تحقیق حاضر مؤثر بوده باشد (Jiménez *et al.*, 2014).

پتانسیل زتا فاکتوری مهم در تولید نانولیپوزوم‌ها محسوب می‌شود که برای توضیح میزان بار موجود در دیسپرسیون به‌کاررفته و بر پایداری نانولیپوزوم‌های تولیدشده مؤثر است. همان‌طورکه مشهود است دامنهٔ پتانسیل زتا نانولیپوزوم‌های تولیدشده در ناحیهٔ منفی قرار دارد و بیشینهٔ میزان آن در نقطهٔ ۳۶/۶- میلی‌ولت واقع است. این منفی‌بودن اساساً ناشی از حضور گروه‌های انتهایی زنجیره‌های چربی است. به‌طورکلی گزارش شده است که اگر میزان مطلق پتانسیل زتا بین ۶۰-۳۰ میلی‌ولت باشد به‌دلیل دافعهٔ الکترواستاتیک ایجادشده، سیستم نانولیپوزومی پایدار است (Wu *et al.*, 2015). بنابر مطالب ذکرشده می‌توان نتیجه گرفت که نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس پونهٔ کوهی تولیدشده، به‌منظور شرکت داده‌شدن در محلول فیلم‌ساز و همچنین کاربرد در سایر سیستم‌های غذایی به اندازهٔ کافی پایدارند.



شکل ۱ - نمودارهای مرتبط با توزیع اندازهٔ ذرات و پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس پونهٔ 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 رشدکرده 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 اسیدلاکتیک به‌طورکلی در فلور عامل فساد ماهی غالب‌اند. باکتری‌های گرم منفی مختلفی از قبیل انتروباکتریاسه نیز دراین‌زمینه مطرح هستند (Gram & Huss, 1996; Kazemi & Rezaei, 2015).

نتایج مرتبط با تغییرات بار باکتریایی کل[1] تیمارهای مختلف در شکل (۲-الف) نشان داده‌شده است. تمامی تیمارها در روز صفر شرایط تقریباً مشابهی نشان دادند و بین آنها اختلاف چندانی مشاهده نشد. میزان کم بار باکتریایی کل در روز صفر نگهداری نشان‌دهندهٔ کیفیت بهداشتی مناسب ماهی از مرحلهٔ صید تا مصرف است. میزان پایین TVC فیلهٔ ماهی قزل‌آلا در روز صفر در کارهای مشابه مختلف گزارش شده است (Ojagh *et al.*, 2010; Jouki *et al.*, 2014b; Kazemi & Rezaei, 2015). باگذشت زمان میزان بار باکتریایی کل برای تمامی نمونه‌ها روند افزایشی نشان داد به‌طوری‌که به بالاترین سطح خود در روز ۱۶ رسید. افزایش بار باکتریایی کل در طول زمان نگهداری سرد توسط Ojagh 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 خالص و

[1] Total Viable Count

نانولیپوزوم‌شده در طول زمان نگهداری به شکل معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) نسبت به ۲ تیمار دیگر سبب کنترل و کندترشدن روند افزایشی میزان بار باکتریایی کل شدند. ICMSF (۲۰۰۲) بار باکتریایی کل در حد ۷ (لگاریتم واحد تشکیل کلونی/گرم) را به‌عنوان آخرین میزان مجاز پذیرش برای گونه‌های ماهی آب شور و شیرین معرفی کرده است. بنابراین در این تحقیق فیلم‌های فعال ازنظر این شاخص سبب افزایش زمان ماندگاری فیله‌ها تا روز ۱۲ شدند. این افزایش احتمالاً ناشی از اثر اسانس خالص و نانولیپوزوم‌شده بر رشد باکتری‌های موجود در فیله و ممانعت از آن است. نتایج مشابهی در زمینهٔ کاربرد اسانس‌ها در کنترل بار باکتریایی کل فیلهٔ ماهی توسط دیگر محققان گزارش شده است (Ojagh *et al*., 2010; Ahmad *et al*., 2012; Jouki *et al*., 2014b; Kazemi & Rezaei, 2015). همچنین میزان این شاخص در پوشش‌های حاوی اسانس نانولیپوزوم‌شده نسبت به اسانس خالص در بازهٔ زمانی ۴ تا ۱۰ به‌طور قابل ملاحظه‌ای کمتر بود که این می‌تواند به‌دلیل اثر تقویتی و پایدارکنندگی نانولیپوزوم بر اسانس باشد (Liolios *et al*., 2009; Wu *et al*., 2015).

باکتری‌های گرم منفی سرمادوست[1] گروه اصلی از میکروارگانیسم‌های عامل فساد هوازی ماهیان تازه ذخیره‌سازی‌شده در دمای سرد می‌باشند (Gram & Huss, 1996; Ojagh *et al*., 2010; Kazemi & Rezaei, 2015). میزان اولیهٔ (شکل ۲-ب) آنها در تیمارهای مختلف پایین بود که نشان‌دهندهٔ رعایت نکات بهداشتی و شرایط مناسب ماهی از قبیل تیماربندی است. این شاخص در طول دورهٔ نگهداری در تمامی تیمارها به شکل معنی‌داری افزایش یافت اما روند افزایشی آن در تیمارهای حاوی اسانس خالص و نانولیپوزوم نسبت به شاهد شیب کمتری نشان داد ($P<۰/۰۵$). ازطرفی در روزهای میانی شرایط تیمارهای حاوی اسانس نانولیپوزوم‌شده نسبت به خالص بهتر بود اما در روزهای پایانی این ۲ تیمار عملاً اختلافی باهم نداشتند ($P<۰/۰۵$). این پدیده می‌تواند با توانایی نانولیپوزوم‌ها در پایدارکردن اثر اسانس نهایتاً تا روز ۱۰ مرتبط باشد که احتمالاً در روزهای بعد تأثیر آن کاهش‌یافته و اختلاف موجود بین ۲ تیمار کم‌شده است. به‌طورکلی اعمال تیمارهای فعال روی فیلهٔ ماهی سبب شد بالاترین حد مجاز بار باکتریایی سرمادوست (۷ لگاریتم واحد تشکیل‌کلونی/گرم) از روز ۸ در تیمار شاهد به روز ۱۲ افزایش یابد. Ahmad و همکاران (۲۰۱۲) نتایج مشابهی را در زمینهٔ کاهش بار باکتریایی سرمادوست به‌وسیلهٔ اعمال فیلم‌های خوراکی فعال‌شده با اسانس علف لیمو[2] گزارش کردند. همچنین فیلم‌های کیتوزانی حاوی اسانس دارچین در کاهش میزان رشد باکتری‌های سرمادوست فیلهٔ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تأثیر معنی‌داری داشتند (Ojagh *et al*., 2010). ازطرفی Jouki و همکاران (۲۰۱۴b) و Kazemi و Rezaei (۲۰۱۵) اثر مثبت اسانس پونهٔ کوهی را بر کاهش روند رشد باکتری‌های سرمادوست نشان دادند.

نمودار الگوی رشد باکتری‌های سودوموناس موجود در فیله‌های ماهی تیمارشده با فیلم‌های مختلف در شکل (۲-ج) مشخص است. با افزایش طول دورهٔ 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 حاوی اسانس خالص و نانولیپوزوم‌شده در ممانعت و کاهش روند رشد این باکتری‌ها طی دورهٔ نگهداری اثر معنی‌دار داشتند ($P<۰/۰۵$). همچنین مشخص شد که فیلم‌های حاوی اسانس نانولیپوزوم‌شده 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، دی‌متیل‌سولفید، کتون، استر، آمین، آلدهید و هیپوگزانتین را تولیدکرده و سبب غیرقابل مصرف‌شدن محصول می‌شوند (Gram & Huss, 1996; Gram & Dalgaard, 2002). نتایج مشابهی در زمینهٔ اثر بازدارندگی فیلم و پوشش‌های فعال‌شده با اسانس پونهٔ کوهی بر سودوموناس‌ها توسط محققان دیگر گزارش شده است (Mexis *et al*.,

[1] Total aerobic mesophiles

[2] Lemongrass Oil

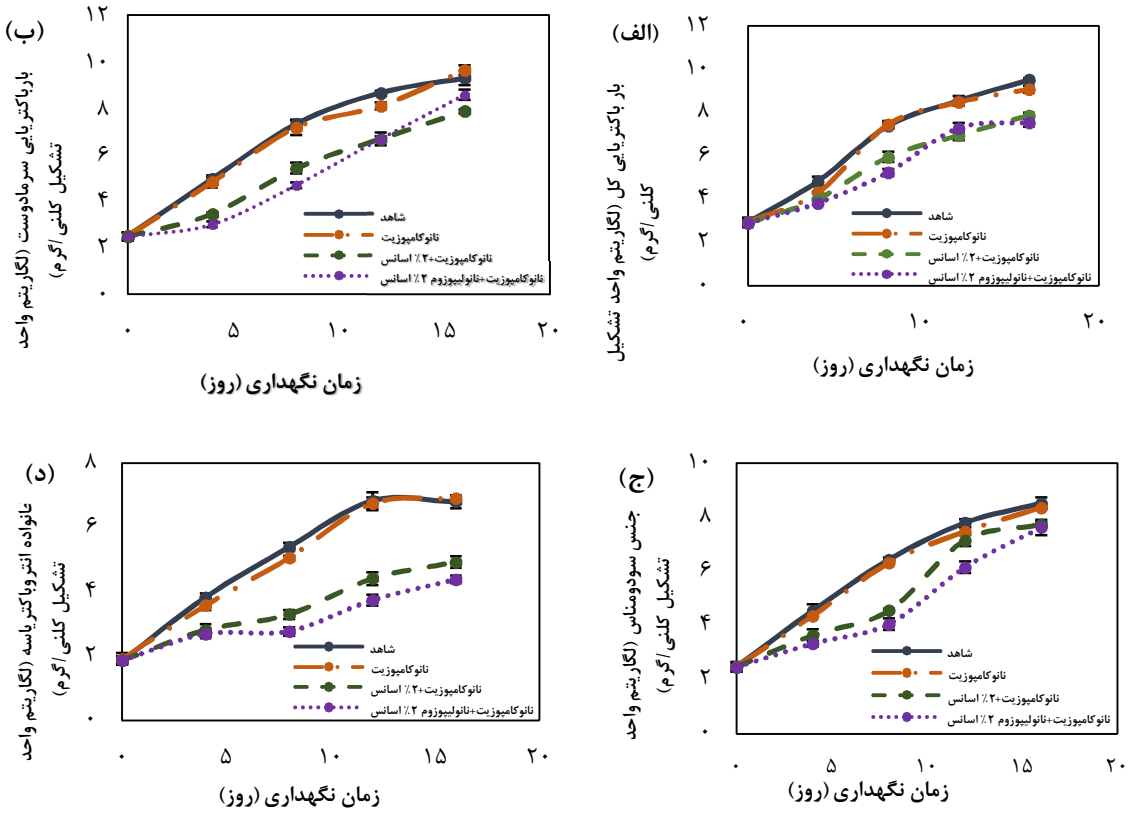
2009; Emiroğlu *et al*., 2010; Jouki *et al*., 2014b; Kazemi & Rezaei, 2015). همچنین Pyrgotou و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که سودوموناس‌ها در مقایسه با سایر باکتری‌های عامل فساد کمترین حساسیت را در برابر اسانس پونهٔ کوهی نشان دادند که این نتیجه در مطالعهٔ حاضر چندان نمودی نداشت. Gómez-Estaca و همکاران (۲۰۱۰) نیز کاهش میزان رشد باکتری‌های سودوموناس را ازطریق به‌کارگیری فیلم کیتوزان-ژلاتین حاوی اسانس میخک در فیلهٔ ماهی کاد گزارش کردند.

نتایج مرتبط با بررسی میزان انتروباکترهای شمارش‌شده از فیله‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان طی روزهای مختلف نگهداری در شکل (۲-د) نشان داده شده است. تیمارهای مختلف ازنظر این شاخص در روز صفر شرایط مشابهی داشتند و پایین‌بودن آن در روز صفر تیمارهای مختلف نشان‌دهندهٔ کیفیت مناسب بهداشتی فیله‌ها در اثر کیفیت مناسب زنجیرهٔ انتقال و نگهداری ماهی است. فیلم‌های حاوی اسانس خالص و نانولیپوزوم‌شده بر کنترل روند رشد انتروباکترها مؤثر بوده و سبب کاهش آن شدند. همچنین فیلم‌های حاوی اسانس نانولیپوزوم‌شده نسبت به اسانس خالص به‌ویژه در روزهای ابتدایی تا میانی نگهداری، شرایط بهتری داشتند. انتروباکترها گروهی دیگر از باکتری‌ها می‌باشند که در فرایند فساد فیلهٔ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان طی زمان نگهداری در شرایط سرد تأثیر گذارند. بررسی وجود و روند رشد این باکتری‌ها در مواد غذایی ازجمله فراورده‌های شیلاتی ضروری است چرا که این خانواده بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا نظیر سالمونلا را دربرمی‌گیرد. انتروباکترها در واقع خانوادهٔ بزرگی از باکتری‌های گرم منفی هستند که به‌عنوان شاخص بهداشتی شناخته می‌شوند (Mexis *et al*., 2009). این باکتری‌ها در زمان نگهداری ترکیباتی مانند تری‌متیل‌آمین، سولفید هیدروژن، کتون‌ها، استرها، آلدهیدها، هیپوگزانتین و اسید تولید می‌کنند (Gram & Huss, 1996). محققان دلیل حضور این نوع از باکتری‌ها را در آبزیان با عواملی نظیر صید از مناطق آلوده، تأخیر در یخ‌گذاری آبزیان صیدشده و همچنین شرایط بهداشتی نامناسب پس از صید و زمان نگهداری مرتبط دانسته‌اند (Jeevanandam *et al*., 2001; Papadopoulos *et al*., 2003). در واقع پتانسیل ایجاد فساد توسط باکتری‌های انتروباکتریاسه به‌ویژه در موارد آب آلوده و یا به‌تأخیرافتادن سردسازی ماهیان پس از صید می‌بایست مدنظر قرار گیرد (Sallam, 2007). دربارهٔ بررسی اثر اسانس‌های گیاهی در بازدارندگی رشد انتروباکترهای فیلهٔ ماهی نتایج مشابهی با یافته‌های تحقیق حاضر گزارش شده است (Ojagh *et al*., 2010; Ahmad *et al*., 2012; Jouki *et al*., 2014b).

به‌طورکلی در تحقیق حاضر مشخص شد که فیلم‌های فعال حاوی اسانس خالص و نانولیپوزوم‌شده قادرند به‌طور مؤثر از فعالیت و رشد باکتری‌های مختلف عامل فساد جلوگیری کنند. فعالیت ضدمیکروبی اسانس پونهٔ کوهی و اثر تقویت‌کنندگی و پایدارکنندگی ریزپوشانی (نانولیپوزوم) بر اسانس‌های مختلف در تحقیق‌های مشابه انجام‌شده، گزارش شده است (Liolios *et al*., 2009; Jouki *et al*., 2014b; Kazemi & Rezaei, 2015; Wu *et al*., 2015). فعالیت ضدمیکروبی اسانس پونهٔ کوهی به اجزاء تشکیل‌دهندهٔ آنها و اساساً ترکیبات فنولیک مثل ترپن‌هایی ازقبیل کارواکرول (2-methyl-5-[1-methylethyl] phenol) و تیمول (5-methyl-2-[1-methylethyl] phenol) نسبت داده می‌شود (Gómez-Estaca *et al*., 2010). کارواکرول و تیمول دیوارهٔ بیرونی باکتری‌های گرم منفی را متلاشی کرده و سبب آزادشدن لیپوپلی‌ساکاریدها می‌شوند که درنتیجهٔ آن نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی به آدنوزین تری‌فسفات[1] افزایش می‌یابد. در واقع فعالیت ضدمیکروبی 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 جنبهٔ فعالیت ضدمیکروبی آنها مهم است (Jouki *et al*., 2014a; Ahmad *et al*., 2012). گروه‌های هیدروکسیل توانایی آب‌دوستی این ترکیبات را افزایش‌داده و به حل‌شدن آنها در غشای سیتوپلاسمی میکروب و تخریب آن کمک می‌کنند. درحالت‌کلی، مکانیسم ضدمیکروبی اسانس‌ها با اختلال در غشای سیتوپلاسمی، مختل‌کردن نیروی انتقال

[1] Adenosine triphosphate

پروتن، جریان الکترون، انتقال فعال و انعقاد محتویات درونی سلول مرتبط است (Gómez-Estaca *et al.*, 2010; Günlü & Koyun, 2013). به‌علاوه ذکر این نکته ضروری است که اثر ضدمیکروبی پوشش‌ها و فیلم‌های فعال حاوی اسانس می‌تواند با نوع گونه و ترکیب شیمیایی بدن ماهی مرتبط باشد و گزارش شده است که محتوای بالای چربی اثر و عمل ضدمیکروبی اسانس‌ها را بر میکروارگانیسم‌های مختلف در محصولات گوشتی کاهش می‌دهد (Kazemi & Rezaei, 2015). دربارهٔ بهبود و پایدارترشدن اثر ضدمیکروبی تیمار حاوی اسانس نانولیپوزوم‌شده در مقایسه با اسانس خالص، Wu و همکاران (۲۰۱۵) طی یک بررسی مقایسه‌ای، اثر ضدمیکروبی فیلم‌های خوراکی حاوی اسانس دارچین خالص و ریزپوشانی‌شده را مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که تیمارهای حاوی اسانس نانولیپوزم‌شده در طول زمان انکوباسیون (به مدت ۳۰ روز) اثر پایدارتر و بیشتری را نشان دادند که این مشاهده‌ها می‌تواند تا حدودی نتایج مطالعهٔ حاضر را تأیید کند. باهدف توضیح بیشتر این پدیده می‌توان گفت، طبق نتایج گزارش‌شده توسط محققان دیگری دراین‌زمینه، روش تماس مستقیم اسانس با محیط کشت و نفوذ در محیط آگار برای تخمین ویژگی‌های ضدباکتریایی اسانس راهکار مناسبی نیست. ازآنجایی‌که به نظر می‌رسد هم‌زمان با پخش‌شدن اسانس در محیط کشت، ترکیبات فرار و فعال آن تبخیرشده و فقط بخش قطبی آنهاست که از رشد باکتری ممانعت می‌کند (Kubo *et al.*, 1995; Kalemba & Kunicka, 2003). بنابراین باتوجه‌به مشابهت محیط کشت آگاردار با سیستم‌های غذایی جامد با فعالیت آبی بالا، می‌توان عنوان کرد که نانولیپوزوم‌ها با کنترل رهایش اسانس در محیط و هدایت بیشتر ترکیبات فرار موجود در آن به سمت فلور باکتریایی موجود اثر آن را بهبود داده و تا مدت طولانی‌تر حفظ کرده‌اند.



شکل ۲- مقادیر شمارش، الف: بار باکتریایی کل؛ ب: بار باکتریایی سرمادوست؛ ج: باکتری‌های سودوموناس؛ د: انتروباکترهای فیله‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تیمارشده با فیلم‌های مختلف طی مدت نگهداری در یخچال (۲±۴ درجهٔ سانتی‌گراد)؛

Control: داده‌ها به‌صورت میانگین (حداقل ۳ تکرار)± انحراف معیار گزارش شده است.

سنجش تغییرات رنگ

نتایج مرتبط با تغییر شاخص‌های رنگ تیمارهای مختلف در جدول (۱) گزارش شده است. شاخص L^* تمام تیمارها در طول زمان نگهداری کاهش یافت که نشان‌دهندهٔ کاهش شفافیت فیله‌ها بود ($P<۰/۰۵$). در بررسی مقایسه‌ای تیمارها مشخص شد که فیله‌های پوشش‌داده‌شده با فیلم‌های فعال نسبت به ۲ تیمار دیگر تغییر کمتری در شاخص L^* نشان دادند که بیانگر ثبات بیشتر رنگ در این تیمارها بود. Jung و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که تغییرات در رنگ گوشت و ماهی در طول زمان نگهداری می‌تواند با واکنش‌های آنزیمی و غیرآنزیمی مرتبط باشد که نتیجهٔ آن سبب تخریب پروتئین‌های میوفیبریل و ازدست‌رفتن نظم و جهت‌گیری آنها شده و درنتیجه رنگ تغییر می‌کند. همچنین اشاره شد که رنگ فیلهٔ ماهی (شاخص L^*) با مقادیر رنگ مرتبط با رنگدانه‌های هم، ساختار فیزیکی عضله و میزان فراوانی آب موجود که پخش نور را تحت تأثیر قرار می‌دهد، مرتبط است (Juki *et al.*, 2014c). Ahmad و همکاران (۲۰۱۲) نتایج مشابهی را دراین‌زمینه گزارش کردند و اشاره کردند که شاخص L^* فیلهٔ ماهی سی‌باس[1] طی زمان نگهداری کاهش می‌یابد. ازطرفی Juki و همکاران (۲۰۱۴c) گزارش کردند که شاخص L^* فیله‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان طی زمان نگهداری افزایش یافت.

شاخص a^* تیمارهای مختلف به‌طورکلی طی زمان نگهداری کاهش یافت ($P<۰/۰۵$). تیمارهای پوشش‌داده‌شده با فیلم‌های فعال تا حدودی سبب حفظ رنگ قرمز فیله‌ها شدند، به‌طوری‌که طبق جدول (۱) شاخص a^* این تیمارها در مقایسه با ۲ تیمار دیگر به میزان کمتری کاهش یافت ($P<۰/۰۵$). گزارش شده است که کاهش رنگ قرمز گوشت با تولید و واکنش ترکیبات مرتبط با (TBARS[2]) تولیدشده طی زمان نگهداری سرد مرتبط است. همچنین گزارش شده است که شاخص قرمزی با سطح میزان TVB-N نیز مرتبط است که با افزایش آن از رنگ قرمز کاسته می‌شود. در واقع می‌توان گفت بین کاهش رنگ قرمز، میزان تخریب میکروبی و اکسیداسیون ارتباط وجود دارد و احتمالاً فعالیت ضدمیکروبی/اکسیدانی اسانس در حفظ رنگ فیله‌های پوشش‌داده‌شده با تیمارهای فعال مؤثر بوده است (Juki *et al.*, 2014c).

شاخص b^* تیمارهای مختلف به‌طورکلی طی زمان نگهداری افزایش یافت ($P<۰/۰۵$). نمونه‌های پوشش‌دهی‌شده با فیلم‌های فعال در پایان زمان نگهداری شاخص b^* کمتری در مقایسه با ۲ تیمار دیگر نشان دادند ($P<۰/۰۵$). تصور می‌شود که این اختلاف در شاخص b^* فیله‌ها به‌دلیل رنگ ناشی از محصولات تولیدی در اثر اکسیداسیون چربی‌ها بخصوص آلدهیدها باشد که می‌توانند منبعی از ترکیبات کربونیلی را برای واکنش میلارد فراهم کنند (wu *et al.*, 2011). شاخص b^* فیله‌های پوشش‌دهی‌شده با فیلم‌های فعال در مقاطعی از زمان نگهداری بالاتر از ۲ تیمار دیگر به نظر رسید که این می‌تواند به‌دلیل تأثیر رنگ زرد این فیلم‌ها بر تیمارهای مربوطه باشد. همچنین گزارش شد که افزایش در شاخص b^* به همراه کاهش در شاخص a^* می‌تواند نتیجهٔ تجمع و پلیمریزاسیون بازها باشد. به‌طورکلی می‌توان گفت که فیلم‌های فعال در اثر تأخیر واکنش‌های مرتبط با فساد، تغییرات رنگ فیله را نیز به‌تأخیرانداخته و سبب حفظ کیفیت رنگ آن در طول زمان نگهداری شده‌اند.

[1] Sea Bass
[2] Thiobarbituric Acid Reactive Substances

جدول ۱- تغییر شاخص‌های رنگ فیله‌های شاهد و تیمارشده با فیلم نانوکامپوزیت پروتئین-نانوفیبر سلولز و همچنین فیلم‌های نانوکامپوزیت حاوی ۲ درصد اسانس پونهٔ کوهی نانولیپوزوم‌شده و خالص طی مدت ۱۶ روز نگهداری در یخچال (۲±۴ درجهٔ سانتی‌گراد)

شاخص رنگ	تیمار	زمان نگهداری (روز)				
		۰	۴	۸	۱۲	۱۶
L^*	شاهد	۵۵/۳۶±۱/۴۷^{aA}	۵۴/۵۶±۰/۴۹^{aAB}	۵۳/۷۶±۱/۲۰^{aAB}	۵۲/۷۰±۱/۰۵^{aB}	۵۲/۴۶±۲/۰۰^{aB}
	پروتئین-سلولز ۴/ درصد۰	۵۵/۴۶±۰/۱۵^{aA}	۵۵/۵۳±۰/۸۰^{aA}	۵۴/۰۶±۰/۶۳^{aAB}	۵۳/۰۳±۰/۶۶^{aBC}	۵۱/۷۳±۱/۰۰^{aC}
	پروتئین-سلولز ۰/۴درصد-پونه ۲ درصد	۵۳/۴۶±۱/۱۰^{aA}	۵۲/۷۳±۱/۰۰^{bA}	۵۲/۱۶±۱/۹۶^{aA}	۵۱/۶۶±۲/۵۳^{aA}	۵۱/۳۶±۰/۸۰^{aA}
	پروتئین-سلولز ۰/۴ درصد-لیپوزوم پونه ۲ درصد	۵۴/۹۳±۱/۹۳^{aA}	۵۴/۶۰±۱/۱۵^{aA}	۵۴/۲۰±۲/۲۲^{aA}	۵۳/۷۳±۱/۷۹^{aA}	۵۳/۴۶±۱/۵۰^{aA}
a^*	شاهد	۰/۸۳±۰/۰۶^{aA}	۰/۶۳±۰/۵۷^{aB}	۰/۴۶±۰/۰۵^{bC}	۰/۰۲±۰/۰۱^{bD}	-۰/۲۶±۰/۰۵^{dE}
	پروتئین-سلولز۰/۴ درصد	۰/۸۶±۰/۱۵^{aA}	۰/۸۶±۰/۰۵^{aA}	۰/۴۴±۰/۰۸^{bB}	۰/۴۹±۰/۰۶^{aB}	۰/۳۶±۰/۰۳^{cB}
	پروتئین-سلولز ۰/۴ درصد-پونه ۲ درصد	۰/۸۳±۰/۰۲^{aA}	۰/۵۶±۰/۰۶^{aBC}	۰/۵۱±۰/۰۲^{bC}	۰/۵۸±۰/۰۲^{aBC}	۰/۵۸±۰/۰۲^{bBC}
	پروتئین-سلولز ۰/۴ درصد-لیپوزوم پونه ۲ درصد	۰/۸۱±۰/۰۹^{aA}	۰/۸۷±۰/۰۶^{aA}	۰/۸۴±۰/۰۷^{aA}	۰/۵۳±۰/۰۶^{aB}	۰/۶۶±۰/۰۵^{aB}
b^*	شاهد	۵/۳۳±۰/۵۱^{aB}	۶/۵۳±۰/۶۳^{aA}	۶/۸۰±۰/۷۰^{aA}	۷/۱۰±۰/۳۶^{aA}	۷/۱۱±۰/۱۰^{aA}
	پروتئین-سلولز۰/۴ درصد	۵/۰۳±۰/۳۰^{aC}	۵/۳۶±۰/۳۷^{cC}	۶/۱۳±۰/۰۵^{aB}	۶/۷۳±۰/۱۱^{aA}	۷/۱۳±۰/۰۵^{aA}
	پروتئین-سلولز۰/۴ درصد-پونه ۲ درصد	۵/۵۶±۰/۳۵^{aC}	۵/۸۳±۰/۴۰^{abBC}	۶/۵۰±۰/۵۵^{aAB}	۶/۷۶±۰/۳۲^{aA}	۷/۰۳±۰/۱۵^{aA}
	پروتئین-سلولز ۰/۴ درصد-لیپوزوم پونه ۲ درصد	۵/۱۰±۰/۳۶^{aC}	۵/۷۳±۰/۱۱^{abBC}	۶/۱۰±۰/۱۷^{aAB}	۶/۰۳±۰/۰۴^{bAB}	۶/۷۳±۰/۷۵^{aA}

حروف متفاوت کوچک (a، b، c و..) درهر ستون نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار بین تیمارها و حروف متفاوت بزرگ (A، B، C و...) درهر ردیف نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار بین زمان‌ها در سطح (P<۰/۰۵) است. داده‌ها به‌صورت میانگین (حداقل ۳ تکرار) ± انحراف معیار بیان شده‌اند.

نتایج مرتبط با ارزیابی حسی

نتایج ارزیابی حسی تیمارهای مختلف با بررسی ۴ ویژگی بافت، بو، رنگ و پذیرش کلی در جدول (۲) نشان داده شده است. در ابتدا تمامی تیمارها ازنظر ۴ شاخص مورد بررسی قابل قبول بودند و اعمال فیلم‌های مختلف روی فیلهٔ ماهی در روزهای نخست تأثیر نامطلوبی بر خواص حسی آنها نداشت. باگذشت زمان اختلاف بین تیمارها بیشتر شد و کیفیت ویژگی‌های حسی در نمونهٔ شاهد و فیلم‌های نانوکامپوزیت با سرعت بیشتری کاهش یافتند (P<۰/۰۵). به‌طوری‌که در روز ۱۲ نگهداری تیمار شاهد و فیلم نانوکامپوزیت ازنظر ویژگی‌های مختلف به زیر ۳ که حد قابل قبول برای مصرف انسانی است، نزول کردند اما در ۲ تیمار دیگر شاخص‌های مرتبط همچنان عدد بالای ۳ را نشان‌دادند. این افزایش ماندگاری و حفظ کیفیت حسی را می‌توان به خواص ضدمیکروبی فیلم‌های فعال نسبت داد. در واقع این نتایج به نوعی با نتایج آزمون‌های میکروبی همسو بودند. همچنین در بررسی نتایج فیلم‌های حاوی اسانس خالص و نانولیپوزوم‌شده مشخص شد که فیلم‌های حاوی نانولیپوزوم امتیاز پایین‌تری در شاخص بافت کسب کردند که این می‌تواند نشان‌دهندهٔ تأثیر نامطلوب فیلم‌های حاوی لستین بر بافت فیله باشد که علت آن مشخص نیست. ازطرفی فیلم‌های حاوی نانولیپوزم بالاترین شاخص بو، رنگ و پذیرش کلی را ارائه دادند (P<۰/۰۵). در بررسی‌های چشمی نیز مشخص شد که این فیم‌ها تأثیر مثبتی بر خواص ظاهری (رنگی) فیله دارند. نتایج مشابهی درزمینهٔ به‌کارگیری فیلم‌های فعال حاوی اسانس در بهبود ماندگاری و حفظ کیفیت فیلهٔ ماهی و بروز اثرات آن در ارزیابی حسی توسط سایر محققان گزارش شده است (Ojagh *et al*., 2010; Jouki *et al*., 2014b).

جدول ۲ - تغییر شاخص‌های حسی فیله‌های شاهد و تیمارشده با فیلم نانوکامپوزیت پروتئین-نانوفیبر سلولز و همچنین فیلم‌های نانوکامپوزیت حاوی ۲ درصد اسانس پونهٔ کوهی نانولیپوزوم‌شده و خالص طی مدت ۱۶ روز نگهداری در یخچال (۲±۴ درجهٔ سانتی‌گراد)

شاخص	تیمار	زمان نگهداری (روز)				
		۰	۴	۸	۱۲	۱۶
رنگ						
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}
	پروتئین-سلولز ۴/ درصد۰	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}
	پروتئین-سلولز ۰/۴ درصد-پونه ۲ درصد	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}
	پروتئین-سلولز ۰/۴ درصد-لیپوزوم پونه ۲ درصد	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}
	پروتئین-سلولز ۰/۴ درصد	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}
	پروتئین-سلولز ۰/۴ درصد-پونه ۲ درصد	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}
	پروتئین-سلولز ۰/۴ درصد-لیپوزوم پونه ۲ درصد	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}
	پروتئین-سلولز ۰/۴ درصد	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}
	پروتئین-سلولز ۰/۴ درصد-پونه ۲ درصد	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}
	پروتئین-سلولز ۰/۴ درصد-لیپوزوم پونه ۲ درصد	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}
	پروتئین-سلولز ۰/۴ درصد	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}
	پروتئین-سلولز ۰/۴ درصد-پونه ۲ درصد	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}
	پروتئین-سلولز ۰/۴ درصد-لیپوزوم پونه ۲ درصد	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 کوچک (a، b، c و غیره) در هر ستون نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار بین تیمارها و حروف متفاوت بزرگ (A، B، C و غیره) در هر ردیف نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار بین زمان‌ها در سطح (P<۰/۰۵) است. داده‌ها به‌صورت میانگین (حداقل ۳ تکرار) ± انحراف معیار بیان شده‌اند.

نتیجه‌گیری

نتایج آزمون‌های مختلف میکروبی نشان داد که اعمال فیلم نانوکامپوزیت پروتئین-نانوفیبر سلولز هرچند که درحالت خالص تأثیر چندانی از جنبهٔ افزایش مدت ماندگاری و کنترل عوامل فساد میکروبی نداشت، اما فعال‌سازی آن به‌وسیلهٔ اسانس پونهٔ کوهی درحالت خالص و ریزپوشانی‌شده توانست روند رشد باکتری‌های مختلف را در طی زمان نگهداری کنترل کرده و مدت ماندگاری تکه‌های فیلهٔ ماهی قزل‌آلا را در مقایسه با تیمار شاهد تا حدود قابل قبولی افزایش دهد. اعمال پوشش‌های حاوی اسانس ریزپوشانی‌شده به‌ویژه در روزهای نخست تا میانی (۱ تا ۱۰) تأثیر بهتری نسبت به اسانس خالص داشت. همچنین نتایج حاصل از بررسی شاخصه‌های حسی و رنگ تیمارهای مختلف نیز به نوعی همسو با آزمون‌های میکروبی بوده و تیمارهای پوشش‌داده‌شده با فیلم‌های فعال نسبت به تیمار شاهد در طول زمان نگهداری ازنظر شاخص‌های رنگ تغییر کمتری نشان دادند و نمرهٔ حسی بالاتری را دریافت کردند.

منابع

۱- کاظمی، م. ۱۳۹۴. کاربرد فیلم پروتئینی حاوی نانوسلولز و نانولیپوزوم‌های اسانس پونهٔ کوهی بر کیفیت و ماندگاری فیلهٔ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) طی نگهداری در یخچال. پایان‌نامهٔ کارشناسی‌ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

2- Aguirre, A., Borneo, R., & León, A.E. 2013. Antimicrobial, mechanical and barrier properties of triticale protein films incorporated with oregano essential oil. Food Bioscience, 1:2-9.

3- Ahmad, M., Benjakul, S., Sumpavapol, P., & Nirmal, N.P. 2012. Quality changes of sea bass slices wrapped with gelatin film incorporated with lemongrass essential oil. International Journal of Food Microbiology, 155(3):171-178.

4- Barbosa-Pereira, L., Angulo, I., Lagarón, J.M., Paseiro-Losada, P., & Cruz, J.M. 2014. Development of new active packaging films containing bioactive nanocomposites. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 26:310-318.

5- Blanco-Pascual, N., Fernández-Martín, F., & Montero, P. 2014. Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) myofibrillar protein concentrate for edible packaging films and storage stability. LWT-Food Science and Technology, 55(2):543-550.

6- Cai, L., Cao, A., Li, Y., Song, Z., Leng, L., & 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.

7- Condés, M.C., Añón, M.C., Mauri, A.N., & Dufresne, A. 2015. Amaranth protein films reinforced with maize starch nanocrystals. Food Hydrocolloids, 47:146-157.

8- Emiroğlu, Z.K., Yemiş, G.P., Coşkun, B.K., & Candoğan, K. 2010. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. Meat Science, 86(2):283-288.

9- Gómez-Estaca, J., de Lacey, A.L., López-Caballero, M.E., Gómez-Guillén, M.C., & Montero, P. 2010. Biodegradable gelatin–chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. Food Microbiology, 27(7):889-896.

10-Gram, L., & Dalgaard, P. 2002. Fish spoilage bacteria–problems and solutions. Current Opinion in Biotechnology, 13(3):262-266.

11-Gram, L., & Huss, H.H. 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. International journal of Food Microbiology, 33(1):121-137.

12-Günlü, A., & 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 & Bioprocess Technology, 6(7):1713-1719.

13-Hamaguchi, P.Y., WuYin, W., & Tanaka, M. 2007. Effect of pH on the formation of edible films made from the muscle proteins of Blue marlin (*makaira mazara*). Food Chemistry, 100(3):914-920.

14-ICMSF. 2002. Microorganisms in Foods 7. Kluwer Academic/Plenum Publishers New York.

15-Jeevanandam, K., Kakatkar, A., Doke, S.N., Bongirwar, D.R., & Venugopal, V. 2001. Influence of salting and gamma irradiation on the shelf-life extension of threadfin bream in ice. Food Research International, 34(8):739-746.

16-Jensen, A., Lim, L.T., Barbut, S., & Marcone, M. 2015. Development and characterization of soy protein films incorporated with cellulose fibers using a hot surface casting technique. LWT-Food Science and Technology, 60(1):162-170.

17-Jeyasekaran, G., Ganesan, P., Anandaraj, R., Shakila, R.J., & Sukumar, D. 2006. Quantitative and qualitative studies on the bacteriological quality of indian white shrimp (Penaeus indicus) stored in dry ice. Food Microbiology, 23(6):526-533.

18-Jiménez, A., Sánchez-González, L., Desobry, S., Chiralt, A., & Tehrany, E.A. 2014. Influence of nanoliposomes incorporation on properties of film forming dispersions and films based on corn starch and sodium caseinate. Food Hydrocolloids, 35:159-169.

19-Jouki, M., Yazdi, F.T., Mortazavi, S.A., & Koocheki, A. 2014a. Quince seed mucilage films incorporated with oregano essential oil: physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. Food Hydrocolloids, 36:9-19.

20-Jouki, M., Yazdi, F.T., Mortazavi, S.A., Koocheki, A., & Khazaei, N. 2014b. 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.

21-Jouki, M., Mortazavi, S.A., Yazdi, F.T., Koocheki, A., & Khazaei, N. 2014c. Use of quince seed mucilage edible films containing natural preservatives to enhance physico-chemical quality of rainbow trout fillets during cold storage. Food Science and Human Wellness, 3(2):65-72.

22-Jung, S., Ghoul, M., & de Lamballerie-Anton, M. 2003. Influence of high pressure on the color and microbial quality of beef meat. LWT-Food Science and Technology, 36(6):625-631.

23-Kalemba, D., & Kunicka, A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medicinal Chemistry, 10(10):813-829.

24-Kazemi, S.M., & Rezaei, M. 2015. Antimicrobial effectiveness of gelatin–alginate film containing oregano essential oil for fish preservation. Journal of Food Safety, 35(4): 482-490.

25-Khanjari, A., Karabagias, I.K., & Kontominas, M.G. 2013. Combined effect of N, o-carboxymethyl chitosan and oregano essential oil to extend shelf life and control Listeria monocytogenes in raw chicken meat fillets. LWT-Food Science & Technology, 53(1):94-99.

26-Kubo, I., Muroi, H., & Kubo, A. 1995. Structural functions of antimicrobial long-chain alcohols and phenols. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 3(7):873-880.

27-Limpan, N., Prodpran, T., Benjakul, S., & 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(1):226-233.

28-Liolios, C.C., Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J., & 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(1):77-83.

29-Ma, Q., Zhang, Y., Critzer, F., Davidson, P.M., Zivanovic, S., & Zhong, Q. 2016. Physical, mechanical, and antimicrobial properties of chitosan films with microemulsions of cinnamon bark oil and soybean oil. Food Hydrocolloids, 52:533-542.

30-Mexis, S.F., Chouliara, E., & 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(6):598-605.

31-Nowzari, F., Shábanpour, B., & Ojagh, S.M. 2013. Comparison of chitosan–gelatin composite and bilayer coating and film effect on the quality of refrigerated rainbow trout. Food Chemistry, 141(3):1667-1672.

32-Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H., & Hosseini, S.M.H. 2010. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. Food Chemistry, 120(1):193-198.

33-Panaitescu, D.M., Frone, A.N., Ghiurea, M., & Chiulan, I. 2015. Influence of storage conditions on starch/PVA films containing cellulose nanofibers. Industrial Crops & Products, 70:170-177.

34-Papadopoulos, V., Chouliara, I., Badeka, A., Savvaidis, I.N., & 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(4):411-420.

35- Pires, C., Ramos, C., Teixeira, B., Batista, I., Nunes, M.L., & Marques, A. 2013. Hake proteins edible films incorporated with essential oils: physical, mechanical, antioxidant and antibacterial properties. Food Hydrocolloids, 30(1): 224-231.

36- Pyrgotou, N., Giatrakou, V., Ntzimani, A., & Savvaidis, I.N. 2010. Quality assessment of salted, modified atmosphere packaged rainbow trout under treatment with oregano essential oil. Journal of Food Science, 75(7):406-411.

37- Sallam, K.I., 2007. Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. Food Control, 18(5):566-575.

38- Savadekar, N.R., Karande, V.S., Vigneshwaran, N., Bharimalla, A.K., & Mhaske, S.T. 2012. Preparation of nano cellulose fibers and its application in kappa-carrageenan based film. International Journal of Biological Macromolecules, 51(5):1008-1013.

39- Trovatti, E., Fernandes, S.C., Rubatat, L., da Silva Perez, D., Freire, C.S., Silvestre, A.J., & Neto, C.P. 2012. Pullulan–nanofibrillated cellulose composite films with improved thermal and mechanical properties. Composites Science and Technology, 72(13):1556-1561.

40- Wen, P., Zhu, D.H., Wu, H., Zong, M.H., Jing, Y.R., & Han, S.Y. 2016. Encapsulation of cinnamon essential oil in electrospun nanofibrous film for active food packaging. Food Control, 59: 366-376.

41- Wu, J., Liu, H., Ge, S., Wang, S., Qin, Z., Chen, L., Zheng, Q., Liu, Q., & Zhang, Q. 2015. 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.

42- Wu, C.H., Huang, S.M., Lin, J.A., & Yen, G.C. 2011. Inhibition of advanced glycation endproduct formation by foodstuffs. Food & Function, 2(5):224-234.

43- Zhang, H.Y., Tehrany, E.A., Kahn, C.J.F., Ponçot, M., Linder, M., & Cleymand, F. 2012. Effects of nanoliposomes based on soya, rapeseed and fish lecithins on chitosan thin films designed for tissue engineering. Carbohydrate Polymers, 88(2):618-627.

44- Zinoviadou, K.G., Koutsoumanis, K.P., & Biliaderis, C.G. 2009. Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. Meat Science, 82(3):338-345.

The Assessment of Effect of Fish Myofibrillar Protein-Nanofibrillated Cellulose Edible Film Incorporated with Oregano Essential Oil Nanoliposomes on Microbial Quality of Rainbow Trout Fillet during Cold Storage

Mohsen Kazemi[1*], Bahare Shabanpour[2], Parastoo Pourashouri[3]

1- PhD. Student, Department of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
* Corresponding author (kazemi_mohsen@yahoo.com)
2- Professor, Department of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
3- Assistant Professor, Department of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Abstract

In this study, bionanocomposite films enriched with Oregano essential oil (OEO) and OEO nanoliposomes (2% v/v) as a preservative agent on the rainbow trout fillets were used. Trout fillets were separated into four groups: unwrapped trout fillet (control), wrapped with nanocomposite based fish myofibrillar protein (FMP)-nanofibrillated cellulose (NFC) and wrapped with nanocomposites incorporated with 2% (v/v) OEO and OEO nanoliposomes. Trout fillets were analyzed for microbiological (total viable count, psychrotrophic count, Pseudomonas spp. counts and Enterobacteriaceae counts), sensory and color characteristics. The results of microbiological analysis showed that the highest rate of growth was observed respectively in trout fillets stored in air (control), wrapped with FMP-NFC nanocomposite and the lowest counts were in wrapped samples with nanocomposite enriched with OEO and OEO nanoliposomes ($P<0.05$). In this regard, the films enriched with OEO and OEO nanoliposomes increased the microbial shelf life for 4 days (up to 12). The wrapped sample by film enriched with OEO nanoliposomes, especially in the early to middle (day 10) storage time, for microbiological characteristics were better than the film contain OEO. Compared to control samples, fillet samples wrapped with activated films showed less change in sensory and color (L^*, a^* and b^*) characteristics during storage ($P<0.05$).

Keywords: Fish Myofibrillar Protein, Nanocomposite, Nanoliposome, Oregano Essential Oil, Rainbow Trout