شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

دوره ۷۰، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۶

صفحات ۲۲۰-۲۱۱

تأثیر پوشش نانوکامپوزیت کیتوزان و عصاره‌ی رزماری (*Rosmarinus officinalis L*) بر خصوصیات شیمیایی فیله‌ی فیل ماهی (*Huso huso*) تلقیح شده با لیستریا مونوسیتوژنز (*Listeria monocytogenes*) نگهداری شده در یخچال

آلیکا جعفری کلیجی[۱]، سید علی جعفرپور*[۲]، رضا صفری[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه شیلات، گرایش فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

۲-دانشیار گروه شیلات، گرایش فراوری محصولات شیلاتی،دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

۳-مربی، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۲۸ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۶/۳

چکیده

این مطالعه با هدف ارزیابی اثرات آنتی اکسیدانی و آنتی باکتریال پوشش نانوکامپوزیت کیتوزان و عصاره ی رزماری در فیله ی فیل ماهی تلقیح شده با لیستریامونوسیتوژنز نگهداری شده در یخچال (۴±۱°C) انجام شد. ماهی فیله و به چهار گروه شاهد (بدون پوشش)، تیمار رزماری ۰/۵ درصد، کیتوزان ۱ درصد و ترکیب کیتوزان ۱درصد و رزماری ۰/۵ درصد به عنوان تیمار نانوکامپوزیت کیتوزان تقسیم شد. سپس همه‌ی نمونه‌ها با لیستریا مونوسیتوژنز تلقیح شدند. متعاقبا پارامترهای شیمیایی (بازهای نیتروژنی فعال، عدد پراکسید، pH و تیوباربیتوریک اسید) و ویژگی‌های ضدلیستریایی نمونه ها در طی شانزده روز نگهداری در یخچال (۱Cº±۴) بررسی شدند. بر اساس نتایج، نانوکامپوزیت کیتوزان توانایی معنی‌داری ($P<0.05$) را برای جلوگیری از رشد لیستریا مونوسیتوژنز از ۴/۱۴ log cfu/g به ۲/۲۳ log cfu/g و به دنبال آن به‌ترتیب تیمارهای کیتوزان ۱ درصد و عصاره‌ی رزماری ۰/۵ درصد در مقایسه با نمونه شاهد در انتهای دوره‌ی نگهداری نشان داد. بر حسب پارامترهای شیمیایی، اگرچه نمونه‌های پوشش داده شده به‌وسیله ی نانوکامپوزیت دارای پایین‌ترین pH و بازهای نیتروژنی فرار ($P<0.05$) بودند، هرچند این پوشش توانایی متوقف کردن دناتوره شدن پروتئین را بعد از هشت روز نگهداری ($P>0.05$) نداشت.از طرف دیگر پوشش نانوکامپوزیت کیتوزان اکسیداسیون لیپید را به وسیله‌ی کاهش تولید پراکسید و تیوباربیتوریک اسید در نمونه‌ها در مقایسه با تیمار شاهد در انتهای دوره‌ی نگهداری در یخچال به تعویق انداخت.

واژگان کلیدی: نانوکامپوزیت کیتوزان، عصاره رزماری، کیتوزان، لیستریا مونوسیتوژنز، فیل ماهی.

* نویسنده مسئول: تلفن: ۰۹۸۱۵۱۳۸۲۲۷۱+ ایمیل: a.jafarpour@sanru.ac.ir

۱. مقدمه

ماهی یکی از فسادپذیرترین فرآورده‌های غذایی است و ماندگاری چنین فرآورده‌هایی در حضور اکسیژن و رشد میکروارگانیسم‌های هوازی عامل فساد محدود می‌گردد (Ozogul *et al*., 2010). لیستریا مونوسیتوژنز یک باکتری گرم مثبت هوازی است که سبب لیستریوزیس، مننژیتو انسفالیت می‌شود (Allerberger and Wagner, 2010; Embarek, 1994; Tamayo *et al*., 2014). این باکتری از طریق مصرف گوشت، بوقلمون، ماهی و فرآورده‌های لبنی و شیلاتی به انسان منتقل می‌شود (Hamon *et al*., 2006). بنابراین در موادغذایی به مواد و روش‌هایی برای جلوگیری از رشد و مهار میکروارگانیسم نیاز می باشد (Jokar *et al*., 2012; Tamayo *et al*., 2014).

همچنین روغن ماهی شامل اسیدهای چرب چندغیر اشباع بلند زنجیر از قبیلایکوزاپنتانوئیک اسید و دوکوزاهگزانوئیک اسید هستند که نسبت به اکسیداسیون آسیب‌پذیر هستند (Ozogul *et al*., 2010; Sarkardei and Howell, 2008). عصاره‌ی گیاهانی از قبیل رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) منبعی از ترکیبات بیواکتیو (زیستی فعال) هستند که از نرخ رشد فساد موادغذایی جلوگیری می‌کنند (Klancnik *et al*., 2009). به علت خواص ضد اکسایشی قوی رزماری، این گیاه به صورت عصاره و به‌طور گسترده‌ای برای نگهداری مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. عامل ایجاد خواص ضد اکسایشی در رزماری ترکیبات دیترپن‌های فنولی از قبیل: اسید کارنوزیک، کارنوزول، رزمانول، اپی و ایزو رزمانول و متیل کارنوزات هستند (Ibanez *et al*., 2003). به‌علاوه رزماری در برابر باکتری‌های گرم مثبت از قبیل *Leuconostoc mesenteroides*, *Listeria monocytogenes* و *Staphylococcus aureus* نیز باکتری‌های گرم منفی از قبیل *Escherichiacoli* موثر می‌باشد (Abdollahi *et al*., 2012a; Abdollahi *et al*., 2012b; Abdollahi *et al*., 2014; Ture *et al*., 2008).

کیتوزان یکی از نگهدارنده‌های طبیعی و پوششی فعال است (López-Caballero *et al*., 2005) که به علت طبیعت غیر سمی، فعالیت آنتی اکسیداتیوی و آنتی باکتریال، خاصیت تشکیل فیلم، زیست سازگاری و زیست تخریب‌پذیری به‌عنوان یکی از افزودنی‌های غذایی طبیعی مورد توجه قرار گرفته است (Fan *et al*., 2009). کیتوزان یکی از بهترین پلیمرهای زیستی است که تاکنون برای تهیه فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی به کار رفته است (Peniche *et al*., 2008).

توسعه نانوکامپوزیت‌ها یک استراتژی جدید برای بهبود خصوصیات فیزیکی پلیمرها ازقبیل قدرت مکانیکی، مقاومت حرارتی وخصوصیات ممانعت کنندگی نسبت به گاز است (Arora and Padua, 2010). سیستم های نانوکامپوزیت ضد میکروبی برای کنترل عوامل بیماری‌زا بسیار مناسب است. از آن-جایی‌که مواد در محدوده مقیاس نانودارای نسبت سطح به حجم بالاتری در مقایسه با همتای مقیاس میکرو هستند موثرتر خواهند بود (Luo and Stutzenberger, 2008). موادی با مقیاس نانو برای فعالیت ضد میکروبی به‌عنوان مهارکننده‌های رشد (Cioffi *et al*., 2005)، عوامل کشنده (Qi *et al*., 2004) یا حامل‌های آنتی‌بیوتیک عمل می‌کنند (Kumar and Münstedt, 2005). بنابراین هدف از این پژوهش، تعیین اثرات ضد اکشایشی و ضد لیستریایی کیتوزان و عصاره‌ی رزماری به‌عنوان سیستم نانوکامپوزیت کیتوزان در فیله‌ی فیل ماهی چالش داده شده با باکتری لیستریا مونوسیتوزنز نگهداری شده در یخچال است.

۲. مواد و روش‌ها

فیل ماهی (*Huso huso*) با وزن متوسط ۴ کیلوگرم از کارگاه پرورش ماهیان خاویاری ساعی ساری خریداری و در مجاورت زنجیره سرد به پایلوت فرآوری محصولات شیلاتی دانشگاه علوم کشاورزی انتقال داده شد. پس از سر و دم زنی، خارج کردن امعاء و احشاء و غضروف، پوست‌کنی انجام شده و نسبت به تهیه فیله‌های ۵۰ گرمی اقدام گردید. مجموع این عملیات به‌وسیله دست صورت گرفت.

برای تهیه عصاره رزماری ۵۰ گرم از گیاه خشک به‌همراه ۵۰۰ میلی لیتر الکل اتانول (Merck, Germany) ۹۵٪ در دکانتور قرار داده شد و به مدت ۲۴ ساعت عصاره‌گیری صورت گرفت. سپس دستگاه

توسط روتاری با ایجاد خلاء تبخیر شد. این عمل تا به‌دست آمدن مقدار کافی عصاره تکرار خواهد گردید (Nelson and Onyeagba, 2007). جهت تهیه نانوکامپوزیت کیتوزان، کیتوزان از شرکت سیگما (Sigma-Aldrich Chemical Co., USA) خریداری شده و محلول ۱ درصد کیتوزان (با وزن مولکولی متوسط) در اسید استیک ۱ درصد تهیه شده و پس از قرار دادن روی هیتر مگنت و تنظیم دما در محدوده ۴۰ درجه، به‌مدت ۳ ساعت شیک گردید. در مرحله بعد، گلیسرول به میزان ۰/۷۵ (حجمی /حجمی) میلی‌لیتر به ازای هر گرم کیتوزان به‌عنوان نرم‌کننده اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه مجدداً شیک شد و در نهایت با استفاده از کاغذ واتمن ۳ تحت خلاء صاف گردید.

برای تهیه نانوکامپوزیت، عصاره رزماری به مقدار ۰/۵ درصد به محلول پایه اضافه شده و محلول نهایی به مدت ۵ دقیقه در آمپلی تود ۸۰ و فرکانس ۴۰ کیلوهرتز سونیکه شده که اینکار با استفاده از دستگاه اولتراسوند (Hilscher UP200H, Germany) انجام گرفت (Maurya *et a*l., 2012). سویه استاندارد و لیوفیلیزه باکتری *Listeria monocytogenes* 1163 *PTCC* از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (Persian Type Culture collection (PTCC) Tehran, Iran) تهیه شد. از کلنی‌های لیستریا در داخل پلیت لیستریا کروم آگار برداشت کرده و به محیط BrainHeart Infusion Broth (BHI)(Merck, Germany) انتقال داده و سوسپانسیون باکتری در ۱۵ میلی‌لیتر BHI به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد در ۱۵۰rpm با دو انتقال متوالی انکوبه شد. سلول‌های باکتری از BHI به وسیله ی سانتریفیوژ سه گانه در ۵۰۰۰ rpm مدت ۱۵ دقیقه جداسازی و در طی ۲ سانتریفیوژ نهایی ماده‌ی شناور بر روی سطح حذف و سرم فیزیولوژیک به آن اضافه گردید و شمارش سلول باکتریایی به وسیله روش (OD) در ۶۰۰ نانومتر مشخص شد به‌طوری که جذب نوری ۰/۰۸ تا ۰/۱ تقریباً معادل ۱×۱۰^{۸} باکتری در هر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد (Abdollahzadeh *et al*., 2014). بعد از رقیق‌سازی، نمونه‌ها که شامل فیله های بدون پوشش، پوشش داده شده به وسیله‌ی کیتوزان ۱ درصد، رزماری ۰/۵ درصد و نانوکامپوزیت کیتوزان هستند به‌وسیله‌ی ۱×۱۰^{۴}cfu/g تلقیح گردید. سپس نمونه‌ها ماساژ داده شدند تا از اختلاط کامل باکتری با فیله ماهی اطمینان حاصل شود و در دمای ۴ درجه در زمان‌های ۰، ۴ ، ۸ ، ۱۲ و ۱۶ روز مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۱.۲. ترکیبات تقریبی

میزان رطوبت در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد در آون و خاکستر در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد در کوره الکتریکی تعیین شد. میزان چربی طبق روش Blight و Dyer (۱۹۵۹) و میزان پروتئین کل با استفاده از روش کلدال اندازه‌گیری شد (AOAC, 2005).

۲.۲. آزمون میکروبی (شمارش لیستریا)

برای آزمایش میکروبی ۵ گرم از نمونه‌های تیمار شده و شاهد به وسیله ۴۵ میلی‌لیتر از محلول رینگر هموژنایز شد. برای شمارش لیستریا هم از ۰/۱ میلی لیتر از رقت تهیه شده بر روی محیط کشت لیستریا کروم آگار پخش شده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون گردید. کلنی‌های آبی با اندازه‌ی متوسط دارای هاله‌ی سفید تا شیری نشان دهنده‌ی لیستریا مونوسیتوژنز می‌باشند (El Marrakchi *et al*., 2005).

۳.۲. آزمون‌های شیمیایی

برای اندازه‌گیری PV و TBA مطابق با روش پیشنهاد شده توسط Egan و همکاران (۱۹۹۷) و Namulem و همکاران (۱۹۹۹) استفاده شد. pH مطابق با روش پیشنهاد شده توسط Abdollahi و همکاران (۲۰۱۴) و TVB-N مطابق روش پیشنهاد شده توسط Jeon و همکاران (۲۰۰۲) انجام شد.

۴.۲. تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS16 و بررسی نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف انجام شد. به منظور

جدول ۱- ترکیبات تقریبی فیله‌ی فیل ماهی تلقیح شده با لیستریا مونوسیتوژنز نگهداری شده در یخچال

زمان نگهداری (روز)	پارامترها (درصد وزن مرطوب)			
	پروتئین	چربی	رطوبت	خاکستر
۰	۱۹/۵۵±۰/۰۱*	۱۱/۵۷±۰/۰٤	٦٥/۱۳±۰	۲/٤۷±۰/۰۱
۱٦	۱۹/۲۱±۰/۰٤	۱۱/۳٤±۰/۰۷	٦٥/۸۷±۰/۰۳	۲/٥۷±۰/۰٤

*میانگین ± انحراف معیار

جدول ۲- اثر کیتوزان، رزماری و نانوکامپوزیت کیتوزان بر pH فیله‌ی فیل ماهی تلقیح شده با لیستریا مونوسیتوژنز نگهداری شده در یخچال

دوره نگهداری (روز)	تیمارها			
	شاهد	کیتوزان ۱درصد	رزماری ۰/۵ درصد	نانوکامپوزیت کیتوزان
۰	٦/۲۰±۰/۰۱^{Ae*}	٦/۱٦ ± ۰/۰٤^{Ae}	٦/۱۱± ۰^{Be}	٦/۱٦ ±۰/۰۱^{Ad}
٤	٦/۲۸±۰ ^{Ad}	٦/۲٤± ۰/۰۱^{Bd}	٦/۲۷±۰/۰۲^{ABd}	٦/۲٥±۰/۰۱^{ABc}
۸	٦/۳٥±۰/۰۲^{Ac}	٦/۳۲ ± ۰/۰۰٥^{Ac}	٦/۳۳ ± ۰/۰۱^{Ac}	٦/۲۸ ± ۰/۰۱^{Bc}
۱۲	٦/٤۷±۰/۰۳^{ABb}	٦/٥۱ ± ۰/۰٤^{Ab}	٦/٤۷ ±۰/۰٦^{ABb}	٦/٤۲ ±۰/۰۰٥^{Bb}
۱٦	٦/۷۹±۰/۰٤^{Aa}	٦/۷ ± ۰/۰۷^{Aba}	٦/٦٦ ± ۰/۰۳^{Ba}	٦/٦۳ ± ۰/۰٥^{Ba}

*میانگین ± انحراف معیار

حروف بزرگ در هر ردیف نشانگر معنی‌دار یا عدم معنی‌داری بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ می‌باشد (اثر هر تیمار در زمان های مختلف).
حروف کوچک در هر ردیف نشانگر معنی‌دار یا عدم معنی‌داری بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ می‌باشد (اثر تیمارها در هر زمان).

ارزیابی رفتار لیستریا و پارامترهای مختلف شیمیایی در زمان‌های مختلف از آزمون‌های آنالیز واریانس یکطرفه (One-Way ANOVA) و به‌منظور ارزیابی معنی‌دار بودن داده‌ها، از آزمون دانکن Duncan در سطح معنی‌دار پنج درصد استفاده شد.

۳. نتایج

۱.۳. ارزیابی شیمیایی

ترکیبات تقریبی در تیمار شاهد در ابتدا و انتهای دوره‌ی نگهداری در جدول ۱ نشان داده می‌شود. بدیهی است که اختلاف معنی‌داری بین ارزش غذایی نمونه شاهد در ابتدا و انتهای دوره‌ی نگهداری مشاهده نشد.

pH: pH اولیه از ۶/۱۱ در رزماری به ۶/۲۰ در نمونه شاهد محدود بود (جدول ۲). بر اساس نتایج، pH در زمان ذخیره‌سازی افزایش یافت. در انتهای دوره نگهداری (روز شانزدهم) نمونه‌های تیمار شده بوسیله‌ی نانوکامپوزیت کیتوزان pH (۶/۶۳±۰/۰۷) پایین‌تری را نشان داد و به دنبال آن نمونه‌های تیمار شده با کیتوزان (۶/۷±۰/۰۹) و رزماری (۶/۶۶±۰/۰۴) pH پایینتری نسبت به شاهد (۶/۷۹±۰/۰۶) نشان دادند.

مجموع بازهای نیتروژنی فرار (TVB-N): مقادیر مجموع بازهای نیتروژنی فرار در تیمارهای مختلف و طی مدت ۱۶ روز نگهداری در جدول ۳ آورده شده است. مقدار TVB-N با گذشت زمان افزایش یافت به طوری‌که میزان بازهای نیتروژنی فرار اولیه در شاهد ۱۰/۳۵ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم گوشت و ۱۰/۴۶ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم گوشت در تیمار نانوکامپوزیت کیتوزان بوده و به ترتیب به ۶۵/۸۴ و ۴۷/۲۴ میلی گرم در ۱۰۰ گرم گوشت افزایش یافت. مقدار بازهای نیتروژنی فرار به‌طور معنی‌داری ($P<0.05$) در نمونه های پوشش داده شده با نانوکامپوزیت کیتوزان نسبت به سایر تیمارها کمتر بوده است. با افزایش دوره‌ی نگهداری، بازهای نیتروژنی فرار در همه‌ی نمونه‌ها به‌طور معنی‌داری ($P<0.05$) افزایش یافت. به‌طوری که بیشترین نرخ افزایش در شاهد و کمترین در نمونه‌های پوشش داده شده به وسیله‌ی نانوکامپوزیت در طی شانزده روز نگهداری بود.

۲.۳. اکسیداسیون لیپید

پراکسید (PV): پراکسید استخراج شده از روغن فیله ی فیل ماهی که در جدول ۴ نمایش داده شده است، در همه‌ی تیمارها با افزایش طول دوره نگهداری افزایش یافت. در روز شانزدهم ارزش پراکسید به

جدول ۳- اثر کیتوزان، رزماری و نانوکامپوزیت کیتوزان بر TVB-N فیله ی فیل ماهی تلقیح شده با لیستریا مونوسیتوژنز نگهداری شده در یخچال

دوره نگهداری (روز)	شاهد	کیتوزان ۱ درصد	رزماری ۰/۵ درصد	نانوکامپوزیت کیتوزان
۰	۱۰/۳۳ ± ۰/۱۰ ^{Be*}	۱۰/۵۳ ± ۰/۰۱ ^{Abe}	۱۰/۶۲ ± ۰/۱۵ ^{Ae}	۱۰/٤٦ ± ۰/۱٤ ^{Abe}
٤	۱٦/۸٦ ± ۰/٤٥ ^{Ad}	۱۵/۵۵ ± ۰/۱۲ ^{Cd}	۱٦/۱۸ ± ۰/۳۰ ^{Bd}	۱۳/۷۵ ± ۰/۰٦ ^{Dd}
۸	۲٤/۲٦ ± ۰/۳۲ ^{Ac}	۲۳/۹۷± ۱/٦٤ ^{Ac}	۲۳/٤۰ ± ۰/۲٦ ^{Ac}	۲۰/۷۳ ± ۰/۸٦ ^{Bc}
۱۲	٥٦/۷٦ ± ۰/۸۷ ^{Ab}	٥۳/۸۷ ± ۱/۹٥ ^{Bb}	٥۳/٥٦ ± ۰/۰۹ ^{Bb}	٤٤/۷٤ ± ۲/۱۸ ^{Cb}
۱٦	٦٥/۸٤ ± ۰/٤۰ ^{Aa}	٦۲/۰٤ ± ۳/۰۸ ^{Ba}	٥۷/۹۱ ± ۰/٥۲ ^{Ca}	٤۷/۲٤ ± ۰/۲۷ ^{Da}

*میانگین ± انحراف معیار

حروف بزرگ در هر ردیف نشانگر معنی‌دار یا عدم معنی‌داری بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ می‌باشد (اثر هر تیمار در زمان های مختلف).
حروف کوچک در هر ردیف نشانگر معنی‌دار یا عدم معنی‌داری بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ می‌باشد (اثر تیمارها در هر زمان).

جدول ۴- اثر کیتوزان، رزماری و نانوکامپوزیت کیتوزان بر PV فیله ی فیل ماهی تلقیح شده با لیستریا مونوسیتوژنز نگهداری شده در یخچال

دوره نگهداری (روز)	شاهد	کیتوزان ۱درصد	رزماری ۰/۵ درصد	نانوکامپوزیت کیتوزان
۰	۰/۸٦ ± ۰/۰۰٥ ^{Ae*}	۰/۸۷ ± ۰/۰۰۷ ^{Ae}	۰/۸٤ ± ۰/۰۰٥ ^{Be}	۰/۸٦ ± ۰/۰۱ ^{Ad}
٤	۲/٤۰ ± ۰/۰۲ ^{Ad}	۲/٤٤ ± ۰/۰۷ ^{Ad}	۲/۳۲ ± ۰/۰۳ ^{ABd}	۲/۱٤ ± ۰/۲۱ ^{Bc}
۸	۲/۷٤ ± ۰/۱۳ ^{Ac}	٤/۰۳ ± ۰/۱۷ ^{Bb}	٤/٤٥ ± ۰/۰۱ ^{Ac}	۲/۷٤ ± ۰/۱۳ ^{Cb}
۱۲	۳/۷۹ ± ۰/۰۳ ^{Aa}	٤/۷۸ ± ۰/۰۱ ^{Ca}	٥/۰٤ ± ۰/۰۷ ^{Ba}	۳/۷۹ ± ۰/۰۳ ^{Da}
۱٦	۲/۹٦ ± ۰/۱٥ ^{Ab}	۳/۸۳ ± ۰/۰٤ ^{Bc}	٤/٥٥ ± ۰/۰۸ ^{Ab}	۲/۹٦ ± ۰/۱٥ ^{Cb}

*میانگین ± انحراف معیار

حروف بزرگ در هر ردیف نشانگر معنی‌دار یا عدم معنی‌داری بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ می‌باشد (اثر هر تیمار در زمان های مختلف).
حروف کوچک در هر ردیف نشانگر معنی‌دار یا عدم معنی‌داری بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ می‌باشد (اثر تیمارها در هر زمان).

جدول ۵- اثر کیتوزان، رزماری و نانوکامپوزیت کیتوزان بر TBA فیله‌ی فیل ماهی تلقیح شده با لیستریا مونوسیتوژنز نگهداری شده در یخچال

دوره نگهداری (روز)	تیمار			
	شاهد	کیتوزان ۱درصد	رزماری ۰/۵ درصد	نانوکامپوزیت کیتوزان
۰	۰/٦٤ ± ۰/۰۳ ^{Ae*}	۰/٦۸ ± ۰/۰٤ ^{Ae}	۰/٦٦ ± ۰/۰۳ ^{Ae}	۰/٦۹ ± ۰/۰۰٤ ^{Ad}
٤	۱/۲۹± ۰/۰۷ ^{Ad}	۱/۲۱± ۰/۰٤ ^{Ad}	۱/۲۳ ± ۰/۰۲ ^{Ad}	۱/۱۱ ± ۰/۰۲ ^{Bc}
۸	۲/۷۱± ۰/۰۳ ^{Ac}	۲/۵۸ ± ۰/۰٤ ^{Bc}	۲/۷۲ ± ۰/۰٦ ^{Ac}	۲/۳۹± ۰/۰۳ ^{Cb}
۱۲	۳/٦۲ ± ۰/۰۷ ^{Ab}	۳/۰۳ ± ۰/۰۸ ^{Bb}	۳/٥۳ ± ۰/۰۹ ^{Ab}	۲/۸٤ ± ۰/۳۳ ^{Ba}
۱٦	٤/۸۳ ± ۰/۰٤ ^{Aa}	٤/۰۹ ± ۰/۲٤ ^{Ba}	٤/۰۲ ± ۰/۱۱ ^{Ba}	۲/۹۹ ± ۰/۰۸ ^{Ca}

*میانگین ± انحراف معیار

حروف بزرگ در هر ردیف نشانگر معنی‌دار یا عدم معنی‌داری بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ می‌باشد (اثر هر تیمار در زمان های مختلف).
حروف کوچک در هر ردیف نشانگر معنی‌دار یا عدم معنی‌داری بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ می‌باشد (اثر تیمارها در هر زمان).

بالاترین میزان (۴/۶۱ میلی اکی والان بر کیلوگرم) در شاهد و پایین‌ترین میزان (۲/۹۶ میلی‌اکی والان در گرم) در نانوکامپوزیت کیتوزان در میان نمونه‌ها ($P<0.05$) رسید.

تیوباربیتوریک اسید (TBA): مقادیر TBA در تیمارهای مختلف در طی روزهای نگهداری در جدول ۵ مشاهده می‌شود. نتایج نشان داد که مقدار TBA به طور معنی‌داری ($P<0.05$) در همه‌ی تیمارها در طی ۱۶روز نگهداری افزایش یافت. مقدار TBA در نمونه های تیمارشدهبا نانوکامپوزیت کیتوزان به طور معنی‌داری کمتر از سایر تیمارها بود.

۳.۳. رفتار لیستریا در فیله های فیل ماهی

اثر ضدلیستریایی کیتوزان ۱ درصد، رزماری ۰/۵ درصد و نانوکامپوزیت کیتوزان بر فیله ی فیل ماهی در طی شانزده رو نگهداری در دمای $4\pm1^{\circ}C$ در جدول ۶ نشان داده شده است. نانوکامپوزیت کیتوزان بیشترین فعالیت ضد لیستریایی را نشان داد و تعداد لیستریا از ۴/۱۴ log cfu/g به ۲/۲۳ log cfu/g کاهش پیدا کرد. در میان رزماری ۰/۵ درصد و کیتوزان ۱ درصد، رزماری اثر ضد لیستریایی کمتری را در مقایسه با کیتوزان نشان داد.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

ترکیبات تقریبی موجود در فیله‌ی ماهیان به تغذیه، اندازه ماهی، سن، فصل صید و محیط زندگی

جدول ۶- اثر کیتوزان، رزماری و نانوکامپوزیت کیتوزان بر روی رفتار لیستریا مونوسیتوژنز در فیله‌ی فیل ماهی نگهداری شده در یخچال

دوره نگهداری (روز)	تیمار			
	شاهد	کیتوزان	رزماری	نانوکامپوزیت کیتوزان
۰	٤/١٤ ± ۰/۰٦ ^{Be*}	٤/١۰ ± ۰/۰٥ ^{Be}	٤/٢٨ ± ۰/۰٥ ^{Ae}	٤/١٤ ± ۰/۰٣ ^{Ba}
٤	٥/٧٩ ± ۰/١٢ ^{Ad}	٤/٥٦ ± ۰/۰٧ ^{Cd}	٤/٩٧ ± ۰/١٨ ^{Bd}	٣/٤٤ ± ۰/۰٩ ^{Da}
٨	٦/٤٤ ± ۰/۰٥ ^{Ac}	٣/٨٣ ± ۰/۰٤ ^{Cc}	٥/٦١ ± ۰/۰٤ ^{Bc}	٢/٩٨ ± ۰/۰٥ ^{Dc}
١٢	٧/۰۰٨ ± ۰/١٥ ^{Ab}	٣/٦٧ ± ۰/۰٥ ^{Cb}	٦/٦٧ ± ۰/١٣ ^{Ba}	٢/٤١± ۰/۰٩ ^{Dd}
١٦	٧/٧٣ ± ۰/۰٨ ^{Aa}	٤/٧٩ ± ۰/۰٨ ^{Ca}	٦/٤٣ ± ۰/١۰ ^{Bb}	٢/٢٣ ± ۰/١۰ ^{De}

*میانگین ± انحراف معیار

حروف بزرگ در هر ردیف نشانگر معنی‌دار یا عدم معنی‌داری بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ می‌باشد (اثر هر تیمار در زمان های مختلف).
حروف کوچک در هر ردیف نشانگر معنی‌دار یا عدم معنی‌داری بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ می‌باشد (اثر تیمارها در هر زمان).

آن‌ها بستگی دارد. این ترکیبات به‌طور عمده‌ای از گونه ای به گونه‌ی دیگر تغییر می‌کند. بدین گونه تغییرات قابل توجهی در ترکیبات عضله‌ی ماهی قابل مشاهده خواهد بود (Abdollahi *et al*., 2014c; Pacheco-Aguilar *et al*., 2000). pH در زمان نگهداری افزایش یافت اما فیله‌های تیمار شده با نانوکامپوزیت دارای کمترین pH نسبت به سایر تیمارها بودند. طبق گزارش Abdollahi و همکاران (۲۰۱۴) و Fan و همکاران (۲۰۰۹) میزان pH در فیله‌های ماهی کپور نقره‌ای تیمار شده با کیتوزان به آهستگی در زمان نگهداری در یخچال افزایش یافت. به طور کلی افزایش pHدر فرآورده‌ها ممکن است به فساد سریع فرآورده و تشکیل ترکیبات نیتروژنی و تولید متابولیت‌های باکتریایی مرتبط باشد. اگرچه نمونه‌های پوشش داده شده می‌تواند سبب مهار میکروب‌ها و گسترش زمان ماندگاری عضله در طی دوره‌ی پس از مرگ گردد (Souza *et al*., 2010). میزان کل بازهای نیتروژنی فرار یکی از شاخص‌های تشخیص تازگی ماهی است و دامنه‌ی وسیعی از ترکیبات نیتروژنی فرار شامل تری-متیل آمین، دی متیل آمین، آمونیاک و سایر ترکیبات مشابه است (Huss, 1995) که در اثر فعالیت آنزیم-های درونی و فساد باکتریایی تولید می‌شود (EEC, 1995). بالاترین سطح قابل قبول TVB-N برای ماهی و فرآورده‌های شیلاتی ۳۵ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم گوشت است (EEC, 1995). میزان TVB-N در مطالعه حاضر، نمونه شاهد و پوشش داده شده با کیتوزان، رزماری و نانوکامپوزیت کیتوزان در روز ۱۲ و ۱۶ بیشتر از حداکثر میزان قابل قبول بود، اگرچه دناتوره شدن پروتئین در پوشش نانوکامپوزیت کیتوزان در مقایسه با سایر تیمارها کمتر بود. افزایش میزان TVB-N در طول نگهداری ممکن است به‌علت فعالیت‌های آنزیم‌ها، به‌عنوان مثال، آمین‌زدایی اسیدهای آمینه آزاد، تخریب نوکلئوتیدها و اکسیداسیون آمین‌ها باشد (Gill, 1990). Ojagh و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که فیله های ماهی پوشانیده با کیتوزان و اسانس دارچین میزان TVB-N را طی ۱۶روز نگهداری افزایش داده اما TVB-N در این پوشش در مقایسه با پوشش کیتوزان و نمونه شاهد کمتر بوده است. Fan و همکاران (۲۰۰۹) تاثیر پوشش کیتوزان را بر کیفیت و مانگاری ماهی کپور نقره‌ای نگهداری شده در یخچال را بررسی کردند و طبق نتایج این پژوهشگران، پوشش کیتوزان نقش مثبتی را در نگهداری فیله‌ی ماهی به وسیله‌ی مهار فعالیت پروتئازهای درونی دارد.طبق گزارش Abdollahi و همکاران (۲۰۱۴) محلول کیتوزان/رس و کیتوزان/رس/اسانس رزماری به‌عنوان پوشش بر فیله-ی ماهی سبب افزایش TVB-N در زمان نگهداری شد و TVB-N در روز ۸ در تیمار شاهد و همچنین در روز ۱۰ در نمونه‌ی پوشش داده شده با کیتوزان از حد مجاز (سطح قابل قبول TVB-N در آبزیان و فراورده-های آنها) تجاوز کرد. همچنین نمونه‌های پوشش داده شده به‌وسیله‌ی نانوکامپوزیت مقدار TVB-N پایین-تری در مقایسه با سایر تیمارها داشتند. میزان TVB-N با گونه، فصل و محل صید، سن و جنس ماهی تغییر می‌کند و بنابراین تغییرات مشاهده شده مربوط به عوامل ذکر شده خواهد بود.

ماندگاری ماهی به علت اکسیداسیون لیپید محدود می‌باشد. شاخص پراکسید میزان کل هیدروپراکسیدها را نشان می‌دهد و یکی از شاخص های اولیه و مهم اندازه‌گیری فساد چربی ماهیان است (Ozogul *et al*., 2010). پراکسیدها ترکیباتی ناپایدار

هستند و به آلدهیدها، کتون‌ها و الکل ها تجزیه می‌گردند همچنین این فرآورده‌های فرار سبب طعم نامطلوب در ماهی می شوند (Hamilton *et al.*, 1997). میزان PV و TBA شاخص‌های شیمیایی اصلی جهت اندازه‌گیری درجه تندی اکسیداتیوی هستند (Ozogul *et al.*, 2010). در تحقیق حاضر، PV از روز ۰ تا روز ۱۲ افزایش و سپس در روز ۱۶ کاهش یافت. به‌طور کلی، PV در نانوکامپوزیت کیتوزان نسبت به شاهد کاهش یافته بود. بعد از روز ۱۴ روز نگهداری نمونه‌های تیمار شده با رزماری و کیتوزان، میزان اکسیداسیون اسیدهای چرب در کیتوزان به طور معنی‌داری بالاتر از رزماری بود. طبق گزارش Abdollahi و همکاران (۲۰۱۴) فیله‌های ماهی کپور نقره‌ای تیمار شده با نانوکامپوزیت رس/کیتوزان، PV پایین‌تری (ماکزیمم ۷/۹ میلی اکی والان O_2 بر کیلوگرم چربی ماهی) در مقایسه با نمونه های پوشش داده شده با کیتوزان (ماکزیمم ۹/۰۹ میلی اکی والان O_2 بر کیلوگرم چربی ماهی) داشتند. به طور کلی پوشش کیتوزان به‌عنوان سدی بین گوشت و محیط اطراف آن عمل کرده و نفوذ اکسیژن به سطح گوشت ماهی را به تعویق می‌اندازد (Jeon *et al.*, 2002).

شاخص TBA سطح ترکیباتی که مسئول ایجاد طعم و بوی نامطلوب در مواد غذایی هستند را اندازه گیری می‌کند و خصوصا برای اندازه‌گیری اکسیداسیون لیپید به وسیله‌ی اندازه‌گیری میزان مالون آلدئید (MDA) استفاده می‌شود (Souza *et al.*, 2010; Stikar and Hiremath, 1972). مالون دی آلدئید از هیدروپرکسیدها که محصول واکنش مقدماتی اسیدهای چرب چند غیر اشباع با اکسیژن می‌باشد، تشکیل می‌شود (Fernandez *et al.*, 1997). غلظت TBA در ماهی معمولاً بین ۳ و ۵ میلی‌گرم MDA در هر کیلوگرم گوشت است و معمولاً به‌عنوان حد مجاز برای ماهی ذخیره شده در یخ در نظر گرفته می‌شود (Fernandez *et a*l., 1997; Ozogul *et al.*, 2010). در تحقیق حاضر TBA به طور معنی‌داری در همه‌ی تیمارها در طی ۱۶روز نگهداری افزایش یافت و TBA در روز ۱۲ و ۱۶ در تمامی تیمارها به جز نانوکامپوزیت کیتوزان از حد مجاط تجاوز کرده است. طبق گزارش Abdollahi و همکاران (۲۰۱۴)، TBA در فیله‌های ماهی کپور نقره‌ای تیمار شده با نانوکامپوزیت رس/کیتوزان کمتر از فیله‌های پوشانیده با کیتوزان و شاهد بوده است. Ojagh و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که فیله‌های ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در فیله های پوشش داده شده با اسانس دارچین-کیتوزان دارای TBA کمتری (۰/۲۱ میلی گرم MDA در کیلوگرم گوشت ماهی) نسبت به نمونه‌های تیمار شده با کیتوزان و شاهد بوده است. Fan و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که پوشش کیتوزان ۲ درصد از اکسیداسیون لیپید در کپور نقره ای نگهداری شده تحت شرایط انجماد جلوگیری می‌کند (۰/۸۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم گوشت بعد از ۳۰ روز نگهداری تحت شرایط انجماد). در تحقیق حاضر میزان TBA در همه‌ی نمونه‌های تیمار شده و نگهداری شده در یخچال کمتر از ۵ میلی‌گرم MDA اکی والان بر کیلوگرم گوشت بوده است. لیستریا مونوسیتوزنز به خوبی در فرآورده‌های شیلاتی طی نگهداری در یخچال رشد می کند (Embarek, 1994). طبق نتایج این تحقیق تعداد لیستریا در نمونه شاهد و رزماری در طی ۱۶روز نگهداری افزایش یافت. در نمونه های تیمارشده با کیتوزان تا روز ۱۲ لیستریا افزایش و سپس در روز ۱۶ کاهش یافت. همچنین نمونه های تیمار شده با نانوکامپوزیت کیتوزان پایین‌ترین تعداد لیستریا را نشان دادند.Alboofetileh و همکاران (۲۰۱۵) دریافتند که نانوکامپوزیت مبتنی برآلژینات رشد لیستریا مونوسیتوژنز را در زمان ۱۵ روز نگهداری به تاخیر انداخت. کیتوزان درای اثر ضد لیستریایی می باشد (Fernandez-Saiz *et al.*, 2010). طبق گزارش Rozman وJersek (۲۰۰۹) عصاره‌ی رزماری دارای فعالیت ضد میکروبی خوبی در برابر لیستریا مونوسیتوژنز است. عصاره‌ی رزماری به‌عنوان یک افزودنی موادغذایی برای نگهداری و جلوگیری از فساد موادغذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین عصاره‌ی این گیاه، فعالیت ضد لیستریایی قوی نشان داده و در غذاهای آلوده به لیستریا مونوسیتوزنز برای کنترل این باکتری مورد استفاده قرار می‌گیرد (Bubonja-Sonje *et al.*, 2011). به‌طور کلی اسانس و عصاره‌های گیاهی به‌عنوان نگهدارنده‌های بیولوژیکی قادر به کاهش بار میکروبی موادغذایی و آبزیان هستند و از آن‌ها به‌عنوان نگهدارنده‌های طبیعی

برای کاهش بار میکروبی باکتری‌های گرم مثبت نظیر لیستریا مونوسیتوژنز استفاده می‌شود (Yaghoubzadeh and Safari, 2014).

۵. نتیجه گیری

پوشش نانوکامپوزیت کیتوزان، بیشتر خصوصیات شیمیایی فیله ی فیل ماهی تلقیح شده با لیستریامونوسیتوژنز را در مقایسه با نمونه شاهد در طی شانزده روز نگهداری در یخچال گسترش داد. در این مطالعه مشاهده شد که نانوکامپوزیت کیتوزان به وضوح اکسیداسیون لیپید را با کاهش PV و TBA نسبت به نمونه شاهد در زمان نگهداری به تعویق انداخت. همچنین افزودن نانوکامپوزیت کیتوزان به فیله ها بالاترین اثر ضد لیستریایی را نسبت به سایر تیمارها نشان داد. بنابراین این پوشش می تواند به عنوان یک نگهدارنده ی سالم و بی خطر برای فیله‌ی ماهی در زمان نگهداری در یخچال مورد استفاده قرار گیرد.

References

Abdollahi, M., Rezaei, M., Farzi, A., 2012a. A novel active bionanocomposite film by incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. *Journal of Food Engineering*, 111, 343-350 .

Abdollahi, M., Rezaei, M., Farzi, A., 2012b. Improvement of active chitosan film properties with rosemary essential oil for food packaging. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 847-853 .

Abdollahi, M., Rezaei, M., Farzi, A., 2014. Influence of chitosan/clay functional bio-nanocomposite activated with rosemary essential oil on the shelf life of fresh silver carp. *International Journal of Food Science and Technology*, 49, 811-818 .

Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., Hosseini, H., 2014. Antibacterial activity of plant essential oils and extract : the role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish. *Food Control*, 35, 177-183 .

Ablboofetileh, M., Rezaei, M., Hosseini, H., Abdollahi, M., 2015. Efficacy of activeted alginated-based nanocomposite films to control *Listeria monocytogenes* and spoilage flora in rainbow trout slice. *Journal of food science and Technology*, 1-10 .

Allerberger, F., Wagner, M., 2010. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 16, 16-23 .

AOAC., 2005. Official Methods of Analytical (17th ed.). Washington, DC: Association of Official Analytical.

Arora, A., Padua, G., 2010. Nanocomposites in food packaging. *Journal of food science*, 75, 43-49 .

Bligh , E.G., Dyer , W.J., 1959. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911-917 .

Bubonja-Sonije, M., Giacometti, J., Abram, M., 2011. Antioxidant and antilisterial activityof olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry*, 127, 1821-1827 .

Cioffi, N., Torsi, L., Ditaranto, N., Tantillo, G., Ghiebelli, L., Sabbatini, L., Traversa, E., 2005. Copper nanoparticle/ polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties. *Chemistry of Materials*, 17, 5255-5262 .

EEC. 1995. Totla volatile basic nitrogen TVBN limit values for ceratin categories of fishery products and specifying the analysis methods to be used. *Official Journal L 097*, 84-87.

Egan, H., Kirk, R. S., & Sawyer, R. 1997. Pearson's chemical analysis of foods (19th ed., pp. 609-643): Longman Scientific and Technical.

El Marrakchi, A., Boum;handi, N., Hamama, A., 2005. Performance of a new chromogenic plating medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* from marine environments. *Letters in Applied Microbiology*, 40(2), 87-91 .

Embarek, P.K.B., 1994. Presence, detection and growth of Listeia monocytogenes in seafood: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 17-34 .

Fan, W.J., Sun, J.X., Chen, Y.C., Qiu, J., Zhang, Y., Chi, Y.L., 2009. Effect of chitosan coating on the quality and shelf life of silver carp during frozen storage. *Food Chemistry, 115*, 66-70 .

Fernandez-Saiz, P., Soler, C., Lagaron, J.M., Ocio, M.J., 2010. Effect of chitosan films on the growth of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. in labratory media and in fish soup. *International Journal of Food Microbiology*, 137, 287-294 .

Gill, T.A. 1990. Objective analysis of seafood quality. *Food Review International*, 6, 681-714 .

Hamilton, R.J ,.Kalu, C., Prisk, E., Padley, F.B., Pierce, H., 1997. Chemistry of free radicals in lipids. *Food Chemistry*, 60,193-199.

Hamon, M., Bierne, H., Cossart, P., 2006. Listeria monocytogenes: a multifaceted model. *Nature Reviews Microbiology*, 4, 423-434.

Huss, H.H. 1995. Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fisheries Technical Paper*, 195.

Ibanez, E., Kubatova, A., Senorans, F.J., Cavero, S., Reglero, G., Hawthore, S.B., 2003. Subcritical water extraction of antioxidant compoundsfrom rosemary plant. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 375-382 .

Jeon, Y.J., Kamil, J.Y.V.A., Shahidi, F., 2002. Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 20, 5167-5178 .

Jokar, M., Abdoul, R.R., Abdullah, L.C., Tan, C.P., 2012. Melt production and antimicrobial efficiency of low-density polyethylene (LDPE)-silver nanocomposite film. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 719-728 .

Klancnik, A., Guzej, B., Kolar, M.H., Abramovic, H., Mozina, S.S., 2009. In Vitro Antimicrobial and Antioxidant Activity of Commercial Rosemary Extract Formulations *Journal of Food Protection*, 72, 1744-1752 .

Kumar, R., Münstedt, H., 2005. Silver ion release from antimicrobial polyamide/silver composites. *Biomaterials*, 26, 2081-2088 .

Lopez-Caballero, M.E., Gomez-Guillen, M. C., Perez-Mateos, M., Montero, P., 2005. A chitosan-gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocolloids*, 19, 303-311.

Luo, P.G., Stutzenberger, F.J., 2008. Nano-technology in the detection and control of microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*, 63, 145-181 .

Maurya, A., Chauhan , P., Mishra, A., Pandey, A.K., 2012. Surface Functionalization of TiO2 with Plant Extracts and their Combined Antimicrobial Activities Against *E. faecalis* and *E. Coli*. *Lifescience Global*, 1, 43-51.

Namulema, A., Muyonga, J.H., Kaaya, A.N., 1999. Quality deterioration in frozen Nile perch (*Lates niloticus*) stored at −13 and −27°C. *Food Research International*, 32(2), 151-156 .

Nelson, C., Onyeagba, R.A., 2007. Antimicrobial properties of extracts of *Allium cepa* (Onions) and *Zingiber officinale* (Ginger) on *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, and *Bacillus subtilis*. *The Internet Journal of Tropical Medicine*, 3(2), 8 .

Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H., Hosseini, S. M.H. 2010a. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*, 122, 161-166.

Ozogul, Y., Ayas, D., Yazgan, H., Ozogul, F., Boga, E.K., Ozyurt, G., 2010. The capability of rosemary extract in preventing oxidation of fish lipid. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 1717-1723.

Pacheco-Aguilar, R,. Lugo-Sanchez, M., Robles-Burgueno, M., 2000. Post-mortem biochemical and functional characteristic of Monterey sardine muscle stored at 0°C. *Journal of Food Science*, 65, 40-47 .

Peniche, C., Argüelles-Monal, W., Goycoolea, F.M., 2008. Chitin and chitosan: major sources, properties and application .

Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C., Zou, X., 2004. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research*, 339, 2693-2700 .

Rozman, T., Jersek, B., 2009. Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of *Listeria*. *Acta Agriculture Slovenica*, 93, 51-58 .

Sarkardei, S., Howell, N.K., 2008. Efect of natural antioxidants on stored freeze-dried food product formulated using horse mackerel (*Trachurus trachurus*). *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 309-315 .

Souza, B.W.S., Cerqueria, M.A., Ruiz, H.A., Martins, J.T., Casariego, A., Teixeira, J.A., Vicente, A.A. 2010. Effect of chitosan-based coatings on the shelf life of salmon (*Salmo salar*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58, 11456-11462 .

Stikar, L.N., Hiremath, J.G., 1972. Fish preservation I. Studies on changes during frozen storage of oil sardin. *Journal of Food Science and Technology* 9, 191-193 .

Tamayo, L.A., Zapata, P.A., Vejar, N.D., Azocar, M.I., Gulppi, M.A., Zhou, X., Paez, M.A., 2014. Release of silver carp and copper nanoparticles from polyethylene nanocomposites and their penetrationinto *Listeria monocytogenes*. *Materials Science and Engineering C*, 40, 24-31 .

Ture, H., Erolu, E., Soyer, F., Ozen, B., 2008. antifungal activity of biopolymers containing natamycin and rosemary extract against *Aspergillus niger* and *Penicillium roquefortii*. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 2026-2032.

Yaghoubzadeh, Z., Safari, R., 2015. Effect of boiss *Zataria multiflora* essential oil on *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* inoculated nto ground Silver carp. *journalof Mazandaran University of Medical Science*, 24(120), 100-106. (Abstract in English)