شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۳، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۹
صفحات ۳۹۴-۳۸۳

بررسی تأثیر عصاره های آبی و اتانولی پوست انار (*Punica granatum*) بر رشد باکتری اشریشیاکلی (*Escherichia coli*) تلقیح شده در گوشت چرخ شده کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

فرزانه تقوی اصل سوق[۱]، مجید علیپور اسکندانی*[۲]، داریوش سعادتی[۳]، علی ارشدی[۴]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۲. دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۳. استادیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۴.دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹ /۰۳/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۲۷

چکیده

امروزه استفاده از روشهای نوین نگهداری نظیر استفاده از ضدمیکروبها جایگاه ویژه ای در صنایع غذایی پیدا کرده اند. از طرف دیگر با توجه به نگرانی های موجود در مورد استفاده از نگهدارنده های شیمیایی و اثرات مضر احتمالی آنها گرایش به استفاده از نگهدارنده های طبیعی افزایش یافته است. با توجه به احتمال بالای آلودگی ماهیان پرورشی به باکتری اشریشیاکلی (*Escherichia coli*)، هدف تحقیق حاضر، بررسی استفاده از عصاره های آبی و اتانولی پوست انار (*Punica granatum*) جهت مهار رشد باکتری اشریشیاکلی در گوشت چرخ شده ماهی کپور معمولی است. پس از ارزیابی حسی گوشت چرخ شده کپور معمولی آغشته شده با عصاره های آبی و اتانولی پوست انار و تعیین غلظت بهینه، عصاره های آبی و اتانولی به گوشت چرخ شده تلقیح شده با 1×10^{3} cfu/g باکتری اشریشیاکلی، اضافه شد. سپس تیمارها بسته بندی و در طول دوره آزمایش در دمای یخچال نگهداری شدند. شمارش باکتری در روزهای ۰، ۱، ۳، ۶، ۹ و ۱۲ صورت گرفت. طبق نتایج، عصاره اتانولی فعالیت ضدباکتری قابل توجهی داشت و غلظت ۲۰ درصد با حذف باکتری در ۲۴ ساعت اولیه، بیشترین تاثیر را داشت و غلظت های ۱۰، ۱۲/۵ و ۱۵ در صد در رده های بعدی قرار گرفتند. عصاره آبی فعالیت ضدمیکروبی بسیار ضعیفی داشته و در طی دوره آزمایش، باکتری روند رشد صعودی نشان داد. نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش غلظت عصاره های آبی و اتانولی پوست انار میزان فعالیت ضدمیکروبی و آنتی اکسیدانی نیز در گوشت چرخ شده تقویت می شود. فعالیت ضدمیکروبی و آنتی اکسیدانی بیشتری در عصاره اتانولی نسبت به عصاره آبی مشاهده شد. استفاده از عصاره های آبی و اتانولی پوست انار به دلیل خاصیت ضدباکتری، آنتی اکسیدانی و محافظتی که دارد می تواند نقش مهمی در نگهداری و تأمین سلامت مواد غذایی و همچنین مصرف کننده ایفا کند.

واژگان کلیدی: عصاره آبی و اتانولی، پوست انار، اشریشیاکلی، گوشت چرخ شده کپور معمولی.

* نویسنده مسئول: مجید علیپور اسکندانی
Email: alipoureskandani@uoz.ac.ir

Journal of Fisheries
Vol. 73, No. 3, Autumn 2020
pp. 383-394

Effects of aqueous and ethanol extracts of pomegranate peel (*Punica granatum*) on the growth of inoculated *Escherichia coli* in *Cyprinus carpio* minced meat

Farzaneh Taghavi[1], Majid Alipoor Eskandani[2]*, Dariush Saadati[3], Ali Arshadi[4]

1.Graduate Master Science of Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, Zabol University, Zabol, Iran
2.Associate Professor of Food Hygiene and Quality Control Department, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran
3.Assistant Professor of Food Hygiene and Quality Control Department, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran
4. Associate Professor of Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, Zabol University, Zabol, Iran

Received: 16-Jun-2020 **Accepted: 15-Sep-2020**

Abstract

Synthetic preservatives have been used as food additives to extend shelf life of foods, but they are strictly regulated due to toxicological concerns and some health problems. So it is increasingly attractive to find out effective and nontoxic measures (e.g. use of natural antimicrobial agent) to delay microbial spoilage. Considering the high probability of *Escherichia coli* contamination of local fish, the present study aimed at investigating the effects of aqueous and ethanol extracts of pomegranate peel (*Punica granatum*) on the growth of *Escherichia coli* in minced common carp during refrigerated storage. The sensory evaluation of common carp minced meat treated with different concentrations, water and ethanol extracts of pomegranate peel was performed. After determining the optimum concentration, water and ethanol extracts of minced meat inoculated with 1×10^3cfu/g *Escherichia coli*, were added. The packaging treatment and during the test period at (4±1) °C Refrigerators, were kept. Counting the bacteria on days 0, 1, 3, 6, 9 and 12 was conducted. The results showed that ethanol extract had a significant antibacterial activity and concentration of 20%, by eliminating the bacteria in the first 24 hours, and are the most effective concentrations of %10, %12/5 and %15 fall into the next category. The aqueous extract antimicrobial activity is very weak and the duration of the experiment, the bacteria showed a rising trend. Pomegranate peel extract because of antibacterial property and protect it, can play an important role in ensuring food safety and consumer play.

Key words: Aqueous and Ethanol Extracts, *Punica granatum*, *Escherichia coli*, Minced *Cyprinus carpio*

Corresponding author: Majid Alipoor Eskandani Email: alipoureskandani@uoz.ac.ir

۱. مقدمه

آبزیان از جمله منابع سرشار از پروتئین با قابلیت هضم ۹۶ درصد، اسیدهای چرب غیراشباع ضروری مانند اسید ایکوزاپنتانویک و اسید دکوزاهگزانویک، مواد معدنی و ویتامین ها می باشند که با فرهنگ سازی و بهبود رو شهای تولید، می توان مصرف آنها را جهت تغذیه و سلامت جامعه، افزایش داد. در سراسر جهان از انواع مختلف غذاهای دریایی به عنوان یک غذای خاص مغذی و سالم استفاده می شود. تولید گوشت چرخ شده از ماهیان کم مصرف یکی از روشهایی است که امروزه برای افزایش مصرف این دسته از ماهیان پیشنهاد می گردد. گوشت بدون استخوان ماهی در ایران به عنوان ماده اولیه فرآورده‌هایی نظیر برگر، فینگر، سوسیس ماهی و غیره بکار می رود (Peralta *et al*., 2005). وجود اسیدهای چرب غیراشباع، آب فعال، نسبت بالای اسید آمینه های آزاد، آنزیم های اتولیتیک، آهن آزاد، آلدئیدها، سایر پراکسیدها و محصولات ثانویه حاصل از واکنش های اکسیداسیون حساسیت ماهی به فساد از قبیل پیشرفت میکروبی، اکسیداسیون چربی و همچنین قهوه ای شدن آنزیمی را افزایش می دهد و متعاقباً کیفیت و مدت ماندگاری آنها کاهش می یابد (Frangos *et al*., 2010). یکی از مشکلات نگهداری ماهی، مدت زمان کوتاه ماندگاری کیفیت آن است، بطوری که مدت زمان نگهداری آن طی نگهداری در یخ ۹ تا ۱۱ روز گزارش شده است (Rezaei and Hosseini, 2008). جلوگیری از فساد، رشد باکتریهای بیماریزا و افزایش زمان ماندگاری یا حفظ کیفیت ماهی به عنوان یک ماده غذایی فسادپذیر و حمایت کننده از رشد باکتری ها با استفاده از روش های ایمن از دیرباز توجه محققان ایمنی و کیفیت محصولات شیلاتی را به خود جلب کرده است. برای به تعویق انداختن فساد اکسیداتیو ماهی و فرآورده های آن راهکارهای متعددی ارائه شده است که از آن جمله می توان به کنترل دما و کاهش آن، بسته بندی در اتمسفر تغییر یافته و همچنین افزودن آنتی اکسیدان اشاره کرد (Lin and Lin, 2005). اخیراً علاقه مندی قابل ملاحظه ای بر آنتی اکسیدان های طبیعی به علت افزایش عمر مفید محصولات غذایی با مهار و به تأخیر انداختن اکسیداسیون چربی و جلوگیری از ضررهای اقتصادی متمرکز شده است. از آنجا که آنتی اکسیدان های مصنوعی مانند BHT (Butylated hydroxytoluene)، BHA (Butylated hydroxyanisole) و TBHQ (Tert-Butylhydroquinone) اثر سرطانزایی و نشان داده اند، آنتی اکسیدان های طبیعی به طور وسیعی مورد مطالعه قرار گرفتند. مکانیسم عمده و اصلی فعالیت ضدمیکروبی عصاره های گیاهی با تاثیر ترکیبات فنولی بر پیوند میان مولکول های پروتئینی و لیپیدها در غشای سلول های میکروبی، سلول را حساس نموده و موجب ایجاد اختلال در انتقال نوترینت ها از غشای سیتوپلاسمی، افزایش نفوذپذیری و نشت اجزای ضروری داخل سلول مانند (آهن، اسیدهای نوکلئیک و اسیدهای آمینه، ATP) می شوند (Shan, 2007) و یا به سیستم آنزیمی باکتری ها آسیب می زنند (Burt, 2004). بسیاری از ادویه ها و گیاهان اثر آنتی اکسیدانی در سیستم های مواد غذایی را نشان دادند و در این میان گونهٔ انار خوراکی با نام علمی *Punica granatum* که دارای ترکیبات فنولی و فعالیت ضدباکتریایی و آنتی اکسیدانی بالایی است یکی از این گیاهان است (Anonymous, 2005). عصاره تمام قسمت های این میوه خواص درمانی دارد، آنتی اکسیدانی انار سه برابر قویتر از شراب قرمز و برابر با عصارهٔ چای سبز است (Aviram *et al*., 2004). ویژگی های ضدقارچی، ضدباکتریایی و آنتی اکسیدانی پوست انار با ترکیبات فنولی و آلکالوئیدی شامل پله تیرین (Pelletierine) و تانن های قابل هیدرولیز از قبیل پونیکالین (Punicalin) گالیک اسید (Gallic acid)، الاژیک اسید (Ellagic acid) و آنتوسیانین مرتبط است (Noda *et al*., 2002؛ Aguilar, 2008). الاژیک اسید از مشتقات اسیدگالیک، یکی از ترکیبات موجود در پوست انار است که فعالیت ضدمیکروبی بالایی در برابر باکتری های بیماریزای دستگاه گوارش دارند (Seeram *et al*., 2006؛ Siri *et al*., 2008). Pai و همکاران

(۲۰۱۱)، فعالیت ضدمیکروبی عصاره آبی و الکلی پوست انار را در برابر باکتری های بیماریزا که باعث مسمومیت غذائی می شوند را ثبت کرده اند. از جمله این باکتری ها می توان به *Vibri cholera*، *Escherichia coli*، *Aeromonas hydrophila*، Salmonella، Shigella و Candida اشاره کرد. نتایج تحقیقات آنها نشان داد که عصاره الکلی (اتانولی) تأثیر بیشتری در برابر پاتوژنهای یاد شده دارد. در مطالعات مختلفی Voravuthikunchai و همکاران (۲۰۰۵) تانن های با ترکیبات فنولی با وزن مولکولی بالا و موجود در انار را مسئول ویژگی ضدمیکروبی قوی آن در برابر باکتری *E.coli* دانستند (Voravuthikunchai *et al*., 2005؛ Negi and Jayaprakasha, 2003؛ Pagliarulo *et al*., 2016). باکتری اشریشیاکلی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه بوده و از باسیل های گرم منفی، تاژکدار، متحرک و بدون اسپور است. اشرشیاکلی تولید کننده سم شیگاتوکسین ۲ است که از سموم باکتریایی بسیار قوی است که از سنتز پروتئین در سلول های یوکاریوتی ممانعت می کند. باکتری اشریشیاکلی بیشترین گونه شایع در مدفوع جانوران خونگرم می باشد. عفونت غذایی ناشی از اشریشیاکلی سلامتی مصرف کننده موادغذایی را تهدید می کند و سم ناشی از این باکتری، مخاط روده را تخریب می کند و باعث ایجاد دردهای شدید شکمی و اسهال می شود (Madigan *et al*., 2006؛ Pai *et al*., 1984). با توجه به احتمال بالای آلودگی ماهیان به باکتری *E.coli* در هنگام دستکاری ماهی و فرآیندهای بسته بندی، هدفاز انجام پژوهش حاضر، بررسی امکان مهار رشد باکتری *E.coli* تلقیح شده در گوشت چرخ شده ماهی کپورمعمولی با استفاده از عصاره های آبی و اتانولی پوست انار بود.

۲. مواد و روش

۱.۲. آماده سازی نمونه و تهیه عصاره

حدود ۳۵ کیلو گرم ماهی کپورمعمولی با میانگین وزن ۱۸۶±۸۵۳ گرم بصورت زنده از بازار ماهی فروشان زابل در اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۷ خریداری و به آزمایشگاه فراوری محصولات شیلاتی دانشگاه زابل منتقل شد. پس از شستشو، عملیات پوست کنی و فیله کردن بدون تماس امعا و احشا با سطح زیرین گوشت و در شرایط استریل با دست صورت گرفت. پس از جداسازی گوشت از استخوان ها، با استفاده از چرخ گوشت (مدل M.G.1400، پارس خزر، ایران) گوشت لخم ماهی چرخ شد. جهت حصول اطمینان از سترون بودن گوشت چرخ شده تهیه شده، بررسی وجود یا عدم وجود باکتری اشریشیاکلی تست جدا سازی *E.coli* انجام شد (عبداله زاده و همکاران، ۱۳۹۰). جهت تهیه عصاره آبی و عصاره اتانولی با پودر پوست انار رقم گرچ شهوار یزد، از روش Devatkala و همکاران (۲۰۱۵) استفاده شد.

۲.۲. ارزیابی حسی

جهت تعیین حداکثر غلظت قابل قبول عصاره آبی و اتانولی پوست انار بر خواص حسی فیله کپور معمولی از ارزیابی حسی به روش هدونیک استفاده گردید. بدین منظور نمونه های فیله ۱۰۰ گرمی تیمار شاهد و تیمارهای حاوی عصاره آبی و اتانولی پوست انار پس از بسته بندی به مدت ۲۴ ساعت در یخچال (در دمای ۴ درجه سانتیگراد) نگهداری شدند. سپس فیله ها به مدت ۲۰ دقیقه توسط دستگاه بخارپز خانگی با دمای ۹۸ درجه سانتیگراد پخته و به صورت گرم درون ظروف کدگذاری شد و برای ارزیابی حسی در اختیار گروه ارزیاب آموزش دیده متشکل از ۱۰ نفر قرار گرفت. سپس این افراد نظرات خود را پس از ارزیابی طعم، بو، بافت، رنگ و مطلوبیت کل فیله ها روی پرسشنامه هایی که از قبل بر اساس مقیاس هدونیک (با معیار ۷ امتیازی:۷=بسیارخوب، ۵=خوب، ۳=متوسط، ۱=بد و ۰=بسیاربد) تهیه شده بود، منتقل کردند. نقطه بحرانی مقبولیت هر یک از ویژگی ها ۳ در نظر گرفته شد و پایین تر از آن به معنای رد خصوصیات حسی مورد نظر بود (Ojagh *et al*., 2010).

۳.۲. آماده سازی باکتری اشریشیاکلی و تلقیح

سویه استاندارد و لیوفیلیزه باکتری اشریشیاکلی (ATCC 11775) در محیط کشت TBS (Tryptic

Soy Broth) با ۲۰ درصد گلیسیرین تا زمان مورد نیاز در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. برای استفاده آزمایشگاهی این سویه به صورت استوک بر روی محیط کشت TSA (Tryptic Soy Agar) در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. یک لوپ از باکتری به ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت TBS انتقال داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک شب گرمخانه گذاری شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از کشت شبانه به محیط کشت TSA جدید منتقل و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد تا رسیدن به فاز نیمه لگاریتمی گرمخانه گذاری شد. از این کشت حدود 10^3 cfu/g به ازای هر گرم گوشت چرخ شده برای تلقیح استفاده شد (Fernandez-Saiz *et al.*, 2010).

۴.۲. تیماربندی و شمارش باکتری اشریشیاکلی طی دوره نگهداری

تیمارها (هر تیمار با ۳ تکرار) شامل: شاهد (گوشت فاقد عصاره)، گوشت تلقیح شده با عصاره آبی پوست انار در غلظت های ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۲/۵، ۱۵و ۲۰ درصد (v/w %) و همچنین گوشت تلقیح شده با عصاره اتانولی پوست انار در غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۷،۱۰/۵، ۱۲/۵، ۱۵ و ۲۰ در صد (v/w %) در نظر گرفته شد. جهت توزیع یکنواخت ترکیبات اضافه شده، نمونه‌های گوشت تیمار شده کاملا همگن شدند. برای هر تیمار ۱۸ بسته گوشت ۵ گرمی در نظر گرفته شد. همه تیمارها در کیسه های پلاستیکی بسته بندی و در طول دوره آزمایش در دمای یخچال (۴ درجه سانتیگراد) نگهداری شدند. در طول دوره آزمایش، شمارش باکتری *E.coli* در روزهای صفر، ۱، ۳، ۶، ۹ و ۱۲ انجام گرفت (Solomakos *et al*, 2008). جهت شمارش باکتری *E.coli*، ۵ گرم گوشت چرخ شده در شرایط استریل با ۴۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی مخلوط و به مدت ۶۰ ثانیه هموژنایز گردید. پس از تهیه رقت سریالی، ۱۰۰ میکرولیتر نمونه برای شمارش باکتری *E.coli* به روش کشت سطحی بر روی پلت های حاوی محیط کشت Hicrome *E. coli* agar (ساخت شرکت HiMedia هند) منتقل و کشت داده شد. باکتری *E.coli* برروی محیط کشت Hicrome *E.coli* agar کلنی های کرم رنگ تشکیل می دهد. سپس پلت ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری و کلنی باکتریها شمارش شدند. تعداد کلنی ها بعد از شمارش در عکس رقت مورد استفاده ضرب و لگاریتم آن گرفته شد تا میزان (log cfu/g) بدست آید (Solomakos *et al*, 2008). شمارش جمعیت باکتریها در تیمارهای گوشت چرخ شده در روزهای صفر (در بازه زمانی بلافاصله پس از تیمار بندی)، ۱، ۳، ۶، ۹ و ۱۲ انجام شد.

۵.۲. تجزیه و تحلیل آماری

پس از اطمینان از نرمال بودن داده ها، برای بررسی تأثیر تیمارها و زمان نگهداری از طرح کاملاً تصادفی و تجزیه واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد. در صورت وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها از آزمون دانکن در سطح معنی دار پنج درصد و در صورت پیروی نکردن داده ها از توزیع نرمال و آنالیز داده های حسی، از آزمون ناپارامتریک کروسکال والیس استفاده شد. تجزیه تحلیل آماری داده های حاصله با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد.

۳. نتایج

تغییرات لگاریتم رشد سلولهای اشریشیاکلی تحت تأثیر غلظتهای مختلف عصاره اتانولی و عصاره آبی پوست انار در گوشت چرخ شده کپور معمولی در جدول ۱ نشان داده شده است. میانگین تعداد سلول‌های اشریشیاکلی در گوشت چرخ شده کپور معمولی در روز صفر 1×10^3CFU/g بود. نتایج نشان داد که در دمای ۴ درجه سانتی گراد، رشد باکتری اشریشیاکلی در شاهد و تیمارهای مختلف عصاره آبی و عصاره اتانولی (به جز تیمار ۱۲/۵، ۱۵ و ۲۰ در صد اتانولی و تیمار ۲۰ درصد آبی) تا انتهای آزمایش، روند افزایشی نشان دادند. افزایش تعداد باکتری می تواند مربوط به ورود باکتری به فاز لگاریتمی رشد باشد. روند رشد باکتری در طی روزهای آزمایش در تیمار شاهد و سایر تیمارهای عصاره آبی (به جز غلظت ۲۰ درصد) صعودی بوده است، ولی در تیمار ۲۰ درصد روند رشد بسیار کند بود و تفاوت لگاریتم باکتری در

پایان دوره نسبت به دوز تلقیح، کمتر از ۲ لگاریتم افزایش نشان داد (جدول ۱). در تیمار ۱۰ درصد عصاره اتانولی، پس از افزایش اندک تعداد باکتری در روز اول، همانند تیمارهای ۱۲/۵ و ۱۵ درصد اتانولی، در سایر روزها روند کاهشی نشان داده و جمعیت باکتری تا پایان روز ۹ دوره نگهداری کاهش و یا حذف شدند. به نظر می‌رسد عصاره اتانولی در غلظت‌های مورد بررسی به میزان قابل‌توجهی باعث جلوگیری از رشد باکتری در مرحله لگاریتمی رشد گردیده و پس از آن تعداد باکتری در گوشت ماهی تا پایان دوره نگهداری به تدریج کاهش یافته و مهار شد. دیگر غلظت های عصاره اتانولی با نوسان رشد همراه بودند و غلظت های پایین تر، با کند کردن روند رشد باکتری تاثیر ضد میکروبی خوبی نشان دادند.

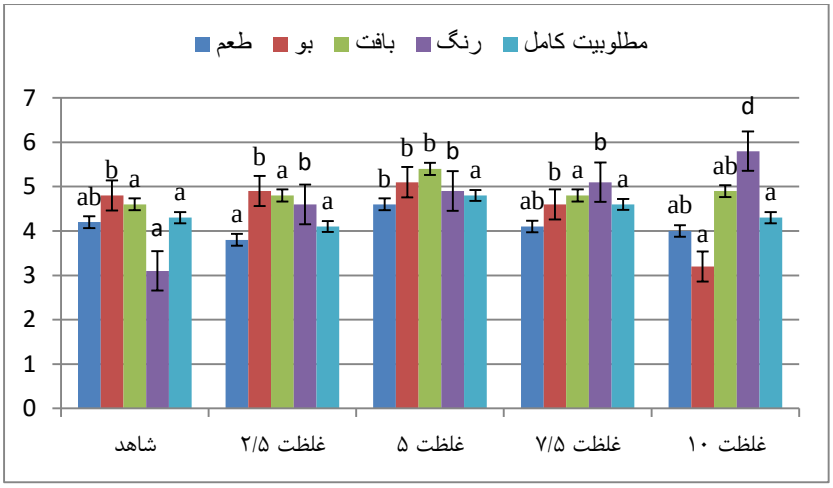
جدول۱ - اثر ضد باکتریایی عصاره آبی و اتانولی پوست انار در ۷ سطح ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۲/۵، ۱۵ و ۲۰ درصد (%v/w) در گوشت چرخ شده ماهی کپور طی ۱۲ روز نگهدرای در دمای یخچال (انحراف معیار ± میانگین لگاریتم تعداد باکتری).

تیمارها	لوگ کلنی باکتری درهرگرم					
	روز ۰	روز ۱	روز ۳	روز ۶	روز ۹	روز ۱۲
شاهد	۳±۰/۰۰	۵/۲۸±۰/۱۱^{i}	۷/۳۷±۰/۱۵^{j}	۹/۵۰±۰/۱۹^{i}	۱۱/۷۰±۰/۲۳^{g}	۱۳/۰۰±۰/۲۶^{j}
عصاره اتانولی۲/۵درصد	۳±۰/۰۰	۴/۵۵±۰/۰۹^{h}	۵/۰۰±۰/۱۰^{g}	۵/۱۲±۰/۱۰^{e}	۵/۲۳±۰/۱۰^{d}	۵/۳±۰/۱۷^{d}
عصاره اتانولی۵درصد	۳±۰/۰۰	۴/۳±۰/۰۹^{fg}	۴/۶۰±۰/۰۹^{f}	۵/۱۰±۰/۱۰^{e}	۵/۱۲±۰/۱۰^{d}	۴/۸±۰/۱۰^{c}
عصاره اتانولی۷/۵درصد	۳±۰/۰۰	۴/۰۷±۰/۰۸^{ef}	۳/۶۵±۰/۰۷^{e}	۲/۴۷±۰/۰۵^{c}	۳/۲±۰/۰۶^{b}	۲/۶۰±۰/۰۵^{b}
عصاره اتانولی۱۰درصد	۳±۰/۰۰	۳/۵±۰/۰۷^{d}	۳/۱۰±۰/۰۶^{cd}	۲/۰۰±۰/۰۴^{b}	۰/۰۰±۰/۰۰^{a}	۰/۰۰±۰/۰۰^{a}
عصاره اتانولی۱۲/۵درصد	۳±۰/۰۰	۳/۰۰±۰/۰۶^{c}	۲/۷۴±۰/۰۵^{b}	۰/۰۰±۰/۰۰^{a}	۰/۰۰±۰/۰۰^{a}	۰/۰۰±۰/۰۰^{a}
عصاره اتانولی۱۵درصد	۳±۰/۰۰	۲/۶±۰/۰۵^{b}	۲/۸۴±۰/۰۶^{b}	۰/۰۰±۰/۰۰^{a}	۰/۰۰±۰/۰۰^{a}	۰/۰۰±۰/۰۰^{a}
عصاره اتانولی۲۰درصد	۳±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰^{a}	۰/۰۰±۰/۰۰^{a}	۰/۰۰±۰/۰۰^{a}	۰/۰۰±۰/۰۰^{a}	۰/۰۰±۰/۰۰^{a}
عصاره آبی۲/۵درصد	۳±۰/۰۰	۴/۷۰±۰/۰۹^{h}	۶/۶۲±۰/۱۳^{i}	۸/۹۵±۰/۱۸^{h}	۹/۸۰±۰/۲۰^{f}	۱۱/۲۰±۰/۱۱^{i}
عصاره آبی۵درصد	۳±۰/۰۰	۴/۶۵±۰/۱۰^{h}	۵/۴۷±۰/۱۱^{h}	۸/۸۵±۰/۱۸^{h}	۹/۶۵±۰/۱۹^{f}	۱۰/۶±۰/۱۶^{h}
عصاره آبی۷/۵درصد	۳±۰/۰۰	۴/۴۹±۰/۰۹^{gh}	۵/۳۹±۰/۱۱^{h}	۸/۷۳±۰/۲۷^{h}	۹/۴۰±۰/۱۷^{f}	۱۰/۰۰±۰/۲۰^{h}
عصاره آبی۱۰درصد	۳±۰/۰۰	۳/۹۰±۰/۰۸^{fg}	۵/۳۰±۰/۱۰^{h}	۷/۹۲±۰/۱۲^{g}	۸/۵۷±۰/۲۱^{e}	۹/۶۵±۰/۱۴^{g}
عصاره آبی۱۲/۵درصد	۳±۰/۰۰	۳/۶۳±۰/۰۷^{e}	۵/۰۰±۰/۰۹^{g}	۷/۳۰±۰/۱۵^{f}	۸/۴۱±۰/۱۴^{e}	۹/۲۰±۰/۱۸^{ef}
عصاره آبی۱۵درصد	۳±۰/۰۰	۳/۴۸±۰/۰۷^{d}	۴/۸±۰۴/۱۰^{fg}	۶/۹۰±۰/۱۳^{f}	۷/۶۸±۰/۲۵^{e}	۸/۳±۰/۲۳^{e}
عصاره آبی۲۰درصد	۳±۰/۰۰	۳/۰۷±۰/۰۶^{c}	۳/۳±۰/۰۷^{d}	۴/۲۶±۰/۲۹^{d}	۴/۵۷±۰/۲۳^{c}	۴/۷±۰/۰۹^{c}

-حروف متفاوت (a, b, c) در هر ستون نشانگر تفاوت معنی دار ($p<0/05$) بین تیمارهای مختلف است.

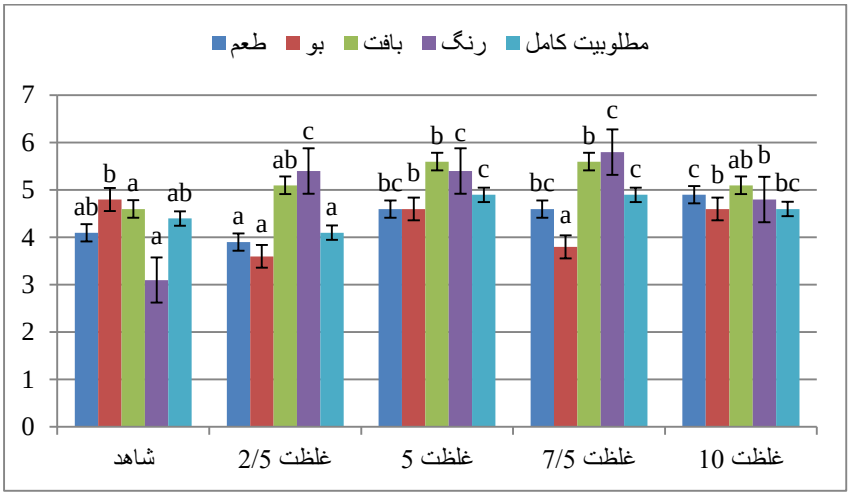
کاهش رشد باکتری در تمامی تیمارها در مقایسه با گروه شاهد معنی دار بود ($P<0/05$) ولی این کاهش در تیمارهای عصاره اتانولی بسیار چشمگیرتر از تیمارهای عصاره آبی مشاهده شد؛ به طوری که تا پایان دوره نگهداری، در تیمارهای ۷/۵، ۱۰، ۱۲/۵، ۱۵ و ۲۰ درصد عصاره اتانولی جمعیت باکتری به کمتر از سطح تلقیح رسید. غلظت ۲۰ در صد اتانولی تاثیر آنتی باکتریال قابل توجهی داشته و سپس غلظت های ۱۵، ۱۲/۵ و ۱۰ درصد با مهار رشد باکتری، به ترتیب در رده های بعدی قرار می

گیرند. اگرچه غلظت ۷/۵ درصد روند منظمی در کاهش رشد باکتری نداشت اما تا انتهای دوره آزمایش، تعداد باکتری را زیر سطح تلقیح کاهش داد. عصاره آبی تاثیر بسیار خفیفی داشته که در بهترین حالت، غلظت ۲۰ درصد باعث کند شدن روند رشد باکتری گردید. این تیمار در طول دوره آزمایش نسبت به تیمارهای ۲/۵ و ۵ درصد عصاره اتانولی تاثیر مهارکنندگی معناداری نشان داد و لگاریتم باکتری در پایان دوره آزمایش، کمتر از میزان آن در تیمار ۲/۵ و ۵ درصد اتانولی بود ($P<0/05$)؛ با اینحال نسبت به دیگر غلظت‌های عصاره اتانولی، تاثیر ضد باکتری کمتری نشان داد. سایر غلظت‌های عصاره آبی فعالیت ضد باکتری قابل قبولی نداشتند و در روز ۶ آزمایش، به مرحله فساد و بیماریزایی رسیدند ولی نسبت به گروه شاهد، زمان فساد گوشت را ۳ روز به تعویق انداختند.براساس نتایج حاصل از ارزیابی حسی، افزودن عصاره اتانولی پوست انار در غلظت های ۰، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد تفاوت معنی داری در شاخص های حسی بو، طعم، بافت و مطلوبیت کل گوشت ماهی ایجاد نکرد ($P>0/05$)، اما امتیاز داده شده ارزیاب ها به رنگ تیمارهای مختلف، تفاوت آماری معنی داری داشت ($P<0/05$). غلظت ۵ درصد اتانولی از لحاظ شاخص های حسی طعم، بو، بافت و مطلوبیت کل بالاترین امتیاز را کسب کرده و بیشترین مقبولیت را داشت (نمودار شکل ۱).



شکل ۱- نمودار میانگین امتیاز داده شده به فیله ماهی کپور معمولی متاثر از غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی پوست انار.

عصاره ۱۰ درصد اتانولی به لحاظ شاخص حسی رنگ، بیشترین امتیاز را کسب کرد. از نظر ارزیاب ها افزایش غلظت عصاره باعث کاهش کیفیت گوشت ماهی به لحاظ شاخص های حسی طعم، بو و مطلوبیت کل گردید و در غلظت های پایین تر، به تیمارهای (شاهد و ۲/۵ درصد)، از نظر شاخص های حسی طعم و رنگ و مطلوبیت کل امتیاز کمتری از نظر ارزیاب ها تعلق گرفت. در میان تیمارهای حاوی عصاره های آبی، از لحاظ شاخص های حسی طعم، بو، بافت، رنگ و مطلوبیت کل تفاوت معنی داری مشاهده نشد ولی از نظر ارزیاب ها به ترتیب عصاره های ۷/۵، ۵، ۱۰ و ۲/۵ درصد بالاترین امتیازات را به دست آوردند (نمودارشکل۲).



شکل۲ – نمودار میانگین امتیاز داده شده به فیله ماهی کپور معمولی متاثر از غلظت‌های مختلف عصاره آبی پوست انار.

بر اساس نتایج بدست آمده در بررسی ارزیابی حسی، غلظت ۷/۵ درصد عصاره آبی از نظر شاخص های حسی بافت و رنگ با دریافت بیشترین امتیاز از نظر مطلوبیت کل، بیشترین مقبولیت را در بین ارزیاب ها داشته و به عنوان غلظت بهینه انتخاب شد.

۴. بحث و نتیجه گیری

به طور کلی، یافته های جدول ۱ به وضوح نشان می دهد که عصاره الکلی پوست انار حتی در غلظت های پایین در مقایسه با عصاره آبی، تاثیر بسزایی در کاهش تعداد باکتری اشریشیاکلی دارد، و به طور موثر قادر به مهار رشد باکتری شده است. عصاره آبی نیز علی رغم تفاوت معنی دار با تیمار شاهد، در مقایسه با عصاره اتانولی تأثیر چندانی بر روند صعودی رشد باکتری نداشت و باکتری اشریشیاکلی در حضور عصاره آبی پوست انار، حداکثر رشد خود را به دست آورد. بیشترین تاثیر تیمارهای ۱۲/۵ و ۱۵ و۲۰ درصد عصاره اتانولی و ۲۰درصد عصاره آبی پوست انار در ۱۸ساعت اولیه بود، که معادل مرحله رشد لگاریتمی باکتری می باشد که باکتریها بیشترین حساسیت را نسبت به بازدارنده های رشد دارند. غلظت های ۷/۵ و ۱۰ درصد پس از افزایش اندک تعداد باکتری در روز اول در سایر روزهای آزمایش باعث کاهش تدریجی رشد باکتری شدند. این امر را می توان به مقدار مواد مؤثر پس از گذشت زمان و پایداری ترکیبات نسبت داد. مشاهده میزان متفاوت رشد باکتری با گذشت زمان می تواند بیانگر اثر گذاری متفاوت تیمارها در زمان‌های رشد با توجه به فاز رشدی و قدرت تحمل باکتری باشد. حد مجاز پیشنهاد شده برای باکتریها در گوشت ماهی Log CFU/g ۷ است (Savvaidis *et al.*, 2002). بر این اساس در مطالعه حاضر در پایان دوره آزمایش تعداد باکتری اشریشیاکلی در تیمار شاهد و تیمارهای حاوی عصاره آبی بجز تیمار حاوی ۲۰ درصد عصاره آبی بیشتر از حد مجاز و در تیمارهای دارای عصاره اتانولی و تیمار حاوی ۲۰ درصد عصاره آبی در حد مجاز قرار داشتند، که نشان دهنده کارایی استفاده از عصاره اتانولی پوست انار در کنترل باکتری اشریشیاکلی گوشت چرخ شده ماهی کپور معمولی حتی در غلظت های کم است. با افزایش زمان نگهداری مواد غذایی در یخچال باکتریهای سرما گرا با تولید کتونها و آلدهیدها موجب پایین آوردن کیفیت ماده غذایی و تغییر بافت، بو و مزه می شوند و در نتیجه از مهمترین عوامل فساد مواد غذایی طی نگهداری در یخچال می باشند (Gram and Huss, 1996). در مطالعه حاضر استفاده از عصاره اتانولی پوست انار تاثیر معنی داری بر کنترل رشد باکتری اشریشیاکلی داشته است، به طوری که در پایان دوره آزمایش در همه تیمارهای دارای عصاره اتانولی تعداد باکتریهای اشریشیاکلی کمتر از حد مجاز بود (Log ۷ cfu/g) ولی در تیمار شاهد و تیمارهای دارای عصاره آبی (بجز تیمار ۲۰ درصد عصاره آبی) بالا تر از حد مجاز اندازه گیری شد.

خاصیت ضدمیکروبی عصاره پوست انار مربوط به ترکیبات فنولی آن می باشد، گالیک اسید، الاژیک

اسید و پونیگالاچین از ترکیبات فنولی عمده در پوست انار می با شند که خا صیت ضدمیکروبی آنها به اثبات رسیده است. فلاونوئیدها و آنتوسیانین ها نیز خاصیت ضـــدمیکروبی دار ند (Aguilar, 2008). Silvan و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که فنولیک اســیدها، کاتچین، پروآنتو سیانین ها و فلاونولها دارای خا صیت ضـدمیکروبی می باشـند. در پژوهش مشـابه دیگر از Negi و Jayaprakasha (۲۰۰۳) فـعـالـیـت ضدباکتریایی دو غلظت ۱۵۰ و ۳۰۰ppm عصاره های مختلف پوست انار (اتیل استات، استون، متانول و آبی) را روی گروهی از باکتری های پاتوژن گرم منفی و مثبت در محیط آزمایشگاه برر سی کردند. طبق نتایج این بررســی عصــاره متانولی با فعالیت ضــدمیکروبی بالاتر به طور قابل توجهی نسـبت به عصـاره آبی فعال تر و موثرتر بوده و در غلظت پائین تر به طور موثر رشـــد باکتری ها *E.coli* را مهار کرد. حداقل غلظت مهـارکننـدگی[1](MIC) در متـانول از ۲۵۰ تا ppm ۵۰۰ میلی گرم در لیتر متنوع بود و برای عصـاره آب بیشـــتر بوده که محدوده آن از ۴۰۰ تا ۷۰۰ppm گزارش شد.

Dahham و هـمـکـاران (۲۰۱۰) فـعـالـیـت ضـــدمیکروبی انار را در مقابل دو گروه باکتری ها و قارچ برر سی کردند طبق نتایج حا صل ع صاره متانولی در برابر باکتریها و قارچها موثرتر از عصـــاره آبی عمل کرد. ایشان حضور ترکیباتی از جمله فنلی، تانن دار و فلاونوئیدی در عصـــاره الکلی را به عنوان ترکیبات مسئول فعالیت ضدمیکروبی گزارش کردند. از مقایسه نتایج مطالعه حاضـــر با این مطالعه می توان نتیجه گرفت که تأثیر بالاتر عصاره ها، به فاکتورهای متعددی مانند غلظت و قطبیت حلال بسـتگی دارد. بطوری که با افزایش غلظت و قطبیت، اســتخراج ترکیبات فعال زیســـتی از گیاهان، با کیفیت بهتر و به میزان بالاتر بـدســـت می آیـد. Karami Moghaddam و همکـاران (۲۰۱۵)، پس از برر سی فعالیت ضدمیکروبی پو شش خوراکی کازئینات سدیم حاوی عصـاره پوسـت انار از طریق آزمون حساسیت رقتهای مایع و محاسبهٔ MIC روی گروهی از باکتریها، تاثیر ضـــدمیکروبی عصـــاره پوســت انار قابل قبول بود، بطوری که در برابر باکتری اسـتافیلوکوکوس ارئوس نسـبت به اشـریشـیاکلی اثر بازدارندگی بیشـتری نشـان داد. غلظتppm ۲۵۰ بر اشـــرشـــیاکلی اثر بازدارندگی و غلظت ppm۵۰۰ اثر کشندگی نشان داد. این محققین فعالیت ضد میکروبی عصـــاره انار را در این تحقیق به دلیل وجود ترکیبات فنولیک مانند فلاوونوئیدها و تانن های قابل هیدرولیز بیان کردند که با مطالعه حاضـــر همســـو اســـت. در تحقیقی دیگر Voravuthikunchai و همکـاران (۲۰۰۴)، اثر عصـاره اتانولی و آبی پوسـت انار را روی سـویه های مختلف اشـریشـیاکلی در روش دیسـک گذاری بررسـی کردند، نتایج حاصـل از تحقیق ایشـان نشـــان داد، عصـــاره اتانولی با کمترین میزان حداقل غلظت مهارکنندگی (۰/۱۹ میلی گرم بر میلی لیتر) و حداقل غلظت کشـــندگی مطلق[2](۰/۳۹ میلی گرم بر میلی لیتر)، فعالیت بســـیار قوی در برابر همه ســـویه های اشرشیاکلی دارد که با نتایج تحقیق حاضر همسو بود. این امر می توانـد در ارتبـاط بـا وجود مقـادیر بالاتری از ترکیبات فنولی در عصـــاره اتانولی در مقایسـه با عصـاره‌های آبی باشـد. در مطالعه حاضـر، ترکیبات ضد میکروبی پوست انار ترکیباتی غیر قطبی می باشند که محلول در اتانول هستند. عصاره آبی در هیچکدام از غلظت های مورد بررســـی قادر به کاهش تعداد باکتری به زیر ســـطح بیماریزایی نبود. مطالعات انجام شـده در زمینه اسـتفاده از عصـاره گیاهان برای کنترل رشد باکتری تلقیح شده به گوشت و محصولات گوشتی نیز نشان داده است با استفاده از این ترکیبات می توان رشـــد باکتریهای پاتوژن را به صـــورت قابل توجهی کنترل نمود (Khaleque *et al.*, 2016؛ Silvan *et al.*, 2013)، یافته های این محققین، نتایج تحقیق حاضـر را تائید می نماید. مطالعات انجام شده در زمینه استفاده از عصاره گیاهان برای کنترل رشـــد باکتریایی و افزایش زمان ماندگاری ماهی و محصولات شیلاتی نیز نشان داده است که استفاده از این مواد به عنوان نگهدارنده های طبیعی روش موثری در کنترل روند فساد می باشد. در مطالعه Elswijk و همکاران (۲۰۰۴)، ســـه ترکیب فلاوونوئیدی مانند

[1] Minimum Inhibitory Concentration

[2] Minimum Bactericidal Concentration

لوتئولین، کمپفرول و کوئرستین در عصارهٔ الکلی پوست انار شناسایی و اندازه گیری شدند. به همین دلیل ترکیب حلال ها و قطبیت آنها اهمیت زیادی در راندمان استخراج ترکیبات فنلی از پوست انار دارد و نسبت به حلالهای خالص، بیشترین میزان ترکیبات فنلی را استخراج می کند. ترکیبات فنولی بر پیوند میان مولکول‌های پروتئینی و لیپیدها در غشای سلولهای میکروبی تأثیر گذاشته، غشای دولایه فسفولیپیدی را حساس نموده و باعث ایجاد اختلال در انتقال نوترینت ها از غشا می شود، که منجر به رسوب پروتئین های غشای سلول باکتری و مهار آنزیم هایی مانند گلیکوزیل ترانسفرازها و در نتیجه لیز سلولی می شوند (Naz *et al*., 2007). پس نتایج حاصل از مطالعه حاضر را همچنین می توان به دلیل وجود ترکیبات حل شونده در حلال های آلی مانند اتانول و همچنین ترکیبات قابل حل در حلال های قطبی نیز دانست. نتایج حاصل از این تحقیق با یافته های سایر مطالعات که بیانگر فعالیت ضد میکروبی قوی عصاره اتانولی پوست انار و فعالیت ضدمیکروبی ضعیف عصاره آبی پوست انار در گوشت می باشد، مطابقت دارد (Khakzad *et al*., 2019؛ Rahnemoon *et al*., 2018؛ Rezvanifard *et al*., 2017). بنابراین در مطالعه حاضر فعالیت ضدمیکروبی بسیار قویتر عصاره اتانولی نسبت به عصاره آبی با توجه به نقش حلال و خواص قطبیت آن قابل توجیه است.

۵. نتیجه گیری

به عنوان نتیجه گیری کلی، شمارش تعداد باکتری اشریشیاکلی نشان داد که استفاده از عصاره اتانولی پوست انار در همه غلظت ها مخصوصاً غلظت ۲۰ درصد می تواند رشد باکتری را کنترل کند. به طوری که هر چه غلظت عصاره اتانولی پوست انار افزایش یابد، زمان ماندگاری گوشت چرخ شده نیز افزایش می یابد. بنابراین استفاده از غلظت ۲۰ در صد عصاره اتانولی پوست انار برای نگهداری محصولات شیلاتی پیشنهاد می گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حمایت مالی دانشگاه زابل Grant code: UOZ-GR-9618-73 همکاری کارشناسان محترم گروه شیلات برای انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می گردد.

۶. منابع

References

Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., Hosseini, H., Safari, R., 2011. Effects of nisin and thyme essential oil, individually and in combination, on inoculated populations of *Listeria monocytogenes* in minced silver carp. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Technology* 6(4), 13-20.

Aguilar, CN., Aguilera-Carbo, A., Robledo, A., Ventura, J., Belmares, R., Martinez, D., 2007. Production of antioxidant nutraceuticals by solid-state cultures of Pomegranate (*Punica granatum*) peel and Creosote Bush (*Larrea tridentata*) leaves. *Food Technology and Biotechnology* 46(2), 218-22.

AOAC. In W. Horwitz (ED)., 2005. Official methods of analysis (17th ED). Suite, MD: Association of Official Methods of Analysis Chemists.

Anonymous, E., 2005. The Wealth of India: A dictionary of Indian raw materials and industrial products. New Delhi: *CSIR Publication*, 317P.

Aviram, M., Dornfeld, L., 2001. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis* 158, 195-198.

Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253.

Dahham, S.S., Ali, M. N., Tabassum, H., Khan,M., 2010. Studies on antibacterial and antifungal activity of Pomegranate (*Punica granatum*). *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environment Science* 9(3), 273-281.

Devatkala, S., Somervillea, J., Thammakulkrajanga, R., Balasubramaniama, V.M., 2015. Microbiological efficacy of pressure assisted thermal processing and natural extracts against *Bacillus amyloliquefaciens* spores suspended in deionized water and beef broth. *Food and Bio Products Processing* 95(-), 183–191.

Fernandez-Saiz, P., Soler, C., Lagaron, J.M., Ocio, M.J., 2010. Effects of chitosan films on the growth of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and S*almonella* spp. in laboratory media and in fish soup. *International journal of food microbiology* 137, 287-294.

Frangos, L., Pyrgotou, N., Giatrakou, V., Ntzimani, A., Savvaidis, I.N., 2010. Combined effects of salting, oregano oil and vacuum-packaging on the shelf-life of refrigerated trout fillets. *Food Microbiology* 27(-), 115- 221.

Gram, L., Huss, H.H., 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* 33, 121-137.

Karami Moghaddam, A., Emam Jomeh, Z., Yasini Ardakani, S.A., 2015. Effect of Pomegranate Peel Extract on the Antibacterial and Mechanical Properties of Sodium Caseinate Film. Iranian Journal of Biosystems Engineering 45(2), 121-130.

Khakzad, S., Farahmandfar, R., Ahmadpour, A., 2019. Study on antioxidant properties of leathery and spongy peels of pomegranate (*Punica granatum*). Food Science and Technology 85 (15), 103-111.

Khaleque, M.A., Keya, C.A., Hasan, K.N., Hoque, M.M., Inatsu, Y., Bari, M.L., 2016. Use of cloves and cinnamon essential oil to inactivate *Listeria monocytogenes* in ground beef at freezing and refrigeration temperatures. LWT-Food Science and Technology 74, 219-223.

Naz, S., Siddiqi, R., Ahmad, S., Rasool, S.A., Sayeed, S.A., 2007. Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum*. *Journal of Food Science* 72, 341–345.

Negi, P.S., Jayaprakasha, G.K., 2003.Antioxidant and Antibacterial Activities of *Punica granatum* Peel Extracts. *Journal of Food Science* 68, 1473-1477.

Noda, Y., Kaneyuki, T., Mori, A., Packer, A., 2002. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidin: delphinidin, cyaniding and pelargonidin. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 50, 166- 171.

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, 193-198.

Pagliarulo, C., Vito, V.D., Picariello, G., Colicchio, R., Pastore, G., Salvatore, P., Volpe, M.G., 2016. Inhibitory effect of pomegranate *(Punica granatum*) polyphenol extracts on the bacterial growth and survival of clinical isolates of pathogenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli. Food Chem*istry 190, 824–831.

Pai, H., Ahmed, N., Lior, H., Bryan, L.E., 1984. Sporadic cases of hemorrhagic colitis associated with *E. coli* O157:H7. Ann. Intern. Med, 624P.

Pai, V., Chanu, R., Chakraborty, R., Raju, B., Ballal, M., 2011. Evaluation of the antimicrobial activity of *Punica granatum* peel against the enteric pathogens. *Asian Journal of Plant Science and Research* 1(2), 57-62.

Lin, C.C., Lin, C.S., 2005. Enhancement of the storage quality of frozen bonito fillets by glazing with tea extracts. *Food Control* 16(2), 169-175.

Peralta, E., Hatate, H., Watanabe, D., Kawabe, D., Murata, H., Hama, Y., 2005. Antioxidative activity of Philippine salt-fermented shrimp paste and variation of its contents during fermentation. *Journal of Oleo Science* 54(-), 553–558.

Rahnemoon, P., Sarabi Jamab, M., Javanmard Dakheli, M., Bostan, A., 2017. Evaluation of Extraction Conditions on Phenolic Compounds and Antimicrobial Properties of Pomegranate (*Punica Granatum*) Peels. *Food Science and Technology* 65 (14), 51-62.

Rezaei, M., Hosseini, S.F., 2008. Quality assessment of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chilled storage. *Journal of Food Science* 73, 93-96.

Rezvanifard, Z., Eshaghi, M.R., Hasanzadeh, S.M., 2018. The use of peel extracts of pomegranate in apple juice as a preservative against *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum* and *Alicyclobacillus acidoterrstris*,6(2), 22-33.

Savvaidis, I.N., Skandamis, P., Riganakos, K.A., Panagiotakis, N., Kontominas, M.G., 2002. Control of natural microbial flora and *Listeria monocytogenes* in vacuum packaged trout at 4 and 10 degrees C using irradiation. *Journal of Food Protection* 65, 515-522.

Seeram, N.P., Henning, S.M., Zhang, Y., Suchard, M., Li, Z., Heber, D., 2006. Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours. *Journal of Nutrition* 136, 2481- 2485.

Shan, B., Cai, Yi-Z., Brooks, J.D., Corke, H., 2007. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology* 117(1), 112-119.

Silvan, M., Mingo, E., Hidalgo, M., Teresa, P.S., Carrascosa, A.V., Rodriguez, A.J.M., 2013. Antibacterial activity of a grape seed extract and its fractions against *Campylobacter* spp. *Food Control* 29, 25- 31.

Siri, S., Somdung, W., Wadbua, P., Kitancharoen, K., Wongphathanakul, W., Chantaranothai, P., 2008. Antibacterial and phytochemical studies of 20 thai medicinal plants against catfish-infectious bacteria *Aeromonas caviae*. The First International Conference on Science and Technology for Sustainable Development of the Greater Mekong Subregion, 93p.

Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P., Botsoglou. N., 2008. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli O157:H7* in minced beef during refrigerated storage. *Meat Science* 80, 159–166.

Uçak, İ., Özogul, Y., Durmuş, M., 2011. The effects of rosemary extract combination with vacuum packing on the quality changes of *Atlantic mackerel* fish burgers. *International Journal of Food Science and Technology* 46(6), 1157-1163.

Voravuthikunchai, S.P., Sririrak, T., Limsuwan, S., Supawita, T., Iida, T., Honda, T., 2005. Inhibitory Effects of Active Compounds from *Punica granatum* Pericarp on Verocytotoxin Production by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Health Science* 51(5), 590-596.