

The Effects of Chitosan Incorporated with Eucalyptus and Cuminum Essential Oils on Storage Time of *Oncorhynchus mykiss*

Reza Sharafati Chaleshtori¹,
Mohsen Taghizadeh²,
Ahmad Khanalizadeh³,
Sepideh Hesami³,
Zahra Heidaryan³,
Pegah Sahebjam³,
Mehdi Khatami³

¹ Assistant Professor, Research Center for Biochemistry and Nutrition in Metabolic Diseases, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

² Associate Professor, Research Center for Biochemistry and Nutrition in Metabolic Diseases, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

³ Research Center for Biochemistry and Nutrition in Metabolic Diseases, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

(Received August 31, 2015 Accepted November, 11, 2015)

Abstract

Background and purpose: Today, the use of natural preservatives in increasing meat products shelf life has gained much attention. In this study, we aimed at evaluating the effects of eucalyptus and cuminum essential oils on microbial quality of *Oncorhynchus mykiss*.

Materials and methods: In an experimental study the eucalyptus and cuminum essential oils were prepared and their antibacterial activities were evaluated against *Shigella dysenteriae*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, and *Salmonella typhi* by micro dilution method. Then, the effects of eucalyptus and cuminum essential oils were examined on microbial quality of *Oncorhynchus mykiss* at 8±1 °C in zero, 3 and 6 days in different forms and concentrations (alone: eucalyptus 0.25% and cuminum 0.5%, combined: 0.5% + 0.5%, and also incorporated with chitosan: 0.25% and 0.5%). Data analysis was performed in SPSS ver.16 applying ANOVA and Duncan test.

Results: The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) for the essential oils ranged between 0.351 and 11.25, and 1.406 and 11.25 mg/ml, respectively. Eucalyptus essential oil at 0.5% concentration was found to have the best effect on decreasing the total count of bacteria, enterobacteriaceae and psychrotrophic bacteria in fish. Also, combination of chitosan and the essential oils decreased the total count of bacteria, enterobacteriaceae and psychrotrophic bacteria (P<0.05). The antibacterial effects of essential oils (alone) were lower compared to synergistic antibacterial activities of essential oils with chitosan (P<0.05).

Conclusion: Eucalyptus and cuminum essential oils could be used as alternative for chemical preservatives and also in active packaging in meat industry.

Keywords: Eucalyptus, Cuminum, *Oncorhynchus mykiss*

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 26(133): 150-161 (Persian).

بررسی اثرات کیتوزان حاوی اسانس های اکالیپتوس و زیره بر مدت زمان نگهداری ماهی قزل آلا

رضا شرافتی چالشتی^۱

محسن تقی زاده^۲

احمد خانعلی زاده^۳

سپیده حسامی^۳

زهره حیدریان^۳

پگاه صاحب جمعی^۳

مهدی خاتمی^۳

چکیده

سابقه و هدف: امروزه جهت افزایش مدت زمان نگهداری گوشت ها و فراورده های گوشتی، استفاده از ترکیبات نگهدارنده طبیعی رو به افزایش است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات کیتوزان حاوی اسانس های اکالیپتوس و زیره بر مدت زمان نگهداری ماهی قزل آلا بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، پس از تهیه اسانس اکالیپتوس و زیره، اثرات ضد میکروبی اسانس ها به روش میکرو دیلوشن علیه باکتری های *شیگلا دیزانتری*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *استرپتوکوکوس پایوژنز* و *سالمونلا تایفی* بررسی شدند. سپس اثرات اسانس های اکالیپتوس و زیره به صورت مجزا (غلظت های ۰/۲۵ درصد و ۰/۵ درصد)، ترکیبی (۰/۵ + ۰/۵ درصد) و همچنین در ترکیب با کیتوزان (غلظت های ۰/۲۵ درصد و ۰/۵ درصد) بر روی کیفیت میکروبی ماهی قزل آلا در 8 ± 1 درجه سانتی گراد در روزهای صفر، ۳ و ۶ بررسی شدند. نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS ۱۶ و آزمون واریانس و آزمون دانکن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها: حداقل میزان غلظت مهار کنندگی باکتری ها و حداقل میزان باکتری کشی باکتری ها به ترتیب غلظت هایی بین ۰/۳۵۱ تا ۱۱/۲۵ و ۱/۴۰۶ تا ۱۱/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر برای اسانس ها بود. اسانس اکالیپتوس ۰/۵ درصد بهترین اثر را در کاهش شمارش کلی باکتری ها، سرماگراها و انتروباکتریاسه ها در ماهی نشان داد. هم چنین استفاده از کیتوزان همراه با اسانس ها سبب کاهش شمارش کلی باکتری ها، سرما دوست ها و انتروباکتریاسه ها در ماهی قزل آلا شد ($p < 0/05$). اثرات ضد باکتریایی اسانس های تنها نسبت به حالت سینرژیستی اسانس ها با کیتوزان کم تر بود ($p < 0/05$).

استنتاج: بنابراین می توان اسانس های مذکور را به عنوان جایگزینی برای ترکیبات نگهدارنده شیمیایی و هم چنین در بسته بندی های فعال در صنایع گوشت استفاده نمود.

واژه های کلیدی: اکالیپتوس، زیره، قزل آلا

مقدمه

ماهیان و فرآورده های آن ها، از غذاهای فسادپذیر و با زمان ماندگاری کوتاهی می باشند. رشد افزایشی میکروب ها بر روی ماهی و گوشت های تازه سرد شده، به دلیل عدم رعایت زنجیره سرما در زمان ذخیره سازی،

مؤلف مسئول: رضا شرافتی چالشتی: کاشان: مرکز تحقیقات بیهوشی و تغذیه در بیماری های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان Email: sharafati.reza@gmail.com

۱. استادیار، مرکز تحقیقات بیهوشی و تغذیه در بیماری های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

۲. دانشیار، مرکز تحقیقات بیهوشی و تغذیه در بیماری های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

۳. کارشناس مرکز تحقیقات بیهوشی و تغذیه در بیماری های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۶/۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۶/۲۴ تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۸/۲۰

توزیع و حمل و نقل، سبب کوتاه شدن زمان نگهداری و کاهش کیفیت آن می شود. از طرفی با حمایت از رشد میکروارگانیسم های پاتوژن می تواند مشکلات جدی برای سلامت عمومی ایجاد نماید (۲،۱) ماهی به عنوان یکی از مهم ترین منابع پروتئینی که حاوی انواع اسیدهای آمینه ضروری برای بدن، مواد معدنی مانند آهن و روی، انواع ویتامین ها و نیز انرژی کافی بوده، در زمره یکی از بهترین و کامل ترین مواد غذایی معرفی شده است. در صورت ایجاد فساد باکتریایی و فساد اکسیداتیو و از بین رفتن این محصولات، خسارات اقتصادی سنگینی به صنعت گوشت وارد خواهد شد (۳-۱). برای به تعویق انداختن فساد اکسیداتیو و باکتریایی ماهی و فرآورده های آن می توان از روش هایی هم چون کنترل درجه حرارت و کاهش آن، بسته بندی تحت خلأ، بسته بندی در اتمسفر تغییر یافته، افزودن عوامل ضد میکروبی مانند نمک و افزودن آنتی اکسیدان ها اشاره کرد. البته باید توجه شود که تعدادی از روش های ذکر شده برای نگهداری ماهی که به شکل تازه و خام که از تقاضای زیادی در بین مصرف کنندگان برخوردار است، کاربرد ندارد (۴،۵). یکی از روش های نگهداری مواد غذایی استفاده از افزودن نگهدارنده های شیمیایی و طبیعی در غلظت های مختلف به انواعی از مواد غذایی است که با توجه به رویکرد مصرف کنندگان به استفاده از ترکیبات طبیعی در مواد غذایی و احتمال سرطان زایی ترکیبات نگهدارنده سنتزی، استفاده از مواد طبیعی با خاصیت ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی مانند اسانس های گیاهی رو به افزایش است (۶). با این حال به دلیل آزاد شدن اسانس ها به صورت کنترل نشده در ماده غذایی و ایجاد بوها و طعم های تند و یا غیر فعال شدن قسمتی از این ترکیبات فعال به دلیل واکنش با مواد غذایی، عملکرد آن ها کاهش می یابد (۷). بنابراین می توان با استفاده از پوشش های خوراکی حاوی ترکیبات ضد میکروبی که به صورت کندتر سبب آزادسازی این ترکیبات به داخل گوشت می شوند و سبب حفظ غلظت های بالاتر

ترکیبات ضد میکروبی در سطح گوشت می شود، کارایی این روش را افزایش داد (۸). از طرفی امروزه آلودگی های ناشی از پلیمرهای سنتزی در جهت تولید انواع بسته بندی ها به ویژه برای مواد غذایی مختلف، توجه محققین را به استفاده از مواد زیست تخریب پذیر جلب نموده، به طوری که در دهه اخیر مطالعه بر روی ترکیباتی با خواص مذکور حاصل از پروتئین ها و کربوهیدرات ها گسترش وسیعی یافته است (۸،۶). کیتوزان ترکیبی پلی ساکاریدی است که دارای ویژگی های عملکردی مانند خصوصیت ضد باکتریایی، ضد قارچی و آنتی اکسیدانی است (۹). هم چنین دارای خواص زیست تخریبی، غیر سمی بودن، خاصیت چسبندگی، فیبر غذایی و تولید فیلم هایی با ویژگی عدم تبادل گازهای CO₂، O₂ و رطوبت می باشد که در صنایع دارویی و غذایی و غیره کاربرد دارد (۹،۱۰).

محققین استفاده از اسانس های گیاهی را برای محافظت از انواعی از مواد غذایی در مقابل میکروارگانیسم های عامل فساد و بیماری را نشان داده اند (۱۱،۱۲). فعالیت ضد میکروبی عصاره اکالیپتوس روی طیف وسیعی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی نظیر استافیلوکوکوس اورئوس، شینگلا دیسانتری، سالمونلا پاراتیفی، اشرشیا کولی، باسیلوس سرئوس و نیز قارچ کاندیدا آلیکنس مشخص شده است (۱۳،۱۴). هم چنین در مطالعه ای، مهم ترین ترکیبات اسانس زیره سبز را سابینن، فلاونوئیدها، کومارین، کومین آلدئید، پینن و ترپین گزارش کردند و اثرات ضد میکروبی اسانس را علیه باسیلوس سرئوس و اشریشیاکلی نشان دادند (۱۵). اثرات ضد میکروبی برخی از فیلم های خوراکی حاوی اسانس ها و عصاره ها، به وسیله تعدادی از محققان ارزیابی شده است. با این وجود به دلیل این که تاکنون مطالعه ای در به کارگیری از اسانس های اکالیپتوس، زیره و به صورت ترکیبی آن ها و یا همراه با کیتوزان بر روی گوشت ماهی وجود ندارد، بنابراین هدف از این بررسی اثرات کیتوزان حاوی اسانس های

اکالیپتوس و زیره بر مدت زمان نگهداری ماهی قزل‌آلا در دمای $8 \pm 1^\circ\text{C}$ بود.

مواد و روش ها

تهیه اسانس و آنالیز آن

در این مطالعه تجربی که در آزمایشگاه میکروب شناسی مواد غذایی دانشگاه علوم پزشکی کاشان در بهار ۱۳۹۴ انجام گرفت، اسانس‌های اکالیپتوس (دانسته ۰/۸۷۹ گرم در میلی‌لیتر در 20°C سانتی‌گراد، ضریب شکست ۱/۴۵۸۳ و چرخش نوری $1/95^\circ$) و اسانس زیره (دانسته ۰/۹۰۶ گرم در میلی‌لیتر در 20°C سانتی‌گراد، ضریب شکست ۱/۴۸۵ و چرخش نوری $13/93^\circ$) با درجه غذایی از شرکت باریج اسانس تهیه شدند. سپس توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی مجهز به دتکتور یونیزاسیون شعله (FID) (Agilent ۶۸۹۰) با طول ستون ۶۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از نوع HP-5MS آنالیز شدند. برنامه دمایی ستون به این نحو تنظیم شد: دمای ابتدایی 40°C درجه سانتی‌گراد و توقف در این دما به مدت ۱ دقیقه بود. سپس تا رسیدن به دمای نهایی 230°C درجه سانتی‌گراد، افزایش دما با شیب حرارتی 3°C درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه انجام گرفت. دمای اتافک تزریق 250°C درجه سانتی‌گراد بود و از گاز هلیوم به عنوان حامل با سرعت جریان ۱ میلی‌متر در دقیقه استفاده شد. جهت شناسایی ترکیبات اسانس‌ها از مقایسه پیک‌های به دست آمده با استانداردهای موجود و با سه بار تکرار به دست آمد.

آماده‌سازی کیتوزان و نمونه ماهی

کیتوزان با وزن ملکولی متوسط از شرکت سیگما (St. Louis, MO, USA) خریداری گردید. برای تهیه فیلم، ابتدا محلول اسید استیک دو درصد تهیه و سپس محلول کیتوزان دو درصد در اسید مذکور تهیه و پس از حل شدن کامل (۲/۵ ساعت در دمای 55°C درجه سانتی‌گراد) و عبور دادن از کاغذ صافی واتمن شماره

۴۱، به میزان دو درصد حجمی حجمی از پلاستی سایزر گلیسرول به محلول اضافه گردید (۱۶). از توئین ۸۰ به عنوان امولسیفایر (۰/۲ درصد محلول کیتوزان) برای توزیع کامل اسانس‌های مذکور در محلول کیتوزان استفاده شد. نمونه‌های ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با وزن تقریبی 350 ± 20 گرم از یک مغازه ماهی فروشی در شهر کاشان خریداری و سریعاً در کنار یخ به آزمایشگاه میکروب شناسی مواد غذایی دانشگاه علوم پزشکی کاشان انتقال یافتند. پس از شستشوی اولیه توسط آب سرد استریل، به قطعات ۱۰ گرمی تقسیم شدند. گروه‌های تیمار و کنترل شامل: (۱) گوشت ماهی بدون اسانس و پوشش کیتوزان، (۲) گوشت ماهی بدون اسانس و همراه با پوشش کیتوزان، (۳) گوشت ماهی با پوشش کیتوزان و غلظت ۰/۲۵ درصد اسانس اکالیپتوس، (۴) گوشت ماهی با پوشش کیتوزان و غلظت ۰/۲۵ درصد اسانس زیره، (۵) گوشت ماهی با پوشش کیتوزان و غلظت ۰/۵ درصد اسانس اکالیپتوس، (۶) گوشت ماهی با پوشش کیتوزان و غلظت ۰/۵ درصد اسانس زیره، (۷) گوشت ماهی با غلظت ۰/۲۵ درصد اسانس اکالیپتوس، (۸) گوشت ماهی با غلظت ۰/۲۵ درصد اسانس زیره، (۹) گوشت ماهی با غلظت ۰/۵ درصد اسانس اکالیپتوس، (۱۰) گوشت ماهی با غلظت ۰/۵ درصد اسانس زیره و (۱۱) گوشت ماهی با غلظت ترکیبی $0/5 + 0/5$ درصد اسانس اکالیپتوس و زیره بودند. به منظور پوشش نمونه‌ها توسط محلول کیتوزان، آن‌ها را یک دقیقه در محلول غوطه ور نموده و به مدت ۳۰ دقیقه مجاورت هوا خشک کردیم. سپس کلیه نمونه‌های آماده سازی شده در دما $8 \pm 1^\circ\text{C}$ نگهداری شدند و آنالیزهای میکروبی بر روی آن‌ها در روزهای صفر، سه و شش صورت پذیرفت. کلیه آزمون‌ها با سه بار تکرار انجام گرفت.

فعالیت ضد میکروبی

جهت تعیین فعالیت ضد میکروبی اسانس‌های اکالیپتوس، زیره و محلول کیتوزان از باکتری‌های

لیستریا مونوسیژنر (PTCC: ۱۱۶۶)، سالمونلا تایفی (PTCC: ۱۶۰۹)، استرپتوکوکوس پایوژنر (PTCC: ۱۴۴۷) و شیگلا دیزنتری (PTCC: ۱۱۸۸) تهیه شده از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران استفاده شد. سپس باکتری‌های مورد نظر جهت تهیه سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند به محیط کشت تریپتیک سوی براث منتقل شدند و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند.

تعیین میزان حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل میزان کشندگی باکتری‌ها (MBC) با استفاده از روش میکرودايلوشن اندازه گیری گردید. به این صورت که برای هر تست، ۹ چاهک از پلیت الیزا انتخاب شد و به هر کدام ۹۵ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث اضافه، سپس ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی معادل لوله ۰/۵ مک فارلند به همه چاهک‌ها اضافه نمودیم. سپس به هر کدام از چاهک‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های متوالی اسانس‌ها معادل ۶۶۶-۵/۲ میلی گرم در میلی لیتر اضافه کردیم. چاهک شماره ۸ صرفاً حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت به عنوان کنترل منفی و چاهک شماره ۹ حاوی ۱۹۵ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث به اضافه ۵ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. حجم نهایی در تمامی چاهک‌ها ۲۰۰ میکرولیتر بود. پس از مخلوط کردن نمونه‌ها توسط شیکر (۲۰ ثانیه با دور ۳۰۰ rpm)، آن‌ها را به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده و چاهک‌ها را از نظر وجود کدورت و یا عدم کدورت مورد بررسی قرار دادیم. رقت چاهک حاوی کم‌ترین غلظت اسانس که باعث جلوگیری از رشد باکتری (عدم ایجاد کدورت) شد، به عنوان میزان حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد باکتری (MIC) تعیین گردید. سپس از نمونه‌های چاهک‌های بدون کدورت بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار پاساژ داده و میزان حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC) نیز تعیین شد (۱۱).

آزمون‌های میکروبی

نمونه‌های ۱۰ گرمی هر کدام از تیمارهای مورد نظر به ۹۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل اضافه شد (رقت ۱-)، سپس رقت‌های بعدی با استفاده از لوله‌های رقت به دست آمد. شمارش کلی باکتری‌های مزوفیل و انتروباکتریاسه‌ها به ترتیب در محیط کشت plate count agar و ویولت ردبایل گلوکز آگار (VRBGA) به روش کشت سطحی انجام و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. شمارش باکتری‌های سرمادوست در محیط کشت به روش کشت سطحی انجام و به مدت ۴۸ ساعت در ۳۵ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد (۱۷، ۱۸).

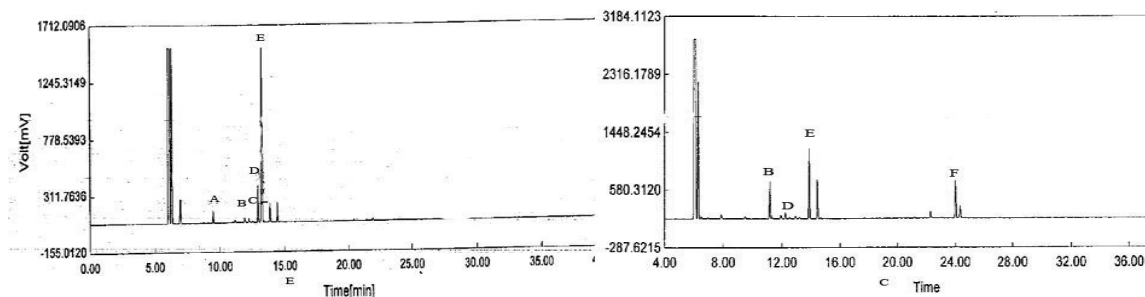
روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

کلیه آزمون‌های میکروبی با دو بار تکرار و به صورت میانگین به دست آمده همراه با انحراف معیار گزارش گردید. نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS ۱۶ و آزمون واریانس و آزمون دانکن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها

کروماتوگرام آنالیز دستگاهی GC/FID اسانس‌های اکالیپتوس و زیره در تصویر شماره ۱ قابل مشاهده است. در اسانس اکالیپتوس، پنج ترکیب اصلی ۱ و ۸ سینئول (۷۷/۳۲ درصد)، لیمونن (۸/۳۹ درصد)، آلفا پینن (۲/۷۴ درصد)، بتاپینن (۰/۸۶ درصد) و سایبین (۰/۵۲ درصد) شناسایی شد. هم چنین در اسانس زیره، چهار ترکیب ۱ و ۸ سینئول (۲۶/۷۵ درصد)، کومین (۱۷/۱ درصد)، سایبین (۱۵/۱۴ درصد) و لیمونن (۰/۹۴ درصد) شناسایی شد.

بر اساس نتایج، اسانس‌های اکالیپتوس و زیره دارای اثرات ضد میکروبی بودند. این اثرات در جدول شماره ۱ قابل مشاهده می‌باشند. محلول کیتوزان اثر ضد باکتریایی بیش تری نسبت به اسانس‌ها نشان داد، به طوری که بیش ترین اثر را بر استرپتوکوکوس پایوژنر



تصویر شماره ۱: کروماتوگرام ترکیبات اصلی اسانس های اکالیپتوس و زیره به دست آمده توسط GC/FID. A: آلفا پینن (زمان بازدارندگی: ۹/۴۸۴۲ دقیقه)، B: ساینین (زمان بازدارندگی: ۱۱/۱۷۵۰ دقیقه)، C: بتاینین (زمان بازدارندگی: ۱۱/۶۷۱۷ دقیقه)، D: لیمونن (زمان بازدارندگی: ۱۲/۹۵۲۵ دقیقه)، E: ۱ و ۸ سینئول (زمان بازدارندگی: ۱۳/۲۶۱۷ دقیقه) و F: کومین آلدهید (زمان بازدارندگی: ۲۳/۹۹۶۷ دقیقه)

جدول شماره ۱: حداقل میزان مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل میزان کشندگی باکتری‌ها (MBC) تحت تاثیر اسانس های اکالیپتوس، زیره و محلول کیتوزان بر تعدادی از باکتری‌های منتقله از غذا

شیکلا دیزانتری		لیستریا مونوسیژنوز		سالمونلا تایفی		استریتوکوکوس پایوزنز		
MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	
۱۱/۲۵	۲۲/۵	۵/۶۲۵	۱۱/۲۵	۵/۶۲۵	۱۱/۲۵	۱/۴۰۶	۲/۸۱۲	اسانس اکالیپتوس
۰/۳۵۱	۰/۷۰۳	۵/۶۲۵	۱۱/۲۵	۵/۶۲۵	۱۱/۲۵	۲/۸۱۲	۵/۶۲۵	اسانس زیره
۰/۵	۱	۰/۵	۱	۱	۱	۰/۲۵	۰/۵	محلول کیتوزان

سبب جلوگیری از افزایش شمارش کلی باکتری‌ها بیش از 2 Log CFU/g شدند (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: رشد لگاریتمی شمارش کلی باکتری‌ها (CFU/g) در گوشت ماهی همراه با کیتوزان و اسانس‌های نگهداری شده در دمای $1 \pm 8^\circ\text{C}$ به مدت ۶ روز

تیمار	روز صفر	روز سوم	روز ششم
C *	2.90 ± 0.1^a	4.45 ± 0.1^a	6.41 ± 0.1^a
Ch *	2.90 ± 0.1^a	$< 0.1^{bc}$	$< 0.1^{bc}$
Z 0.25^*	2.90 ± 0.1^a	4.45 ± 0.1^a	6.38 ± 0.1^{bd}
Z 0.5^*	2.90 ± 0.1^a	3.50 ± 0.1^{bd}	6.34 ± 0.1^{be}
E 0.25^*	2.90 ± 0.1^a	3.55 ± 0.1^{be}	5.79 ± 0.1^{bf}
E 0.5^*	2.90 ± 0.1^a	$< 0.1^{bc}$	5.63 ± 0.1^{bg}
E $0.5 + Z 0.5^*$	2.90 ± 0.1^a	4.16 ± 0.1^{bf}	5.36 ± 0.1^{bh}
CZ 0.25^*	2.90 ± 0.1^a	$< 0.1^{bc}$	3.00 ± 0.1^b
CZ 0.5^*	2.90 ± 0.1^a	$< 0.1^{bc}$	$< 0.1^{bc}$
CE 0.25^*	2.90 ± 0.1^a	$< 0.1^{bc}$	$< 0.1^{bc}$
CE 0.5^*	2.90 ± 0.1^a	$< 0.1^{bc}$	$< 0.1^{bc}$

C: گروه کنترل (گوشت ماهی)، Ch: گوشت ماهی همراه با کیتوزان، Z: گوشت ماهی حاوی اسانس زیره (۰/۲۵ و ۰/۵ درصد)، E: گوشت ماهی حاوی اسانس اکالیپتوس (۰/۲۵ و ۰/۵ درصد)، E+Z: گوشت ماهی حاوی اسانس زیره و اکالیپتوس (۰/۵+۰/۵ درصد)، CZ: گوشت ماهی همراه با کیتوزان حاوی اسانس زیره (۰/۲۵ و ۰/۵ درصد)، CE: گوشت ماهی همراه با کیتوزان حاوی اسانس اکالیپتوس (۰/۲۵ و ۰/۵ درصد)، حروف غیر یکسان در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی دار می باشد ($p < 0.05$).

داشت. در بین اسانس‌ها نیز اثر ضد میکروبی زیره بر روی شیکلا دیزانتری قابل توجه است. با این وجود باکتری‌های لیستریا مونوسیژنوز و سالمونلا تایفی، بیش‌ترین مقاومت را نسبت به اسانس‌ها و محلول کیتوزان نشان دادند.

نتایج این مطالعه نشان داد که در دمای $1 \pm 8^\circ\text{C}$ میزان شمارش کلی باکتری‌ها در روز سوم در گروه کنترل و اسانس زیره ۰/۲۵ درصد تفاوت معنی‌داری باهم ندارد ($p > 0.05$)، ولی در سایر تیمارها، کاهش شمارش کلی باکتری‌ها قابل مشاهده است. این کاهش در تیمارهای حاوی کیتوزان و اسانس اکالیپتوس ۰/۵ درصد نسبت به سایرین بیش‌تر است ($p < 0.05$). در روز ششم، نتایج حاکی از آن است که استفاده از غلظت‌های اسانس‌ها سبب جلوگیری از افزایش شمارش کلی باکتری‌ها شد، به ویژه که با افزایش غلظت اسانس‌ها نیز این اثر کاهش‌ی نمایان‌تر شد. استفاده ترکیبی اسانس‌های زیره و اکالیپتوس نیز نسبت به استفاده تنه‌ای اسانس‌ها اثر بهتری نشان داد ($p < 0.05$)، با این حال در این روز نیز استفاده از پوشش کیتوزان به تنهایی و یا همراه با اسانس‌ها

در جدول شماره ۳ اثر تیمارهای مختلف اسانس‌ها و کیتوزان بر روی شمارش باکتری‌های سرماگرا مشاهده می‌شود. در روز سوم در گروه کنترل و تمام تیمارهای اسانس‌ها به جز اسانس اکالیپتوس ۰/۵ درصد، شمارش باکتری‌های سرماگرا نسبت به روز صفر افزایش داشته است، ولی در گروه اسانس‌های زیره ۰/۵ درصد و اکالیپتوس ۰/۵ درصد، کم‌ترین میزان رشد مشاهده شد ($p < 0.05$). در این روز، تیمارهای کیتوزان و کیتوزان حاوی اسانس‌ها سبب کاهش باکتری‌های سرماگرا شدند. در روز ششم، نشان داده شد که با افزایش غلظت اسانس‌ها، رشد باکتری‌های مذکور کاهش یافت ($p < 0.05$)، ولی بین استفاده ترکیبی اسانس‌های زیره و اکالیپتوس (۰/۵+۰/۵ درصد) با استفاده تنهای اسانس‌های زیره ۰/۵ درصد و اکالیپتوس ۰/۵ درصد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0.05$). در این روز نیز استفاده از پوشش کیتوزان به تنهایی و یا همراه با اسانس‌ها سبب جلوگیری از افزایش شمارش باکتری‌های سرماگرا بیش از 2 Log CFU/g شدند.

جدول شماره ۳: رشد لگاریتمی باکتری‌های سرماگرا (CFU/g) در گوشت ماهی همراه با کیتوزان و اسانس‌های نگهداری شده در دمای $1 \pm 8^\circ\text{C}$ به مدت ۶ روز

تیمار	روز صفر	روز سوم	روز ششم
C *	$3/60 \pm 0.05^a$	$4/34 \pm 0.01^a$	$7/45 \pm 0.00^a$
Ch *	$3/60 \pm 0.05^a$	< 0.05	< 0.05
Z ۰/۲۵*	$3/60 \pm 0.05^a$	$6/43 \pm 0.03^{bd}$	$7/00 \pm 0.00^{bd}$
Z ۰/۵*	$3/60 \pm 0.05^a$	$3/73 \pm 0.05^{be}$	$6/01 \pm 0.01^{be}$
E ۰/۲۵*	$3/60 \pm 0.05^a$	$6/06 \pm 0.01^{bf}$	$7/00 \pm 0.00^{bd}$
E ۰/۵*	$3/60 \pm 0.05^a$	$3/62 \pm 0.01^{bg}$	$6/02 \pm 0.01^{be}$
E ۰/۵ + Z ۰/۵ *	$3/60 \pm 0.05^a$	$6/39 \pm 0.01^{abd}$	$6/03 \pm 0.00^{be}$
CZ ۰/۲۵*	$3/60 \pm 0.05^a$	< 0.05	< 0.05
CZ ۰/۵*	$3/60 \pm 0.05^a$	< 0.05	< 0.05
CE ۰/۲۵*	$3/60 \pm 0.05^a$	< 0.05	< 0.05
CE ۰/۵*	$3/60 \pm 0.05^a$	< 0.05	< 0.05

C: گروه کنترل (گوشت ماهی)، Ch: گوشت ماهی همراه با کیتوزان، Z: گوشت ماهی حاوی اسانس زیره (۰/۲۵ و ۰/۵ درصد)، E: گوشت ماهی حاوی اسانس اکالیپتوس (۰/۲۵ و ۰/۵ درصد)، E+Z: گوشت ماهی حاوی اسانس زیره و اکالیپتوس (۰/۵+۰/۵ درصد)، CZ: گوشت ماهی همراه با کیتوزان حاوی اسانس زیره (۰/۲۵ و ۰/۵ درصد)، CE: گوشت ماهی همراه با کیتوزان حاوی اسانس اکالیپتوس (۰/۲۵ و ۰/۵ درصد)، حروف غیر یکسان در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشند ($p < 0.05$).

در جدول شماره ۴، اثر تیمارهای مختلف اسانس‌ها و کیتوزان بر روی شمارش انتروباکتریاسه‌ها مشاهده می‌شود. در روز سوم، اسانس‌های زیره و اکالیپتوس با غلظت‌های ۰/۵ درصد و همچنین تیمارهای حاوی کیتوزان سبب کاهش انتروباکتریاسه‌ها نسبت به روز صفر شدند. در روز ششم نیز، رشد انتروباکتریاسه‌ها در گروه اسانس اکالیپتوس ۰/۵ درصد نسبت به گروه‌های کنترل و اسانس‌های دیگر پایین‌تر و حدود $4/83 \text{ Log CFU/g}$ بود ($p < 0.05$). همچنین گروه‌های کیتوزان به تنهایی و همراه با غلظت‌های مختلف اسانس اجازه رشد به انتروباکتریاسه‌ها ندادند ($p < 0.05$).

جدول شماره ۴: رشد لگاریتمی انتروباکتریاسه‌ها (CFU/g) در گوشت ماهی همراه با کیتوزان و اسانس‌های نگهداری شده در دمای $1 \pm 8^\circ\text{C}$ به مدت ۶ روز

تیمار	روز صفر	روز سوم	روز ششم
C *	$2/60 \pm 0.05^a$	$3/88 \pm 0.01^a$	$5/30 \pm 0.00^a$
Ch *	$2/60 \pm 0.05^a$	< 0.05	< 0.05
Z ۰/۲۵*	$2/60 \pm 0.05^a$	$3/80 \pm 0.01^{be}$	$5/12 \pm 0.01^{bd}$
Z ۰/۵*	$2/60 \pm 0.05^a$	< 0.05	$5/05 \pm 0.00^{be}$
E ۰/۲۵*	$2/60 \pm 0.05^a$	$3/02 \pm 0.02^{bf}$	$4/95 \pm 0.00^{bf}$
E ۰/۵*	$2/60 \pm 0.05^a$	< 0.05	$4/83 \pm 0.01^{bg}$
E ۰/۵ + Z ۰/۵ *	$2/60 \pm 0.05^a$	$3/83 \pm 0.00^{be}$	$5/40 \pm 0.01^{bh}$
CZ ۰/۲۵*	$2/60 \pm 0.05^a$	< 0.05	< 0.05
CZ ۰/۵*	$2/60 \pm 0.05^a$	< 0.05	< 0.05
CE ۰/۲۵*	$2/60 \pm 0.05^a$	< 0.05	< 0.05
CE ۰/۵*	$2/60 \pm 0.05^a$	< 0.05	< 0.05

C: گروه کنترل (گوشت ماهی)، Ch: گوشت ماهی همراه با کیتوزان، Z: گوشت ماهی حاوی اسانس زیره (۰/۲۵ و ۰/۵ درصد)، E: گوشت ماهی حاوی اسانس اکالیپتوس (۰/۲۵ و ۰/۵ درصد)، E+Z: گوشت ماهی همراه با اسانس زیره و اکالیپتوس (۰/۵+۰/۵ درصد)، CZ: گوشت ماهی همراه با کیتوزان حاوی اسانس زیره (۰/۲۵ و ۰/۵ درصد)، CE: گوشت ماهی همراه با کیتوزان حاوی اسانس اکالیپتوس (۰/۲۵ و ۰/۵ درصد)، حروف غیر یکسان در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشند ($p < 0.05$).

بحث

براساس نتایج به دست آمده این مطالعه، اسانس‌های اکالیپتوس و زیره حاوی ترکیباتی به ترتیب ۱ و ۸ سینئول (۷۷/۳۲ درصد)، لیمونن (۸/۳۹ درصد)، آلفا پینن (۲/۷۴ درصد) و ۱ و ۸ سینئول (۲۶/۷۵ درصد)

درصد)، کومین آلدئید (۱۷/۱ درصد) و ساینین (۱۵/۱۴ درصد) بودند.

در مطالعه Huang و همکاران، بیشترین ترکیبات اسانس اکالیپتوس را ۱ و ۸ سینئول (۲۳/۹ درصد)، آلفا ائودسمول (۱۱/۶ درصد) و گاما ترپن (۱۲/۹ درصد) گزارش نمودند (۱۹). هم‌چنین در مطالعه دیگری، ۱ و ۸ سینئول ۲۱/۷۵ درصد و بتا پینن ۲۰/۵۱ درصد، بیشترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس اکالیپتوس بودند (۲۰). در بررسی‌های صورت گرفته بر روی اسانس زیره در مناطق مختلف، انواعی از ترکیبات مانند آلفاپینن (۰/۵ درصد)، لیمونن (۰/۵ درصد)، ۱ و ۸ سینئول (۰/۲ درصد)، بتاپینن (۱۳ درصد)، D ترپینن (۲۹/۵ درصد) و کومین آلدئید (۳۲/۴ درصد) گزارش شده‌اند (۲۱). هم‌چنین در مطالعه‌های دیگری ترکیبات مونوترپنی بیشترین ترکیبات اسانس زیره بوده که شامل کومین آلدئید (۲۵ تا ۳۵ درصد)، ترپینن (۲۹/۵ درصد)، آلفا و بتا پینن (۲۱ درصد) بودند (۲۲، ۲۳). در بررسی دیگری توسط پژوهی و همکاران نیز بیشترین ترکیب اسانس زیره را کومین آلدئید ۲۹/۲ درصد و آلفا ترپینن ۲۰/۷ درصد گزارش کردند (۲۴). وجود ترکیبات موجود در اسانس‌ها که شامل انواع مونوترپن‌ها، سسکوئی ترپن‌ها و مشتقات اکسیژنه آن‌ها می‌باشند، دارای اثرات ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشند (۲۵، ۲۶). در مطالعه حاضر اثرات ضدباکتریایی اسانس‌های زیره و اکالیپتوس در شرایط آزمایشگاهی در جدول شماره ۱ قابل مشاهده است. در مطالعه‌ای اثر اسانس اکالیپتوس علیه باکتری‌های اشریشیاکلی، سودوموناس آئروژنز، باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس ارئوس، میکروکوکوس فلاووس به روش میکرودايلوشن و دیسک دیفیوژن بررسی شد و نشان داده شد که بیشترین حساسیت به اسانس را میکروکوکوس فلاووس، سودوموناس آئروژنز و اشریشیاکلی داشتند (۲۷). در بررسی دیگری اثر اسانس اکالیپتوس بر باکتری‌های اشریشیاکلی، سودوموناس آئروژنز، استرپتوکوکوس

فکاليس، کاندیدا آلبیکانس و آسپرژیلوس فلاووس نشان داده شد و میزان MIC برای آن‌ها را به ترتیب ۵/۲، ۵/۶، ۴، ۴/۸ و ۱۲/۸ میکروگرم در میلی لیتر گزارش کردند (۲۸). در مطالعات دیگری، اثر ضد باکتریایی اسانس زیره بر باسیلوس سرئوس، اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس ارئوس و استرپتوکوکوس فکاليس را نشان داده‌اند (۲۹، ۲۴). در بررسی حاضر نیز اثر ضدباکتریایی اسانس بر روی چهار باکتری منتقله از غذا نشان داده شد که در مقایسه با کیتوزان اثر کمتری داشتند که می‌تواند یکی از دلایل آن نوع تهیه کیتوزان باشد که در شرایط اسیدی تهیه شده است. تفاوت‌هایی که در میزان ترکیبات، خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی اسانس‌ها در بررسی‌های محققان مشاهده می‌شود که می‌تواند در اثر وجود ترکیبات متفاوت در اسانس‌ها باشد که تحت تاثیر فاکتورهای هم‌چون موقعیت جغرافیایی، دما، مرحله رشد گیاه، زمان برداشت گیاه، فاکتور زمین و به‌طور کلی فاکتورهای محیطی و ژنتیکی گیاه باشد (۶). هم‌چنین نوع دستگاه‌های آنالیزکننده و تکنیک‌های مورد استفاده در روش‌های گاز کروماتوگرافی نیز تفاوت‌هایی را در میزان ترکیبات مختلف در انواع اسانس‌ها نشان می‌دهد (۱۹).

در سال‌های اخیر، استفاده از تکنولوژی مانعی (Technology Hurdle) برای افزایش قدرت ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی توأم با سایر عوامل درون اثر و برون اثر مانند استفاده از فیلم‌های بسته‌بندی، علیه میکروب‌های بیماری‌زای مهم موادغذایی، رو به گسترش است (۳۰، ۳۱). بر اساس نتایج به دست آمده در این مطالعه، نشان داده شد که استفاده از اسانس‌ها می‌تواند سبب کاهش جمعیت میکروبی گوشت ماهی شود. با افزایش غلظت اسانس‌ها، اثرات ضد میکروبی آن‌ها بیش‌تر شده و سبب کاهش جمعیت میکروبی گوشت ماهی شدند. هم‌چنین اسانس اکالیپتوس ۰/۵ درصد نسبت به سایر غلظت‌های اسانس‌ها اثرات ضد باکتریایی بهتری در ماهی نشان داد. با این حال استفاده ترکیبی از اسانس اکالیپتوس و زیره

در بررسی‌ها نشان داده‌اند که استفاده از ۱ و ۸ سینتول به همراه لیمون و یا آلفا پینن و لیمون دارای اثر سینرژیستی (۳۶-۳۴) و وجود کارواکول به همراه میرسین، کارواکل به همراه ائوژنول دارای اثرات آنتاگونیستی بر روی خواص ضد باکتریایی و مخمری است (۳۷). هم‌چنین اثرات ضد باکتریایی پوشش‌های کیتوزانی، به دلیل بار مثبت گروه‌های آمینی آن‌ها و واکنش با گروه‌های آنیونی سطح سلولی باکتری‌ها است که نهایتاً باعث مرگ باکتری‌ها می‌شود. به علاوه استفاده از فیلم‌های حاوی ترکیبات ضدباکتریایی مانند اسانس‌ها و عصاره‌ها، به دلیل این که به مرور این ترکیبات را در غذا رها می‌سازند، نسبت به زمانی که این ترکیبات را به تنهایی در غذا اضافه می‌کنند، موثرترند (۳۱،۳۰).

یافته‌های این پژوهش نشانگر این بود که اسانس‌های زیره و اکالیپتوس دارای خاصیت ضدباکتریایی در شرایط آزمایشگاهی است، ولی در زمانی که در یک مدل غذایی استفاده می‌شوند، خاصیت ضدباکتریایی آن‌ها کاهش می‌یابد. از طرفی خاصیت ضدباکتریایی اسانس‌ها، وقتی با پوشش کیتوزانی همراه شدند، سبب بهبود وضعیت میکروبی ماهی قزل آلا به ویژه در دمای بالای دمای یخچالی شد که می‌توان ترکیب مذکور را به عنوان یک پوشش بسته‌بندی مناسب در صنایع تبدیلی غذایی معرفی نمود.

سپاسگزاری

نویسندگان از همکاری کارمندان آزمایشگاه کنترل غذای معاونت غذا و داروی دانشگاه علوم پزشکی کاشان کمال تشکر را دارند.

References

1. Kargiotou C, Katsanidis E, Rhoades J, Kontominas M, Koutsoumanis K. Efficacies of soy sauce and wine base marinades for controlling spoilage of raw beef. Food Microbiol 2011; 28(1): 158-163.
2. Loretz M, Stephan R, Zweifel C. Antibacterial activity of decontamination treatments for cattle hides and beef carcasses. Food Control 2011; 22(3): 347-359.

3. Sharafati-Chaleshtori R, Rokni N, Rafieian Kopaei M, Drees F, Sharafati-Chaleshtori A, Salehi E. Use of tarragon (*Artemisia Dracunculus*) essential oil as a natural preservative in beef burger. *Ital J Food Sci* 2014; 26(4): 427-432.
4. Kerry JP, O'Grady MN, Hogan SA. Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. *Meat Sci* 2006; 74(1): 113-130.
5. Lin C-C, Lin C-S. Enhancement of the storage quality of frozen bonito fillets by glazing with tea extracts. *Food Control* 2005; 16(2): 169-175.
6. Sharafati Chaleshtori R, Rokni N, Rafieian-Kopaei M, Drees F, Salehi E. Antioxidant and Antibacterial Activity of Basil (*Ocimum basilicum* L.) Essential Oil in Beef Burger. *J Agr Sci Tech* 2015; 17(4): 817-826.
7. Quintavalla S, Vicini L. Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Sci* 2002; 62(3): 373-380.
8. Higuera L, Lopez-Carballo G, Hernandez-Munoz P, Catala R, Gavara R. Antimicrobial packaging of chicken fillets based on the release of carvacrol from chitosan/cyclodextrin films. *Int J Food Microbiol* 2014; 188: 53-59.
9. Hassanzadeh P, Tajik H, Razavi Rohani M, Ehsani A, Aliakbarlu J, Moradi M. Effects of gamma irradiation and chitosan edible coating on the bacterial, chemical and sensory properties of chicken meat. *J Food Res* 2011; 3(21): 356-369 (Persian).
10. Busatta C, Vidal RS, Popiolski AS, Mossi AJ, Dariva C, Rodrigues MR, et al. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food Microbiol* 2008; 25(1): 207-211.
11. Sharafati Chaleshtori R, Rafieian Kopaei M, Salehi E. Bioactivity of *Apium petroselinum* and *Portulaca oleracea* Essential Oils as Natural Preservatives. *Jundishapur J Microbiol* 2015; 8(3): e 20128.
12. Perricone M, Arace E, Corbo MR, Sinigaglia M, Bevilacqua A. Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. *Front Microbiol* 2015;6(76).
13. Sattari M, Shahbazi N, Najari Peeryeh S. An assessment of antibacterial effect of alcoholic and aquatic extracts of *Eucalyptus* leaves on *Pseudomonas aeruginosa*. *Modares Journal of Medical Sciences: Pathobiology* 2006; 8(1): 19-23 (Persian).
14. Srinivasan D, Nathan S, Suresh T, Lakshmana Perumalsamy P. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *J Ethnopharmacol* 2001; 74(3): 217-220.
15. Daneshmandi S, Soleimani N, Pourfathollah AA, Sattari M. Evaluation of the drug synergistic and antibacterial effects of *cuminum cyminum* essential oil. *Arak Med Univ J* 2010; 13(2): 75-82 (Persian).
16. Fernandes IP, Leite E, Vilas-Boas D, Amaral JS, Barreiro M. Production of chitosan based films enriched with oregano essential oil for increased antibacterial activity. 11 Encontro de Química dos Alimentos Bragança, Portugal, 16-19 Set. 2012.
17. Ahmadabad MK, Rezaei M, Ojagh S. The effect of whey protein edible coating on microbial quality of rainbow trout fillet during cold storage. *Iran J Food Sci Technol* 2016; 12(49): 11-20 (Persian).
18. Zolfaghari M, Shabanpoor B, Fallahzadeh S. Comparison the effect of thyme, onion and *ziziphora clinopodiodes* extracts on shelf-life of rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*). *Iran*

- Food Sci Technol Rese J 2010; 6(2)(12): 121-129 (Persian).
19. Huang HC, Ho YC, Lim JM, Chang TY, Ho CL, Chang TM. Investigation of the anti-melanogenic and antioxidant characteristics of eucalyptus camaldulensis flower essential oil and determination of its chemical composition. *Int J Mol Sci* 2015; 16(5): 10470-10490.
 20. Salem MZ, Ashmawy NA, Elansary HO, El-Settawy AA. Chemotyping of diverse Eucalyptus species grown in Egypt and antioxidant and antibacterial activities of its respective essential oils. *Nat Prod Res* 2015; 29(7): 681-685.
 21. Peter KV. Handbook of herbs and spices. Cambridge England: Woodhead publishing Limited Abington Hall; 2006.
 22. Nadeem M, Riaz A. Cumin (Cuminum cyminum) as a potential source of antioxidants. *Pakistan J Food Sci* 2012; 22(2): 101-107.
 23. Raghavan S. Handbook of spices, seasonings, and flavorings. 2ndEd. Boca Raton : CRC Press, Taylor & Francis Group, 2007.
 24. Pajohi MR, Tajik H, Farshid AA, Hadian M. Synergistic antibacterial activity of the essential oil of Cuminum cyminum L. seed and nisin in a food model. *J Appl Microbiol* 2011; 110(4): 943-951.
 25. AL-Jabri NN, Hossain MA. Comparative chemical composition and antimicrobial activity study of essential oils from two imported lemon fruits samples against pathogenic bacteria. *Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci* 2014; 3(4): 247-253.
 26. Bassole IH, Juliani HR. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules* 2012; 17(4): 3989-4006.
 27. Bugarin D, Grbovic S, Orcic D, Mitic-Culafic D, Knezevic-Vukcevic J, Mimica-Dukic N. Essential oil of Eucalyptus gunnii hook. As a novel source of antioxidant, antimutagenic and antibacterial agents. *Molecules* 2014; 19(11): 19007-19020.
 28. Soliman FM, Fathy MM, Salama MM, Saber FR. Chemical composition and bioactivity of the volatile oil from leaves and stems of Eucalyptus cinerea. *Pharm Biol* 2014; 52(10): 1272-1277.
 29. Allahghadri T, Rasooli I, Owlia P, Nadooshan MJ, Ghazanfari T, Taghizadeh M, et al. Antimicrobial property, antioxidant capacity, and cytotoxicity of essential oil from cumin produced in Iran. *J Food Sci* 2010; 75(2): H54-61.
 30. Wu J, Chen S, Ge S, Miao J, Li J, Zhang Q. Preparation, properties and antioxidant activity of an active film from silver carp (Hypophthalmichthys molitrix) skin gelatin incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids* 2013; 32(1): 42-51.
 31. Wu J, Ge S, Liu H, Wang S, Chen S, Wang J, et al. Properties and antimicrobial activity of silver carp (Hypophthalmichthys molitrix) skin gelatin-chitosan films incorporated with oregano essential oil for fish preservation. *Food Packaging and Shelf Life* 2014; 2(1): 7-16.
 32. Jouki M, Yazdi FT, Mortazavi SA, Koocheki A, Khazaei N. Effect of quince seed mucilage edible films incorporated with oregano or thyme essential oil on shelf life extension of refrigerated rainbow trout fillets. *Int J Food Microbiol* 2014; 174: 88-97.
 33. Frangos L, Pyrgotou N, Giatrakou V, Ntzimani A, Savvaidis IN. Combined effects of salting, oregano oil and vacuum-packaging on the shelf-life of refrigerated trout fillets. *Food Microbiol* 2010; 27(1): 115-121.

34. Van Vuuren SF, Viljoen AM. Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1, 8cineole alone and in combination. *Flavour Fragr J* 2007; 22(6): 540-544.
35. Tserennadmid R, Tako M, Galgoczy L, Papp T, Pesti M, Vagvolgyi C, et al. Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. *Int J Food Microbiol* 2011; 144(3): 480-486.
36. Sharafati Chaleshtori R, Rafieian Kopaei M, Rokni N, Mortezaei S, Sharafati Chaleshtori A. Antioxidant activity of zataria multiflora hydroalcoholic extract and its antibacterial effect on staphylococcus aureus. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2013; 22(1): 88-94 (Persian).
37. Gallucci MN, Oliva M, Casero C, Dambolena J, Luna A, Zygodlo J, et al. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour Fragr J* 2009; 24(6): 348-354.