نشریه تازه ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی
وبگاه: nfvm.uoz.ac.ir
فصلنامه - شاپا چاپی: ۲۶۴۵-۴۴۹۱ شاپا الکترونیکی: ۲۶۷۶-۵۰۰۴

دوره ۸، شماره ۳، پائیز ۱٤۰٤، صفحات ٤۰- ٥۳

بررسی فعالیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌های برپایه کربوکسی‌متیل سلولز ترکیب‌شده با نانوذرات اکسید روی و عصاره پوست انار برای نگهداری نمونه‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

داوود نصیری*

استادیار، گروه بهداشت مواد غذایی، واحد نقده، دانشگاه آزاد اسلامی ، نقده، ایران.

دریافت مقاله: ۱۲ بهمن ۱۴۰۳، بازنگری: ۰۴ اردیبهشت ۱۴۰۴، پذیرش نهایی: ۰۶ اردیبهشت ۱۴۰۴

10.22034/nfvm.2025.503535.1274

چکیده

ماهی قزل‌آلا به فساد میکروبی بسیار حساس است و امروزه استفاده از بسته‌بندی‌های زیست‌فعال برای افزایش ماندگاری مواد غذایی فسادپذیر مورد توجه قرار گرفته است. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر فیلم‌های زیست‌فعال بر پایه کربوکسی‌متیل سلولز (CMC) ترکیب شده با نانوذرات اکسید روی (ZnO) و عصاره پوست انار (PE) بر حفظ کیفیت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بود. فیلم‌ها به روش ریخته‌گری محلول تهیه شدند و در پنج گروه مختلف ارزیابی شدند. فیلم‌ها شامل کربوکسی‌متیل سلولز (CMC)، کربوکسی‌متیل سلولز/ نانوذرات اکسید روی (CMC/ZnO)، کربوکسی‌متیل سلولز/ نانوذرات اکسید روی/۰/۵۰درصد عصاره پوست انار (CMC/ZnO/0.5% PE)، کربوکسی‌متیل سلولز/ نانوذرات اکسید روی/ ۱درصد عصاره پوست انار (CMC/ZnO/1% PE) و کربوکسی‌متیل سلولز/ نانوذرات اکسید روی/ ۲درصد عصاره پوست انار (CMC/ZnO/2% PE) بودند. نمونه‌های ماهی در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای مدت یک هفته نگهداری شدند. ویژگی‌های کیفی نمونه‌های ماهی قزل‌آلا شامل میزان بازهای ازته فرار(TVBN) ، میزان کل باکتری‌های زنده (TVC) و pH بررسی شد. نتایج نشان داد که فیلم‌های حاوی نانوذرات اکسید روی و عصاره پوست انار به‌طور معنی‌داری ($P<0.05$) موجب کاهش TVBN و TVC شدند ($P<0.05$). همچنین، pH نمونه‌ها در گروه‌های تیمار شده با فیلم‌ها نسبت به گروه کنترل به‌طور قابل توجهی پایین‌تر بود ($P<0.05$) که نشان‌دهنده‌ی کارایی این فیلم‌ها در کاهش فعالیت‌های میکروبی و تأخیر در روند فساد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بود. این نتایج نشان می‌دهند که استفاده از فیلم‌های کربوکسی‌متیل سلولز ترکیب‌شده با نانوذرات اکسید روی و عصاره پوست انار، به‌ویژه فیلم CMC/ZnO/2% PE، می‌تواند به‌عنوان روشی مؤثر برای حفظ کیفیت و افزایش ماندگاری ماهی قزل‌آلا در طول نگهداری باشد.

واژگان کلیدی: *کربوکسی‌متیل سلولز، نانوذرات اکسید روی، عصاره پوست انار، ماهی قزل‌آلا، فعالیت آنتی‌باکتریایی، بازهای ازته فرار*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: davodnasiri2020@gmail.com

مقدمه

هدررفت مواد غذایی یکی از چالش‌های اساسی در زنجیره تأمین جهانی غذا است. سالانه بخش قابل توجهی از محصولات کشاورزی و دریایی، به‌ویژه ماهی‌ها، به‌دلیل رشد میکروارگانیسم‌های بیماریزا و فسادپذیری بالا از بین می‌روند. در کشورهای کمتر توسعه‌یافته، عمده هدررفت مواد غذایی در مراحل پس از برداشت و پیش از فرآوری رخ می‌دهد، در حالی که در کشورهای توسعه‌یافته، این ضایعات بیشتر در مراحل خرده‌فروشی و مصرف مشاهده می‌شود (۱). ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) یکی از گونه‌های مهم آبزیان است که به‌دلیل بافت لطیف و محتوای بالای رطوبت، در برابر آلودگی‌های میکروبی و فساد سریع بسیار حساس است (۲). از این‌رو، استفاده از بسته‌بندی‌های زیست‌فعال که دارای خواص ضد باکتریایی بوده و ماندگاری مواد غذایی را افزایش دهند، اهمیت زیادی دارد (۳، ۴). در سال‌های اخیر، بیوپلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر به‌عنوان جایگزین مناسبی برای پلاستیک‌های رایج در صنعت بسته‌بندی معرفی شده‌اند (۵). پلی‌ساکاریدها، به‌ویژه کربوکسی‌متیل سلولز (CMC)، به‌دلیل فراوانی، زیست‌سازگاری، خاصیت فیلم‌سازی مطلوب و قیمت مقرون به‌صرفه، یکی از بهترین گزینه‌ها برای تولید فیلم‌های بسته‌بندی زیست‌فعال محسوب می‌شوند (۶، ۷).

با این حال، برای بهبود عملکرد ضد باکتریایی این فیلم‌ها، افزودن ترکیبات ضد میکروبی ضروری است. این نانوذرات در تماس با باکتری‌ها، به‌ویژه تحت شرایط نور یا در حضور رطوبت، موجب تولید گونه‌های فعال اکسیژن یا ROS مانند پراکسید هیدروژن، هیدروکسیل رادیکال و آنیون سوپراکسید می‌شوند (۸، ۹). این گونه‌های فعال اکسیژن می‌توانند به‌طور مستقیم با غشای سلولی باکتری‌ها واکنش دهند، سبب تخریب غشاء، افزایش نفوذپذیری آن و در نهایت مرگ سلولی شوند (۱۰). علاوه بر این، نانوذرات اکسید روی می‌توانند به پروتئین‌ها و آنزیم‌های ضروری داخل سلول آسیب رسانده و مسیرهای متابولیکی حیاتی باکتری‌ها را مختل کنند (۹). همچنین، این نانوذرات موجب بهبود خواص مکانیکی، حرارتی و ممانعتی فیلم‌های بسته‌بندی شده و در نتیجه پایداری و عملکرد آنها را افزایش می‌دهند (۱۱). علاوه بر این، استفاده از ترکیبات گیاهی مانند عصاره پوست انار می‌تواند فعالیت ضد میکروبی فیلم‌های زیست‌فعال را تقویت کند (۱۲). پوست انار سرشار از ترکیبات فنولی، به‌ویژه اسید الاجیک (EA)، است که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی قوی است (۱۳).

کارایی فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر حاوی نانوذرات تیتانیوم/ اسانس شوید/ کربوکسی‌متیل سلولز (۱۴)، امولسیونه فعال بر پایه کیتوزان-کربوکسی‌متیل سلولز حاوی نانوذرات اکسید روی (۱۵) و گلوکومانان کنجاک/ کربوکسی‌متیل سلولز/ آنتوسیانین شاه‌توت سیاه (۱۶) برای نگهداری نمونه‌های ماهی گزارش شده است. با این حال، تاکنون هیچ مطالعه‌ای به بررسی فعالیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌های کربوکسی‌متیل سلولز تقویت شده با نانوذرات اکسید روی و عصاره پوست انار بر روی نمونه‌های ماهی نپرداخته است.

با توجه به فسادپذیری بالای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، هدف از این مطالعه بررسی فعالیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌های کربوکسی‌متیل سلولز تقویت شده با نانوذرات اکسید روی و عصاره پوست انار و تأثیر آن بر کیفیت و ماندگاری فیله‌های ماهی در طول دوره نگهداری است.

مواد و روش‌ها

مواد: کربوکسی‌متیل سلولز سدیم، با میانگین وزن مولکولی ۲۵۰،۰۰۰ و درجه جایگزینی ۰/۹ درصد و هیدروکسید سدیم (پلت‌های بدون آب) از شرکت Sigma-Aldrich تأمین گردید. استات روی، از شرکت مرک (دارمشتات، آلمان) خریداری شد.

تهیه‌ی نانوذرات: نانوذرات اکسید روی بر اساس روش‌های گزارش شده توسط دیگر پژوهشگران سنتز

گردید (۱۷). ابتدا یک محلول آبی ۰/۲۰ مولار از روی کلرید به حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر آماده و در حمام آب تا دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. سپس، ۲۰ میلی‌لیتر محلول آبی سدیم هیدروکسید با غلظت ۵ مولار به‌آرامی و به‌صورت قطره‌ای در مدت ۲۰ دقیقه، با هم‌زدن ملایم، به آن اضافه گردید. رسوب سفید به مدت مشخصی ته‌نشین و محلول رویی جدا شد. برای حذف کامل سدیم کلرید و تنظیم pH به ۷، رسوب چندین بار با آب مقطر شستشو یافت. سپس ذرات در ایزوپروپانول قرار گرفتند و به‌مدت ۳۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک تحت امواج فراصوت قرار گرفتند تا تجمعات ذرات از هم باز شوند. پس از آن، ذرات با استفاده از سانتریفیوژ در ۶۰۰۰ دور در دقیقه (معادل ۶۰۴۸ برابر شتاب جاذبه) به‌مدت ۱۵ دقیقه جمع‌آوری گردیدند. ذرات دوباره سه بار شسته و سپس در کوره الکتریکی در دمای ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت کلسینه شدند. در نهایت، ماده جامد سفید حاصل با استفاده از آسیاب گلوله‌ای به‌طور کامل خرد و نانوذرات اکسید روی تهیه گردید.

تهیه‌ی عصاره: عصاره‌ی پوست انار طبق روش‌های گزارش‌شده توسط پژوهشگران دیگر استخراج گردید (۱۸، ۱۹). انارهای رسیده از بازار محلی خریداری و پوست‌های تازه به‌طور دستی برش داده شدند. سپس پوست‌ها به قطعات کوچک‌تر تقسیم و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. پس از خشک‌شدن، پوست‌ها با آسیاب به پودر تبدیل و در دمای محیط نگهداری گردیدند. در مرحله بعد، ۵ گرم از این پودر در محلول هیدروالکلی ۸۰ درصد (ترکیب ۸۰ درصد اتانول و ۲۰ درصد آب) با نسبت ۱ به ۵۰ (یک گرم پودر به ۵۰ میلی‌لیتر محلول) به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد خیسانده شد تا عصاره‌گیری صورت گیرد. در نهایت، عصاره پوست انار از طریق کاغذ واتمن شماره ۴۱ فیلتر و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در آون خشک گردید. نمونه‌ها تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تهیه‌ی فیلم‌ها: فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر نانوکامپوزیتی بر پایه کربوکسی‌متیل سلولز با استفاده از روش ریخته‌گری محلول طبق مطالعات دیگر پژوهشگران تهیه گردیدند (۱۴). به‌طور خلاصه، ۱/۲۰ گرم گلیسرول (۳۰ درصد وزنی نسبت به کربوکسی‌متیل سلولز) به‌عنوان نرم‌کننده در ۱۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و دمای محلول به ۷۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. سپس ۴ گرم کربوکسی‌متیل سلولز به آن اضافه و به‌مدت ۳۰ دقیقه در سرعت ۵۰۰ دور در دقیقه هم زده شد تا محلولی شفاف حاصل گردد. همزمان، ۳ درصد وزنی کربوکسی‌متیل سلولز از نانوذرات اکسید روی در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر با استفاده از دستگاه اولتراسونیک به‌مدت ۳۰ دقیقه پراکنده گردید. پس از حل کامل کربوکسی‌متیل سلولز، سوسپانسیون نانوذرات اکسید روی به محلول افزوده و به‌مدت ۱۵ دقیقه دیگر هم زده شد تا ترکیب یکنواخت حاصل شود. سپس ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره پوست انار به محلول افزوده و به‌مدت ۳۰ دقیقه دیگر هم زده شد. محلول‌های فیلم‌ساز بر روی صفحات شیشه‌ای پوشیده‌شده با تفلون توزیع و به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط کنترل‌شده خشک شدند. در این مطالعه، پنج نوع فیلم زیست‌تخریب‌پذیر نانوکامپوزیتی تهیه گردید: فیلم خالص کربوکسی‌متیل سلولز، فیلم کربوکسی‌متیل سلولز حاوی نانوذرات اکسید روی، فیلم کربوکسی‌متیل سلولز/ نانوذرات اکسید روی حاوی ۰/۵۰درصد عصاره پوست انار، فیلم کربوکسی‌متیل سلولز/ نانوذرات اکسید روی حاوی ۱/۰۰درصد عصاره پوست انار و فیلم کربوکسی‌متیل سلولز/ نانوذرات اکسید روی حاوی ۲/۰۰درصد عصاره پوست انار. برای تهیه فیلم‌های حاوی عصاره پوست انار، به‌ترتیب ۰/۵۰، ۱ و ۲ درصد عصاره به محلول فیلم‌ساز اضافه گردید.

ارزیابی فعالیت آنتی‌باکتریایی در شرایط آزمایشگاهی: برای ارزیابی فعالیت آنتی‌باکتریایی در شرایط آزمایشگاهی، مجموعه‌ای از میکروارگانیسم‌ها شامل *لیستریا مونوسیتوژنز* (ATCC 19118)، *سالمونلا تیفی‌موریوم* (ATCC 14028)و *اشریشیاکلی* (ATCC 10536) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

(تهران، ایران) تهیه گردید. *لیستریا مونوسیتوژنز* به‌عنوان یک باکتری گرم‌مثبت مرتبط با غذاهای دریایی و *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *اشریشیاکلی* به‌عنوان باکتری‌های گرم‌منفی رایج در آلودگی مواد غذایی انتخاب شدند. حداقل غلظت بازدارنده (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) با استفاده از روش میکرودایلوشن تعیین گردید (۲۰). برای آماده‌سازی سوسپانسیون باکتریایی، ابتدا با استفاده از محلول سالین استریل، غلظت باکتری‌ها به 10^5 واحد تشکیل‌دهنده کلونی در هر میلی‌لیتر (CFU/mL) تنظیم و سپس رقت‌هایی از عصاره در دامنه‌ی غلظتی ۰/۰۷۸ تا ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه گردید. صفحات میکرو دایلوشن استریل ۹۶ چاهکی آماده و میکروپلیت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. کمترین غلظت بدون رشد قابل مشاهده به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد. MBC به‌عنوان کمترین غلظت بدون رشد قابل مشاهده و/ یا با مرگ ۹۹/۵۰ درصد تلقیح اولیه تعیین گردید. با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (ELISA reader) و نرم‌افزار Microplate Manager نسخه ۴,۰ (Bio-Rad Laboratories, USA)، جذب نوری (OD) نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. با استفاده از نمونه‌ی بلانک و کنترل مثبت مقایسه گردید. اندازه‌گیری‌ها با بهره‌گیری از الایزا ریدر انجام شد. آزمایش‌ها در پنج تکرار مختلف صورت پذیرفت.

تهیه‌ی نمونه‌ها: نمونه‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی (Oncorhynchus mykiss) از یک بازار محلی تهیه گردید. ماهی‌ها به فیله‌های کوچک (هر کدام ۴۵ گرم با ابعاد ۵ × ۲ × ۳ سانتی‌متر مکعب) تقسیم و سطوح بالایی و پایینی فیله‌ها با فیلم‌هایی به ابعاد ۷ × ۷ سانتی‌متر پوشانده شدند، همان‌طور که در مطالعات دیگر پژوهشگران گزارش شده است (۲۱، ۲۲). ماهی‌ها به مدت ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تحت آزمایش‌های باکتریایی قرار گرفتند. گروه‌های آزمایشی شامل شش گروه کنترل و فیلم‌های کربوکسی‌متیل سلولز، کربوکسی‌متیل سلولز/ روی اکسید، کربوکسی‌متیل سلولز/ روی اکسید/۰/۵۰ درصد عصاره، کربوکسی‌متیل سلولز/ روی اکسید/۱ درصد عصاره و کربوکسی‌متیل سلولز/ روی اکسید/۲ درصد بودند. گروه کنترل هیچ پوششی نداشت، در حالی‌که سایر گروه‌ها با فیلم‌های برپایه کربوکسی‌متیل سلولز و مقادیر مختلف روی اکسید و عصاره پوشش داده شدند. برای هر گروه، ۸۰ فیله در نظر گرفته شد و در مجموع ۴۸۰ فیله مورد مطالعه قرار گرفتند.

بررسی بازهای ازته فرار و میزان کل باکتری‌های زنده: برای بررسی بازهای ازته فرار (TVBN) و میزان کل باکتری‌های زنده (TVC)، نمونه‌ها به مدت ۴ روز نگهداری شدند. بازهای ازته فرار بر اساس مطالعه آمگو و همکاران (۲۳) با استفاده از روش تیتراسیون اندازه‌گیری گردید. به‌طور خلاصه، ۱۰ گرم از نمونه‌ها همگن و با استفاده از تقطیر بخار کجلدال همراه با محلول آبی هیدروکسید سدیم ۳۰ درصد (w/v) و اسید بوریک آبی ۴ درصد (v/v) استخراج شدند. سپس، عصاره حاصل در برابر ۰/۰۱ نرمال اسید هیدروکلریک تیتر گردید و مقادیر آن گزارش شد.

میزان کل باکتری‌های زنده بر اساس مطالعه خشنودی‌نیا و همکاران (۲۴) سنجش گردید. به‌طور خلاصه، ۱۰ گرم از هر نمونه ماهی ابتدا خرد و به ۹۰ میلی‌لیتر محلول نمکی ۰/۹۰ درصد استریل شده منتقل شد و همگن گردید. سپس، ۱ میلی‌لیتر از هر رقت نمونه با آگار شمارش پلیت (Beijing Aoboxing Bio-tech Co., Ltd., Beijing, China) در ظروف پتری مخلوط و به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از انکوباسیون، شمارش باکتری‌ها انجام شد. برای اندازه‌گیری pH، نمونه‌ها در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر همگن شدند. مخلوط‌ها فیلتر و pH آنها با استفاده از pH متر اندازه‌گیری گردید.

فعالیت‌های آنتی‌باکتریایی فیلم‌ها بر روی فیله‌ها: فعالیت‌های آنتی‌باکتریایی فیلم‌ها بر روی فیله‌ها بر اساس مطالعه ووراپورایورت و همکاران (۲۵) مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌طور خلاصه، فیلم‌ها تهیه و به‌مدت ۱۵ دقیقه با استفاده از اشعه ماوراء بنفش استریل شدند. فیله‌ها (با ابعاد

۳×۲×۵ سانتی‌متر مکعب) به‌صورت جداگانه با استفاده از میکروپیپت‌ها تا غلظت نهایی با باکتری‌های معرفی‌شده در بخش‌های پیشین تلقیح شدند. بر روی سطح هر فیله، 10^5 CFU/cm^2 از باکتری‌ها اعمال گردید و سپس با فیلم‌های مورد نظر پوشانده شدند. نمونه‌ها در دمای ۴±۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۷۵ درصد نگهداری شدند و پس از مدت مشخص، شمارش باکتریایی انجام گرفت. برای این منظور، سلول‌های باکتریایی موجود بر سطح فیلم‌ها با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت SCDLP (سویا-کازئین همراه با لستین و پلی‌سوربات) بازیابی و رقت‌های متوالی از آنها بر روی محیط کشت TSB آگار کشت داده شد.

روش‌های آماری: آنالیزها در پنج تکرار صورت گرفت و نتایج حاصل جهت بررسی اثرات تیمارها مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف ارزیابی شد و با توجه به مقادیر، معنی‌داری بیشتر از ۰/۰۵، توزیع داده‌ها نرمال تشخیص داده شد. تحلیل آماری با بهره‌گیری از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) انجام شد و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون تعقیبی توکی (Tukey) استفاده گردید. تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۱، SPSS Inc، شیکاگو، ایالات متحده) انجام گرفت و نمودارها با کمک نرم‌افزار GraphPad Prism (نسخه ۶,۰۷) ترسیم شدند.

نتایج

فعالیت آنتی‌باکتریایی در شرایط آزمایشگاهی:

جدول ۱ فعالیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌های تهیه‌شده را در آزمون‌های MIC و MBC برای سه باکتری بیماری‌زا نشان می‌دهد. فیلم‌های کربوکسی‌متیل سلولز بدون افزودنی‌ها کمترین اثر مهاری را داشتند، اما با افزودن نانوذرات اکسید روی، این کارایی بهبود یافت. ترکیب عصاره انار نیز به‌طور قابل توجهی اثر ضد باکتریایی را افزایش داد. در آزمونMBC، افزودن نانوذرات و عصاره باعث کاهش قابل توجه مقدار مورد نیاز برای از بین بردن باکتری‌ها شد، که نشان‌دهنده تأثیر این ترکیبات در تقویت خاصیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌ها است. نتایج نشان می‌دهد که با افزودن مقادیر بیشتری از عصاره پوست انار، خاصیت آنتی‌باکتریایی افزایش می‌یابد، به‌طوری که فعالیت آنتی‌باکتریایی در غلظت ۲ درصد بیشتر از ۱ درصد می‌باشد و در غلظت ۰/۵۰ درصد پایین‌تر از ۱/۰۰ درصد بود. بنابراین، افزودن نانوذرات اکسید روی و عصاره پوست انار در بیشترین غلظت توانستند بیشترین فعالیت آنتی‌باکتریایی را نشان دهند.

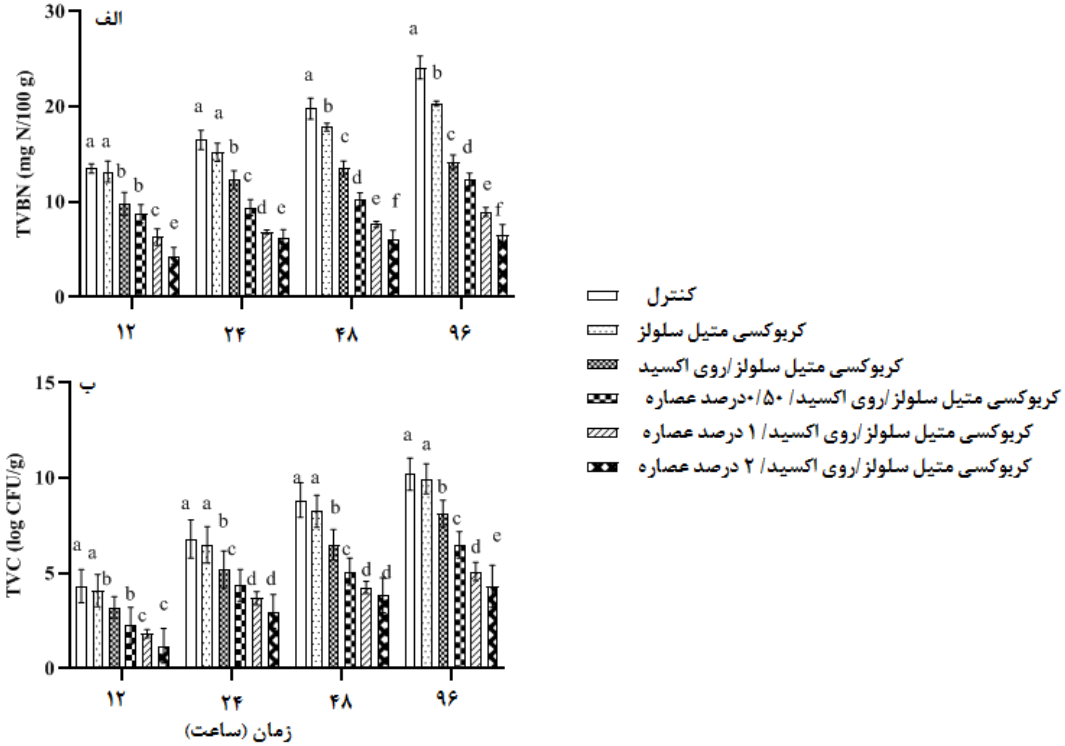
جدول ۱- فعالیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌های تهیه شده در آزمون‌های MIC و MBC

	MIC (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)		
باکتری‌ها	**لیستریا مونوسیتوژنز**	**سالمونلا تیفی‌موریوم**	**اشریشیاکلی**
کربوکسی‌متیل سلولز	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰
کربوکسی‌متیل سلولز/ روی اکسید	۲/۵۰	۲/۵۰	۲/۵۰
کربوکسی‌متیل سلولز/ روی اکسید/ ۰/۵۰ درصد عصاره	۲/۵۰	۲/۵۰	۲/۵۰
کربوکسی‌متیل سلولز/ روی اکسید/ ۱/۰۰ درصد عصاره	۰/۶۲۵	۰/۶۲۵	۰/۶۲۵
کربوکسی‌متیل سلولز/ روی اکسید/ ۲/۰۰ درصد عصاره	۰/۳۱۲	۰/۳۱۲	۰/۳۱۲
استرپتومایسین	۰/۳۱۲	۰/۳۱۲	۰/۳۱۲
	MBC (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)		
باکتری‌ها	**لیستریا مونوسیتوژنز**	**سالمونلاتیفی‌موریوم**	**اشریشیاکلی**
کربوکسی‌متیل سلولز	۲۰/۰۰	۲۰/۰۰	۲۰/۰۰
کربوکسی‌متیل سلولز/ روی اکسید	۵/۰۰	۵/۰۰	۵/۰۰
کربوکسی‌متیل سلولز/ روی اکسید/ ۰/۵۰ درصد عصاره	۵/۰۰	۵/۰۰	۵/۰۰

کربوکسی‌متیل سلولز/ روی اکسید/ ۱/۰۰ درصد عصاره	۱/۲۵	۱/۲۵	۱/۲۵
کربوکسی‌متیل سلولز/ روی اکسید/ ۲/۰۰ درصد عصاره	۰/۶۲۵	۰/۶۲۵	۰/۶۲۵
استرپتومایسین	۰/۶۲۵	۰/۶۲۵	۰/۶۲۵

بررسی بازهای ازته فرار و میزان کل باکتری‌های زنده: شکل ۱ تأثیر فیلم‌های پوششی بر میزان بازهای ازته فرار (TVBN) و تعداد کل باکتری‌های زنده (TVC) در نمونه‌های ماهی طی ۹۶ ساعت را نشان می‌دهد. گروه کنترل (بدون عصاره) بالاترین میزان TVBN را داشته و این مقدار به مرور افزایش یافته است ($P<0.05$). در مقابل، گروه‌های حاوی فیلم‌های کربوکسی متیل سلولز، نانوذرات اکسید روی و عصاره پوست انار، میزان TVBN کمتری در مقایسه با دیگر گروه‌ها نشان دادند، به‌ویژه گروه دارای ۲ درصد عصاره که در تمام زمان‌ها پایین‌ترین مقدار را داشت ($P<0.05$). این روند نشان می‌دهد که فیلم‌های زیست‌فعال نقش مؤثری در کاهش سرعت فساد ماهی دارند.

نتایج نشان می‌دهد که در زمان ۱۲ ساعت، گروه کنترل بیشترین میزان باکتری‌های زنده را در مقایسه با دیگر گروه‌ها دارد ($P<0.05$)، در حالی که گروه‌های حاوی کربوکسی‌متیل سلولز و نانوذرات اکسید روی به‌تدریج باعث کاهش تعداد باکتری‌ها شده‌اند ($P<0.05$). به‌ویژه، افزودن عصاره انار به این ترکیب تأثیر قابل توجهی در کاهش میزان باکتری‌های زنده داشته است، به‌طوری که گروه دارای ۲ درصد عصاره کمترین مقدار را نشان می‌دهد. این یافته‌ها تأیید می‌کند که فیلم‌های زیست‌فعال تهیه‌شده، به‌ویژه در غلظت‌های بالاتر عصاره، اثر مهاری بهتری بر رشد باکتری‌ها دارند.



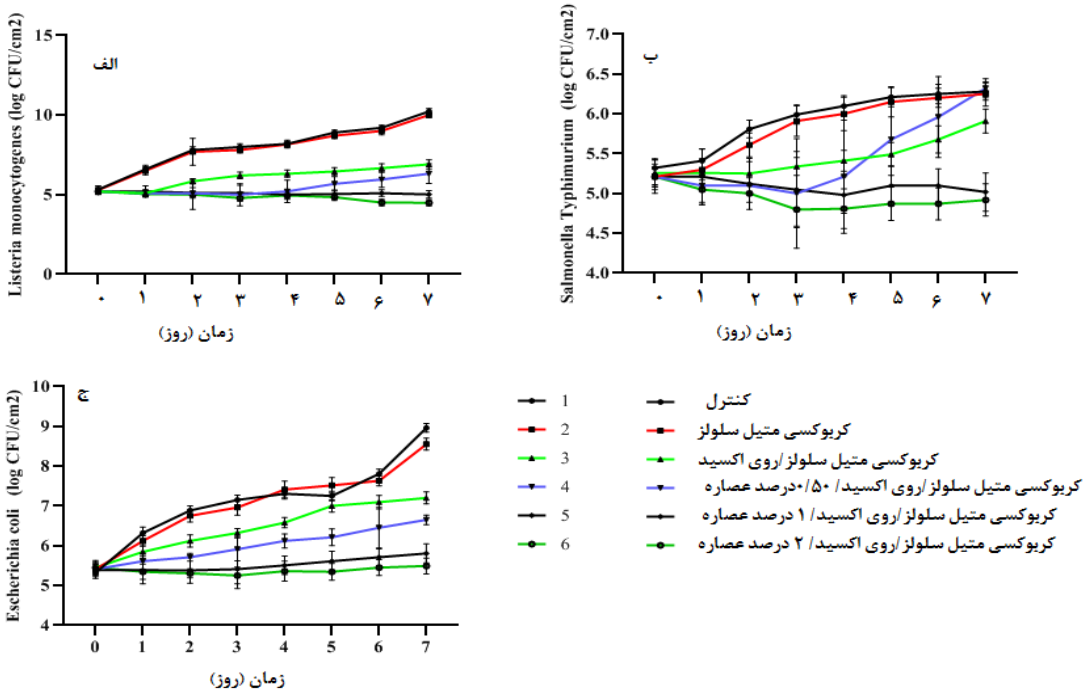
شکل ۱- تأثیر فیلم‌های پوششی بر روی بازهای ازته فرار (TVBN) و میزان کل باکتری‌های زنده (TVC) نمونه‌های ماهی در طی ۹۶ ساعت.

حروف غیر مشابه اختلاف معنی‌دار در طی همان زمان را در سطح ۵ درصد نشان می‌دهد. بالانویس‌های مختلف اختلافات معنی‌دار بین گروه‌ها در همان زمان را نشان می‌دهد. برای مثال، بالا نویس a در زمان ۱۲ ساعت اختلاف معنی‌داری با b و c را نشان می‌دهد.

با گذشت زمان (۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت)، میزان باکتری‌های زنده در همه گروه‌ها افزایش یافته است، اما این افزایش در گروه‌های حاوی فیلم‌های زیست‌فعال کمتر بوده است ($P<0.05$). در ۹۶ ساعت، گروه کنترل بیشترین میزان باکتری‌های زنده را داشت، در حالی که گروه‌های حاوی کربوکسی‌متیل سلولز، نانوذرات اکسید روی و عصاره انار، به‌ویژه در غلظت ۲ درصد، کمترین میزان را نشان دادند ($P<0.05$). این نتایج تأیید می‌کند که ترکیب نانوذرات اکسید روی و عصاره انار تأثیر قابل توجهی در مهار رشد باکتری‌ها و افزایش ماندگاری ماهی دارد.

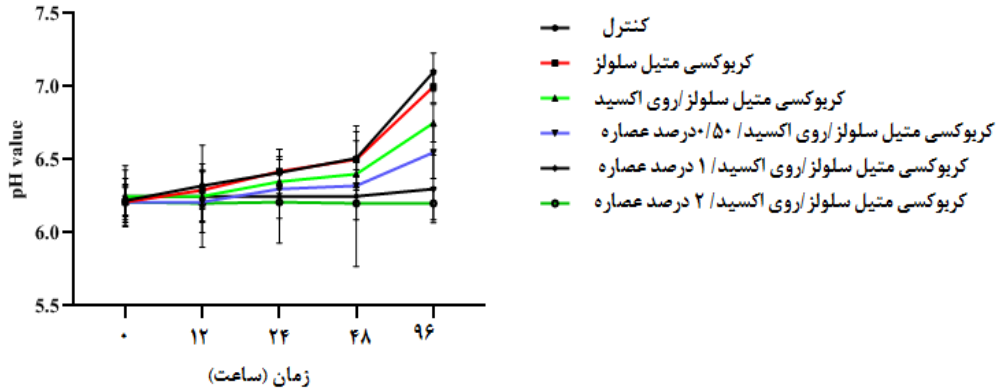
فعالیت‌های آنتی‌باکتریایی فیلم‌ها بر روی فیله‌ها: شکل ۲ فعالیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌های پوششی را بر روی نمونه‌های ماهی طی ۷ روز نشان می‌دهد. در روز صفر، شمارش لیستریا مونوسیتوژنز در تمام گروه‌ها مشابه بود. از روز اول تا هفتم، روند افزایش شمارش در برخی گروه‌ها مشاهده شد. در پایان روز هفتم، گروه کنترل بیشترین شمارش را در مقایسه با دیگر گروه‌ها داشت ($P<0.05$)، در حالی که گروه‌های حاوی کربوکسی‌متیل سلولز و نانوذرات اکسید روی به‌ویژه در ترکیب با عصاره انار، شمارش کمتری نشان دادند ($P<0.05$). گروه کربوکسی‌متیل سلولز/ روی اکسید با عصاره ۲ درصد کمترین شمارش لیستریا را داشت. این نتایج نشان می‌دهند که فیلم‌های حاوی عصاره‌ها تأثیر مؤثری در کاهش رشد لیستریا مونوسیتوژنز و حفظ کیفیت ماهی دارند.

داده‌ها نشان داد که در روز صفر، تمامی گروه‌ها میزان مشابهی از *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *اشریشیاکلی* داشتند. با گذشت زمان، گروه کنترل به‌طور پیوسته رشد باکتری‌ها را نشان داد و در روز ۷ به بالاترین مقدار رسید. گروه‌های حاوی کربوکسی‌متیل سلولز نیز روند مشابهی داشتند، اما در گروه‌های حاوی نانوذرات اکسید روی، رشد باکتری‌ها کمتر بود. به‌ویژه، در گروه‌های حاوی عصاره پوست انار، کنترل رشد *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *اشریشیاکلی* مؤثرتر بود ($P<0.05$). گروه کربوکسی‌متیل سلولز/ روی اکسید با ۲ درصد عصاره کمترین میزان رشد را داشت و نشان‌دهنده اثر بازدارندگی قوی عصاره بود. به‌طور کلی، گروه کنترل بیشترین رشد باکتری را داشت، در حالی که گروه‌های حاوی عصاره‌های مختلف، به‌ویژه ۲ درصد عصاره، اثرات بازدارندگی قوی‌تری داشتند.



شکل ۲- فعالیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌های پوششی بر روی نمونه‌های ماهی در طی ۷ روز

تغییرات PH: شکل ۳ نشان‌دهنده تغییرات pH در نمونه‌های فیله ماهی طی ۹۶ ساعت است. مقدار اولیه pH در روز صفر در تمامی گروه‌ها مشابه بود و در محدوده ۶/۲۱ تا ۶/۲۵ قرار داشت. با گذشت زمان، مقدار pH در همه گروه‌ها افزایش یافت، اما سرعت این افزایش در گروه‌های مختلف متفاوت بود. در گروه کنترل pH بیشترین تغییر را نشان داد و از ۶/۲۲ به ۷/۱۰رسید. گروه‌های حاوی کربوکسی‌متیل سلولز نیز روند مشابهی داشتند، اما افزایش pHدر گروه کربوکسی‌متیل سلولز/ روی اکسید ملایم‌تر بود. در گروه‌های حاوی عصاره، افزایش pH کمتر و کنترل شده‌تر بود. به‌ویژه در گروه کربوکسی‌متیل سلولز/ روی اکسید با ۲ درصد عصاره، کمترین تغییرات pH مشاهده شد و مقدار آن در ساعت ۹۶ ثابت ماند. در نهایت، گروه‌های حاوی عصاره، به‌ویژه ۲ درصد عصاره، توانستند تغییرات pHرا به‌طور مؤثری کنترل کنند. ($P<0.05$).



شکل ۳- مقادیر pH نمونه‌های فیله در زمان‌های مختلف بر حسب ساعت

بحث و نتیجه‌گیری

این مطالعه با هدف بررسی فعالیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌های کربوکسی‌متیل سلولز ترکیب‌شده با نانوذرات اکسید روی و عصاره پوست انار برای نگهداری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شد. نتایج نشان داد که کربوکسی‌متیل سلولز به‌تنهایی فعالیت آنتی‌باکتریایی ضعیفی دارد و تأثیر قابل توجهی بر کاهش رشد باکتری‌ها ندارد. اما وقتی با نانوذرات روی اکسید و عصاره‌های طبیعی ترکیب شد، فعالیت آنتی‌باکتریایی آن افزایش یافت و به‌طور مؤثری از رشد باکتری‌های بیماری‌زا جلوگیری کرد. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که نانوذرات اکسید روی از طریق آزادسازی یون روی($Zn^{2}+$) ، جلوگیری از متابولیسم اسیدهای آمینه، اختلال در سیستم آنزیمی و تولید گونه‌های فعال اکسیژن باعث مرگ باکتری‌ها می‌شوند (۲۶، ۲۷). نانوذرات اکسید روی به‌دلیل سطح ویژه بالا، خاصیت کاتالیستی، و توانایی تولید گونه‌های اکسیژن فعال دارای فعالیت آنتی‌باکتریایی قوی علیه طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی هستند (۹، ۲۸).

گونه‌های فعال اکسیژن می‌توانند به‌طور مستقیم با غشای سلولی باکتری‌ها واکنش دهند، سبب تخریب غشاء، افزایش نفوذپذیری آن و در نهایت مرگ سلولی شوند (۱۰). این نانوذرات از طریق تخریب دیواره سلولی، تولید استرس اکسیداتیو، و اختلال در متابولیسم سلولی، رشد و تکثیر باکتری‌ها را مهار می‌کنند (۹، ۲۹). علاوه بر این، نانوذرات اکسید روی می‌توانند به پروتئین‌ها و آنزیم‌های ضروری داخل سلول آسیب رسانده و مسیرهای متابولیکی حیاتی باکتری‌ها را مختل کنند (۹). در این مطالعه، افزودن عصاره پوست انار باعث افزایش قابل توجه فعالیت آنتی‌میکروبی فیلم‌ها شد و بیشترین اثرات در گروه‌های حاوی بالاترین غلظت عصاره مشاهده گردید. عصاره پوست انار دارای

ترکیبات پلی‌فنولی، تانن‌ها، فلاونوئیدها و آلکالوئیدها است که به‌دلیل تخریب دیواره سلولی، تغییر در نفوذپذیری غشا و مهار آنزیم‌های ضروری باکتری‌ها، باعث مهار رشد و از بین بردن طیف وسیعی از باکتری‌های بیماری‌زا، از جمله باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌شوند (۳۰-۳۲). با توجه به نتایج به‌دست آمده، عصاره پوست انار در غلظت‌های بالاتر اثرات آنتی‌باکتریایی قوی‌تری نشان داده است. در تمامی گروه‌ها، افزایش غلظت عصاره منجر به کاهش میزان باکتری‌های زنده و کاهش تعداد *لیستریا مونوسیتوژنز*، *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *اشریشیاکلی* شد. این کاهش در گروه‌های حاوی ۲ درصد عصاره پوست انار به‌طور معناداری بیشتر از سایر گروه‌ها بود. همچنین، ترکیب عصاره با نانوذرات اکسید روی تأثیر آنتی‌باکتریایی آن را تقویت کرد و باعث مهار قوی‌تر رشد باکتری‌ها در طول زمان شد. این نتایج نشان می‌دهند که استفاده همزمان از عصاره پوست انار و نانوذرات اکسید روی می‌تواند به‌عنوان یک روش مؤثر برای کنترل رشد باکتری‌های بیماری‌زا در صنایع غذایی و بسته‌بندی مورد استفاده قرار گیرد.

نتایج این مطالعه نشان داد که میزان بازهای ازته فرار (TVB-N) در گروه‌های حاوی عصاره و نانوذرات روی نسبت به گروه کنترل بهتر بود. بیشترین کاهش TVB-N در فیلم‌های حاوی بالاترین غلظت عصاره همراه با نانوذرات روی مشاهده شد که نشان‌دهنده اثر هم‌افزایی میان این دو بود. حد آستانه پذیرش TVB-N برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ۲۰ میلی‌گرم نیتروژن/۱۰۰ گرم نمونه است (۳۳). در این تحقیق، مقدار TVB-N در تمامی فیلم‌ها به جز گروه‌های کنترل و کربوکسی‌متیل سلولز کمتر از ۲۰ میلی‌گرم بود. در گروه‌های کنترل و کربوکسی‌متیل سلولز، از ۲۴ ساعت به بعد مقدار TVB-N به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت. آمونیاک و دی‌متیل‌آمین به‌عنوان ترکیبات TVB-Nشناخته می‌شوند که به‌واسطه فعالیت میکروبی تولید می‌شوند و از مهم‌ترین شاخص‌های ارزیابی کیفیت محصولات دریایی هستند (۳۴). افزایش TVB-N معمولاً به‌دلیل فعالیت میکروبی است که موجب تجزیه آنزیم‌های درون‌زا می‌شود. بنابراین، فیلم‌های مورد استفاده در این مطالعه با مهار رشد باکتری‌ها، از افزایش TVB-N جلوگیری کرده‌اند. نتایج نشان داد که مقدار TVB-N در گروه کنترل به‌طور چشمگیری افزایش یافت، در حالی که گروه‌های حاوی کربوکسی‌متیل سلولز، نانوذرات اکسید روی و عصاره پوست انار مقادیر کمتری از TVB-N نشان دادند. این کاهش به‌دلیل ویژگی‌های ضد باکتریایی نانوذرات اکسید روی و ترکیبات فنولی عصاره پوست انار است که از رشد میکروب‌ها جلوگیری می‌کند. همچنین، افزایش غلظت عصاره پوست انار اثر مهاری بیشتری بر افزایش TVB-N داشت و بالاترین غلظت عصاره (۲ درصد) کمترین مقدار TVB-Nرا در انتهای دوره آزمایش نشان داد. این نتایج نشان می‌دهند که ترکیب کربوکسی‌متیل سلولز، نانوذرات اکسید روی و عصاره پوست انار می‌تواند به‌عنوان یک روش مؤثر برای افزایش ماندگاری و حفظ کیفیت محصولات دریایی مورد استفاده قرار گیرد.

میزان کل باکتری‌های زنده در گروه‌های ترکیب اکسید روی و عصاره پوست انار نسبت به گروه‌های حاوی تنها نانوذرات روی پایین‌تر بود، که این نتایج با داده‌های شمارش باکتری‌ها هم‌راستا است. مطالعات پیشین آستانه شمارش باکتریایی برای قزل‌آلای رنگین‌کمان را 10^6 CFU/g پیشنهاد کرده‌اند (۳۵). در این مطالعه، نتایج شمارش کل باکتری‌های زنده (TVC) نشان داد که در گروه کنترل تعداد باکتری‌ها در طول زمان به‌طور قابل توجهی افزایش یافت، که این به معنای رشد میکروارگانیسم‌های تخریب‌کننده و کاهش کیفیت نمونه‌های ماهی بود. در مقابل، گروه‌های حاوی کربوکسی‌متیل سلولز به همراه نانوذرات اکسید روی و عصاره پوست انار کاهش چشمگیری در تعداد باکتری‌ها نسبت به گروه کنترل نشان دادند. این کاهش به‌دلیل ویژگی‌های ضد باکتریایی نانوذرات اکسید روی (۳۶، ۳۷) و ترکیبات فنولی موجود در عصاره پوست انار (۱۸، ۳۸) بود که به‌طور مؤثری از رشد میکروارگانیسم‌ها جلوگیری کردند. به‌ویژه، ترکیب کربوکسی‌متیل سلولز و نانوذرات اکسید روی با ایجاد یک فیلم محافظ، از تماس باکتری‌ها با سطح

نمونه‌ها جلوگیری کرده و فعالیت میکروبی را مهار کردند. همچنین، عصاره پوست انار در غلظت‌های بالاتر اثرات ضد باکتریایی قوی‌تری نشان داد و منجر به کاهش بیشتر تعداد باکتری‌ها شد.

داده‌های pH در طول ۹۶ ساعت برای گروه‌های مختلف نشان‌دهنده تغییرات قابل توجهی در سطح pH در نمونه‌ها بودند. در ابتدا، pH در همه گروه‌ها تقریباً مشابه بود (بین ۶/۲۰ تا ۶/۴۰). با گذشت زمان، در گروه کنترل و برخی گروه‌های دیگر (مانند گروه عصاره پوست انار)، افزایش pH مشاهده شد که این ممکن است به‌دلیل فعالیت‌های میکروبی و تخریب مواد آلی باشد. در مقابل، در گروه‌های تیمارشده با کربوکسی‌متیل سلولز همراه با نانوذرات اکسید روی و عصاره پوست انار، pH نسبتاً ثابت یا تغییرات کمتری داشت که نشان‌دهنده کاهش فعالیت میکروبی و حفظ شرایط اسیدی‌تر در نمونه‌ها بود. این نتایج می‌توانند نشان‌دهنده اثرات ضد باکتریایی این ترکیبات باشند که مانع از رشد میکروارگانیسم‌ها و تخریب نمونه‌ها شده و از افزایش pH جلوگیری می‌کنند. افزایش pH معمولاً به‌عنوان یکی از شاخص‌های فساد و کاهش کیفیت در محصولات دریایی شناخته می‌شود (۳۹، ۴۰). بنابراین، ترکیباتی مانند کربوکسی‌متیل سلولز به همراه نانوذرات اکسید روی و عصاره پوست انار با کنترل رشد میکروبی و جلوگیری از افزایش pH ، نقش مؤثری در حفظ کیفیت و تازگی محصولات دریایی ایفا می‌کنند. لازم به ذکر است که نانوذرات اکسید روی در مقادیر بسیار ناچیز به نمونه‌ها اضافه شدند و توانایی ایجاد سمیت را نداشتند. مطالعات قبلی نیز گزارش کرده‌اند که این نانوذرات به راحتی وارد سلول‌های سالم یا پوست انسان نمی‌شوند (۹). بنابراین نانوذرات روی در این غلظت نمی‌تواند باعث سمیت برای انسان شود.

فیلم‌های زیست‌فعال بر پایه کربوکسی‌متیل سلولز حاوی نانوذرات اکسد روی و عصاره پوست انار، در مقایسه با روش‌های متداول نگهداری ماهی، مزایا و معایب خاص خود را دارند. روش‌هایی مانند بسته‌بندی با اتمسفر اصلاح‌شده و استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی معمولاً به کاهش رشد میکروبی و افزایش ماندگاری ماهی کمک می‌کنند، اما ممکن است اثرات جانبی نامطلوبی داشته باشند (۴۱). در روش استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی (مانند نیترات‌ها و بنزوات‌ها)، ترکیبات مصنوعی برای کنترل فساد میکروبی بکار می‌روند، اما مصرف طولانی‌مدت آنها نگرانی‌های ایمنی دارد (۴۲). از سوی دیگر، روش‌های فیزیکی مانند انجماد و بسته‌بندی وکیوم نیز تأثیر قابل توجهی بر افزایش ماندگاری دارند، اما ممکن است بر کیفیت بافت و طعم ماهی تأثیر بگذارند (۴۳). در مقابل، فیلم‌های زیست‌فعال نه‌تنها دارای خواص ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی هستند، بلکه از نظر زیست‌تخریب‌پذیری نیز گزینه‌ای پایدارتر محسوب می‌شوند. این فیلم‌ها می‌توانند بدون نیاز به افزودن مواد شیمیایی ماندگاری ماهی را افزایش دهند و کیفیت محصول را حفظ کنند.

در مجموع، نتایج این مطالعه نشان‌دهنده تأثیر مثبت فیلم‌های حاوی مواد فعال مانند کربوکسی‌متیل سلولز، نانوذرات اکسید روی و عصاره پوست انار در حفظ کیفیت و تازگی ماهی قزل‌آلا هستند. بر اساس داده‌های به‌دست آمده، این فیلم‌ها توانسته‌اند به‌طور مؤثری رشد میکروارگانیسم‌ها را محدود کنند و در نتیجه از افزایش مقدار بازهای ازته فرار و شمارش کل میکروارگانیسم‌ها جلوگیری کنند. علاوه بر این، فیلم‌ها با حفظ pH در سطح مناسب، به جلوگیری از فساد و افزایش اسیدیته ناشی از فعالیت میکروبی کمک کرده‌اند. در این مطالعه، کربوکسی‌متیل سلولز و نانوذرات اکسید روی به‌ویژه در کاهش TVBN و TVC مؤثر بودند و به‌طور چشمگیری از فساد میکروبی جلوگیری کردند. همچنین، عصاره پوست انار نیز اثرات آنتی‌باکتریایی قابل توجهی نشان داد که به حفظ کیفیت ماهی کمک کرده و از فساد آن جلوگیری نمود. با توجه به نتایج، استفاده از این فیلم‌ها می‌توانند به‌عنوان یک روش مؤثر برای بسته‌بندی محصولات دریایی و به‌ویژه ماهی‌های حساس مانند ماهی قزل‌آلا مطرح باشد. این فیلم‌ها علاوه بر حفظ کیفیت محصول، احتمالاً

می‌توانند به‌عنوان یک روش طبیعی و ایمن برای کاهش مصرف مواد نگهدارنده شیمیایی مورد استفاده قرار گیرند. فیلم‌های تولیدی دارای قابلیت استفاده در صنعت بسته‌بندی ماهی و برای پوشش دادن فیله‌های ماهی هستند و همچنین به‌علت ساختار تجزیه‌پذیر می‌توانند به‌عنوان پوشش‌های آنتی‌باکتریایی قابل تجزیه استفاده شوند. با وجود نتایج مثبت این مطالعه، برای تحقق کاربردهای عملی‌تر و تجاری‌تر، پیشنهاد می‌شود که تحقیقات بیشتری در زمینه بهینه‌سازی نسبت‌های ترکیب مواد فعال برای دستیابی به بهترین عملکرد در بسته‌بندی مواد غذایی انجام شود. همچنین، ارزیابی طولانی‌مدت‌تر از تأثیر این فیلم‌ها در شرایط واقعی ذخیره‌سازی محصولات دریایی ضروری است. علاوه بر این، بررسی اثرات این فیلم‌ها بر سایر محصولات دریایی و مقایسه آن با روش‌های نگهداری شیمیایی رایج می‌تواند در بهبود فرآیندهای بسته‌بندی و حفظ کیفیت محصولات دریایی مؤثر باشد. این تحقیق به بررسی تأثیر این فیلم‌ها بر ماهی قزل‌آلا پرداخته است و برای کاربرد در دیگر انواع محصولات دریایی نیاز به تحقیقات بیشتری دارد. همچنین، فرآیند تولید و هزینه‌های مربوط به این فیلم‌ها باید مورد توجه قرار گیرد تا قابلیت استفاده آنها در مقیاس صنعتی امکان‌پذیر شود.

سپاسگزاری

از تمامی عزیزانی که در اجرای این تحقیق همکاری نمودند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

1- Motelica L, **Ficai D**, **Ficai A**, **Trușcă RD**, **Ilie CI**, **Oprea OC, *et al.*** Innovative antimicrobial chitosan/ZnO/Ag NPs/citronella essential oil nanocomposite—Potential coating for grapes. *Foods*. 2020; 9(12): 1801.

2- Rastiani F, **Jebali A**, **Hekmati moghaddam SH**, **Sadrabad EK**, **Mohajeri FA**, **Dehghani-Tafti A.** Monitoring the freshness of rainbow trout using intelligent PH-sensitive indicator during storage. *J Nutr Food Secur*. 2019. [In persian]

3- Flórez M, **Guerra-Rodríguez E**, **Cazón P**, **Vázquez M.** Chitosan for food packaging: Recent advances in active and intelligent films. *Food Hydro coll*. 2022; 124: 107328.

4- Pires J, **Paula CDd**, **Souza VGL**, **Fernando AL**, **Coelhoso I.** Understanding the barrier and mechanical behavior of different nanofillers in chitosan films for food packaging. *Polymers*. 2021; 13(5): 721.

5- Priyadarshi R, **Kumar B**, **Deeba F**, **Kulshreshtha A**, **Negi YS.** Chitosan films incorporated with Apricot (Prunus armeniaca) kernel essential oil as active food packaging material. *Food Hydro coll*. 2018; 85: 158-66.

6- Youssef H, **El-Naggar ME**, **Fouda F**, **Youssef AM.** Antimicrobial packaging film based on biodegradable CMC/PVA-zeolite doped with noble metal cations. *Food Packag Shelf Life*. 2019; 22: 100378.

7- Priyadarshi R, **Kumar B**, **Rhim J-W.** Green and facile synthesis of carboxymethylcellulose/ZnO nanocomposite hydrogels crosslinked with Zn2+ ions. *Int J Biol Macromol*. 2020; 162: 229-35.

8- Malik GK, **Mitra J.** Zinc oxide nanoparticle synthesis, characterization, and their effect on mechanical, barrier, and optical properties of HPMC-based edible film. *Food Bioprocess Technol*. 2021; 14: 441-56.

9- Kim I, **Viswanathan K**, **Kasi G**, **Thanakkasaranee S**, **Sadeghi K**, **Seo J.** ZnO nanostructures in active antibacterial food packaging: Preparation methods, antimicrobial mechanisms, safety issues, future prospects, and challenges. *Food Rev Int*. 2022; 38(4): 537-65.

10- Yang X, **Yu Q**, **Gao W**, **Tang X**, **Yi H**, **Tang X.** The mechanism of metal-based antibacterial materials and the progress of food packaging applications: A review. *Ceram Int*. 2022; 48(23): 34148-68.

11- Kumar S, **Mudai A**, **Roy B**, **Basumatary IB**, **Mukherjee A**, **Dutta J.** Biodegradable hybrid nanocomposite of chitosan/gelatin and green synthesized zinc oxide nanoparticles for food packaging. *Foods*. 2020; 9(9): 1143.

12- Caputo L, **Cornara L**, **Bazzicalupo M**, **De Francesco C**, **De Feo V**, **Trombetta D, *et al.*** Chemical composition and biological activities of essential oils from peels of three citrus species. *Molecules*. 2020; 25(8): 1890.

13- Xiang Q, **Li M**, **Wen J**, **Ren F**, **Yang Z**,

Jiang X, *et al.* The bioactivity and applications of pomegranate peel extract: A review. *J Food Biochem.* 2022; 46(7): e14105.

14- Eshaghi R, **Mohsenzadeh M**, **Ayala-Zavala JF.** Bio-nanocomposite active packaging films based on carboxymethyl cellulose, myrrh gum, TiO2 nanoparticles and dill essential oil for preserving fresh-fish (Cyprinus carpio) meat quality. *Int J Biol Macromol.* 2024; 263: 129991.

15- Noshirvani N, **Ghanbarzadeh B**, **Mokarram RR**, **Hashemi M**, **Coma V.** Preparation and characterization of active emulsified films based on chitosan-carboxymethyl cellulose containing zinc oxide nano particles. *Int J Biol Macromol.* 2017; 99: 530-8. [In persian]

16- You P, **Wang L**, **Zhou N**, **Yang Y**, **Pang J.** A pH-intelligent response fish packaging film: Konjac glucomannan/carboxymethyl cellulose/blackcurrant anthocyanin antibacterial composite film. *Int J Biol Macromol.* 2022; 204: 386-96.

17- Priyadarshi R, **Negi YS.** Effect of varying filler concentration on zinc oxide nanoparticle embedded chitosan films as potential food packaging material. *J Polym Environ*. 2017; 25: 1087-98.

18- Maroufi LY, **Tabibiazar M**, **Ghorbani M**, **Jahanban-Esfahlan A.** Fabrication and characterization of novel antibacterial chitosan/dialdehyde guar gum hydrogels containing pomegranate peel extract for active food packaging application. *Int J Biol Macromol.* 2021; 187: 179-88. [In persian]

19- Derakhshan Z, **Ferrante M**, **Tadi M**, **Ansari F**, **Heydari A**, **Hosseini MS, *et al.*** Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of pomegranate peels, juice and seeds. *Food Chem Toxicol.* 2018; 114: 108-11. [In persian]

20- Rostami H, **Kazemi M**, **Shafiei S.** Antibacterial activity of Lavandula officinalis and Melissa officinalis against some human pathogenic bacteria. *Asian J Biochem*. 2012; 7(3): 133-42. [In persian]

21- Chang S-H, Chen YJ, Tseng HJ, Hsiao HI, Chai HJ, Shang KC, *et al.* Antibacterial activity of chitosan–polylactate fabricated plastic film and its application on the preservation of fish fillet. *Polym.* 2021; 13(5): 696.

22- Remya S, Mohan C, Bindu J, Sivaraman G, Venkateshwarlu G, Ravishankar C. Effect of chitosan based active packaging film on the keeping quality of chilled stored barracuda fish. *J Food Sci Technol.* 2016; 53: 685-93.

23- Amegovu AK, Sserunjogi ML, Ogwok P, Makokha V. Nucleotide degradation products, total volatile basic nitrogen, sensory and microbiological quality of Nile perch (*Lates niloticus*) fillets under chilled storage. *J Microbiol Biotechnol Food Sci.* 2012; 2(2): 653-66.

24- Khoshnoudi-Nia S, Moosavi-Nasab M, Nassiri SM, Azimifar Z. Determination of total viable count in rainbow-trout fish fillets based on hyperspectral imaging system and different variable selection and extraction of reference data methods. *Food Anal Methods.* 2018; 11: 3481-94. [In persian]

25- Woraprayote W, Pumpuang L, Tosukhowong A, Zendo T, Sonomoto K, Benjakul S, *et al.* Antimicrobial biodegradable food packaging impregnated with Bacteriocin 7293 for control of pathogenic bacteria in pangasius fish fillets. *LWT.* 2018; 89: 427-33.

26- Abbasabadi OR, Farahpour MR, Tabatabaei ZG. Accelerative effect of nanohydrogels based on chitosan/ZnO incorporated with citral to heal the infected full-thickness wounds; an experimental study. *Int J Biol Macromol.* 2022; 217: 42-54. [In persian]

27- Gudkov SV, Burmistrov DE, Serov DA, Rebezov MB, Semenova AA, Lisitsyn AB. A mini review of antibacterial properties of ZnO nanoparticles. *Front Phys.* 2021; 9: 641481.

28- Akshaykranth A, Jayarambabu N, Venkatappa Rao T, Rakesh Kumar R, Srinivasa Rao L. Antibacterial activity study of ZnO incorporated biodegradable poly (lactic acid) films for food packaging applications. *Polym Bull.* 2023; 80(2): 1369-84.

29- Zare M, Namratha K, Ilyas S, Sultana A, Hezam A, Surmeneva MA, *et al.* Emerging trends for ZnO nanoparticles and their applications in food packaging. *ACS Food Sci Technol.* 2022; 2(5): 763-81.

30- Emam-Djomeh Z, Moghaddam A, Yasini Ardakani SA. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extract, physical, mechanical, barrier and antimicrobial properties of pomegranate peel extract-incorporated sodium caseinate film and application in packaging for ground beef. *Packag Technol Sci.* 2015; 28(10): 869-81.

31- Hanani ZN, Yee FC, Nor-Khaizura M. Effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel powder on the antioxidant and antimicrobial properties of fish gelatin films as active packaging. *Food Hydrocoll.* 2019; 89: 253-9.

32- Yuan G, Lv H, Yang B, Chen X, Sun H. Physical properties, antioxidant and antimicrobial activity of chitosan films containing carvacrol and pomegranate peel extract. *Molecules.* 2015; 20(6):

11034-45.

33- Khoshnoudi-Nia S, Moosavi-Nasab M. Comparison of various chemometric analysis for rapid prediction of thiobarbituric acid reactive substances in rainbow trout fillets by hyperspectral imaging technique. *Food Sci Nutr.* 2019; 7(5): 1875-83. [In persian]

34- Moosavi-Nasab M, Khoshnoudi-Nia S, Azimifar Z, Kamyab S. Evaluation of the total volatile basic nitrogen (TVB-N) content in fish fillets using hyperspectral imaging coupled with deep learning neural network and meta-analysis. *Sci Rep*. 2021; 11(1): 5094. [In persian]

35- Javan AJ, Bolandi M, Jadidi Z, Parsaeimehr M, Vayeghan AJ. Effects of *Scrophularia striata* water extract on quality and shelf life of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during superchilled storage. *Iran J Vet Res.* 2015; 16(2): 213. [In persian]

36- Kim I, Viswanathan K, Kasi G, Sadeghi K, Thanakkasaranee S, Seo J. Poly (lactic acid)/ZnO bionanocomposite films with positively charged ZnO as potential antimicrobial food packaging materials. *Polym.* 2019; 11(9): 1427.

37- Silva FAS, Carvalho M, de Carvalho TB, Gama M, Poças F, Teixeira P. Antimicrobial activity of in-situ bacterial nanocellulose-zinc oxide composites for food packaging. *Food Packag Shelf Life.* 2023; 40: 101201.

38- Cui H, Surendhiran D, Li C, Lin L. Biodegradable zein active film containing chitosan nanoparticle encapsulated with pomegranate peel extract for food packaging. *Food Packag Shelf Life.* 2020; 24: 100511.

39- Sobhan A, Muthukumarappan K, Wei L. A biopolymer-based pH indicator film for visually monitoring beef and fish spoilage. *Food Biosci.* 2022; 46: 101523.

40- Comi G, Iacumin L. Spoilage of meat and fish. *Microbiol Qual Food.* Elsevier. 2025. p. 221-48.

41- Floros JD, Matsos KI. Introduction to modified atmosphere packaging. *Innov Food Packag.* Elsevier. 2005; p. 159-72.

42- Gassara F, Kouassi AP, Brar SK, Belkacemi K. Green alternatives to nitrates and nitrites in meat-based products–a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2016; 56(13): 2133-48.

43- Yam KL. *The Wiley Encyclopedia of Packaging Technology.* John Wiley & Sons. 2010.

New Findings in Veterinary Medicine
Homepage: nfvm.uoz.ac.ir
Quarterly - Print ISSN: 2645-4491 Online ISSN: 2676-5004

Volume 8, Issue 3, Autumn 2025, pages: 40-53

Antibacterial activity of carboxymethyl cellulose-based films combined with zinc oxide nanoparticles and pomegranate peel extract for preservation of *Rainbow trout* samples

Davoud Nasiri*

Assistant Professor, Department of Food Hygiene, Naghadeh Branch, Islamic Azad University, Naghadeh, Iran.

Receive: January 31, 2025; Revise: April 24, 2025; Accept: April 26, 2025

10.22034/nfvm.2025.503535.1274

Summary

Rainbow trout is highly susceptible to microbial spoilage, and use of active packaging to extend the shelf life of perishable foods has gained considerable attention in recent years. The aim of this study was to investigate the effect of bioactive films based on carboxymethyl cellulose (CMC) combined with zinc oxide nanoparticles (ZnO) and pomegranate peel extract (PE) on maintaining the quality of rainbow trout. Films were prepared by the solution casting method and evaluated in five different groups. The films included carboxymethyl cellulose (CMC), carboxymethyl cellulose/zinc oxide nanoparticles (CMC/ZnO), carboxymethyl cellulose/zinc oxide nanoparticles/0.5% pomegranate peel extract (CMC/ZnO/0.5% PE), carboxymethyl cellulose/zinc oxide nanoparticles/1% pomegranate peel extract (CMC/ZnO/1% PE), and carboxymethyl cellulose/zinc oxide nanoparticles/2% pomegranate peel extract (CMC/ZnO/2% PE). The fish samples were stored at 25°C for one week. The quality characteristics of the rainbow trout samples, including the total volatile basic nitrogen (TVBN) content, total viable count (TVC), and pH, were evaluated. The results showed that films containing zinc oxide nanoparticles and pomegranate peel extract significantly reduced TVBN and TVC ($P<0.05$). Additionally, the pH of the samples in the treated film groups was significantly lower than that in the control group ($P<0.05$), indicating the efficacy of these films in reducing microbial activity and delaying the spoilage of rainbow trout. These results suggest that the use of carboxymethyl cellulose-based films combined with zinc oxide nanoparticles and pomegranate peel extract, especially the CMC/ZnO/2% PE film, could be an effective method for maintaining quality and extending the shelf life of rainbow trout during storage.

Keywords: *Carboxymethyl cellulose, zinc oxide nanoparticles, pomegranate peel extract, rainbow trout, antibacterial activity, total volatile basic nitrogen*