



Study on The Effect of Chitosan Coating Incorporated With *Ziziphora Clinopodioides* Essential Oil on The Some Microbial and Sensory Properties of Chicken Fillet at Refrigerated Temperature

Shirin Hasan¹, Ali Khanjari¹, Mohammad Kazem Koochi², Hassan Gandomi Nasrabadi¹, Nassim Shavisi³

¹Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

²Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine University of Tehran, Tehran, Iran

³Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran



[10.22059/jvr.2018.244342.2715](https://doi.org/10.22059/jvr.2018.244342.2715)

J Vet Res. 74(3): 370-378

Abstract

BACKGROUND: Poultry meat belongs to perishable foods and the major concern of food industries is the microbial spoilage of poultry meat.

OBJECTIVES: The aim of present study was to investigate the effect of chitosan (CH) coating enriched with different concentrations of *Ziziphora clinopodioides* essential oil (ZEO) in comparison with control group on some of the sensory and microbial properties of chicken breast fillets during storage at refrigerated temperature for 12 days.

METHODS: Essential oil extraction was done by hydro-distillation method and its chemical composition was determined by gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS). In the present study, chicken breast fillets separately were dipped in 2% CH solution containing ZEO at concentrations 0, 0.5 and 1% and then stored at refrigerated condition for 12 days. After that chicken fillets were studied at 7 intervals (0, 1, 3, 5, 7, 9 and 12 days) regarding microbial (Total mesophilic and Psychrotrophic bacteria, *Pseudomonas spp.* and Enterobacteriaceae) and sensory (color, odor and taste) examination.

RESULTS: The most important compounds of the ZEO were geraniol (20.62%), carvacrol (18.17%), thymol (5.39%), α -terpineol (7.49%) and 4-terpineol (6.83%). Results of this study revealed that in the treatments coated with CH containing ZEO, total viable counts (TVC), *Pseudomonas spp.*, lactic acid bacteria, Psychrotrophic bacteria and Enterobacteriaceae family significantly ($P < 0.05$) decreased as compared to control group during the storage period. Based on the results of the present study, coating of chicken fillets with chitosan alone or chitosan containing 0.5 % concentration of ZEO showed better sensory properties.

CONCLUSIONS: CH coating enriched with 0.5 % ZEO has potential to extend shelf life of chicken fillets without any unfavorable organoleptic properties.

Keywords: Chitosan, Coating, *Ziziphora clinopodioides* essential oil, Chicken fillet

Copyright © 2019. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: Email: khanjari@ut.ac.ir Tel/Fax: 021-66438141

How to cite this article:

Hasan, S., Khanjari, A., Kazem Koochi, M., Gandomi Nasrabadi, H., & Shavisi, N. (2019). Study on The Effect of Chitosan Coating Incorporated With *Ziziphora Clinopodioides* Essential Oil on The Some Microbial and Sensory Properties of Chicken Fillet at Refrigerated Temperature. *J Vet Res*, 74(3), 370-378. doi:10.22059/jvr.2018.244342.2715

Figure Legends and Table Captions

- Figure 1. Effect of chitosan coating containing different concentrations of *Ziziphora clinopodioides* (ZEO) on TVC of fresh chicken fillet stored at 4 °C.
 Figure 2. Effect of chitosan coating containing different concentrations of *Ziziphora clinopodioides* (ZEO) on Psychrotrophic bacteria of fresh chicken fillet stored at 4 °C.
 Figure 3. Effect of chitosan coating containing different concentrations of *Ziziphora clinopodioides* (ZEO) on Enterobacteriaceae of fresh chicken fillet stored at 4 °C.
 Figure 4. Effect of chitosan coating containing different concentrations of *Ziziphora clinopodioides* (ZEO) on *pseudomonas* spp. of fresh chicken fillet stored at 4 °C.
 Figure 5. Effect of chitosan coating containing different concentrations of *Ziziphora clinopodioides* (ZEO) on lactic acid bacteria of fresh chicken fillet stored at 4 °C.
 Figure 6. Effect of chitosan coating containing different concentrations of *Ziziphora clinopodioides* (ZEO) on sensory characteristics (taste, odor and color) of fresh chicken fillet stored at 4 °C.



مطالعه اثر پوشش کیتوزان حاوی اسانس کاکوتی کوهی بر برخی خصوصیات میکروبی و حسی فیله مرغ در دمای یخچالی

شیرین حسن^۱، علی خنجری^۱، محمد کاظم کوهی^۲، حسن گندمی نصر آبادی^۱، نسیم شایسی^۳

^۱گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۲گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۳گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

doi: [10.22059/jvr.2018.244342.2715](https://doi.org/10.22059/jvr.2018.244342.2715)

تاریخ دریافت: ۱۷ فروردین ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: ۰۴ تیر ۱۳۹۸ تاریخ انتشار آنلاین: ۱ شهریورماه ۱۳۹۸

چکیده

زمینه مطالعه: گوشت مرغ جزء غذاهای فسادپذیر تقسیم‌بندی می‌شود و یکی از نگرانی‌های صنایع غذایی فساد میکروبی آن می‌باشد.

هدف: هدف از این مطالعه ارزیابی اثر پوشش کیتوزان حاوی غلظت‌های مختلف اسانس کاکوتی کوهی در مقایسه با گروه شاهد بر برخی خصوصیات حسی و میکروبی فیله مرغ در طول ۱۲ روز نگهداری در دمای یخچالی (۴ درجه سانتی‌گراد) بود.

روش کار: در این مطالعه، اسانس گیاه کاکوتی کوهی به روش تقطیر با آب استخراج گردید و ترکیبات تشکیل‌دهنده آن با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی مشخص گردید. در این مطالعه، فیله‌های مرغ بصورت جداگانه در محلول پوششی کیتوزان ۲ درصد حاوی ۰/۵ و ۱ درصد اسانس کاکوتی کوهی و کیتوزان ۲ درصد بدون اسانس غوطه‌ور و سپس بمدت ۱۲ روز در دمای یخچالی نگهداری شدند. سپس در ۷ فاصله (روزهای ۰، ۱، ۳، ۵، ۷، ۹ و ۱۲) از نظر خصوصیات میکروبی (شمارش کلی، سرماگراها، گونه‌های سودوموناس، باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک و خانواده انتروباکتریاسه) و حسی (رنگ، بو و طعم) مورد مطالعه قرار گرفتند.

نتایج: بیشترین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس کاکوتی کوهی شامل گرانول (۲۰/۶۲ درصد)، کارواکول (۱۸/۱۷ درصد)، آلفا-ترپینئول (۷/۴۹ درصد)، ۴-ترپینئول (۶/۸۳ درصد) و تیمول (۵/۳۹ درصد) بود. نتایج این مطالعه نشان داد که در تیمارهای پوشش داده‌شده با کیتوزان حاوی اسانس کاکوتی کوهی شمارش شاخص‌های میکروبی مذکور در مقایسه با گروه کنترل بصورت معنی‌داری در طول دوره نگهداری کاهش یافت ($P < 0.05$). بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، پوشش فیله‌های مرغ با کیتوزان به تنهایی یا کیتوزان حاوی ۰/۵ درصد اسانس کاکوتی کوهی خصوصیات حسی بهتری نشان دادند.

نتیجه‌گیری نهایی: پوشش کیتوزان حاوی ۰/۵ درصد اسانس کاکوتی کوهی پتانسیل افزایش زمان نگهداری فیله‌های مرغ را بدون ایجاد خصوصیات حسی نامطلوب دارد.

کلمات کلیدی: کیتوزان، پوشش، اسانس کاکوتی کوهی، فیله مرغ

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: علی خنجری، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

پست الکترونیکی: Khanjari@ut.ac.ir

مقدمه

منظور جایگزینی این نگهدارنده‌ها با انواع طبیعی آن صورت گرفته و با در حال انجام است (۲۱، ۱۶، ۶).

از جمله ترکیبات طبیعی که می‌توانند به عنوان نگهدارنده در مواد غذایی بکار روند، اسانس‌های گیاهی هستند. مطالعات فراوانی اثر ضدباکتریایی، کاهندگی توکسین برخی از باکتری‌ها، ضدقارچی، آنتی-اکسیدانی و ضدسرطانی اسانس‌ها را ثابت نموده‌اند (۲۱، ۱۰). از جمله

به منظور افزایش ایمنی و زمان نگهداری مواد غذایی از روش‌هایی مانند خشک کردن، اشعه دادن، منجمد کردن، کنسرو کردن و یا به کارگیری نگهدارنده‌های مختلف استفاده می‌شود لیکن در اغلب این روش‌ها ماده غذایی دیگر بصورت تازه نمی‌تواند به مصرف کنندگان عرضه گردد (۴). تا کنون مطالعات مختلفی اثرات مضر برخی از نگهدارنده‌های شیمیایی را نشان داده است لذا تحقیقات فراوانی به

تهیه پوشش‌های بر پایه کیتوزان: کیتوزان با وزن مولکولی بالا از شرکت سیگما آلدریج انگلستان تهیه و سپس ۱۰ گرم از آن در ۵۰۰ میلی‌لیتر محلول اسید استیک ۱ درصد حل گردید. برای دستیابی به پخش شدن کیتوزان به صورت مناسب، محلول کیتوزان به مدت سه ساعت در دمای اتاق بر روی همزن مغناطیسی هم زده شد. سپس اسانس کاکوتی کوهی در غلظت‌های ۰/۵ و ۱ درصد با توپین ۸۰ (۲۵/۰ درصد) مخلوط و به محلول اضافه گردید. در نهایت، محلول نهایی به مدت یک دقیقه با همزنایزر WiseD 15-D با دور ۲۱۶۰۰ RPM ۵۰۰ همزن شد. برای هر پوشش قطعات فیله، به مدت دو دقیقه در ۵۰۰ میلی‌لیتر محلول پوشش‌دهنده غوطه‌ور و پس از آن فیله‌ها از داخل محلول خارج و در زیر هود میکروبی به منظور زهکشی به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد و پس از آن در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (۱۱،۱۶).

بررسی میکروبی نمونه‌های فیله مرغ: جهت ارزیابی میکروبی در روزهای ۰، ۱، ۳، ۵، ۷، ۹ و ۱۲ میزان ۱۰ گرم از هر تیمار جهت انجام آزمون‌های میکروبی انتخاب و رقت‌های متوالی در بافر فسفات تهیه گردید. شمارش تعداد باکتری‌های مزوفیل هوازی و باکتری‌های سرماگرا به روش کشت سطحی در محیط پلیت کانت آگار به ترتیب با دوره گرمخانه‌گذاری ۴۸ ساعته در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۰ روز در ۷ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. شمارش اتروباکترياسه به روش کشت مخلوط در محیط VRBGA با گرمخانه‌گذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. باکتری‌های مولد لاکتیک اسید و گونه‌های سودوموناس به روش کشت سطحی به ترتیب در محیط MRS آگار با ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و محیط *Pseudomonas agar* با ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد شمارش گردید (۲۱).

ارزیابی ارگانولپتیک (رنگ، بو و طعم): ویژگی‌های حسی (رنگ، بو و طعم) فیله‌های مرغ با تیمارهای مختلف در روز سوم مطالعه توسط گروه ۶ نفره انتخاب شده و آموزش دیده از کارکنان و دانشجویان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به عنوان تست پنل حسی ارزیابی گردید. نمونه‌ها به طور یکسان و با کدگذاری ۳ عددی بصورت انفرادی به آنها داده شد تا با استفاده از سیستم ۵ امتیازی، ارزیابی انجام گیرد (۲۱).

نتایج

ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس کاکوتی کوهی: با توجه به نتایج بدست آمده از آنالیز ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس کاکوتی کوهی توسط دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف سنج جرمی، ۵۴

گیاهانی که می‌توان جهت استخراج اسانس از آن بهره گرفت گیاه کاکوتی کوهی می‌باشد. در مواد غذایی مختلف نظیر گوشت، پنیر و سوپ از این گیاه به منظور ایجاد طعم مناسب استفاده می‌کنند (۲۱) از این گیاه و مشتقات آن جهت رفع اختلالات قلبی، سرماخوردگی، افسردگی، اسهال، سرفه، مشکلات دستگاه گوارش، میگرن و تب مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۱، ۱۰). مهمترین ترکیبات ضد میکروبی جدا شده از این اسانس شامل ترکیبات فنولی نظیر Pulegone، 1,8- Limonene و Cineole می‌باشد (۲۱).

کیتوزان پلی‌ساکاریدی کاتیونی است که طی فرایند استیل‌زدایی کیتین حاصل میشود. کیتوزان و مشتقات آن، کاربردهای بسیاری در پزشکی، کشاورزی، صنایع غذایی و شیمی صنعتی دارد (۱۵). با حل نمودن کیتوزان در محلول‌های اسیدی می‌توان تولید پوشش و فیلم نمود. البته خواص عملکردی و ضد میکروبی پوشش‌ها و فیلم‌های کیتوزان به ویژگی‌های کیتوزان (مثل درجه استیل‌زدایی و وزن مولکولی)، سایر ترکیبات موجود در سیستم (نوع و غلظت اسید، حضور پروتئین، لیپید، یون و سایر ترکیبات غذایی) و شرایط محیطی (درجه حرارت و رطوبت نسبی) نیز بستگی دارد (۱۶، ۱۱).

گوشت مرغ به دلیل کم بودن میزان چربی، دارا بودن مواد تغذیه ای مناسب و ارزان بودن آن یکی از پرمصرف‌ترین گوشت‌های موجود در ایران می‌باشد، لیکن میکروارگانوسم‌ها به راحتی در این گوشت رشد می‌نمایند و به راحتی می‌توانند آن را دچار فساد نمایند، به همین دلیل می‌توان برای رفع این مشکل از نگهدارنده‌ها در افزایش ماندگاری آن استفاده نمود (۱۱). تاکنون مطالعات مختلفی در رابطه با استفاده از پوشش‌های حاوی مواد ضد میکروبی صورت گرفته (۱۶، ۱۱، ۸) و یا در حال انجام است ولی تاکنون مطالعه‌ای در رابطه با پوشش کیتوزان حاوی اسانس کاکوتی کوهی جهت پوشش دهی فیله مرغ صورت نگرفته است و این طرح می‌تواند سبب ایجاد دید مناسب جهت کاربرد این پوشش‌ها در صنایع غذایی باشد.

مواد و روش کار

تهیه اسانس کاکوتی کوهی و آنالیز ترکیبات تشکیل‌دهنده آن: اسانس کاکوتی کوهی به وسیله دستگاه کلونجر آپاراتوس به روش تقطیر با آب از این گیاه بدست آمد. آنالیز ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس توسط دستگاه گاز کروماتوگراف مجهز به طیف سنجی جرمی (GC-MS) انجام شد (۲۱).

تهیه فیله مرغ: فیله‌های مرغ ۶۰ گرمی از کشتارگاه ایران بورچین تهیه و طی ۱ ساعت در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل گردید.

شیمیایی اسانس به دست آمده از بخش‌های هوایی گیاه مذکور را با استفاده از GC/MS آنالیز و ۳۱ ترکیب اصلی شناسایی کردند که ۹۹/۵ درصد اسانس را تشکیل می‌داد. مونوترپن‌های اکسیژنی (۳۹/۳ درصد) بخش عمده اسانس بودند، بطوریکه پولگون (۴۵/۸ درصد)، پیپرینتون (۱۴/۷ درصد) پارا منت-۳ (۸ درصد) ترکیب-های عمده شناسایی شده بودند (۱۹). Dehghan و همکاران (۲۰۱۴)، ترکیب شیمیایی اندام‌های هوایی گیاه کاکوتی کوهی رشد کرده در توپسرکان همدان را در مرحله گلدهی کامل مورد بررسی قرار دادند که در بین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس ۳ ترکیب بیش از ۷۷/۴ درصد اسانس را تشکیل داده بود که این ترکیبات شامل پولگون (۵۹/۳ درصد)، بتا کاریوفیلین (۱۰/۷ درصد) و او۱-سینئول (۷/۷ درصد) بود (۳). همانطور که از نتایج این مطالعه و مطالعات دیگر مشخص شده این اسانس حاوی ترکیبات پلی فنلی بوده و لذا دارای خواص ضد میکروبی می باشد.

ترکیب مختلف در اسانس شناسایی گردید که از بین آن‌ها ۵ ترکیب بیش از ۵۸/۵ درصد اسانس را تشکیل دادند که بیشترین ترکیبات تشکیل دهنده آن گرانپول (۲۰/۶۲ درصد)، کارواکرول (۱۸/۱۷ درصد)، آلفا-ترپینئول (۷/۴۹ درصد)، ۴-ترپینئول (۶/۸۳ درصد) و تیمول (۵/۳۹ درصد) می باشد (جدول ۱). مقایسه نتایج حاصل از کروماتوگرافی اسانس گیاه کاکوتی کوهی با اسانس گیاه کاکوتی تهیه شده در سایر مطالعات نشان می‌دهد که علی‌رغم وجود شباهت‌ها در ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس گیاه، شرایط آب و هوایی، محل رویش و ارتفاع محل می‌تواند دلیل برخی تفاوت‌ها در این ترکیبات باشد (۲۰). برای مثال، Chitsaz و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که ۲۲ ترکیب متفاوت در اسانس گیاه کاکوتی کوهی وجود دارد که ۵ ترکیب بیش از ۷۳ درصد اسانس را تشکیل می‌دادند این ترکیبات شامل: پولگون (۲۹/۳ درصد)، پارامنتا ۳-ان-۸-اول (۱۹/۱ درصد)، نئو-منتول (۱۱/۶ درصد)، پیپرینتون (۹/۴ درصد) و او۱-سینئول (۴/۵ درصد)، بودند (۱). در تحقیق دیگر، Salehi و همکاران (۲۰۰۵)، ترکیب

جدول ۱. ترکیبات تشکیل دهنده اسانس کاکوتی با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی

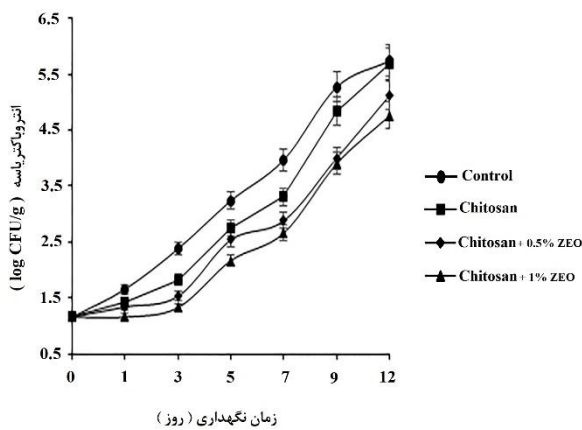
| ردیف | نام ترکیب | % | زمان بازداری (دقیقه) |
|------|---|------|----------------------|
| ۱ | Thujene | ۰/۱۰ | ۶/۱۲۲ |
| ۲ | α -Pinene | ۰/۴۰ | ۶/۳۴۳ |
| ۳ | Camphene | ۰/۴۲ | ۶/۸۴۱ |
| ۴ | Sabinene | ۰/۱۳ | ۷/۷۳۴ |
| ۵ | 2- β -Pinene | ۰/۱۱ | ۷/۸۳۷ |
| ۶ | ol-3-Octen-1 | ۰/۰۸ | ۸/۰۰۶ |
| ۷ | β -Myrcene | ۱ | ۸/۴۲۲ |
| ۸ | α -Terpinene | ۱/۷۱ | ۹/۴۱۹ |
| ۹ | Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl) | ۱/۶۲ | ۹/۷۵۷ |
| ۱۰ | 1,8-Cineole | ۱ | ۹/۹۹۹ |
| ۱۱ | trans- β -Ocimene | ۰/۱۶ | ۱۰/۳۵۳ |
| ۱۲ | trans- β -Ocimene | ۰/۴۳ | ۱۰/۷۹۵ |
| ۱۳ | γ -Terpinene | ۳/۳۵ | ۱۱/۲۳۶ |
| ۱۴ | trans-Sabinene hydrate | ۱/۳۱ | ۱۱/۵۹۱ |
| ۱۵ | cis-Linalool oxide | ۰/۱۷ | ۱۱/۸۱۲ |
| ۱۶ | α -Terpinolene | ۰/۷۵ | ۱۲/۵ |
| ۱۷ | Z- β -Terpineol | ۰/۲۳ | ۱۲/۹۵۲ |
| ۱۸ | Linalool | ۳/۱۱ | ۱۳/۱۵۲ |
| ۱۹ | Trans-2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methylethyl) | ۰/۴۱ | ۱۳/۹۸۹ |
| ۲۰ | cis-2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methylethyl) | ۰/۲۰ | ۱۴/۸۲۶ |
| ۲۱ | Camphor | ۱/۰۲ | ۱۴/۹۴۹ |
| ۲۲ | Nerol oxide | ۰/۱۰ | ۱۵/۵۱۹ |
| ۲۳ | Borneol | ۳/۶۷ | ۱۶/۰۴۸ |
| ۲۴ | 4-Terpineol | ۶/۸۳ | ۱۶/۶۳۴ |
| ۲۵ | α -Terpineol | ۷/۴۹ | ۱۷/۳۰۶ |

| ردیف | نام ترکیب | % | زمان بازداری (دقیقه) |
|------|-------------------------------|--------|----------------------|
| ۲۶ | Nerol | ۰/۹۸ | ۱۹/۱۲۴ |
| ۲۷ | Z-Citral | ۱/۵۱ | ۱۹/۷۷۱ |
| ۲۸ | Carvacrol methyl ether | ۰/۱۴ | ۱۹/۸۷۹ |
| ۲۹ | Geraniol | ۲۰/۶۲ | ۲۰/۹۵۸ |
| ۳۰ | 2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl- | ۲/۱۱ | ۲۱/۴۱۵ |
| ۳۱ | Borneol, acetate | ۰/۵۱ | ۲۱/۹۸ |
| ۳۲ | Thymol | ۵/۳۹ | ۲۲/۶۵۲ |
| ۳۳ | Geraniol formate | ۰/۱۰ | ۲۲/۸۲۷ |
| ۳۴ | Carvacrol | ۱۸/۱۷ | ۲۳/۱۹۷ |
| ۳۵ | Alloocimene | ۰/۱۷ | ۲۴/۸۳۵ |
| ۳۶ | Eugenol | ۰/۰۹ | ۲۵/۲۳۵ |
| ۳۷ | Copaene | ۰/۰۸ | ۲۵/۷۹ |
| ۳۸ | β -Bourbonene | ۰/۷۰ | ۲۵/۱۳۹ |
| ۳۹ | Geranyl acetate | ۲/۰۷ | ۲۶/۳۰۳ |
| ۴۰ | trans-Caryophyllene | ۲/۵۹ | ۲۷/۴۷۴ |
| ۴۱ | β -Cubebene | ۰/۱۳ | ۲۷/۸۱۸ |
| ۴۲ | α -Humulene | ۰/۱۱ | ۲۸/۶۹۱ |
| ۴۳ | γ -Muurolene | ۰/۰۹ | ۲۹/۵۵۴ |
| ۴۴ | Germacrene-D | ۱/۶۱ | ۲۹/۶۹۳ |
| ۴۵ | Bicyclogermacrene | ۰/۲۳ | ۳۰/۲۰۶ |
| ۴۶ | β -Bisabolene | ۰/۳۸ | ۳۰/۶۶۸ |
| ۴۷ | γ -Cadinene | ۰/۴۲ | ۳۰/۸۱۲ |
| ۴۸ | Δ -Cadinene | ۰/۳۸ | ۳۱/۱۳۶ |
| ۴۹ | cis- α -Bisabolene | ۱/۶۰ | ۳۱/۷۹۳ |
| ۵۰ | Geraniol butyrate | ۰/۴۲ | ۳۲/۳۶۸ |
| ۵۱ | (+) spathulenol | ۰/۲۱ | ۳۲/۸۸۲ |
| ۵۲ | (-)-Caryophyllene oxide | ۱/۹۶ | ۳۲/۰۲۶ |
| ۵۳ | Geranyl butyrate | ۰/۴۹ | ۳۲/۶۶۳ |
| ۵۴ | Camphene | ۰/۱۳ | ۳۳/۸۲۷ |
| | | ٪۹۹/۴۱ | |

بطور کلی بین شمارش کلی باکتری‌ها در تیمار مرغ پوشش داده شده با کیتوزان به تنهایی نسبت به نمونه شاهد از روز ۵ به بعد تفاوت معنی‌دار مشاهده گردید ($P < 0/05$). نتایج شمارش باکتری‌های سرماگرا در تیمارهای مختلف در طی نگهداری در دمای یخچالی در طی ۱۲ روز در نمودار ۲ مشاهده می‌شود. بر اساس نتایج مطالعه حاضر، در تمامی تیمارها به جز تیمار مربوط به کیتوزان حاوی ۱ درصد اسانس میزان باکتری‌های سرماگرا، در طی روزهای آزمون افزایش پیدا کرد. شمارش باکتری‌های سرماگرا بین گروه کنترل و تیمار مرغ پوشش داده شده با کیتوزان بدون اسانس کاکوتی کوهی (۰ درصد) در تمامی روزها، به جز روز ۹ تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشتند ($P > 0/05$). همچنین، افزایش غلظت اسانس کاکوتی کوهی، باعث کاهش معنی‌دار در روند

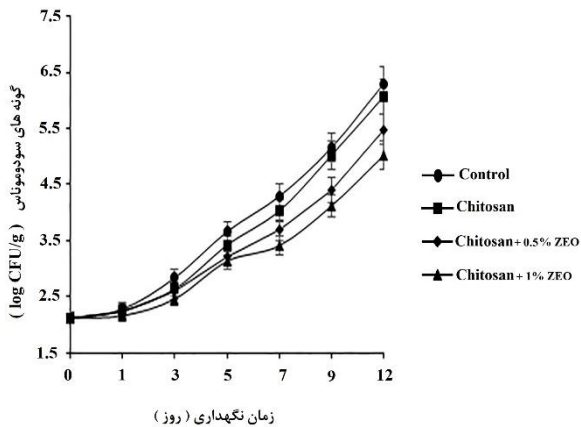
بررسی میکروبی نمونه‌های فیله مرغ: نتایج شمارش کلی

باکتری‌ها در نمونه‌های کنترل و پوشش داده شده با کیتوزان حاوی غلظت‌های مختلف اسانس کاکوتی کوهی طی ۱۲ روز در دمای یخچالی در نمودار ۱ نشان داده شده است. بر این اساس، در تمامی روزهای مطالعه، شمارش کلی باکتری‌ها، در تمامی تیمارها (به جز روز ۱ در رابطه با تیمار مرغ پوشش داده شده با کیتوزان حاوی ۱ درصد اسانس کاکوتی کوهی) افزایش یافت. بطوری که در روز پایانی مطالعه این افزایش از $4/08 \log \text{CFU/g}$ به $8/33 \log \text{CFU/g}$ و $7/64 \log \text{CFU/g}$ و $7/20 \log \text{CFU/g}$ به ترتیب در تیمارهای مرغ شاهد، پوشش داده شده با کیتوزان به تنهایی، کیتوزان حاوی ۰/۵ درصد اسانس و کیتوزان حاوی ۱ درصد اسانس منجر گردید.

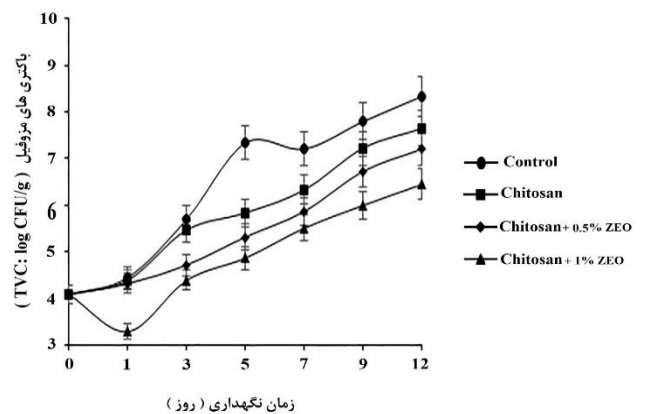


نمودار ۳. اثرات پوشش ضد میکروبی کیتوزان حاوی غلظت‌های مختلف اسانس کاکوتی کوهی (ZEO) روی جمعیت باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه در فیله مرغ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

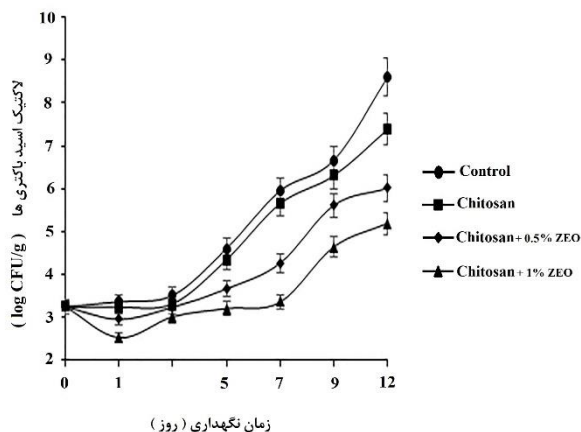
افزایش شمارش باکتری‌های سرماگرا گردید و این افزایش غلظت تا ۱ درصد باعث اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل شد ($P < 0.05$). همانگونه که مشاهده می‌شود (نمودار ۳)، در تمامی روزها، شمارش باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه، در تیمارهای حاوی اسانس به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.05$). همچنین، شمارش این دسته از باکتری‌ها در تیمار کیتوزان حاوی یک٪ اسانس نسبت به سایر تیمارها بصورت معنی‌داری پایین‌تر بود ($P < 0.05$). در مورد روند افزایشی در تعداد سودوموناس (نمودار ۴)، در تیمارهای مرغ پوشش داده شده با کیتوزان حاوی اسانس تا روز ۳ تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل و گروه تیمار ۵ و گروه تیمار فاقد اسانس نداشت و تفاوت معنی‌دار از روز ۵ به بعد مشاهده گردید ($P < 0.05$). در نمودار ۵، شمارش باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود شمارش باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک در نمونه‌های حاوی اسانس بصورت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل پایینتر بود ($P < 0.05$).



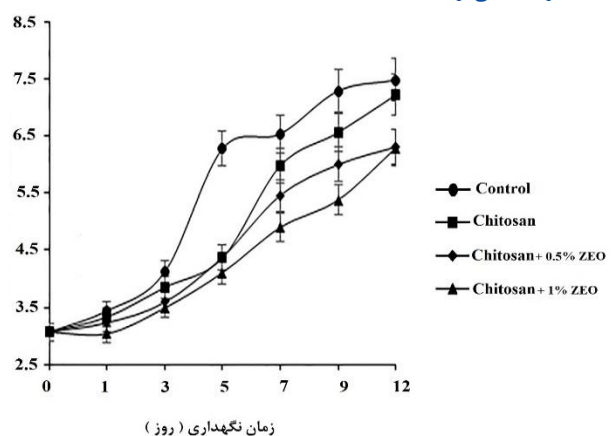
نمودار ۴. اثرات پوشش ضد میکروبی کیتوزان حاوی غلظت‌های مختلف اسانس کاکوتی کوهی (ZEO) روی جمعیت گونه سودوموناس در فیله مرغ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد



نمودار ۱. اثرات پوشش ضد میکروبی کیتوزان حاوی غلظت‌های مختلف اسانس کاکوتی کوهی (ZEO) روی جمعیت باکتری‌های مزوفیل هوازی در فیله مرغ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد



نمودار ۵. اثرات پوشش ضد میکروبی کیتوزان حاوی غلظت‌های مختلف اسانس کاکوتی کوهی (ZEO) روی جمعیت باکتری‌های مولد اسید لاکتیک در فیله مرغ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

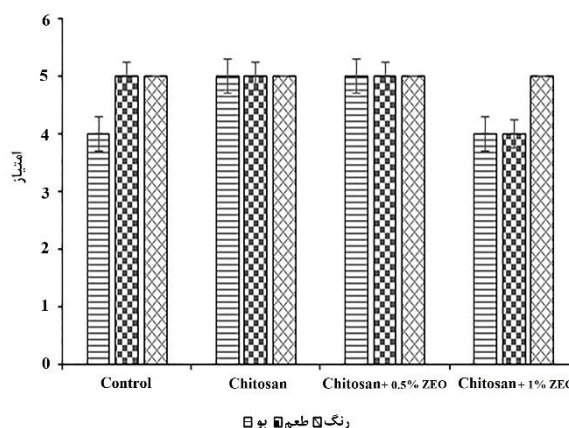


نمودار ۲. اثرات پوشش ضد میکروبی کیتوزان حاوی غلظت‌های مختلف اسانس کاکوتی کوهی (ZEO) روی جمعیت باکتری‌های سرماگرا در فیله مرغ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

در مطالعات مختلف بعضاً متفاوت است (۲). مطالعات محدودی اثر ضد میکروبی اسانس گیاه کاکوتی را در شرایط آزمایشگاهی و مدل غذایی بررسی کرده‌اند. Mehraban و همکاران (۲۰۰۷)، تاثیر اسانس و عصاره کاکوتی کوهی را بر فعالیت باکتری‌های آغازگر ماست بررسی کردند. نتایج این پژوهش نشان داد که تعداد باکتری‌های آغازگر در همه نمونه‌های ماست در طول نگهداری کاهش معناداری داشت. زنده‌مانی باکتری‌های آغازگر در ماست‌های حاوی اسانس کاکوتی کوهی در سطح $P < 0.05$ با نمونه‌های شاهد اختلاف معناداری نداشت. زنده‌مانی باکتری‌های آغازگر در بالاترین غلظت عصاره کاکوتی (۴۰۰۰ میکروگرم در لیتر) از روز هفدهم به بعد کاهش معناداری ($P < 0.05$) نشان داد (۱۳). Shahbazi و همکاران در سال ۲۰۱۶، اثر این اسانس را به همراه نایسین در افزایش مدت زمان ماندگاری گوشت چرخ کرده گاو در دمای یخچال بررسی و نشان دادند که استفاده غلظت ۰/۱ درصد و ۰/۲ درصد اسانس کاکوتی کوهی باعث مهار کامل رشد باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه، اشیریشیا کلی O157:H7 و استافیلوکوکوس اورئوس پس از ۷ روز نگهداری در دمای یخچال می‌شود (۲۳). همچنین، این محققین نشان دادند در حین نگهداری سوپ جو تجاری در مدت ۷ روز در دمای یخچال به صورت کامل باکتری باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتیلیس، سالمونلا تیفی موربوم و اشیریشیا کلی O157:H7 حذف می‌شوند (۲۲).

برخی از مطالعات از فیلم کیتوزان حاوی اسانس و عصاره‌های مختلف به منظور افزایش مدت زمان نگهداری گوشت مرغ استفاده کرده‌اند. فیلم کیتوزان حاوی پلی فنول چای در پتی‌های گوشت خوک در تحقیق Qin و همکاران (۲۰۱۳) باعث کاهش pH نهایی در زمان نگهداری نسبت به گروه کنترل و با تاخیر در افزایش TBARS پایداری لیبیدها را منجر شد و رشد میکروبی نیز کاهش یافت. در مجموع، با توجه به نتایج حاصل و بررسی‌های ارگانولپتیک به این نتیجه رسیدند که ماندگاری محصول ۶ روز افزایش می‌یابد (۱۸). Fernandez و همکاران (۲۰۱۳) خصوصیات میکروبی فیلدهای ماهی بسته‌بندی شده در شرایط هوازی و خلأ با استفاده از فیلم‌های کیتوزان مطالعه نمودند. اثر مهار معناداری در برابر مزوفیل‌های هوازی، لیستریا مونوسایتوزنز، لاکتیک اسید باکتری‌ها، سودوموناس‌ها، باکتری‌های تولیدکننده سولفید هیدروژن و انتروباکتریاسه مشاهده شد و فاز تأخیری رشد باکتری‌ها نیز افزایش یافت (۴). در مطالعه خنجری و همکاران (۲۰۱۳) بر روی بسته‌بندی گوشت فیله مرغ با استفاده از پوشش O,N-کرکوبکسی متیل کیتوزان و اسانس پونه کوهی جهت افزایش ماندگاری و بررسی لیستریا مونوسایتوزنز، نمونه‌ها در شرایط هوازی بسته‌بندی و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا ۱۴ روز نگهداری

نتایج ارزیابی حسی: همانطور که در نمودار شماره ۶ مشاهده می‌شود امتیازات داده شده از طرف ارزیاب‌ها به بوی فیلدهای مرغ پوشش داده‌شده با کیتوزان به تنهایی و کیتوزان حاوی ۰/۵ درصد اسانس کاکوتی کوهی نسبت به گروه کنترل و گروه پوشش داده شده با کیتوزان حاوی ۱ درصد اسانس بصورت معنی‌داری بالاتر بود ($P < 0.05$) در حالیکه از نظر رنگ تفاوت معنی‌داری بین هیچ یک از تیمارها مشاهده نگردید ($P > 0.05$)



نمودار ۶. اثرات پوشش ضد میکروبی کیتوزان حاوی غلظت‌های مختلف اسانس کاکوتی کوهی (ZEO) روی خواص حسی (طعم، بو و رنگ) در فیله مرغ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

بحث

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد، با استفاده از پوشش ضد میکروبی کیتوزان حاوی غلظت‌های مختلف اسانس کاکوتی کوهی می‌توان مدت زمان ماندگاری فیله مرغ را حداقل تا ۱۲ روز افزایش داد. همچنین همانطور که در نمودارهای ۱-۵ نشان داده شده است میزان تاثیر اثرات ضد میکروبی پوشش کیتوزان وابسته به غلظت اسانس بود بطوریکه با افزایش میزان غلظت میزان خواص ضد میکروبی نیز افزایش یافت.

مطالعات قبلی نیز نشان داده‌اند که میزان تاثیر اثر اسانس‌های مختلف وابسته به غلظت می‌باشد بطوریکه در غلظت‌های پایین ترکیبات فنولی با تاثیر بر روی فعالیت آنزیمی به خصوص آنزیم‌های مرتبط با تولید انرژی عمل نموده، در حالی که در غلظت‌های بالا، این ترکیبات باعث دناتوراسیون پروتئین‌ها نیز می‌شوند (۱۲، ۱۱). بطور کلی، اثرات ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی بستگی به روش اسانس‌گیری، فاز رشد و میزان باکتری، نوع محیط کشت مورد استفاده، عوامل خارجی و داخلی مواد غذایی نظیر pH، چربی، پروتئین، آب، آنتی‌اکسیدان‌ها، مدت زمان و دمای نگهداری، روش بسته‌بندی و ساختار فیزیکی مواد غذایی دارد، به همین دلیل نتایج به دست آمده

آمین آن و بار منفی غشای باکتری مرتبط می‌باشد. این امر منجر به اختلال در غشا و تراوش پروتئین‌های سلولی باکتری و الکترولیت می‌گردد. همچنین کیتوزان با جلوگیری از نفوذ اکسیژن به داخل ماده غذایی و شلاته کردن مواد مغذی رشد میکروارگانیسم‌ها را کاهش می‌دهد (۶).

در رابطه با نتایج حسی حاصله، در مطالعات صورت گرفته بر روی فیلم کیتوزان حاوی اسانس و عصاره‌های گیاهی مختلف مشخص شده که اسانس در غلظت ۰/۵ و ۱ درصد تاثیر معنی‌داری در کاهش میزان مقبولیت نمونه‌های غذایی نداشته و حتی در بسیاری از موارد موجب بهبود کلی رنگ، طعم و بوی ماده غذایی شده‌اند در مطالعه Shavisi و همکاران ۲۰۱۷ بر روی اثر فیلم پلی لاکتیک اسید حاوی اسانس کاکوتی کوهی بر روی ویژگی‌های حسی گوشت چرخ کرده گاو مشخص گردید که فیلم پلی لاکتیک اسید حاوی غلظت ۲٪ اسانس کاکوتی کوهی بالاترین امتیاز را در رابطه با خصوصیات حسی دریافت کرد از دلایل تفاوت در نتایج خصوصیات حسی این مطالعه با مطالعه مذکور می‌توان به نحوه استفاده از اسانس اشاره نمود که در مطالعه شایسی و همکاران در داخل فیلم اسانس وجود داشت در حالیکه در این مطالعه اسانس در داخل پوشش وارد شده بود و لذا اثر اسانس بر روی خصوصیات حسی فیله مرغ مشخص تر بود (۲۱).

نتیجه گیری نهایی: بر طبق نتایج این مطالعه مشخص گردید استفاده از پوشش کیتوزان حاوی ۰/۵ درصد و ۱ درصد اسانس کاکوتی کوهی زمان ماندگاری گوشت مرغ را به مدت ۷ روز نسبت به گوشت های مرغ فاقد پوشش افزایش می‌دهد. لذا در صورت تولید آن بصورت صنعتی می‌توان از پوشش های مذکور در صنایع گوشتی بهره برد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

شدند. تعداد کل باکتری‌ها در نمونه‌های شاهد از روز ۶ و نمونه‌های تیمار شده با اسانس پونه کوهی از روز ۱۰ به بعد از $7 \log \text{CFU/g}$ تجاوز کرد. شمارش کلی در نمونه های تیمار شده با کیتوزان و اسانس پونه کوهی تا انتهای مطالعه به این حد نرسید و نیز در مورد لیستریا مونوسایتوزنز با دوز تلقیح اولیه 10^5 و 10^3 بعد از روز ۴ و ۲ به ترتیب یافت نشد (۱۱).

بطور کلی، نتایج حاصل از تاثیر استفاده از فیلم کیتوزان در کنترل فساد میکروبی و همچنین رشد عوامل بیماریزا در گوشت مرغ، و سایر مدل‌های غذایی متفاوت است. فیلم کیتوزان در برخی از مطالعات اثر مهاری داشته، در حالی که در برخی از مطالعات دیگر باعث کاهش مختصر در شمارش تعداد باکتری شده است (۱۸، ۱۵، ۴، ۶) این تفاوت‌ها برگرفته از نوع ماده غذایی، نوع باکتری، روش تهیه کیتوزان، وزن مولکولی آن، میزان دی استیله شدن و حتی نوع روش تلقیح باکتری در ماده غذایی دارد. بطور مثال نشان داده شده است کیتوزان حل شده در اسید استیک نسبت به کیتوزان حل شده در اسیدلاکتیک اثرات ضد میکروبی بالاتری دارد. یا برای مثال اثبات شده است که گروه‌های آمینی کیتوزان شرایط لازم برای اتصال کیتوزان به ترکیبات زیستی دارای بار منفی همچون پروتئین و اسیدهای چرب می‌گردد. این حالت باعث ایجاد کمپلکس بین گوشت و کیتوزان می‌گردد. تشکیل این کمپلکس ممکن است باعث کاهش تداخلات بین کیتوزان و میکروارگانیسم‌ها شده و در نتیجه خصوصیات ضد میکروبی آن کاهش یابد (۱۶). از طرف دیگر اثر بخشی فیلم کیتوزان به میزان دوز تلقیح باکتری نیز بستگی دارد که نباید آن را نادیده گرفت. در واقع، مهمترین فاکتور در اثربخشی نوع میکروارگانیسم مورد مطالعه می‌باشد. ترتیب قدرت مهار رشد کیتوزان، به ترتیب برای قارچ‌ها، جلبک‌ها و باکتری‌ها است. باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت حساسیت بیشتری نسبت به کیتوزان از خود نشان می‌دهند. ثابت شده است که در گرم مثبت‌ها، گونه‌های لاکتوباسیلوس بیشترین مقاومت را دارا هستند (۲۱، ۲۰، ۱۱). بطور کلی مکانیسم اصلی تاثیر کیتوزان با تشکیل کمپلکس بین گروه

References

- Chitsaz, M., Pargar, A., Naseri, M., Bazargan, M., Kamalinezhad, M., Mansouri, S., Ansari, F (2007). Essential oil composition and antibacterial activity of *Ziziphora clinopodioides* (Lam) on selected bacteria. *Daneshvar J*, 14(68), 15-22.
- Dehghan, Z., Emami, S. M., Sefidkon, F. (2014). Chemical composition of the essential oils *Ziziphora clinopodioides* collected from Tuyserkan (Hamadan), Iran. *J Herb Drugs*, 5(3), 165-167.
- Elgadir, M. A., Uddin, M. S., Ferdosh, S., Adam, A., Chowdhury, A. J. K., Sarker, M. Z. I. (2015). Impact of chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on various drug delivery systems: A review. *J Food Drug Anal*, 23(4), 619-629. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.10.008>
- Fernández-Saiz, P., Sánchez, G., Soler, C., Lagaron, J. M., Ocío, M. J. (2013). Chitosan films for the microbiological preservation of

- refrigerated sole and hake fillets. *Food Control*, 34(1), 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.03.047>
5. Goetz, L., Mathew, A., Oksman, K., Gatenholm, P., Ragauskas, A.J. (2009). A novel nanocomposite film prepared from cross linked cellulosic whiskers. *Carbohydr Polym*, 75(1), 85-89. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.06.017>
 6. Gómez-Estaca, J., De Lacey, A. L., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Montero, P. (2010). Biodegradable gelatin–chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food microbiol*, 27(7), 889-896. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.012>
 7. Gómez-Estaca, J., Giménez, B., Montero, P., Gómez-Guillén, M. C. (2009). Incorporation of antioxidant borage extract into edible films based on sole skin gelatin or a commercial fish gelatin. *J Food Eng*, 92(1), 78-85. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.10.024>
 8. Guo, M., Jin, T. Z., Wang, L., Scullen, O. J., Sommers, C. H. (2014). Antimicrobial films and coatings for inactivation of *Listeria innocua* on ready-to-eat deli turkey meat. *Food control*, 40, 64-70. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.11.018>
 9. Jayakumar, R., Chennazhi, K.P., Muzzarelli, R. A.A., Tamura, H., Nair, S.V., Selvamurugan, N. (2010). Chitosan conjugated DNA nanoparticles in gene therapy. *Carbohydr Polym*, 79(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.08.026>
 10. Jouki, M., Yazdi, F.T., Mortazavi, S.A., Koocheki, A., Khazaei, N. (2014). 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*, 174, 88-97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.01.001>
 11. Khanjari, A., Karabagias, I. K., Kontominas, M. G. (2013). Combined effect of N, O-carboxymethyl chitosan and oregano essential oil to extend shelf life and control *Listeria monocytogenes* in raw chicken meat fillets. *LWT-Food Sci Technol*, 53(1), 94-99. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.02.012>
 12. Lv, F., Liang, H., Yuan, Q., Li, C. (2011). In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Res Int*, 44(9), 3057-3064. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.07.030>
 13. Mehraban, S. M., Karazhyan, R., Hadad, K. M., Habibi, N. M., Beiraghi, T. S. (2007). Effect of essential oil and extract of *Ziziphora clinopodioides* on yoghurt starter culture activity. *Iranian J Food Sci Technol*, 3(4), 47-55.
 14. Moradi, M., Tajik, H., Rohani, S. M. R., Oromiehie, A. R., Malekinejad, H., Aliakbarlu, J., Hadian, M. (2012). Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. *LWT-Food Sci Technol*, 46(2), 477-484. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.11.020>
 15. Nowzari, F., Shábanpour, B., Ojagh, S. M. (2013). Comparison of chitosan–gelatin composite and bilayer coating and film effect on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chem*, 141(3), 1667-1672. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.022>
 16. 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 Chem*, 120(1), 193-198. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.006>
 17. Petrou, S., Tsiraki, M., Giatrakou, V., Savvaidis, I. N. (2012). Chitosan dipping or oregano oil treatments, singly or combined on modified atmosphere packaged chicken breast meat. *Int J Food Microbiol*, 156(3), 264-271. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.002>
 18. Qin, Y. Y., Yang, J. Y., Lu, H. B., Wang, S. S., Yang, J., Yang, X. C., Lin, L., Cao, J. X. (2013). Effect of chitosan film incorporated with tea polyphenol on quality and shelf life of pork meat patties. *Int J Biol Macromolec*, 61, 312-316. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.07.018>
 19. Salehi, P., Sonboli, A., Eftekhari, F., Nejad-Ebrahimi, S., Yousefzadi, M. (2005). Essential Oil Composition, Antibacterial and Antioxidant Activity of the Oil and Various Extracts of *Ziziphora clinopodioides* subsp. *rigida* (Boiss.) Rech. from Iran. *Biol Pharm Bull*, 28(10), 1892-1896. <https://doi.org/10.1248/bpb.28.1892>
 20. Shahbazi, Y., Shavisi, N. (2016). Interactions of *Ziziphora clinopodioides* and *Mentha spicata* essential oils with chitosan and ciprofloxacin against common food-related pathogens. *LWT-Food Sci Technol*, 71, 364-369. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.011>
 21. Shavisi, N., Khanjari, A., Basti, A. A., Misaghi, A., Shahbazi, Y. (2017). Effect of PLA films containing propolis ethanolic extract, cellulose nanoparticle and *Ziziphora clinopodioides* essential oil on chemical, microbial and sensory properties of minced beef. *Meat Sci*, 124, 95-104. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.10.015>
 22. Shahbazi, Y., Shavisi, N., Mohebi, E. (2016). Potential application of *Ziziphora clinopodioides* essential oil and nisin as natural preservatives against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli* O157:H7 in commercial barley soup. *J Food Saf*, 36(4), 435-441. <https://doi.org/10.1111/jfs.12257>
 23. Shahbazi, Y., Shavisi, N., Mohebi, E. (2016). Effects of *Ziziphora clinopodioides* essential oil and nisin, both separately and in combination, to extend shelf life and control *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in raw beef patty during refrigerated storage. *J Food Saf*, 36(2), 227-236. <https://doi.org/10.1111/jfs.12235>
 24. Sonboli, A., Atri, M., Shafiei, S. (2010). Intraspecific variability of the essential oil of *Ziziphora clinopodioides* ssp. *rigida* from Iran. *Chem Biodivers*, 7(7), 1784-1789. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200900336>
 25. Volpe, M. G., Siano, F., Paolucci, M., Sacco, A., Sorrentino, A., Malinconico, M., Varricchio, E. (2015). Active edible coating effectiveness in shelf-life enhancement of trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. *LWT-Food Sci Technol*, 60(1), 615-622. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.08.048>