Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Food Processing and Preservation

Print ISSN: 2322 - 2069
Online ISSN: 2322 - 2794

Iranian Association of Food Scientists and Technologists

Investigation of Chemical Composition and Anti-Listeria Properties of *Zataria multiflora* Boiss Essential Oil, and its Application with Nisin in Chitosan Nano- Coating in Chicken Fillet

Hamidreza Kazemeini[1*] | Bahare Naeiji[2] | Mohammad Hassan Shahavi[3]

[1]Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies (AUSMT), Amol, Iran, Email: h.kazemeini@ausmt.ac.ir
[2]Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies (AUSMT), Amol, Iran
[3]Assistant professor, Department of Nanotechnology, Faculty of Engineering Modern Technologies, Amol University of Special Modern Technologies (AUSMT), Amol, Iran

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received: 17.10.2020
Revised: 26.05.2021
Accepted: 08.07.2021

Keywords:
Nanotechnology
Chitosan
Listeria monocytogenes
Zataria Multiflora
Boiss
Nisin

ABSTRACT

Background and objectives: Nowadays, the interest in using food coatings and films containing bacteriocins and plant essential oils has been increased due to the factors such as environmental concerns of synthetic packaging materials, the need for new methods and opportunities to create new markets for food products, enhancing shelf life of products, and the tendency of consumers to use natural materials. Nanotechnology can increase the efficiency of edible coatings by reducing particle size, smaller pore sizes, and improving the quality of packaging materials. The high ability of chitosan to form a film has made it possible to be used as a suitable food coating. Essential oils with antibacterial properties can be used to enhance the antibacterial properties of chitosan. Also, foodborne illness has always been one of the most important human concerns, and therefore the present study was conducted to investigate how to reduce these risks.The objective of this study was to investigate the chemical composition of *Zataria multiflora* Boiss essential oil (ZEO), and its application with nisin in Nano-emulsion of chitosan-based coatings against *Listeria monocytogenes* in chicken fillets kept at cold temperatures (4±1°C) during 16-days period.

Materials and methods: The chemical composition of the ZEO was determined using gas chromatography. The antibacterial activity of ZEO (as emulsion and Nano-emulsion) against the studied bacterium was evaluated by determining MIC and MBC. The treatments were divided into six groups: without coating (control), chitosan, nano-chitosan, nano-chitosan containing ZEO, nano-chitosan + nisin, and nano-chitosan + ZEO + nisin. The samples were then transferred to the refrigerator, and the cell counts were measured on days 0, 2, 4, 8, 12, 16.

Results: Carvacrol (44.36%), thymol (30.14%) and gamma-terpinene (8.31%) were identified as the major compounds in ZEO. Significant difference was found among the bacteria cell counts in the 16-days period ($P < 0.05$). The results showed that the highest inhibitory effect on *L. monosytogenes* was related to the sample with nano-emulsion containing nisin and ZEO.

Conclusion: The results of this study showed that nano-emulsion of chitosan edible coating is effectively capable of inhibiting the growth of pathogenic *L.*

monocytogenes in chicken fillet samples at cold temperatures, and its application in the food industry is recommended.

Cite this article: Kazemeini, H.R., Naeiji, B., Shahavi, M.H. 2022. Investigation of Chemical Composition and Anti-Listeria Properties of *Zataria multiflora* Boiss Essential Oil, and its Application with Nisin in Chitosan Nano- Coating in Chicken Fillet. *Journal of Food Processing and Preservation*, 13 (4), 113-128.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/EJFPP.2021.18470.1640
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

فرآوری و نگهداری مواد غذایی
شاپا چاپی: ۳۵۴۴-۲۴۲۳
شاپا الکترونیکی: ۳۸۰۳-۲۴۲۳

بررسی ترکیب شیمیایی و خاصیت ضد لیستریایی اسانس آویشن شیرازی و کاربرد آن با نایسین در نانوپوشش کیتوزان در فیله مرغ

حمیدرضا کاظمینی[1*] | بهاره نائیجی[2] | محمد حسن شاهوی[3]

۱. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران، رایانامه: h.kazemeini@ausmt.ac.ir
۲. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران
۳. گروه فناوری نانو، دانشکده مهندسی فناوری‌های نوین، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۲۶
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۰۳/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۱۷

واژه‌های کلیدی:
نانوتکنولوژی
کیتوزان
لیستریا مونوسیتوژنز
آویشن
نایسین

چکیده

سابقه و هدف: امروزه علاقه‌مندی برای استفاده از پوشش‌ها و فیلم‌های خوراکی حاوی باکتریوسین‌ها و اسانس‌های گیاهی، به‌دلیل وجود مسائلی مانند نگرانی‌های زیست محیطی مصرف مواد بسته‌بندی سنتزی، نیاز به روش‌هایی جدید و فرصت‌هایی برای ایجاد بازارهای جدید مصرف محصولات، افزایش عمر نگهداری فرآورده‌های غذایی و گرایش مصرف کنندگان به مصرف مواد طبیعی در حال گسترش است. فناوری نانو در پوشش‌های خوراکی می‌تواند به واسطه کاهش اندازه ذرات و کوچک تر کردن منافذ پوشش‌ها باعث افزایش کارایی آن‌ها در مقایسه با پوشش‌های خوراکی معمولی شود و ارتقای کیفی مواد بسته‌بندی را به دنبال داشته باشد. توانایی بالای کیتوزان در تشکیل فیلم امکان استفاده از آن را به عنوان یک پوشش غذایی مناسب فراهم نموده است. برای تقویت خواص ضد باکتریایی کیتوزان می‌توان از اسانس‌های دارای خواص ضد باکتریایی استفاده نمود. بیماری‌های غذا زاد نیز همواره از مهم‌ترین دغدغه‌های بشر بوده و مطالعه حاضر به منظور بررسی روشی برای کاهش این خطرات انجام شده است. هدف از این مطالعه بررسی ترکیب شیمیایی اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss) و کاربرد آن به‌همراه نایسین در پوشش پایه نانوامولسیون کیتوزان جهت کنترل رشد باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* تلقیح شده در فیله مرغ طی یک دوره ۱۶ روزه نگهداری شده در دمای سرد (۱±۴ درجه سانتی‌گراد) بود.

مواد و روش‌ها: فعالیت ضد لیستریایی اسانس گیاه آویشن شیرازی با استفاده از روش میکرودایلوشن برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) تعیین گردید. ترکیب شیمیایی اسانس با روش کروماتوگرافی گازی تعیین و تیمارها در شش گروه: فاقد پوشش (کنترل)، کیتوزان، نانوامولسیون کیتوزان، نانوامولسیون کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی، نانوامولسیون کیتوزان + نایسین، نانوامولسیون کیتوزان + اسانس آویشن شیرازی + نایسین تقسیم شدند، سپس نمونه‌ها جهت شمارش باکتریایی در روزهای ۰، ۲، ۴، ۸، ۱۲ و ۱۶ به یخچال منتقل شدند.

یافته‌ها: کارواکرول (۳۶/۴۴ درصد)، تیمول (۱۴/۳۰ درصد) و گاماترپینن (۳۱/۸ درصد) به عنوان مهم‌ترین ترکیب شیمیایی اسانس آویشن شیرازی شناسایی شدند. میانگین لگاریتم تعداد باکتری شمارش شده در دوره ۱۶ روزه بین گروه‌ها اختلاف معنی داری نشان داد (P ۰/۰۵). نتایج نشان داد که بیشترین

اثر مهارکنندگی در برابر *لیستریا مونوسیتوژنز* مربوط به گروه نانوامولسیون کیتوزان حاوی نایسین و اسانس در مقایسه با گروه کنترل بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد پوشش‌های خوراکی نانوامولسیون کیتوزان به‌طور موثری توانایی مهار رشد باکتری پاتوژن *لیستریا مونوسیتوژنز* در نمونه‌های فیله‌ی مرغ در دمای سرد را دارند و استفاده از آن‌ها در صنعت غذا می‌تواند مورد توجه قرار گیرد.

استناد کاظمینی، ح.ر.، نائیجی، ب.، شاهوی، م.ح. (۱۴۰۰). بررسی ترکیب شیمیایی و خاصیت ضد لیستریایی اسانس آویشن شیرازی و کاربرد آن با نایسین در نانوپوشش کیتوزان در فیله مرغ. *فرآوری و نگهداری مواد غذایی*، ۱۳ (۴)، ۱۲۸-۱۱۳.

DOI:10.22069/EJFPP.2021.18470.1640

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

لیستریا مونوسیتوژن باکتری گرم مثبت، غیرهاگ‌زا، هوازی تا بی‌هوازی اختیاری و میله‌ای شکل است (۳۵،۵). لیستریا مونوسیتوژنز یک باکتری بیماری‌زای فرصت طلب است که باعث عفونت حادی به نام لیستریوزیس در حیوان و انسان می‌شود (۴۰). لیستریوزیس یکی از مهم‌ترین بیماری‌های باکتریایی مشترک بین انسان و دام می‌باشد که در اکثر موارد ناشی از محصولات غذایی آلوده است. در بیماری لیستریوزیس یک آنزیم سمی توسط باکتری تولید و سپس وارد خون می‌شود. این آنزیم سمی علائمی مشابه مننژیت و عفونت خون ایجاد می‌کند. معمولا افراد بزرگسال که از سیستم ایمنی سالمی برخوردارند، نسبت به این بیماری مقاوم هستند. اما نوزادان، سالمندان، کسانی که سیستم ایمنی آن‌ها توسط دارو تضعیف شده است و مادران باردار در معرض خطر هستند (۱۵، ۳۵). این باکتری از طریق غذاهای آلوده مانند پنیر، سبزی‌های خام، مرغ و ماهی به انسان منتقل می‌شود (۴۰). گوشت طیور یکی از منابع مهم پروتئینی در تغذیه انسان است. در کشور ما گوشت مرغ نسبت به سایر گوشت‌ها بیشترین مصرف را دارد (۸). از آن‌جایی که گوشت مرغ و ماهی در سبد غذایی مردم جایگاه ویژه‌ای دارد و از این دو، فرآورده‌های غذایی متنوع تولید می‌گردد، بنابراین آلودگی گوشت مرغ و ماهی و عدم رعایت اصول بهداشتی طی فراوری و تولید فرآورده‌های غذایی بر پایه مرغ و ماهی می‌تواند باعث ماندگاری و رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* گردد که این خود باعث انتقال راحت این ارگانیسم به انسان و در نهایت بروز اپیدمی‌های شدید در انسان می‌گردد (۱۷). امروزه علاقه‌مندی برای استفاده از پوشش‌ها و فیلم‌های خوراکی نظیر استفاده از باکتریوسین‌ها و اسانس‌های گیاهی، به‌دلیل وجود مسائلی مانند نگرانی‌های زیست محیطی مصرف مواد بسته‌بندی سنتزی، نیاز به روش‌هایی جدید و فرصت‌هایی برای ایجاد بازارهای جدید مصرف محصولات، افزایش عمر نگهداری فرآورده‌های غذایی و گرایش مصرف کنندگان به مصرف مواد طبیعی گسترش یافته است. این مواد برای کاهش و یا مهار رشد میکروارگانیسم‌ها در سطح غذا می‌توانند گسترش یابند (۱، ۱۶، ۲۱). توانایی بالای کیتوزان در تشکیل فیلم امکان استفاده از آن را به عنوان یک پوشش غذایی مناسب فراهم نموده است. برای تقویت خواص ضد باکتریایی کیتوزان می‌توان از اسانس‌های دارای خواص ضد باکتریایی استفاده نمود (۲۲، ۳۸، ۳۹). بنابراین از دیگر مواد با منشأ طبیعی که در راستای بهبود شرایط نگهداری در بعضی از مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند، اسانس‌های گیاهی هستند که در این میان اسانس آویشن شیرازی از اهمیت زیادی برخوردار است (۲۶). اسانس‌ها مایعات روغنی معطری هستند که از قسمت‌های مختلف گیاهان نظیر ریشه، دانه، برگ، جوانه، شاخه، پوست، غنچه و گل تهیه می‌شوند که به آن‌ها روغن‌های اتری، روغن‌های فرار و یا روغن‌های اسانسی هم می‌گویند. رایج ترین روش مورد استفاده برای تولید تجاری اسانس روش تقطیر با آب می‌باشد (۴). از برگ‌های خوش عطر آویشن شیرازی اغلب به عنوان ادویه یا دارو استفاده می‌شود. کارواکرول، تیمول، گاماترپینن و پاراسیمن ترکیبات موثره ضد میکروبی موجود در اسانس‌های گیاهی هستند که البته مقدار آن‌ها با توجه به منطقه کشت و واریته گیاه متفاوت می‌باشد (۶). نایسین یک باکتریوسین است که توسط گونه‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس* تولید می‌شود. نایسین به‌علت طبیعی و غیر سمی بودن، پایداری اسیدی و قابلیت انبارداری بسیارخوب، تغییر ندادن بو یا طعم غذا، قابلیت تجزیه توسط آنزیم‌های هضم کننده و عدم تاثیر بر فلور میکروبی روده، طیف وسیع

فعالیت‌های میکروبی و عدم سرطان‌زایی به‌عنوان یک نگهدارنده مطلوب در مواد غذایی مطرح است (۱۴، ۳۰). فناوری نانو در پوشش‌های خوراکی می‌تواند به‌واسطه کاهش اندازه ذرات و کوچک‌تر کردن منافذ پوشش‌ها باعث افزایش کارایی آن‌ها در مقایسه با پوشش‌های خوراکی معمولی شود و ارتقای کیفی مواد بسته‌بندی را به دنبال داشته باشد (۳، ۲۹). نانوامولسیون‌ها به‌دلیل اندازه ریز قطرات می‌توانند به صورت کاملاً یکنواخت بر روی سطحی که روی آن هستند پخش شوند و هم‌چنین می‌توانند عناصر فعال موجود در یک لایه محافظتی را به یکدیگر مرتبط کنند. تحقیقات انجام شده نشانگر این امر است که کاربرد پوشش‌های نانوامولسیون کیتوزان باعث افزایش ماندگاری در گوشت مرغ می‌شود (۳، ۲۰).

هدف از این پژوهش بررسی ترکیب شیمیایی و تأثیر پوشش نانوامولسیون کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی و نایسین بر روی رشد باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* تلقیح شده بر گوشت مرغ طی یک دوره ۱۶ روزه در شرایط نگهداری در دمای یخچال می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه: باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* (۱۹۱۱۵ NCTC) از گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی تهیه شد. کلیه محیط‌های کشت مورد استفاده در این مطالعه از شرکت مرک خریداری شدند. کیتوزان با وزن مولکولی کم (درجه دی استیلاسیون ۹۱ درصد) از شرکت سیگما آلدریچ (سنت لوئیس، ایالات متحده) خریداری و استفاده شد.

تهیه اسانس: گیاه تازه آویشن شیرازی از مرکز فروش گیاهان دارویی خریداری شد. جهت اسانس‌گیری مقدار ۵۰ گرم از گیاه خشک و پاک شده را با استفاده از آسیاب برقی خرد و گیاه پودر شده به داخل بالن ژوژه دستگاه اسانس‌گیری (کلونجر) ریخته و به آن ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. سپس جریان آب سرد مبرد برقرار شد و بالن ژوژه درون هیتر برقی دستگاه قرار گرفت. پس از آن اجازه داده شد به مدت چهار ساعت فرایند تقطیر انجام شود.

آنالیز اسانس‌ها: جهت آنالیز و شناسایی ترکیبات اسانس از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC-MS) ساخت کشور آمریکا مدل Agilent Technologies 7890A استفاده شد. اسانس در شرایط مشابه و یکسان به دستگاه تزریق شد تا نوع ترکیب‌های تشکیل دهنده آن‌ها مشخص شد (کل زمان اجرایی دستگاه ۶۰ دقیقه). پس از انجام تزریقات و به‌دست آوردن کروماتوگرام، شناسایی و تعیین مقدار هر یک از ترکیبات با استفاده از طیف جرمی آن‌ها انجام شد. تعیین نوع ماده ورودی به طیف سنج جرمی بر اساس داده‌های کتابخانه‌ای وایلی و هم‌چنین مطابق استاندارد ملی ایران با شماره ۵۶۹۳ تعیین گردید (۲۴).

تهیه و آماده سازی باکتری: جهت آماده سازی باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز*، در شرایط استریل و با استفاده از آنس استریل از سویه مرجع برداشته و بر روی پلیت حاوی محیط کشت اختصاصی کشت داده شد. پلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم‌خانه گذاری شد. جهت تهیه سوسپانسیون باکتری، از کلنی‌های حاصل از کشت ۲۴ ساعته توسط آنس استریل برداشته شد و به لوله‌های حاوی ۱۰ میلی‌لیتر BHI براث استریل انتقال داده شد و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای رسیدن به فاز لگاریتمی گرم‌خانه گذاری گردید. برای تنظیم تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر از دستگاه اسپکتروفتومتر از طریق کدورت سنجی برابر با ۰/۵ مک فارلند استفاده شد (میزان جذب نوری برابر با ۰/۱۴ تا ۰/۰۸ در طول موج ۶۰۰ نانومتر) و

تعداد تقریبی 1.5×10^{8} باکتری در هر میلی‌لیتر به دست آمد (۱۰).

تعیین MIC و MBC مقایسه‌ای: در این بخش از مطالعه، جهت تهیه نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی، از توئین ۸۰ به عنوان امولسی‌فایر استفاده شد. برای رسیدن به یک امولسیون پایدار، یکنواخت و شفاف عمل هم زدن هم به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد، سپس فرموله شدن امولسیون اسانس‌ها مطابق با پروتکل‌های پیشنهادی انجام شد. امولسیون با استفاده از دستگاه اولتراتوراکس به مدت ۳ دقیقه در ۳۰۰۰ دور بر دقیقه و به مدت ۶ دقیقه اولتراسوند (HF-power ۲۰۰ W، شرکت Bandelin آلمان) نانوامولسیون تهیه شد. اندازه گیری سایز ذرات هم با دستگاه Dynamic light scattering (DLS) انجام شد. سپس جهت انجام میکرودایلوشن اسانس آویشن شیرازی ۰/۰۳۲ میلی گرم توزین شد و در یک میلی‌لیتر DMSO حل گردید تا غلظت ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسانس ایجاد شود. از غلظت ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسانس ۰/۵ میلی‌لیتر برداشته و درون یک میکروتیوب استریل حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر BHI براث استریل ریخته شد که غلظت ۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسانس ایجاد گردید. رقت سازی تا رسیدن به غلظت ۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسانس انجام شد. در این روش قبل از هر رقت سازی میکروتیوب حاوی اسانس ورتکس گردید (۱۹). سپس در ۳ تکرار برای یک سویه باکتری، در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای (استریل) میکرودایلوشن انجام شد؛ به این صورت که درون هر چاهک میکروپلیت ۱۶۰ میکرولیتر محیط کشت BHI براث استریل،۲۰ میکرولیتر از باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* با میزان 1.5×10^{7} واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر و ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف آویشن شیرازی ریخته شد تا به حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر رسید. میکروپلیت دارای ۸ ردیف می‌باشد که در هر ردیف از غلظت‌های مختلف اسانس از رقت‌های ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تا ۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد (۱۳، ۲۷). در این روش ۲ گروه کنترل نیز در نظر گرفته شد که شامل الف) ۱-۱۸۰ میکرولیتر BHI براث استریل و ۲۰ میکرولیتر از باکتری درون چاهک های میکروپلیت ریخته شد(کنترل مثبت) و ب) ۲- ۱۸۰ میکرولیتر BHI براث استریل و ۲۰ میکرولیتر اسانس درون چاهک‌های میکروپلیت ریخته(کنترل منفی) بودند. در مدت زمان کوتاهی میکروپلیت بسیار آهسته به صورت هشت لاتین روی سطح صاف تکان داده شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه گذاری شدند (۲۷،۱۳). MBC به‌عنوان کمترین غلظت اسانس که موجب نابودی ۹۹/۹ درصد از باکتری مورد نظر می‌گردد، تعریف می‌شود. بدین‌منظور از تمامی چاهک‌های با غلظت بالاتر و فاقد کدورت درهر کدام از میکروپلیت‌های استفاده شده، ۱۰ میکرولیتر توسط سمپلر برداشته شد و به صورت جداگانه در پلیت حاوی محیط کشت BHI آگار کشت داده شد. سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد و مورد بررسی قرار گرفت (۲۷،۱۳).

تهیه نمونه‌های گوشت مرغ وتلقیح باکتری‌ها: گوشت تازه مرغ از بازار روز خریداری و در ظرف پر از یخ به آزمایشگاه منتقل شد. خون و لجن نمونه‌های فیله مرغ با شستن برداشته و سپس خشک شد. جهت حذف فلور میکروبی نرمال، فیله‌های ۱۰ گرمی به مدت ۵-۳ دقیقه در محلول اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور شدند (۲۵، ۲۷). ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی با استفاده از سمپلر برداشته و بر روی نمونه‌های فیله مرغ ۱۰ گرمی تلقیح سطحی گردید تا به غلظت نهایی 1.5×10^{6} واحد تشکیل کلنی

بر میلی‌لیتر رسید و توسط لوله L شکل استریل پخش شد (۲۳).

تهیه پوشش نانوامولسیون کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی و نایسین: برای آماده سازی محلول کیتوزان ۲ درصد (وزنی/وزنی) در اسید استیک، کیتوزان در محلول آبی اسید استیک یک درصد مخلوط و برای ۱۰ دقیقه هم زده شد. پس از حل شدن کامل کیتوزان، pH محلول با محلول سود ۱ نرمال به ۵/۹ رسید (۳۴). به‌منظور تهیه محلول نایسین ابتدا محلول اسیدکلریدریک ۰/۰۲ مولار تهیه گردید، سپس نایسین بر اساس فرمول ارایه شده در این محلول حل و آماده شد (۵۰۰ میلی‌گرم پودر نایسین در ۵۰ میلی لیتر اسید آماده شده) (۳۷). سپس اسانس آویشن شیرازی یک درصد و نایسین ۲۰۰ واحد بین الملل به محلول کیتوزان اضافه شد. محلول نانوامولسیون با استفاده از روش اولتراسوند با انرژی بالا تهیه شد. به‌این منظور پس از آماده سازی محلول کیتوزان دو درصد، با استفاده از دستگاه اولتراتوراکس به‌مدت ۳ دقیقه و به مدت ۶ دقیقه اولتراسوند (HF-power W ۲۰۰، شرکت Bandelin آلمان) نانوامولسیون تهیه شد و سپس سایز ذرات با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری سایز ذرات DLS (Nano S، شرکت Malvern انگلستان) بررسی شد (۳۳).

تهیه تیمارهای مورد مطالعه: نمونه‌های تلقیح شده به شش گروه تقسیم شدند (جدول ۱) و سپس تحت تیمار قرار گرفتند. به‌منظور ایجاد پوشش نمونه‌ها به مدت یک دقیقه در محلول تهیه شده غوطه‌ور شدند. سپس فیله‌ها از محلول خارج شده و پس از اتمام چکیدن قطرات در زیپ پک‌های استریل به مدت ۱۶ روز در دمای یخچال ۱±۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سرانجام، تحلیل آماری در روزهای ۰، ۲، ۴، ۸، ۱۲ و ۱۶ انجام شد (۳۲).

جدول ۱ - تیمارهای مورد مطالعه در طول دوره نگهداری در یخچال

Table 1- Studied treatments during refrigerated storage

شماره Number	تیمارها Treatment	شرح Description
1	کنترل control	قطعات گوشت مرغ بدون پوشش کیتوزان Pieces of chicken meat without chitosan coating
2	کیتوزان chitosan	قطعات گوشت مرغ + پوشش کیتوزان ۲ (٪) Chicken pieces + 2(%) chitosan coating
3	نانوکیتوزان Nano-chitosan	قطعات گوشت مرغ + پوشش نانوکیتوزان۲ (٪) Chicken pieces + 2 (%) Nano-chitosan coating
4	نانوکیتوزان+اسانس آویشن شیرازی Nano-chitosan + *Zataria multiflora* Boiss Essential Oil	قطعات گوشت مرغ + پوشش نانوامولسیون کیتوزان ۲ (٪) + اسانس آویشن شیرازی ۱ (٪) Chicken meat pieces + 2(%) chitosan nanoemulsion coating + 1 (%) *Zataria multiflora* Boiss Essential Oil
5	نانوکیتوزان+نایسین Nano-chitosan + Nisin	قطعات گوشت مرغ + پوشش نانوامولسیون کیتوزان ۲ (٪) + نایسین ۲۰۰ (واحد بین الملل) Chicken meat pieces + 2 (%) chitosan nanoemulsion coating + nisin 200 (international units)
6	نانوکیتوزان+نایسین+اسانس آویشن شیرازی Nano-chitosan + nisin + *Zataria multiflora* Boiss Essential Oil	قطعات گوشت مرغ + پوشش نانوامولسیون کیتوزان۲ (٪) + اسانس آویشن شیرازی ۱ (٪) و نایسین ۲۰۰ واحد بین الملل Chicken meat pieces + 2 (%) chitosan nanoemulsion coating + 1 (%) *Zataria multiflora* Boiss Essential Oil and nisin 200 (international units)

شمارش باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز*: نمونه‌های مربوط به هر تیمار (درسه تکرار) در روزهای صفر (بلافاصله پس از تلقیح)، ۲، ۴، ۸، ۱۲و ۱۶ از یخچال خارج شدند. ابتدا نمونه‌های درون زیپ پک با ۹۰

میلی‌لیتر پپتون واتر استریل مخلوط گردید و در دستگاه بگ میکسر با دور ۷ به مدت ۳ دقیقه قرار داده شد تا سوسپانسیون هم‌گنی به دست آید (رقت $۱۰^{-۱}$). مقدار یک میلی‌لیتر از سطح رویی سوسپانسیون به کمک سمپلر برداشته و درون لوله آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر پپتون واتر استریل ریخته شد تا رقت $۱۰^{-۲}$ به دست آید. پس از رقت سازی متوالی از رقت‌های مورد نظر به روش کشت قطره‌ای در محیط کشت اختصاصی پالکام آگار کشت داده و پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد شمارش میکروبی انجام گرفت (۱۸، ۳۶).

آنالیز آماری: میانگین، انحراف معیار، مینیمم و ماکزیمم شمارش باکتری در هر گروه و در هریک از روزهای مطالعه گزارش شد. روند تغییرات لگاریتم تعداد باکتری در گروه‌های مختلف در دوره ۱۶ روزه توسط آزمون آماری Repeated measure ANOVA مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. مقایسه دو به دوی گروه‌ها توسط Bonferroni post hoc test انجام شد. کلیه آنالیزهای آماری توسط نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد و مقادیر P ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی گردید.

نتایج و بحث

آنالیز اسانس آویشن شیرازی: همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود کارواکرول با ۴۴/۳۶ درصد، تیمول با ۳۰/۱۴ درصد و گاماترپینن با ۸/۳۱ درصد به‌ترتیب مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه آویشن شیرازی را تشکیل می‌دهند. در مطالعه ساجد و همکاران (۲۰۱۵) پیرامون ترکیب شیمیایی اسانس آویشن شیرازی، تیمول و کارواکرول به عنوان مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی این اسانس گزارش شدند که این ترکیبات موجب بی‌ثباتی غشاء میکروبی می‌شود (۲۸).

جدول ۲- نتایج آنالیز اسانس آویشن شیرازی مورد مطالعه با استفاده از روش GC/MS

Table 2- Analyze Results of studied *Zataria multiflora* Bioss essential oil by GC/MC method

درصد نسبی ترکیبات Relative percentage of compounds	ترکیبات Compounds	شماره Number
30.14	تیمول Thymol	1
1.62	والنسین Valencen	2
8.31	گاما ترپینن Gamma terpinene	3
44.36	کارواکرول Carvacrol	4
0.47	آلفا ترپینئول Alpha Terpineol	5
0.48	بورنی استات Bornyl acetate	6
2.16	آلفا پینن alpha.-Pinene.	7
1.11	بورنل Bornel	8
6.38	p-سایمن p-Cymene	9
1.6	کاریوفیلن اکسید Caryophyllene oxide	10
96.63	-	جمع Total

فعالیت ضدلیستریایی: نتایج فعالیت ضدلیستریایی اسانس آویشن شیرازی به دو فرم امولسیون و نانوامولسیون با استفاده از روش میکرودایلوشن (MIC-MBC) در جدول ۳ نشان داده شده است. همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، مقادیر MIC و MBC در نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی بسیار پایین‌تر ازامولسیون اسانس آویشن شیرازی است که این می‌تواند نشان دهنده تأثیر اندازه ذرات در افزایش فعالیت ضد میکروبی نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی باشد. نتایج حاضر با مطالعه گهرویی و همکاران (۲۰۱۷)، در مورد حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و میکروب کشی (MBC) عصاره آویشن شیرازی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مطابقت دارد (۷، ۱۲).

جدول ۳- MIC و MBC اسانس و نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی علیه باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز*

Table 3- MIC and MBC of *Zataria multiflora* Bioss essential oil and its nanoemulsion against *Listeria monocytogens* bacteria

	MIC (mg/ml) حداقل غلظت مهارکنندگی (میلی‌گرم/میلی‌لیتر)	MBC (mg/ml) حداقل غلظت کشندگی (میلی‌گرم/میلی‌لیتر)
اسانس آویشن شیرازی *Zataria multiflora* Boiss Essential Oil	4	8
نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی Nanoemulsion of *Zataria multiflora* Boiss essential oil	0.5	2

اندازه ذرات: در این مطالعه اندازه گیری اندازه ذرات و PDI مربوط به تیمارهای مختلف به کمک دستگاه DLS انجام شد که جزییات آن در جدول ۴ مشاهده می‌شود. میانگین اندازه ذرات در کلیه تیمارها کمتر از ۵۰۰ نانومتر بوده و کم‌ترین میانگین سایز، مربوط به تیمار نانوامولسیون کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی و نایسین و بیشترین میانگین سایز مربوط به تیمار کیتوزان (غیر نانو) بود.هاتاناکا و همکاران (۲۰۱۰) و همچنین سروینو و همکاران (۲۰۱۵)، در مطالعات خود محدوده کمتر از ۵۰۰ نانومتر را به عنوان نانو در نظر گرفتند (۳۰،۹).

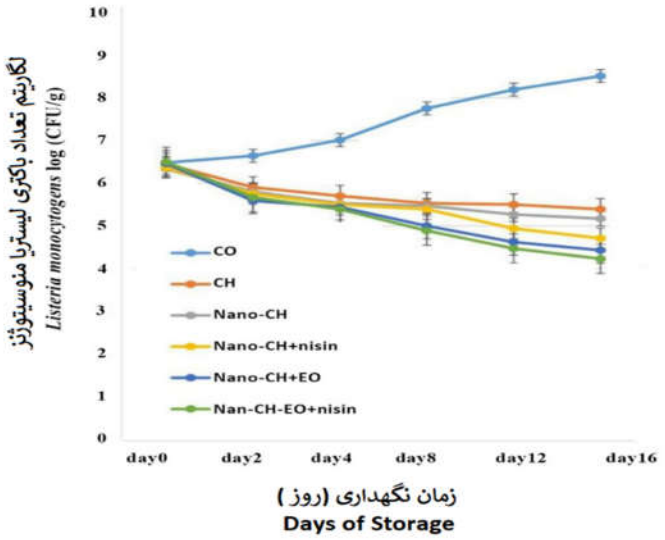
جدول ۴- سایز ذرات و شاخص بسپارش مربوط به تیمارهای مختلف مورد مطالعه

Table 4- PDI polydispersity index (PDI) and particle size for the studied treatments

گروه‌ها Groups	PDI	z-average (nm) (نانومتر)
کیتوزان ۲ (٪) Chitosan 2 (%)	0.254	3159
نانوکیتوزان ۲ (٪) Nano-chitosan 2 (%)	0.296	1.470
نانوکیتوزان+آویشن شیرازی Nano-chitosan + *Zataria multiflora* Boiss	0.365	9.412
نانوکیتوزان + نایسین Nano-chitosan + Nisin	0.521	300.5
نانوکیتوزان+نایسین+آویشن شیرازی Nano-chitosan + nisin + *Zataria multiflora* Boiss	0.565	3.285

تغییرات لگاریتم تعداد باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز*: در شکل ۱ و جدول ۵ تأثیر تیمارهای مختلف بر روی رشد باکتری لیستریا طی دوره مطالعه نشان داده شده است. تعداد اولیه باکتری در نمونه‌های بدون

پوشش از ۰/۱۶± ۶/۴۸ لگاریتم واحد تشکیل کلنی بر گرم به ۰/۲۴± ۸/۵۱ لگاریتم واحد تشکیل کلنی بر گرم افزایش یافت که این افزایش می‌تواند به‌دلیل سایکروتروف بودن باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* باشد. رشد لیستریا در تمامی گروه‌ها در طول دوره مورد مطالعه (۱۶روزه) نسبت به گروه فاقد پوشش کاهش یافت. بطور مشابه سورینو و همکاران (۲۰۱۵) در بررسی اثر ضد میکروبی پوشش کیتوزان حاوی نانوامولسیون اسانس علیه باکتری *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ در لوبیا سبز نشان دادند پوشش کیتوزان به تنهایی و همراه با اسانس اثر ضدمیکروبی دارد (۳۰). خانزادی و همکاران (۲۰۱۹) در ارزیابی اثر ضد میکروبی تیمار کیتوزان و نانوامولسیون کیتوزان بر رشد باکتری *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ به اثر ضدمیکروبی بهتر تیمار نانوامولسیون کیتوزان پی بردند (۱۳). گهروئی و همکاران (۲۰۱۷) اثرات ضدمیکروبی فرم نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی افزوده شده به مواد بسته‌بندی پلیمری را بررسی و نشان دادند با کاهش اندازه ذرات نانو امولسیون، اثرات ضد میکروبی اسانس افزایش می‌یابد (۷). بطور مشابه یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد تیمار نانوامولسیون کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی که موجب کاهش تعداد باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* شد. به‌طورکلی در این پژوهش حداکثر و حداقل تعداد باکتری شمارش شده در روز شانزدهم، به‌ترتیب در نمونه‌های فاقد پوشش ۰/۲۴± ۸/۵۱ لگاریتم واحد تشکیل کلنی بر گرم و نمونه‌های نانوامولسیون کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی ۱درصد + نایسین ۰/۰۵±۴/۲۳ لگاریتم واحد تشکیل کلنی بر گرم مشاهده شد.



شکل ۱- روند تغییرات لگاریتم تعداد باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در گروه‌های مختلف در طول دوره مطالعه

Figure 1- Effects of the treatments on *Listeria monocytogenes* counts growth (log CFU/g) during storage

جدول ۵- تغییرات تعداد باکتری در نمونه‌های تلقیح شده با باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در طول دوره ۱۶ روزه

Table 5- Changes of the bacterial counts in inoculated treatments with *Listeria monocytogens* bacteria during 16 days storage

روز Day	کنترل control	کیتوزان Chitosan	نانو امولسیون کیتوزان nanoemulsion chitosan	نانوامولسیون کیتوزان+ اسانس آویشن شیرازی nanoemulsion chitosan + *Zataria Multiflora* Boiss essential oil	نانو امولسیون کیتوزان+نایسین nanoemulsion chitosan + Nisin	نانو امولسیون کیتوزان+ اسانس آویشن شیرازی + نایسین nanoemulsion chitosan + nisin + Zataria multiflora Boiss
0	6.48±0.16	6.45±0.25	6.33±0.46	6.46±0.27	6.36±0.40	6.5±0.16
2	6.64±0.13	5.9±0.24	5.8±0.17	5.59±0.16	5.75±0.08	5. 67±0.48
4	7.01±0.22	5.7±0.10	5.53±0.38	5.44±0.07	5.5±0.09	5.39±0.18
8	7.75±0.1	5.53±0.12	5.47±0.23	5.4±0.07	5.39±0.07	4.89±0.31
12	8.19±0.35	5.5±0.17	5.27±0.40	4.62±0.11	4.94±0.45	4.47±0.17
16	8.51±0.24	5.39±0.13	5.17±0.40	4.43±0.21	4.71±0.08	4.23±0.05

در مطالعه عزیزیان و همکاران (۲۰۱۹) در استفاده همزمان از زیره سیاه و نایسین به نتایج مشابه دست یافتند (۲). جدول ۶ که بیانگر میانگین کاهش تعداد باکتری لیستریا (به صورت مقایسه دو به دو گروه‌ها) در تیمارهای مختلف است، نشان می‌دهد بیشترین میزان کاهش در مقایسه با تیمار کنترل مربوط به تیمار نانوامولسیون کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی یک درصد و نایسین و پس از آن مربوط به تیمار نانوامولسیون کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی بود. این یافته نشان می‌دهد که استفاده از ترکیبات طبیعی ضدمیکروبی به‌صورت همزمان، در مقابل رشد میکروبی، نسبت به استفاده آن‌ها به تنهایی تاثیرگذاری بیشتری دارد. مطالعات بسیاری یافته فوق را تأیید کردند (۲، ۱۲، ۳۱). نوع ماده ضد میکروبی و نوع میکروارگانیسم می‌توانند در میزان فعالیت آنتاگونیستی و هم‌افزایی تأثیر داشته باشند.

جدول ۶- اختلاف میانگین کاهش لگاریتم تعداد باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در گروه‌های مختلف مورد مطالعه.

Table 6- The average of log reduction of *Listeria monocytogens* bacteria among studied treatments

اختلاف میانگین Mean difference I-J	گروه group (J)	کیتوزان۲ (٪) Chitosan 2(%)	نانو کیتوزان Nano-chitosan	نانو کیتوزان+ نایسین Nano-chitosan + Nisin	نانو کیتوزان+ آویشن شیرازی Nano-chitosan + *Zataria multiflora* Boiss	نانو کیتوزان+ نایسین+ آویشن شیرازی Nano-chitosan + nisin + *Zataria multiflora* Boiss
گروه(I)						
کنترل control		1.69*	1.84*	1.99*	2.18*	2.24*
کیتوزان۲ (٪) Chitosan 2(%)			0.15*	0.30*	0.49*	0.55*
نانو کیتوزان Nano-chitosan				0.15*	0.34*	0.40*
نانو کیتوزان+ نایسین Nano-chitosan + Nisin					0.19*	0.25*
نانو کیتوزان+ آویشن شیرازی Nano-chitosan + Zataria multiflora Boiss						0.06*

نتیجه‌گیری کلی

استفاده اسانس آویشن شیرازی به‌دلیل دارا بودن ترکیبات شیمیایی مانند کارواکرول و تیمول و نیز نایسین به عنوان یک باکتریوسین قوی در پوشش خوراکی نانوامولسیون کیتوزان ۲ درصد سبب کاهش تعداد باکتری پاتوژن *لیستریا مونوسیتوژنز* در فیله مرغ نگهداری شده در یخچال گردید. این نتیجه به‌ویژه در استفاده همزمان اسانس و نایسین کاملا مشهود بود. بنابراین استفاده از فناوری نانو در تهیه پوشش‌های خوراکی حاوی ترکیبات ضد میکروبی طبیعی جهت افزایش ماندگاری مواد غذایی به خصوص گوشت و فرآورده‌های گوشتی می‌تواند مورد توجه قرار گیرد.

References

1. Amirsoleimani, M., Khalilzadeh, M. A., Sadeghifar, F., Sadeghifar, H. 2018. Surface modification of nanosatrch using nano silver: a potential antibacterial for food package coating. J. Food Sci. Technol. 55: 3. 899-904.
2. Azizian, A., Khanzadi, S., Hashemi, M., Azizzadeh, M. 2019. Inhibitory Effect of Nano-gel/Emulsion of Chitosan Coating Incorporated with *Ziziphora Clinopodioides* Essential Oil and Nisin on *Escherichia Coli O157: H7* Inoculated in Beef at Cold Storage Condition. JNFH. 7: 2. 103-109.
3. Bautista-Baños, S., Hernandez-Lauzardo, A.N., Velazquez-Del Valle, M.G., Hernández-López, M., Barka, E.A., Bosquez-Molina, E., Wilson, C.L. 2006. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. Crop protection. 25: 2. 108-118.
4. Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. Int J Food Microbiol. 94: 3. 223-253.
5. Chen, B. Y., Pyla, R., Kim, T. J., Silva, J. L., Jung, Y.S. 2010. Prevalence and contamination patterns of *Listeria monocytogenes* in catfish processing environment and fresh fillets. Food microbiology. 27: 5. 645-652.
6. Deng, W., Liu, K., Cao, S., Sun, J., Zhong, B., Chun, J. 2020. Chemical Composition, Antimicrobial, Antioxidant and Antiproliferative Properties of Grapefruit Essential Oil Prepared by Molecular Distillation. Molecules (Basel, Switzerland). 25: 1. 217.
7. Gahruie, H. H., Ziaee, E., Eskandari, M. H., Hosseini, S.M.H. 2017. Characterization of basil seed gum-based edible films incorporated with *Zataria multiflora* essential oil nanoemulsion. Carbohydrate polymers. 166: 1. 93-103.
8. Gallocchio, F., Cibin, V., Biancotto, G., Roccato, A., Muzzolon, O., Carmen, L., Ricci, A. 2016. Testing nano-silver food packaging to evaluate silver migration and food spoilage bacteria on chicken meat. Food Additives & Contaminants: Part A. 33: 6. 1063-1071.
9. Hatanaka, J., Chikamori, H., Sato, H., Uchida, S., Debari, K., Onoue, S., Yamada, S. 2010. Physicochemical and pharmacological characterization of α-tocopherol-loaded nano-emulsion system. Int. J. Pharm. 396: 1-2. 188-193.
10. Iturriaga, L., Olabarrieta, I., de Marañón, I.M. 2012. Antimicrobial assays of natural extracts and their inhibitory effect against *Listeria innocua* and fish spoilage bacteria, after incorporation into biopolymer edible films. Int J Food Microbiol. 158: 1. 58-64.
11. Jiang, Z., Neetoo, H., and Chen, H. 2011. Control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using chitosan-based antimicrobial coatings and films. J Food Sci. 76:1. 22-26.
12. Kazemeini, H., Azizian, A., Shahavi, M. H. 2019. Effect of Chitosan Nano-Gel/Emulsion Containing *Bunium Persicum* Essential Oil and Nisin as an Edible Biodegradable Coating on *Escherichia Coli O157: H7* in Rainbow Trout Fillet. J. Water Environ Nanotechnol. 4:4. 343-349.
13. Khanzadi, S., Azizian, A., Hashemi, M., Azizzadeh, M. 2019. Chemical

Composition and Antibacterial Activity of the Emulsion and Nano-emulsion of *Ziziphora clinopodioides* Essential Oil against *Escherichia coli O157: H7*. J. Hum., Environ. Health Promot. 5: 2. 94-97.

14. Krivorotova, T., Cirkovas, A., Maciulyte, S., Staneviciene, R., Budriene, S., Serviene, E., Sereikaite, J. 2016. Nisin-loaded pectin nanoparticles for food preservation. Food Hydrocolloids. 54: 4. 49-56.
15. Martins, E.A., Germano, P.M.L. 2011. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, sliced, cooked ham and salami products, marketed in the city of São Paulo, Brazil: Occurrence, quantification, and serotyping. Food Control. 22: 2. 297-302.
16. Medina-Jaramillo, C., Quintero-Pimiento, C., Gómez-Hoyos, C., Zuluaga-Gallego, R., López-Córdoba, A. 2020. Alginate-Edible Coatings for Application on Wild Andean Blueberries (*Vaccinium meridionale* Swartz): Effect of the Addition of Nanofibrils Isolated from Cocoa By-Products.Polymers. 12:4. 824.
17. Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., Hogg, T., Gibbs, P. A. 2004. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. Food microbiology. 21: 2. 213-216.
18. Min, S., Harris, L.J., Krochta, J.M. 2005. Antimicrobial effects of lactoferrin, lysozyme, and the lactoperoxidase system and edible whey protein films incorporating the lactoperoxidase system against *Salmonella enterica* and *Escherichia coli O157*: H7. J Food Sci. 70:7. 332-338.
19. Moshafi, M.H., Mansouri, S.H., Sharififar, F. A. R. I. B. A., Khoshnoodi, M. 2015. Antibacterial and antioxidant effects of the essential oil and extract of *Zataria Multiflora* Boiss. Int J Health Policy Manag. 12: 2. 814.
20. Oh, Y.A., Oh, Y.J., Song, A.Y., Won, J. S., Song, K.B., and Min, S.C. 2017. Comparison of effectiveness of edible coatings using emulsions containing lemongrass oil of different size droplets on grape berry safety and preservation. LWT. 75: 2. 742-750.
21. Pérez Quiñones, J., Brüggemann, O., Kjems, J., Shahavi, M.H., Peniche Covas, C. 2018. Novel brassinosteroid-modified polyethylene glycol micelles for controlled release of agrochemicals. J Agric Food Chem. 66:7. 1612-1619.
22. Rabea, E.I., Badawy, M.E.T., Stevens, C. V., Smagghe, G., Steurbaut, W. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. Biomacromolecules. 4: 6. 1457-1465.
23. Rabiey, S., Hosseini, H., Rezaei, M. 2015. The H urdle Effect of B unium persicum Essential Oil, Smoke and NaCl for Controlling the *Listeria monocytogenes* Growth in Fish Model Systems. J. Food Saf. 33:2. 137-144.
24. Raeisi, M., Hashemi, M., Aminzare, M., Afshari, A., Zeinali, T., Jannat, B. 2018. An investigation of the effect of *Zataria multiflora* Boiss and *Mentha piperita* essential oils to improve the chemical stability of minced meat. Veterinary world. 11: 12. 1656–1662.
25. Raeisi, M., Tabaraei, A., Hashemi, M., Behnampour, N. 2016. Effect of sodium alginate coating incorporated with nisin, *Cinnamomum zeylanicum*, and rosemary essential oils on microbial quality of chicken meat and fate of *Listeria monocytogenes* during refrigeration. Int. J. Food Microbiol. 238:4. 139-145.
26. Raji, F., Khanzadi, S., Hashemi, M., Azizzadeh, M. 2019. Effect of Chitosan Coating Nano-emulsion Containing *Zataria multiflora* and *Bunium persicum* Essential Oils on *Escherichia Coli O157: H7* in Vacuum-packed Rainbow Trout Fillet. J Hum., Environ., Health Promot. 5:1. 21-25.
27. Sabdoningrum, E.K., Hidanah, S., Yuniarti, W.M., Chusniati, S., Warsito, S.H., Muchtaromah, B. 2020. Antimicrobial activity of *Phyllantus niruri* extract on Avian pathogenic *Escherichia coli* Isolated from Chicken with Colibacillosis symptoms. Res. J. Pharm Technol. 13: 4. 1883-1887.
28. Sajed, H., Sahebkar, A., Iranshahi, M. 2015. *Zataria multiflora* Boiss. (Shirazi thyme)—an ancient condiment with

modern pharmaceutical uses. J. Ethnopharmacol. 145: 3. 686-698.

29. Salvia-Trujillo, L., Soliva-Fortuny, R., Rojas-Graü, M.A., McClements, D.J., Martin-Belloso, O. 2017. Edible nanoemulsions as carriers of active ingredients: Annu Rev Food Sci. Technol. 8:4. 439-466.
30. Severino, R., Ferrari, G., Vu, K.D., Donsì, F., Salmieri, S., Lacroix, M. 2015. Antimicrobial effects of modified chitosan based coating containing nanoemulsion of essential oils, modified atmosphere packaging and gamma irradiation against *Escherichia coli O157: H7* and *Salmonella Typhimurium* on green beans. Food control. 50: 2. 215-222.
31. 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 O 157: H 7* and *Staphylococcus aureus* in Raw Beef Patty during Refrigerated Storage. J Food Saf. 36:2. 227-236.
32. Sharifi, F., Khanzadi, S., Hashemi, M., Azizzadeh, M. 2017. Control of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli O157: H7* inoculated on fish fillets using alginate coating containing lactoperoxidase system and *Zataria multiflora* boiss essential oil. J. Aquat. Food Prod Technol. 26: 9. 1014-1021.
33. Shin, J.H., Chang, S., and Kang, D.H. 2004. Application of antimicrobial ice for reduction of foodborne pathogens (*Escherichia coli O157: H7*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes*) on the surface of fish. J. Appl. Microbiol. 97: 5. 916-922.
34. Tapia, M.S., Rojas-Graü, M.A., Rodríguez, F.J., Ramírez, J., Carmona, A., Martin-Belloso, O. 2007. Alginate- and gellan-based edible films for probiotic coatings on fresh-cut fruits. J. Food Sci. 72:4. E190-E196.
35. Wadud, S., Leon-Velarde, C.G., Larson, N., Odumeru, J.A. 2010. Evaluation of immunomagnetic separation in combination with ALOA *Listeria chromogenic* agar for the isolation and identification of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. J. Microbiol. Methods. 81: 2. 153-159.
36. Walker, S.J., Archer, P., Banks, J.G. 1990. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. J. Appl. Bacteriol. 68: 2. 157-162.
37. Xiao, D., Davidson, P. M., Zhong, Q. 2011. Spray-dried zein capsules with coencapsulated nisin and thymol as antimicrobial delivery system for enhanced antilisterial properties. J Agric Food Chem. 59: 13. 7393-7404.
38. Yadav, B., Kumar, R., Kumar, R., Chaudhuri, S., Pramanik, P. 2017. Electrical behaviour of chitosan-silver nanocomposite in presence of water vapour. J. Water Environ Nanotechnol. 2: 2. 71-79.
39. Yuan, G., Chen, X., Li, D. 2016. Chitosan films and coatings containing essential oils: The antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems. Food Research International. 89: 4. 117-128.
40. Zeinali, T., Jamshidi, A., Khanzadi, S., Azizzadeh, M. 2015. The effect of short-time microwave exposures on *Listeria monocytogenes* inoculated onto chicken meat portions. In Veterinary Research Forum. 6: 2.173-174.