

اثر عصاره گلبرگ زعفران بر روی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و ضدباکتریایی گوشت ماهی

عاطفه نیکزاد المشیری

کارشناسی ارشد، زیست فناوری میکروبی، موسسه غیرانتفاعی سنا، ساری، ایران

چکیده

ماهیان بسیار فسادپذیر بوده و برای جلوگیری یا به تعویق انداختن فساد آنها استفاده از مواد نگهدارنده طی نگهداری ضروری است. این مطالعه به منظور بررسی اثر عصاره گلبرگ زعفران بر روی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و ضد باکتریایی گوشت ماهی انجام شد. ماهیان به مدت ۹۰ دقیقه در محلول های صفر، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم در لیتر عصاره زعفران غوطه ور گردیدند. عوامل میکروبی، فیزیکوشیمیایی و pH، اندازه گیری شد. تمام این آزمایشات در طول دوره ذخیره سازی انجام شد. در نمونه های تیمار شده با غلظت های مختلف عصاره زعفران، TBARS (مواد واکنش دهنده اسید تیوباربیتوریک) کمتر از نمونه های شاهد بود. نتیجه گیری کلی بر این اصل استوار است که زعفران اکسیداسیون چربی را در گوشت ماهی در طول نگهداری کاهش می دهد. بر اساس نتایج آزمون میکروبی نمونه های تیمار شده تا روز ۱۶ و نمونه کنترل تا روز ۸ نگهداری، قابل مصرف بودند.

واژگان کلیدی: ماهی کپور، فیزیکوشیمیایی، زعفران، میکروبی

مقدمه

کیفیت ماهی و محصولات دریایی در صنایع شیلاتی یکی از با اهمیت ترین موضوعات در صنعت فرآوری آبزیان به ویژه در کشورهای در حال توسعه می باشد. ماهیان با وجود ارزش غذایی بالایی که دارند در برابر فساد اکسیداتیو بسیار حساس هستند و ویژگیهای کیفی آنها در طول نگهداری در اثر فساد باکتریایی و اکسیداتیو کاهش می یابد (Mexis et al., 2009). فساد اکسیداتیو باعث ایجاد بوی نامطبوع، تغییرات نامطلوب در طعم، تغییر در ساختمان مواد مغذی و کاهش ارزش غذایی محصول می شود. توزیع و نگهداری مواد غذایی در سال ۱۹۴۰ با در دسترس بودن یخچال و فریزرهای خانگی ارزان قیمت توسعه یافت که به نگهداری مواد غذایی کمک می کرد. سپس عوامل دیگری مانند فرآیندهای خشک کردن مصنوعی، بسته بندی خلاء، تابش و افزودنی های شیمیایی اضافه شده است. کنترل مناسب، پیشگیری و فنون نگهداری می تواند کیفیت ماهی و سایر آبزیان و فرآورده های ناشی از آنها را توسعه داده و زمان ماندگاری آنها را افزایش دهد. امروزه مصرف کنندگان مواد غذایی نگران مواد نگهدارنده در مواد غذایی هستند و رویکرد کلی به استفاده از نگهدارنده های طبیعی بهبود یافته است، زیرا این مواد حساسیت به حذف عوامل میکروبی را دارند که در دمای یخچال یا شرایط بی هوازی رشد می کنند (Soomro et al., 2002). یکی از روش های نگهداری مواد غذایی استفاده از عصاره های گیاهی و گیاهان دارویی و ادویه جات است. امروزه به دلیل افزایش تقاضای مصرف کنندگان برای مواد نگهدارنده سالم و بدون مواد شیمیایی، استفاده از نگهدارنده های طبیعی و فناوری های دوستدار محیط زیست پیشنهاد شده است. برخلاف ترکیبات مصنوعی، نگهدارنده های طبیعی به دست آمده از عصاره های گیاهی، غنی از ترکیب فنلی هستند که می تواند کیفیت کلی غذا را با کاهش اکسیداسیون چربی و رشد میکروبی افزایش دهد (Patsias et al., 2008). بنابراین استفاده از موادی مناسب با فعالیت آنتی اکسیدانی و آنتی باکتریایی به منظور بهبود کیفیت، افزایش ماندگاری گوشت و در عین حال جلوگیری از ضررهای اقتصادی ضروری و مفید می باشد (Yin and Cheng, 2003).

یکی از این مواد نگهدارنده طبیعی زعفران (*Crocus sativus* Linn) است. زعفران گران ترین ادویه جهان از خانواده Iridaceae است که عمدتاً در ایران و بعداً در یونان، مراکش، هند، اسپانیا و ایتالیا تولید و تهیه می شود. زعفران به دلیل توانایی بالای آن در تولید رنگ، طعم و ویژگی های آن در عطر غذا اغلب مورد توجه قرار می گیرد. ادویه زعفران از دیرباز در طب سنتی مورد استفاده قرار گرفته است و مطالعات اخیر خواص دارویی و بیولوژیکی آن را نشان داده است (Cardone et al., 2020; Moratalla-López et al., 2019; Kyriakoudi et al., 2015; Mir et al., 2011). کلاله ها که درصد بسیار کمی از کل توده گل را تشکیل می دهند، برای تولید ادویه جمع آوری و پردازش می شوند. تولید ادویه زعفران تعدادی محصول جانبی تولید می کند که از یک کیلوگرم گل فقط ۱۵ گرم ادویه به دست می آید. این بدان معنی است که بیش از ۹۰٪ از مواد گیاهی جمع آوری شده دور ریخته می شود (Vahidi et al., 2002; Serrano-Díaz et al., 2012; Shadmehri Ahmadi et al., 2019). به طور خاص، برای هر کیلوگرم ادویه، حدود ۶۳ کیلوگرم بقایای زیستی گل (حدود ۵۳ کیلوگرم گل سرکه، ۹ کیلوگرم برچه، و ۱ کیلوگرم سبک)، ۱۵۰۰ کیلوگرم برگ، ۱۰۰ کیلوگرم اسپات و ۱۰۰ کیلوگرم بنه جمع آوری می شوند (Cardone et al., 2020; Jadouali et al., 2018). بنابراین، در چارچوب اصول اقتصادی، وجود راه حل های جدید فناورانه و سازگار با محیط زیست برای استفاده از ضایعات گل زعفران یک نیاز روزافزون است. بنابراین، راه حل های جدید فن آوری و سازگار با محیط زیست برای شناسایی کاربردهای جدید برای محصولات ضایعات گل زعفران به منظور استفاده از اصول اقتصادی و کاهش ضایعات مورد نیاز است. ارزش گذاری این محصولات فرعی همچنین به تقویت پایداری کشت گل زعفران و افزایش سودآوری این بخش صنعتی با بهره گیری از این زیست توده با ارزش کمک می کند (Cardone et al., 2020). در سال های اخیر، بسیاری از محققان بر روی فعالیت بیولوژیکی محصولات جانبی زعفران تمرکز کرده اند (Cardone et al., 2020; Serrano-Díaz et al., 2017; Lahmass et al., 2017; al., 2012; Shadmehri Ahmadi et al., 2019). و آنتی اکسیدان، آنتی تیروزیناز، ضد

افسردگی، ضدردی و فعالیت های ضد التهابی، خواص سیتوتوکسیک آنها در برابر رده های سلولی تومور، فعالیت های ضد قارچی و ضد باکتریایی آنها و توانایی آنها در کاهش فشار خون شریانی (Mottaghipisheh et al., 2020).

گلبرگ ها و گلبرگ های گل زعفران حاوی مقادیر قابل توجهی از گلوکوزیدهای فلاونول، گلیکوزیدهای فلاونوئید، کروسین و کامفرول و همچنین ترکیبات دیگری مانند آنتوسیانین ها و لوئین دی استر هستند (Sun et al., 2020; Zeka et al., 2018; Ahrazem et al., 2015)، که نشان می دهد اینها می توانند منابع خوبی از ترکیبات فعال زیستی برای توسعه مواد غذایی کاربردی و فرمولاسیون های آرایشی و بهداشتی، و منبع رنگ طبیعی آنتوسیانین ها برای کاربردهای غذایی و زیست پزشکی است (Abbasvali et al., 2016; Kakouri et al., 2017; Tuberoso et al., 2016). این خواص اساساً مربوط به وجود ترکیباتی مانند پیکوکروسین، سافرانال و کروسین است (Ahrazem et al., 2018). همچنین، این ترکیبات فعال، یعنی سافرانال و کروسین، ممکن است مسئول فعالیت باکتری کشی در محیط خود از جمله گونه های مختلف سالمونلا و متعاقباً با احتمال کمتر گونه های استافیلوکوک و اشیریشیا کلی باشند (Ahrazem et al., 2018). با توجه به اینکه در ایران به طور سنتی از زعفران برای تولید غذاهای گوشتی مانند گوشت ماهی استفاده می شود و همچنین با توجه به وجود ابهامات در مورد تأثیر زعفران بر میکروبیوم های موجود در غذا و بهبود خواص فیزیوشیمیایی، این پژوهش با هدف بررسی تأثیر استفاده از گلبرگ زعفران بر خواص میکروبی و خصوصیات فیزیوشیمیایی گوشت ماهی نگهداری شده در یخچال در طول نگهداری انجام شد.

مواد و روش ها

گلبرگ زعفران مورد مطالعه از مزرعه ای واقع در شهرستان قان جمع آوری و خشک شد. جهت تهیه عصاره اتانولی ۵۰ گرم از گلبرگ خشک شده با ۴۵۰ میلی لیتر الکل ۸۰ درصد با استفاده از شیکر به مدت ۲۴ ساعت عصاره گیری شد. عصاره استخراج شده با دستگاه روتاری اوپوراتور تغلیظ و در فور ۴۰ درجه خشک شد. سپس عصاره جهت خشک شدن نهایی لیوفلیزه شد. عصاره خشک شده تا زمان مصرف در شیشه های رنگی و در یخچال نگهداری شد. از عصاره تهیه شده غلظت های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم در لیتر تهیه شد.

تعداد ۶۰ قطعه ماهی کپور با وزن هر کدام ۷۰۰-۸۰۰ گرم و در مجموع به وزن تقریبی ۴۸ کیلوگرم در فصل تابستان از بازار گیلان به صورت تازه صید شده خریداری شد. نمونه ها به طور تصادفی از بین ماهیان هم اندازه و سالم انتخاب شدند و به صورت یک در میان در لایه هایی از یخ پودر شده درون یونولیت قرار داده شد.

ماهی ها به طور کامل (بدون تخلیه شکمی) در محلول های ۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم در لیتر تهیه شده از عصاره گلبرگ زعفران به مدت ۹۰ دقیقه غوطه ور گردیدند سپس بلافاصله درون بسته های سلفون پوشانده و درون جعبه های یونولیت که در کف آن سوراخی جهت خروج احتمالی آب حاصل از ذوب یخ ها تعبیه شده بود به صورت یک لایه یخ پودری و یک لایه ماهی قرار داده شدند (Fan et al., 2008).

اندازه گیری TBARS: ۱ گرم از نمونه با ۱۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط و از کاغذ صافی WattmanTM سایز ۴۰ عبور داده شد. سپس سه محلول مختلف برای مراحل مختلف این آزمایش تهیه شد. محلول A حاوی ۱۰۰ میلی لیتر اسید کلرید ۰،۲۵ مولار، محلول C حاوی ۱ گرم BHT (هیدروکسی تولوئن بوتیل) در ۵۰ سی سی اتانول ۹۶ درصد و محلول B حاوی ۰،۱۸۷ گرم TBA (تیوباربتوریک اسید) و ۷،۵ گرم اسید TCA (غنی TCA) رولون بود. برای انجام آزمایش با محلول های فوق، ابتدا ۱،۵ میلی لیتر محلول C به محلول B اضافه شد و سپس هر دو محلول با محلول A تا ۱۰۰ میلی لیتر شارژ شدند. در نهایت ۴ میلی لیتر از محلول با ۲ میلی لیتر نمونه صاف شده به مدت ۲ دقیقه توسط شیکر ورتکس شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در بین ماری در حال جوش با دمای ۹۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد.

پس از سرد شدن محلول تا دمای پایین تر، محلول به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰۰ گرم در دمای اتاق با دستگاه سانتریفیوژ جدا شد. در نهایت، جذب نور برای لایه رویی در طول موج ۵۳۲ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر ثبت شد و با منحنی به دست آمده

از اندازه گیری MDA (مالون دی آلدئید) مقایسه شد. TBARS بر حسب میلی گرم مالون دی آلدئید به ازای هر کیلوگرم گوشت ماهی گزارش شد. (Gatellier et al. 2007).

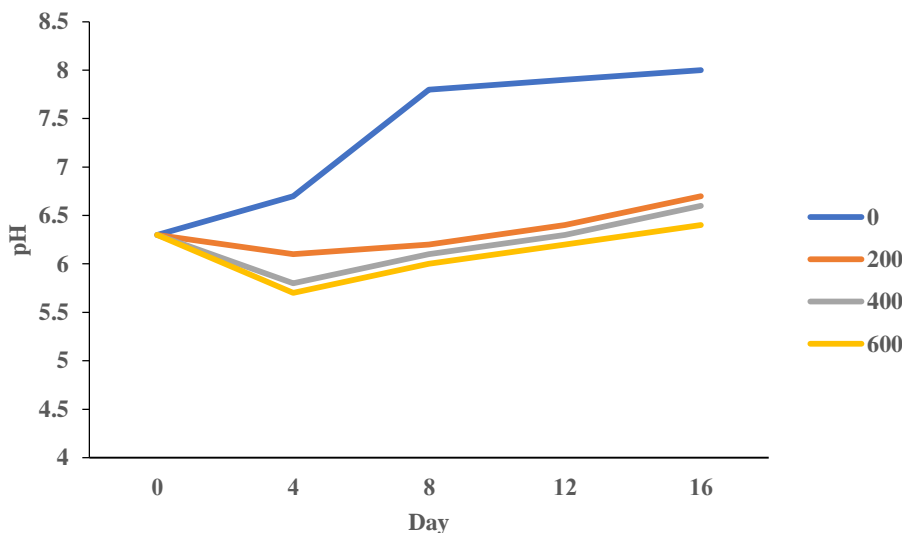
اندازه گیری pH: نمونه‌ها در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر کاملاً همگن شدند و سپس pH آنها با استفاده از PH متر اندازه‌گیری شد (Chouliara et al., 2007).

تجزیه و تحلیل میکروبی: نمونه برداری به منظور انجام آزمون‌های میکروبی شناسی با توجه به روش Sallam (۲۰۰۷) و Ojagh و همکاران (۲۰۱۰) انجام شد. پس از تهیه رقت‌های اعشاری متوالی، ۱ میلی‌لیتر از هر رقت برای کشت باکتری‌ها به روش پورپلیت به محیط کشا پلیت کانت آگار (PCA) اضافه شد. پلیت‌ها برای شمارش باکتری‌های هوازی مزوفیل، به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و برای شمارش باکتری‌های سرماگرا به مدت ۱۰ روز در دمای ۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از ANOVA استفاده شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون تعقیبی دانکن استفاده شد. در ارزیابی آماری سطح معنی داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد ($P \geq 0/05$).

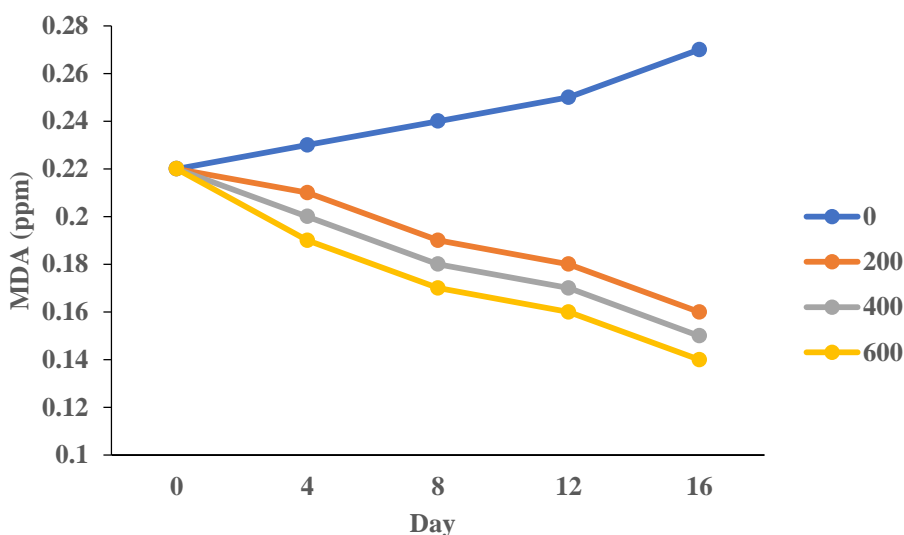
نتایج

شکل ۱ میانگین و انحراف معیار داده‌های حاصل از آزمایشات شیمیایی را در روزهای مختلف برای گروه شاهد و گروه تیمار شده با زعفران در غلظت‌های مختلف را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که pH گوشت ماهی در گروه شاهد و گروه تیمار شده با زعفران با افزایش زمان نگهداری در یخچال به طور معنی داری افزایش یافت ($P > 0/01$).



شکل ۱: pH گوشت ماهی در گروه شاهد و تیمار شده با غلظت‌های مختلف زعفران در روزهای مختلف

در ابتدا، مقدار MDA، $0/22 \pm 0/0$ ppm بود که با گذشت زمان تا پایان دوره (روز شانزدهم) روند افزایشی برای نمونه شاهد دنبال شد. در پایان دوره، بیشترین میزان MDA برای نمونه شاهد ($0/27 \pm 0/02$ ppm) و کمترین آن مربوط به نمونه‌های تیمار شده با عصاره ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر زعفران ($0/14 \pm 0/00$ ppm) بود. بر اساس نتایج تجزیه و تحلیل آماری، نرخ افزایشی MDA برای نمونه شاهد معنی دار نبود ($P > 0/05$)، اما این درصد برای نمونه تیمار شده کاهش معنی داری داشت ($P > 0/05$). (شکل ۲).



شکل ۲: میزان مالون دی آلدئید موجود در گوشت ماهی در گروه شاهد و تیمار شده با غلظت های مختلف زعفران در روزهای مختلف

شمارش کلی باکتری های هوازی مزوفیل با گذشت زمان در غلظت های مختلف عصاره زعفران به طور معنی داری افزایش یافت. به طور کلی در مقایسه غلظت های مختلف عصاره زعفران با یکدیگر از نظر شمارش کلی باکتری ها، عدم استفاده از عصاره زعفران بیشترین میزان باکتری هوازی مزوفیل را داشت (جدول ۱). شمارش باکتری های سرماگرا در غلظت های مختلف عصاره زعفران در مقایسه با تیمار کنترل در روزهای مختلف مورد مطالعه تفاوت معنی داری نشان داد. با گذشت زمان شمارش باکتری های سرماگرا در غلظت های مختلف عصاره زعفران به طور معنی داری افزایش یافت. (جدول ۱).

جدول ۱: تغییرات مقادیر باکتری های هوازی و سرماگرا ($\log \text{CFU/g}$) طی دوره نگهداری (روز)

روز	غلظت صفر میلی گرم در لیتر		غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر		غلظت ۴۰۰ میلی گرم در لیتر		غلظت ۶۰۰ میلی گرم در لیتر	
	باکتری هوازی	باکتری سرماگرا	باکتری هوازی	باکتری سرماگرا	باکتری هوازی	باکتری سرماگرا	باکتری هوازی	باکتری سرماگرا
۰	$3/21 \pm 0/01$	$3/02 \pm 0/03$	$3/21 \pm 0/01$	$3/02 \pm 0/03$	$3/21 \pm 0/01$	$3/02 \pm 0/03$	$3/21 \pm 0/01$	$3/02 \pm 0/03$
۴	$5/82 \pm 0/02$	$4/87 \pm 0/04$	$4/52 \pm 0/03$	$4/32 \pm 0/05$	$3/74 \pm 0/04$	$3/41 \pm 0/02$	$2/13 \pm 0/02$	$2/74 \pm 0/06$
۸	$6/68 \pm 0/01$	$5/82 \pm 0/02$	$5/32 \pm 0/02$	$4/78 \pm 0/01$	$4/41 \pm 0/02$	$3/02 \pm 0/03$	$3/12 \pm 0/05$	$2/15 \pm 0/03$
۱۲	$8/45 \pm 0/03$	$6/68 \pm 0/01$	$7/10 \pm 0/01$	$5/36 \pm 0/02$	$6/03 \pm 0/05$	$4/24 \pm 0/05$	$4/97 \pm 0/03$	$3/21 \pm 0/04$

۴/۰۳ ± ۰/۰۱	± ۰/۰۲ ۵/۵۷	۵/۱۰ ± ۰/۰۶	± ۰/۰۳ ۶/۹۸	۶/۵۸ ± ۰/۰۳	۸/۰۳ ± ۰/۰۴	۷/۸۵ ± ۰/۰۴	۹/۵۳ ± ۰/۰۲	۱۶
-------------	----------------	-------------	----------------	-------------	-------------	-------------	-------------	----

بحث

در مطالعه حاضر در گروه شاهد pH به تدریج افزایش یافت اما در گروه های غلظت های مختلف عصاره زعفران این شاخص نسبتاً پایدار بود. این یافته نشان می دهد که افزایش pH در طول دوره نگهداری گوشت ماهی به دلیل تولید و تجمع ترکیبات پایه مانند آمونیاک و TVB-N (روش نیتروژن اساسی فرار کل) است که توسط باکتری هایی مانند باکتری های پروتئولیتیک که باعث انحطاط می شوند، ایجاد می شود (Sallam, 2007). کاهش pH در لاشه یک تغییر مطلوب پس از مرگ است. با توجه به اینکه اسیدی شدن محیط شرایط نامناسبی را برای رشد باکتری ها در گوشت ماهی ایجاد می کند، بنابراین کاهش pH گوشت ماهی پس از مرگ به عنوان یک عامل بازدارنده در افزایش جمعیت میکروبی گوشت ماهی عمل می کند و مطلوب است. از سوی دیگر اسیدی شدن گوشت بر بافت های همبند و به ویژه رشته های کلاژن اثر می گذارد و این بافت ها را به مواد ژلاتینی آسان تجزیه می کند.

کاهش قابل توجه سطح مالون دی آلدئید (MDA) در نمونه های تیمار شده با غلظت های مختلف زعفران احتمالاً به دلیل وجود آنتی اکسیدان های طبیعی در گیاهان زعفران مانند ترکیبات فنولیک سافرانال و کروسین است. اثر بازدارندگی سافرانال و کروسین بر فرآیند اکسیداسیون لیپیدها در مطالعات دیگری مانند Sánchez-Vioque و همکاران (۲۰۱۲) و Assimopoulou و همکاران (۲۰۰۵) نیز مشاهده شده است. از سوی دیگر، محققان ایرانی (۱۳۸۹) اثر آنتی اکسیدانی زعفران را به وجود اسید گالیک و پیروگالول به عنوان ترکیبات زیست فعال در کلاله زعفران نسبت دادند (Karimi et al., 2010). در ضمن افزایش سطح مالون دی آلدئید در نمونه شاهد به دلیل تخریب شیمیایی و عدم وجود عوامل بازدارنده و آنتی اکسیدانی در لیپیدها می باشد. لازم به ذکر است که مقدار کم مالون دی آلدئید احتمالاً به دلیل کمبود چربی های غیراشباع در بافت گوشت ماهی است.

افزایش بار باکتریایی با گذشت زمان نگهداری ماهی در دمای یخچال به اثبات رسیده است (Mexis et al., 2009). دست آورد حاصل با نتایج تحقیق Barakat و همکاران که اثر محلول کارواکرول و تیمول را بر روی فیله های ماهی کپور معمولی بررسی کردند، مطابقت دارد (Barakat et al., 2004). باکتری های سرمادوست گرم منفی، گروه اصلی میکروارگانیسم های مسئول فساد ماهی تازه نگهداری شده به صورت سرد هستند (Sallam et al., 2007). این باکتری ها به ویژه گونه های سودوموناس آنزیم های لیپاز و فسفولیپاز تولید می کنند که سبب افزایش اسیدهای چرب آزاد می گردند (Kykkidou et al., 2009). کاهش شمارش باکتریهای سرماگرا و در نتیجه افزایش زمان ماندگاری در نمونه های تیمار شده با غلظت های مختلف عصاره زعفران، نشاندهنده تأثیر معنی دار عصاره گیاهی به کار برده شده به عنوان ترکیب ضد باکتریایی می باشد. نتایج این تحقیق با نتایج تحقیقات Erkan و همکاران بر روی ماهی bluefish تیمار شده با اسانس آویشن و برگ بو و Ojagh و همکاران بر روی فیله های ماهی قزل آلائی رنگینکمان تیمار شده با کیتوزان و اسانس دارچین مطابقت دارد (Erkan et al., 2011; Ojagh et al., 2010).

نتیجه گیری

زعفران در بهبود خواص فیزیکی شیمیایی نتایج مثبتی نشان داده است، اما نمی تواند اثر بازدارندگی بر رشد میکروبی داشته باشد. نشان داده شده است که زعفران pH گوشت ماهی را تا نقطه ایزوالکتریک افزایش می دهد و با مهار تولید مالون دی آلدئید در بهبود خواص شیمیایی و فیزیکی گوشت ماهی، اکسیداسیون چربی ها را کاهش می دهد. همچنین با افزایش غلظت های عصاره

زعفران، میزان باکتری های هوازی مزوفیل و باکتری های سرماگرا به طور معنی داری کاهش یافت. بنابراین با توجه به اطلاعات فوق می توان از پودر زعفران به عنوان ماده ای برای بهبود خواص فیزیکی و شیمیایی در ماتریس های مختلف غذایی استفاده کرد.

منابع

Abbasvali, M.; Ranaei, A.; Shekarforoush, S.S.; Moshtaghi, H. The Effects of Aqueous and Alcoholic Saffron (*Crocus sativus*) Tepal Extracts on Quality and Shelf-Life of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) During Iced Storage. *J. Food Qual.* 2016, 39, 732–742. [Google Scholar] [CrossRef]

Ahrazem, O.; Argandoña, J.; Fiore, A.; Aguado, C.; Luján, R.; Rubio-Moraga, Á.; Marro, M.; Araujo-Andrade, C.; Loza-Alvarez, P.; Diretto, G.; et al. Transcriptome analysis in tissue sectors with contrasting crocins accumulation provides novel insights into apocarotenoid biosynthesis and regulation during chromoplast biogenesis. *Sci. Rep.* 2018, 8, 1–17. [Google Scholar] [CrossRef]

Assimopoulou A, Sinakos Z, Papageorgiou V. Radical scavenging activity of *Crocus sativus* L. extract and its bioactive constituents. *Phytother Res.* 2005;19:997-1000. DOI:1002/ptr.1749. PMID:16317646.

Barakat SM, Koji Y, Kazuo M, Shin Sh. Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelflife extension by essential oil compounds. *J Food Microb* 2004; 21: 657-66.

Cardone, L.; Castronuovo, D.; Perniola, M.; Cicco, N.; Candido, V. Saffron (*Crocus sativus* L.), the king of spices: An overview. *Sci. Hortic.* 2020, 272, 109560. [Google Scholar] [CrossRef]

Chouliara E, Karatapanis A, Savvaidis I, et al. Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4 C. *Food Microbiol.* 2007;24:607-17. DOI:1016/j. fm.2006.12.005. PMID:17418312.

Erkan N, Tosun SY, Ulusoy S, Uretener G. The use of thyme and laural essential oil treatments to extend the shelf life of bluefish (*Pomatomus saltatrix*) during storage in ice. *J Consum Protec and Food Saf* 2011; 6: 39 -48.

Fan, W., Chi, Y., Zhang, S. 2008. The use of a tea polyphenol dip to extend the shelf life of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) during storage in ice. *Food Chemistry.* 108: 148-153.

Gatellier P, Gomez S, Gigaud V, et al. Use of a fluorescence front face technique for measurement of lipid oxidation during refrigerated storage of chicken meat. *Meat science.* 2007;76:543-7. DOI:1016/j.meatsci.2007.01.006.

Jadouali, S.M.; Atifi, H.; Bouzoubaa, Z.; Majourhat, K.; Gharby, S.; Achemchem, F.; Elmoslih, A.; Laknifli, A.; Mamouni, R. Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activity of Moroccan *Crocus sativus* L. petals and leaves. *J. Mater. Environ. Sci.* 2018, 9, 113–118. [Google Scholar] [CrossRef]

Kakouri, E.; Daferera, D.; Paramithiotis, S.; Astraka, K.; Drosinos, E.H.; Polissiou, M.G. *Crocus sativus* L. tepals: The natural source of antioxidant and antimicrobial factors. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* 2017, 4, 66–74. [Google Scholar] [CrossRef]

Karimi E, Oskoueian E, Hendra R, et al. Evaluation of *Crocus sativus* L. stigma phenolic and flavonoid compounds and its antioxidant activity. *Molecules*. 2010;15:6244-56. DOI:3390/molecules15096244 . PMID:20877220.

Kykkidou S, Giatrakou V, Papavergou A, Kontominas MG, Savvaidis I: Effect of thyme essential oil and packaging treatments on fresh Mediterranean swordfish fillets during storage at 4°C. *J Food Chem* 2009; 115: 169–75.

Kyriakoudi, A.; Ocallaghan, Y.C.; Galvin, K.; Tsimidou, M.Z.; O'Brien, N.M. Cellular Transport and Bioactivity of a Major Saffron Apocarotenoid, Picrocrocin (4-(β-D-Glucopyranosyloxy)-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexene-1-carboxaldehyde). *J. Agric. Food Chem*. 2015, 63, 8662–8668. [Google Scholar] [CrossRef]

Lahmass, I.; Lamkani, T.; Delporte, C.; Sikdar, S.; van Antwerpen, P.; Saalaoui, E.; Megalizzi, V. The waste of saffron crop, a cheap source of bioactive compounds. *J. Funct. Foods* 2017, 35, 341–351. [Google Scholar] [CrossRef]

Mexis, S.F., Chouliara, E., Kontominas, M.G. 2009. Combined effect of an oxygen absorber and oregano essential oil on shelf-life extension of rainbow trout fillets stored at 4°C. *Food Microbiology*. 26: 598- 605.

Mir, A.M.; Rameashkannan, M.V.; Pala, R.A. A comparative study of phytochemical analysis and antimicrobial properties of stigmas and stamens of saffron (*Crocus sativus* L.) found in Kashmir. *Adv. Biotechnol*. 2011, 11, 35–38. [Google Scholar]

Moratalla-López, N.; Bagur, M.J.; Lorenzo, C.; Martínez-Navarro, M.E.; Salinas, M.R.; Alonso, G.L. Bioactivity and Bioavailability of the Major Metabolites of *Crocus sativus* L. Flower. *Molecules* 2019, 24, 2827. [Google Scholar] [CrossRef]

Mottaghipisheh, J.; Sourestani, M.M.; Kiss, T.; Horváth, A.; Tóth, B.; Ayanmanesh, M.; Khamushi, A.; Csopor, D. Comprehensive chemotaxonomic analysis of saffron crocus tepal and stamen samples, as raw materials with potential antidepressant activity. *J. Pharm. Biomed. Anal*. 2020, 184, 113183. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

Ojagh SM, Rezaei M, Razavi SH, Hosseini SMH. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *J Food Chem* 2010; 120: 193-8.

Patsias A, Badeka A, Savvaidis I, et al. Combined effect of freeze chilling and MAP on quality parameters of raw chicken fillets. *Food Microbiol*. 2008;25:575-81. DOI:1016/j.fm.2008.02.008. PMID:18456112 .

Sallam KhI, Ahmed AM, Elgazzar MM, Eldaly EA. Chemical quality and sensory attributes of marinated Pacific saury (*Cololabis saira*) during vacuum-packaged storage at 4°C. *J Food Chem* 2007; 102: 1061-70.

Sallam KhI. Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *J Food Control* 2007; 18: 566-75.

Sánchez-Vioque R, Rodríguez-Conde M, ReinaUreña J, et al. In vitro antioxidant and metal chelating properties of corm, tepal and leaf from saffron (*Crocus sativus* L.). *Industrial Crops and Products*. 2012;39:149-53. DOI:1016/j. indcrop.2012.02.028.

Serrano-Díaz, J.; Sánchez, A.M.; Maggi, L.; Martínez-Tomé, M.; García-Diz, L.; Murcia, M.A.; Alonso, G.L. Increasing the Applications of Crocus sativus Flowers as Natural Antioxidants. *J. Food Sci.* 2012, 77, C1162–C1168. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

Shadmehri Ahmadi, A.; Miri, H.; Namvar, F.; Nakhaei Moghaddam, M.; Yaghmaei, P. Cytotoxicity, antioxidant and antibacterial activities of Crocus sativus petal extract. *Int. J. Res. Appl. Basic Med. Sci.* 2019, 5, 69–76. [Google Scholar]

Soomro A, Masud T, Anwaar K. Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health-a review. *Pakistan J Nutr.* 2002;1:20-4. DOI:3923/pjn.2002.20.24.

Sun, C.; Nile, S.H.; Zhang, Y.; Qin, L.; El-Seedi, H.R.; Daglia, M.; Kai, G. Novel Insight into Utilization of Flavonoid Glycosides and Biological Properties of Saffron (*Crocus sativus* L.) Flower Byproducts. *J. Agric. Food Chem.* 2020, 68, 10685–10696. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

Tuberoso, C.I.; Rosa, A.; Montoro, P.; Fenu, M.A.; Pizza, C. Antioxidant activity, cytotoxic activity and metabolic profiling of juices obtained from saffron (*Crocus sativus* L.) floral by-products. *Food Chem.* 2016, 199, 18–27. [Google Scholar] [CrossRef]

Vahidi, H.; Kamalinejad, M.; Sedaghati, N. Antimicrobial properties of Crocus sativus L. *Iran. J. Pharm. Res.* 2002, 1, 33–35. [Google Scholar]

Yin, M.C., Cheng, W.S. 2003. Antioxidant and antimicrobial effects of four garlic-derived organosulfur compounds in ground beef. *Meat Science.* 63: 23-28.

Zeka, K.; Ruparelia, K.C.; Continenza, M.A.; Stagos, D.; Vegliò, F.; Arroo, R.R. Petals of Crocus sativus L. as a potential source of the antioxidants crocin and kaempferol. *Fitoterapia* 2015, 107, 128–134. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]