

بررسی اثرات نایسین و نانوذرات نایسین به عنوان جایگزین نیتريت بر ویژگی های فیزیکیوشیمیایی، میکروبی، حسی و زمان ماندگاری سوسیس فرانکفورتر

کاظم علیرضالو^{۱*}، جواد حصاری^۲، مقصود بشارتی^۳، میلاد یعقوبی^۴، ذبیح اله نعمتی^۵، حیدر ملایری^۶

- ۱- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
* نویسنده مسئول (kazem.alirezalu@tabrizu.ac.ir)
- ۲- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
- ۳- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
- ۴- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
- ۵- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
- ۶- دانش آموخته دکتری، مدیر کنترل کیفیت صنایع گوشت و لبنیات، اداره استاندارد ایران، تبریز، ایران

چکیده

در این پژوهش، تأثیر استفاده از ترکیب ۵۰۰ پی پی ام عصاره های گیاهی مخلوط (چای سبز، گزنه و برگ زیتون) به همراه نایسین (۲۰۰ پی پی ام) و نانوذرات نایسین (۲۰۰ پی پی ام) به منظور تولید سوسیس فرانکفورتر بدون نیتريت مورد بررسی قرار گرفت. نمونه های سوسیس فرانکفورتر بدون نیتريت در ۳ تیمار حاوی ۵۰۰ پی پی ام عصاره گیاهی + ۲۰۰ پی پی ام نایسین، تیمارها به همراه نمونه کنترل (۱۲۰ پی پی ام نیتريت سدیم) تولید شدند و پس از بسته بندی تحت خلأ در بسته های پلی اتیلنی آزمایش های فیزیکیوشیمیایی، کیفی، میکروبی و حسی در مدت زمان ۴۵ روز مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که استفاده از نایسین و نانوذرات نایسین تأثیر معنی داری ($P > 0.05$) روی میزان رطوبت، چربی، پروتئین و خاکستر نداشتند. نانوذرات نایسین به دلیل وجود کیتوزان در ساختار کپسول توانستند از اکسیداسیون چربی ها ممانعت کنند و در انتهای زمان نگهداری سوسیس های حاوی این ترکیبات دارای پایین ترین میزان اندیس تیوباریتوریک اسید بودند. شمارش باکتری های کل، کپک ها و مخمرها به طور معنی داری ($P < 0.05$) طی مدت زمان نگهداری افزایش پیدا کرد و در انتهای ۴۵ روز به ترتیب سوسیس های حاوی نیتريت سدیم و نانوذرات نایسین دارای کمترین شمارش باکتری های کل مزوفیل، کپک ها و مخمرها بودند. شمارش باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* (۲/۵ لگاریتم واحد تشکیل کلنی در گرم) و *شریشیاکلی* (۲ لگاریتم واحد تشکیل کلنی در گرم) طی زمان نگهداری به طور معنی داری ($P < 0.05$) کاهش پیدا کرد. مشخص شد که سوسیس حاوی نانوذرات نایسین دارای امتیازهای حسی بیشتری در مقایسه با سایر تیمارها بود. نتایج حاصل نشان داد که استفاده از ۲۰۰ پی پی ام نانوذرات نایسین در ترکیب با ۵۰۰ پی پی ام عصاره های ترکیبی می تواند گامی جدید در تولید سوسیس فرانکفورتر بدون نیتريت و با ویژگی های کیفی مطلوب و زمان ماندگاری بالا باشد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۱۷

واژه های کلیدی

زمان ماندگاری
سوسیس فرانکفورتر
عصاره گیاهی
نانوذرات نایسین

مقدمه

به همین جهت محصولات گوشتی نقش عمده ای در تغذیه و تنوع غذایی مردم دارند (De Smet & Vossen, 2016). طبق آخرین آمار ارائه شده توسط سازمان

گوشت یکی از منابع مهم ریزمغذی ها از جمله روی، ویتامین B₁₂، فسفر و پروتئین بشمار می رود،

امروزه به دنبال افزودنی‌های مناسب جهت حذف یا کاهش مصرف این ترکیبات در فرآورده‌های گوشتی می‌باشند. باتوجه به کاربردهای مختلف نیتريت سدیم در فرمولاسیون سوسیس در صورت حذف این ترکیب باید راهبردهای متنوعی در بهبود فرمولاسیون ارائه کرد، به طوری که ویژگی‌های میکروبی و کیفی در سطح بالایی حفظ شود. استفاده از ترکیبات ضد میکروبی طبیعی مانند نایسین، کیتوزان، اپسیلون پلی-ال-لیزین^۲ و نانوکپسوله‌شده آنها و همچنین عصاره‌های گیاهی در فرمولاسیون تولید و بسته‌بندی فعال سوسیس در جهت جایگزینی نیتريت سدیم گامی جدید در تولید محصولات گوشتی فراسودمند و بدون نیتريت می‌باشد (Sebranek, 2009). نایسین نوعی باکتریوسین پلی‌پپتیدی آمفی‌پاتیک دارای ۳۴ آمینواسید است که توسط سوش‌های خاص لاکتوکوکوس لاکتیس^۳ زیروگونه لاکتیس تولید می‌شود و مدت‌هاست که باتوجه به خصوصیات ضد میکروبی آن و سمیت پایین برای انسان به عنوان یک ماده ایمن (GRAS^۴) و نگهدارنده مواد غذایی در بسیاری از کشورها استفاده می‌شود (Kuвано et al., 2005). نایسین دارای اثرات ضد میکروبی روی برخی باکتری‌های گرم مثبت بیماری‌زا مانند لیستریا مونوسی‌توزن^۵ و کلاستریدیوم بوتولینوم و همچنین باکتری‌های گرم منفی بیماری‌زا مانند اشریشیا کلی^۶ و سالمونلا^۷ می‌باشد (Bernela, Kaur, Chopra, & Thakur, 2014). از محصولاتی که امروزه به صورت تجارتي در فرآوری آنها از نایسین استفاده می‌شود به فرآورده‌های گوشتی نظیر گوشت خام، محصولات پخته گوشت، سوسیس، کالباس، محصولات غذایی دریایی نظیر انواع ماهی و صدف و محصولات لبنی نظیر پنیرهای پاستوریزه فرایندشده پنیر طبیعی، شیر پاستوریزه و انواع دسرهای لبنی پاستوریزه، انواع محصولات خامه، شیر استریلیزه، تخم‌مرغ مایع پاستوریزه، انواع نوشیدنی مثل آب‌میوه‌ها و دیگر محصولات همچون سس‌های سالاد، فرآورده‌های سیب‌زمینی، سویا و پیتزا اشاره نمود (Davidson, MacGregor, Stuhr, & Gidron, 1999). کیتوزان به دلیل ویژگی‌های تکنولوژیکی و فیزیولوژیکی منحصر به فرد از جمله خاصیت ضد میکروبی در برابر دامنه

خواربار و کشاورزی، مصرف سرانه گوشت قرمز و سفید ۴۱ کیلوگرم اعلام شده است. مقدار مصرف گوشت در کشورهای توسعه یافته چیزی در حدود ۹۰ کیلوگرم در سال بوده که این مقدار برای کشورهای از جمله چین، برزیل، کویت، امارات و عربستان به ترتیب ۳۲، ۲۸، ۶۲، ۵۶ و ۴۵ کیلوگرم است (FAO, 2013). اما باتوجه به افزایش قیمت گوشت در کشور ایران و کاهش قدرت خرید مصرف کنندگان، مصرف سرانه گوشت در سال به حدود ۱۳ کیلوگرم یعنی در حدود یک سوم مصرف سرانه جهانی کاهش یافته است (Azham, 2011). سوسیس محصول غذایی مطلوبی بوده و ترکیبات تغذیه‌ای آن کامل تر از گوشت خالص می‌باشد. اما افزایش استقبال مصرف کنندگان از انواع سوسیس و کالباس، در شرایطی مشاهده می‌شود که بسیاری از متخصصان تغذیه، به جهت استفاده از نیتترات و نیتريت سدیم در این محصولات به مضرات مصرف این نوع مواد غذایی اشاره می‌کنند (Morgen, 2011). نیتترات و نیتريت سدیم به عنوان نگهدارنده و برای افزایش زمان ماندگاری به فرمولاسیون سوسیس اضافه می‌شوند تا مانع رشد باکتری‌های خطرناکی مانند کلاستریدیوم بوتولینوم^۱ گردند (Adams & Moss, 2007; Sebranek & Bacus, 2000). به علاوه این ترکیبات نیتراتی باعث حفظ عطر و طعم ادویه‌های آن می‌شوند و شروع فساد را در گوشت به تاخیر می‌اندازند. مطابق گزارش‌ها مقدار مصرف نیتترات سدیم در حدود ۰/۰۶۲ درصد کل وزن سوسیس یا در حدود ۱۲۰ پی‌پی‌ام می‌باشد (Sebranek, 2009). اما نیتترات و نیتريت مواد سرطان‌زایی هستند که وجود آنها در مواد غذایی تهدیدکننده سلامت انسان‌هاست. مشتق‌های مختلفی از این ترکیبات در ماده غذایی و یا در طی هضم و جذب در دستگاه گوارش انسان، ایجاد می‌شود. این مشتق‌ها شامل ترکیبات سرطان‌زای مختلف N-نیتروز آمین‌ها می‌باشند که به آسانی طی واکنش نیتترات و نیتريت با آمینواسیدهای نوع دوم شکل می‌گیرند (Ozel, Gogus, Yagci, Hamilton, & Lewis, 2010). گزارش‌های مختلفی اثرات نامطلوب این ترکیبات مانند کمبود اکسیژن‌رسانی به خون و سایر ارگان‌های داخلی بدن به علت بلوکه شدن گلبول‌های قرمز با نیتريت (Pierson, Smoot, & Robach, 1983)، انسداد مزمن ریوی (Colmenero, 2000) و سرطان‌زایی (Pegg & Shahidi, 2008) را به اثبات رسانیده‌اند. بنابراین بسیاری از محققان

¹ Clostridium botulinum

² Epsilon poly-l-lysine

³ Lactococcus lactis

⁴ Generally Recognized As Safe

⁵ Listeria monocytogenes

⁶ Escherichia coli

⁷ Salmonella

تأثیر نایسین با استفاده از الحاق آن در میکروکپسول‌هاست. ازسوی دیگر بسیاری از ترکیبات ضد میکروبی و زیست‌فعال مفید ممکن است طی فرایند مواد غذایی به آرامی تخریب شده، فعالیت خود را از دست داده، سمی شده و یا اکسیده شوند. همچنین ممکن است با سایر ترکیبات موجود در غذا واکنش داده و دسترسی زیستی آنها را کاهش و یا رنگ و طعم فرآورده را تغییر دهند و باعث کاهش زمان ماندگاری محصولات غذایی گردند. استفاده از کپسوله کردن ترکیبات ضد میکروبی در بسیاری از موارد می‌تواند راه‌حل مناسبی برای حل این مشکلات گردد (Chopra, Kaur, Bernela, & Thakur, 2014).

باتوجه به اینکه نایسین ساختار پلی‌پپتیدی دارد، بنابراین می‌تواند توسط میکروارگانیزم‌های پروتئولیتیک^۶ به صورت جزئی تجزیه گردد. ازسوی دیگر به علت بافت جامد سوسیس فرانکفورتر^۷ پخش این ماده در ساختار آن همیشه به طور کامل انجام نمی‌گیرد، بنابراین نوآوری این پژوهش تولید نانوذرات نایسین می‌باشد که در ترکیب با عصاره‌های گیاهی مخلوط (چای سبز، برگ‌گزنه و برگ‌زیتون) می‌توانند پیشنهادی برای جایگزین شدن نیتريت سدیم سرطان‌زا باشند. براساس اهمیت مطالب ذکر شده، هدف این پژوهش استفاده از ترکیب ضد میکروبی طبیعی نایسین و نانوذرات نایسین به همراه عصاره گیاهان چای سبز، برگ‌زیتون و برگ‌گزنه در فرمولاسیون سوسیس فرانکفورتر بدون نیتريت و بررسی تأثیر ترکیبی آنها روی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، حسی، میکروبیولوژیکی و زمان ماندگاری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه

در این پژوهش اکثر مواد شیمیایی و کلیه محیط‌های کشت مورد استفاده از شرکت مرک آلمان با درجه خلوص تجزیه‌ای، نایسین (Nisaplin, Danisco, Copenhagen, 5000 IU/mL، ساخت دانمارک)، کیتوزان با درجه استیلاسیون ۹۵ درصد (Sigma-Aldrich، ساخت آمریکا) و آلژینات سدیم (Sigma-Aldrich، ساخت آمریکا) تهیه شدند.

گسترده‌ای از باکتری‌ها، کپک‌ها و مخمرها^۱ (Dutta, Tripathi, Mehrotra, & Dutta, 2009)، توانایی بالا در تشکیل فیلم، قدرت آنتی‌اکسیدانی بالا (Kamil, Jeon, & Shahidi, 2002)، هضم‌پذیری و غیرسمی بودن به طور گسترده در صنعت غذا به عنوان افزودنی‌های ضد میکروبی در فیلم‌ها و پوشش‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد.

چای سبز به دلیل داشتن ویژگی‌هایی از جمله خواص ضدباکتریایی، آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطان‌زایی مورد توجه محققان واقع شده است (Cooper, Morr , & Morr , 2005). همچنین عصاره چای سبز توانایی بالایی در کاهش رشد پاتوژن‌ها و باکتری‌های عامل فساد در ماده غذایی از جمله استافیلوکوکوس اورئوس^۲، کمپیلوباکتر ججونی^۳، سالمونلا تیفی^۴، لیستریا مونوسیتوژنز و کلستریدیوم پرفریجنس^۵ می‌باشد (Mbata, Debiao, & Saikia, 2008). عصاره برگ‌زیتون شامل مقادیر بالایی از ترکیبات فنولیک است که باعث ایجاد خواصی از جمله خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی در آن می‌شود، علاوه بر آن عصاره برگ‌زیتون دارای خواص دیگری از جمله ضد میکروبی، ضد التهابی و ضدویروس می‌باشد (Omar, 2010). برگ‌گزنه یکی دیگر از گیاهان با خاصیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی قوی می‌باشد که به طور سنتی در درمان برخی از بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد و علاوه بر آن در صنعت دارویی نیز به واسطه قدرت ضد میکروبی بالا مورد استفاده قرار می‌گیرد. برگ‌گزنه همچنین در درمان بیماری‌هایی از قبیل سرطان، هموروئید، آگزما و برونشیت نیز کاربرد دارد (Sezik et al., 2001).

کاهش سریع فعالیت نایسین در تعدادی از مواد غذایی یکی از فاکتورهای مهم محدودکننده اثربخشی آن در نگهداری مواد غذایی است. این کاهش فعالیت اساساً نتیجه برهمکنش اجزاء سازنده ماده غذایی مثل پروتئین‌ها و چربی‌هاست. علاوه بر آن، به دنبال افزودن مستقیم نایسین در سطح فرآورده‌های گوشتی خام یک کاهش سریع در فعالیت‌های بازدارندگی آن که به دلیل تخریب آنزیمی است، مشاهده شده است (Rose, Sporns, Stiles, & McMullen, 1999). بنابراین هدف تحقیق‌های فعلی بهبود پایداری و

¹ Mold and Yeasts

² *Staphylococcus aureus*

³ *Campylobacter jejuni*

⁴ *Salmonella typhi*

⁵ *Clostridium perfringens*

⁶ Proteolytic

⁷ Frankfurter sausage

نیز با روتاری تحت خلأ از عصاره جداسازی گردید و به مقدار ۵۰۰ پی‌پی‌ام در سوسیس‌های بدون نیتريت مورد استفاده قرار گرفت.

آماده‌سازی باکتری‌های تلقیح‌شده به سوسیس فرانکفورتر
باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (شاخص باکتری‌های گرم مثبت، ATCC: 6538) و *اشریشیاکلی* (شاخص باکتری‌های گرم منفی، ATCC: 25922) از مرکز تحقیقات کاربردی دارویی تبریز تهیه شدند. برای غنی‌سازی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* از محیط کشت تریپتیک سوی‌براث^۱ و شرایط ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد استفاده شد تا تعداد باکتری‌ها در محیط مایع تا غلظت 10^8 واحد تشکیل‌کننده در گرم افزایش پیدا کند. در نهایت از محیط کشت تریپتیک سوی‌آگار برای شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* استفاده شد و باکتری‌ها در غلظت 10^3 واحد تشکیل‌کننده در گرم به سوسیس فرانکفورتر تلقیح شدند (Greenwood, 2003).

تولید سوسیس فرانکفورتر

نمونه‌های سوسیس فرانکفورتر مورد بررسی در این پژوهش در کارخانه فراورده‌های گوشتی بشارت تبریز تولید شدند. ابتدا گوشت قرمز (۵۵ درصد) با شبکه ۴ میلی‌متر چرخ شد، سپس کلیه مواد اولیه که عبارتند از روغن مایع گیاهی (۱۲ درصد)، آب و یخ (۲۱ درصد)، نمک (۱/۵ درصد)، ادویه (۲ درصد)، نیتريت سدیم (۱۲۰ پی‌پی‌ام) نشاسته و سایر مواد خشک (۸/۱۵ درصد) و فسفات سدیم (۰/۳۵ درصد) آماده‌سازی و توزین گردید. از کاتریزاسیون با حجم ۵ کیلوگرمی (MADO، ساخت آلمان) استفاده شد. برای تولید نمونه کنترل ابتدا گوشت قرمز به همراه نمک طعام، فسفات و نیتريت سدیم به همراه نصف یخ به کاتر انتقال داده شد. در مرحله بعد نشاسته، سایر مواد خشک، ادویه و در انتهای فرایند مابقی یخ و اسید آسکوربیک اضافه شد و خمیر سوسیس (فارش) به مدت ۲ دقیقه مخلوط شد. سپس فارش بعد از پرشدن در پوشش‌های پلی‌امیدی (قطر ۲۸ میلی‌متر) و کلیپس‌زنی وارد مرحله پخت با بخار گردید. برای تولید نمونه‌های بدون نیتريت، عصاره‌های گیاهی به میزان ۵۰۰ پی‌پی‌ام همراه با یخ به کاتر اضافه گردید و

تهیه محلول نایسین

برای تهیه محلول اولیه نایسین از روش Hampikyan و Ugur (۲۰۰۷) با اندکی تغییرات استفاده شد. ۲ گرم نایسین پودری در ۲۰۰ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال ۰/۰۲ مولار به کمک حرارت ۶۰-۷۰ درجه سانتی‌گراد حل شد. سپس محلول با استفاده از فیلترهای با اندازه منافذ ۰/۲۲ میکرومتر استریل شد و برای تهیه سوسیس‌های فرانکفورتر با ۲۰۰ پی‌پی‌ام نایسین مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه نانوذرات نایسین

نانوذرات نایسین با استفاده از روش‌های Kasoju, Das و Bora (۲۰۱۰) و Bernela و همکاران (۲۰۱۴) با تغییرات اندکی به منظور افزایش کارایی انکپسولاسیون و تولید ذرات با اندازه‌های مناسب انجام شد. بدین ترتیب ۷۷/۵ میلی‌لیتر محلول نایسین (۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) با ۳/۷۵ میلی‌لیتر محلول کلرید کلسیم در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتر مخلوط شدند. سپس ۶/۲۵ میلی‌لیتر سورفاکتانت PF 68 (۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر)، ۵۸/۷۵ میلی‌لیتر آلزینات سدیم (۰/۶۳ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) و ۱۲/۵ میلی‌لیتر محلول کیتوزان (۰/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) تهیه‌شده در اسید استیک ۱ درصد (وزنی/وزنی) به ارلن اضافه شد. مخلوط به دست‌آمده به مدت ۲۱۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) به طور ملایم با کمک شیکر هم‌زده شد و در نهایت نانوذرات نایسین پس از سانتریفیوژ ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و خشک‌کردن انجام‌دای تولید شدند و برای تولید سوسیس فرانکفورتر با ۲۰۰ پی‌پی‌ام نانوذرات نایسین (اندازه: ۸۵/۹ نانومتر) مورد استفاده قرار گرفتند.

تهیه عصاره‌های گیاهی

عصاره‌های گیاهی برگ‌چای، برگ‌زیتون و برگ‌گزنه با استفاده از روش Pourmorad, Ebrahimzadeh و Hafezi (۲۰۰۸) با تغییرات جزئی تهیه شد. در این روش ابتدا برگ گیاهان طی ۴۸ ساعت در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند و سپس توسط آسیاب (Sayona, مدل SCG-133، ساخت ایران) به پودر تبدیل شدند. ۵۰ گرم از هر گیاه در داخل ارلن با ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد به مدت ۴۸ ساعت مخلوط شدند. در نهایت محلول به دست‌آمده توسط کاغذ واتمن شماره ۱ صاف‌شده و اتانول

^۱ Tryptic soy broth

آزمایش ۲ میلی‌لیتر از محلول صاف‌شده با ۲ میلی‌لیتر از معرف ۲-تیوباربتوریک اسید ۰/۰۲ مولار مخلوط و لوله آزمایش به مدت ۲۰ دقیقه به بن‌ماری محتوی آب جوش منتقل شد. پس از سرد کردن مخلوط لوله آزمایش، اندیس تیوباربتوریک اسید براساس میزان جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد و نتایج حاصل به‌صورت میلی‌گرم مالون‌دی‌آلدئید بر کیلوگرم سوسیس گزارش شد (Ahmadian, Nemati, Karimi, & Safari, 2019;) (Faustman, Specht, Malkus, & Kinsman, 1992).

ویژگی‌های رنگی

برای ارزیابی رنگ نمونه‌های سوسیس از عکس‌برداری دیجیتال شبیه‌ساز هانتربل استفاده شد. اندازه‌گیری رنگ با بررسی پیکسل‌های عکس دیجیتال سطح ماده غذایی توسط نرم‌افزار فتوشاپ (نسخه CS8) و تبدیل اندیس‌های RGB به Lab صورت گرفت (Leon, Mery, Pedreschi, & Leon, 2006).

ویژگی‌های میکروبی

ابتدا قسمت خارجی بسته‌بندی سوسیس توسط اتانول ۷۰ درصد به‌خوبی ضدعفونی و سپس پوشش پلی‌آمیدی با چاقوی استریل بریده شد. رقت ۰/۱ اولیه (10^{-1}) از اختلاط ۲۵ گرم نمونه سوسیس با ۲۲۵ گرم محلول رقیق‌کننده پیتون بافر ۰/۱ درصد استریل در یک ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتر استریل به‌دست آمد. سپس نمونه به مدت ۲ دقیقه با استفاده از هموژنایزر (IKA, ساخت آلمان) استریل مخلوط شد. درنهایت رقت‌های 10^{-2} ، 10^{-3} و تا 10^{-9} نیز در پیتون واتر استریل ۰/۱ درصد تهیه شدند. کشت باکتری‌های مزوفیل کل، کلیفرم و /شیریشاکلی به‌صورت پورپلیت به‌ترتیب با شرایط گرم‌خانه‌گذاری؛ ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد (در محیط کشت PCA^۲، هواز)، ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (در محیط کشت VRB آگار^۳، دولایه)، براساس روش MPN در مدت زمان ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ و ۴۴ درجه سانتی‌گراد (در محیط کشت‌های لوریل سولفات، EC و آب‌پپتونه)، انجام شد. همچنین شمارش /استافیوکوکوس اورئوس و کپک و مخمرها به‌صورت کشت سطحی و به‌ترتیب با

ترکیبات ضد میکروبی نایسین (۲۰۰ پی‌پی‌ام) و نانوذرات نایسین (۲۰۰ پی‌پی‌ام) در مرحله دوم به‌همراه باکتری‌های /استافیوکوکوس اورئوس و /شیریشاکلی در میزان 10^3 واحد تشکیل کلنی در گرم به کاتر اضافه گردید و پس از عملیات پرکنی و کلیپس‌زنی به‌همراه نمونه کنترل عملیات پخت در دمای ۸۵-۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ ساعت انجام شد. سپس نمونه‌های پس از سرد شدن زیر دوش‌های آب، وارد سردخانه با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد شدند. تیمارهای مورداستفاده در این پژوهش شامل سوسیس فرانکفورتر کنترل (حاوی ۱۲۰ پی‌پی‌ام نیتريت سدیم)، سوسیس فرانکفورتر حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام نایسین+۵۰۰ پی‌پی‌ام عصاره‌های گیاهی و سوسیس فرانکفورتر حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام نانوذرات نایسین+۵۰۰ پی‌پی‌ام عصاره‌های گیاهی بودند.

اندازه‌گیری pH

برای این کار از pH متر (مدل Hanna, ساخت پرتغال) که از قبل کالیبره‌شده استفاده شد. ابتدا ۲ گرم از نمونه‌های سوسیس با آب مقطر با نسبت ۱:۱۰ به‌طور اولیه مخلوط و سپس در مخلوط‌کن (IKA-WERK, مدل RER, آلمان) با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه هموژنیزه شد. درنهایت مقدار pH مورد سنجش قرار گرفت (AOAC, 2005).

ترکیب شیمیایی

آزمون‌های فعالیت آبی (a_w)، محتوای رطوبت، چربی، پروتئین و خاکستر نمونه‌های مختلف سوسیس براساس روش‌های استاندارد AOAC (۲۰۰۵) انجام شد.

محتوای اکسیداسیون چربی یا اندیس تیوباربتوریک اسید^۱ (TBARS)

میزان ۱۰ گرم نمونه سوسیس با ۲۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواسید استیک ۲۰ درصد و ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر در داخل بشر با استفاده از هموژنایزر اولتراتوراکس (IKA-WERK, مدل RER, ساخت آلمان) به مدت ۳۰ ثانیه مخلوط شد. پس از سانتریوفیوژن کردن مخلوط با ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه عمل فیلتراسیون سوپرناتانت با کاغذ واتمن شماره ۱ انجام پذیرفت. در داخل لوله

^۲ Plate Count Agar

^۳ Violet Red Bile Agar

^۱ Thiobarbituric acid reactive substances

میانگین‌ها در زمان‌های مختلف با روش حداقل میانگین مربعات^۴ به کمک نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹.۲ انجام شد. همچنین آنالیز واریانس برای ویژگی‌های فعالیت آبی، رطوبت، چربی، پروتئین، خاکستر و پارامترهای ارگانولپتیکی، به روش ANOVA و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن^۵ در سطح احتمال ($P < 0.05$) انجام گرفت.

نتایج و بحث

براساس نتایج گزارش مشخص شد که توزیع اندازه ذرات، اندیس پراکندگی چندگانه^۶، پتانسیل زتا و کارایی کپسولاسیون نانوذرات نایسین به ترتیب در محدوده ۲۰۰-۸۵/۹ نانومتر (بیش از ۷۰ درصد نانوذرات)، ۰/۴۳، ۳۳/۶ میلی‌ولت و ۸۲/۸۵ درصد بود (علیرضالو، حصاری، اسکندری، ولی‌زاده و سیروس‌آذر، ۱۳۹۷). نتایج حاصل از آنالیز واریانس و مقایسه میانگین تغییرات a_w و pH در **جدول (۱)** نشان داده شده است. در طی زمان نگهداری در تمامی نمونه‌های مختلف سوسیس a_w کاهش جزئی نشان داد. علت این کاهش می‌تواند مربوط به نفوذپذیری جزئی پوشش بسته‌بندی پلی‌آمید باشد که در طی نگهداری رطوبت به صورت سطحی تبخیر شده و میزان رطوبت و a_w به صورت غیرمعنی‌داری ($P > 0.05$) کاهش پیدا می‌کند.

شرایط گرم‌خانه‌گذاری ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (در محیط کشت BPA^۱) و ۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (در محیط کشت DRBC آگار^۲) انجام شد (FDA, 1976).

ویژگی‌های حسی

تأثیر استفاده از ترکیبات ضد میکروبی طبیعی روی ویژگی‌های ارگانولپتیکی شامل رنگ، طعم، بوی تازگی، بافت و مقبولیت کلی نمونه‌ها با استفاده از ۱۲ نفر پانلیست (مرد: ۴ نفر، زن: ۸ نفر؛ سن: ۲۰-۳۰ سال) آشنا به سوسیس فرانکفورتر از دانشجویان کارشناسی ارشد و دکتری گروه صنایع غذایی دانشگاه تبریز در روز ۴۵ مدت زمان نگهداری به روش توصیفی ۵ نقطه‌ای (۵: خیلی قوی، ۴: قوی، ۳: متوسط، ۲: ضعیف، ۱: خیلی ضعیف) و براساس روش‌های Stone و Sidel (۲۰۰۴) و Pournis, Economou, Savvaidis و Ntzimani (۲۰۰۹) انجام گرفت.

آنالیز آماری

این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تیمار سوسیس‌های فرانکفورتر در طول زمان انجام شد. برای آنالیز داده‌ها در طول زمان از روش اندازه‌گیری‌های تکرار شده در واحد زمان^۳ در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد. مقایسه

جدول ۱- تغییرات a_w و pH سوسیس‌های فرانکفورتر حاوی نایسین و نانوذرات نایسین در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد طی زمان نگهداری

ویژگی‌ها	زمان نگهداری (روز)			
	۴۵	۳۰	۱۵	۱
تیمار ۱	۰/۹۷۴±۰/۰۱۴ ^{Aa}	۰/۹۷۵±۰/۰۱۶ ^{Aa}	۰/۹۷۵±۰/۰۱۷ ^{Aa}	۰/۹۷۶±۰/۰۱۳ ^{Aa}
تیمار ۲	۰/۹۷۴±۰/۰۰۳۵ ^{Aa}	۰/۹۷۷±۰/۰۱۲ ^{Aa}	۰/۹۷۷±۰/۰۱۵ ^{Aa}	۰/۹۷۶±۰/۰۱۱ ^{Aa}
تیمار ۳	۰/۹۷۶±۰/۰۱۴ ^{Aa}	۰/۹۷۷±۰/۰۱۲ ^{Aa}	۰/۹۷۷±۰/۰۱۲ ^{Aa}	۰/۹۷۸±۰/۰۲۶ ^{Aa}
تیمار ۱	۵/۲۴±۰/۰۲۴ ^{Bd}	۵/۷۹±۰/۰۴۴ ^{Ac}	۶/۰۲±۰/۰۲۶ ^{Bb}	۶/۵۱±۰/۰۳۴ ^{Aa}
تیمار ۲	۵/۶۵±۰/۰۱۲ ^{Ac}	۵/۶۶±۰/۰۱۵ ^{Bc}	۶/۰۲±۰/۰۱۶ ^{Bb}	۶/۴۲±۰/۰۲۲ ^{Ba}
تیمار ۳	۵/۷۳±۰/۰۱۸ ^{Ad}	۵/۸۴±۰/۰۱۷ ^{Ac}	۶/۱۳±۰/۰۱۹ ^{Ab}	۶/۴۱±۰/۰۲۱ ^{Ba}

تیمار ۱: سوسیس کنترل، تیمار ۲: سوسیس حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام نایسین و تیمار ۳: سوسیس حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام نانوذرات نایسین می‌باشد.

^{a-d} حروف متفاوت در سطر نشانگر اختلاف معنی‌داری میانگین‌ها در سطح احتمال ($P < 0.05$) طی زمان نگهداری می‌باشند.

^{A-B} حروف متفاوت در ستون نشانگر اختلاف معنی‌داری میانگین‌ها در سطح احتمال ($P < 0.05$) میان تیمارهای مختلف می‌باشند.

⁴ Least Square Means

⁵ Duncan's multiple range test

⁶ Polydispersity index

¹ Baird Parker Agar

² Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar

³ Repeated Measurement

با این وجود در نمونه‌های حاوی نایسین به دلیل اثرات ضد میکروبی pH بالاتر از نمونه کنترل بود.

در جدول (۲) ویژگی‌های شیمیایی سوسیس‌های فرانکفورت حاوی نایسین و نانوذرات نایسین نشان داده شده است. نتایج نشان داد که افزودن ترکیبات ضد میکروبی تأثیر معنی‌داری ($P > 0.05$) روی ویژگی‌های شیمیایی سوسیس‌های فرانکفورت نداشت. همچنین مشخص شد نمونه‌های مختلف سوسیس فرانکفورت دارای رطوبت ۶۰/۸۲-۵۹/۶۷ درصد، چربی ۱۸/۹۶-۱۷/۵۳ درصد، پروتئین ۱۳/۸۲-۱۳/۷۴ درصد و خاکستر ۲/۹۷-۲/۲۳ درصد بودند. تیمار ۱ (کنترل) به‌طور غیرمعنی‌داری ($P > 0.05$) دارای کمترین میزان رطوبت بود. با توجه به ماهیت جذب رطوبت توسط نایسین و نانوذرات نایسین، پایین‌تر بودن محتوای رطوبت تیمار کنترل قابل توجه است. نمونه‌های سوسیس فرانکفورت حاوی نایسین و نانوذرات نایسین به دلیل ماهیت پروتئینی این ترکیبات به‌طور غیرمعنی‌داری ($P > 0.05$) دارای محتوای پروتئینی بالاتری در مقایسه با نمونه کنترل بودند. Samelis و همکاران (۲۰۰۵) با بررسی تأثیر نایسین و اسیدهای آلی برای کنترل رشد لیستریا مونوسیتوژنز در سوسیس بلوگنای خوک بسته‌بندی‌شده تحت خلأ به این نتیجه رسیدند که میزان رطوبت و چربی نمونه‌های سوسیس طی زمان نگهداری تغییر نداشت و به ترتیب برابر با ۵۴ و ۲۳ درصد بود که با نتایج این پژوهش سازگاری داشت.

جدول ۲- ترکیب شیمیایی سوسیس‌های فرانکفورت حاوی نایسین و نانوذرات نایسین در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

نمونه‌های سوسیس	ویژگی‌ها (درصد) *		
	رطوبت	چربی	پروتئین
تیمار ۱	۵۹/۶۷	۱۸/۲۸	۱۳/۷۴
تیمار ۲	۶۰/۸۵	۱۸/۹۶	۱۳/۷۵
تیمار ۳	۶۰/۸۲	۱۷/۵۳	۱۳/۸۲
خطای استاندارد	۰/۵۱	۰/۴۸	۰/۲۰

تیمار ۱: سوسیس کنترل، تیمار ۲: سوسیس حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام نایسین و تیمار ۳: سوسیس حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام نانوذرات نایسین می‌باشد.

* نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار ($P > 0.05$) بین تیمارهای مختلف می‌باشد.

پارامتر a_w به میزان آب قابل استفاده برای فعالیت‌های میکروبی، شیمیایی و آنزیمی گفته می‌شود، بنابراین تغییر آن در طی زمان نگهداری می‌تواند به‌طور معنی‌داری باعث جلوگیری از فعالیت‌های میکروبی و واکنش‌های شیمیایی گردد. نمونه‌های سوسیس فرانکفورت حاوی ترکیبات ضد میکروبی دارای اندیس a_w بالاتری نسبت به نمونه کنترل بودند. بنابراین سوسیس‌های فرانکفورت حاوی این ترکیبات اندیس a_w بیشتری از نمونه کنترل نشان دادند. با این وجود مشخص شد که اختلاف در a_w سوسیس‌های فرانکفورت معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). Wang (۲۰۰۰) و Hampikyan و Ugur (۲۰۰۷) ادعان کردند که افزودن نایسین به ترتیب به سوسیس سوچوک^۱ و سوسیس چینی تأثیری بر مقدار a_w نمونه‌ها در طی زمان نگهداری نداشت که با نتایج پژوهش اخیر مطابقت داشت.

اندیس pH در تمامی نمونه‌های مختلف سوسیس طی زمان نگهداری ۴۵ روز به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) کاهش پیدا کرد. کاهش pH می‌تواند به دلیل تولید اسیدهای آلی توسط باکتری‌ها باشد (Nattress & Baker, 2003). بنابراین هرچه فعالیت ضد میکروبی نایسین و نانوذرات نایسین بیشتر باشد از رشد باکتری‌ها جلوگیری شده و افت pH کمتر خواهد بود. در انتهای زمان نگهداری ۴۵ روز نمونه سوسیس فرانکفورت کنترل دارای کمترین (۵/۲۴) و سوسیس فرانکفورت حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام نانوذرات نایسین دارای بیشترین (۵/۸۶) میزان pH بود. در تحقیقی گزارش کردند که pH سوسیس‌های کم‌چرب چینی طی زمان نگهداری ۹ روز کاهش داشت (Lin & Chao, 2001). گزارش‌ها نشان می‌دهد که افزودن غلظت‌های مختلف نایسین تأثیر معنی‌داری ($P > 0.05$) روی تغییرات pH سوسیس سوچوک طی زمان نگهداری ۳۰ روز نداشت (Hampikyan & Ugur, 2007). Samelis و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که pH سوسیس‌های بلوگنا^۲ طی نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به دلیل فعالیت باکتری‌ها و تبدیل کربوهیدرات‌ها به اسیدهای آلی کاهش معنی‌داری ($P < 0.05$) پیدا می‌کند و محدوده pH آنها به صورت ۵/۶-۶/۶ بود که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت داشت.

¹ Sucuk sausage

² Bologna sausages

افزایش پیدا کرد. بیشترین و کمترین میزان افزایش اندیس TBARS مربوط به سوسیس فرانکفورتر کنترل (۲/۷۴ میلی گرم بر کیلوگرم) و سوسیس فرانکفورتر حاوی ۲۰۰ پی پی ام نایسین (۲/۴۱ میلی گرم بر کیلوگرم) بود. مشخص شد که نانوکپسولاسیون نایسین باعث کاهش غیرمعنی دار ($P > 0.05$) میزان اکسیداسیون چربی در طی زمان نگهداری ۴۵ روز شد. باتوجه به اینکه در تولید نانوکپسولها از کیتوزان استفاده شده بود بنابراین وجود کیتوزان به عنوان ترکیب آنتی اکسیدان توانست باعث کاهش اندیس TBARS در طی زمان نگهداری شود. باین وجود Lee, Jo, Lee و Byun (۲۰۰۱) گزارش دادند که کیتوزان فقط در شرایط بسته بندی هوازی می تواند اثرات آنتی اکسیدانی خود را نشان دهد و زمانی که سوسیس خوک تحت شرایط خلأ بسته بندی گردید اختلاف معنی داری ($P > 0.05$) میان سوسیس های خوک حاوی کیتوزان و تیمار نشده دیده نشد. Georgantelis و همکاران (۲۰۰۷) در برگرهای منجمد گوشت گاو و سوسیس خوک و Soutos, Ambrosiadis, Tzikas, Abraham و Georgantelis (۲۰۰۸) در سوسیس خوک با نیتريت کاهش یافته با غلظت ۱ درصد کیتوزان به نتایج مشابهی در کاهش تولید مالون دی آلدئید و اکسیداسیون چربی ها رسیدند. Sayas-Barberá و همکاران (۲۰۱۱) بهترین پایداری بو و رنگ در برگرهای چرخ شده گوشت گاو را در ۳ غلظت ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد کیتوزان را مشاهده کردند.

اکسیداسیون چربی ها به عنوان عامل رنسدیتی یکی از عوامل مهم فساد و کاهش کیفیت گوشت و فراورده های گوشتی است که به دلیل میزان بالای چربی و زمان طولانی مدت نگهداری این محصولات غذایی اتفاق می افتد. این پدیده منجر به افزایش اکسیداسیون پروتئین ها، ایجاد بدطعمی، آفت رنگ و در نهایت نقایص ارگانولپتیکی و بافتی در فراورده های گوشتی می شود (Georgantelis, Blekas, Katikou, Ambrosiadis, & Fletouris, 2007). اکسیداسیون پروتئین هایی مانند میوگلوبین منجر به تولید مت میوگلوبین^۱ قهوه ای رنگ شده که ظاهر گوشت و فراورده های گوشتی را تحت تأثیر قرار می دهد. Williams و همکاران (۱۹۹۲) گزارش دادند که بدرنگی ناشی از تولید رنگ قهوه ای منجر به کاهش فروش و تجارت گوشت قرمز به میزان ۴/۵ درصد و فراورده های گوشتی به میزان ۳/۷ درصد شده است. در جدول (۳) نتایج حاصل از آنالیز واریانس و مقایسه میانگین های اکسیداسیون چربی بر مبنای اندیس تیوباربتوریک اسید در سوسیس های فرانکفورتر نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی گراد را نشان می دهد. نتایج نشان داد که افزودن نایسین و نانوذرات نایسین به نمونه های مختلف سوسیس فرانکفورتر دارای تأثیر معنی داری ($P < 0.05$) روی اندیس TBARS بود. به طوری که نمونه کنترل دارای بالاترین میزان TBARS در کل زمان نگهداری ۴۵ روز بود. در تمامی نمونه های سوسیس اندیس TBARS تا انتهای زمان نگهداری به طور معنی داری ($P < 0.05$)

جدول ۳- تغییرات TBARS (میلی گرم مالون دی آلدئید بر کیلوگرم سوسیس) سوسیس های فرانکفورتر حاوی نایسین و نانوذرات نایسین در دمای ۴ درجه سانتی گراد طی زمان نگهداری

زمان نگهداری (روز)				نمونه های سوسیس
۴۵	۳۰	۱۵	۱	
۲/۷۴±۰/۰۶ ^{Aa}	۲/۱۳±۰/۰۳ ^{Ab}	۱/۴۱±۰/۰۳ ^{Ac}	۰/۳۶±۰/۰۴ ^{Ad}	تیمار ۱
۲/۴۱±۰/۰۳ ^{Ba}	۱/۷۹±۰/۰۲ ^{Cb}	۰/۵۵±۰/۰۲ ^{Bc}	۰/۳۲±۰/۰۱ ^{Ad}	تیمار ۲
۲/۳۸±۰/۰۱ ^{Ba}	۱/۸۶±۰/۰۳ ^{Bb}	۰/۵۸±۰/۰۳ ^{Bc}	۰/۳۱±۰/۰۳ ^{Ad}	تیمار ۳

تیمار ۱: سوسیس کنترل، تیمار ۲: سوسیس حاوی ۲۰۰ پی پی ام نایسین و تیمار ۳: سوسیس حاوی ۲۰۰ پی پی ام نانوذرات نایسین می باشد.
^{a-d} حروف متفاوت در سطر نشانگر اختلاف معنی داری میانگین ها در سطح احتمال ($P < 0.05$) طی زمان نگهداری می باشند.
^{A-B} حروف متفاوت در ستون نشانگر اختلاف معنی داری میانگین ها در سطح احتمال ($P < 0.05$) میان تیمارهای مختلف می باشند.

¹ Metmyoglobin

پارامترهای محدودکننده زمان ماندگاری و بروز فساد محسوب می‌شود. در بین سوسیس‌های فرانکفورتر حاوی ترکیبات ضد میکروبی نمونه حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام نانوذرات نایسین به دلیل داشتن کیتوزان دارای اندیس قرمزی بالاتری بوده و در طی زمان نگهداری آفت کمتری را نشان داد. مطابق با نتایج اندیس TBARS و اندیس قرمزی مشخص شد که کیتوزان ممکن است اکسیداسیون چربی‌ها و تبدیل میوگلوبین به مت‌میوگلوبین را به تأخیر اندازد و باعث جلوگیری از کاهش اندیس قرمزی در طی زمان نگهداری گردد که این نتایج با گزارش Petrou و همکاران (۲۰۱۲) سازگاری داشت. نتایج حاصل از اندیس زردی در نمونه‌های مختلف سوسیس فرانکفورتر در طی زمان نگهداری ۴۵ روز نشان داد که اندیس زردی به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) کاهش پیدا کرد. همچنین باید ذکر کرد کاربرد نایسین و نانوذرات نایسین به دلیل ماهیت زرد باعث افزایش اندیس زردی در تیمارهای ۲ و ۳ در طی زمان نگهداری شد. Giatrakou، Ntzimani، و Savvaidis (۲۰۱۰) گزارش دادند که تغییرات اندیس زردی در محصولات گوشتی الگوی خاصی نداشته و براساس نوع محصول، فرمولاسیون و نوع بسته‌بندی در طی زمان نگهداری می‌تواند، تغییر کند. بر همین اساس Jo و همکاران (۲۰۰۱) و Giatrakou و همکاران (۲۰۱۰) روند افزایشی اندیس زردی و Georgantelis و همکاران (۲۰۰۷) روند کاهش اندیس زردی در طی زمان نگهداری را گزارش دادند که نتایج پژوهش حاضر با گزارش Georgantelis و همکاران (۲۰۰۷) مطابقت داشت.

جدول (۵) نتایج حاصل از تغییرات شمارش میکروارگانیزم‌های سوسیس‌های کنترل و بدون نیتريت در مدت زمان نگهداری ۴۵ روز را نشان می‌دهد. در تمامی تیمارها شمارش باکتری‌های مزوفیل کل افزایش یافت. بیشترین میزان افزایش مربوط به سوسیس فرانکفورتر کنترل (تیمار ۱) بود که فقط دارای نیتريت سدیم بود. در تیمارهای ۲ و ۳ به دلیل اینکه از عصاره‌های چای سبز، گزنه و برگ‌زیتون و ترکیبات ضد میکروبی نایسین و نانوذرات نایسین استفاده شده بود شمارش باکتری‌های مزوفیل کل پایین‌تری از تیمار ۱ داشتند، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این ترکیبات دارای اثرات ضد میکروبی بالایی نسبت به نیتريت سدیم بودند. Alip و Aksu (۲۰۱۰) تأثیرات عصاره برگ‌گزنه در غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام را روی سوسیس سوچوک مورد ارزیابی قرار دادند و تأثیرات معنی‌دار آن در مقابل رشد

ویژگی‌های ظاهری و رنگ گوشت و فراورده‌های گوشتی از مهم‌ترین پارامترهای بازارپسندی می‌باشند. بنابراین هنگام استفاده از عوامل ضد میکروبی توجه به مقدار مصرف که تأثیر نامطلوب روی ویژگی‌های رنگی محصول نداشته باشد، حائز اهمیت می‌باشد. در **جدول (۴)** داده‌های حاصل از اندیس‌های روشنایی، قرمزی و زردی نمونه‌های مختلف سوسیس فرانکفورتر در طی زمان نگهداری آورده شده است. مشخص شد که در تمامی نمونه‌های مختلف سوسیس فرانکفورتر طی زمان نگهداری روشنایی به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) کاهش پیدا کرد که با گزارش Suman و همکاران (۲۰۱۱) مطابقت داشت. با این‌وجود Jo و همکاران (۲۰۰۱) ذکر کردند که اندیس روشنایی در سوسیس خوک حاوی کیتوزان اولیگومر^۱ در مدت زمان نگهداری ۲۱ روز تغییر چندانی پیدا نکرد که در پژوهش اخیر نیز چون در تولید نانوذرات نایسین از پوشش کیتوزان استفاده شده بود، بنابراین کاهش چشمگیری در اندیس روشنایی سوسیس فرانکفورتر در طی زمان نگهداری دیده نشد.

اندیس روشنایی در سوسیس‌های فرانکفورتر حاوی نانوذرات نایسین و نایسین تفاوت معنی‌داری با همدیگر نداشتند ولی به‌طور معنی‌داری در نمونه‌های تیمار شده کمتر از نمونه‌های کنترل بودند که این مورد توسط محققان دیگر نیز به اثبات رسیده است (Alirezalu et al., 2019). Petrou، Tsiraki، Giatrakou و Savvaidis (۲۰۱۲) نشان دادند که گوشت سینه مرغ بسته‌بندی‌شده در اتمسفر تغییر یافته حاوی کیتوزان و عصاره پونه کوهی دارای اندیس روشنایی بالاتری نسبت به نمونه کنترل (بدون نیتريت) بودند که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت داشت. نتایج حاصل از داده‌های اندیس قرمزی نشان داد که افزودن عوامل ضد میکروبی باعث ایجاد اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) در شدت رنگ قرمز شدند. مشخص شد که در طی زمان نگهداری ۴۵ روز در تمامی نمونه‌های مختلف سوسیس فرانکفورتر اندیس قرمزی کاهش پیدا کرد. بیشترین میزان کاهش اندیس قرمزی در نمونه‌های حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام نایسین بود. مشخص شد که نیتريت سدیم با تولید نیتروزیل میوگلوبین می‌تواند باعث جلوگیری از کاهش اندیس قرمزی طی نگهداری سوسیس فرانکفورتر گردد. آفت اندیس قرمزی در گوشت و فراورده‌های گوشتی از

¹ Oligomer

افزایش شمارش باکتری‌های کل به بیش از ۷ لگاریتم واحد تشکیل کلنی در گرم (Sofos, 1989) باعث ایجاد بدطعمی و عدم پذیرش گوشت و فراورده‌های گوشتی می‌شود. براین اساس در تمامی تیمارها در طی زمان نگهداری ۴۵ روز شمارش باکتری‌های مزوفیل کل در محدوده استاندارد بود که نشان‌دهنده افزایش زمان ماندگاری سوسیس‌های فرانکفورتر بدون نیتریت بودند.

باکتری‌های مزوفیل کل، سرماگرا و باکتری‌های اسید لاکتیک را گزارش دادند. استفاده از عصاره برگ چای سبز در صدف چروک به‌طور معنی‌داری می‌تواند رشد باکتری‌های مزوفیل کل را در زمان نگهداری در یخچال کاهش دهد (Xi, Liu, & Su, 2012). مشخص شد که نانوذرات نایسین به‌دلیل آزادسازی کنترل‌شده و پخش بهتر دارای اثرات ضد میکروبی غیرمعنی‌دار بالاتری نسبت به نایسین محلول بودند. براساس استانداردهای میکروبی،

جدول ۴- تغییرات ویژگی‌های رنگی سوسیس‌های فرانکفورتر حاوی نایسین و نانوذرات نایسین در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد طی زمان نگهداری

ویژگی‌ها	نمونه‌های سوسیس	زمان نگهداری (روز)		
		۴۵	۳۰	۱۵
L*	تیمار ۱	۵۵/۲۲±۰/۱۸۶ ^{Ac}	۵۷/۳۵±۰/۳۷ ^{Ab}	۵۷/۷۴±۰/۶۳ ^{Aab}
	تیمار ۲	۴۳/۲۱±۰/۲۶ ^{Bb}	۴۵/۰۰±۰/۴۰ ^{Ba}	۴۴/۴۳±۰/۴۵ ^{Ba}
	تیمار ۳	۴۳/۶۷±۰/۳۴ ^{Bb}	۴۵/۰۴±۰/۴۶ ^{Ba}	۴۴/۵۷±۰/۷۶ ^{Ba}
a*	تیمار ۱	۱۱/۷۹±۰/۳۶ ^{Ac}	۱۳/۲۱±۰/۱ ^{Ab}	۱۳/۲۸±۰/۲۲ ^{Ab}
	تیمار ۲	-۲/۲۸±۰/۲۱ ^{Bc}	-۱/۷۷±۰/۲۵ ^{Bbc}	-۱/۵۰±۰/۳۳ ^{Bb}
	تیمار ۳	-۲/۱۱±۰/۳۲ ^{Bc}	-۱/۲۵±۰/۵۶ ^{Bbc}	-۰/۹۷±۰/۱۵ ^{Bb}
b*	تیمار ۱	۱۶/۳۲±۰/۶۵ ^{Aa}	۱۶/۹۷±۰/۴۶ ^{Aa}	۱۶/۶۴±۰/۳۰ ^{Ba}
	تیمار ۲	۱۶/۸۴±۰/۴۵ ^{Ab}	۱۶/۵۹±۰/۵۵ ^{Ab}	۱۷/۵۰±۰/۳۵ ^{ABab}
	تیمار ۳	۱۷/۲۰±۰/۳۶ ^{Ab}	۱۶/۶۵±۰/۴۶ ^{Ab}	۱۷/۵۲±۰/۲۴ ^{Aa}

تیمار ۱: سوسیس کنترل، تیمار ۲: سوسیس حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام نایسین و تیمار ۳: سوسیس حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام نانوذرات نایسین می‌باشد.
^{a-d} حروف متفاوت در سطر نشانگر اختلاف معنی‌داری میانگین‌ها در سطح احتمال ($P < 0.05$) طی زمان نگهداری می‌باشند.
^{A-B} حروف متفاوت در ستون نشانگر اختلاف معنی‌داری میانگین‌ها در سطح احتمال ($P < 0.05$) میان تیمارهای مختلف می‌باشند.

جدول ۵- تغییرات شمارش میکروارگانیزم‌های سوسیس‌های فرانکفورتر حاوی نایسین و نانوذرات نایسین در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد طی زمان نگهداری

میکروارگانیزم (لگاریتم واحد تشکیل کلنی در گرم)	نمونه‌های سوسیس	زمان نگهداری (روز)		
		۴۵	۳۰	۱۵
باکتری‌های مزوفیل کل	تیمار ۱	۵/۳۸±۰/۰۷ ^{Ba}	۵/۰۶±۰/۰۹ ^{Aab}	۴/۵۸±۰/۰۹ ^{Ab}
	تیمار ۲	۵/۹۲±۰/۰۳ ^{Aa}	۴/۶۷±۰/۰۷ ^{Bb}	۳/۶۲±۰/۰۳ ^{Bc}
	تیمار ۳	۵/۶۳±۰/۰۷ ^{Aa}	۴/۶۱±۰/۰۴ ^{Bb}	۳/۸۶±۰/۰۵ ^{Bc}
استافیلوکوکوس اورئوس	تیمار ۱	۰/۶۴±۰/۰۳ ^{Bc}	۱/۷۳±۰/۰۹ ^{Ab}	۲/۵۸±۰/۰۵ ^{Aa}
	تیمار ۲	۱/۹۲±۰/۰۸ ^{Ac}	۱/۴۵±۰/۰۳ ^{Ab}	۲/۸۹±۰/۰۷ ^{Aa}
	تیمار ۳	nd	۱/۱۱±۰/۰۴ ^{Ab}	۲/۷۵±۰/۰۳ ^{Aa}
اشریشیاکلی	تیمار ۱	۰/۲۱±۰/۰۳ ^{Bd}	۱/۰۳±۰/۰۹ ^{Bc}	۱/۶۷±۰/۰۵ ^{Bb}
	تیمار ۲	۲/۳۴±۰/۰۸ ^{Ac}	۲/۵۶±۰/۰۳ ^{Abc}	۲/۷۴±۰/۰۷ ^{Aab}
	تیمار ۳	۲/۰۳±۰/۰۴ ^{Ac}	۲/۴۳±۰/۰۴ ^{Ab}	۲/۷۵±۰/۰۳ ^{Aab}
کپک‌ها و مخمرها	تیمار ۱	۲/۳۴±۰/۰۹ ^{Ba}	۱/۸۷±۰/۰۴ ^{ABb}	۱/۳۹±۰/۰۲ ^{Bc}
	تیمار ۲	۲/۵۴±۰/۰۳ ^{Aa}	۲/۱۶±۰/۱۸ ^{Ab}	۱/۶۵±۰/۰۴ ^{Ac}
	تیمار ۳	۲/۳۱±۰/۰۴ ^{Ba}	۱/۷۶±۰/۰۷ ^{Bb}	۱/۴۸±۰/۰۷ ^{Bc}

تیمار ۱: سوسیس کنترل، تیمار ۲: سوسیس حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام نایسین و تیمار ۳: سوسیس حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام نانوذرات نایسین می‌باشد.
^{a-d} حروف متفاوت در سطر نشانگر اختلاف معنی‌داری میانگین‌ها در سطح احتمال ($P < 0.05$) طی زمان نگهداری می‌باشند.
^{A-B} حروف متفاوت در ستون نشانگر اختلاف معنی‌داری میانگین‌ها در سطح احتمال ($P < 0.05$) میان تیمارهای مختلف می‌باشند.

سوسیس‌های حاوی نایسین و نانوذرات نایسین شمارش بالایی از *اشریشیاکلی* (۲/۳۴-۲/۰۳ لگاریتم واحد تشکیل کُنی در گرم) را داشتند و مشخص شد که نایسین و نانوذرات آن دارای اثرات بازدارندگی زیادی روی این باکتری نیستند. Elmani (۲۰۱۴) با بررسی تأثیر نایسین و کیتوزان به‌صورت پوشش‌دهی روی شمارش *اشریشیاکلی* به این نتیجه رسیدند که نایسین تأثیر معنی‌داری روی کاهش شمارش باکتری در شرایط آزمایشگاهی نداشت که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت داشت. مشخص شد که نانوذرات نایسین دارای اثرات بازدارندگی بیشتری نسبت به نایسین محلول روی *اشریشیاکلی* بودند.

نتایج نشان داد که در طی زمان نگهداری ۴۵ روز شمارش کپک‌ها و مخمرها در تمامی نمونه‌های مختلف سوسیس فرانکفورتر افزایش پیدا کرد. مشخص شد که بیشترین میزان افزایش مربوط به سوسیس‌های حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام نایسین بود. مطابق با استاندارد ملی ایران (سازمان ملی استاندارد ایران [ISIRI], ۱۳۸۴) تعداد کپک‌ها و مخمرها حداکثر ۲ لگاریتم واحد تشکیل کُنی در گرم می‌باشد و براساس جدول (۵) مشخص شد که شمارش کپک‌ها و مخمرها در تیمارهای حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام نانوذرات نایسین و ۱۲۰ پی‌پی‌ام نیتريت سدیم تا روز ۳۰ زمان نگهداری در حد مجاز بودند ولی در روز ۴۵ از حد استاندارد افزایش پیدا کردند. Khajehali, Shekarforoush, Nazer و Hoseinzadeh (۲۰۱۲) نشان دادند که استفاده از ترکیب بسته‌بندی تغییر یافته (دی‌اکسیدکربن ۳۹/۵ درصد، نیتروزن ۶۰ درصد و مونوکسیدکربن ۰/۵ درصد) و نایسین (۳۰ پی‌پی‌ام) می‌تواند شمارش کپک و مخمر را به میزان ۱ لگاریتم واحد تشکیل کُنی در گرم در سوسیس امولسیون کاهش دهد. با این وجود Guerra, Macias, Agrasar و Castro (۲۰۰۵) اذعان کردند که نایسین بیشتر روی باکتری‌های گرم مثبت دارای فعالیت ضد میکروبی و روی باکتری‌های گرم منفی، کپک‌ها و مخمرها تأثیر کمی دارد. با این وجود نانوذرات نایسین برخلاف نایسین به دلیل پخش بهتر و اندازه ذرات کوچک‌تر دارای اثرات ضدقارچی نیز بودند. Thomas و Delves-Broughton (۲۰۰۵) دلیل عدم تأثیر نایسین روی کپک‌ها و مخمرها را ساختار ویژه غشای خارجی آنها عنوان کرد که به نایسین اجازه تعامل با مکان‌های فعال را نمی‌دهد.

استافیلوکوکوس اورئوس باکتری بیماری‌زایی است که رشد آن در سوسیس به‌علت تولید انترتوکسین^۱ موجب به‌خطرافتادن سلامت مصرف‌کنندگان می‌شود. انترتوکسین‌ها به حرارت مقاوم بوده و سوسیس محیط مناسبی برای رشد این باکتری می‌باشد (Morgen, 2011). بنابراین جلوگیری از رشد آن حائز اهمیت بوده و در این ارتباط استفاده از ترکیبات ضد میکروبی طبیعی خیلی مطلوب می‌باشد. در تمامی نمونه‌های مختلف سوسیس فرانکفورتر شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) کاهش پیدا کرد و در انتهای زمان نگهداری ۴۵ روز در تیمار ۳ غیرقابل شمارش بود. نتایج دیگر محققین نشان داد که با بررسی تأثیر ترکیبات ضد میکروبی نایسین، کیتوزان و لیزوزیم^۲ روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در محصول گوشتی خام^۳ به این نتیجه رسیدند که نایسین دارای اثرات کشندگی بیشتری نسبت به کیتوزان و لیزوزیم است (Elmani, 2014). این محققان نشان دادند که شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه حاوی نایسین و کیتوزان به میزان ۲/۵ لگاریتم واحد تشکیل کُنی در گرم پایین‌تر از نمونه کنترل بود. Aymerich, Jofré و Garriga (۲۰۰۷) گزارش دادند که کاربرد توأم نایسین (۱۲۸۰ واحد بین‌المللی بر گرم) و فشار بالا (۶۰۰ مگاپاسکال) در همبرگر عمل‌آوری‌شده خشک باعث کاهش تعداد *استافیلوکوکوس اورئوس* از ۳/۵ به صفر لگاریتم واحد تشکیل کُنی در گرم در مدت زمان ۷ روز شد. مشخص شد که کاربرد نانوذرات نایسین دارای فعالیت ضد میکروبی بیشتری نسبت به خود نایسین بودند. از سوی دیگر چون در انتهای زمان نگهداری شمارش این باکتری در تیمار ۱ به صفر کاهش پیدا نکرد، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از نیتريت سدیم در غلظت ۱۲۰ پی‌پی‌ام نمی‌تواند شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* حاوی ۱۰^۳ واحد تشکیل کُنی در گرم در سوسیس فرانکفورتر را به صفر کاهش دهد.

نتایج آنالیز واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که افزودن عصاره گیاهی، ترکیبات ضد میکروبی طبیعی دارای تأثیر معنی‌داری ($P < 0.05$) روی شمارش باکتری *اشریشیاکلی* بود. در انتهای زمان نگهداری

¹ Enterotoxin

² Lysozyme

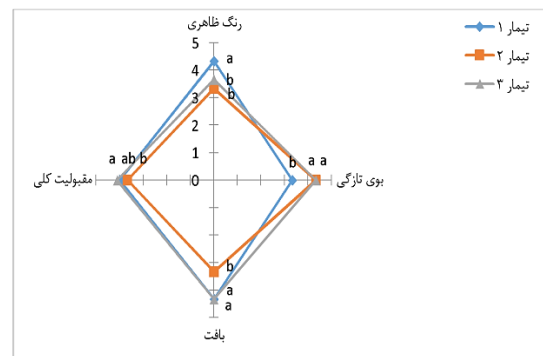
³ Cig kofte

محصول حاصل از مغز گاو باعث افزایش رنگ صورتی آن می‌شود که با نتایج پژوهش اخیر مطابقت داشت. به طوری که چون در تهیه نانوذرات از کیتوزان استفاده شده بود، بنابراین عامل بهبود رنگ صورتی محصول نهایی شد. همان‌طور که قبلاً نیز اشاره شد کیتوزان دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی است، بنابراین با تأثیر در اکسیداسیون می‌تواند مانع تولید عطر و طعم و بوی نامطلوب شده و در نهایت امتیازهای ارگانولپتیکی را افزایش می‌دهد.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که در طی زمان نگهداری سوسیس‌های بدون نیتريت اندیس‌های a_w ، pH، اندیس روشنایی، اندیس قرمزی، اندیس زردی، شمارش باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیاکلی کاهش و در مقابل اندیس‌های TBARS، شمارش باکتری‌های مزوفیل کل، کپک‌ها و مخمرها افزایش پیدا کرد. براساس نتایج می‌توان اظهار کرد که کاربرد تکنولوژی هردل می‌تواند به صورت مطلوبی در تولید سوسیس فرانکفورتر بدون نیتريت و با زمان ماندگاری بالا مورد استفاده قرار گیرد. به طوری که نانوذرات نایسین بهتر از نایسین و نیتريت سدیم فعالیت ضد میکروبی در مقابل استافیلوکوکوس اورئوس را نشان داد. از سوی دیگر چون در سوسیس‌های حاوی نایسین و نانوذرات نایسین از نیتريت به عنوان عامل مؤثر در رنگ صورتی محصول استفاده نشده بود، بنابراین برای بهبود رنگ و کاهش اکسیداسیون چربی‌ها استفاده از کیتوزان مطلوب می‌باشد. در نهایت باید ذکر کرد که چون نایسین و نانوذرات نایسین با عصاره‌های گیاهی دارای اثرات سینرژیستی هستند، بنابراین تولید سوسیس فرانکفورتر حاوی ترکیبی از ۵۰۰ پی‌پی‌ام عصاره‌های گیاهی ترکیبی (چای سبز، گزنه و برگ زیتون) و ۲۰۰ پی‌پی‌ام نانوذرات نایسین از جنبه‌های مختلف مطلوب خواهد بود.

مشخص شد که در بین تیمارهای مورد بررسی در روز ۴۵ اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) از لحاظ ویژگی‌های ارگانولپتیکی وجود داشت (شکل ۱). نتایج حاصل از بررسی‌ها نشان داد که تیمار کنترل دارای رنگ ظاهری بیشتری نسبت به سوسیس‌های حاوی نایسین و نانوذرات نایسین بودند که علت آن مربوط به تشکیل نیتروزیل میوگلوبین پایدار صورتی‌رنگ می‌باشد. مشخص شد که تیمار نانوذرات نایسین در مقایسه با نایسین دارای امتیازهای حسی بیشتری بود که براساس نتایج حاصل از ویژگی‌های شیمیایی و میکروبی نیز قابل پیش‌بینی بود. از سوی دیگر سوسیس حاوی نانوذرات نایسین در مقایسه با تیمار کنترل به جز در رنگ ظاهری دارای ویژگی‌های حسی برتری بود.



شکل ۱- ویژگی‌های حسی سوسیس‌های فرانکفورتر حاوی نیتريت سدیم، نایسین و نانوذرات نایسین در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

تیمار ۱: سوسیس کنترل، تیمار ۲: سوسیس حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام نایسین و تیمار ۳: سوسیس حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام نانوذرات نایسین می‌باشد.

^{a-d} حروف متفاوت در هر ویژگی نشانگر اختلاف معنی‌داری میانگین‌ها در سطح احتمال ($P < 0.05$) می‌باشند.

De Souza (۲۰۱۱) نشان دادند که افزودن کیتوزان به

منابع

- سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۸۴). سوسیس و کالباس-ویژگی‌ها و روش‌های آزمون. (استاندارد ملی ایران به شماره ۲۳۰۳، تجدیدنظر سوم، برگرفته از <http://standard.isiri.gov.ir/StandardView.aspx?Id=35104>)
- علیرضالو، ک.، حصاری، ج.، اسکندری، م.، ولی‌زاده، ه.، و.، و سیروس‌آذر، م. (۱۳۹۷). بررسی ویژگی‌های میکروبیولوژیکی و حسی سوسیس فرانکفورتر فراسودمند در مدت زمان نگهداری. *علوم و صنایع غذایی ایران*، ۱۵ (۸۳)، ۲۶۷-۲۸۰.

Adams, M., & Moss, M. (2000). The microbiology of food preservation. In *Food microbiology* (pp. 65-120).

- Ahmadian, H., Nemati, Z., Karimi, A., & Safari, R. (2019). Effect of different dietary selenium sources and storage temperature on enhancing the shelf life of quail eggs. *Animal Production Research*, 8(2).
- Alirezalu, K., Hesari, J., Eskandari, M. H., Valizadeh, H., Sirousazar, M., & Nemati, Z. (2019). Evaluation of microbiological and sensory properties of functional frankfurter sausage during storage. *Food Science and Technology*, 15(83), 267-280. (in Persian)
- Alirezalu, K., Hesari, J., Nemati, Z., Munekata, P. E., Barba, F. J., & Lorenzo, J. M. (2019). Combined effect of natural antioxidants and antimicrobial compounds during refrigerated storage of nitrite-free frankfurter-type sausage. *Food research international*, 120, 839-850. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.048>
- Alp, E., & Aksu, M. İ. (2010). Effects of water extract of *Urtica dioica* L. and modified atmosphere packaging on the shelf life of ground beef. *Meat Science*, 86(2), 468-473. doi:<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.05.036>
- AOAC. (2005). Meat and meat products. In Official Methods of Analysis, 16th Ed. In: Association of Official Analytical Chemists International, Arlington.
- Azham, N. A. (2011). *Physicochemical and sensory characteristics of vegetarian sausage*. Universiti Teknologi MARA,
- Bento, R. A., Stamford, T. L. M., Stamford, T. C. M., De Andrade, S. A. C., & De Souza, E. L. (2011). Sensory evaluation and inhibition of *Listeria monocytogenes* in bovine pâté added of chitosan from *Mucor rouxii*. *LWT-Food Science and Technology*, 44(2), 588-591. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.08.016>
- Bernela, M., Kaur, P., Chopra, M., & Thakur, R. (2014). Synthesis, characterization of nisin loaded alginate–chitosan–pluronic composite nanoparticles and evaluation against microbes. *LWT-Food Science and Technology*, 59(2), 1093-1099. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.061>
- Chopra, M., Kaur, P., Bernela, M., & Thakur, R. (2014). Surfactant assisted nisin loaded chitosan-carageenan nanocapsule synthesis for controlling food pathogens. *Food Control*, 37, 158-164. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.024>
- Colmenero, F. J. (2000). Relevant factors in strategies for fat reduction in meat products. *Trends in Food Science & Technology*, 11(2), 56-66. doi:[https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)00042-X](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)00042-X)
- Cooper, R., Morré, D. J., & Morré, D. M. (2005). Medicinal benefits of green tea: Part I. Review of noncancer health benefits. *Journal of Alternative & Complementary Medicine*, 11(3), 521-528. doi:<https://doi.org/10.1089/acm.2005.11.521>
- Das, R. K., Kasoju, N., & Bora, U. (2010). Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cancer cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(1), 153-160. doi:<https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.05.009>
- Davidson, K., MacGregor, M. W., Stuhr, J., & Gidron, Y. (1999). Increasing constructive anger verbal behavior decreases resting blood pressure: A secondary analysis of a randomized controlled hostility intervention. *International Journal of Behavioral Medicine*, 6(3), 268-278.
- De Smet, S., & Vossen, E. (2016). Meat: The balance between nutrition and health. A review. *Meat Science*, 120, 145-156. doi:<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.04.008>
- Dutta, P., Tripathi, S., Mehrotra, G., & Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food chemistry*, 114(4), 1173-1182. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.047>
- Ebrahimpzadeh, M. A., Pourmorad, F., & Hafezi, S. (2008). Antioxidant activities of Iranian corn silk. *Turkish Journal of biology*, 32(1), 43-49.
- Economou, T., Pournis, N., Ntzimani, A., & Savvaidis, I. (2009). Nisin–EDTA treatments and modified atmosphere packaging to increase fresh chicken meat shelf-life. *Food chemistry*, 114(4), 1470-1476. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.036>
- Elmani, M. (2014). Effects of Different Concentration of Nisin, Lysozyme, and Chitosan on The Changes of Microorganism Profile in Produced Çiğ Köfte (Turkish Traditional Meat Product; Raw Meatball) During The Production Stage. *Manas Journal of Engineering*, 2(2), 30-45.
- FAO, O. (2013). WHO, 2010. *FAO/WHO Ex*.

- Faustman, C., Specht, S., Malkus, L., & Kinsman, D. (1992). Pigment oxidation in ground veal: Influence of lipid oxidation, iron and zinc. *Meat Science*, 31(3), 351-362. doi:[https://doi.org/10.1016/0309-1740\(92\)90064-B](https://doi.org/10.1016/0309-1740(92)90064-B)
- FDA. (1976). bacteriological analytical manual for foods. Bureau of foods division of microbiology In: Association of Official Analytical Chemists.
- Georgantelis, D., Blekas, G., Katikou, P., Ambrosiadis, I., & Fletouris, D. J. (2007). Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on lipid oxidation and colour stability during frozen storage of beef burgers. *Meat Science*, 75(2), 256-264. doi:<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.07.018>
- Giatrakou, V., Ntzimani, A., & Savvaidis, I. (2010). Effect of chitosan and thyme oil on a ready to cook chicken product. *Food microbiology*, 27(1), 132-136. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.09.005>
- Greenwood, M. (2003). *Practical food microbiology*: Blackwell Pub.
- Guerra, N. P., Macias, C. L., Agrasar, A. T., & Castro, L. (2005). Development of a bioactive packaging cellophane using Nisaplin® as biopreservative agent. *Letters in applied microbiology*, 40(2), 106-110. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01649.x>
- Hampikyan, H., & Ugur, M. (2007). The effect of nisin on *L. monocytogenes* in Turkish fermented sausages (sucuks). *Meat Science*, 76(2), 327-332.
- Iranian National Standardization Organization. (2005). Sausages-Specifications and test methods. (ISIRI No. 3th.Revision). Retrieved from <http://standard.isiri.gov.ir/StandardView.aspx?Id=35104> (in Persian)
- Jo, C., Lee, J., Lee, K., & Byun, M. (2001). Quality properties of pork sausage prepared with water-soluble chitosan oligomer. *Meat Science*, 59(4), 369-375. doi:[https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(01\)00089-4](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(01)00089-4)
- Jofré, A., Aymerich, T., & Garriga, M. (2008). Assessment of the effectiveness of antimicrobial packaging combined with high pressure to control *Salmonella* sp. in cooked ham. *Food Control*, 19(6), 634-638. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.06.007>
- Kamil, J. Y., Jeon, Y.-J., & Shahidi, F. (2002). Antioxidative activity of chitosans of different viscosity in cooked comminuted flesh of herring (*Clupea harengus*). *Food chemistry*, 79(1), 69-77. doi:[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00180-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00180-2)
- Khajehali, E., Shekarforoush, S. S., Nazer, A. H., & Hoseinzadeh, S. (2012). Effects of nisin and modified atmosphere packaging (map) on the quality of emulsion-type sausage. *Journal of Food Quality*, 35(2), 119-126. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2012.00438.x>
- Kuwano, K., Tanaka, N., Shimizu, T., Nagatoshi, K., Nou, S., & Sonomoto, K. (2005). Dual antibacterial mechanisms of nisin Z against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International journal of antimicrobial agents*, 26(5), 396-402. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.08.010>
- Leon, K., Mery, D., Pedreschi, F., & Leon, J. (2006). Color measurement in L* a* b* units from RGB digital images. *Food research international*, 39(10), 1084-1091. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.03.006>
- Lin, K.-W., & Chao, J.-Y. (2001). Quality characteristics of reduced-fat Chinese-style sausage as related to chitosan's molecular weight. *Meat Science*, 59(4), 343-351. doi:[https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(01\)00084-5](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(01)00084-5)
- Mbata, T., Debiao, L., & Saikia, A. (2008). Antibacterial activity of the crude extract of Chinese green tea (*Camellia sinensis*) on *Listeria monocytogenes*. *African journal of Biotechnology*, 7(10).
- Morgen, N. (2011). *Fermented sausage- Product development at lindell's Gardsslakteri*. (master's thesis), Department of Food Science, SLU, Swedish University of Agricultural Sciences
- Nattress, F. M., & Baker, L. P. (2003). Effects of treatment with lysozyme and nisin on the microflora and sensory properties of commercial pork. *International journal of food microbiology*, 85(3), 259-267. doi:[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00545-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00545-7)
- Omar, S. H. (2010). Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Scientia pharmaceutica*, 78(2), 133-154. doi:<https://doi.org/10.3797/scipharm.0912-18>

- Ozel, M. Z., Gogus, F., Yagci, S., Hamilton, J. F., & Lewis, A. C. (2010). Determination of volatile nitrosamines in various meat products using comprehensive gas chromatography–nitrogen chemiluminescence detection. *Food and Chemical Toxicology*, 48(11), 3268-3273. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.08.036>
- Pegg, R. B., & Shahidi, F. (2008). *Nitrite curing of meat: The N-nitrosamine problem and nitrite alternatives*: John Wiley & Sons.
- Petrou, S., Tsiraki, M., Giatrakou, V., & Savvaidis, I. (2012). Chitosan dipping or oregano oil treatments, singly or combined on modified atmosphere packaged chicken breast meat. *International journal of food microbiology*, 156(3), 264-271. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.002>
- Pierson, M. D., Smoot, L. A., & Robach, M. C. (1983). Nitrite, nitrite alternatives, and the control of Clostridium botulinum in cured meats. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 17(2), 141-187. doi:<https://doi.org/10.1080/10408398209527346>
- Rose, N., Sporns, P., Stiles, M., & McMullen, L. (1999). Inactivation of nisin by glutathione in fresh meat. *Journal of Food Science*, 64(5), 759-762. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1999.tb15906.x>
- Samelis, J., Bedie, G., Sofos, J., Belk, K., Scanga, J., & Smith, G. (2005). Combinations of nisin with organic acids or salts to control Listeria monocytogenes on sliced pork bologna stored at 4 C in vacuum packages. *LWT-Food Science and Technology*, 38(1), 21-28. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.04.012>
- Sayas-Barberá, E., Quesada, J., Sánchez-Zapata, E., Viuda-Martos, M., Fernández-López, F., Pérez-Alvarez, J., & Sendra, E. (2011). Effect of the molecular weight and concentration of chitosan in pork model burgers. *Meat Science*, 88(4), 740-749. doi:<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.03.007>
- Sebranek, J. G. (2009). Basic curing ingredients. In *Ingredients in meat products* (pp. 1-23): Springer.
- Sebranek, J. G., & Bacus, J. N. (2007). Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? *Meat Science*, 77(1), 136-147. doi:https://doi.org/10.1007/978-0-387-71327-4_1
- Sezik, E., Yeşilada, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y., & Tanaka, T. (2001). Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in central Anatolia. *Journal of ethnopharmacology*, 75(2-3), 95-115. doi:[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00399-8](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00399-8)
- Sofos, J. N. (1989). *Sorbate food preservatives*: CRC Press.
- Soultos, N., Tzikas, Z., Abraham, A., Georgantelis, D., & Ambrosiadis, I. (2008). Chitosan effects on quality properties of Greek style fresh pork sausages. *Meat Science*, 80(4), 1150-1156. doi:<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.05.008>
- Stone, H., & Sidel, J. (2004). *Sensory Evaluation Practices*, Elsevier Academic Press. California, USA.
- Suman, S., Mancini, R., Joseph, P., Ramanathan, R., Konda, M., Dady, G., & Yin, S. (2011). Chitosan inhibits premature browning in ground beef. *Meat Science*, 88(3), 512-516. doi:<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.02.002>
- Thomas, L. V., & Delves-Broughton, J. (2005). 7 Nisin. *Antimicrobials in food*, 237.
- Wang, F.-S. (2000). Effects of three preservative agents on the shelf life of vacuum packaged Chinese-style sausage stored at 20 C. *Meat Science*, 56(1), 67-71. doi:[https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(00\)00022-X](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00022-X)
- Williams, S., Frye, T., Frigg, M., Schaefer, D., Scheller, K., & Liu, Q. (1992). *Vitamin E as an in situ post-mortem pigment and lipid stabilizer in beef*. Paper presented at the Proceedings of the Pacific Northwest animal nutrition conference.
- Xi, D., Liu, C., & Su, Y.-C. (2012). Effects of green tea extract on reducing Vibrio parahaemolyticus and increasing shelf life of oyster meats. *Food Control*, 25(1), 368-373. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.11.002>

The Effects of Nisin and Nisin-nanoparticles as Nitrite Replacement on Physicochemical, Microbiological, Sensory Properties and Shelf Life of Frankfurter Type Sausage

Kazem Alirezalu^{1*}, Javad Hesari², Maghsoud Besharati³, Milad Yaghoubi⁴, Zabihollah Nemati⁵, Haidar Malayeri⁶

1- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tabriz, Tabriz, Iran

* Corresponding author (kazem.alirezalu@tabrizu.ac.ir)

2- Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

3- Assistant Professor, Department of Animal Science, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tabriz, Tabriz, Iran

4- M.Sc. Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

5- Associate Professor, Department of Animal Science, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tabriz, Tabriz, Iran

6- PhD. Graduated, Quality Control Manager of Meat and Dairy Industry, Iran Standard Organization, Tabriz, Iran

Abstract

The effect of 500 ppm mixed plant extracts (green tea, stinging nettle and olive leaves extract in the same rates) in combination with nisin (200 ppm) and nisin nanoparticles (200 ppm) was studied to produce nitrite free frankfurter sausage. Nitrite free frankfurter sausages in three treatments containing 500 ppm plant extract + 200 ppm of nisin, 500 ppm plant extract + 200 ppm nisin nanoparticles with control sample (120 ppm sodium nitrite) were produced, then packaged in polyethylene bags in vacuum condition and physicochemical, quality, microbiological and sensory properties were evaluated during 45 days of storage. The results showed that the use of nisin and nisin nanoparticles had no significant effect ($P>0.05$) on moisture, fat, protein and ash content. Nisin nanoparticles, due to the presence of chitosan in the capsule structure, prevented the lipid oxidation and the sausages containing these compounds had the lowest TBARS at the end of the storage. Total viable count, molds and yeasts counts increased significantly ($P<0.05$) during storage. At the end of 45 days, sausages containing sodium nitrite and nisin nanoparticles had the lowest total viable bacterial and molds and yeasts counts, respectively. The count of *Staphylococcus aureus* (2.5 Log CFU/g) and *Escherichia coli* (2 Log CFU/g) decreased significantly during storage ($P<0.05$). It was found that sausage containing nisin nanoparticles had high sensory scores compared to other treatments. The results showed that the use of 200 ppm nisin nanoparticles in combination with 500 ppm of mixed extracts could be a novel step in the production of nitrite free frankfurter sausage with good quality characteristics and extended shelf life.

Keywords: Frankfurter sausage, Nisin, Nisin nanoparticles, Plant extract, Shelf life