مطالعه میکروبی تاثیر جایگزینی نگهدارنده های گیاهی با شیمیایی در تولید سوسیس های حرارت دیده

علی شریف زاده[1*]، هدی معتمدنژاد[2]

۱. گروه آموزشی میکروبیولوژی ،دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲. دانش آموخته دانشکده داروسازی، واحد شهرضا، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرضا، ایران.

***نویسنده مسئول:** *sharifzadeh@iaushk.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۰۹

چکیده

نیتریت ها و نیترات ها از جمله موادی اند که بعنوان افزودنی جهت عمل آوری محصولات گوشتی (سوسیس) مورد استفاده قرار میگیرد. امروزه سرطان‌زایی این مواد به دلیل ارتباط آن با تشکیل نیتروزآمین‌ها ثابت شده است. برخی از عصاره ها و اسانس های گیاهی دارای خاصیت ضدمیکروبی می باشند. هدف از این پژوهش مطالعه جایگزینی مقادیر متفاوت نیتریت سدیم با اسانس گیاه گزنه (*یورتیکا دیویکا*) در فرآورده گوشتی سوسیس و سنجش تأثیر این جایگزینی برخصوصیات میکروبی محصول بود. جهت انجام این تحقیق مقدار نیتریت سدیم مجاز در سوسیس (۱۲۰ppm) کاهش و با مقادیر (۱۲۰،۱۰۰،۸۰،۶۰،۴۰،۲۰ppm) اسانس *گزنه* جایگزین گردید. اثر ضد میکروبی اسانس در مرحله اول با روش MIC برای *اشریشیا کلی* و *کلستریدیوم پرفرنژانس* بررسی و پس از تهیه سوسیس های با مقادیر متفاوت اسانس، به بررسی میزان اثر مهارکنندگی رشد باکتری های مهم در فساد ماده غذایی، در مقایسه با استاندارد پرداخته شد. بر اساس یافته های این تحقیق مشخص گردید که نمونه های با ۲۰ppmنیتریت و ۱۰۰ppm اسانس *گزنه* اختلاف آماری معناداری تا انتهای دوره نگهداری با گروه کنترل نداشته و با استاندارد فرآورده های گوشتی هم خوانی دارد. میزان بالای نیتریت و نیترات در فرآورده های گوشتی خطرناک است. در این تحقیق نمونه های سوسیس با مقادیر متفاوت اسانس تا ۶۰ روز نگهداری و پس از انجام آزمونهای میکروبی روی سوسیس های تولیدی، مشاهده گردید که این اسانس می تواند تا۸۳ درصد جایگزین نیتریت در سوسیس گردیده و خصوصیات میکروبی سوسیس را بر اساس استاندارد حفظ نماید.

کلید واژه ها: نگهدارنده ها، گیاه دارویی، *اشریشیاکلی*، *کلستریدیوم پرفرنژانس*، نیتریت.

مقدمه

امروزه نگهدارنده ها نقش مهمی درعرضه غذاهای سالم و پایدار دارند. افزایش تقاضا برای غذاهای راحت ونگهداری طولانی مدت غذاهای فراوری شده ،استفاده ازنگهدارنده های شیمیایی در موادغذایی را ضروری کرده است (Richard and Paul, 2004 Sadeghi ; et al., 2013). نیترات ونیتریت سدیم به عنوان یک نگهدارنده برعلیه *کلستریدیوم* و دیگر باکتری های مولد فساد مواد غذایی به کارمی رود. مطالب زیادی در رابطه با اثر نیتریت بر سلامت انسان وجود دارد. نیتریت ممکن است درمعده با ترکیبات قابل نیتروزه شدن (از قبیل آمین های ثانویه یا ثالثیه یا آمیدها در غذا) واکنش دهد. مشخص گردیده است که ۸۵ درصد از ۲۰۹ نیتروزآمین و۹۲ درصداز ۸۶ نیتروزآمید شناخته شده دارای اثر سرطان زایی هستند. بیشتر نیتروزآمین هاباعث سرطان کبد می شوند، ولی تعدادی از آن ها باعث ایجاد سرطان در عضو خاصی (مثانه، ریه، مری، حفره‌های بینی و غیره) می‌شوند. تماس انسان باترکیبات نیتروزآمین با خطرافزایش سرطان مری ،معده و مثانه ارتباط داده شده است (Hambridge., 1999; Belitzet al., 2009).

ادویه جات و گیاهان از دوران باستان، نه تنها به عنوان عامل طعم دهنده، بلکه به عنوان نگهدارنده مواد غذایی

www.SID.ir

Archive of SID

به غذاها اضافه شده است. فعالیت های ضد میکروبی عصاره ها و اسانس های گیاهان، اساس برنامه های کاربردی، از جمله حفظ مواد غذایی خام و فرآوری شده، داروهای جایگزین و درمان های طبیعی راتشکیل می دهند.(Proestos et al., 2006; Sahin et al., 2004; Shan et al 2007).

تیره *گزنه* شامل گیاهانی است عموماً علفی چندساله به ارتفاع ۱۰-۸ سانتیمتر و بیشتر اندامهای هوائی آن پوشیده ازکرک های قلاب مانند و یا مخروطی شکل می باشد. انتشارگیاه *گزنه*درنقاط مرطوب ایران خصوصا نواحی شمالی، غربی، مرکزی و ارتفاعات ۳۰۰۰ متری است. در بین گونه‌های *گزنه‌یورتیکادیویکا*[1] و یورتیکااورنس[2]به دلیل مصارف طولانی مدت شان به عنوان گیاه دارویی درسطح جهان شناخته شده هستند و همچنین درطب سنتی ایران به عنوان ضدآماس معرفی شده است. ازبرگ های خشک و تازه گیاه *گزنه* به عنوان درمان بیماری های درد مفاصل، درد محوطه شکمی، بیماری های عفونی مجاری ادراری و تورم استخوان استفاده میشود. هم چنین این گیاه دارای خواص آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی نیز می‌باشد. (Gülçin et al., 2004; Rakhshandehroo et al., 2009; Wrigh 2008).

در بررسی سیستماتیک بر روی کارایی و ایمن بودن گزنه در درمان دیابت، کاهش معنادار گلوکز خون توسط گیاه گزنه گزارش شده است (Mehri et al.,2011). هم چنین در بررسی اثر محافظتی عصاره برگ گیاه گزنه بر تخریب ناشی از دیابت ساختار مخاط روده باریک موش صحرایی دریافتند که عصاره گیاه گزنه موجب محافظت مخاط روده باریک می گردد (Rezai .,2011).

در سال ۲۰۰۳ تاثیر مثبت عصاره اتانولی *گزنه* بر روی باکتری های *سالمونلا*، *سودوموناس*، *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی گردید (Majd et al.,2003).

اشریشیا کلی[3] باسیل کوتاه گرام منفی بوده که متعلق به خانواده انتروباکتریاسه می‌باشد. این باکتری بخصوص در غذاهای اسیدی ارزش ویژه ای به عنوان یک میکروارگانیسم شاخص دارد. این باکتری در سلول های مخاطی روده وارد شده و باعث تخریب آن ها می گردد. همچنین این باکتری می تواند در بدن انسان تولید سم نموده که مسموم کننده بوده و باعث تولید اسهال می‌گردد. *کلستریدیوم پرفرنژانس*[4]نیز به شکل باسیل گرام مثبتی بوده که حاوی هاگ مقاوم به حرارت می باشد. غذاهای پخته شده پس از پختن نیز دارای هاگ بوده و هنگام سرد نمودن تدریجی آن ها به فرم رشته ای تبدیل و با سرعت بالا اقدام به تولید توکسین و ایجاد مسمومیت می نماید (Kiaii et al., 2010).

با توجه به شواهد موجود، دراین مطالعه آثار فعالیت مهاری اسانس *گزنه* در مواجهه با دو باکتری عامل فساد گوشت یعنی باکتری *اشرشیاکلی* و *کلستریدیوم پرفرنژانس* بررسی و سپس با وارد نمودن مخلوط های متفاوت اسانس وگزنه، قدرت جایگزینی نیتریت توسط اسانس *گزنه* بررسی گردید.

روش‌کار

آماده سازی اسانس

گیاه *گزنه* با نام علمی (*یورتیکا دیویکا*) از مزارع استان مازندران تهیه و توسط کارشناس هرباریوم مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرضا به روش علمی مورد شناسایی و نمونه هرباریومی آن به شماره ۳۶۰۶ در هرباریوم مرکز تحقیقات گیاهان دارویی ثبت گردید. پس از آسیاب نمودن موادگیاهی خشک شده مذکور، اسانس آن ها استخراج گردید. ۵۰ گرم از پودر آسیاب شده گیاه در بالون ژوژه ریخته و پس از آن ۶۰۰ میلی لیتر آب مقطر

1- *Urtica dioica*
2- *U.urens*
3- *E. coli*
4- *Clostridium perfringenes*

www.SID.ir

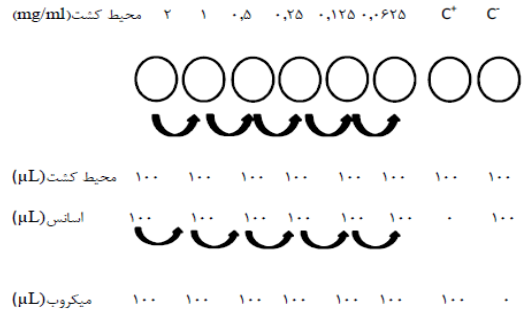
به آن اضافه گردید. آب مقطر بدون املاح بوده و تحت تاثیر حرارت، روی اسانس تاثیر نمی گذارد. بالن ژوژه حاوی مواد راروی هیتر قرار داده و کلونجر را به بالون ژوژه حاوی مواد متصل کرده و خود کلونجر با گیره و پایه به جای ثابتی محکم گردید. مبرد یا کندانسور کلونجر دو جداره و دارای قوس و انحناهای متعدد بوده و بنابراین سطح تماس بخار آب با دیواره مبرد بیشتر شده و زودتر خنک می گردد. ورودی آب به لوله پایین مبرد متصل و خروجی آب به لوله بالایی وصل و به سینک ظرفشویی هدایت می‌گردید. پس از روشن کردن هیتر، اسانس گیری به مدتی یک ساعت و نیم انجام شد. سپس شیر خروجی کلونجر با احتیاط باز شده و اسانس در ظرف مخصوص خود ریخته شد و تا زمان استفاده در شیشه های تیره و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

تهیه سوش باکتری های مورد آزمایش

اشرشیا کلی (ATCC:25922) و *کلستریدیوم پرفرنژنس* (ATCC:13124) لیوفیلیزه از انستیتو پاستور تهران خریداری و احیا گردید. برای این کار از محیط آبگوشت مغذی برای باکتری *اشریشیا کلی* و از محیط تیوگلی کولات براث برای باکتری *کلستریدیوم* استفاده گردید، پس از تلقیح سوش لیوفیلیزه در محیط های فوق این محیط ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت احیا شده و س از آن باکتری *کلستریدیوم پرفرنژنس* و *اشرشیا کلی* در محیط کشت ژلوز خوندار ۵ ائوزین متیلن بلو ۶ برای اثبات خلوص پرگنه کشت داده شدند. باکتری کلستریدیوم در مراحل احیا در شرایط بی هوازی قرار گرفت.

سنجش میزان حداقل غلظت بازدارندگی[7] اسانس با استفاده ازروش میکرودایلوشن

برای این منظور از سوش باکتری های یاد شده یک کشت ۲۴ ساعته (کشت شبانه) دردمای ۳۷ درجه سانتیگراد در محیط ژلوز خون دار تهیه شد. اسانس با DMSO[8] و RPMI[9] مخلوط و رقت سازی گردید (۰٫۵ میلی لیتر DMSO با ۴٫۵ میلی لیتر RPMi مخلوط و ۴۰ میکرولیتر از اسانس به آن اضافه شد تا غلظت اسانس تهیه شده ۸ میلی گرم درمیلی لیتر باشد). سوسپانسیون باکتریایی معادل ۰٫۵ مک فارلند که حاوی ۱٫۵*۱۰۸ باکتری در هرمیلی لیتر بود نیز تهیه شد. پلیت ها در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردیدند. (این آزمایش برای هرکدام از باکتری ها و برای هر کدام از اسانس ها به طور جداگانه با ۳ تکرار انجام شد). پس از این مدت میانگین داده های بدست آمده به عنوان نتایج[1] MIC با دستگاه الایزا Stat Fax 4300 ابتدا با طول موج ۴۵۰ وسپس ۶۳۰ نانومتر قرائت گردید (شکل ۱).



شکل ۱: سنجش میزان حداقل غلظت بازدارندگی با استفاده ازروش میکرودایلوشن

سنجش میزان حداقل غلظت بازدارندگی در نسبتهای مختلف نیتریت و اسانس

تهیه نسبت های مختلف نیتریت به اسانس گزنه

نسبتهای نیتریت به اسانس *گزنه* با نسبت ها ی ۰: ۱۲۰ به عنوان گروه شاهد و نسبت های ۲۰: ۱۰۰، ۴۰:۸۰، ۶۰:۶۰، ۱۰۰:۲۰، ۱۲۰:۰ به عنوان گروه آزمون آماده و آزمایشMIC در مورد نسبتهای مختلف آن ها انجام

5-Blood Agar
6-Eosin Methylen Blue
7-MIC
8-Di metyl sulfoxide
9-Roswell Park Memorial Institute
1 -minimum inhibitory concentration 0

www.SID.ir

Archive of SID

گردید. در مرحله بعد ۷ کیلوگرم سوسیس به فرمولاسیون :سینه مرغ: ۲/۱۰۰، روغن: ۱/۴۰۰، یخ: ۲، نمک: ۱۷۰/ ۰،ادویه: ۰/۱۳۷۵ ،فسفات: ۰/۰۱۷۵، آرد:۰/۹۱۰، گلوتن: ۰/۲۲۵، نشاسته: ۰/۰۴۰، اسید آسکوربیک آماده وپس از تقسیم خمیر در۷ دسته‌ی جداگانه، به هرکدام از دسته ها به صورت دستی ۷ مخلوط اسانس و نیتریت اضافه گردید. هر بچ در پوشش پلی آمید به طور جداگانه پر و در ۷۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ ساعت پخته شد.سپس محصول تحت جریان آب سرد خنک و در ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ روز ذخیره و در نهایت آزمایشات میکروبی و با سه تکرار برای تعیین وضعیت میکروبی آنها انجام گردید.

آزمایشات میکروبی سوسیس

تهیه سوسپانسیون

برای تهیه سوسپانسیون،۱۰ گرم از نمونه به وسیله تیغ جراحی استریل جدا و به داخل ۹۰ سی سی محلول رقیق کننده افزوده وپس از همگن نمودن نمونه اقدام به تهیه رقت گردید.

روش انجام شده برای شمارش کلی میکروارگانیسم ها

یک میلی لیتر از هر یک از رقتهای ۱ تا ۵، به پلیت سترون منتقل و حدود ۱۲ تا ۱۵ میلی لیتر از محیط پلیت کانت آگار بادمای ۴۴ تا ۴۷ درجه سلسیوس به هر کدام از پلیت ها افزوده گردید .بعد از افزودن محیط کشت به پلیت ها، به وسیله حرکت چرخشی پلیت ها مخلوط و وروی سطح خنک قرار داده تا کاملا منعقد گردد. پلیت های آماده شده پس از بستن محیط کشت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت زمان ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری شدند.

روش انجام شده برای شمارش *استافیلوکوکوس* کوآگولاز مثبت

با استفاده از پی پت سترون، ۰/۱ سی سی از سوسپانسیون اولیه، به پلیت حاوی محیط کشت برد پارکر آگار انتقال و سپس با استفاده از لوپ، کشت خطی انجام وگرمخانه گذاری به مدت ۷۲ ساعت در ۳۷ درجه انجام گردید.

روش انجام شده برای شمارش *کلی فرم*

۱ میلی لیتر از رقت ۱ و۲ با استفاده از پیپت استریل به پلیت سترون انتقال و حدود ۱۵ میلی لیتر از محیط VRBA کشت به پلیت ها افزوده و پس از بستن پلیت ها، گرمخانه گذاری به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه انجام گردید.

روش انجام شده برای شمارش *سالمونلا*

۱ میلی لیتر از سوسپانسیون اولیه به لوله های حاوی محیط کشتBPW انتقال و ۱۸ ساعت گرمخانه گذاری انجام گرفت، سپس نمونه غنی شده به محیط کشت RVS broth تلقیح ودر دمای ۴۱ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری و در انتها از لوله ها حدودا ۰/۱ میلی لیتر به داخل پلیت حاوی محیط کشت بیسموت سولفیت آگار انتقال داده شد و کشت خطی انجام شد و به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه انجام گرفت.

روش انجام شده برای شمارش *اشریشیاکلی*

۱۰ میلی لیتر از سوسپانسیون اولیه به ۱۰ میلی لیتر لوله حاوی لوریل سولفات با غلظت مضاعف اضافه و لوله های تلقیح شده با غلظت مضاعف لوریل سولفات در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ قرار گرفت. در صورت عدم تولید گاز یا کدورت گرمخانه گذاری ۲۴ ساعت دیگر نیز ادامه می یافت.

روش انجام شده برای شمارش *کلستریدیوم*

۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون اولیه به پلیت های حاوی محیط کشت SPS انتقال و کشت خطی انجام شد. گرمخانه گذاری به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد صورت پذیرفت.

روش انجام شده برای شمارش کپک و مخمر

۱ میلی لیتر از رقت ۱ و۲ با استفاده از پیپت استریل به پلیت سترون انتقال وحدود ۱۵ میلی لیتر از محیط YGCبه پلیت ها افزوده گردید و پس از بستن پلیت‌ها،

www.SID.ir

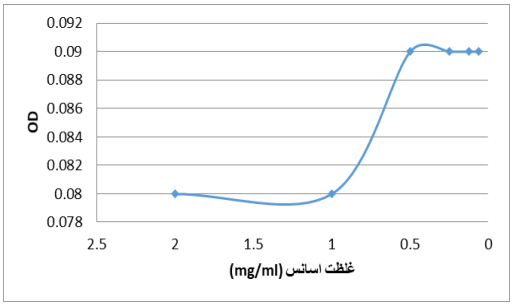
گرمخانه گذاری به مدت۷۲ ساعت در ۲۵ درجه سانتیگراد صورت گرفت.

تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل نتایج آماری در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار مینی تب ۱۶ در سطح احتمال خطای پنج درصد انجام شد.

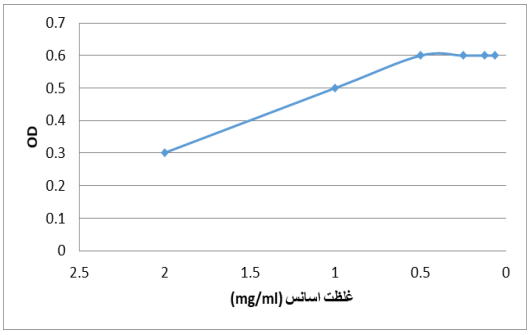
نتایج

درابتدا، نتیجه آزمایشات MIC در مورد غلظت های مختلف اسانس گزنه در مورد هر دو باکتری*E.coli* و *C. perfringens* استخراج گردید. بر اساس نتایج تحقیقات صورت گرفته مشخص شد اسانس برگ گزنه در باکتری E.coli در غلظتهای ۲mg/ml-۱، دارای بیشترین میزان اثر ممانعت کنندگی می باشد، که این امر در نمودار۱ مشخص می‌باشد:



نمودار۱- نتیجه آزمون سنجش حداقل میزان ممانعت کنندگی اسانس گزنه در باکتری *E.Coli*

بر اساس نتایج تحقیقات صورت گرفته مشخص شد اسانس گزنه در باکتری *C. perfringens* در غلظت ۲mg/ml، دارای بیشترین میزان اثرممانعت کنندگی می باشد، که این امر در نمودار ۲ مشخص می باشد:



نمودار۲- نتیجه آزمون سنجش حداقل میزان ممانعت کنندگی اسانس گزنه در باکتری *C. perfringens*

درمرحله بعد، نتیجه آزمایشات MIC در مورد نمونه های نیتریت حاوی مقادیر متفاوت اسانس گزنه در مقایسه با گروه شاهد (صرفا حاوی نیتریت) استخراج گردید. براساس نتایج تحقیقات صورت گرفته مشخص شد اسانس گزنه در باکتری *E.coli* در غلظت ۱۲۰:۰ نیتریت به اسانس دارای حساسیت میکروبی می باشد که این امر در جدول شماره ۱ مشخص می باشد. بر این اساس روند کاهشی تراکم باکتریایی در نمونه‌های مخلوط اسانس ونیتریت درنسبت های مختلف مشاهده شد ($p<۰/۰۵$).

جدول۱: نتیجه آزمون تعیین حساسیت میکروبی نسبت ۱۲۰:۰نیتریت به اسانس در باکتری *E.Coli*

غلظت (ppm)	۱۲۰:۰ (نیتریت به اسانس)	کنترل مثبت	کنترل منفی
A	۰/۱۱۵	۰/۲۲۰	**۰/۰۳۲۶**
B	۰/۱۲۳	۰/۲۵۷	**۰/۰۶۶**
C	۰/۱۲۶	۰/۳۲۶	**۰/۰۵۸**
D	۰/۱۲۰	۰/۲۵۹	**۰/۲۹۲**
میانگین	۰/۰±۰,۱۲۱۱۲۱/۰۰۴	۰/۰±۲۶۵/۰۴۴	**۰/۱۸۵ ۰±/۰۱۴۳**

هم چنین براساس نتایج این تحقیق مشخص شد اسانس گزنه در باکتری*E.coli* درغلظت ۱۲۰:۰ نیتریت به اسانس دارای حساسیت میکروبی می باشد که این امر در جدول شماره ۲مشخص می باشد. بر این اساس، روند کاهشی تراکم باکتریایی در نمونه‌های مخلوط اسانس و نیتریت مشاهده شد ($p<۰/۰۵$).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۲- نتیجه آزمون تعیین حساسیت میکروبی نسبت ۰:۱۲۰نیتریت به اسانس در باکتری *E.coli*

کنترل منفی	کنترل مثبت	۰:۱۲۰ (نیتریت به اسانس)	غلظت (ppm)
۰/۶۲	۰/۲۵۶	۰/۱۲۹	A
۰/۰۶۴	۰/۲۶۹	۰/۱۲۷	B
۰۱/۰۶۲	۰/۲۲۶	۰/۱۲۸	C
۰/۰۶۳	۰/۲۷۴	۰/۱۷۶	D
۰/۰۶۲±۰/۰۰۰۹	۰/۲۵۶±۰/۰۲۱	۰/۱۴۰±۰/۰۲۴	میانگین

بر اساس نتایج این تحقیق، اسانس گزنه در باکتری *C.perfringes* در غلظت ۰:۱۲۰ نیتریت به اسانس نیز دارای حساسیت میکروبی می‌باشد که این امر در جدول شماره ۳ مشخص می‌باشد. بر این اساس، روند کاهشی تراکم باکتریایی در نمونه‌های مخلوط اسانس ونیتریت مشاهده شد ($p<۰/۰۵$).

جدول۳- نتیجه آزمون تعیین حساسیت میکروبی نسبت ۰:۱۲۰نیتریت به اسانس در باکتری*C.perfringes*

کنترل منفی	کنترل مثبت	۰:۱۲۰ (نیتریت به اسانس)	غلظت (ppm)
۰/۱۰۰	۰/۵۰۰	۰/۲۲۹	A
۰/۱۱۷	۰/۴۷۲	۰/۲۴۸	B
۰/۱۰۱	۰/۴۸۸	۰/۲۷۱	C
۰/۱۱۰	۰/۴۹۶	۰/۲۵۹	D
۰/۱۰۷±۰/۰۰۸	۰/۴۸۹±۰/۰۱۷	۰/۲۵۱ ±۰/۰۱۲	میانگین

هم چنین بر اساس نتایج این تحقیق، اسانس گزنه در باکتری *C.perfringes* نیز تا غلظت ۲۰:۱۰۰ نیتریت به اسانس دارای حساسیت میکروبی می باشدکه این امر در جدول شماره ۴ مشخص می باشد بر این اساس، روند کاهشی تراکم باکتریایی در نمونه‌های مخلوط اسانس و نیتریت مشاهده شد ($p<۰/۰۵$).

جدول۴- نتیجه آزمون تعیین حساسیت میکروبی نسبت۲۰:۱۰۰نیتریت به اسانس در باکتری *C.perfringes*

کنترل منفی	کنترل مثبت	۲۰:۱۰۰(نیتریت به اسانس)	غلظت(ppm)
۰/۰۹۶	۰/۴۹۱	۰/۲۶۴	A
۰/۱۰۴	۰/۴۹۸	۰/۲۷۹	B
۰/۰۹۶	۰/۵۱۷	۰/۲۶۸	C
۰/۱۰۳	۰/۵۴۵	۰/۲۸۷	D
۰/۰۹۹±۰/۰۰۴	۰/۵۱۲±۰/۰۲۴	۰/۲۷۴±۰/۰۱۰	میانگین

در مرحله بعد، استانداردهای میکروبی سوسیس های تولیدی با سوسیس های دارای نسبت های متفاوت نیتریت به اسانس بررسی و نتایج زیر استخراج گردید. بر اساس نتایج آزمایشات صورت گرفته سوسیس آماده شده تا نسبت ۲۰:۱۰۰ نیتریت به اسانس مطابق با استاندارد ۲۳۰۳ عاری از مشکل میکروبی بود که این امر در جدول شماره ۵ مشخص می باشد. بر این اساس روند کاهش تعداد باکتری های نمونه آزمون در مقایسه با گروه کنترل در نمونه‌های مخلوط اسانس و نیتریت مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). از هفته چهارم به بعد افزایش مشهودتری در تعداد باکتری های نمونه آزمون در مقایسه با گروه کنترل وجود داشت ($p>۰/۰۵$).

www.SID.ir

جدول ۵- نتایج آزمون میکروبی سوسیس آماده شده تا نسبت۱۰۰:۲۰نیتریت به اسانس

ردیف	عامل مورد آزمون	نتیجه آزمون (در یک گرم)	حدقابل قبول (در یک گرم)
۱	شمارش کلی میکروبی	$۴,۳\times۱۰^{۳}$	بیشینه $۱۰^{۵}$
۲	*کلی فرمها*	کمتر از ۱	بیشینه ۱۰
۳	*اشرشیا کلی*	منفی	منفی
۴	*استافیلوکوکوس اورئوس* کوآگولاز +	کمتر از ۱۰	کمتراز ۱۰
۵	*سالمونلا*	منفی	منفی(در۲۵ گرم)
۶	*کلستریدیوم پرفرانژانس*	کمتر از ۱۰	بیشینه ۵۰
۷	کپک و مخمر	کمتر از ۱۰	بیشینه ۱۰۰

بحث

امروزه استفاده از فرآورده های گوشتی حرارت دیده از جمله سوسیس وکالباس، بسیار بیشتر از گذشته مورد توجه قرار گرفته و مصرف آنها درجوامع بشری رو به افزایش است. از آنجائی که عوامل میکروارگانیسمی فراوانی در طبیعت وجود دارند که روند فساد و از بین رفتن این مواد غذایی را تسریع می کنند، باید با روش مناسبی از جمله کاربرد مواد افزودنی به نحوی این روند را کند یا متوقف نمود. نیتریت سدیم از جمله مواد افزودنی است که از فعالیت عوامل میکروارگانیسمی جلوگیری نموده و جهت نگهداری و عمل آوری گوشت و فرآورده های گوشتی از جمله سوسیس و کالباس مورد استفاده قرار می گیرد. (Samsam-Shariat and Moatar., 2004; Emami and Ahi., 2008). از آنجائی که ماده شیمیایی نیتریت سدیم می تواند باعث به خطر افتادن سلامت انسانها گردد در اکثر کشورها مقررات خاصی در مورد مصرف نیتریت سدیم رعایت می شود و سعی مسؤولین بهداشتی بر این است که تا حد امکان مصرف این ماده شیمیایی را کاهش دهند (حد مجاز مطابق با استاندارد ایران ۱۲۰میلی گرم به ازاء هر کیلوگرم از فرآورده های گوشتی سوسیس وکالباس می باشد). موادشیمیایی متعددی نیز برای جایگزینی نیتریت دربرخی تحقیقات استفاده گردیده است از جمله اسید آسکوربیک در مطالعه ناصحی نیا که اثری مشابه نیتریت سدیم را در فرآورده های گوشتی ایفا نموده است. در مطالعه انجام شده توسط معارفیان و همکاران تاثیر جایگزینی جزئی نیتریت با اسانس *نعنا* بر ویژگی های اکسیداتیو، میکروبی و حسی سوسیس پخته شده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد، در سطوح مختلف اسانس پس از ۳۰ روز از ذخیره سازی با توجه به تعیین آستانه مقدار پروکسید و ماده انفعالی تیوباربیتوریک اسید ، تعویض ۵۰ درصد از نیتریت با اسانس نعنا یک رویکرد منطقی به منظور از بین بردن اثر ات مضر نیتریت در فرآورده های گوشتی و به منظور افزایش عملکرد محصول می‌باشد (Moarefian et al.,2012).

Alzoreky و Nakahara در مطالعه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* درمقایسه با باکتری *اشرشیا کلی* در مورد عصاره گزنه حساسیت بیشتری را نشان دادند، زیرا ارتباط مثبتی بین فعالیت آنتی باکتریال ومحتوای فنلی عصاره بر علیه باکتری وجود دارد. این نشان می‌دهد فعالیت ضدباکتری عصاره ارتباط نزدیکی با ترکیبات فنلی خود دارد. هم چنین در برخی مطالعات، عصاره *موسیر چینی* و *سنا* نیز توانسته است تعداد *اشریشیاکولی* و سایر باکتری ها در طول ذخیره سازی آبمیوه، شیر و گوشت را کاهش دهد(Alzoreky and Nakahara.,2003; Hashemi et al 2019).

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعه فعالیت اسانس *پونه کوهی* در برابر اسپور *کلستریدیوم بوتولینوم* نشان داده، غلظت تا ۰/۴میکرولیتر بر گرم اسانس *پونه کوهی* تعداد و یا تاخیر رشد اسپورهای *کلستریدیوم بوتولینوم* را تحت تاثیر قرار ندادند در حالی که، در حضور سطوح پایین نیتریت سدیم، زمانی که به تنهایی استفاده شود رشد باکتری و تورم قوطی به تاخیر می افتد، در صورت استفاده همراه با همان غلظت اسانس پونه کوهی تاخیر ، افزایش می یابد (Farahmandfar et al.,2018). در مطالعه انجام شده توسط پاندیت ، مشخص شد که اسانس *رزماری* کپسوله بسیار مؤثرتر از اسانس *رزماری* استاندارد بر روی *لیستریا مونوسیتوژنز* در سوسیس کبد خوک بود (pandit and shelf., 1994). در مطالعه ای دیگر، اسانس گشنیز، میخک، پونه و آویشن در سطح۲۰-۵ میکرولیتر بر گرم در مهار *لیستریا مونوسیتوژنز* در محصولات گوشت مؤثر واقع شده است. هم چنین در مطالعه آزمایشگاهی فعالیت ضدباکتری اسانس در برابر باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز توسط* Burt و همکاران، *سالمونلا تیفی موریوم، اشرشیاکلی O157: H7، شیگلا دیسانتری، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس* در سطوح بین ۰/۲و ۱۰ $\mu ml^{-1}l$ حساسیت خود را نشان داده شده اند که در این میان باکتری های گرم مثبت حساس تر از باکتری های گرم منفی اند . مطالعه با گوشت تازه درمورد فرآورده های گوشتی، ماهی ، شیر، محصولات لبنی، میوه و برنج پخته شده نشان می‌دهد که غلظت مورد نیاز برای رسیدن به اثر ضدباکتری قابل توجه در حدود ۲۰-۰,۵۰ $\mu g^{-1}l$در مواد غذایی و حدود ۱۰-۰,۱ ml در محلول برای شستن میوه و سبزیجات است $\mu^{1}l$ (Burt., 2004).

بسیاری از این اسانس ها و حتی ادویه جات حاوی سطح بالایی از ترکیبات فنولی بوده، که فعالیت مهاری بر علیه پاتوژنهای ناشی از مواد غذایی را نشان می دهند. باکتری های گرم مثبت معمولا به آزمایشهای اسانس نسبت به باکتری های گرم منفی حساس ترند (Jafarnia et al.,2007).

ترکیبات فنولی موجود در گزنه بر روی باکتری هایی مانند *اشریشیاکلی، پروتئوس ولگاریس، کلبسیلا* و *پسودوموناس* اثر دارد. عصاره این گیاه بر روی *سالمونلا* و *پروتئوس* مقاوم به انتی بیوتیک موثر است. هم چنین این عصاره باعث وقفه در رشد چندین مخمر و کپک شده است. اثرات ضدقارچی برخی از ترکیبات موجود در گزنه نیز تایید گردیده است. عصاره برگ و بذر گزنه دارای بیشترین اثر ضدباکتریایی به ترتیب بر روی باکتری های گرام مثبت و گرام منفی می باشد. عصاره گل گزنه نیز دارای بیشترین اثر ضدقارچی می باشد (Majd et al.,2003).

اسید گالیک، اسیدفرمیک، کاروتن، ویتامینA، ویتامینC ،تانن، موسیلاژ، آهن ، کلسیم، گوگرد و پتاسیم از ترکیبات شیمیایی این گیاه هستند (Otles and Yalcin .,2012). در سرشاخه های گیاه نیز ماده ای به نام اورتی سین (urticine) وجود دارد (Shahraki et al., 2008). وجود لستین، گلوکوزیدی با اثر قرمز کنندگی پوست وبرخی آلکالوییدها نیر در این گیاه تایید شده است (Babashpour et al.,2014). برگ گزنه حاوی گزانتوفیل، لوکوآنتوسیانیدین، فلاون، فلاونول البته به میزان کمتری از لوکوآنتوسیانیدین نیز می باشد (Rutto et al., 2013, siadouo et al., 2015).

تعدادی از ترکیبات اسانس نیز به عنوان ضد باکتری موثر شناسایی شده است. به عنوان مثال مشخص کارواکرول، تیمول، اوژنول، پریل آلدئید، سینامالدئید و سینامیک اسید که دارای حداقل غلظت بازدارنده، ۵-۰,۰۵ $\mu ml^{-1}l$ در شرایط آزمایشگاهی هستند (Tavakoli-Saberi and Sedaghat.,2004).

www.SID.ir

نتیجه‌گیری کلی

به جهت محدود بودن تعداد مطالعات انجام شده در رابطه با افزودن نیتریت سدیم وجایگزین های آن به فرآورده های گوشتی در کشور و از طرفی پتانسیل خطرات ناشی از آن در ایجاد بیماری ، دراین مطالعه سعی شد از اسانس *گزنه* برای این مهم استفاده گردد.

دریک نتیجه گیری کلی و براساس یافته های این تحقیق می توان چنین اظهار نمودکه اسانس *گزنه* مشابه نتایج تحقیقات قبلی دارای خاصیت و قابلیت ضد باکتریایی بر روی شایعترین باکتریهای گرم مثبت وگرم منفی عامل فساد سوسیس بوده و براساس نتایج این تحقیق می تواند تا ۸۳ درصد بعنوان جایگزین نیتریت در تولید سوسیس استفاده گردد.

منابع

1. Alzoreky, N.S. and Nakahara, k, Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonli consumed in Asia. Int. J. Food Microbiol., 2003, 80, pp 223-230

2. Babashpour-AS, M. Baleghi,M .Sajadi,P . Golalipour,M.J .Different aspects and results of modern studiesof urtica dioica:A review. J Babol univ med sci, 2014, 16(1), pp47-54

3. Burt, Sara, Essential oils: their antibacterial properties and potential application in food- a review Int. J. Food Microbiol., 2004, 94, pp223-253.

4. Belitz H., W Grosch, P Schieberle. Food Chemistry,springer verlage,Berlin,2009.

5. Emami A, Ahi A. Medical botany. 1st ed. Tehran: Iran University of Medical Sciences and Health Services 2008; p: 534.

6. Farahmandfar, R. Esmaeilzadeh Kenari, R. Asnaashari,M . Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of Oregano essential oil and its effect on oxidative stability of silver carp (Hypophthalmichtys molitrix) fish oil in water emulsion. JFST 2018, 77(15)

7. Gülçin I, Küfrevio glu I, Oktay M, Büyükokuro glu ME, Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (Urtica dioica L.). J. Ethnopharm. 2004; 90: 205 -

8. Hambridge. T, nitrate and nitrite, WHO food additives series 1999.

9. Hashemi, A.H. Shapouri, M. Esrafili, Antimicrobial and Healing Effect Burdock and Nasturtium of Nettle,ExtractsWith Silver Sulfadiazine on Burn Infections of Staphylococcus aureus. J Anim Physiol An n 2019, 45(12), 63-72

10. Jafarnia S, Khosroshahi S, Ghasemi M. Medicinal plants. 1st ed. Mashhad: Sokhan-Gostar Publications 2007; p: 179.

11. Kiaii E, Mazandarani M, Ghaemi E, Anti-bacterial Activity of 7 Species of Medicinal Plants on Bacteria Isolated from UTI Patients in Golestan Province. J. Med. Plants 2010; 34: 74 -83.

12. Majd A, Mehrabian S, Jafari Z. The antimicrobial effect of different parts of Urtica dioica. J Med Aromatic Plants 2003; 19(2): 287-312.

13. Mehri,A . Hasani-Ranjbar,SH . Larijani,B. Abdollahi, M.A systematic review of efficacy and safety of urtica dioica in the treatment of diabetes .int j pharmacol. 2011 7(2): 161-70.

14. Moarefian, M, Barzegar, Sattari, M, Naghdi Badi, H, Production of Functional Cooked Sausage by Mentha piperita Essential Oil as a Natural Antioxidant and Antimicrobial Material , J. Med. Plant Res., 5 Feb. 2012.

15. Otles,S .Yalcin,B .Phenolic compounds analysis of roots,stalk and leaves of nettle. Sci. World J., 2012, 17(3), pp37-49

16. Pandit,V.A .Shelf,L.A .Sensitivity of listeria monocytogenes to rosemary. Food Microbiol.1994, 11(1), pp57-63

17. Proestos,C. Boziaris, I.S. Nychas, J.E. and Komaitis, M, Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants:Investigation of their antioxidant

www.SID.ir

Archive of SID

activities of the essential oils and methanol extract of Origanum vulgare ssp vulgare in the Eastern Anatolia region of Turkey, Food Control,2004, 15, pp 549-557.
24. Samsam-Shariat H, Moatar F. Medicinal plants and natural drugs. 1st ed. Tehran: Golshan Publications 2004; p: 472.
25. Shahraki MR, Mirshekari H, Shahraki AR, Shahraki E, Divband KH. Effect of Urtica dioica boiling on serum glucose, insulin and lipids in fructose-fed male rats. Ofogh-e Danesh 2008; 14(3):10-15.
26. Shan, B., Cai, Y., Brooks, J and Croke H, The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. Int. J. Food Microbiol., 2007, 117, pp112-119.
27. Siadoui,F .Belghith,S .Barth,D .Trablesi,M .Cherif,K .study of Tunisian nettle leaves(urtica dioica):mineral composition and antioxidant capacity of their extracts obtained by maceration and supercritical fluid extraction. Inter. j. pharm. and phytochem. research, 2015, 7(4), pp707-713
28. Tavakoli-Saberi M, Sedaghat M. Medicinal plants. 1st ed. Tehran: Roozbehan Publications 2004; p: 264.
29. Wright GD. Resistance; new chemical strategies for battling superbugs. Chem. Biol. 2008; 127 - 32.
capacity and antimicrobial activity, Food Chem.,2006, 95, pp 664-671.
18. Rakhshandehroo F, Modarresi Chahardehi A and Zamani Zadeh HR. Study on the antiviral effect of aquatic and alcoholic extracts of Urtica dioica L. on rose mosaic viral diseases in vitro culture, Iranian J. Med. and Aromatic Plants, 2009; 25 (3): 403 - 13.
19. Richard J, paul B. Nitrite in meat. University of Minnesota, 2004.
20. Rezai-Aref,T .Mianii-Zangii,B .Lotfipour,M .protective effect of urtica dioica extract of the demage of rat small intestinal mucosa caused by diabetes. J Babol univ med sci 2011 14(3) 31-7(in Persian)
21. Rutto,L .Yixiang,X .Ramairez, E Brandt,M .mineral properties and dietary value of raw and processed staining nettle(urtica dioica). Inter. J. food sci., 2013, 7(2), pp25-34
22. Sadeghi E, Hashemian AH, Mohammadi M, Mohammadi R. Study on the microbiological and chemical characterization of the meat products consumed in Kermanshah in 2012. Iranian J. Food Sci Nutr Technol. 2013; 7(5): 281-287.
23.Sahin, F., Gulluce, M., Daferera, D., Sokmen A., Sokmen, M., Polissiou, M.,Agar, G. and Ozer, H, Biological

www.SID.ir

Microbial study of the effect of replacing herbal preservatives with chemicals on the production of functional cooked sausages

Sharifzadeh A[1*], Mootamednejad H[2]

1. Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2. Graduate of Pharmacy Shahreza Branch, Islamic Azad University, Shahreza, Iran.

[*]**Corresponding author:** *sharifzadeh@iaushk.ac.ir*

Received: 1 October 2019 Accepted: 30 December 2019

Abstract

Nitrite and nitrate are preservatives that have been used in meat products (sausages) and include carcinogenic effects. Natural antimicrobials with plant origin are incorporated into foods in the forms of essential oils or extracts. They can control spoilage bacteria in foodstuffs (e.g., meat products). This work was aimed to evaluate the effect of partial nitrite replacement with Urticadioicaessential oil (UDE) on microbial properties of cooked sausage. Nitrite content (120 ppm) was reduced and replaced with 20, 40, and 60, 80, 100, and 120 ppm of UDE. The effect of UDE on antimicrobial properties of the essential oil was evaluated by MICs determination against *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* by the microdilution method. Results indicated that samples with 20 ppm of nitrite and 100 ppm UDEwerenot significantly samples with control at the end of storage period. The high level of nitrite and nitrate in meat products is worrying. Consequently, Reduction and Replacement of these food additives is essential.in this study, all samples with different essential oil levels were acceptable after 60 days of storage. Replacement of 83 % of nitrite with UDE is a reasonable approach in order to put down the harmful effects of nitrite in sausage and to enhance the functionality of the product.

Keywords: *Preservative, Herbal plant E.coli, Clostridium perfringenes*, Nitrite.

www.SID.ir