مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

اثر جایگزینی نیتریت سدیم با نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین میکروجلبک هماتوکوکوس (*Haematococcus pluvialis*) در فرمولاسیون سوسیس معمولی بر رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد

سکینه یگانه[1*]، سهیل ریحانی پول[2]

۱. استاد، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

۲. دانش‌آموخته دکتری تخصصی، گروه فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۲/۵

کلمات کلیدی:

فراورده‌های گوشتی،

نیتریت سدیم،

نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین،

کلستریدیوم پرفرنژنس،

استافیلوکوکوس اورئوس

DOI: 10.22034/FSCT.20.136.103

DOR:20.1001.1.20088787.1402.20.136.9.7

* مسئول مکاتبات:

s.yeganeh@sanru.ac.ir,
skyeganeh@gmail.com

چکیده

هدف از تحقیق حاضر استفاده از نانوکپسول‌های حامل رنگدانه آستاگزانتین در فرمولاسیون سوسیس معمولی به عنوان جایگزین نیتریت سدیم و جستجوی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد در محصول بود. به همین منظور پس از استخراج آستاگزانتین از میکروجلبک *هماتوکوکوس پلوویالیس* و تولید نانوکپسول‌های حامل رنگدانه با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات سدیم، پنج تیمار با نسبت‌های مختلف نیتریت سدیم و نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین به همراه شاهد طراحی و طی ۲۸ روز نگهداری در دمای یخچال (۴±۱°C) از نظر وجود باکتری‌های *کلستریدیوم پرفرنژنس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *کلی‌فرم*، *سالمونلا*، *اشریشیاکلی*، *کلستریدیوم بوتولینوم*، باکتری‌های لاکتیک‌اسید، کپک‌ها و مخمرها مورد ارزیابی قرار گرفتند. مطابق نتایج، در تیمار دارای حد مجاز نیتریت سدیم یعنی ۱۲۰mg/kg (تیمار A) و همچنین تیمارهایی که این حد با ۳۰mg/kg (تیمار C) و ۶۰mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین (تیمار D) جایگزین شد، شمارش باکتری‌های *کلستریدیوم پرفرنژنس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و کلی‌فرم (در طول دوره نگهداری) در حد استاندارد و کمتر از ۱۰CFU/gr ثبت گردید. در تیمارهای صرفا حاوی ۱۲۰mg/kg نانوکپسول‌های حامل (تیمار B) و همچنین دارای ۳۰mg/kg نیتریت سدیم و ۹۰mg/kg نانوکپسول‌های حامل (تیمار E)، فقط در روز ۲۸، شمارش سه باکتری مذکور بیشتر از ۱۰CFU/gr بود. در ادامه مشخص شد که هیچ یک از تیمارهای تحقیق محتوی باکتری‌های سالمونلا، *اشریشیاکلی* و *کلستریدیوم بوتولینوم* نیستند. همچنین هر پنج تیمار فرموله‌شده در طول دوره نگهداری (بر خلاف شاهد) از نظر باکتری‌های لاکتیک‌اسید در محدوده استاندارد قرار داشتند. نتایج شمارش کپک‌ها و مخمرها نشان داد که این تیمارها بر خلاف نمونه شاهد در کل دوره نگهداری فاقد هرگونه کلنی کپک و مخمر بودند. مطابق یافته‌های این پژوهش، در صورت جایگزینی ۵۰ درصد حد مجاز نیتریت سدیم با نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین، می‌توان محصولی عاری از میکروارگانیسم‌های تهدیدکننده سلامتی تولید کرد. ضمن اینکه با این فرایند، از مضرات نیتریت سدیم کاسته و بواسطه ارزش غذایی و نقش اثبات‌شده آستاگزانتین در حفظ سلامتی و پیشگیری از بیماری‌های مختلف، به مفیدبودن محصول افزوده خواهد شد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-14]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.136.9.7]

[DOI: 10.22034/FSCT.20.136.103]

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-14]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.136.9.7]

[DOI: 10.22034/FSCT.20.136.103]

۱- مقدمه

استفاده از ترکیبات سنتتیک آنتی‌اکسیدان و ضد میکروب (نگهدارنده‌ها) در صنایع غذایی، همواره نگرانی‌هایی به جهت مضربودن برای سلامتی ایجاد می‌کنند. از جمله این نگهدارنده‌ها که کاربرد گسترده‌ای در صنعت غذا بخصوص فراورده‌های گوشتی دارند، می‌توان به نیترات و نیتریت سدیم اشاره کرد. این ترکیبات در فراورده‌های گوشتی با جلوگیری از رشد باکتری‌های بی‌هوازی به ویژه کلستریدیوم‌ها، اعمال اثر آنتی‌اکسیدانی، تثبیت رنگ قرمز گوشت و بهبود طعم به افزایش دوره نگهداری و بازارپسندی محصول کمک می‌کنند [1]. با همه این مزایا، این ترکیبات ممکن است در معده انسان با ترکیبات قابل نیتروزه‌شدن واکنش دهند که ماحصل آن بروز انواع بیماری-های خطرناکی است که بشر در قرن حاضر با آن‌ها رو به رو است[2]. به همین دلیل سازمان‌های استاندارد، حد مشخصی را برای استفاده از نیتریت در فراورده‌های گوشتی تعیین کرده‌اند. بر اساس استاندارد ملی شماره ۲۳۰۳ حداکثر مقدار مجاز نیتریت قابل استفاده در انواع سوسیس و کالباس ۱۲۰ppm می‌باشد.

در کنار این ترکیبات سنتتیک مضر، ترکیبات طبیعی هم وجود دارند که نه تنها برای سلامتی مضر نیستند، بلکه مزایایی بسیار زیادی در حفظ سلامتی، پیشگیری و درمان بیماری‌های مختلف دارند. ترکیبات فعال یا رنگدانه‌هایی که از آبزیان استخراج می‌شوند، از این دست هستند. آستاگزانتین ($C_{40}H_{52}O_4$ با وزن مولکولی ۵۹۶/۸ گرم بر مول) رنگدانه‌ای به رنگ قرمز تا صورتی است که از موجودات مختلف از جمله جلبک‌ها [3]، مخمرها [4]، باکتری‌ها، ماهی و خرچنگ‌های دریایی [5] استخراج می-شود. این رنگدانه دارای یازده پیوند دوگانه مزدوج یا کونژوگه[1] و دو گروه هیدروکسیل است. باند دوگانه کونژوگه بلند زنجیر و دو ساختار حلقوی در تعیین خصوصیات شیمیایی و ویژگی‌های جذب نور آستاگزنتین موثر هستند [6]. رنگ قرمز تا صورتی آستاگزانتین، به دلیل وجود پیوندهای دوگانه کونژوگه در مرکز رنگدانه است. همچنین این پیوندهای دوگانه به عنوان آنتی‌اکسیدان بسیار قوی عمل می‌کنند؛ به این صورت که از طریق واکنش با رادیکال‌های آزاد، موجب غیرفعال‌سازی آن‌ها می‌شوند [7]. از آنجا که آستاگزانتین قادر است به غشای سیتوپلاسمی از قسمت درونی به بیرونی متصل شود، فعالیت بیولوژیکی آن نسبت به سایر آنتی‌اکسیدان‌ها به صورت بالقوه‌ای بیشتر است [8]. فعالیت مطلوب آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین در بسیاری از مطالعات ثابت شده است [9]. این رنگدانه خاصیت ضد میکروبی نیز دارد [10]. این ویژگی‌ها در کنار فعالیت ضد سرطانی [11]، پیشگیری از بیماری قلبی-عروقی و التهابی [12]، بهبود سلامت چشم، خاصیت ضد التهابی [13] و ضد دیابتی [14]، غنی‌سازی مواد غذایی مختلف و همچنین جایگزینی نگهدارنده‌های شیمیایی و خطرناک با این رنگدانه را توجیه می‌کند.

استفاده از آستاگزانتین در مواد غذایی مختلف به عنوان رنگ‌دهنده یا نگهدارنده مستلزم به کارگیری روش حفاظتی مناسب از این ترکیب است، چرا که طی تولید و نگهداری مواد غذایی استفاده از تیمارهای حرارتی، اسیدی، آنزیمی و همچنین کاربرد یکسری مواد که می‌توانند با آستاگزانتین واکنش دهند و از خاصیت آن بکاهند، احتمالا موجب کاهش کارائی و عملکرد این رنگدانه می‌گردند. امروزه در صنایع غذایی و دارویی، تکنیک نانو ریزپوشانی، موثرترین روش جهت محافظت از ترکیبات مختلف غذایی و دارویی مانند اسانس‌ها، پپتیدهای زیست‌فعال [15]، آروما و طعم‌ها و همچنین رنگدانه‌های طبیعی [3] است. طی این فرایند کپسولی اطراف ترکیبات فعال (هسته) ایجاد می‌شود که از آن‌ها در شرایط نامساعد از تغییرات احتمالی محافظت می-کند. این تکنیک موجب افزایش دوام و بقاء ترکیبات

1. Double conjugate

مختلف، عدم تاثیر فاکتورهای محیطی نظیر pH، نور و اکسیژن بر آن‌ها و همچنین کنترل رهایش مواد محصور در دیواره و در نتیجه تاثیر بیشتر بر کیفیت ماده غذایی می‌گردد [16]. به منظور نانو ریزپوشانی ترکیبات فعال از پوشش‌های مختلفی جهت تشکیل دیواره استفاده می‌شود. این پوشش‌ها معمولا ساختار پروتئینی، کربوهیدراتی، سلولزی، لیپیدی و ... دارند و از منابع گیاهی، دریایی، حیوانی و میکروبی تهیه می‌شوند. در انتخاب دیواره بایستی به ویژگی‌های اولیه ترکیبات فعال از جمله ترکیب و ساختار شیمیایی، وزن مولکولی و همچنین خواص ثانویه نظیر حلالیت، رفتار رئولوژیکی، توانایی تشکیل فیلم، کیفیت فیلم، فعالیت سطحی، دوام و تجزیه پذیری، نقطه ذوب و نقطه جوش توجه شود [17].

مالتودکسترین از پوشش‌های کربوهیدراتی و از مشتقات نشاسته است که از منابع مختلف نشاسته‌ای مانند سیب‌زمینی، ذرت و گندم تهیه می‌گردد. این ماده به دلیل حلالیت بالا در آب و عدم داشتن بو و رنگ شاخص، از مهم‌ترین مواد پلی‌ساکاریدی جهت ریزپوشانی‌کردن مواد محسوب می‌شود، اما با این وجود توانایی امولسیفایری و پایداری امولسیونی آن ضعیف می‌باشد. کازئینات سدیم از پوشش‌های پروتئینی و برخلاف کازئین در آب محلول است؛ ضمن اینکه حلالیت آن با بالا رفتن دمای آب افزایش می‌یابد. این ماده دارای فعالیت سطحی و امولسیفایری مطلوب است و مواد پوشش داده‌شده توسط این ماده نسبت به پارامترهای محیطی از جمله بخار آب و اکسیژن دارای نفوذپذیری پائینی هستند [3 and 16].

هدف تحقیق حاضر در مرحله اول، استخراج رنگدانه آستاگزانتین از میکروجلبک *هماتوکوکوس پلوویالیس*[1] با استفاده از روش ترکیبی اسید–استون بود. در مرحله بعد، این رنگدانه با استفاده از پوشش ترکیبی مالتودکسترین–کازئینات سدیم، نانو ریزپوشانی شد. نهایتا نیتریت سدیم مورد استفاده در فرمولاسیون سوسیس معمولی با نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین جایگزین و آلودگی محصول به میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد ارزیابی گردید.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

پودر خالص میکروجلبک *هماتوکوکوس پلوویالیس* به صورت فریزدرای‌شده و با رنگ متمایل به قرمز از شرکت پرتوغذای آبزیان سورنا مازندران تهیه شد. ترکیب شیمیایی این پودر در جدول ۱ ارائه شده است. مالتودکسترین، کازئینات سدیم و نیتریت سدیم از شرکت سیگما و محیط‌های کشت مورد استفاده از شرکت مرک آلمان تهیه شدند.

Table 1- Qualitative analysis of *Hematococcus* microalgae used in this study

Cell composition	Amount (%)
Protein	23
Carbohydrate	37.5
Total fat	35.5
Astaxanthin	3
Beta-carotene	0.037
Lutein	0.018
Canthaxanthin	0.18

۲-۲- روش‌ها

۲-۲-۱- استخراج آستاگزانتین

جهت استخراج رنگدانه آستاگزانتین از میکروجلبک *هماتوکوکوس پلوویالیس* و روش ترکیبی اسید- استون (پیش تیمار اولیه با اسیدکلریدریک و سپس استخراج با استون خالص) استفاده شد [9]. پس از استخراج رنگدانه مذکور، به منظور هیدرولیز یا صابونی‌کردن آستاگزانتین و تبدیل فرم‌های مونواستر و دی‌استر آن به فرم آزاد، از روش Dewati و همکاران [18] با کمی تغییر استفاده گردید. خالص‌سازی آستاگزانتین نیز مطابق روش Sun و همکاران [19] با کمی تغییر انجام شد.

1. *Haematococcus pluvialis*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-14]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.136.9.7]
[DOI: 10.22034/FSCT.20.136.103]

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-14]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.136.9.7]

[DOI: 10.22034/FSCT.20.136.103]

۲-۲-۲- تولید نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین با خصوصیات فیزیکی مشخص

به منظور نانو ریزپوشانی آستاگزانتین، از پوشش ترکیبی مالتودکسترین و کازئینات سدیم با نسبت ۱:۱ استفاده و نسبت پوشش‌ها به هسته نیز ۴ به ۱ در نظر گرفته شد. ابتدا سوسپانسیون همگنی از مالتودکسترین در آب مقطر (۴ گرم در ۵۰ میلی‌لیتر) تهیه شد. سپس جهت تهیه پوشش دوم، سوسپانسیونی از کازئینات سدیم در آب مقطر تهیه (۴ گرم در ۵۰ میلی‌لیتر) ایجاد و با قراردادن بر روی همزن مغناطیسی و دمای ۴۵ درجه برای مدت ۳۰ دقیقه، سوسپانسیون همگنی از آن حاصل شد. محلول حاوی کازئینات سدیم (پس از کاهش دما به ۲۵ درجه) به محلول دارای مالتودکسترین اضافه و ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه جهت افزایش جذب آب نگهداری گردید. در مرحله انتهایی، ۲ گرم آستاگزانتین به محلول حاوی پوشش‌ها اضافه و پس از حل‌شدن آن، جهت تولید نانوکپسول، از دستگاه اولتراسوند (Hilscher, UP200، آلمان) با طول موج ۴۰ کیلوهرتز به مدت ۱۵ دقیقه و تعداد ۶ سیکل (زمان هر سیکل ۳۰ ثانیه و زمان استراحت ۱۵ ثانیه بین سیکل‌ها، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) استفاده شد. برای کاهش بیشتر اندازه ذرات و افزایش راندمان ذرات نانوکپسوله، از دستگاه هموژنایزر با دور بالا (اولتراتوراکس، IKa، ایتالیا) با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۱۵ دقیقه استفاده گردید. محلول حاصل از فرآیند، در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد منجمد و با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی (Vaco 2 Zirbus، آلمان) در فشار ۰/۰۵۱ میلی‌بار و دمای ۵۰- درجه سانتی‌گراد خشک گردید [16]. نتایج این فرایند، تولید نانوکپسول‌هایی با میانگین سایز ۳/۹۵±۲۶۹/۱ نانومتر، شاخص توزیع اندازه ذره‌ای معادل ۱/۲۸±۰/۴۲۳، پتانسل زتای برابر با ۲/۸۸±۴۶/۷۱+ میلی‌ولت و بازده ریزپوشانی ۴/۰۹±۸۵/۱۹ درصد بود.

۲-۲-۳- تولید سوسیس

در مجموع ۶ نمونه سوسیس با مقادیر مشخص از نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین و نیتریت سدیم تولید شد (جدول ۲). ترکیبات اصلی سوسیس شامل گوشت سر و گردن گوساله (۶۰ درصد)، آب و یخ (۱۸/۵۱ درصد)، روغن سویا (۱۴ درصد)، نمک (۱/۵ درصد)، نشاسته (۲/۸ درصد)، ایزوله سویا (۱/۸ درصد)، فسفات سدیم (۰/۴ درصد)، آسکوربیک‌اسید (۰/۰۵ درصد) و ادویه (۰/۹ درصد) بود. تمام مواد مذکور با یکدیگر در کاتر (Seydelmann, Aalen) مخلوط و خمیر حاصله در بچ-های جداگانه در کاتر به همراه نیتریت سدیم، نانوکپسول-های حامل آستاگزانتین و آب و یخ باقیمانده ترکیب شد. در مرحله بعد، بچ‌ها در بسته‌های استریل پلی‌آمیدی به صورت جداگانه بسته‌بندی و به مدت یک ساعت در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد پخته شدند. نهایتا محصول تولیدشده بوسیله دوش آب سرد خنک و به یخچال با دمای ۱±۴ منتقل شد. دوره نگهداری ۲۸ روز بود و نمونه‌گیری جهت انجام آزمایشات میکروبی با فاصله ۷ روز انجام گردید [20].

Table 2- Research treatments

Treatments	Sodium nitrite (mg/kg)	Nanocapsules carrying astaxanthin (mg/kg)
Control	-	-
A	120	-
B	-	120
C	90	30
D	60	60
E	30	90

۲-۲-۴- جستجوی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در تیمارها

۲-۲-۴-۱- تهیه رقت

جهت تهیه رقت، ابتدا بخش کوچکی از بسته‌بندی سوسیس (پوشش پلی‌آمیدی) با استفاده از الکل ۷۰ درصد ضد

عفونی و بریده شد. به منظور تهیه رقت 10^{-1}، ۲۵ گرم نمونه با ۲۲۵ گرم محلول رقیق‌کننده پپتون بافر ۰/۱ درصد استریل در یک ارلن‌مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری استریل مخلوط شد. مخلوط حاصل با استفاده از هموژنایز (IKA، آلمان) به مدت ۵ دقیقه هموژن گردید. رقت‌های 10^{-2} تا 10^{-9} نیز در پپتون واتر استریل ۰/۱ درصد تهیه شدند [21].

۲-۲-۴-۲- شمارش و میزان میکروارگانیسم‌ها

به منظور کشت *کلستریدیوم پرفرنژنس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، کلی‌فرم‌ها، سالمونلا، *اشریشیاکلی*، کپک‌ها و مخمرها به صورت پورپلیت به ترتیب از شرایط انکوباسیون ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (محیط کشت SPS آگار، غیر هوازی)، ۴۸ ساعت با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (محیط کشت BPA)، ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (محیط کشت VRB آگار، دولایه)، ۲۴ و ۴۸ ساعت با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (محیط کشت‌های PWA، TTB، RV، SSA و BGA)، ۲۴ ساعت در دمای ۴۴ درجه سانتی‌گراد (محیط کشت‌های لوریل سولفات، EC و آب پپتونه)، ۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (محیط کشت DRBC آگار) استفاده شد [21]. به منظور شناسایی *کلستریدیوم بوتولینوم* در تیمارها از استاندارد ملی ایران با شماره ۲۳۲۳ استفاده گردید. اندازه‌گیری میزان باکترهای لاکتیک‌اسید در تیمارهای تحقیق، با استفاده از روش ترکیبی آنزیمی-اسپکترومتری و کیت ترکیبی اندازه‌گیری باکتری-های لاکتیک‌اسید انجام و میزان این باکتری‌ها بر حسب میلی‌گرم بر کیلوگرم گزارش شد [22].

۲-۲-۵- تجزیه و تحلیل آماری

پژوهش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا و به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه[1] و آزمون دانکن (در سطح اطمینان ۹۵ درصد) استفاده شد. همچنین از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۲) برای آنالیز داده‌ها و نرم‌افزار EXCEL (نسخه ۲۰۱۳) جهت رسم جداول و اشکال استفاده گردید.

۳- نتایج

۳-۱- جستجوی *کلستریدیوم پرفرنژنس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و کلی‌فرم‌ها

جدول ۳، شمارش باکتری‌های *کلستریدیوم پرفرنژنس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و کلی‌فرم‌ها را در تیمارهای مختلف نشان می‌دهد. مطابق این جدول، نمونه شاهد به غیر از روز صفر، آلوده به این سه میکروارگانیسم بود. همچنین شمارش میکروارگانیسم‌های مورد بررسی در تیمارهای B و E صرفا در روز ۲۸ بیشتر از $10^{CFU/gr}$ ثبت شد. اما میزان این باکتری‌ها در سه تیمار A، C و D در کل دوره نگهداری کمتر از $10^{CFU/gr}$ (حد استاندارد) بوده است. همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، با افزایش زمان نگهداری، شمارش میکروارگانیسم‌ها در برخی از تیمارها به صورت معنی‌داری افزایش یافته است ($p<0/05$).

Table 3: Counting of different bacteria in research treatments during storage period (CFU/gr)

	Strain	Treatments	Storage time (day)		
		0	7	21	28
Clostridium perfringens	Control	$<10^{d}$	15 ± 0.67^{c}	20 ± 1.15^{b}	28 ± 0.92^{a}
	A	$<10^{a}$	$<10^{a}$	$<10^{a}$	$<10^{a}$
	B	$<10^{b}$	$<10^{b}$	$<10^{b}$	11 ± 0.31^{a}
	C	$<10^{a}$	$<10^{a}$	$<10^{a}$	$<10^{a}$
	D	$<10^{a}$	$<10^{a}$	$<10^{a}$	$<10^{a}$

1. One way Anova

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-14]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.136.9.7]
[DOI: 10.22034/FSCT.20.136.103]

	E	$<10^{b}$	$<10^{b}$	$<10^{b}$	11 ± 0.55^{a}
Staphylococcus aureus	Control	$<10^{d}$	18 ± 0.53^{c}	30 ± 0.42^{b}	37 ± 1.12^{a}
	A	$<10^{a}$	$<10^{a}$	$<10^{a}$	$<10^{a}$
	B	$<10^{b}$	$<10^{b}$	$<10^{b}$	12 ± 0.93^{a}
	C	$<10^{a}$	$<10^{a}$	$<10^{a}$	$<10^{a}$
	D	$<10^{a}$	$<10^{a}$	$<10^{a}$	$<10^{a}$
	E	$<10^{b}$	$<10^{b}$	$<10^{b}$	11 ± 0.15^{a}
Coliform	Control	$<10^{d}$	17 ± 1.24^{c}	31 ± 1.69^{b}	45 ± 1.18^{a}
	A	$<10^{a}$	$<10^{a}$	$<10^{a}$	$<10^{a}$
	B	$<10^{b}$	$<10^{b}$	$<10^{b}$	11 ± 0.81^{a}
	C	$<10^{a}$	$<10^{a}$	$<10^{a}$	$<10^{a}$
	D	$<10^{a}$	$<10^{a}$	$<10^{a}$	$<10^{a}$
	E	$<10^{b}$	$<10^{b}$	$<10^{b}$	11 ± 0.63^{a}

- Different letters in each row indicate significant differences between the data ($p<0.05$).
- Control: without sodium nitrite and nanocapsules carrier astaxanthin, A: 120 mg/kg sodium nitrite, B: 120 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, C: 90 mg/kg sodium nitrite + 30 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, D: 60 mg/kg sodium nitrite + 60 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, E: 30 mg/kg sodium nitrite + 90 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin

۳-۲- جستجوی *سالمونلا، اشریشیاکلی و کلستریدیوم بوتولینوم*

مطابق نتایج به دست‌آمده از جستجوی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، در هیچ یک از تیمارهای فرموله‌شده با مقادیر مختلف نیتریت سدیم و نانوکپسول‌های حامل، باکتری‌های *سالمونلا، اشریشیاکلی* و *کلستریدیوم بوتولینوم* مشاهده نشدند.

۳-۳- ارزیابی میزان باکتری‌های لاکتیک‌اسید

در شکل ۱، میزان باکتری‌های لاکتیک‌اسید در شاهد و سوسیس‌های فرموله‌شده با مقادیر مختلف نیتریت سدیم و نانوکپسول‌های حامل ارائه شده است. مطابق این شکل، میزان باکتری‌های لاکتیک‌اسید در تیمارهای A، C و D طی دوره نگهداری فاقد اختلاف معنی‌دار ($p>0/05$) و از حدود ۲۶ تا ۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم متغیر می‌باشد. این سه تیمار از نظر میزان باکتری مورد بررسی در سطح کمتری از دو تیمار B و E ($p>0/05$) و شاهد قرار داشتند ($p<0/05$). البته در روز هفتم نگهداری تیمارها در دمای یخچال، هر پنج تیمار فرموله‌شده محتوی میزان باکتری‌های لاکتیک‌اسید تقریبا برابری بودند ($p>0/05$) اما با گذشت زمان، اختلاف بین تیمارها معنی‌دار شد ($p<0/05$). حداکثر میزان باکتری‌های لاکتیک‌اسید در دو تیمار B و E مربوط به روز ۲۸ و حدودا معادل ۱۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود. این میزان برای شاهد، ۳۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم ثبت شد.

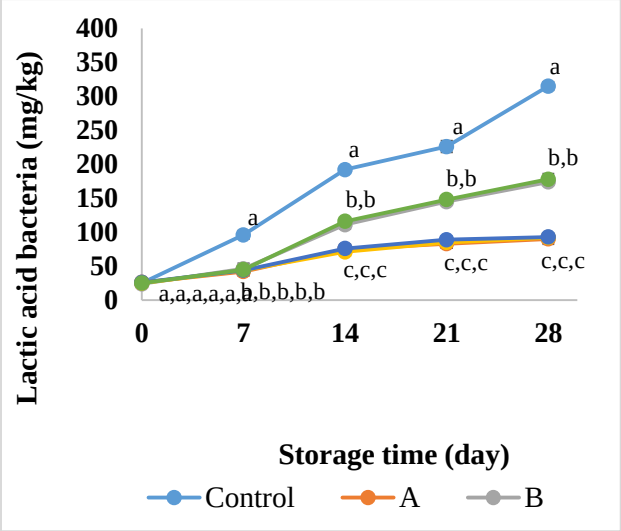

Figure 1: Counting of Lactic acid bacteria in research treatments during storage period

- Different letters in each day indicate significant differences between the data ($p<0.05$).
- Control: without sodium nitrite and nanocapsules carrier astaxanthin, A: 120 mg/kg sodium nitrite, B: 120 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, C: 90 mg/kg sodium nitrite + 30 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, D: 60 mg/kg sodium nitrite + 60 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, E: 30 mg/kg sodium nitrite + 90 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin

۳-۴- شمارش کپک‌ها و مخمرها

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-14]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.136.9.7]
[DOI: 10.22034/FSCT.20.136.103]

شکل ۲، نتایج شمارش کپک‌ها و مخمرها را در تیمارهای تحقیق نشان می‌دهد. همانطور که در این شکل مشاهده می‌شود، هر پنج تیمار فرموله‌شده در کل دوره نگهداری فاقد کلنی کپک و مخمر بودند. اما شاهد محتوی این میکروارگانیسم‌ها بود و شمارش کپک‌ها و مخمرها برای این نمونه در طول دوره نگهداری حداکثر تا LogCFU/gr ۳/۸۸ ثبت شد (روز ۲۸). مطابق شکل ۲، روند رشد و تکثیر کپک‌ها و مخمرها در نمونه شاهد طی دوره نگهداری به صورت قابل توجهی افزایشی است و اختلاف بین روزهای مورد بررسی معنی‌دار می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

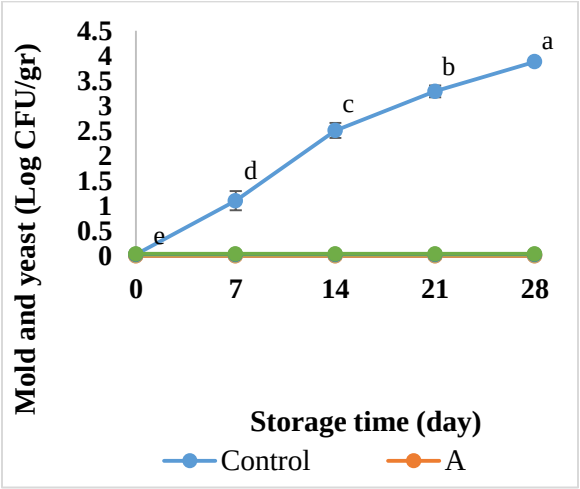

Figure 2: Counting of Yeast and Mold in research treatments during storage period

- Different letters in each day indicate significant differences between the data ($p<0.05$).
- Control: without sodium nitrite and nanocapsules carrier astaxanthin, A: 120 mg/kg sodium nitrite, B: 120 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, C: 90 mg/kg sodium nitrite + 30 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, D: 60 mg/kg sodium nitrite + 60 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, E: 30 mg/kg sodium nitrite + 90 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin

۴- بحث و نتیجه‌گیری

نتایج تحقیقات نشان داده که اسپورهای *کلستریدیوم پرفرنژنس* می‌توانند در غلظت‌های مختلف نمک استفاده‌شده در فرمولاسیون فراورده‌های گوشتی از جمله سوسیس و کالباس باقی بمانند [23]. از آنجا که این اسپورها قادرند طی فرایندهای بعدی تولید سوسیس از جمله پاستوریزاسیون و افزایش فعالیت آبی دوباره فعال شوند، تهدیدی برای سلامت مصرف‌کننده به حساب می‌آیند [24]. به همین دلیل کنترل رشد این باکتری‌ها در فراورده‌های گوشتی با استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی و یا طبیعی ضروری می‌باشد [25]. در تحقیق حاضر میزان این باکتری در تیماری که حاوی ۱۲۰mg/kg نیتریت سدیم بود (تیمار A) و همچنین تیمارهایی که در آن‌ها این میزان از نیتریت سدیم با ۳۰mg/kg و ۶۰mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین جایگزین شده بود (به ترتیب تیمارهای C و D) در محدوده استاندارد یعنی کمتر از ۱۰CFU/gr (استاندارد ۲۳۰۳، ۱۳۸۴) ثبت شد. همچنین تیمار حاوی صرفا ۱۲۰mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین (تیمار B) و تیماری که این میزان از نانوکپسول‌ها در آن با ۳۰mg/kg نیتریت سدیم جایگزین شده بود (تیمار E)، به غیر از روز ۲۸ دوره نگهداری، از نظر شمارش *کلستریدیوم پرفرنژنس* در محدوده استاندارد قرار داشتند. این نتایج نشان می‌دهد که نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین به عنوان جایگزین مطلوبی برای نیتریت سدیم در تولید فراورده‌های گوشتی مطرح هستند و به این ترتیب می‌توان از مضرات سوسیس و کالباس که غالبا به دلیل نیتریت بروز می‌کنند، پیشگیری کرد. در تحقیقی که از عصاره ترکیبی برگ‌های چای سبز، گزنه و زیتون و همچنین نایسین (۲۰۰ پی‌پی‌ام)، کیتوزان (۰/۵ درصد) و اپسیلون پلی‌لیزین (۰/۲ درصد) به منظور تولید سوسیس فرانکفورتر فراسودمند بدون نیتریت استفاده شد، طی ۴۵ روز نگهداری محصول در دمای یخچال صرفا در تیمار شاهد (بدون هیچگونه نگهدارنده) *کلستریدیوم پرفرنژنس* ثبت شد و در سایر تیمارهای

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-14]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.136.9.7]
[DOI: 10.22034/FSCT.20.136.103]

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-14]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.136.9.7]

[DOI: 10.22034/FSCT.20.136.103]

فرموله‌شده با نگهدارنده‌های طبیعی و شیمیایی، میزان این باکتری در محدوده استاندارد (۱۰CFU/gr) قرار داشت [26]. طی تحقیقی از غلظت‌های مختلف تیمول و آستاگزانتین به عنوان جایگزین نیتریت در فرمولاسیون سوسیس پروبیوتیک استفاده شد. نتایج نشان داد که ترکیب این دو ماده در طول دوره نگهداری سوسیس در دمای یخچال به مدت ۴۵ روز موجب کاهش باکتری‌های لاکتیک‌اسید وگونه *کلستریدیوم پرفرنژنس* می‌گردد [27] که این نتیجه با یافته‌های پژوهش حاضر (از نظر قابلیت آستاگزانتین به منظور مقابله با رشد و تکثیر باکتری‌های *کلستریدیوم پرفرنژنس* و لاکتیک‌اسید) تطابق دارد. در تحقیق جکسون [28] و همچنین پژوهش ریاضی و همکاران [29] که اثر استفاده از ترکیبات طبیعی بر خصوصیات میکروبی فراورده‌های گوشتی (نگهداری‌شده به مدت ۳۰ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) ارزیابی شد، عدم وجود *کلستریدیوم پرفرنژنس* در همه تیمارهای فرموله‌شده گزارش گردید. طی پژوهشی ۱۲۰ نمونه از سوسیس و کالباس‌های عرضه‌شده در فروشگاه‌های سطح شهر شهرکرد از نظر وجود *کلستریدیوم پرفرنژنس* مورد ارزیابی قرار گرفتند که در هیچ نمونه‌ای این باکتری مشاهده نشد [30]. این نتیجه به دلیل استفاده از نگهدارنده‌های مختلفی از جمله نیتریت سدیم است که در پژوهش حاضر نیز چنین نتیجه‌ای ثبت شد.

استافیلوکوکوس اورئوس، یک باکتری گرم مثبت و بیماری‌زایی است که محیط سوسیس برای رشد و تکثر آن مطلوب است و در چنین شرایطی با تولید انتروتوکسین موجب به خطرافتادن سلامت مصرف‌کنندگان می‌شود. انتروتوکسینی که از این باکتری ترشح می‌شود به حدی مهم است که به عنوان چهارمین عامل بیماری‌های ناشی از مصرف غذا مطرح است [31]. به طور کلی، کارشناسان، گوشت و فراورده‌های گوشتی را شایع‌ترین علل بروز مسمومیت غذایی ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌دانند [32]. افزایش تعداد باکتری‌های لاکتیک‌اسید، pH اسیدی و رقابت میکروبی از عواملی هستند که می‌توانند اثر کاهنده بر رشد و تکثیر این باکتری اعمال کنند [33]. کلی‌فرم‌ها باکتری‌هایی هستند که فلور طبیعی دستگاه گوارش حیوانات را تشکیل می‌دهند که برخی از آن‌ها به دلیل تولید هیستامین و دی‌آمین برای سلامتی مضر و بیماری‌زا هستند [33]. جمعیت این باکتری‌ها شاخص مناسبی به منظور تشخیص کیفیت فراورده‌های گوشتی (سوسیس و کالباس) و همچنین ارزیابی وضعیت بهداشتی و آلودگی آن‌ها است [34]؛ به این معنی که رعایت اصول ایمنی نگهداری مواد اولیه، در کاهش میزان این میکروارگانیسم‌ها موثر می‌باشد [35]. *استافیلوکوکوس اورئوس* و کلی‌فرم‌ها نیز همانند *کلستریدیوم پرفرنژنس* در تیمارهای A (۱۲۰mg/kg نیتریت سدیم)، C (۹۰mg/kg نیتریت سدیم + ۳۰mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین) و D (۶۰mg/kg نیتریت سدیم + ۶۰mg/kg نانوکپسول‌های حامل) طی دوره نگهداری کمتر از ۱۰CFU/gr ثبت شدند که این مورد هم نشان‌دهنده کارایی بالای نیتریت سدیم و همچنین مطلوب‌بودن نانوکپسول‌های حامل جهت مقابله با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در ترکیب با نیتریت سدیم است. از آنجا که حد مجاز این باکتری‌ها (*استافیلوکوکوس اورئوس* و کلی‌فرم‌ها) در فراورده‌های گوشتی کمتر از ۱۰CFU/gr است (استاندارد ۲۳۰۳، ۱۳۸۴)، می‌توان ادعا کرد که نمونه شاهد با گذشت کمتر از یک هفته نگهداری در دمای یخچال، از نظر میزان *استافیلوکوکوس اورئوس* و کلی‌فرم‌ها استاندارد نیست. در پژوهش عبدالمالک و همکاران [36] از آستاگزانتین استخراج‌شده از ضایعات میگو[1] به منظور افزایش زمان ماندگاری استیک مرغ در دمای یخچال استفاده شد. یافته‌ها موید آن بود که تیمار دارای آستاگزانتین نسبت

1. *Parapenaeus longirostris*

به شاهد در مهار باکتری کل[1]، سرماگراها، کلیفرم مدفوعی[2]، *استافیلوکوکوس اورئوس* و سالمونلا اثرگذاری بیشتری داشت و شمارش باکتری‌های مذکور به صورت معنی‌داری در این تیمار کمتر بود. این پژوهشگران عنوان کردند که افزودن آستاگزانتین طبیعی می‌تواند پایداری میکروبیولوژیکی استیک مرغ را در طول زمان نگهداری بهبود بخشد. پژوهش مذکور مانند تحقیق حاضر نشان داد که آستاگزانتین در زمینه مقابله با *استافیلوکوکوس اورئوس* و کلی‌فرم‌ها اثرگذاری قابل توجهی دارد.

آلودگی فراورده‌های گوشتی به *اشریشیاکلی*، سالمونلا و *کلستریدیوم بوتولینوم* ارتباط تنگاتنگی با آلودگی گوشت و لاشه حیوان مورد استفاده به منظور تولید فراورده، رعایت اصول ایمنی و بهداشتی ذبح و همچنین شرایط نگهداری (دمای سرخانه) دارد [37]. در تحقیق حاضر اثری از این باکتری‌ها در تیمارهای نگهداری‌شده در دمای یخچال به مدت ۲۸ روز وجود نداشت که این مورد علاوه بر مویدبودن رعایت موارد مذکور در بالا، می‌تواند اثر استفاده از ترکیبات ضد میکروبی در فرمولاسیون سوسیس (نیتریت سدیم و نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین) باشد [26]. این نتایج با پژوهش‌های کوزاسینسکی و همکاران [33] و همچنین الجیلجانا و همکاران [38] مطابقت دارد. یافته‌های پژوهش ایرنا و همکاران [10] در زمینه ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی (قطر هاله عدم رشد) آستاگزانتین استخراج‌شده از میگو[3] (با دو روش شیمیایی و فشار بالا) نشان داد که این رنگدانه قادر به مهار رشد و تکثیر باکتری‌های *اشریشیاکلی*، *انتروباکتر آئروژنز*[4]، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس*[5] است. در تحقیق دیگری، رنگدانه آستاگزانتین با استفاده از روش حلال استون از سه گونه خرچنگ[6] استخراج و فعالیت ضد باکتریایی آن علیه باکتری *اشریشیاکلی* ایزوله‌شده از شیر و گوشت فاسد بررسی شد. یافته‌ها حاکی از قابلیت مطلوب رنگدانه در مقابله با باکتری مذکور بود. به گونه‌ای که قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های ۳۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از حدود ۵ تا ۱۲ میلی‌متر متغیر گزارش شد [39]. دو تحقیق مذکور همانند تحقیق حاضر نقش مطلوب آستاگزانتین را در مقابله با باکتری‌های مورد مطالعه تائید کردند. در پژوهشی که خصوصیات میکروبی سوسیس تخمیری خشک بدون کشت آغازگر طی ۹۰ روز عمل‌آوری مورد بررسی قرار گرفت، محصول تولیدشده عاری از *استافیلوکوکوس اورئوس*، سالمونلا و *کلستریدیوم بوتولینوم* بود [40]. طی تحقیقی ۱۷۰۰ نمونه غذایی از نظر وجود اسپور و توکسین *کلستریدیوم بوتولینوم* ارزیابی شدند که نتایج نشان داد بیشترین میزان آلودگی (۹ درصد) مربوط به ماهی و کنسرو آن بود. در تحقیق مذکور هیچ نمونه سوسیس و کالباسی حاوی *کلستریدیوم بوتولینوم* نبود که این مورد (از نظر کارابودن نیتریت سدیم به منظور مقابله با باکتری مورد بررسی) مطابق با یافته‌های تحقیق حاضر است [41]. در پژوهشی که ۵۰ نمونه همبرگر جمع‌آوری‌شده از اغذیه‌فروشی‌های مشهد از نظر آلودگی به *اشریشیاکلی* ارزیابی شدند، فقط ۲ درصد نمونه‌ها (یک نمونه) به این باکتری آلوده بودند [42].

باکتری‌های لاکتیک‌اسید یکی از میکروارگانیسم‌های اصلی عامل فساد فراورده‌های پروتئینی نگهداری‌شده در دمای یخچال هستند [43]. حد قابل قبول این باکتری‌ها در سوسیس و سایر فراورده‌های پروتئینی، ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم است [44]. با توجه به این حد، می‌توان ادعا کرد که همه تیمارهای فرموله‌شده با مقادیر مختلف نیتریت سدیم و نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین طی ۲۸ روز نگهداری در دمای یخچال از نظر این باکتری‌ها در محدوده استاندارد قرار داشتند اما نمونه شاهد در روز ۲۸ از این بازه

1. Total flora
2. Fecal coliform
3. *Penaeus monodon*
4. *Enterobacter aerogenes*
5. *Bacillus subtilis*
6. *Portunus sanguinolentus, Callinectes sapidus, Paralithodes brevipes*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-14]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.136.9.7]
[DOI: 10.22034/FSCT.20.136.103]

خارج شد. نتایج این بخش نشان داد که استفاده از نیتریت سدیم و نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین (هم به صوت منفرد و هم به شکل ترکیبی) در فرمولاسیون سوسیس می‌تواند بر کاهش میزان باکتری‌های لاکتیک‌اسید نسبت به شاهد موثر واقع گردد. اما این دو نگهدارنده از نظر میزان اثرگذاری بر مهار رشد این باکتری‌ها تفاوت‌هایی دارند که در بیشتر موارد این اختلاف‌ها معنی‌دار بوده است. مطابق یافته‌ها، تیمار A که صرفا حاوی ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیتریت سدیم (حداکثر مجاز) بود، از نظر میزان باکتری‌های لاکتیک‌اسید با دو تیمار C (حاوی ۹۰mg/kg نیتریت سدیم و ۳۰mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین) و D (حاوی ۶۰mg/kg نیتریت سدیم و ۶۰mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین) اختلاف معنی‌داری نداشت. شرایط مشابهی بین دو تیمار B (۱۲۰mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین) و E (حاوی ۳۰mg/kg نیتریت سدیم و ۹۰mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین) نیز وجود داشت. این یافته‌ها حاکی از کارایی بالای نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین به منظور ایفای نقش نیتریت سدیم در فراورده‌های گوشتی هستند. در تحقیقی که از غلظت‌های مختلف تیمول و آستاگزانتین به عنوان جایگزین نیتریت در فرمولاسیون سوسیس پروبیوتیک استفاده شد، اثر قابل توجه آستاگزانتین بر کاهش جمعیت باکتری‌های لاکتیک‌اسید ثابت گردید که این یافته با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد [27].

حضور بیش از حد مجاز کپک‌ها و مخمرها در مواد غذایی مختلف، علاوه بر اینکه تهدیدی برای سلامت مصرف‌کنندگان محسوب می‌شود، به دلیل فعالیت‌های لیپولیتیک[1] و پروتئولیتیک[2] می‌تواند خواص حسی محصولات مختلف بویژه فراورده‌های گوشتی را تحت تاثیر قرار دهد [33]. وجود کپک و مخمر در فراورده‌های گوشتی ارتباط نزدیکی به میزان سلامت و یا آلودگی گوشت مورد استفاده و سایر مواد اولیه دارد. ضمن اینکه رعایت ایمنی و استاندارد طی روند پخت و تولید محصول از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است [45]. نتایج بخش آنالیز کپک‌ها و مخمرها نشان داد که همه تیمارهای فرموله‌شده با مقادیر و نسبت‌های مختلف نیتریت سدیم و نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین در کل دوره نگهداری فاقد کلنی کپک و مخمر بودند. با توجه به وجود قابل توجه این میکروارگانیسم‌ها در نمونه شاهد، می‌توان ادعا کرد که علاوه بر نیتریت سدیم، نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین نیز در زمینه مقابله با رشد کپک‌ها و مخمرها بسیار موثر هستند و بواسطه این خاصیت و ارزش غذایی، می‌توانند جایگزین مطلوبی برای نیتریت سدیم باشند. از آنجا که حد مجاز کپک‌ها و مخمرها در فراورده‌های گوشتی کمتر از ۱۰۰CFU/gr است [44]، می‌توان ادعا کرد که نمونه شاهد تقریبا از روز ۷ نگهداری به بعد، از این دامنه استاندارد خارج شد. در تحقیقی که از عصاره ترکیبی برگ‌های چای سبز، گزنه و زیتون و همچنین ترکیبات شیمیایی از جمله نایسین، کیتوزان و اپسیلون پلی‌لیزین به منظور تولید سوسیس فرانکفورتر فراسودمند بدون نیتریت استفاده شد، هیچ کلنی کپک و مخمری در دو تیمار محتوی ۰/۵ درصد کیتوزان و ۰/۲ درصد اپسیلون پلی‌لیزین و همچنین تیماری که دارای ۲۰۰ پی‌پی‌ام نایسین، ۰/۵ درصد کیتوزان و ۰/۲ درصد اپسیلون پلی‌لیزین بود، مشاهده نشد. در تحقیق مذکور بیشترین میزان شمارش کپک‌ها و مخمرها مربوط به شاهد و روز ۴۵، معادل Log ۳/۴۲CFU/gr بود [26]. حسینی و همکاران [46] در پژوهشی میزان میکروارگانیسم‌های فراورده‌های گوشتی (محتوی ۱۲۰ پی‌پی‌ام نیتریت سدیم) با درصدهای مختلف گوشت را طی ۸۷ روز (در دمای یخچال) بررسی کردند. نتایج این پژوهش نشان داد فراورده محتوی ۴۰ درصد گوشت، تا روز ۵۰ نگهداری فاقد کلنی کپک و مخمر بود.

1.Lipolytic
2.Proteolytic

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-14]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.136.9.7]
[DOI: 10.22034/FSCT.20.136.103]

۵- نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که اولا حد مجاز نیتریت سدیم (۱۲۰mg/kg) به منظور مقابله با رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد در فرمولاسیون سوسیس کارائی لازم را دارد. دوما، اگر ۳۰mg/kg تا ۶۰mg/kg (حداکثر ۵۰ درصد) از این حد مجاز با نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین جایگزین شود، ترکیب حاصل به منظور کنترل رشد و تکثیر عوامل بیماری‌زا و آلوده‌کننده فراورده‌های گوشتی همان اثر ۱۲۰mg/kg نیتریت سدیم را داراست و به این صورت است که می‌توان نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین را به عنوان جایگزین نیتریت سدیم، کاهنده مضرات فراورده‌های گوشتی و افزاینده ارزش غذایی آن‌ها به صنایع تولیدی این محصولات معرفی کرد. البته باید در تحقیقات تکمیلی حد بهینه و یا حداکثر میزان قابل استفاده نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین را در فرمولاسیون فراورده‌های گوشتی از جهت حفظ خواص حسی (و رنگی) محصول و صرفه اقتصادی تولید نانوکپسول‌ها بررسی کرد. چرا که در صورت امکان استفاده از مقادیر بیشتر از ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین در فرمولاسیون، (به منظور کنترل رشد میکروب‌ها) شاید دیگر نیازی به نیتریت سدیم نباشد و یا اینکه این نیاز به حداقل و کمتر از ۵۰ درصد برسد.

۶- تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تحت قرارداد با شماره ۰۳-۱۴۰۱-۰۳ انجام شد که به این وسیله سپاسگزاری می‌شود.

۵- منابع

[1] Toldrá, F., Aristoy, M. C. and Flores, M., 2009. Relevance of nitrate and nitrite in dry-cured ham and their effects on aroma development. *Grasas y Aceites*, 60(3), 291-296.

[2] Ferguson, L. R., Philpott, M. and Karunasinghe, N., 2004. Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology*, 198(1-3), 147-159.

[3] Safari, R., Raftani Amiri, Z., Reyhani Poul, S. and Ghaffari, H., 2022. Nanoencapsulation of phycocyanin extracted from the alga Spirulina (*Spirulina platensis*) and use of resulting nanoparticles in ice cream formulation. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 123 (19), 145-159.

[4] Liu, Y. S., and Wu, J. Y., 2007. Optimization of cell growth and carotenoid production of *Xanthophyllomyces dendrorhous* through statistical experiment design. *Biochemical Engineering Journal*, 36(2), 182-189

[5] Gu, Z., Deming, C., Yongbin, H., Zhigang, C. and Feirong, G., 2008. Optimization of carotenoids extraction from *Rhodobacter sphaeroides*. *LWT-Food Science and Technology*, 41(6), 1082-1088.

[6] Zhou, T., Wang, X., Ju, Y., Shi, C. and Kan, G., 2018. Stability application and research of astaxanthin integrated into food. In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering (Vol. 394, No. 2, p. 022007). IOP Publishing

[7] Guerin, M., Huntley, M. E. and Olaizola, M., 2003. *Haematococcus astaxanthin*: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*, 21(5), 210-216.

[8] Yuan, J. P., Peng, J., Yin, K. and Wang, J. H., 2011. Potential health-promoting effects of astaxanthin: A high-value carotenoid mostly from microalgae. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(1), 150-165.

[9] Dong, S., Huang, Y., Zhang, R., Wang, S. and Liu, Y., 2014. Four different methods comparison for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. *The Scientific World Journal*, 2014.

[10] Irna, C., Jaswir, I., Othman, R. and Jimat, D., 2017. Antioxidant and antimicrobial activities of astaxanthin from *Penaeus monodonin* comparison between chemical extraction and High Pressure Processing (HPP). *International Food Research Journal*, 24, 508-513.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-14]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.136.9.7]
[DOI: 10.22034/FSCT.20.136.103]

[11] Zhang, L. and Wang, H., 2015. Multiple mechanisms of anti-cancer effects exerted by astaxanthin. *Marine Drugs*, 13(7), 4310-4330.

[12] Fassett, R. G. and Coombes, J. S., 2011. Astaxanthin: a potential therapeutic agent in cardiovascular disease. *Marine Drugs*, 9(3), 447-465.

[13] Chang, M. X. and Xiong, F., 2020. Astaxanthin and its effects in inflammatory responses and inflammation-associated diseases: recent advances and future directions. *Molecules*, 25(22), 1-14.

[14] Zhuge, F., Ni, Y., Wan, C., Liu, F. and Fu, Z., 2021. Anti-diabetic effects of astaxanthin on an STZ-induced diabetic model in rats. *Endocrine Journal*, 68(4), 451-459.

[15] Reyhani Poul, S. and Yeganeh, S., 2022. Physicochemical and antioxidant properties of chitosan-coated nanoliposome loaded with bioactive peptides produced from shrimp wastes hydrolysis. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 21(4), 987-1003.

[16] Machado, A. R., Assis, L. M., Costa, J. A. V., Badiale-Furlong, E., Motta, A. S., Micheletto, Y. M. S. and Souza-Soares, L. A., 2014. Application of sonication and mixing for nanoencapsulation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in liposomes. *International Food Research Journal*, 21(6), 2201-2206.

[17] Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S. and Bugarski, B., 2011. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1, 1806-1815.

[18] Dewati, P. R., Rohman, A. and Budiman, A., 2020. A Preliminary Study of Extraction and Purification Processes of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialisas* a Natural Antioxidant. In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering (Vol. 778, No. 1, p. 012032). IOP Publishing.

[19] Sun, W., Lin, H., Zhai, Y., Cao, L., Leng, K. and Xing, L., 2015. Separation, Purification, and Identification of (3S, 3′ S) - trans-Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Separation Science and Technology*, 50(9), 1377-1383.

[20] Khaleghi, A., Rezaei K., Kasai, M., Khosravi, K. and Soleymani, M., 2013. Evaluation of antioxidant properties of *Berberis crataegina* extract on fat oxidation of beef sausages during refrigerated storage. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*, 7 (5), 345-353.

[21] FDA. 2013. Bacteriological analytical manual for foods. Washington, USA: US Government Printing Office.

[22] Birnbaum, D. G., Leonard, S., Heil, J. R., Buhlert, J. E., Wolcott, T. K. and Ansar, A., 1977. Microbial activity in heated and unheated to Wijnker mato serum concentrates. *Journal of Food Processing and Preservation*, 1(2), 103-118.

[23] Houben, J. H., 2005. A survey of dry-salted natural casings for the presence of Salmonella spp., *Listeria monocytogenes* and sulphite-reducing Clostridium spores. *Food Microbiology*, 22(2-3), 221-225.

[24] Zaika, L. L., 2003. Influence of NaCl content and cooling rate on outgrowth of *Clostridium perfringens* spores in cooked ham and beef. *Journal of Food Protection*, 66(9), 1599-1603.

[25] Ercolini, D., Ferrocino, I., La Storia, A., Mauriello, G., Gigli, S., Masi, P. and Villani, F., 2010. Development of spoilage microbiota in beef stored in nisin activated packaging. *Food Microbiology*, 27(1), 137-143.

[26] Alirezalu, K., Hesari, J., Eskandari, M. H., Valizadeh, H., Sirousazar, M. and Nemati, Z., 2018. Evaluation of microbiological and sensory properties of functional frankfurter sausage during storage. *Journal of Food Science and Technology*, 83 (15), 267-280.

[27] Mohammadpourfard, I., Khanjari, A., Akhonzadeh Basti, A., Herrero-Latorre, C., Shariatifar, N. and Hosseini, H., 2021. Evaluation of microbiological, chemical, and sensory properties of cooked probiotic sausages containing different concentrations of astaxanthin, thymol, and nitrite. *Food Science and Nutrition*, 9(1), 345-356.

[28] Jackson, A., 2010. Investigating the microbiological safety of uncured no nitrate or nitrite added process ed meat products. PhD thesis, Iowa State University.

[29] Riazi, F., Zeynali, F., Hoseini, E. and Behmadi, H. 2016. Effect of dry red grape pomace as a nitrite substitute on the

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-14]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.136.9.7]
[DOI: 10.22034/FSCT.20.136.103]

microbiological and physicochemical properties and residual nitrite of dry-cured sausage. *Nutrition and Food Sciences Research*, 3(3), 37-44.

[30] Shakerian, A., Rokni, N., Sharifzadeh, A., and Emampour, H., 2006. Study of microbial contamination of sausage supply in Shahrekord supermarkets. 2nd congress and exhibition of food science, Isfahan.

[31] Rahimi, E., 2013. Detection of classical enterotoxins of Staphylococcus aureus in raw sheep, goat, camel, and water buffalo milk by ELISA method. *Comparative Clinical Pathology*, 22(2), 181-184.

[32] Pillsbury, A., Chiew, M., Bates, J. and Sheppeard, V., 2013. An outbreak of staphylococcal food poisoning in a commercially catered buffet. *Commun Dis Intell*, 37(2), 144-148.

[33] Kozacinski, L., Zdolec, N., Hadziosmanovic, M., Cvrtila, Z., Filipovic, I. and Majic, T., 2006. Microbial flora of the Croatian traditionally fermented sausage. *Archiv fur Lebensmittelhygiene*, 57(5), 141-147

[34] Filimon, M. N., Borozan, A., Bordean, D., Radu, F. and Popescu, R., 2010. Microorganisms, qualitative indicators for meat products. *Animal Science and Biotechnologies*, 43(2), 346-349. 141-147

[35] Ferreira, V., Barbosa, J., Silva, J., Felício, M. T., Mena, C., Hogg, T. and Teixeira, P., 2007. Characterisation of alheiras, traditional sausages produced in the North of Portugal, with respect to their microbiological safety. *Food Control*, 18(5), 436-440.

[36] Abdelmalek, B. E., Sila, A., Ghlissi, Z., Taktak, M. A., Ayadi, M. A. and Bougatef, A., 2016. The influence of natural astaxanthin on the formulation and storage of marinated chicken steaks. *Journal of Food Biochemistry*, 40(4), 393-403.

[37] Karimi, M., Mehrabian, S., RAFIEI, T. R. and Samiai, B., 2010. A study on microbial properties of mechanically deboned chicken meat in meat plan of Tehran.

[38] Ljiljana, P., Natalija, D., Predrag, I., tatjana, T. and Vladimir, T., 2011. Quality and safety standardization of traditional fermented sausages. *Tehnologija Mesa* 74, 271-285.

[39] Suganya, V. and Asheeba, S., 2015. Antioxidant and antimicrobial activity of astaxanthin isolated from three varieties of crabs. *International Journal of Recent Scientific Research*, 6(10), 6753-6758.

[40] Dabbagh, H., Alizadeh, A. and Seyed Moslemi, A., 2018. Evaluation of microbial characteristics of dry fermented sausage without primer culture. *Journal of Food Research*, 28 (2), 115-125

[41] Modarres, S., 1997. Role of Clostridium botulinumspecies in food contamination in Iran. *Journal of Scientific Medicine Ahvaz Medical Science University*. (23), 33-40

[42] Soltaninejad, V., 2005. Isolation of E. coli O157:H7from hamburger samples in Mashhad. 14th National Congress of Veterinary Medicine, Tehran.

[43] Korkeala, H. J. and Björkroth, K. J., 1997. Microbiological spoilage and contamination of vacuum-packaged cooked sausages. *Journal of Food Protection*, 60(6), 724-731.

[44] Porretta, S. and Vicini, E., 1993. Changes in tomato pulp quality caused by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Science & Technology*, 28(6), 611-616.

[45] Gungor, E. and Gokglu, N., 2010. Determination of microbial contamination sources at a Frankfurter sausage processing line. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 34(1), 53-59

[46] Hosseini, H., Ahmadi, H., Akhavan, H., Ferdowsi, R., Khaksar, R., Shahraz, F. and Kamran, M., 2007. The growth pattern of aerobic mesophilic microorganisms, cold-loving, mold and yeast in 4 groups of heated red meat products during the storage period. *National Nutrition &Food Technology Research Institute*, 3 (2), 33-40

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-14]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.136.9.7]
[DOI: 10.22034/FSCT.20.136.103]

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Effect of replacing sodium nitrite by nanocapsules carrying astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* in common sausage formulation on growth and proliferation of pathogenic and spoilage microorganisms

Sakineh Yeganeh[1*], Soheyl Reyhani Poul[2]

1. Professor, Department of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

2. PhD graduate, Department of Processing of Fishery Products, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

ABSTRACT

The purpose of present study was to use nanocapsules carrying astaxanthin pigment in common sausage formulation as a substitute for sodium nitrite and search for pathogenic and spoilage microorganisms in the product. For this purpose, after extracting astaxanthin from Haematococcus pluvialis microalgae and producing nanocapsules carrying pigment by maltodextrin-sodium caseinate combined coating, five treatments using different proportions of sodium nitrite and nanocapsules carrying astaxanthin along with control were designed and evaluated in term of the presence of Clostridium perfringens, Staphylococcus aureus, coliform, salmonella, Escherichia coli, Clostridium botulinum, lacticacid bacteria, yeasts and molds during 28 days of storage at refrigerator temperature (4±1°C). According to the results, in the treatment with the permissible limit of sodium nitrite or 120 mg/kg (treatment A) and also the treatments that this limit was replaced by 30 mg/kg (treatment C) and 60 mg/kg (treatment D) of nanocapsules carrying astaxanthin, (during the storage period), the counts of Clostridium perfringens, Staphylococcus aureus, and coliform bacteria were within the standard limit and recorded less than 10 cfu/gr. In treatments containing only 120 mg/kg nanocapsules carrying astaxanthin (treatment B) and also containing 30 mg/kg sodium nitrite and 90 mg/kg nanocapsules carrying astaxanthin (treatment E), only on day 28, the counts of three mentioned bacteria were more than 10 CFU/gr. Further, it was found that none of the research treatments contained Salmonella, Escherichia coli and Clostridium botulinum bacteria. Also, all five formulated treatments (unlike the control sample) were within the standard range in terms of lactic acid bacteria during storage time. The results of counting molds and yeasts showed that this treatments, unlike the control sample, did not have any mold and yeast colonies in the whole of storage period. According to the findings of this research if 50% of permissible sodium nitrite limit using nanocapsules carrying astaxanthin is replaced, it is possible to produce a product free of health-threatening microorganisms. In addition, by this process, the harmful effects of sodium nitrite will be reduced and the usefulness of the product will be increased due to the nutritional value and the proven role of astaxanthin in maintaining health and preventing various diseases.

ARTICLE INFO

Article History:

Received :2023/1/27
Accepted :2023/4/25

Keywords:

Meat products,

Sodium nitrite,

Nanocapsules carrying astaxanthin,

Clostridium perfringens,

Staphylococcus aureus

DOI: **10.22034/FSCT.20.136.103**
DOR:**20.1001.1.20088787.1402.20.136.9.7**

*Corresponding Author E-Mail:
skyeganeh@gmail.com;
s.yeganeh@sanru.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-14]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.136.9.7]

[DOI: 10.22034/FSCT.20.136.103]