مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

اثر جایگزینی نیتریت سدیم با نانوامولسیون اسانس زنیان وکیتوزان بر برخی ویژگی‌های شیمیایی و ماندگاری کالباس گوشت قرمز در دمای یخچال

المیرا طاهرزاده[۱]، اکرم آریان فر[۱*]، الهام مهدیان[۱]، شراره محسنی[۲]

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران.

۲- گروه شیمی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹ /۰۷/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۲۷

کلمات کلیدی:

گوشت قرمز،

کیتوزان،

نانوامولسیون،

زنیان،

زمان ماندگاری.

DOI: 10.52547/fsct.18.117.247

* مسئول مکاتبات:

a_aria_1443@yahoo.com

چکیده

به دلیل اهمیت مصرف گوشت و فرآورده‌های آن بخصوص سوسیس و کالباس و عوارض سوء ناشی از مصرف نگهدارنده‌های مصنوعی مورد استفاده در آن‌ها، این تحقیق با هدف بررسی اثر نگهدارنده‌های طبیعی کیتوزان ونانوامولسیون اسانس زنیان به عنوان جایگزین نیتریت سدیم بر ماندگاری کالباس گوشت حرارت دیده و مقایسه آن با نگهدارنده سنتزی نیتریت سدیم انجام شد. اثر نانوامولسیون زنیان (در سطوح صفر، ۱، ۲ و ۳ درصد) و پودر کیتوزان (در سطوح صفر، ۰/۵ و ۱ درصد) به عنوان جایگزین نیتریت سدیم بر ویژگی‌های میکروبی(شمارش کلی، کلی‌فرم‌ها، اسیدلاکتیک باکتری‌ها و کپک ومخمر) و برخی ویژگی‌های شیمیایی شامل(pH و ظرفیت نگهداری آب) کالباس گوشت قرمز در طول ۳۰ روز نگهداری در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد بررسی گردید. آزمایشات در قالب طرح کاملا تصادفی بر پایه فاکتوریل و در سه تکرار انجام گرفت و جهت تعیین اختلاف معنی‌دار بین میانگین داده‌ها، از آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ استفاده شد. نتایج آنالیز میکروبی حاکی از موثر بودن کیتوزان و نانوامولسیون زنیان در کاهش فلور میکروبی نمونه های کالباس در طول دوره ذخیره‌سازی بودند و بیشترین کاهش بار میکروبی در نمونه‌های حاوی نانو امولسبون اسانس زنیان و کیتوران مشاهده شد که حاکی از اثر سینرزیستی این دو ترکیب است. با افزایش غلظت کیتوزان ظرفیت نگهداری آب نمونه‌های کالباس نسبت به کنترل در طول زمان نگهداری افزایش و میزان pH کاهش یافت، اما افزایش غلظت نانوامولسیون اثر معنی‌داری بر این پارامترها نداشت. ترکیب کیتوزان ۱ درصد و نانوامولسیون ۲-۳ درصد مطلوب‌ترین نتایج را نشان دادکه می‌تواند پتانسیل ارزشمندی برای استفاده تجاری داشته‌باشد و تولید محصولات گوشتی را بدون استفاده از نیتریت‌ها یا سایر مواد افزودنی مصنوعی بهبود بخشد.

۱- مقدمه

سوسیس و کالباس از معروف ترین فراورده های گوشتی است که مورد علاقه میلیون ها مصرف کننده در سراسر جهان می باشد [۱]. عمده ترین مواد تشکیل دهنده این فراورده ها گوشت، چربی یا روغن، آب، مواد پروتئینی اتصال دهنده، مواد پرکننده، ادویه جات، نگهدارنده ها و سایر افزودنی ها هستند [۲].

با توجه به ماهیت فساد پذیر محصولات گوشتی بخصوص از لحاظ رشد میکروارگانیسم‌ها و اکسیداسیون چربی‌ها نیاز به روش‌های بازدارنده و استفاده از مواد نگهدارنده به منظور جلوگیری و یا کاهش سرعت فساد این محصولات می‌باشد. مواد شیمیایی مختلفی به منظور افزایش زمان ماندگاری و حفظ کیفیت محصولات گوشتی استفاده می‌شود که یکی از پر مصرف ترین آنها، نمک های نیتریت و نیترات می باشد [۳]. از مهمترین اهداف استفاده از این ترکیبات در فرآورده های گوشتی می‌توان به ایجاد رنگ و طعم مناسب در محصول، کنترل رشد اسپورها (مخصوصا اسپور کلستریدیوم بوتولینوم) و در نتیجه افزایش زمان ماندگاری فرآورده گوشتی اشاره نمود [٤]. لازم به ذکر است که استفاده از مقادیر بالای نمک‌های نیترات و نیتریت در فرآورده‌های گوشتی سلامت انسان را تهدید می‌کند، چرا که مقادیر مازاد نیترات طی واکنش با اسیدهای آمینه به تولید ترکیبات سرطان‌زا منجر می‌شود [۵]. بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۲۳۰۳ حد مجاز برای مصرف سدیم نیتریت در فراورده های سوسیس و کالباس 120mg/kgمی‌باشد. کاهش دادن نیتریت در امولسیون‌های گوشتی با وجود اینکه از بابت اثرات منفی یاد شده مطلوب است ولی سبب پیشرفت واکنش اکسیداسیون لیپیدها می شود، این واکنش یکی از مخرب ترین واکنش‌هایی است که عامل به وجود آمدن بو و طعم نامطبوع و در ادامه از بین رفتن رنگ پیگمان‌های مطلوب (هموگلوبین و میوگلوبین) در فرآورده های گوشتی می‌شود [٦]. با توجه به خطرات بالقوه موجود در به کارگیری نگهدارنده‌های سنتزی از جمله نیتریت و علاقه مصرف کننده ها به استفاده از محصولات سالم و طبیعی، موجب حرکت علم و صنعت غذا به سوی استفاده از آنتی اکسیدان‌های طبیعی و یا روش های جایگزین به منظور افزایش عمر مفید و یا بهبود ایمنی مواد غذایی شده است. استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی برای افزایش زمان نگهداری محصولات گوشتی نوید بخش تکنولوژی جدیدی است که در آن می توان از گیاهان به صورت عصاره، پودر، اسانس و نانواسانس به دلیل خواص ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی آن ها، استفاده کرد [۷] و [۸].

زنیان با نام علمی Carum copticum یک گیاه یکساله از خانواده چتریان است که در ایران، هند، پاکستان و مصر رشد می کند. دانه‌های رسیده این گیاه ۲ تا ٤ درصد اسانس دارند. دانه های زنیان غنی از فیبر، مواد معدنی، ویتامین‌ها و آنتی اکسیدان‌ها می باشد. اسانس این گیاه غنی از مونوترپن ها مثل تیمول است و به صورت گسترده به عنوان عامل ضدباکتری تجویز می شود. این اسانس در ترکیب داروها نیز به کار می رود [۹]و [۱۰]. تاکنون، مطالعات متعددی به منظور ارزیابی ویژگی های ضدمیکروبی این اسانس در محیط‌های کشت آزمایشگاهی انجام شده است [۹]و [۱۱]. اما کارایی آن در سیستم های غذایی مورد بررسی قرار نگرفته است و اطلاعات محدودی در این زمینه در دسترس می باشد. کیتوزان، پلی ساکاریدی است که از استیل زدایی کیتین تهیه می‌شود. به دلیل ویژگی‌هایی چون خواص ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی و نیز جلوگیری از تغییر طعم و مزه و افزایش ماندگاری، از کیتوزان به عنوان یک افزودنی در فراورده های گوشتی و لبنی استفاده می شود. گزارش‌ها نشان داده است که افزودن ۱ درصد کیتوزان به گوشت می تواند تا ۷۰ درصد اکسیداسیون چربیها را در دمای ٤ درجه سانتیگراد کاهش دهد. همچنین کیتوزان می تواند مانع از یخ زدگی بیش از حد فراوردهای گوشتی شود [۱۲]. کیتوزان همچنین فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی در برابر طیف وسیعی از میکروارگانیسم های غذایی نشان داده است و در نتیجه به عنوان یک نگهدارنده طبیعی بالقوه برای انواع مواد غذایی مورد توجه قرار گرفته است [۱۳]و [۱٤]. کاپیلاس و همکارانش (۲۰۱۵) یک هات داگ آسیایی بدون نیتریت با استفاده مواد مختلف مثل آناتو، کوچینیل، فیبرهای رژیمی نارنجی، ویتامین E، ویتامین C، لاکتات و کرفس تولید کردند. در این تحقیق این مواد جایگزین

نیتریت شد و ظاهر (رنگ)، ثبات اکسیداسیون چربی و جمعیت میکروبی بررسی شد. نتایج نشان داد نمونه های شاهد (نمونه های دارای نیتریت) نسبت به نمونه های بدون نیتریت مقدار بسیار زیادی نیترات باقیمانده دارند .نمونه شاهد بالاترین مقدار *L و *a را داشته و فرآورده حاوی آناتو کمترین مقدار *a را داشته است. همچنین سطح اکسیداسیون چربی بدون در نظر گرفتن فرمول در همه نمونه ها یکسان بوده است .لازم به ذکر است به دلیل رنگ بهتر کوچینیل، هات داگ با فرمول کوچینیل پذیرش کلی بیشتری نسبت به نمونه آناتو داشته است [۱۵].

دلاتوکسی و واجکیاک و در سال ۲۰۱۶، اثر جایگزینی نگهدارنده های طبیعی Sinapis alba، Rosmarinus officinalis و Janiperus communis در ترکیب با اسید آب پنیر را در یک دوره ۲۱ روزه انبارداری بر روی فرآورده گوشتی سوسیس بررسی کردند. نتایج نشان داد که خصوصیات حسی ، میکروبیولوژی و پایداری اکسیداتیونمونه‌ها بهبود یافت [۱۶]. بستان و ماهان (۲۰۱۱) در تحقیقات خود اثر محلول کیتوزان در غلظت های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد را بر ویژگی های میکروبی و ماندگاری سوسیس به نتاج مطبوب دست یافتند [۱۷].

در این تحقیق اثر جایگزینی نیتریت سدیم بعنوان یک نگهدارنده سنتزی در کالباس گوشت قرمز با بسته بندی وکیوم، توسط نگهدارنده های طبیعی شامل نانومولسیون زنیان و کیتوزان بطور جداگانه و در ترکیب با یکدیگر در طول ۳۰ روز نگهداری در دمای یخچال با اندازه گیری ویژگی‌های محصول نهایی شامل خصوصیات میکروبی و شیمیایی مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱-مواد

گوشت مورد استفاده جهت تولید نمونه های کالباس از نوع سردست برزیلی منجمد بود. کیتوزان با وزن مولکولی متوسط (۱۹۰-۳۱۰ KD) و درجه استیل زدایی ۸۵-۷۵٪ از شرکت سیگما آلدریچ (آمریکا) خریداری گردید. دانه زنیان جهت استخراج اسانس از گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی تهیه گردید. سایر مواد تشکیل دهنده شامل نشاسته (شرکت زرند، ایران)، ادویه جات (شرکت Plant lipids، هندوستان)، مایع تخم مرغ پاستوریزه (شرکت نارین، ایران)، روغن مایع سویا (شرکت روغن مایع ماهک، ایران)، فسفات و لاکتات سدیم و نیتریت سدیم (شرکت Behansar)، اسید آسکوربیک (شرکت WIBERG، آلمان) بود. همچنین نمک، سیر تازه، شکر و آرد گندم نیز از مراکز خرید معتبر خریداری گردید.

اسید استیک، محلول کلرید آمونیوم و اسید سولفوریک، DPPH، متانول، Tween 80 و محیط کشت های PCA[1] (برای شمارش کلی باکتری ها)، VRBA[2] (برای کشت کلیفرم ها)، EMBA[3] (برای کشت اشریشیاکلی)، M17Baird-[4] (برای کشت استافیلوکوکوس اورئوس)، MRS[5] (برای کشت باکتری های اسیدلاکتیک)، CMB[6] (برای کشت کلستریدیوم پرفرژنس) و SDA[7] (برای کشت کپک و مخمر) و سایر مواد شیمیایی مورد نیاز برای انجام آزمون ها از شرکتهای معتبر مرک آلمان و سیگما آلدریچ آمریکا تهیه شدند.

۲-۲-روش ها

۲-۲-۱- تولید اسانس روغنی

برای تولید اسانس روغنی خالص گیاه داروئی زنیان از دستگاه اسانس گیر (کلونجر) استفاده شد. بدین منظور ابتدا بذر گیاه زنیان توسط خرد کن ریز شد تا امکان استخراج اسانس تسهیل یابد. سپس ۳۰ گرم از پودر گیاه مورد نظر را در یک بالن یک لیتری همراه با ۷۰۰ میلی لیتر آب مقطر ریخته و سپس کندانسور را روی آن نصب کرده و روی شوف بالن حرارت داده شد. پس از مدت زمان ۲ ساعت جوشیدن تقریبا تمام ترکیبات فرار روغنی از گیاه جدا شده و در طرف دیگر توسط مبرد کندانس شده و جدا گردید.

۲-۲-۲- تولید نانومولسیون اسانس زنیان

1. Plate Count Agar
2. Violet Red Bile Agar
3. Eosin Methylene Blue Agar
4. Parker medium
5. de Man, Rogosa and Sharpe
6. Cooked Meat Broth
7. Sabouraud Dextrose Agar

به منظور تهیه نانوامولسیون اسانس زنیان از روش گهروی و همکاران (۲۰۱۷)، استفاده شد. برای این منظور ابتدا محلول آبی توئین ۸۰، (٤/٥ درصد وزنی/وزنی) در آب یون زدایی شده به مدت ۳۰ دقیقه تهیه شد. سپس اسانس زنیان (٦ درصد وزنی/وزنی) به آن افزوده شد و به مدت ۳۰ دقیقه دیگر عملیات همزدن ادامه یافت. امولسیون بدست آمده با استفاده از پروب فراصوت (۱۵۰ وات و ۲۰ کیلوهرتز به مدت ۵ دقیقه) صوت دهی شدند. عملیات صوت دهی در دمای ۱۵ درجه سلسیوس انجام شد و نانوامولسیون های بدست آمده برای توزیع اندازه ذرات توسط دستگاه DLS مورد آنالیز قرار گرفتند.

۲-۲-۳- فرمولاسیون تهیه کالباس گوشت قرمز

گوشت گاو منجمد برزیلی دارای مشخصات ثبت شده از بازار تهیه شد. کالباس گوشت قرمز مورد نظر در این تحقیق بر اساس ٦۰ درصد گوشت گاو تهیه شد. تولید خمیر اولیه (امولسیون) کالباس گوشت درون دستگاه کاتر انجام گرفت. فرمولاسیون کالباس گوشت بر اساس جدول ۱ بود. برای تولید خمیر امولسیونی محصول، ابتدا گوشت سردست منجمد، جداگانه وارد دستگاه چرخ گوشت و با مش ۳ میلیمتر چرخ شده و سپس به داخل کاتر منتقل گردید. سایر مواد از قبیل سیر، نمک، پلی فسفات و نیتریت سدیم اضافه شده و بعد از ۱۲۰ ثانیه دور زدن مخلوط آب و یخ اضافه شد و فرایند کاتر زدن تا یک دقیقه دیگر ادامه پیدا کرد. سپس لاکتات سدیم و تخم مرغ مایع پاستوریزه به مخلوط اضافه و بعد از چند دور همزدن روغنی به آرامی به مخلوط افزوده شد و حدود ۱۲۰ ثانیه کارتر زدن ادامه پیدا کرد تا امولسیون یکنواختی تشکیل گردد. در ادامه سایر مواد شامل ادویه جات، شکر، آرد گندم، نشاسته و در نهایت اسید آسکوربیک به ترتیب به دستگاه کاتر اضافه شد. برای دستیابی به یک خمیر یکنواخت عمل کاتریزاسیون به مدت ٦ دقیقه با دور ۱۵۰۰ شروع و تا ۳۰۰۰ دور بر دقیقه به طول انجامید. دمای محتوای کاتر در ابتدای عملیات حدود صفر درجه سانتیگراد می باشد که این دما در طی عملیات کاتریزاسیون افزایش یافته (به دلیل اصطکاک بین مواد اولیه و تیغه ها) و تا حدود ۱۰ درجه سانتیگراد می رسد و امولسیفیکاسیون کامل می گردد. در مرحله بعدی خمیر کالباس ٦۰ درصد گوشت قرمز توسط دستگاه پرکن وارد پوشش‌های پلی آمیدی گردید و در اتاق پخت تا رسیدن به دمای ٧٤-٧٢ درجه سانتیگراد در مرکز محصول قرار گرفت. سپس نمونه ها سریعا به زیر دوش آب سرد و سپس سردخانه بالای صفر (۵-۳ درجه سانتیگراد) انتقال داده شد. در ادامه فرایند، نمونه های کالباس خشک اسلایس شده و تحت خلاء درون پوشش های پلی اتیلنی بسته بندی شد و در نهایت کلیه نمونه‌ها در دمای ٤ درجه سانتیگراد تا زمان انجام آزمون‌ها نگهداری شدند.

Table 1 Formulation of beef bologna with different levels of CCEO and chitosan.

Ingredients (%)	Treatments											
	T_1	T_2	T_3	T_4	T_5	T_6	T_7	T_8	T_9	T_{10}	T_{11}	T_{12}
CCEO	0	0	0	1	1	1	2	2	2	3	3	3
Chitosan	0	0.5	1	0	0.5	1	0	0.5	1	0	0.5	1
Sodium nitrite	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Beef	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
Oil	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Starch	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Albumin egg	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Wheat flour	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Salt	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
Sodium lactate	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fresh garlic	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Spice	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sugar	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
STPP	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
Ascorbic acid	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Water	16	15.5	15	15	14.5	14	14	13.5	13	13	12.5	12

۲-۳- روش های آزمون

۲-۳-۱- آزمون های شیمیایی

آزمون های شیمیایی شامل میزان چربی، پروتئین، خاکستر، رطوبت و نیتریت باقی مانده بود که بعنوان ویژگی های اولیه محصول در مورد نمونه کنترل بلافاصله بعد از تولید تعیین اندازه گیری و با استاندارد محصول مقایسه گردید. همچنین آزمون pH در طول زمان نگهداری برای همه نمونه ها اندازه-گیری شد.

۲-۳-۱-۱- اندازه گیری چربی

چربی نمونه ها به روش سوکسله و استخراج با پترولیوم اتر، مطابق با استاندارد ۹۹۱/۳۰ (AOAC ، ۲۰۰۰) انجام شد [۱۸].

۲-۳-۱-۲- اندازه گیری پروتئین

مقدار پروتئین نمونه ها به روش کجلدال، مطابق با استاندارد ۹۳۸/۱۸ (AOAC ، ۲۰۰۰) خواهد شد [۱۹].

۲-۳-۱-۳- اندازه گیری رطوبت

مقدار رطوبت نمونه‌ها، با استفاده از آون در دمای ۱۰۳ درجه سانتی‌گراد و مطابق با روش ۹۵۰/٤٦ (AOAC ، ۲۰۰۰) انجام شد [۱۸].

۲-۳-۱-۳- اندازه گیری خاکستر

مقدار خاکستر نمونه‌های سوسیس با استفاده از کوره دردمای ۵۳۰ درجه سانتی‌گراد مطابق با روش ۹۲۰/۱۵۳ (AOAC ، ۲۰۰۰) انجام شد.

۲-۳-۱-٤- اندازه گیری pH

برای اندازه گیری pH یک گرم از نمونه سوسیس به همراه ۱۳ میلی‌لیتر آب مقطر با استفاده از دستگاه هموژنایزر یکنواخت شده و سپس pH نمونه‌ها با استفاده از pH متر اندازه‌گیری شد [۱۹].

۲-۳-۱-۵- اندازه گیری نیتریت

مقدار نیتریت باقیمانده در محصول با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و طبق استاندارد ۹۲۰/۱٦۷ (AOAC ، ۲۰۰۰) انجام شد [۱۹].

۲-۳-۱-٦- شناسایی ترکیبات اسانس روغنی

نمونه‌های اسانس با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل شده به طیف سنج جرمی (GC–MS) مدل Varian 3400 مجهز به ستون موئینی HP-5MS (به طول ۳۰ متر، قطر ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت لایه داخلی ۲۵ میکرومتر) تجزیه و شناسایی گردید. گاز حامل هلیم با جریان ۱/۵ میلی لیتر در دقیقه و نسبت شکافت نمونه ۱ به ۱۰ بود. برنامهٔ دمایی ستون از ٦۰ تا ۲۵۰ درجه سانتیگراد با سرعت ۳ درجه در دقیقه تنظیم گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ثابت ۲۵۰ درجه سانتیگراد بعنوان پست ران قرار گرفت. دمای تزریق و شناسایی تا ۲٦۰ درجه سانتیگراد تنظیم گردید. ولتاژ یونیزاسیون طیف جرمی برابر۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون نیز برابر ۲۵۰ درجه سانتیگراد بود. شناسایی اجزای اسانس در نتیجهٔ مقایسهٔ طیف جرمی آن‌ها با بانک طیفی و مقایسهٔ ضرایب بازداری آن‌ها با مقادیر مرجع صورت گرفت [۲۱].

۲-۳-۲- آزمون های فیزیکو شیمیایی

۲-۳-۲-۱- آزمون ظرفیت نگهداری آب

ظرفیت نگهداری آب به روش هیمونیدز و همکاران (1999)، انجام شد. بدین صورت که ابتدا ۵ گرم نمونه خرد شده با ترازوی ۰/۰۰۱ توزین و در داخل کاغذ صافی پیچیده شد. برای افزایش دقت کار و به تعادل رسیدن نمونه‌ها به شکل مناسب در داخل دستگاه، این عمل برای هر نمونه ۳ بار تکرار شد. سپس کاغذ صافی حاوی نمونه در داخل دستگاه سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳٦۰۰ در هر دقیقه قرار داده شد.

سپس کاغذ صافی به آرامی‌باز شده و نمونه آبگیری شده، توزین و در داخل فرمول جایگذاری شد.

$$WHC(\%) = \frac{m_2}{m_1} \times 100$$ رابطه ۱

در این رابطه m2 وزن نمونه بعد از آب گیری و m1 وزن اولیه نمونه می باشد.

۲-۳-۲-۲- آزمون‌های میکروبی

آزمون های میکروبی شامل میزان جمعیت میکروبی، کلی فرم، اشرشیاکلای، کلستریدیوم پرفرژنس، استافیلوکوکوس اورئوس، باکتری های اسیدلاکتیک (LAB) و کپک و مخمر بود که برای تمامی نمونه ها در سه بار طی مدت زمان نگهداری (در روزهای ۱، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز پس از تولید) انجام گردید. برای این منظور از نمونه‌های کالباس به منظور انجام آزمون های میکروبی در فواصل هر ۱۰ روز یکبار نمونه برداری صورت گرفت. برای تهیه سوسپانسیون اولیه کالباس (رقت 10^{-1}) ۱۰ گرم از نمونه‌های کالباس با ۹۰ میلی لیتر محلول رینگر داخل دستگاه استومکر[8] (Interscience Ltd., France) به مدت ۲ دقیقه هموژن گردید، سپس از سوسپانسیون حاصله رقت های اعشاری تهیه گردید . شمارش کلی باکتری ها (در محیط کشت PCA و دمای انکوباسیون ۳۷ C°)، کلی فرم ها (محیط کشت VRBA و دمای ۳۷C°)، اشریشیاکلی (در محیط کشت EMBA و دمای ۳۷C°)، کلستریدیوم پرفرژنس (محیط کشت CMB در شرایط بی هوازی و دمای ۳۷$^\circ C$)، استافیلوکوکوس اورئوس (محیط کشت M17 و دمای ۳۷C°)، باکتری های اسیدلاکتیک (محیط کشت MRS و دمای ۳۰C°) و کپک و مخمر (در محیط کشت SDA و دمای انکوباسیون ۲۵C° و شمارش پس از ۵-۴ روز) طبق استاندارد شماره ۲۳۰۳ موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران صورت گرفت. شمارش باکتری ها بر حسب واحد تشکیل کلنی در هر گرم (CFU) در یک محدوده قابل قبول ۳۰۰-۳۰ واحد کلنی در هر پلیت توسط دستگاه میکروکانتر انجام گردید.

۲-۴- تجزیه و تحلیل آماری

آزمایشات در قالب یک طرح کاملا تصادفی بر پایه فاکتوریل و در سه تکرار انجام گرفت و جهت تعیین اختلاف معنی دار بین میانگین داده ها و رتبه بندی آنها، از آزمون دانکن در سطح احتمال آلفا برابر ۰/۰۵ ($p<0.05$) و با به کارگیری نرم افزار آماری Minitab صورت گرفت. تیمارهای طراحی شده در این تحقیق در جدول ۱ نشان داده شده است.

٤- نتایج و بحث

٤-۱- شناسایی و اندازه گیری ترکیبات تشکیل دهنده اسانس زنیان

راندمان استخراج اسانس بذر گیاه زنیان در شرایط این پژوهش برابر ۲/۷ درصد بود. ۹ ترکیب شیمیایی که مجموعا ۹۹/۵۸ درصد ترکیبات اسانس را تشکیل می‌دهد توسط دستگاه GC/MS شناسایی گردید که نام ترکیبات شیمیایی و مقدار آن‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است. طبق نتایج بدست آمده مشخص شد که بیشترین ترکیبات آلی شناسایی شده در اسانس زنیان به ترتیب شامل کارواکرول[9] (٤٥/٨٥ درصد)، ام-سیمن[10] (۲۵/۹۲ درصد)، گاما-ترپینن[11] (۲٤/٦٨ درصد) و آلفا-پینن (۱/۹۸ درصد) بود.

اسانس استخراج شده از گیاهان با روش های مختلف از نظر مقدار، کیفیت و نوع ترکیبات شیمیایی تشکیل دهنده اسانس بسته به شرایط آب و هوایی، ترکیبات خاک، ارگان یا عضو گیاه، سن و مرحله رشد گیاه متفاوت می‌باشد [۲۲]. برای مثال تحقیقات انجام شده توسط رسولی و همکاران (۲۰۰۸)، نشان داد که بیشترین ترکیب شناسایی شده در اسانس زنیان پی-سیمن بود در حالیکه در مطالعات دیگر گاما-ترپینن بیشترین ترکیب شناسایی شده در اسانس این گیاه بود [۱۱]و [۲۳]، این در حالی بود که در تحقیق حاضر کارواکرول بعنوان ترکیب شیمیایی غالب در اسانس زنیان مورد شناسایی قرار گرفت.

8. stomacher

9. carvacrol
10. m-cymene
11. γ-terpinene

Table 2 Chemical composition of essential oil(C. copticum)

content(%)	Retention Time(minute)	Chemical composition	
0.4	9.61	α-Phyllanderene	1
1.98	11.4	α-Pinene	2
0.57	12.06	α-Myrcene	3
0.29	12.96	Cis-4-carene	4
25.92	13.39	m-Cymene	5
0.52	13.46	(E)-3-Caren-2-ol	6
24.68	14.67	γ-Terpinene	7
0.22	18.69	Artemiseole	8
45.85	23.69	Carvacrol	9
99.58%	-		

٤-٢- آنالیز شیمیایی نمونه کالباس ٦٠ درصد گوشت قرمز

نتایج حاصل از آنالیز شیمیایی کالباس پخته شده یک روز پس از تولید در جدول ۳ و ٤ آورده شده است. همانطور که مشاهده می گردد میزان رطوبت، پروتئین، چربی، کربوهیدرات و خاکستر به ترتیب برابر ۵۷/٦٦±۰/٦۷ درصد، ۱۳/۷٦±۰/۲۱ درصد، ۲۰/۲۸±۰/٦۸ درصد، ۵/۸۳±۰/۱۱ درصد و ۲/۱۱±۰/۰۸ درصد اندازه گیری شد. مقدار pH و نیتریت باقی مانده پس از ٤ روز نگهداری نیز به ترتیب ٦/۰٦±۰/۰۵ و ۳۲/٦۷±۲/۵۲ پی پی ام تعیین شد که مطابق با استاندارد ملی سوسیس و کالباس با شماره ۲۳۰۳ می باشد (جدول ۳).

Table 3 Chemical analysis of bologna with 60% beef.

Chemical properties	Content	Iranian Standard (No. 2303)
Moisture (%)	57.66±0.67	≤ 4P+10
Protein (%)	13.76±0.21	≥ 12
Fat (%)	20.28±0.68	≤ 22
Carbohydrate (%)	5.83±0.11	≤ 6
Ash (%)	2.11±0.08	≤ 2.5
pH	6.06±0.05	5.6-6.2
Salt (%)	1.62±0.06	≤ 2
STPP	0.47±0.01	≤ 0.5
Residual sodium nitrite on day 4 (ppm)	32.67±2.52	≤ 80

٤-٣- اثر غلظت‌های مختلف نانوامولسیون و کیتوزان بر ویژگی‌های کالباس

٤-٣-١- ویژگی میکروبی

چندین فاکتور میکروبی شامل شمارش کلی باکتری‌ها، جمعیت کلی‌فرم‌ها، *باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB)* و کپک و مخمرها برای بررسی اثر ضد میکروبی نگهدارنده‌های طبیعی نانوامولسیون زنیان و کیتوزان و روند تغییرات بار میکروبی در طی ۳۰ روز ذخیره سازی کالباس پخته شده در ٤ درجه سانتیگراد استفاده شد که نتیجه آن بر حسب *Log CFU.g-1* در جدول ٤ آورده شده است. طبق نتایج بدست آمده مشخص شد که پس از ۲٤ ساعت نگهداری در یخچال اختلاف معنی داری بین تیمارهای کیتوزان از نظر شمارش کلی باکتری‌ها وجود نداشت ($p>0.05$)، در حالیکه افزودن نانوامولسیون زنیان حتی در روز اول نگهداری نیز منجر به کاهش معنی‌داری در شمارش باکتری‌ها نسبت به نمونه شاهد (T_1) گردید ($p<0.05$). در طول مدت زمان نگهداری شمارش باکتری‌ها در همه نمونه‌ها افزایش پیدا کرد بطوریکه تا روز ۲۰ ام نگهداری همه نمونه ها بجز تیمار (T_4) از نظر شمارش کلی باکتری‌ها در محدوده استاندارد (10^5 cfu.g^{-1}) بودند ولی در پایان دوره نگهداری فقط تیمارهای حاوی مقادیر بالای کیتوزان و نانوامولسیون در محدوده استاندارد باقی ماندند. بنابراین همان‌طور که از نتایج پیداست در روز ۳۰ ام نگهداری بیشترین و کمترین بار میکروبی به ترتیب در تیمار T_4 (6.12±0.2

(Log CFU.g-1) و T12 (4.21±0.22 Log CFU.g-1) شمارش گردید که در مقایسه با نمونه حاوی ppm ۱۰۰ نیتریت (5.64±0.*12 Log CFU.g*-1) اختلاف قابل توجهی دارند (جدول ۵). نتایج این تحقیق با یافته‌های ژئورگانتلیس و همکاران (۲۰۰۷)، مطابقت دارد که گزارش کردند کیتوزان در غلظت ۱ درصد منجر به افزایش زمان ماندگاری سوسیس تازه خوک نگهداری شده در شرایط سرما از ۷ روز به ۱۵ روز می‌گردد. در مطالعه‌ای دیگر رولر و همکاران (۲۰۰۲)، اثر ترکیبی کیتوزان، کارنوزین[12] و سولفیدها را در افزایش ماندگاری سوسیس خوک بررسی کردند. آن ها نشان دادند که استفاده از ۰/٦ درصد کیتوزان با ppm ۱۷۰ سولفید رشد پاتوژن های غذایی را بطور قابل توجهی تا ٤ سیکل لگاریتمی کاهش می دهد. طبق نتایج یاشیهیکو و همکاران (۲۰۰۳)، مشخص شد که برخلاف نایسین که فقط بر باکتری‌های گرم مثبت موثر است، کیتوزان دارای فعالیت ضد میکروبی بر طیف وسیعی از میکروارگانیسم هاست و همین موضوع منجر به کاربردهای فراوان این نگهدارنده طبیعی شده است [٢٤].

مکانیسم‌های مختلفی برای اثر ضد میکروبی کیتوزان در منابع آورده شده است از جمله؛ تعامل بین مولکول های کیتوزان با بار مثبت و غشای سلول های میکروبی با بار منفی منجر به نشت پروتئین و سایر ترکیبات داخل سلول می‌شود [۲۵]. کیتوزان همچنین به عنوان ماده اتصال دهنده آب عمل می‌کند و آنزیم‌های مختلفی را مهار می‌کند. این ماده همچنین به عنوان یک عامل چلاته کننده عمل می‌کند و به طور انتخابی به عناصر فلزی متصل شده و از این طریق مانع تولید سموم و رشد میکروب‌ها می شود. کیتوزان همچنین فعالیت جذب زیستی[13] دارد و می تواند مواد مغذی باکتری‌ها را جذب کرده و از رشد آنها جلوگیری کند. اتصال کیتوزان با DNA و مهار سنتز mRNA از طریق نفوذ کیتوزان به هسته میکروارگانیسم‌ها و تداخل در سنتز mRNA و پروتئین ها انجام می شود [۳۱].

نتایج این پژوهش نشان داد در روز اول نگهداری کلی‌فرم‌ها در هیچ‌کدام از تیمارها و نمونه شاهد رشد نکرد. طبق استاندارد ۲۳۰۳ حداکثر تعداد مجاز کلی‌فرم‌ها در محصولات سوسیس و کالباس در هنگام مصرف cfu/g ۱۰ می باشد و همانطور که مشاهده می گردد تا روز ۲۰ ام نگهداری همه نمونه ها بجز تیمار T4 (1.23±0.05 Log CFU.g-1) از نظر شمارش کلیفرم‌ها در محدوده استاندارد بودند. نتایج آنالیز میکروبی در پایان دوره نگهداری نشان داد که در تیمارهای حاوی ۱٪ کیتوزان رشد کلی فر ها مشاهده نشد و در تیمارهای T8، T5 و T10 اگرچه کلیفرم‌ها رشد پیدا کردند ولی خارج از محدوده استاندارد نبودند و مشکلی از نظر سلامتی مصرف کننده نداشتند، در حالیکه نمونه حاوی نیتریت از محدوده استاندارد خارج شده و شمارش کلیفرم‌ها برابر 1.08±0.15 Log CFU.g-1 بود (جدول ۵). بنابراین می توان نتیجه گیری کرد که نگهدارنده های طبیعی کیتوزان و نانوامولسیون زنیان در غلظت های مورد استفاده بویژه در حالت ترکیبی در جلوگیری از رشد کلیفرم‌ها موثرتر از نیتریت سدیم در غلظت ppm ۱۰۰ عمل نمودند.

در تحقیقاتی مشابه Garcia و همکاران (۲۰۱۱) با جایگزینی بخشی از نیتریت با کیتوزان در سوسیس خوک گزارش دادند که کلیفرم ها در همه نمونه های تحت تیمار و کنترل قابل جداسازی بودند، بطوریکه از تعداد $cfu.g^{-1}$ ۱۰ در روز اول تا $cfu.g^{-1}$ ۱۰^{۳} در روز ۳۵ ام نگهداری افزایش پیدا کرد که با نتایج این تحقیق سازگاری دارد. این در حالی است که جوادی و همکارانش (۲۰۱۱) در مطالعه میکروبی نمونه های سوسیس در طول ۳۵ روز نگهداری در دمای یخچال هیچگونه رشد کلیفرمی مشاهده نکردند که دلیل این تفاوت می تواند شرایط نامناسب بهداشتی تولید سوسیس و شمارش کلی میکروبی بالای نمونه های سوسیس باشد. بطور کلی شرایط بهداشتی مناسب نگهداری و بسته بندی مانع رشد کلیفرم ها در محصولات غذایی می گردد و وجود این باکتری ها در سوسی و کالباس به دلیل آلودگی پس از پخت و دستکاری غیربهداشتی می‌باشد [٢٦].

نتایج شمارش باکتری های اسیدلاکتیک (LAB) نشان داد که در روز تولید، نمونه های حاوی ترکیبات ضد میکروبی کیتوزان و نانوامولسیون زنیان از نظر شمارش باکتری های LAB تفاوت معنی داری نداشتند (p>۰/۰۵)، اما در غلظت های بالاتر این ترکیبات ضد میکروبی (T9، T11 و T12) شمارش این باکتری ها تقریبا یک سیکل لگاریتمی کمتر از نمونه شاهد بود (p<۰/۰۵). در طول ذخیره سازی نمونه های کالباس در ٤ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ روز، تعداد باکتری های LAB افزایش یافت اما این مقادیر همیشه در نمونه های

12. carnosine
13. bioabsorbant

تیمار شده از شاهد کمتر بود. با این حال، در شمارش باکتری های LAB بین نمونه حاوی ۱۰۰ppm نیتریت و نمونه های حاوی ۰/۵ درصد کیتوزان و ۱ درصد و ۲ درصد نانوامولسیون زنیان به طور جداگانه یا بصورت ترکیبی در طی ۲۰ روز اول ذخیره سازی تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($p>0/05$). در پایان دوره نگهداری شمارش باکتری های LAB در نمونه کنترل از 1.66±0.1 تا 5.33±0.4 log cfu/g افزایش یافت، در حالیکه در تیمارهای T9 و T12 که کمترین رشد این باکتری ها مشاهده شد، تعداد این باکتری ها به ترتیب از 0.84±0.2 به 3.98±0.42 و از 0.77±0.13 به log cfu/g 3.67±0.4 تغییر پیدا کرد (جدول ۵).

باکتری های LAB در محصولات گوشتی بسته بندی شده تحت خلاء، فلور میکروبی غالب را تشکیل می دهد زیرا در برابر نمک و نیترات مقاوم هستند و اگر ادویه های افزوده شده به این محصولات حاوی منگنز باشد، به رشد باکتری های اسید لاکتیک کمک می کند. در محصولات گوشتی که در بسته های غیرقابل نفوذ به هوا بسته بندی می شوند، باکتریهای *LAB* از طریق تولید گاز CO_2 از رشد میکروارگانیسم های هوازی، به خصوص سودوموناس ها جلوگیری می‌کند و با تولید اسید و کاهش pH، مانع از تکثیر و رشد جمعیت بسیاری از میکروارگانیسم های رقیب می شود.

در یک مطالعه مشابه، چنول و همکاران (۲۰۰۹)، باکتری های *LAB* را به عنوان اصلی‌ترین عامل فساد محصولات گوشتی بسته بندی شده با خلاء معرفی کردند. آنها گزارش دادند که لاکتوباسیلوس (۳۷ درصد)، لکونوستوک (٤۳ درصد)، کارنوباکتریوم (۱۱ درصد)، انتروکوکوس (٤ درصد) و لاکتوکوکوس (۲ درصد) مهمترین میکروارگانیسم های عامل فساد در محصولات گوشتی بسته بندی شده می باشند [۲۷]. لندتا و همکاران (۲۰۱۳)، نیز فلور غالب میکروبی در یک نوع سوسیس را مورد مطالعه قرار دادند [۲۸]. نتایج نشان داد که باکتری های LAB فلور اصلی میکروبی این محصول بوده که مهمترین آن‌ها *لاکتوباسیلوس پلانتاروم و پاراکزی* می‌باشند.

نتایج بسیاری از مطالعات، افزایش شمارش کلی باکتری‌ها و *LAB* در طول زمان نگهداری و متوقف کردن یا کند شدن رشد این باکتری‌ها را با افزودن کیتوزان [۱۲]و [۲۹] و نانوامولسیون اسانس‌های گیاهی [۲۱]و [۳۰] در طول ذخیره محصولات گوشتی پخته شده تایید می کند.

نتایج شمارش کپک و مخمر نشان داد که تفاوت معنی داری بین نمونه های حاوی سطوح پایین کیتوزان و نانوامولسیون زنیان در مقایسه با نمونه کنترل در طول ۲۰ روز اول نگهداری وجود نداشت، در حالیکه کیتوزان در غلظت ۱٪ تعداد کپک و مخمر را حدود ۱-۰/٤ سیکل لگاریتمی در طی ۲٤ ساعت اول نگهداری نسبت به شاهد کاهش داد و پس از آن کپک و مخمرها در کالباس های حاوی ۰/۵ و ۱ درصد کیتوزان با روندی مشابه ادامه پیدا کرد، بطور کلی در پایان دوره نگهداری نمونه های تیمار شده با کیتوزان و یا ترکیب کیتوزان و نانوامولسیون از نظر شمارش کپک و مخمر در مقایسه با نمونه حاوی نیتریت و یا نمونه های حاوی نانوامولسیون تنها شرایط بهتری داشتند (جدول ۵). با این حال، تجزیه و تحلیل آماری داده ها نشان داد که افزودن مقادیر فزاینده کیتوزان و نانوامولسیون زنیان تأثیر مثبت تری در جلوگیری از رشد قارچ ها دارد، زیرا از نظر شمارش کپک و مخمر بین نمونه شاهد و کالباس حاوی ۱ درصد کیتوزان تنها و در ترکیب با نانوامولسیون زنیان (۲ و ۳ درصد) تفاوت معنی داری در طول ذخیره سازی مشاهده گردید ($p<0/05$). در پایان دوره نگهداری، هیچ گونه رشد کپک و مخمری در تیمار T12 مشاهده نشد، اما نمونه های شاهد و همچنین تیمارهای T2، T4، T5، T7، T8 و T10 خارج از محدوده استاندارد بودند (۱۰۰ cfu/g).

جمعیت کپک و مخمرها به آلودگی گوشت و سایر مواد تشکیل دهنده به ویژه ادویه جات و مواد پرکننده بستگی دارد و سپس به فرآیند پخت و شرایط بهداشتی تولید محصول مربوط می شود [۲۵]. نتایج تجزیه و تحلیل میکروبیولوژیکی کالباس نتایج قبلی را تایید می کند که اثر بخشی کیتوزان [۱۲]، [۲۵] و [۳۱] و اسانس زنیان [۲۲]، [۳۲] و [۳۳]را به‌عنوان یک نگهدارنده طبیعی بر سوش های مختلف باکتری ها و قارچ ها تأیید کرده‌اند. به طور کلی، مخمرهای عامل فساد نسبت به باکتریهای گرم مثبت در مقابل فعالیت کشندگی اسانس زنیان و کیتوزان حساس تر می باشند و باکتری های گرم مثبت نیز به نوبه خود نسبت به باکتری های گرم منفی حساس تر هستند.

به طور کلی ترکیبات فعال ضد میکروبی اسانس ها ترپن هایی مانند اوژنول، تیمول و کارواکرول هستند. بررسی منابع علمی نشان داده است که تأثیر اسانس ها و عصاره گیاهان دارویی و

ترکیبات آنها بر باکتریهای گرم مثبت بسیار بیشتر از تأثیر آنها بر باکتریهای گرم منفی است. این تفاوت می تواند به این واقعیت مربوط باشد که باکتری‌های گرم منفی به دلیل دیواره لیپوپلی ساکارید خارجی که در اطراف دیواره سلولی پپتیدوگلیکان وجود دارد، مقاوم تر هستند . مطالعات مختلف نشان داده اند که حداقل غلظت مهار کننده (MIC) و حداقل غلظت کشندگی باکتری ها (MBC) نانوساختارهایی مانند نانولیپوزوم ها و نانو امولسیون ها در تمام باکتری‌ها نسبت به اسانس آزاد کم است.

نانومواد از دو روش مستقیم و غیرمستقیم می توانند منجر به غیرفعال شدن باکتریها و مرگ شوند. در حالت مستقیم، نانومواد یونهایی را آزاد می کنند که با گروه تیول (-SH) پروتئین های موجود در سطح سلول باکتریایی واکنش نشان می دهند. این پروتئین ها از غشای سلول باکتریایی خارج شده و مواد مغذی را از دیواره سلولی منتقل می کنند. نانومواد این پروتئین ها را غیرفعال می کنند، نفوذپذیری غشاها را کاهش می دهند و در نهایت منجر به مرگ سلولی می شوند. در حقیقت در این مکانیسم، تأثیر نانوذرات بر باکتری ها از طریق آسیب دیدن پروتئین، DNA و تخریب دیواره سلولی است. این نانوذرات با برهمکنش الکترواستاتیک بین بار مثبت نانوذرات و بار منفی غشای سلولی می توانند در تعامل باشند و در نتیجه باعث از بین رفتن غشا به دلیل حجم زیاد نانوذرات در مقایسه با غشای سلولی شود [۳٤]. از طرف دیگر، تجمع نانوذرات در سیتوپلاسم سلول و غشاهای بیرونی آن می تواند مکانیسم های دیگری باشد که در مهار رشد و بقای باکتریها نقش دارد. نانوذرات همچنین می توانند از طریق نیروهای الکترواستاتیک به DNA متصل شده و با از بین بردن پیوندهای هیدروژن یا تولید پیوندهای جدید غیر طبیعی به DNA سلول آسیب بزنند.

Table 4 Changes in microbial population (Log CFU.g^{-1}) of prepared beef bologna stored at 4 °C for 30 days

	Total count		Time (day)		**Coliforms**		Time (day)	
Treat	1	10	20	30	1	10	20	30
T_1	2.30±0.08^{abc}	3.14±0.18^{ab}	4.88±0.09^{ab}	5.64±0.12^{abc}	0.00±0.00	0.00±0.00^{d}	0.53±0.12^{c}	1.08±0.15^{c}
T_2	2.38±0.1^{ab}	3.09±0.1^{abc}	4.79±0.25^{ab}	5.91±0.08^{ab}	0.00±0.00	0.33±0.11b	0.67±0.1^{c}	1.43±0.1^{b}
T_3	2.05±0.2^{bcd}	2.83±0.07^{cde}	3.95±0.22^{de}	4.77±0.25^{e}	0.00±0.00	0.00±0.00^{d}	0.00±0.00^{d}	0.00±0.00^{e}
T_4	2.44±0.12^{a}	3.28±0.2^{a}	5.22±0.3^{a}	6.12±0.2^{a}	0.00±0.00	0.47±0.08^{a}	1.23±0.05^{a}	2.18±0.2^{a}
T_5	2.02±0.15^{bcd}	3.02±0.16^{abc}	4.66±0.18^{ab}	5.38±0.14^{bcd}	0.00±0.00	0.00±0.00^{d}	0.00±0.00^{d}	0.54±0.1^{d}
T_6	1.95±0.1^{cd}	2.72±0.15^{cde}	3.85±0.13^{e}	4.61±0.1^{ef}	0.00±0.00	0.00±0.00^{d}	0.00±0.00^{d}	0.00±0.00^{e}
T_7	2.15±0.05^{bcd}	3.15±0.10^{ab}	4.73±0.12^{ab}	5.61±0.11^{abc}	0.00±0.00	0.3±0.1^{b}	0.98±0.2^{b}	1.48±0.13^{b}
T_8	1.82±0.12^{de}	2.71±0.15^{cde}	4.48±0.24^{bcd}	4.93±0.23^{de}	0.00±0.00	0.00±0.00^{d}	0.00±0.00^{d}	0.78±0.09^{d}
T_9	1.48±0.15^{ef}	2.53±0.1^{ef}	3.81±0.14^{e}	4.56±0.17^{ef}	0.00±0.00	0.00±0.00^{d}	0.00±0.00^{d}	0.00±0.00^{e}
T_{10}	1.98±0.2^{cd}	2.91±0.11^{bcd}	4.58±0.3^{bc}	5.32±0.28^{cd}	0.00±0.00	0.00±0.00^{d}	0.00±0.00^{d}	0.64±0.1^{d}
T_{11}	1.55±0.13^{ef}	2.65±0.14^{def}	3.98±0.22^{cde}	4.67±0.19^{ef}	0.00±0.00	0.00±0.00^{d}	0.00±0.00^{d}	0.00±0.00^{e}
T_{12}	1.41±0.1^{f}	2.28±0.13^{f}	3.42±0.17^{e}	4.21±0.22^{f}	0.00±0.00	0.00±0.00^{d}	0.00±0.00^{d}	0.00±0.00^{e}
	LAB		Time (day)		**Molds and Yeasts**			Time (day)
Treat	1	10	20	30	1	10	20	30
T_1	1.66±0.1^{abc}	2.25±0.1^{ab}	3.87±0.15^{abc}	5.33±0.4^{a}	0.34±0.05^{de}	1.12±0.11^{bc}	1.91±0.3^{a}	2.62±0.21^{b}
T_2	1.74±0.08^{ab}	2.18±0.06^{ab}	3.91±0.05^{abc}	5.08±0.2^{ab}	0.41±0.1^{de}	0.89±0.08^{cd}	2.05±0.21^{a}	2.91±0.3^{ab}
T_3	1.41±0.12^{bcd}	1.89±0.12^{abc}	3.11±0.12^{cd}	4.23±0.31^{bcd}	0.00±0.00^{f}	0.5±0.1^{ef}	0.95±0.16^{b}	1.93±0.2^{cd}
T_4	1.80±0.15^{a}	2.46±0.15^{a}	4.26±0.3^{a}	5.61±0.24^{a}	1.02±0.2^{a}	1.78±0.2^{a}	2.11±0.11^{a}	3.42±0.35^{a}
T_5	1.38±0.1^{bcd}	1.94±0.25^{abc}	3.74±0.4^{abc}	4.8±0.16^{abc}	0.97±0.1^{ab}	1.22±0.14^{bc}	1.88±0.2^{a}	2.69±0.24^{b}
T_6	1.31±0.05^{cd}	1.78±0.2^{bcd}	3.15±0.3^{cd}	4.05±0.18^{cd}	0.00±0.00^{f}	0.31±0.1^{fg}	0.94±0.1^{b}	1.71±0.2^{cd}
T_7	1.51±0.03^{abc}	2.41±0.3^{ab}	4.02±0.25^{ab}	5.11±0.29^{ab}	0.31±0.02^{e}	0.92±0.2^{cd}	1.67±0.15^{a}	2.85±0.15^{ab}
T_8	1.18±0.1^{de}	1.91±0.31^{abc}	3.51±0.3^{bcd}	4.35±0.4^{bcd}	0.62±0.15^{cd}	0.75±0.15^{de}	1.72±0.18^{a}	2.33±0.2^{bc}
T_9	0.84±0.2^{ef}	1.85±0.35^{bcd}	3.21±0.5^{bcd}	3.98±0.42^{cd}	0.00±0.00^{f}	0.00±0.00^{g}	0.78±0.2^{b}	1.33±0.1^{d}
T_{10}	1.34±0.22^{cd}	2.29±0.28^{ab}	3.81±0.2^{abc}	4.74±0.35^{abc}	0.71±0.18^{bc}	1.28±0.12^{b}	1.76±0.1^{a}	2.25±0.22^{bc}
T_{11}	0.91±0.18^{ef}	1.44±0.25^{cd}	3.42±0.33^{bcd}	4.09±0.25^{cd}	0.00±0.00^{f}	0.3±0.04^{fg}	0.69±0.12^{b}	1.42±0.3^{d}
T_{12}	0.77±0.13^{f}	1.22±0.1^{d}	2.86±0.12^{d}	3.67±0.4^{d}	0.00±0.00^{f}	0.00±0.00^{g}	0.00±0.00^{c}	0.00±0.00^{e}

Different letters (a–z) within a same column (different batches) differ significantly (P< 0.05).

دلیل برخی از این تغییرات می تواند تبدیل یک یا چند واحد تشکیل دهنده DNA باشد که می تواند به بی ثباتی و اختلال در ساختار آن منجر شود [۳۵]. نتایج این مطالعه مطابق با یافته های Noudoost و همکاران (۲۰۱۵) بود، بطوریکه این محققان گزارش دادند که عصاره چای سبز پس از پوشش دادن با نانولیپوزوم‌ها نسبت به حالت آزاد فعالیت ضد میکروبی

بیشتری نشان داد [۳۶]. نتایج *Cui* و همکاران (۲۰۱۶) نیز نشان داد که نانوکپسول اسانس Salvia officinalis از پایداری بالاتری و همچنین اثر ضد میکروبی بیشتری نسبت به اسانس آزاد در برابر بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس در شیر برخوردار است.

همانطور که در توضیحات قبلی ذکر شد، کیتوزان و نانو امولسیون زنیان از توانایی بالایی در جلوگیری از رشد باکتریها به ویژه باکتریهای گرم مثبت برخوردار هستند، بنابراین از رشد این باکتری ها پس از فرایند پخت جلوگیری می کند. علاوه بر این، فرایند پخت کافی، کیفیت مناسب مواد اولیه، ذخیره سازی در شرایط مناسب محیطی، رعایت دمای نگهداری در هنگام حمل و نقل و ذخیره سازی و همچنین استفاده از ترکیبات ضد میکروبی مانع از رشد این باکتری ها می شود.

٤-٤- ظرفیت نگهداری آب (WHC)

ظرفیت نگهداری آب فرآورده‌ی گوشتی عبارت است از توانایی فرآورده در حفظ آب موجود در ساختار بافت آن طی به کارگیری نیروهای بیرونی مانند بریدن، چرخ کردن، فشردن یا حرارت دادن. ظرفیت نگهداری آب در واقع نسبت آب باقی مانده در نمونه به حجم آب اولیه می باشد، بنابراین درصد بالاتر نشان دهنده آزاد شدن مقدار کمتری رطوبت می باشد [۳۷]. نتایج اندازه گیری WHC نمونه های کالباس تحت تاثیر پودر کیتوزان و نانوامولسیون زنیان به تنهایی و در ترکیب با یکدیگر در جدول ٦ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می شود افزودن کیتوزان تأثیر مثبتی بر WHC نمونه های کالباس داشت، به طوری که نتایج اندازه گیری در روز اول نشان داد که نمونه های حاوی ۱٪ کیتوزان بالاترین میزان این پارامتر را داشتند که در محدوده ۸۹/۱-۸۸/۱ درصد بود و از نظر آماری با نمونه کنترل (۸٤/٦ درصد) اختلاف معنی دار بود.

همان‌طور که مشاهده می شود نانوامولسیون زنیان در روز اول نگهداری تاثیر معنی داری بر تغییرات WHC نداشت، بدین صورت که برای تیمارهای T4، T7 و T10 مقدار این پارامتر به ترتیب برابر ۸۳/۹، ۸٤/٥ و ۸٤ درصد بود که نسبت به نمونه کنترل اختلاف معنی داری وجود نداشت ($p>0/05$). در طول ۳۰ روز نگهداری نمونه های کالباس در یخچال مقدار WHC همه نمونه ها روند کاهشی داشت ولی در نمونه های حاوی کیتوزان میزان این تغییرات حداقل بود. طبق نتایج مشخص شد که نانوامولسیون زنیان نیز بخصوص در غلظت ۳درصد اثر سینرژیستی با کیتوزان داشت و منجر به بهبود WHC نمونه های کالباس شد. بدین ترتیب بالاترین میزان WHC در پایان دوره نگهداری به نمونه های حاوی ۳ درصد نانوامولسیون و ۱ درصد کیتوزان (T12) تعلق داشت که برابر ۸۷/۲ درصد اندازه گیری گردید (جدول ٦). همانطور که در بخش آنالیز پروفایل بافتی نمونه ها نشان داده شده است افزودن این دو ترکیب بطور همزمان منجر به کاهش سختی و قابلیت جویدن نمونه های کالباس نسبت به نمونه حاوی نیتریت در طول زمان نگهدرای شده است که میتوان به جذب و حفظ آب و در نتیجه افزایش WHC در ساختار بافتی نمونه های تیمار شده نسبت داد.

عوامل مختلفی از جمله آسیب بافت ناشی از پروتئازهای میکروبی و همچنین کاهش pH ناشی از تولید اسید توسط باکتریهای اسید لاکتیک دلایل اصلی کاهش WHC سوسیس و کالباس در حین ذخیره سازی است. رتروگراداسیون نشاسته و ایجاد پیوندهای هیدروژن بیشتر بین آمیلوز و آمیلوپکتین نیز دلیل دیگری برای افزایش سختی و کاهش WHC در طول ماندگاری محصولات گوشت می باشد [۳۸]. آب به گروههای هیدروفیلی پروتئین ها از جمله زنجیره های جانبی قطبی که دارای گروههای کربوکسیل (-COOH) ، هیدروکسیل (-OH)، سولفیدریل (-SH) و همچنین گروه های کربونیل (-C=O) و آمینو (-NH_2) پیوند های پپتیدی هستند، متصل می شود [۳۸].

WHC گوشت و فرآورده های گوشتی به شدت تحت تأثیر pH و یون های نمکی مانند NaCl قرار دارد و این موضوع با تغییر در بارهای الکتریکی پروتئین های ماهیچه ای توجیه می شود. جذب یا دفع بین گروههای بار شده از مولکولهای پروتئین مجاور با اتصال یا شل شدن پیوندهای جانبی بین زنجیره های پپتید ممکن است باعث ایجاد تغییر در WHC محصول گوشت شود. کاهش pH فرآورده های گوشتی، pH را به نقطه ایزوالکتریک می‌رساند. در نقطه ایزوالکتریک تعادل بین بارهای منفی و مثبت ایجاد می شود که در نهایت پروتئین های گوشت را به هم نزدیک می کند و WHC گوشت یا فرآورده های گوشتی را به حداقل می رساند [۳۹]. کیتوزان به دلیل مهار رشد میکروارگانیسم ها به خصوص باکتری های LAB، از کاهش pH و نزدیک شدن به pH ایزوالکتریک

جلوگیری می کند. با افزایش غلظت کیتوزان، فعالیت مهارکنندگی آن بیشتر افزایش می یابد، در نتیجه در نمونه های حاوی ۱٪ کیتوزان بالاترین میزان WHC اندازه گیری شد. از سوی دیگر، کیتوزان یک پلی ساکارید با قابلیت جذب آب است که می تواند از طریق گروه‌های عملکردی خود با مولکول های آب پیوند برقرار کند و از خروج آب از ساختار محصول جلوگیری کند [٤٠]. نانوامولسیون زنیان نیز تاثیری مشابه کیتوزان ولی با شدت کمتر داشت بدین معنی که با برقراری پیوند با سایر اجزای فرمولاسیون مانند پروتئین ماهیچه ها و همچنین نشاسته منجر به بهبود خواص بافتی نمونه های کالباس و در نتیجه افزایش اندکی در ظرفیت نگهداری آب توسط محصول نهای شد. نانوامولسیون همچنین طریق خاصیت ضد میکروبی اسانس و نانوذرات از تغییرات pH و رسیدن به نقطه ایزوالکتریک جلوگیری می کند.

Table 5 Changes in WHC values of beef bologna stored at 4 °C for 30 days

	WHC	Time (day)		
Treat	1	10	20	30
T_1	84.6 ± 0.4^{cd}	84.5 ± 0.6^{bcd}	82 ± 0.08^{e}	80.25 ± 0.75^{fg}
T_2	85.9 ± 0.6^{b}	85.3 ± 0.35^{b}	84.1 ± 0.2^{d}	82.8 ± 0.85^{de}
T_3	88.5 ± 0.33^{a}	87.9 ± 0.4^{a}	86.5 ± 0.3^{ab}	85.3 ± 0.65^{abc}
T_4	83.9 ± 0.2^{d}	81.5 ± 0.5^{e}	80.9 ± 0.18^{e}	79.1 ± 0.3^{g}
T_5	86 ± 0.12^{b}	85.2 ± 0.3^{b}	83.75 ± 0.3^{d}	81.9 ± 0.1^{ef}
T_6	88.3 ± 0.2^{a}	88 ± 0.28^{a}	85.88 ± 0.4^{bc}	84.6 ± 0.9^{bcd}
T_7	84.5 ± 0.55^{cd}	84.2 ± 0.18^{cd}	81.9 ± 0.11^{e}	79.8 ± 0.8^{g}
T_8	85.8 ± 0.7^{b}	85.4 ± 0.1^{b}	84.1 ± 0.4^{d}	83.75 ± 1^{cde}
T_9	88.1 ± 0.35^{a}	79.8 ± 0.22^{f}	87.3 ± 0.6^{ab}	85.9 ± 0.4^{ab}
T_{10}	84 ± 0.45^{d}	83.6 ± 0.11^{d}	82.25 ± 0.5^{e}	81.95 ± 0.55^{ef}
T_{11}	85.5 ± 0.25^{bc}	85.1 ± 0.1^{bc}	84.6 ± 1^{cd}	83.97 ± 0.68^{bcd}
T_{12}	89.1 ± 0.22^{a}	1.42 ± 0.08^{a}	87.95 ± 0.9^{a}	87.2 ± 0.3^{a}

Different letters (a–z) within a same column (different batches) differ significantly (P< 0.05).

٤-٥- اندازه گیری pH

نتایج اندازه گیری pH نمونه های کالباس گوشت در طول ۳۰ روز نگهداری در دمای ٤ °C در جدول ٦ آورده شده است. در روز اول نگهداری میزان pH همه نمونه ها بین ٦/٠٥ الی ٦/٢٣ قرار داشت. نتایج آنالیز واریانس نشان داد زمان نگهداری و کیتوزان تاثیر معنی داری بر تغییرات pH نمونه های کالباس داشتند ($p<٠/٠٥$)، در حالیکه بین نمونه های حاوی مقادیر مختلف نانوامولسیون زنیان اختلاف معنی داری وجود نداشت ($p>٠/٠٥$). در زمان ثابت نگهداری نمونه های حاوی ٠/٥ و ١ درصد کیتوزان دارای بالاترین مقدار pH نسبت به سایر تیمارها و نمونه کنترل بودند و این امر احتمالا به دلیل وجود گروه های آمین (-NH2) در ساختار واحدهای گلوکزآمین باشد که طی فرایند داستیلاسیون و تبدیل کیتین به کیتوزان تشکیل می شوند. طبق نتایج مقایسه میانگین ها (جدول ٦)، در تمامی تیمارها با افزایش زمان نگهداری کاهش معنی داری در مقدار pH نمونه های کالباس ایجاد شد بطوریکه بالاترین میزان این کاهش در روز ۳۰ نگهداری اندازه گیری شد.

Table 6 Changes in pH values of beef bologna stored at 4 °C for 30 days

	pH	Time (day)		
Treat	1	10	20	30
T_1	6.1 ± 0.02^{abc}	6.00 ± 0.05^{b}	5.95 ± 0.1^{abc}	5.71 ± 0.11^{d}
T_2	6.15 ± 0.01^{abc}	6.08 ± 0.1^{ab}	6.01 ± 0.08^{ab}	5.97 ± 0.1^{abcd}
T_3	6.2 ± 0.05^{ab}	6.15 ± 0.01^{ab}	6.05 ± 0.1^{ab}	6.08 ± 0.02^{ab}
T_4	6.12 ± 0.01^{abc}	6.03 ± 0.02^{ab}	5.85 ± 0.05^{c}	5.81 ± 0.04^{bcd}
T_5	6.17 ± 0.02^{abc}	6.12 ± 0.05^{ab}	$6.04\pm.01^{ab}$	6.00 ± 0.1^{abc}
T_6	6.21 ± 0.01^{ab}	6.14 ± 0.08^{ab}	6.05 ± 0.07^{ab}	6.04 ± 0.05^{abc}
T_7	6.08 ± 0.03^{bc}	6.00 ± 0.04^{b}	5.91 ± 0.03^{bc}	5.86 ± 0.12^{cd}
T_8	6.15 ± 0.01^{abc}	6.1 ± 0.02^{ab}	6.06 ± 0.04^{ab}	6.05 ± 0.03^{abc}
T_9	6.23 ± 0.04^{a}	6.17 ± 0.01^{a}	6.12 ± 0.05^{a}	6.05 ± 0.01^{abc}
T_{10}	6.05 ± 0.05^{c}	6.02 ± 0.06^{ab}	5.97 ± 0.01^{abc}	5.9 ± 0.09^{bcd}
T_{11}	6.09 ± 0.07^{bc}	6.01 ± 0.09^{ab}	6.00 ± 0.01^{ab}	5.98 ± 0.02^{abc}
T_{12}	6.2 ± 0.1^{ab}	6.12 ± 0.02^{ab}	6.08 ± 0.05^{ab}	6.1 ± 0.03^{a}

Different letters (a–z) within a same column (different batches) differ significantly (P< 0.05).

این امر احتمالا به دلیل تولید اسیدهای آلی مانند اسیدلاکتیک توسط باکتری ها (بخصوص گروه LAB) و همچنین اکسیداسیون چربی ها و تشکیل ترکیبات اسیدی باشد که در نهایت منجر به کاهش pH در فراورده نهایی در طی نگهداری می گردد [۴۱]. در طول پاستوریزاسیون محصولات گوشتی، فرم رویشی باکتری های اسیدلاکتیک از جمله *لاکتوباسیلوس*، *میکروکوکوس* و *انتروکوکوس* زنده باقی می مانند. این میکروارگانیسم ها میکروآئروفیل هستند بنابراین در بسته بندی های وکیوم به رشد خود ادامه می دهند و از طریق تنفس بیهوازی متابولیت هایی مانند اسید لاکتیک تولید می کنند [۴۱]. با افزایش زمان ماندگاری میزان اسید تولید شده توسط این میکروارگانیسم ها افزایش می یابد که نتیجه آن کاهش pH محصول در طول ذخیره سازی می باشد. بسیاری از محققان کاهش pH محصولات گوشتی در طول دوره ذخیره سازی را گزارش کرده اند و علت آن را به رشد باکتری های LAB نسبت داده اند [۲۲]، [۴۱]، [۴۲]، [۴۳]. نتایج همچنین نشان داد نمونه های حاوی کیتوزان بویژه در غلظت ۱درصد (T3، T6، T9 و T12 با مقدار pH ۶/۱۰-۶/۰۴) بالاترین میزان pH (۵/۷۱) را در پایان دوره نگهداری نسبت به نمونه حاوی ppm ۱۰۰ نیتریت (۵/۷۱) و نمونه های حاوی نانوامولسیون زنیان تنها (۵/۹۰-۵/۸۱) داشتند که نشان دهنده اثر ضد میکروبی قوی کیتوزان می باشد. تأثیر کیتوزان بر تغییرات pH به ویژه پس از یک ماه ماندگاری مشهود بود، بدین صورت که عدم احساس طعم و بوی ترش در محصول نهایی می تواند تأثیر مثبتی در پذیرش محصولات وکیوم بعد از ۳۰ روز داشته باشد. تحقیقات انجام شده توسط جیاراکو و همکاران (۲۰۱۰)، مارکوس و همکاران (۲۰۱۳)، و گارسیا و همکاران (۲۰۱۱) تاثیر مطلوب افزودن کیتوزان به محصولات گوشتی و جلوگیری از کاهش pH را تایید می نماید[۲۲]، [۴۴].

نانوامولسیون زنیان اگرچه تأثیر کمتری نسبت به کیتوزان در تغییر pH داشت اما نتایج نشان داد که اثر سینرژیستی آن در غلظت ۳٪ با کیتوزان در جلوگیری از کاهش pH وجود دارد، به طوری که بیشترین مقدار این پارامتر در روز ۳۰ ام در تیمار T12 اندازه گیری شد (pH = ۶/۱). تأثیر نانوامولسیون زنیان نیز به فعالیت ضد باکتریایی آن بر طیف وسیعی از میکروارگانیسم ها مربوط می شود که در بخش آزمون میکروبی به تفصیل شرح داده شده است. Aminzare و همکاران (۲۰۱۵) با مطالعه اثر اسانس دارچین بر ویژگی های شیمیایی کالباس لیونر گزارش دادند که اسانس دارچین تاثیر قابل توجهی بر تغییرات pH در تمام روزهای نگهداری نداشت در حالیکه زمان نگهداری فاکتور موثری در این رابطه بود که با نتایج این تحقیق سازگاری دارد[۴۵].

۵-نتیجه گیری

توجه به خطرات بالقوه موجود در به کارگیری نگهدارنده های سنتزی از جمله نیتریت و علاقه ی مصرف کننده ها به استفاده از محصولات سالم و طبیعی، موجب حرکت علم و صنعت غذا به سوی استفاده از آنتی اکسیدان های طبیعی در محصولات غذایی شده است. در این تحقیق امکان جایگزینی نیتریت سدیم بعنوان یک نگهدارنده سنتزی توسط نگهدارنده های طبیعی شامل نانوامولسیون زنیان و کیتوزان در غلظت های مختلف بر خصوصیات میکروبی و شیمیایی محصول نهایی بررسی شد .آنالیز ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه زنیان نشان داد ۹ ترکیب که مجموعا ۹۹/۵۸ درصد ترکیبات اسانس را تشکیل می‌دهد توسط دستگاه GC/MS شناسایی گردید که بیشترین ترکیبات آلی شناسایی شده در اسانس به ترتیب شامل کارواکرول، ام-سیمن، گاما-ترپینن و آلفا-پینن بود. نتایج آنالیز میکروبی حاکی از موثر بودن کیتوزان و نانوامولسیون زنیان در کاهش فلور میکروبی نمونه های کالباس در طول دوره ذخیره سازی بودند و بیشترین کاهش بار میکروبی در نمونه‌های حاوی نانو امولسبون اسانس زنیان و کیتوران مشاهده شد که حاکی از اثر سینرزیستی این دو ترکیب است .

افزودن کیتوزان تأثیر مثبتی بر ظرفیت نگهداری آب نمونه‌های کالباس داشت، به طوری که نتایج اندازه‌گیری در روز اول نشان داد که نمونه‌های حاوی ۱٪ کیتوزان بالاترین میزان این پارامتر را داشتند. با افزایش غلظت کیتوزان ظرفیت نگهداری آب نمونه های کالباس نسبت به کنترل در طول زمان نگهداری افزایش و میزان pH کاهش یافت، اما افزایش غلظت نانو امولسیون اثر معنی‌داری بر این پارامترها نداشت. ترکیب کیتوزان ۱ درصد و نانوامولسیون ۲-۳ درصد مطلوب‌ترین نتایج را نشان دادکه می‌تواند پتانسیل ارزشمندی برای استفاده تجاری داشته باشد و تولید محصولات گوشتی را بدون استفاده از نیتریت ها یا سایر مواد افزودنی مصنوعی بهبود بخشد.

٦- منابع

[1] Sampaio, G. R., Castellucci, C. M. N., Pinto Silva, M. E. M. & Torres, E. A. F. S. 2004. Effect of fat replacers on the nutritive value and acceptability of beef frankfurters. Journal of Food Composition and Analysis, 17, 469-474.

[2] Pereira NR, Tarley CRT, Matsushita M, de Souza NE. 2000. Proximate composition and fatty acid profile in Brazilian poultry sausages. J Food Compos Analy, 13: 915-20.

[3].Hosseinpour, S., Eskandari, M. H ., Mesbahi, G.R , Shakramforosh, S. , Farahnaki, A.2013. Investigation of the use of natural cochineal and paprika dyes in order to create color in low nitrite and non-nitrite Frankfurter sausages. Iranian Food Science and Technology Research.9(3):243-252 [4] Kanatt, S., Rao, M.S., Chawla, S.P., Sharma, A. 2013. Effects of chitosan coating on shelf-life of ready-to-cook meat products during chilled storage. Food Science and Technology, 53: 321-326.

[5] Kamkar, A , Rokni, N. , Cheraghali, A. , Hosseini, H. , Rezaei, M., Bakai, Saeed , Nowruzian ,I. , Abdollahzadeh, A.2004. Measurement of nitrite residue in various meat products offered in Iran by spectrophotometric method. ournal of Veterinary Research (University of Tehran).59(2):179-182.

[6] Sebranek, J. G. 2009. Basic curing ingredients. Pp. 1-25. In: R. Tarte(Ed), Ingredient in meat product. Springer: Wisconsin, USA.

[7] Bozkurt, H. and M. Bayram. 2006. Colour and textural attributes of sucuk during ripening. Meat Sci. 73: 344-350.

[8] Gutiérrez J, González C, Maestro A, Sole I, Pey C, Nolla J. 2008. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 13:245-251.

[9] Goudarzi GR, Saharkhiz MJ, Sattari M, Zomorodian K. Antibacterial activity and chemical composition of Ajowan (*Carumcopticum* benth. & hook) essential oil. J Med PlantRes. 2011;13:203–208.

[10] Souza ELD, Stamford TLM, Lima EO, Tarajano VN, Filho JBM. 2005. Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food conservation system. Braz Arch Biol Technol; 48 (4):1516-8913.

[11] Khajeh, M., Yamini, Y., Sefidkon, F., & Bahramifar, N. 2004. Comparison ofessential oil composition of Carum copticum obtained by supercritical carbondioxide extraction and hydrodistillation methods. Food Chemistry, 86, 587–591.

[12] Kanatt, S.R., Chander, R. and Sharma, A. (2008). Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products, Food Chemistry, 107: 845-852.

[13] Roller S, Sagoo S, Board R, O'Mahony T, Caplice E, Fitzgerald G, Fogden M, Owen M, Fletcher H. 2002. Novel combinations of chitosan, carnocin and sulphite for the preservation of chilled pork sausages. Meat Sci; 62:165–177.

[14] Shahidi, F. 2012. Flavor of meat and meat products. Springer Science & Business Media.

[15] Ruiz-Capillas, C., S. Tahmouzi, M. Triki, L. Rodríguez-Salas, F. Jiménez-Colmenero and A.M. Herrero. 2015. Nitrite-free Asian hot dog sausages reformulated with nitrite replacers. J. Food Sci.Technol. 52: 4333-4341.

[16] Wójciak, K.M. and Z.J. Dolatowski. 2016. Evaluation of natural preservatives in combination with acid whey for use in fermented sausage. Sci. Agric. 73: 125-133.

[17] Bostan, K., Isin Mahan, F. 2013. Microbiological quality and shelf-life of sausage treated with chitosan. Research Article, 37 (2):117-126.

[18] Anonymous.2010. Sausages, features and test methods. National Standard of Iran, No. 2303, Third Revision.

[19] Anonymous.2007. Meat and meat product. Determination of total phosphorus - spectrophotometric method. National Standard of Iran, No. 1134.

[20] Anonymous.1991. Meat and meat product. Determination of Sodium Choloride. National Standard of Iran, No. 741.

[21] Moradi, S. and Barati A. 2019. Essential Oils Nanoemulsions: Preparation, Characterization and Study of Antibacterial Activity against Escherichia Coli. Int. J. Nanosci. Nanotechnol. 15 (3); 199-210.

[22] Garcia M, Beldarrain T, Fornaris L and Diaz R. 2011. Partial substitution of nitrite by chitosan and the effect on the quality

properties of pork sausages. Cienc. Tecnol. Aliment. Campinas 31(2): 481-487.

[23] Kazemi, M. 2014. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant andanti-inflammatory activity of carum copticum essential oil. TEOP, 17(5),1040–1045.

[24] Yoshihiko, O., Mayumi, S., Takahiro, A., Hiroyuki, S., Yoshihiro, S., & Ichiro, N. (2003). Antimicrobial activity of chitosan with different degrees of acetylation and molecular with different degrees of acetylation and molecular weights. Biocontrol Science, 8, 25- 30.

[25] Georgantelis D, Ambrosiadis I, Katikou P, Blekas G, Georgakis SA. 2007. Effect of rosemary extract, chitosan and a-tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. Meat Science. 76: 172-181.

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

[27] Chenoll, E., Macian, M. C., and Elizaquivel, P. 2009. Lactic acid bacteria associated with vacuum –packed cooked meat product spoilage: population analysis by rDNA –based methods. Departamento de Microbiologı´a, University of Valencia, Valencia, Spain.

[28] Landeta, G., Curiel, J. A., Carrascosa, A. V., Muñoz, R., and Rivas, B. d. l. 2013. Technological and safety properties of lactic acid bacteria isolated from Spanish dry-cured sausages. Meat Sci. 95:272-280.

[29] Petrou, S. Tsiraki, M. Giatrakou, V. and Savvaidis, I.N. 2012. Chitosan dipping or oregano oil treatments, singly or combined on modified atmosphere packaged chicken breast meat. International Journal of Food Microbiology, 156: 264–271.

[30] Ghosh, V, Saranya, S., Mukherjee, A., and Chandrasekaran, N. 2013. Cinnamon Oil Nanoemulsion Formulation by Ultrasonic Emulsification: Investigation of Its Bactericidal Activity. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 13, 114–122.

[31] Soultos N, Tzikas Z, Abrahim A, Georgantelis D, Ambrosiadis I. 2008. Chitosan effects on quality properties of Greek style fresh pork sausages. Meat Science. 80: 1150-1156.

[32] Ahmad, I., Beg, A. Z. 2001. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi drug resistant human pathogens. J Ethnopharmacol; 74: 113-23.

[33] Jahed, E, Alizadeh Khaledabad, M., Almasi, H., Hasanzadeh R. 2017. Physicochemical properties of Carum copticum essential oil loaded chitosan films containing organic nanoreinforcements. Carbohydrate Polymers 164; 325–338.

[34] Lu, W., Huang, D.W., Wang, C.R., Yeh, C.H., Tsai, J.C., Huang, Y.T., Li, P.H. 2018. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. Journal of Food and Drug Analysis, 26 (1); 82-89.

[35] Cui, H., Zhou, H., and Lin, L. 2016. The specific antibacterial effect of the Salvia oil nanoliposomes against Staphylococcus aureus biofilms on milk container. Food Control, 61:92-98.

[36] Noudoost, B., Noori, N., Amo Abedini, G., Gandomi, H., Akhondzadeh Basti, A., Jebeli Javan, A., and Ghadami, F. 2015. Encapsulation of Green Tea Extract in Nanoliposomes and Evaluation of its Antibacterial, Antioxidant and Prebiotic Properties. Journal of Medicinal Plants. 3(55): 66-78.

[37] Muthia, D., Nurul, H. and Noryati, I. 2010. The effects of tapioca, wheat, sago and potato flours on the physicochemical and sensory properties of duck sausage. International Food Research Journal 17: 877-884.

[38] Virginia C. Resconi, Derek. Keenan, Elisa García, Paul Allena, Joe P. Kerry, Ruth M. Hamill. 2016. The effects of potato and rice starch as substitutes for phosphate in and degree of commination on the technological, instrumental and sensory characteristics of restructured ham. Meat Science 121, 127–134.

[39] Feiner, G. (2006). Colour in fresh meat and in cured meat products. Meat products handbook: Practical science and technology. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited. pp, 142-156.

[40] Jin S. K., Hur S. J., and Yim D. 2019. Combined Effects of Sodium Substitution and Addition of Cellulose or Chitosan on Quality Properties of Pork Sausages. Food Sci Anim Resour; 39(4): 555–564.

[41] Lynn Knipe, C. Rust, Robert E. 2010. Thermal processing of ready-to-eat meat products. 2: 17-39.
[42] Tarte, R. 2009. Meat-derived protein ingredients. pp. 145-171. In: R. Tarte. (Ed.), Ingredient in meat product. Springer: Wisconsin, USA.
[43] Choi, S.H. and K.B. Chin. 2003. Evaluation of sodium lactate as a replacement for conventional chemical preservatives in comminuted sausages inoculated with Listeria monocytogenes. Meat Sci, 5: 531-537.
[44] Marcos, B., Aymerich, T., Garriga, M., & Arnau, J. (2013). Active packaging containing nisin and high pressure processing as post-processing listericidal treatments for convenience fermented sausages. Food Control, 30, 325-330.
[45] Aminzare M., Aliakbarlu J., Tajik H. 2015. The effect of Cinnamomum zeylanicum essential oil on chemical characteristics of Lyoner- type sausage during refrigerated storage. Veterinary Research Forum; 6 (1) 31 – 39.

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

The effect of Sodium Nitrite replacement by *Carum copticum* (Ajowan) essential oil nanoemulsion and Chitosan on some Chemical properties and shelf life of Beef Bologna at refrigerator temperature

Taherzadeh, E. [1], Arianfar, A. [1]*, Mahdian, E. [1], Mohseni, Sh. [2]

1. Department of Food Science and Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.
2. Department of Chemistry, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.

ARTICIE INFO

Article History:

Received 2020/ 10/ 18
Accepted 2020/ 11/ 18

Keywords:

Beefbologna,
Chitosan,
Nanoemulsions,
Carum copticum,
Shelf life.

DOI: 10.52547/fsct.18.117.247

*Corresponding Author E-Mail:
a_aria_1443@yahoo.com

ABSTRACT

Due to the importance of consuming meat and meat products especially sausage and bologna and the adverse effects of using synthetic preservatives used in them, this study aimed to investigate the effect of natural preservative on shelf-life of cooked beefbologna and comparison with sodium nitrite as synthetic preservative. the effect of chitosan (0, 0.5 and 1%) added individually or in combination with CCEO nanoemulsion (0, 1, 2 and 3%) as an alternative for sodium nitrite on microbiological (Total Viable Counts, Coliforms, *Lactic acid bacteria (LAB),* molds and yeasts), pH and water holding capacity (WHC), of beef bologna stored at 4 °C for 30 days was investigated. The experiment was performed in completely randomized based on factorial in 3 replication. Duncans test at 5% probability level was used to determine the significant difference mean between the data. Results indicated that chitosan addition resulted in significant ($p< 0.05$) inhibition of microbial growth, so that the lowest microbial counts were obtained in the samples containing both chitosan and CCEO nanoemulsion indicating a possible synergistic effect. Chitosan also improved the WHC and reduced the synersis of the samples during shelf-life respect to the control, while CCEO nanoemulsion had no significant effect on these parameters ($p>0.05$). The combination of chitosan (1%) with CCEO nanoemulsion (2-3%), which showed the best results, could have a valuable potential for commercial use in order to improve preservation of meat products without the use of nitrites or other synthetic additives.