بررسی ویژگی‌های میکروبی و حسی سوسیس فرانکفورتر فراسودمند در مدت زمان نگهداری

کاظم علیرضالو[۱*]، جواد حصاری[۲]، محمد هادی اسکندری[۳]، هادی ولیزاده[۴]، محمد سیروس آذر[۵] و ذبیح اله نعمتی[۶]

۱- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز
۲- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۳- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
٤- استاد، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۵- دانشیار، گروه شیمی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی ارومیه
٦- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز
(تاریخ دریافت: ۹٦ /۰۸/۰۵ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۳/۲۷)

چکیده

در این پژوهش تاثیر استفاده از عصاره ترکیبی برگ‌های چای سبز، گزنه و زیتون و ترکیبات ضدمیکروبی نایسین (۲۰۰ ppm)، کیتوزان (۰/۵٪) و اپسیلون پلی لیزین (۰/۲٪) به منظور تولید سوسیس فرانکفورتر فراسودمند بدون نیتریت مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های سوسیس فرانکفورتر حاوی ۵۰۰ ppm عصاره گیاهی ترکیبیدر ۹ تیمار (تیمار ۱: سوسیس حاوی ۱۲۰ ppm نیتریت سدیم؛ تیمار ۲: سوسیس بدون ترکیب نگهدارنده؛ تیمار ۳: سوسیس حاوی ۲۰۰ ppm نایسین؛ تیمار ٤: سوسیس حاوی ۰/۵ ٪ کیتوزان؛ تیمار ۵: سوسیس حاوی ۰/۲ ٪ اپسیلون پلی لیزین؛ تیمار ٦: سوسیس حاوی ۲۰۰ ppm نایسین و ۰/۵ ٪ کیتوزان؛ تیمار ۷: سوسیس حاوی ۲۰۰ ppm نایسین و ۰/۲ ٪ اپسیلون پلی لیزین؛ تیمار ۸: سوسیس حاوی ۰/۵ ٪ کیتوزان و ۰/۲ ٪ اپسیلون پلی لیزین؛ تیمار ۹: سوسیس حاوی ۲۰۰ ppm نایسین، ۰/۵ ٪ کیتوزان و ۰/۲ ٪ اپسیلون پلی لیزین) تولید شدند و آزمایش‌های میکروبی و حسی در روزهای ۱، ۱۵، ۳۰ و ٤۵ مدت زمان نگهداری مورد ارزیابی قرار گرفت. در انتهای مدت زمان نگهداری تیمار ۷ به طور معنی داری ($P<$۰/۰۵) دارای کمترین شمارش باکتری‌های کل (٤/٤ LogCFU/g) بود. در بین تیمارهای مختلف سوسیس در تیمارهای ۲ و ٤ *کلستریدیوم پرفرنجنس*، در تیمار ٦ *استافیلوکوکوس اورئوس*و در تیمارهای ۱ و ۳ باکتری‌های کلیفرم مشاهده شدند.در هیچ یک از نمونه‌های سوسیس فراسودمند باکتری‌های بیماری‌زای *اشریشیا کلی* و *سالمونلا* شناسایی نشد. شمارش کپک‌ها و مخمرها به طور معنی داری ($P<$۰/۰۵) در طول مدت زمان نگهداری افزایش پیدا کرد ولی در تیمارهای ۸ و ۹ کپک و مخمری مشاهده نشد. بطوری که نتایج حسی نشان داد که تیمارهای ۸ و ۹ مقبولیت کلی بالاتری نسبت به سایر نمونه‌ها داشتند. با توجه به نتایج بدست آمده، تیمار ۹ دارای کیفیت میکروبی،ویژگی‌های حسی مطلوب و زمان ماندگاری بالایی بود و می‌تواندبه عنوان استراتژی جدید در صنعت گوشت و تولید فراورده‌های گوشتی بدون نیتریت مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژگان: سوسیس فرانکفورتر،فراسودمند، عصاره‌های گیاهی، ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی

*مسئول مکاتبات: kazem.alirezalu@tabrizu.ac.ir

۱- مقدمه

محصولات گوشتی نقش عمده‌ای در تغذیه و تنوع غذایی مردم دارند. این محصولات از نظر مصرف راحت بوده و در همه جا قابل تهیه بوده و می‌توانند در اختیار مصرف کنندگان با سلیقه‌های مختلف قرار گیرند [۱]. به طور کلی سوسیس، فرآورده گوشتی است که از مخلوط نمودن گوشت چرخ کرده حیوانات حلال گوشت مانند گاو، گوساله و مرغ با انواع مختلف مواد افزودنی از قبیل آرد گندم، آرد سویا، نشاسته، ادویه‌جات، شکر، روغن، نمک، نیتریت و نیترات سدیم یا پتاسیم، کازئین و... و عمل آوردن آنها توسط پخت و دود دادن و تزریق در روده حیوانات و یا پوشش‌های مصنوعی به دست می‌آید و قطر آن حداکثر ۲۵ میلی‌متر می‌باشد [۲]. مصرف سرانه این فرآورده در ترکیه بیش از ۵ کیلوگرم و در چین بیش از ٦ کیلوگرم در سال می‌باشد. این در حالی است که مصرف سرانه در کشور ما کمتر از ۱/۵ کیلوگرم است.

سوسیس محصول غذایی نسبتا کامل بوده و ترکیبات تغذیه‌ای آن کامل‌تر از گوشت خالص می‌باشد. در صورت افزایش مصرف سوسیس از مصرف گوشت کاسته شده و نیازی به واردات گوشت نمی‌باشد. اما افزایش استقبال مصرف کنندگان از انواع سوسیس و کالباس، در شرایطی مشاهده می‌شود که بسیاری از متخصصان تغذیه، به مضرات مصرف این نوع مواد غذایی اشاره می‌کنند [۳]. کیفیت نهایی فرآورده‌های فرآیند شده غذایی در ارتباط مستقیم با نوع و میزان مواد اولیه افزودنی می‌باشد. صنعت سوسیس و کالباس نیز از این قاعده مستثنی نبوده و انتخاب نوع و میزان هر یک از مواد اولیه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در شرایط کنونی که مصرف سوسیس و کالباس همواره در حال افزایشاست، بنابراین چاره‌ای جزء تغییر فرمولاسیون این محصول و کاهش اثرات مضر سلامتی آن نیست.

نیترات و نیتریت سدیم به عنوان نگهدارنده و برای افزایش زمان ماندگاری به فرمولاسیون سوسیس اضافه می‌شوند تا مانع رشد باکتری‌های خطرناکی مانند *کلستریدیوم بوتولینوم* گردند [٤ و ٥]. همچنین این مواد با ترکیب شدن با رنگدانه میوگلوبین گوشت، باعث ایجاد رنگ مطلوب صورتی و افزایش تازگی گوشت می‌شود. با وجود این گوشت قرمز طی مدت زمان نگهداری طولانی نمی‌تواندبه طور طبیعی چنین رنگی داشته باشد. به علاوه این ترکیبات نیتراتی شروع فساد را در گوشت به تاخیر می‌اندازند و باعث حفظ عطر و طعم ادویه‌های آن می‌شوند. مطابق گزارش‌ها مقدار مصرف نیترات سدیم در حدود ۰/۰٦۲ درصد کل وزن سوسیس یا در حدود ۱۲۰ppmمی‌باشد [٦ و ۷].

نیترات و نیتریت مواد سرطان‌زایی هستند که وجود آنها در مواد غذایی تهدید کننده سلامت انسان‌ها است. مشتقات مختلفی از این ترکیبات در ماده غذایی و یا در طی هضم و جذب در لوله گوارش انسان، ایجاد می‌شود. این مشتقات شامل ترکیبات سرطان‌زای مختلف N-نیتروز آمین‌هامی‌باشند که به آسانی طی واکنش نیترات و نیتریت با آمینواسیدهای نوع دوم شکل می‌گیرند [۸ و ۹]. گزارش‌های مختلفی اثرات نامطلوب این ترکیبات مانند کمبود اکسیژن رسانیبه خون و سایر ارگان‌های داخلی بدن به علت بلوکه شدن گلوبول‌های قرمز با نیتریت [۱۰]، انسداد مزمن ریوی [۸] و سرطان زایی [۱۱ و ۱۲] را به اثبات رسانیده‌اند.

با توجه به کاربردهای مختلف نیتریت سدیم در فرمولاسیون سوسیس در صورت حذف این ترکیب باید راهبردهای متنوعی در بهبود فرمولاسیون ارایه کرد، بطوری که ویژگی‌های میکروبی و کیفی در سطح بالایی حفظ شود. گزارش‌های متنوعی در مورد تولید فراورده‌های گوشتی بدون نیتریت یا با نیتریت کاهش یافته وجود دارد. سبرانک و باکوس [۵] نشان دادند که در تولید محصولات ارگانیک و فراسودمند نمی‌توان از نیتریت/نیترات در فرمولاسیون استفاده کرد. یلماز و زوربا [۱۳] اذعان کردند که با استفاده از گلوکونو دلتا لاکتون و اسید آسکوربیک می‌توان میزان نیتریت در مورد سوسیس تخمیری ترکیه‌ای را تا ۲۵ ٪ کاهش داد.کورت و زوربا [۱٤] با استفاده از افزایش دمای فرایند از ^{0}C ٦۰ تا ^{0}C ۹۰ در سوسیس تخمیری ترکیه‌ای توانستند میزان نیتریت سدیم را تا ٦۰ ٪ کاهش دهند. هاسپیتال و همکاران [۱۵] طی پژوهشی با بررسی تاثیر مقادیر مختلف نیتریت سدیم

(ppm ۷۵، ۱۲۰ و ۱۵۰) روی ماندگاری *لیستریا مونوسیتوژنز* در سوسیس تخمیری خشک اسپانیایی به این نتیجه رسیدند که با افزایش مقادیر نیتریت علیرغم کاهش شمارش این باکتری تا ۲ لگاریتم ولی پروفیل ترکیبات فرار کل کاهش پیدا می‌کند.

استفاده از عصاره‌های گیاهی و ترکیات ضدمیکروبی طبیعی در فرمولاسیون تولید سوسیس در جهت جایگزینی نیتریت سدیم گامی جدید در تولید محصولات گوشتی فراسودمند و بدون نیتریت می‌باشد. ثابت شده است که عصاره برگ‌های چای سبز، گزنه و زیتون علاوه بر ویژگی‌های تغذیه‌ای و سلامتی [۱۶، ۱۷، ۱۸ و ۱۹]، دارای فواید تکنولوژیکی مانند خواص آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی [۲۰، ۲۱ و ۲۲] بوده و می‌توانند در تولید فراورده‌های گوشتی با کیفیت مورد استفاده قرار بگیرند.

با توجه به اهمیت حذف نیتریت سدیم از فرمولاسیون سوسیس در بهبود سلامت جامعه و فواید مختلف عصاره‌های گیاهی و ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی در جایگزینی ترکیبات نیتریتی، بنابراین هدف این پژوهش تولید سوسیس فراسودمند بدون نیتریت با استفاده از عصاره‌های گیاهی برگ‌های چای سبز، گزنه و زیتون و ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی نایسین، کیتوزان و اپسیلون پلی لیزین می‌باشد تا بتوان گامی نو در جهت تولید فراورده‌های گوشتی سالم و با زمان ماندگاری بالا برداشته شود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد اولیه

در این پژوهش کلیه مواد شیمیایی و محیط‌های کشت مورد استفاده از شرکت مرک آلمان با درجه خلوص تجزیه‌ای، نایسین از Nisaplin (Danisco, Copenhagen, Denmark, 5000 IU/mL)، کیتوزان از Sigma-Aldrich (درجه داستیلاسیون ۹۵٪، USA) و اپسیلون پلی لیزین از FoodChem (با درجه خلوص ۹۵٪≤، China) تهیه شدند. همچنین برگ‌های چای سبز، گزنه و زیتون به ترتیب از شهرهای لاهیجان، آستارا و نورآباد ممسنی جمع آوری شدند.

۲-۲- تهیه عصاره‌ها

برای این کار از روش ابراهیم‌زاده و همکاران [۲۳] با اندکی تغییرات استفاده شد. به طور خلاصه، نمونه‌های ۵۰ گرمی پودر خشک برگ‌های چای سبز (*Camellia sinensis* L.)، گزنه (*Urtica dioica* L.) و زیتون (*Olea europaea L.*) با نسبت ۱۰ به ۱ [حلال (میلی‌لیتر) به ماده گیاهی (گرم)] با حلالاتانول ۹۵٪ در یک ارلن ۲۵۰ mL با استفاده از شیکر به مدت ٤٨ ساعت مخلوط شدند. پس ازاتمام همزدن،عصاره‌های اولیه به کمک کاغذ صافی از مواد گیاهی جدا شده و در نهایت حلال اتانول با اواپراتور تحت خلا در دمای ٤٠ ^0C استخراج و بدین ترتیب عصاره‌های خالص چای سبز، گزنه و برگ زیتون تهیه شدند.در صورت نیاز عصاره‌ها در دمای ٤^0C نگهداری شدند.

۲-۳- تهیه محلول نایسین و اپسیلون پلی لیزین

برای تهیه محلول اولیه نایسین و اپسیلونپلیلیزین از روش هامپیکیان و اگور [٢٤] با اندکی تغییرات استفاده شد. به طور جداگانه، ۲ گرم نایسین پودری و اپسیلون پلی لیزین در ۲۰۰ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال ۰/۰۲ مولار به کمک حرارت ۷۰-٦٠ ^0C حل شد. سپس محلول‌ها با استفاده از فیلترهای با اندازه منافذ ۰/۲۲ میکرومتر استریل شد و برای تهیه سوسیس‌های فراسودند با مقادیر ppm ۲۰۰ برای نایسین و ۰/۲٪ برای اپسیلون پلی لیزین مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۳- تهیه محلول کیتوزان

برای تهیه محلول اولیه کیتوزان (وزن مولکولی KD ۱۰۰، درجه داستیلاسیون ۹۵ ٪) از روش سرانو و بانون [۲۵] و واسیلاتوس و ساوایدیس [۲٦] استفاده شد. ابتدا ۱ گرم از کیتوزان با ویژگی‌های مشخص در ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال ۱٪ (w/v)، حل شد و محلول اولیه ۱٪ (w/v) بدست آمد. محلول مورد نظر به مدت ۱ شب در دمای اتاق بهم زده شد. در نهایت محلول برای تولید سوسیس فراسودمند حاوی کیتوزان با غلظت ۰/۵٪ مورد استفاده قرار گرفت.

۲-٤- تولید سوسیس فراسودمند

نمونه‌های سوسیس فرانکفورتر مورد بررسی در این پژوهش در کارخانه فرآورده‌های گوشتی تاملی نور تبریز تولید شد. قبل از تولید نمونه‌های اصلی سوسیس برای بهینه‌سازی میزان عصاره مورد استفاده از غلظت‌های مختلف عصاره‌های ترکیبی (۲۵۰ppm، ۵۰۰ و ۱۰۰۰) و از ویژگی‌های ظاهری و بافتی استفاده شد. پس از انتخاب میزان عصاره بهینه شده، نمونه‌های مختلف سوسیس فراسودمند تولید شدند. جهت تولید نمونه‌های سوسیس ابتدا گوشت قرمز (۵۵٪) به دستگاه چرخ گوشت انتقال یافت و با شبکه ٤ میلیمتر چرخ شد، سپس کلیه مواد اولیه که عبارتند از روغن مایع گیاهی(۱۲٪)، آب و یخ (۲۱٪)، نمک (۱/۵٪)، ادویه جات (۲٪)، نشاسته و سایر مواد خشک (۸/۱۵٪) وفسفاتسدیم (۰/۳۵٪) آماده سازی و توزین گردید. برای کاتریزاسیون گوشت قرمز و مخلوط کردن مواد دیگر از کاتر با حجم ۵ کیلوگرمی MADO ساخت کشور آلمان استفاده شد. ابتدا گوشت قرمز به همراه نمک Nacl و فسفات به همراه نصف مقدار آب (حاوی عصاره‌های برگ چای سبز، گزنه و زیتون) و یخ به کاتر انتقال داده شد. در مرحله بعد نشاسته، سایر مواد خشک، ادویه جات و ترکیبات ضدمیکروبی (نایسین، کیتوزان و اپسیلون پلی لیزین) و در انتهای فرایند مابقی یخ و اسید آسکوربیک اضافه شد و خمیر سوسیس (فارش) به مدت ۲ دقیقه مخلوط شد. سپس فارش به دستگاه پرکن انتقال و در پوشش‌های پلی‌آمیدی با قطر ۲۸ میلی‌متر پر شد و پس از کلیپس زنی وارد مرحله پخت با بخار گردید. عملیات پخت در دمای ^{0}C ۸۵-۸۰ به مدت ۱/۵ ساعت انجام شد و سپس نمونه‌های سوسیس زیر دوش‌های آب به صورت اولیه خنک شده و در نهایت وارد سردخانه با دمای ^{0}C ٤ شدند. تیمارهای مورد استفاده در این پژوهش در جدول ۱ نشان داده شده‌اند. تیمارهای مختلف سوسیس فراسودمند به مدت ٤۵ روز در دمای ^{0}C ٤ نگهداری شدند و آزمایش‌های میکروبی در روزهای ۱، ۱۵، ۳۰ و ٤۵ و ویژگی‌های حسی در روز ٤۵ در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفتند.

Table 1 Different treatments of frankfurter sausages produced by natural antimicrobial compounds.

Treatments	Antimicrobials			
	Sodium nitrite (ppm)	Nisin (ppm)	Chitosan (%)	ε-polylysine (%)
T1	120	0	0	0
T2	0	0	0	0
T3	0	200	0	0
T4	0	0	0.5	0
T5	0	0	0	0.2
T6	0	200	0.5	0
T7	0	200	0	0.2
T8	0	0	0.5	0.2
T9	0	200	0.5	0.2

۲-٦- آزمایش‌ها

۲-٦-۱- ویژگی‌های میکروبی

ابتدا قسمت خارجی بسته بندی سوسیس توسط اتانول ۷۰ درصد به خوبی ضدعفونیو سپس پوشش پلی آمیدی با چاقوی استریل برید شد. رقت ۰/۱ اولیه (10^{-1}) از اختلاط ۲۵ گرم نمونه سوسیس با ۲۲۵ گرم محلول رقیق کننده پپتون بافر ۰/۱ ٪ استریل در یک ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتر استریل بدست آمد. سپس نمونه به مدت ۲ دقیقه با استفاده از هموژنایزر (IKA، آلمان) استریل مخلوط شد. در نهایت رقت‌های 10^{-2}، 10^{-3} و تا 10^{-9}

نیز در پپتون واتر استریل ۰/۱ ٪ تهیه شدند. کشت باکتری‌های کل، *کلستریدیوم پرفرنجنس*، کلیفرم‌ها، *سالمونلا* و *اشریشیا کلی* به صورت پورپلیت به ترتیب با شرایط انکوباسیون؛ ۷۲ ساعت در دمای ^0C ۳۰ (در محیط کشت PCA[1]، هوازی)، ۲٤ ساعت در دمای ^0C ۳۷ (در محیط کشت SPS آگار[2]، غیرهوازی)، ۲٤ ساعت در دمای ^0C ۳۷ (در محیط کشتVRB آگار[3]، دولایه)، بر اساس محیط کشت در مدت زمان‌های ۲٤، ٤۸ ساعت در دمای ^0C۳۷ (در محیط کشت‌های PWA[4]، TTB[5]، RV[6]، SSA[7] و BGA[8]) و ۲٤ ساعت در دمای ^0C٤٤ (در محیط کشت‌های لوریل سولفات، EC و آب پپتونه)،انجام شد.همچنین شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* و کپک و مخمرها به صورت کشت سطحی و به ترتیب با شرایط انکوباسیون ٤۸ ساعت در دمای ^0C۳۷ (در محیط کشت BPA[9]) و ۵ روز در دمای ^0C ۲۵ (در محیط کشتDRBC آگار[10]) انجام شد[۲۷].

۲-٦-۲-ویژگی‌های حسی

ویژگی‌های حسی ظاهری، بافتی و عطر و طعم نمونه‌های سوسیس‌های فراسودمند به صورت هدونیک ۵ نقطه‌ای و توصیفی ۹ نقطه‌ای توسط ۱۲ ارزیاب (مرد: ٤ نفر، زن: ۸ نفر؛ سن: ۳۰-۲۰ سال) آموزش دیده و بر اساس روش سیریپاتراوان و نویفا [۲۸]مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲-۷- آنالیز آماری

طرح مورد استفاده در هر مرحله در قالب طرح کاملا تصادفی با ۹ تیمار سوسیس‌های فرانکفورتر فراسودمند در طول زمان انجام شد. برای آنالیز داده‌ها در طول زمان از روش اندازه‌گیری‌های تکرار شده در واحد زمان[11] و برای داده‌های حسی از روش ANOVA در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها در زمان‌های مختلف با روش حداقل میانگین مربعات[12]و برای داده‌های حسی با آزمون چند دامنه‌ای دانکن به کمک نرم افزار آماری SAS نسخه ۹/۲ انجام شد.

۳- نتایج و بحث

استفاده از عصاره‌های گیاهی فراسودمند و ترکیبات ضد میکروبی طبیعی مانند نایسین، کیتوزان و اپسیلون پلی لیزین به عنوان جایگزین‌هایترکیب سرطانزای نیتریت سدیم می‌تواند یکی از روش‌های تولید محصولات گوشتی سالم و افزایش سلامت جامعه باشد. نتایج حاصل از غلظت‌های مختلف مورد استفاده از عصاره‌های چای سبز، گزنه و زیتون در تولید سوسیس فرانکفورتر فراسودمند در جدول ۲ نشان داده شده است.

نتایج حاکی از آن بود که با افزایش غلظت عصاره رنگ نمونه سوسیس به طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) به قهوه‌ای گرایش داشت. همچنین افزایش غلظت عصاره تا حدی به علت بوی گیاهی، باعث افزایش امتیاز حسی شد ولیامتیاز بافتی به علت کاهش تمامیت و استحکامبه طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) کاهش پیدا کرد. همانطور که مشخص شد سوسیس حاوی عصاره ترکیبی ppm ۵۰۰ با وجود اینکه دارای امتیاز بوی پائین‌تری نسبت به سایر نمونه‌های سوسیس بود ولی به علت ویژگی‌های رنگی و بافتی مناسب و بازار پسندی بالابه عنوان بهترین غلظت عصاره انتخاب شد وسوسیس‌های فرانکفورتر فراسودمند حاوی ترکیبات ضدمیکروبی نایسین، کیتوزان و اپسیلون پلی لیزین با غلظت عصاره ppm ۵۰۰ تولید و در مدت زمان نگهداری ٤۵ روز مورد ارزیابی قرار گرفتند.

1. Plate Count Agar
2. Sulfite Polymyxin Sulfadiazine Agar
3. Violet Red Bile Agar
4. Peptone Water Agar
5. Tetrathionate Broth Base
6. Rappaport-Vassiliadis Salmonella Enrichment Broth
7. Salmonella Shigella Agar
8. Brilliant Green Agar
9. Baird Parker Agar
10. Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar
11. Repeated Measurement
12. Least Square Means

Table 2 Sensory properties of frankfurter sausages containing a mixture of green tea,stinging nettle and olive leaves extract.

Mixed extracts (ppm)	Properties*		
	Color	Odor	Texture
250	4.33 ± 0.26^{b}	4.00 ± 0.25^{c}	4.33 ± 0.35^{b}
500	5.00 ± 0.23^{a}	4.33 ± 0.33^{b}	5.00 ± 0.42^{a}
1000	3.33 ± 0.27^{c}	4.66 ± 0.36^{a}	3.66 ± 0.36^{c}

* Scores were based on score 5.

a-c Characteristics within each column with different letters differ significantly ($P< 0.05$).

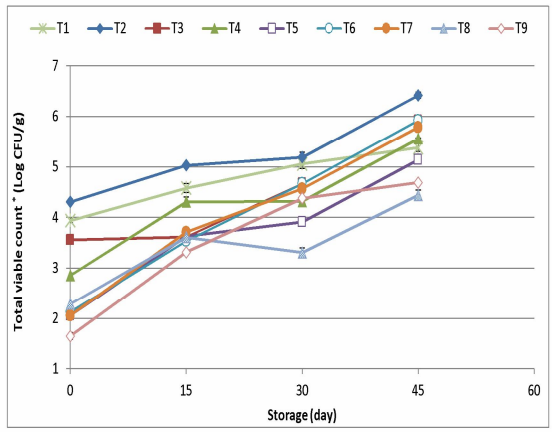

Fig 1 Effect of nisin, ε-polylysine and chitosan on total viable count of frankfurter sausages during storage.
T1: 120 ppm sodium nitrite; T2: Without preservative; T3: 200 ppm nisin; T4: 0.5% chitosan; T5: 0.2% ε-polylysine; T6: 200 ppm nisin + 0.5% chitosan; T7: 200 ppm nisin + 0.2% ε-polylysine; T8: 0.5% chitosan + 0.2% ε-polylysine; T9: 200 ppm nisin + 0.5% chitosan + 0.2% ε-polylysine.
* Mean of three determinations and CV is less than 2%.

شکل ۲ نتایج حاصل از تغییرات شمارش باکتری‌های کل سوسیس‌های فرانکفورتر فراسودمند بدون نیتریت در مدت زمان نگهداری ٤٥ را نشان می‌دهد. در طی مدت زمان نگهداری شمارش کل باکتری‌ها در تمامی نمونه‌های سوسیس به طور معنی‌داری ($P<$۰/۰۵) افزایش پیدا کرد که بیشترین میزان افزایش مربوط به تیمار ۲ بود. در انتهای مدت زمان نگهداری سوسیس فرانکفورترفراسودمند حاوی کیتوزان و اپسیلون پلی لیزین (تیمار ۸) به طور معنی داری ($P<$۰/۰۵)دارای کمترین شمارش باکتری‌های کل (٤/٤ LogCFU/g) بود. هیراکی [۲۹] و پاندی و کومار [۳۰] نشان دادند که اپسیلون پلی لیزین دارای خاصیت ضدمیکروبی قوی روی باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی، کپک‌ها و مخمرها هست. بطوری اثرات ضد میکروبی آن را می‌توان در تیمارهای ۹، ۸ و ۵ بوضوح مشاهده کرد. همچنین رولر و همکاران [۳۱] طی تحقیقی با بررسی ترکیبی کیتوزان، کارنوسین و سولفیدها برای افزایش زمان ماندگاری سوسیس‌های گوشت خوک به این نتیجه رسیدند که کاربرد ۰/٦٪ کیتوزان به همراه ۱۷۰ ppm سولفید رشد باکتری‌های عامل فساد را تا ٤ لگاریتم کاهش می‌دهد.

با مقایسه شمارش باکتری کل تیمار ۳ با ٤ و ۷ با ۸ به این نتیجه می‌توان رسید که اثرات ضدمیکروبی کیتوزان در مقایسه با نایسین در نمونه‌های سوسیس نگهداری شده در دمای یخچال در مدت زمان نگهداری ٤٥ روز به طور معنی داری ($P<$۰/۰۵) بیشتر بود (شکل ۱).

بر اساس نتایج یوشیهیکو و همکاران [۳۲] و ون هوسدن و همکاران [۳۳] مشخص شد که برخلاف نایسین که فقط روی باکتری‌های گرم مثبت تاثیر دارد، کیتوزان دارای محدوده ضدمیکروبی بالاتری بوده و باعث کاهش شمارش کل باکتری‌ها می‌شود که با نتایج تحقیق اخیر مطابقت داشت. یوسته و همکاران [۳٤]، آکسو و کایا [۳۵]، هامپیکیان و اگور [۲٤]، انگوین و همکاران [۳٦]، اکونومو و همکاران [۳۷]، لیوو همکاران [۳۸]، ارکولینی و همکاران [۳۹]، اسکندری و همکاران [٤۰] وخواجه

علی و همکاران [٤١] پژوهش‌هایی درباره استفاده از نایسین و سایر ترکیبات ضدمیکروبی در گوشت و فراورده‌های گوشتی انجام داده‌اند که با نتایج این تحقیق سازگاری داشت.یکی از دلایل کیفیت بالای میکروبی تیمارهای ۵، ۸ و ۹ را می‌توان به عصاره‌های برگ چای سبز، گزنه و زیتون نسبت داد که اثرات ضدمیکروبی آنها در گزارش‌های چوی و همکاران [٤٢] در مورد سوسیس گوشت خوک، آکسو و کایا [۳۵] در مورد سوسیس تخمیری ترکیه‌ای (سوجوک) و بیسیگنانوو همکاران[٤٣] ذکر شده است. جدول ۳ تغییرات شمارش باکتری‌های *کلستریدیوم پرفرنجنس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و کلیفرم را در مدت زمان نگهداری ٤٥ روز نشان می‌دهد.

Table 3 Microbiological characteristics of frankfurter sausages during storage (CFU/g).

icroorganisms	Treatments	Storage (days)			
		1	15	30	45
Clostridium perfringens	T1	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$
	T2	$< 10^{c}$	10 ± 0.82^{b}	10 ± 0.37^{b}	20 ± 0.28^{a}
	T3	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$
	T4	$< 10^{b}$	$< 10^{b}$	$< 10^{b}$	10 ± 0.25^{a}
	T5	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$
	T6	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$
	T7	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$
	T8	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$
	T9	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$
Staphylococcus aureus	T1	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$
	T2	$< 10^{a}$	09 ± 0.87^{c}	20 ± 1.13^{b}	32 ± 0.91^{a}
	T3	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$
	T4	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$
	T5	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$
	T6	$< 10^{c}$	$< 10^{c}$	10 ± 0.74^{b}	20 ± 0.90^{a}
	T7	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$
	T8	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$
	T9	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$
Coliform	T1	$< 10^{b}$	$< 10^{b}$	$< 10^{b}$	20 ± 1.23^{a}
	T2	$< 10^{a}$	04 ± 0.57^{c}	26 ± 1.19^{b}	43 ± 1.24^{a}
	T3	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	10 ± 1.37^{b}	30 ± 1.04^{a}
	T4	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$
	T5	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$
	T6	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$
	T7	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$
	T8	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$
	T9	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$	$< 10^{a}$

[a-c] Characteristics within each row with different letters differ significantly ($P< 0.05$).
T1: 120 ppm sodium nitrite; T2: Without preservative; T3: 200 ppm nisin; T4: 0.5% chitosan; T5: 0.2% ε-polylysine; T6: 200 ppm nisin + 0.5% chitosan; T7: 200 ppm nisin + 0.2% ε-polylysine; T8: 0.5% chitosan + 0.2% ε-polylysine; T9: 200 ppm nisin + 0.5% chitosan + 0.2% ε-polylysine.

در بین تیمارهای مختلف سوسیس فرانکفورتر فراسودمند فقط در نمونه‌های ۲ (حاوی عصاره ترکیبی) و ٤ (حاوی کیتوزان)، *کلستریدیوم پرفرنجنس* مشاهده شد و سایر تیمارها عاری از این باکتری بودند (جدول ۳) که بر اساس استاندارد به صورت کمتر از ۱۰ گزارش شد.بطوری که تیمار ۲ چون دارای هیچ ترکیب ضدمیکروبی نبود و به طور معنی داری ($P<۰/۰۵$) دارای بیشترین شمارشباکتری *کلستریدیوم پرفرنجنس* بود. کلستریدیاها باکتری‌هایی هستند که در محیط اطراف و فلور روده‌ای انسان و حیوان وجود دارد [٤٤]. این باکتری‌ها مقاومت متفاوتی در برابر عوامل محیطی نامطلوب دارند. با وجود این ثابت شده است کهاسپورهای *کلستریدیوم پرفرنجنس* و سایر کلستریدیوم‌های کاهنده سولفیت‌ها می‌توانند در برابر میزان نمک بالای سوسیس‌ها باقی بمانند [٤٤ و ٤٥] و فرایندهای بعدی تولید سوسیس مانند پاستوریزاسیون و افزایش فعالیت آبی باعث فعال شدن دوباره آنها

و خطرات سلامتی مصرف کننده می‌شود [٤٦ و ٤٧].بنابراین غیرفعال سازی این باکتری با استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی خیلی حائز اهمیت می‌باشد. لیو و همکاران [٣٨] با بررسی تاثیر برنج آنکا[1]که قبلا با کپک *موناسکوس پورپوروس*[2] تلقیح شده بود در تولید سوسیس چینی با نیتریت پائین به این نتیجه رسیدند که شمارش باکتری‌های غیرهوازی شامل *کلستریدیوم پرفرنجنس*به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد. گزارش مشابهی درباره جایگزینی بخشی از نیتریت سوسیس با رنگدانه آناتو و کاهش شمارش *کلستریدیوم پرفرنجنس* وجود دارد [٤٨].

استافیلوکوکوس اورئوس باکتری بیماری‌زایی است که رشد آن در سوسیس به علت تولید انتروتوکسین موجب به خطر افتادن سلامت مصرف کنندگان می‌شود. انتروتوکسین‌ها به حرارت مقاوم بوده و سوسیس محیط مناسبی برای رشد این باکتری می‌باشد[٣]. بنابراین جلوگیری از رشد آن حائز اهمیت بوده و در این ارتباط استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی خیلی مطلوب می‌باشد. بر اساس نتایج جدول ٣ در هیچکدام از تیمارها به جز تیمار ٢ (بدون ترکیب نگهدارنده) و تیمار ٦ (حاوی ترکیبات نایسین و کیتوزان) در طول مدت زمان نگهداری ٤٥ روز هیچ باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده نشد که بر اساس استاندارد به صورت کمتر از ١٠ گزارش شد. در تیمار ٢ تقریبا در کل زمان نگهداری و در تیمار ٦ در روزهای ٣٠ و ٤٥ باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*گزارش شد که به طور معنی داری ($P<$٠/٠٥) در حال افزایش بود. دلیل وجود این باکتری در تیمار ٦ برخلاف تیمارهایی که از ترکیبات نایسین (٣) و کیتوزان (٤) تنها استفاده شده بود احتمالا مربوط به اثرات آنتاگونیستیترکیبات ضدمیکروبی می‌باشد [٤٩]. بطوری که گزارش شده است استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی نایسین، کیتوزان و لیزوزیم دارای اثرات مختلفی به صورت جداگانه و ترکیبی در چیغ کوفته (نوعی محصول گوشتی حاصل از گوشت قرمز خام در ترکیه) تولیدی بوده و کیفیت میکروبیولوژیکی متفاوتی در مدت زمان نگهداری نشان دادند و مشخص شد که١٠٠ ppm نایسین دارای اثرات ضدمیکروبی بیشتری روی *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به ترکیب ١٠٠ ppm نایسین و ٣٠٠ ppm لیزوزیم داشت. نتایج این پژوهش با گزارش‌های اسکانل و همکاران [٥٠] و هامپیکیان [٥١] در مورد کاربرد نایسین در سوسیس‌های تخمیری مطابقت داشت.

کلیفرم‌ها باکتری‌هایی هستند که فلور طبیعی روده را تشکیل می‌دهند. بعضی از آن‌ها مانند برخی از سویه‌های اشریشیاکلی مضر بوده و بیماریزا می‌باشند. کلیفرم‌ها به عنوان شاخص بهداشتی برای برخی از مواد غذایی محسوب می‌شوند. جمعیت این باکتری‌ها در گوشت و فراورده‌های گوشتی نشانی از کیفیت و نحوه تهیه محصول می‌باشد. به ویژه در مورد سوسیس و کالباس که دارای ترکیبات اولیه و فرایندهای مختلف تولید می‌باشد [٥٢]. نتایج خاصل از آنالیز واریانس و مقایسه میانگین نشان داد که تعداد کلیفرم‌ها در تیمارهای ١، ٢ و ٣ در طول زمان افزایش پیدا کرد. در انتهای مدت زمان نگهداری ٤٥ روز تیمار ٢ دارای بیشترین شمارش باکتری‌های کلیفرم (Log ١/٦٣CFU/g) بود.در سایر تیمارهای شمارش این باکتری‌های در حد زیر ١٠ (کمتر از Log CFU/g ١) بود که نشان دهنده کیفیت مواد اولیه مخصوصا گوشت قرمز و شرایط بهداشتی فرایند تولید سوسیس می‌باشد.همچنین استفاده از عصاره‌های چای سبز، گزنه، زیتون و ترکیبات ضدمیکروبی از مهمترین عوامل کاهش تعداد کلیفرم‌ها هستند[٥٣].فیلیمون و همکاران [٥٢] نشان دادند که در بین محصولات گوشتی سوسیس‌های تهیه شده از ترکیب گوشت مرغ و گوشت قرمز دارای کمترین میزان باکتری‌های کلیفرم هستند. نتایج این تحقیق با گزارش بارتولومئو و همکاران [٥٤] سوسیس بولوگنا دود داده شده و بهات و همکاران [٥٥] در کوتلت جوجه سازگاری بالایی داشت.

نتایج شمارش باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *سالمونلا*نشان داد که در هیچ یک از نمونه‌های سوسیس فراسودمند این باکتری‌های بیماری‌زا شناسایی نشد. آلودگی‌های ناشی از این باکتری‌ها در سوسیس عمدتا مربوط به لاشه حیوان (گاو و مرغ) در کشتارگاه‌ها و شرایط نگهداری در دمای سردخانه است ولی چنانچه هنگام ذبح اصول بهداشتی رعایت شود شمارش این باکتری‌ها می‌تواند کاهش پیدا بکند[٥٦]. عدم وجود باکتری‌های *اشریشیا کلی* و سالمونلا در پژوهش اخیر می‌تواند مربوط به کیفیت کشتار، فرایند تولید، عصاره‌های گیاهی و ترکیبات ضدمیکروبی باشد.

1. Anka rice
2. Monascus purpureus

شکل ۲ تغییرات شمارش کپک‌ها و مخمرها سوسیس‌های فرانکفورتر فراسودمند بدون نیتریت را در مدت زمان نگهداری نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که در طول مدت زمان نگهداری تعداد کپک‌ها و مخمرها به طور معنی داری ($P<۰/۰۵$) افزایش پیدا کرد. شمارش کپک‌ها و مخمرها در طی مدت زمان نگهداری بسته به فرمولاسیون محصول، فرایند تولید و شرایط نگهداری مانند دما و نوع بسته‌بندی می‌تواند متفاوت باشد. بیشترین میزان افزایش شمارش کپک‌ها و مخمرها مربوط به نمونه‌های ۲ (Log CFU/g ۳/۴۲)و ٦ (Log CFU/g ۳/۱۱) بود. مطابق شکل ۲ مشخص شد که تیمار حاویppm ۱۲۰ نیتریت دارای شمارش کپک و مخمر یکسانی با تیمار حاوی ۰/۵٪ کیتوزان داشت. نمونه ۷ دارای شمارش کپک و مخمر به مراتب پائین‌تری نسبت به تیمار حاوی ppm ۱۲۰ نیتریت سدیم بود. همچنین در تیمارهای ۸ و ۹ هیچ کلنی کپک و مخمر در طول زمان نگهداری یافت نشد. نتایج نشان داد که ۰/۵ ٪کیتوزان و ۰/۲ ٪اپسیلون پلی لیزین دارای قدرت بالاتری از ppm ۱۲۰ نیتریت سدیم در کاهش شمارش کپک‌ها و مخمرها داشتند. به طوری کهاین نتایج در گزارش المالی [٤٩] هم نمود پیدا کرد. بطوری که تیمارهای چیغ کوفته حاوی ترکیبی از نایسین کیتوزان و لیزوزیم دارای شمارش کپک و مخمر پائین‌تری نسبت به نمونه کنترل بودند ولی تیمار کالباس حاوی نایسین (ppm ۳۰) شمارش کپک و مخمر بیشتری از کالباس حاوی نیتریت سدیم (ppm ۱۲۰) داشت که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت [٤١]. لیو و همکاران [۳۸]، المالی و همکاران [٤٩] و بهات و همکاران [٥٥] به نتایج مشابهی درباره کاربرد ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی در گوشت و محصولات گوشتی دست یافته‌اند. در حالی که اسکندری و همکاران [٤٠] با استفاده از رنگدانه‌های کوچنیل و پاپریکا به همراه ppm ٤٠ نیتریت سدیم به ویژگی‌های میکروبی قابل مقایسه با سوسیس فرانکفورتر کنترل رسیدند.

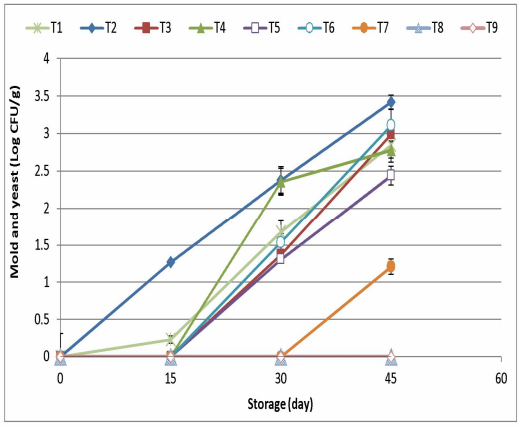

Fig 2 Effect of nisin, ε-polylysine and chitosan on mold and yeast count of frankfurter sausages during storage.
T1: 120 ppm sodium nitrite; T2: Without preservative; T3: 200 ppm nisin; T4: 0.5% chitosan; T5: 0.2% ε-polylysine; T6: 200 ppm nisin + 0.5% chitosan; T7: 200 ppm nisin + 0.2% ε-polylysine; T8: 0.5% chitosan + 0.2% ε-polylysine; T9: 200 ppm nisin + 0.5% chitosan + 0.2% ε-polylysine.
* Mean of three determinations and CV is less than 1%.

شکل ۳ نتایج حاصل از ارزیابی‌هایی حسی سوسیس‌های فرانکفورتر فراسودمند غنی شده با عصاره‌های برگ چای سبز، گزنه و زیتون بدون استفاده از نیتریت سدیم را نشان می‌دهد. با توجه به اینکه در تیمارهای ۱، ۲، ۳، ٤ و ٦ باکتری‌های بیماری‌زای *کلستریدیوم پرفرنجنس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و کلیفرم‌ها مشاهده شدند، بنابراین ارزیابی‌های حسی در انتهای مدت زمان نگهداری فقط روی تیمارهای ٥، ۷، ۸ و ۹ انجام گرفت.نتایج آنالیز واریانس و مقایسه میانگین ارزیابی‌های حسی نشان داد که بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی داری ($P<۰/۰۵$) وجود داشت. بهترین تیمار از لحاظ رنگ، عطر و طعم مربوط به نمونه ۹، بیشترین امتیاز بوی تازگی مربوط به نمونه‌های ۸ و ۹، بیشترین استحکام از لحاظ بافتی مربوط به تیمار ۸ و در نهایت بالاترین امتیاز مقبولیت کلی مربوط به تیمار ۹ بود. با توجه به اینکه کیتوزان دارای ویژگی تثبیت رنگ می‌باشد [٥٧] احتمالا به همین دلیل تیمارهای ۸ و ۹ دارای امتیاز رنگ بالاتری نسبت نمونه‌های دیگر هستند. از لحاظ عطر، طعم و بوی نمونه‌های سوسیس ۲ عامل می‌تواند موثر باشد. اولی مربوط به ترکیبات ضدمیکروبی که از رشد میکروب‌های جلوگیری کرده

و باعث کاهش پروتئولیز پروتئین‌ها و هیدرولیز چربی‌ها شده و در نهایت از ایجاد تعفن و رنسیدیتی جلوگیری می‌کنند.

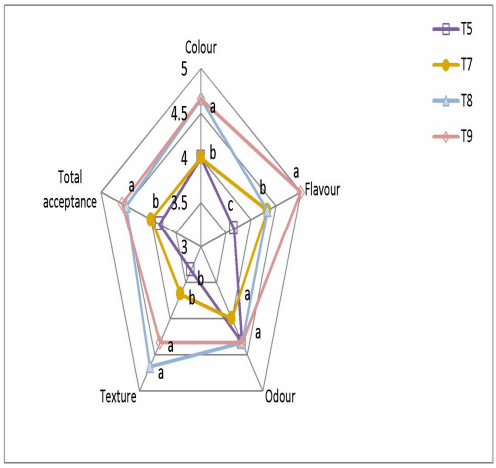

Fig 3 Sensory properties of frankfurter sausages containing nisin, ε-polylysine and chitosan at the 45 storage.
T5: 0.2% ε-polylysine; T7: 200 ppm nisin + 0.2% ε-polylysine; T8: 0.5% chitosan + 0.2% ε-polylysine; T9: 200 ppm nisin + 0.5% chitosan + 0.2% ε-polylysine.
* Mean of three determinations and CV is less than 1%.

دلیل این پدیده در تیمار ۵ و ۷ به وضح دیده شد که به علت شمارش کلی و کپک و مخمر بالا دارای امتیاز عطر، طعم و بوی معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) پائین‌تری بودند. دومی وجود عصاره‌های برگ چای سبز، گزنه و زیتون می‌باشد که در تمامی تیمارها با اعمال اثرات آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی باعث بهبود عطر، طعم و بو شده‌اند. از سوی دیگر استفاده از عصاره‌های گیاهی باعث ایجاد نوعی عطر، طعم و بوی خاص گیاهی ملایم در نمونه‌های سوسیس شده بود که در نهایت به مشتری پسندی محصول کمک کرد. نتایج حاکی از آن بود که تیمارهای حاوی کیتوزان دارای سفتی و استحکام بیشتری در مقایسه با نمونه‌های دیگر بودند. کیتوزان در pH کمتر از ٦ به صورت پلی کاتیونیک می‌باشد و به سهولت با ترکیبات دارای بارمنفی مثل پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدهای آنیونی، اسیدهای چرب و فسفولیپیدها واکنش می‌دهد، این مسأله می‌تواند ساختار و بافت و خواص رئولوژیکسوسیس و سایر محصولاتی را کهکیتوزان در تولید آنها به کار می‌رود، تحت تأثیر قراردهد[۵۸].بر اساس شکل ۳ مشخص شد که تیمارهای ۸ و ۹ مقبولیت کلی بالاتری نسبت به سایر نمونه‌ها داشتند که کیفیت بالای این نمونه‌ها موید این مطلب می‌باشد.

٤- نتیجه گیری

با توجه به تقاضای زیاد برای مصرف فراورده‌های گوشتی و وجود مشکلات سلامتی استفاده از نیتریت سدیم در فرمولاسیون این محصولات، امروزه ارائه راه‌حل‌های کاربردی برای تولید محصولات گوشتی سالم و با ارزش تغذیه‌ای بالا از اهمیت خاصی برخوردار است. عصاره‌های گیاهی به علت برخورداری از ویژگی‌های تغذیه‌ای، دارویی و کاربردی شامل اثرات آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی از اهمیت ویژه‌ای در تغییر فرمولاسیون محصولات گوشتی برخوردار هستند. از سوی دیگر استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی نایسین، کیتوزان و اپسیلون پلی لیزین که می‌توانند جایگزین مناسبی برای نیتریت سدیم سرطان‌زا در محصولات گوشتی باشند و همچنین دارای تائیدیه مجاز بودن از FDA هستند چشم انداز خوبی برای سلامت جامعه بوده و می‌توانند صنعت گوشت و فراورده‌های گوشتی را متحول سازند.

٥- منابع

[1] Beriain M.J., Chasco J., & Lizaso, G. (2000). Relationship between biochemical and sensory quality characteristics of different commercial brands of salchichon. Food Control, 11, 231–237.
[2] Binti Azham, N.A. (2011). Physicochemical and sensory characteristics of vegetarian sausage. B.Sc Dissertation, Universiti Teknologi MARA. Malaysia.
[3] Morgen, N. (2011). Fermented sausage, B.Sc Dissertation, B.Sc Dissertation, Swedish University of Agricultural Science. Sweden.
[4] Adams, M.R., & Moss, M.O. (2000). The microbiology of food preservation. In: Adams MR, Moss MO, editors. Food microbiology. 2 Ed. Royal Society of Chemistry. Pp. 110–114.
[5] Sebranek, G.J., & Bacus, J.N. (2007). Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues?. Meat Science, 77, 136–147.

[6] Honikel, K.O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. Meat Science, 78, 68–76.
[7] Sebranek, J.G. (2009). Basic curing ingredients. Pages 1–24 in Ingredients in Meat Products. R. Tarte, ed. Springer Science+Business Media LLC, New York, NY.
[8] Jimenez Colmenero, F. (2000). Relevant factors in strategies for fat reduction in meat products. Trends in Food Science and Technology, 11, 56–66.
[9] Ozel, M.Z., Gogus, F., Yagci, S., Hamilton, J.F., & Lewis, A.C. (2010). Determination of volatile nitrosamines in various meat products using comprehensive gas chromatography–nitrogen chemiluminescence detection. Food and Chemical Toxicology, 48, 3268–3273.
[10] Pierson, M.D., & Smooth, L.A. (1982). Nitrite, nitrite alternatives, and the control of *Clostridium botulinum* in cured meats. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 17, 141–187.
[11] Coughlin, J.R. (2006). Update on international agency for research on cancer monograph on ingested nitrite and nitrate. In Proceedings of the meat industry research conference. Accessed 3/7/09. October 4-5, Hollywood, FL.
[12] Pegg, R.B., & Shahidi, F. (2000). Nitrite curing of meat: the n-nitrosamine problem and nitrite alternatives. Trumbull, Conn.: Food & Nutrition Press.
[13] Yilmaz. M.T., & Zorba, O. (2010). Response surface methodology study on the possibility of nitrite reduction by glucono-δ-lactone and ascorbic acid in turkish-type fermented sausage. Journal of Muscle Foods, 21, 15-30.
[14] Kurt, S., & Zorba, O. (2011). Proximate composition of dry fermented Turkish sausage (Sucuk) as affected by ripening period, nitrite level and heat treatment. International Journal of Food Engineering, 7(1), 17-28.
[15] Hospital, X.F., Hierro, E., & Fernández, M. (2012). Survival of *Listeria innocua* in dry fermented sausages and changes in the typical microbiota and volatile profile as affected by the concentration of nitrate and nitrite. International Journal of Food Microbiology, 153, 395–401.
[16] Weisburger, J.H., Veliath, E., Larios, E., Pittman, B., Zang, E., & Hara, Y. (2002). Tea polyphenols inhibit the formation of mutagens during the cooking of meat. Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 516, 19-22.
[17] Lee, J.Y., Hwang, W.I., & Lim, S.T. (2004). Antioxidant and anticancer activities of organic extracts from Platycodon grandifloruma a. De Candollr roots. Journal of Ethnopharmacology, 93, 409-415.
[18] Zhong, Z., Xing, R., Liu, S., Wang, L., Cai, S., & Li, P. (2008). Synthesis of acyl thiourea derivatives of chitosan and their antimicrobial activities in vitro. Carbohydrate Research, 343, 566-570.
[19] Gorzalczany, S., Marrassini, C., Mino, J., Acevedo, C., & Ferraro, G. (2011). Antinociceptive activity of ethanolic extract and isolated compounds of Urtica circularis. Journal of Ethnopharmacology, 134, 733–738.
[20] Tang, S., Kerry, J.P., Sheehan, D., Buckley, D.J., & Morrissey, P.A. (2001). Antioxidative effect of added tea catechins on susceptibility of cooked red meat, poultry and fish patties to lipid oxidation. Food Research International, 34, 651–657.
[21] Yener, Z., Celik, I., Ilhan, F., & Bal, R. (2009). Effects of *Urtica dioica* L. seed on lipid peroxidation, antioxidants and liver pathology in aflatoxin-induced tissue injury in rats. Food and Chemical Toxicology, 47, 418–424.
[22] Alp, E., & Aksu, M.I. (2010). Effects of water extract of *Urtica dioica* L. and modified atmosphere packaging on the shelf life of ground beef. Meat Science, 86, 468–473.
[23] Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad, F., & Hafezi, S. (2008). Antioxidant activities of Iranian corn silk. Turkish Journal of Biology, 32, 43-49.
[24] Hampikyan, H., & Ugur, M. (2007). The effect of nisin on *L.monocytogenes* in Turkish fermented sausages (sucuks). Meat Science, 76, 327–332.
[25] Serrano, R., & Bañón, S. (2012). Reducing SO_2 in fresh pork burgers by adding chitosan. Meat Science, 92, 651–658.
[26] Vasilatos, G.C., & Savvaidis, I.N. (2013). Chitosan or rosemary oil treatments, singly or combined to increase turkey meat shelf-life.

International Journal of Food Microbiology, 166, 54–58.
[27] FDA. (2013). Bacteriological analytical manual for foods. Washington, USA: US Government Printing Office.
[28] Siripatrawan, U., & Noipha, S. (2012). Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. Food Hydrocolloids, 27, 102-108.
[29] Hiraki, J. (2000). ε-Polylysine, its development and utilization. Food Chemistry, 29, 18–25.
[30] Pandey, A.K., & Kumar, A. (2014). Improved microbial biosynthesis strategies and multifarious applications of the natural biopolymer epsilon-poly-l-lysine. Process Biochemistry, 49, 496–505.
[31] Roller, S., Sagoo, S., Board, R., O'Mahony, T., Caplice, E., Fitzgerald, G., Fogden, M., Owen, M., & Fletcherc, H. (2002). Novel combinations of chitosan, carnocin and sulphite for the preservation of chilled pork sausages. Meat Science, 62, 165–177.
[32] 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.
[33] Van Heusden, H.E., Knuijff, B., & Breukin, E. (2002). Lipid II induce a transmembrance orientation of the pore-forming peptide antibiotic nisin. Biochemistry, 41, 12171-12178.
[34] Yuste, J., Pla, R., Capellas, M., & Mor-Mur, M. (2002). Application of high-pressure processing and nisin to mechanically recovered poultry meat for microbial decontamination. Food Control, 13, 451–455.
[35] Aksu, M.I., & Kaya, M. (2004). Effect of usage *Urtica dioica* L. on microbial properties of sucuk a Turkish dry-fermented sausage. Food Control, 15, 591–595.
[36] Nguyen, V.T., Gidley, M.J., & Dykes, G.A. (2008). Potential of a nisin-containing bacterial cellulose film to inhibit *Listeria monocytogenes* on processed meats. Food Microbiology, 25, 471–478.
[37] Economou, T., Pournis, N., Ntzimani, A., & Savvaidis, I.N. (2009). Nisin–EDTA treatments and modified atmosphere packaging to increase fresh chicken meat shelf-life. Food Chemistry, 114, 1470–1476.
[38] Liu, D.C., Wu, S.W., & Tan, F.J. (2010). Effects of addition of anka rice on the qualities of low-nitrite Chinese sausages. Food Chemistry, 118, 245–250.
[39] Ercolini, D., Ferrocino, I., Storia, A.L., Mauriello, G., Gigli, S., Masi, P., & Villani, F. (2010). Development of spoilage microbiota in beef stored in nisin activated packaging. Food Microbiology, 27, 137–143.
[40] Eskandari1, M.H., Hosseinpour, S., Mesbahi, Gh., & Shekarforoush, Sh. (2013). New composite nitrite free and low-nitrite meat-curing systems using natural colorants. Food Science & Nutrition, 1(5), 392-401.
[41] Khajeh-Ali, A., Shekarforoush, S.Sh., Hoseinkhan-Nazer, A., & Najafzadeh-Varzi, H. (2012). Effect of nisin on microbiological, chemical and sensory properties of vacuum packed emulsion sausage. Iranian Journal of Veterinary Research, 8, 17-26.
[42] Choi, S.H., Kwon, H.C., An, D.J., Park, J.R., & Oh, D.H. (2003). Nitrite contents and storage properties of sausage added with green tea powder. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 23, 299−308.
[43] Bisignano G., Tomaino A., Lo Cascio R., Crisa W.G., Uccella N., & Saija, A. (1995). On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropin and hydroxytyrosol. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 51, 971-974.
[44] Wijnker, J.J., Koop, G., & Lipman, L.J.A. (2006). Antimicrobial properties of salt (NaCl) used for the preservation of natural casings. Food Microbiology, 23, 657-662.
[45] 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, 221-225.
[46] Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., & Tauxe, R.V. (1999). Food-related illness and death in the United States. Emerging Infectious Diseases, 5, 607-625.
[47] Zaika, L.L. (2003). Influence of NaCl content and cooling rate on outgrowth of *Clostridium perfringens* spores in cooked ham

[53] Banon, S., Dıaz, P., Rodrıguez, M., Dolores Garrido, M., & Price, A. (2007). Ascorbate, green tea and grape seed extracts increase the shelf life of low sulphite beef patties. Meat Science, 77, 626–633.
[54] Bartolomeu, D.A.F.S., Waszczynskyj, N., Kirschnik, P.G., Dallabona, B.R., da Costa, F.J.O.G., & Leivas, C.L. (2014). Storage of vacuum-packaged smoked bologna sausage prepared from Nile tilapia. Acta Scientiarum. Technology, 36, 561-567.
[55] Bhat, A.A., Ahmed, A., Dar, M.A. Achir, A., & Pagrut, N. (2015). Effect of different levels of nisin on the microbial quality of chicken cutlets. Journal of Livestock Science, 6, 47-51.
[56] Karimi, M.A., Mehrabian, S., Rafiei Tabatabaei, R., & Samiei, B. (2009). A study on Microbial Properties of Mechanically Deboned Chicken Meat in Meat Plan of Tehran. Food Technology & Nutrition, 7, 52-59.
[57] Rinaudo, A., & Grenoble, F. (1992) Structure of chitin and chitosan. In chitin chemistry, (Goorge,A. Ed), The Macmilan press LTD. London, UK., Pp.1-35.
[58] Kumar, M. N. (2000). A review of chitin and chitosan applications. Reactive and Functional Polymers, 46, 1-2.
and beef. Journal of Food Protection, 66, 1599-1603.
[48] Zarringhalami, S., Sahari, M.A., & Hamidi-Esfehani, Z. (2009). Partial replacement of nitrite by annatto as a colour additive in sausage. Meat Science, 81, 281-284.
[49] Elmali, M. (2014). Effects of Different concentration of nisin, lysozyme, and chitosan on the changes of microorganism profile in produced Çiğ Köfte (Turkish traditional meat product; Raw Meatball) during the production stage. MANAS Journal of Engineering, 2, 30-45.
[50] Scannell, A.G.M., Hill, C., Buckley, D.J., & Arendt, E.K. (1997). Determination of the in Xuence of organic acids and nisin on shelf-life and microbiological safety aspects of fresh pork. Journal of Applied Microbiology, 83, 407–412.
[51] Hampikyan, H. (2009). Efficacy of nisin against *Staphylococcus aureus* in experimentally contaminated sucuk, a Turkish-type fermented sausage. Journal of Food Protection, 72(8), 1739-1743.
[52] 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.

Evaluation of microbiological and sensory properties of functional frankfurter sausage during storage

Alirezalu, K. [1*], Hesari, J. [2], Eskandari, M. H. [3], Valizadeh, H. [4], Sirousazar, M.[5], Nemati, Z.[6]

1. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tabriz
2. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz
3. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz
4. Professor, Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz
5. Associate Professor, Faculty of Chemical Engineering, Urmia University of Technology, Urmia
6. Assistant Professor, Department of AnimalScience, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tabriz

(Received: 2017/10/27 Accepted:2018/06/17)

At the present study, the effects of 200 ppm nisin, 0.5% chitosan and 0.2% ε-polylysine to produce functional and nitrite free frankfurter type sausage incorporated with mixed green tea (GTE), stinging nettle (SNE) and olive leaves (OLE) extracts were investigated.Frankfurter type sausages containing 500 ppm mixed plant extracts were produced in 9 treatments (T1: 120 ppm sodium nitrite; T2: No antimicrobials; T3: 200 ppm nisin; T4: 0.5% chitosan; T5: 0.2% ε-polylysine; T6: 200 ppm nisin and 0.5% chitosan; T7: 200 ppm nisin and 0.2% ε-polylysine; T8: 0.5% chitosan and 0.2% ε-polylysine; T9: 200 ppm nisin, 0.5% chitosan and 0.2% ε-polylysine) and microbiological and sensory analyses were evaluated on 1, 15, 30, and 45 days during storage. At the end of the storage period, treatment 7 had significantly (P<0.05) the lowest total bacterial count (4.4 log CFU/g). Among different treatments of sausage, in T2 and T4 *Cl. perfringens*, in T6 *S. aureus* and in T1 and in T3 coliform were observed. *E. coli* and *Salmonella* were not detected in all sausage samples. Molds and yeasts count increased significantly (P<0.05) during storage, but in T8 and T9 were not detected.So that sensory results showed that T8 and T9 had a higher overall acceptability than other samples.Based on the results, T9 had the high microbiological quality, sensory properties andextended shelf-life, and can be introduce as a new strategy in meat industry and nitrite free meat products processing.

Keywords: Frankfurter sausage, Functional, Plant extracts, Natural antimicrobials.

[*] Corresponding author: kazem.alirezalu@tabrizu.ac.ir