



استفاده از نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین میکروجلبک هماتوکوکوس با پوشش مالتودکسترین-کازئینات سدیم به عنوان جایگزین نیتريت سدیم در فرمولاسیون سوسیس معمولی و ارزیابی خصوصیات میکروبی و بافتی

محصول

سکینه یگانه<sup>۱\*</sup>، سهیل ریحانی پول<sup>۲</sup>

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

۲- دانش آموخته دکتری تخصصی، گروه فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست،

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۱۲

در تحقیق حاضر پس از استخراج آستاگزانتین از میکروجلبک هماتوکوکوس (*Haematococcus pluvialis*) و نانو ریزپوشانی آن با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات سدیم، نانوکپسول‌های حامل با نسبت‌های مختلف، جایگزین نیتريت سدیم (حد مجاز  $120\text{ mg/kg}$ ) در فرمولاسیون سوسیس معمولی شدند. سپس خصوصیات میکروبی (شمارش باکتری‌های مزوفیل، سرماگرا، انتروباکتریاسه، لاکتیک‌اسید و سودوموناس) و بافتی سوسیس‌های فرموله‌شده طی دوره نگهداری (۲۸ روز در دمای یخچال) مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفتند. نتایج نشان داد تیمارهایی که با نسبت‌های  $1\text{ mg/kg}$  ( $30\text{ mg/kg}$ ) به  $3\text{ mg/kg}$  ( $90\text{ mg/kg}$ ) و  $1\text{ mg/kg}$  ( $60\text{ mg/kg}$ ) به  $1\text{ mg/kg}$  ( $60\text{ mg/kg}$ ) نانوکپسول به نیتريت سدیم فرموله شده بودند (C و D)، در مقایسه با تیمار دارای  $120\text{ mg/kg}$  نیتريت سدیم (A)، کارایی یکسانی از نظر توانایی مهار رشد و تکثیر گروه‌های باکتریایی دارند ( $p > 0.05$ ) و در کل دوره نگهداری، حداقل شمارش باکتری‌ها مربوط به این تیمارها است ( $p < 0.05$ ). تیمار حاوی  $90\text{ mg/kg}$  نانوکپسول و  $30\text{ mg/kg}$  نیتريت سدیم (E) در مهار برخی از گروه‌های باکتریایی تا اواسط دوره نگهداری قابلیت در حد تیمارهای A، C و D داشت ( $p > 0.05$ ). همچنین سطح شمارش در تیمار صرفاً حاوی نانوکپسول ( $120\text{ mg/kg}$ )، (B)، به صورت قابل ملاحظه‌ای کمتر از شاهد بود ( $p < 0.05$ ). نتایج بخش سنجش خصوصیات بافتی تیمارها نشان داد که اثر نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین بر افزایش ظرفیت نگهداری آب سوسیس‌ها و همچنین کاهش افت پخت، سختی، صمغیت، قابلیت جویدن و برش بافت بیشتر از نیتريت سدیم است ( $p < 0.05$ ). شاخص‌های قابلیت ارتجاعی، پیوستگی میان‌بافتی و تخلخل سوسیس‌های فرموله‌شده با نسبت‌های مختلف نانوکپسول و نیتريت سدیم فاقد اختلاف معنی‌دار ( $p > 0.05$ ) و مطلوب‌تر از شاهد بودند ( $p < 0.05$ ). در ادامه مشخص شد که شاخص‌های بافتی تیمارهای فرموله‌شده طی دوره نگهداری (بر خلاف شاهد) تغییر معنی‌داری نداشتند ( $p > 0.05$ ). بنابراین یافته‌ها، نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین پتانسیل بالقوه‌ای برای جایگزینی نیتريت سدیم در فرمولاسیون سوسیس به منظور بهبود خصوصیات میکروبی و بافتی دارند.

کلمات کلیدی:

آستاگزانتین،

نانوکپسول‌های حامل،

مالتودکسترین، نیتريت سدیم،

سوسیس،

خصوصیات میکروبی و بافتی.

DOI: 10.22034/FSCT.19.131.143

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.131.12.3

\* مسئول مکاتبات:

yeganeh@sanru.ac.ir

## ۱- مقدمه

نگرانی مصرف‌کنندگان فراورده‌های گوشتی نظیر سوسیس و کالباس از وجود نگهدارنده‌های تهدیدکننده سلامتی و مضر، متخصصین حوزه صنایع غذایی را واداشته تا همواره به دنبال جایگزین کردن نگهدارنده‌های سنتتیک با انواع طبیعی آن‌ها باشند. فراورده‌های گوشتی مانند غالب مواد غذایی دیگر، به دلیل دارابودن چربی همواره در معرض فساد اکسیداتیو و میکروبی قرار دارند. از این رو استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدان و ضد میکروب در فرمولاسیون آن‌ها امری اجتناب ناپذیر است. نیترات پتاسیم و نیتريت سدیم از جمله نگهدارنده‌هایی هستند که استفاده از آن‌ها در مواد غذایی (بخصوص فراورده‌های گوشتی نظیر سوسیس و کالباس، پنیر و ...) سابقه طولانی دارد. این دو نگهدارنده در فراورده‌های گوشتی به عنوان ضد میکروب (بخصوص علیه باکتری کلاستریدیوم)، تثبیت‌کننده رنگ قرمز گوشت و بهبوددهنده طعم کاربرد دارند [۱]. اما در کنار این مزایا، این نگهدارنده‌ها برای سلامتی انسان بسیار مضر بوده و موجب بروز بیماری‌های سخت می‌گردند. این دو نگهدارنده پس از جذب از طریق گوارش، موجب تبدیل هموگلوبین<sup>۱</sup> به متهموگلوبین<sup>۲</sup> می‌شوند که این نوع از هموگلوبین قابلیت انتقال اکسیژن را ندارد و زمانی که غلظت آن به بیش از ۱۰ درصد هموگلوبین سالم برسد، عوارض آن آشکار خواهد شد. همچنین این ترکیبات ممکن است در معده انسان با ترکیبات قابل نیتروزه شدن (آمین‌های ثانویه یا ثالثیه یا آمیدها) واکنش دهند که ماحصل آن بروز انواع بیماری‌های خطرناکی است که بخش‌های مختلف دستگاه گوارش و تنفس را درگیر خواهد کرد [۲]. به دلیل همین مضرات، باید سعی شود تا حد امکان دوزهای کمتری از نیترات و نیتريت سدیم در فراورده‌های گوشتی استفاده و یا اینکه کلاً یا بخشی از آن‌ها با نگهدارنده‌های طبیعی جایگزین شوند. کمیته تخصصی مشترک سازمان خوار و بار کشاورزی<sup>۳</sup> و سازمان بهداشت جهانی<sup>۴</sup> حد قابل قبول ورودی روزانه نیترات سدیم و نیتريت سدیم به بدن انسان را به ترتیب صفر تا ۰/۵ و صفر تا

۰/۲ درصد وزن بدن تعیین کردند. همچنین حد مجاز استفاده از نیتريت در فراورده‌های گوشتی ppm ۱۲۰ عنوان شده است [۳]. رنگدانه‌های مستخرج از آبزیان به دلیل دارابودن خواص نگهدارندگی (آنتی‌اکسیدان و ضد میکروب) و رنگ‌دهندگی همواره به عنوان جایگزین نگهدارنده‌ها و رنگ‌دهنده‌های سنتتیک مطرح بوده و هستند. یکی از رنگدانه‌هایی که غالباً از میکروجلبک‌ها بخصوص هماتوکوس استخراج می‌شود، آستاگزانتین است [۴]. این رنگدانه که رنگ صورتی تا قرمز دارد، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی می‌باشد که این خواص در تحقیقات گوناگون اثبات شده‌اند [۴ و ۵]. به دلیل همین ویژگی‌ها (رنگی و نگهدارندگی) شاید بتوان از این رنگدانه (به شرط عدم تغییر خواص حسی) در فرمولاسیون سوسیس استفاده کرد. از آنجا که ساختار رنگدانه‌ها ممکن است طی مراحل مختلف تولید مواد غذایی (به دلیل فعالیت‌های آنزیمی، تغییرات دما و pH) دستخوش تغییراتی شوند، لذا استفاده از یک تکنیک جهت حفاظت از ساختار و افزایش کارایی این ترکیبات ضروری به نظر می‌رسد. در چنین مواردی، شاید بهترین روش، نانو ریزپوشانی رنگدانه‌ها باشد. طی این فرایند کپسولی اطراف رنگدانه ایجاد می‌شود که از آن در شرایط نامساعد از تغییرات احتمالی حفاظت می‌کند. امروزه در صنایع غذایی و دارویی، تکنیک نانو ریزپوشانی، موثرترین روش جهت حفاظت از ترکیبات مختلف غذایی و دارویی مانند اسانس‌ها، پپتیدهای زیست‌فعال [۶]، آروما و طعم‌ها و همچنین رنگدانه‌های طبیعی [۷] است. این تکنیک موجب افزایش دوام و بقاء ترکیبات مختلف، عدم تاثیر فاکتورهای محیطی نظیر pH، نور و اکسیژن بر آن‌ها و همچنین کنترل رهایش مواد محصور در دیواره و در نتیجه تاثیر بیشتر بر کیفیت ماده غذایی می‌گردد [۸ و ۹]. در فرآیند نانو ریزپوشانی از ترکیبات مختلفی جهت پوشش یا دیواره استفاده می‌شود. از جمله این ترکیبات می‌توان به نشاسته، کیتوزان، مالتودکسترین، شربت ذرت، دکسترین، ساکارز، کربوکسی‌متیل سلولوز، متیل سلولوز، اتیل سلولوز، نیتروسولوز، استات سلولوز، صمغ عربی، آگار، آلژینات سدیم، کاراگینان، لپوزوم، واکس، پارافین، بیزواکس، دی‌گلیسریدها، مونوگلیسریدها، روغن‌ها، گلوتن، کازئین، آب پنیر، ژلاتین، آلبومین، هموگلوبین، پلی‌پروپیلن و پلی‌وینیل استات اشاره کرد [۸ و ۹].

1. Hemoglobin
2. Methemoglobin
3. FAO
4. WHO

مالتودکسترین از مشتقات نشاسته است و از منابع مختلف نشاسته‌ای مانند سیب زمینی، ذرت و گندم تهیه می‌گردد. این ماده بدلیل حلالیت بالا در آب و عدم داشتن بو و رنگ شاخص، از مهم‌ترین مواد پلی‌ساکاریدی جهت نانو ریزپوشانی کردن مواد محسوب می‌شود [۹]. کازئینات سدیم، نمک سدیم کازئین و شامل عناصر ضروری برای بدن است. این نمک به میزان مطلوبی دارای حلالیت می‌باشد و می‌تواند در یک مخلوط آبی پخش شود [۱۰].

هدف تحقیق حاضر پس از استخراج رنگدانه از میکروجلبک همتوکوکوس با استفاده از روش ترکیبی اسید-استون، نانو ریزپوشانی آن با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات سدیم و استفاده از نانوکپسول‌های حاصل در فرمولاسیون سوسیس معمولی به عنوان جایگزین نیتريت سدیم است. در مراحل بعدی خصوصیات میکروبی و بافتی سوسیس‌های فرموله‌شده با نسبت‌های مختلف نیتريت سدیم و نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین ارزیابی خواهند شد.

## ۲- مواد و روش

### ۲-۱- استخراج، صابونی کردن و خالص سازی

#### آستاگزانتین

روش مورد استفاده جهت استخراج آستاگزانتین، تکنیک ترکیبی اسید-استون (پیش تیمار اولیه با اسیدکلریدریک و سپس استخراج با استون خالص) بود. در این روش، ابتدا نمونه‌ها تحت تأثیر پیش تیمار اولیه اسیدکلریدریک قرار گرفتند و ۱ میلی‌لیتر از اسید ۴ مولار به ۱۰ میلی‌گرم از پودر همتوکوکوس اضافه و مخلوط به مدت ۱ ساعت در دمای ۷۰ درجه بن‌ماری قرار داده شد. پس از خنک‌شدن، سوسپانسیون حاصل به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. بعد از سانتریفوژ، نمونه‌ها دو مرتبه با آب مقطر شستشو و مجدداً سانتریفوژ شدند و در نهایت عمل استخراج بر روی رسوب بدست‌آمده با استفاده از استون انجام گرفت. بدین ترتیب که ابتدا ۴ میلی‌لیتر از استون به رسوب اضافه شد و پس از ۱ ساعت هم‌زدن در دمای اتاق، با استفاده از امواج فراصوت، فرآیند سونیکاسیون به مدت ۱۰ دقیقه

در فرکانس ۲۰ کیلو هرتز انجام گرفت. بعد از این مرحله، استون حاوی مایع رویی، با سانتریفوژ نمونه‌ها در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه جمع‌آوری شد. عمل استخراج مجدداً تکرار گردید. در انتهای آزمایش، حلال‌های استون حاصل از سانتریفوژ چند مرحله‌ای که حاوی رنگدانه آستاگزانتین بودند با هم ترکیب شدند و جهت قرائت غلظت آستاگزانتین با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۷۸ نانومتر مورد استفاده قرار گرفتند [۵، ۱۱ و ۱۲]. در ادامه فرایند، به منظور هیدرولیز یا صابونی کردن آستاگزانتین ابتدا مخلوط حاوی سود ۰/۰۲ نرمال و عصاره حاوی رنگدانه به مدت ۳ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد در مکان تاریک قرار داده شدند [۱۳]. به منظور خالص‌سازی آستاگزانتین مستخرج، ابتدا عصاره هیدرولیزشده حاوی آستاگزانتین، آب مقطر و ان‌هگزان با نسبت ۱:۱:۱ مخلوط شدند و سپس با سانتریفوژ در دور ۴۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه، فرآیند جداسازی رنگدانه انجام گرفت. بعد از سانتریفوژ، فاز هگزان جمع‌آوری شد و فرآیند جداسازی، تا بی‌رنگ شدن کامل این فاز انجام گرفت. حلال آلی هگزان حاصل از سانتریفوژ با هم ترکیب و با استفاده از آب مقطر تا تنظیم pH در محدوده خنثی شستشو داده شد. در انتهای فرآیند، با استفاده از روتاری در دمای اتاق، حلال پراکنی انجام و سوسپانسیون حاوی رنگدانه، تغلیظ و به ۱۰ میلی‌لیتر کاهش داده شد و جهت تزریق به ستون کروماتوگرافی آماده گردید. جهت خالص‌سازی آستاگزانتین از روش کروماتوگرافی ستونی استفاده شد. به این منظور، ستون مورد استفاده با استفاده از سیلیکاژل پر و بعد از تنظیم پارامترهای مختلف شامل flow rate (۰/۶۵ میلی‌لیتر در دقیقه)، فرکانس (۴۷۶ نانومتر)، دمای ستون (۳۰ درجه سانتی‌گراد) و میزان تزریق (۲۰ میکرولیتر) و نوع ستون (PDA)، دستگاه جهت تزریق آماده گردید. ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه تغلیظ‌شده حاوی آستاگزانتین (حاوی یک گرم رنگدانه) جهت تزریق آماده شد. عمل خالص‌سازی در ابتدا با هگزان/استون (نسبت ۷ به ۳ حجمی/حجمی) به مدت ۴۰ دقیقه، سپس با هگزان/دی‌کلرومتان/استون (به نسبت ۵ به ۲/۵ به ۱ حجمی-حجمی) انجام گرفت. مدت زمان انجام عمل خالص‌سازی ۹۰ دقیقه بود. حلال‌های جمع‌آوری در مرحله قبل، با استفاده از دستگاه روتاری خارج شدند و رنگدانه باقیمانده مجدداً در ۱۰۰ میلی‌لیتر استون ترکیب شد. بعد از این مرحله،

## ۲-۳- ارزیابی خواص فیزیکی نانوکپسول‌ها

میانگین سایز ذرات و شاخص توزیع اندازه ذره‌ای پس از رقیق کردن نمونه‌ها به میزان ۱۰ برابر با بافر فسفات نمکی<sup>۱</sup> به روش تفرق نور پویا<sup>۲</sup> با استفاده از دستگاه زتاسایزر (نانوسایزر، ۳۰۰۰، ساخت انگلستان، شرکت Malvern، زاویه ۹۰ درجه و سل مخصوص با عرض ۰/۰۱ متر) اندازه‌گیری شدند. به منظور اندازه‌گیری پتانسیل زتای سطح نانوکپسول‌ها، از دستگاه زتاسایزر استفاده گردید. در این روش نانوکپسول‌ها با استفاده از ۵۰ میلی-مولار بافر فسفات (pH=۷/۴) به میزان ۱۰ برابر رقیق شدند. ارزیابی پتانسیل زتا در زاویه ۱۷۳ درجه سانتی‌گراد و طول موج ۶۳۳ نانومتر هلیوم-تنگستن (در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) انجام شد [۱۷]. بازده فرآیند نانو ریزپوشانی نیز با استفاده از روش یان و همکاران (۲۰۱۴) تعیین گردید [۸].

## ۲-۴- تولید سوسیس

در مجموع ۶ نمونه سوسیس با مقادیر مشخص از نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین و نیتريت سدیم تولید شد (جدول ۱). ترکیبات اصلی سوسیس شامل گوشت سر و گردن گوساله (۶۰ درصد)، آب و یخ (۱۸/۵۱ درصد)، روغن سویا (۱۴ درصد)، نمک (۱/۵ درصد)، نشاسته (۲/۸ درصد)، ایزوله سویا (۱/۸ درصد)، فسفات سدیم (۰/۴ درصد)، آسکوربیک اسید (۰/۰۵ درصد) و ادویه (۰/۹ درصد) بود. تمام مواد مذکور با یکدیگر در کاتر (Seydelmann, Aalen) مخلوط و خمیر حاصله در پیچ‌های جداگانه در کاتر به همراه نیتريت سدیم، نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین و آب و یخ باقیمانده ترکیب شد. در مرحله بعد، پیچ‌ها در بسته‌های استریل پلی‌آمیدی به صورت جداگانه بسته‌بندی و به مدت یک ساعت در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد پخته شدند. نهایتاً محصول تولیدشده بوسیله دوش آب سرد خنک و به یخچال با دمای  $4 \pm 1$  منتقل شد. دوره نگهداری ۲۸ روز بود و نمونه‌گیری جهت انجام آزمایشات میکروبی با فاصله ۷ روز انجام گردید [۱۸].

چند قطره آب مقطر به حلال اضافه گردید و ترکیب بدست‌آمده به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۴ درجه قرار داده شد تا عمل کریستالیزه‌شدن انجام گیرد. رنگ کریستال‌های تشکیل‌شده به رنگ قرمز قهوه‌ای بود. فرآیند فوق مجدداً تکرار و در نهایت نمونه جمع‌آوری‌شده فریز درایر گردید [۱۴-۱۶].

## ۲-۲- نانو ریزپوشانی کردن آستاگزانتین (تولید نانوکپسول‌های حامل)

به منظور نانو ریزپوشانی آستاگزانتین، از پوشش ترکیبی مالتودکسترین و کازئینات سدیم با نسبت ۱:۱ استفاده و نسبت پوشش‌ها به هسته نیز ۴ به ۱ در نظر گرفته شد. ابتدا سوسپانسیون همگنی از مالتودکسترین در آب مقطر (۴ گرم در ۵۰ میلی‌لیتر) تهیه شد. سپس جهت تهیه پوشش دوم، سوسپانسیونی از کازئینات سدیم در آب مقطر تهیه (۴ گرم در ۵۰ میلی‌لیتر) ایجاد و با قراردادن بر روی همزن مغناطیسی و دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۳۰ دقیقه، سوسپانسیون همگنی از آن حاصل شد. محلول حاوی کازئینات سدیم (پس از کاهش دما به ۲۵ درجه سانتی‌گراد) به محلول دارای مالتودکسترین اضافه و ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جهت افزایش جذب آب نگهداری گردید. در مرحله انتهایی، ۲ گرم آستاگزانتین به محلول حاوی پوشش‌ها اضافه و پس از حل شدن آن، جهت تولید نانوکپسول، از دستگاه اولتراسوند (Hilscher, UP200، آلمان) با طول موج ۴۰ کیلوهرتز به مدت ۱۵ دقیقه و تعداد ۶ سیکل (زمان هر سیکل ۳۰ ثانیه و زمان استراحت ۱۵ ثانیه بین سیکل‌ها، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) استفاده شد. به منظور کاهش بیشتر اندازه ذرات و افزایش راندمان ذرات نانوکپسوله، از دستگاه هموژنایزر با دور (اولتراتوراکس، IKA، ایتالیا) ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۱۵ دقیقه استفاده گردید. محلول حاصل از فرآیند، در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد منجمد و با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی (Vaco 2 Zirbus، آلمان) در فشار ۰/۰۵۱ میلی‌بار و دمای ۵۰- درجه سانتی‌گراد خشک گردید [۷-۹].

1. PBS  
2. Dynamic Light Scattering

Table 1 Research treatments

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

### ۲-۵-۳- شمارش باکتری‌های انتروباکتریاسه<sup>۴</sup>

به منظور شمارش باکتری‌های انتروباکتریاسه، ابتدا ۱ میلی‌لیتر از رقت‌های مورد نظر به پلیت‌های از قبل آماده‌شده منتقل شد. سپس ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت ویولت رد بایل گلوکز آگار<sup>۵</sup> (با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد) به پلیت‌ها اضافه گردید. در مرحله بعد، نمونه‌های سوسیس با محیط کشت ترکیب و اجازه داده شد مخلوط در دمای محیط خنک شود. نهایتاً، ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مورد استفاده به پلیت (محتوی نمونه و محیط کشت) اضافه و عمل انکوباسیون پس از بستن محیط کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. نتایج شمارش (تعداد) نیز بر حسب لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی/گرم (log cfu/g) گزارش گردید [۱۹].

### ۲-۵-۴- شمارش باکتری‌های لاکتیک‌اسید<sup>۶</sup> و سودوموناس<sup>۷</sup>

جهت شمارش باکتری‌های لاکتیک‌اسید از محیط کشت MRS آگار استفاده و عمل گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انجام شد. محیط کشت مورد استفاده به منظور شمارش باکتری‌های سودوموناس، آگار پایه دارای مکمل انتخابی سیتیریماید-فوسیدین-سفالوریدین<sup>۸</sup> بود. در این روش، دما و زمان انکوباسیون به ترتیب ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۳ روز در نظر گرفته شد. نتایج شمارش (تعداد) نیز بر حسب لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی/گرم (log cfu/g) گزارش گردید [۱۹].

### ۲-۵-۵- ارزیابی ویژگی‌های میکروبی سوسیس‌ها

جهت بررسی ویژگی‌های میکروبی سوسیس‌ها (شمارش باکتری‌های مزوفیل، سرماگرا، انتروباکتریاسه، سودوموناس و لاکتیک‌اسید)، کشت میکروبی نمونه‌ها در طی دوره نگهداری در روزهای صفر، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ انجام شد.

### ۲-۵-۱- تهیه رقت از سوسیس‌های تیمار شده

به منظور تهیه رقت، ابتدا ۱۰ گرم نمونه سوسیس به کیسه استوماکر انتقال داده شد. در مرحله بعد، ۹۰ میلی‌لیتر آب پپتونه ۰/۱ درصد استریل به کیسه مذکور اضافه و به مدت ۲ دقیقه بوسیله استوماکر (Bagmixer Interscience, France) عمل مخلوط‌کردن انجام شد. سپس در لوله‌های آزمایش، ۹ میلی‌لیتر آب پپتونه ۰/۱ درصد استریل اضافه گردید. نهایتاً با استفاده از سمپلر، ۱ میلی‌لیتر از رقت‌های تهیه‌شده در شرایط کاملاً استریل به لوله‌های مذکور منتقل و ورتکس شد [۱۹].

### ۲-۵-۲- شمارش باکتری‌های مزوفیل هوازی<sup>۱</sup> و سرماگرا<sup>۲</sup>

به منظور شمارش باکتری‌های مزوفیل هوازی، ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مورد نظر در پلیت‌های حاوی محیط پلیت کانت آگار<sup>۳</sup> به صورت سطحی کشت داده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری و نتایج (تعداد) بر حسب لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی/گرم (log cfu/g) گزارش گردید. جهت شمارش باکتری‌های سرماگرا، دما و زمان انکوباسیون به ترتیب ۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۰ روز بود [۱۰].

4. Enterobacteriaceae bacteria count  
5. Violet Red Bile Glucose Agar or (VRBGA)  
6. Lactic acid bacteria count  
7. Pseudomonas bacteria count  
8. Fucidin-Cetrimide-Cephaloridine

1. Mesophilic bacteria counts  
2. Psychrophilic bacteria counts  
3. Plate Count Agar or PCA

و نیروی ۰/۰۵ نیوتن<sup>۲</sup> اعمال شد. سپس با استفاده از منحنی به دست آمده و روابط مشخص [۲۲]، شاخص‌های سختی<sup>۳</sup>، پیوستگی میان‌بافتی<sup>۴</sup>، قابلیت ارتجاع<sup>۵</sup>، میزان صمغی‌بودن<sup>۶</sup> و قابلیت جویدن<sup>۷</sup> تعیین شدند. به منظور انجام آزمون وارنر<sup>۸</sup> (آزمون برش)، ابتدا نمونه‌هایی از سوسیس‌های تیمار شده با قطر ۱/۲۷ و ضخامت ۲ سانتی‌متر تهیه و حداکثر نیروی لازم جهت برش با استفاده از دستگاه ارزیابی بافت مذکور اندازه‌گیری گردید [۲۳].

### ۲-۷- تجزیه و تحلیل آماری

تحقیق پیش‌رو در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا و به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One way Anova) و آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده گردید. آنالیز داده‌ها بوسیله نرم‌افزار آماری SPSS و رسم جداول و اشکال با کمک نرم‌افزار EXCEL انجام شد.

## ۳- نتایج

### ۳-۱- خواص فیزیکی نانوکپسول‌های حامل

#### آستاگزانتین

در جدول ۲، خواص فیزیکی نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین ارائه شده است. مطابق این جدول، میانگین سایز ذرات کمتر از ۲۷۰ نانومتر، شاخص توزیع ذره‌ای حدود ۰/۴۲ و پتاسیل زتای سطح نانوکپسول‌ها مثبت و در حد ۴۷ میلی‌ولت است. در ادامه مشخص شد بازده ریز پوشانی فرایند نیز در حدود ۸۵ درصد می‌باشد.

**Table 2** Physical properties of nanocapsules carrying astaxanthin

Physical properties	Level
Average particle size (nm)	269.1±3.95
Particle distribution index	0.423±1.28
Zeta potential (mv)	+46.71±2.88
Encapsulation efficiency (%)	85.19±4.09

2. Trigger force
3. Hardness
4. Cohesivness
5. Springness
6. Gumminess
7. Chewiness
8. Warner test

### ۲-۶- خصوصیات بافتی سوسیس‌های

#### فرموله شده

#### ۲-۶-۱- ظرفیت نگهداری آب سوسیس‌ها

ظرفیت نگهداری آب سوسیس‌های فرموله شده، در روزهای صفر و ۲۸ مطابق روش بالیگا و مادایه (۱۹۷۰) تعیین شد [۲۰]. به این صورت که ابتدا چهار قطعه کاغذ صافی مربع به ابعاد ۲/۵ به شکل تیمبل تا شده و در لوله‌های اپندورف قرار گرفت و وزن شد. در مرحله بعد، ۰/۲ گرم از سوسیس‌های تیمار شده در داخل آن قرار داده و در دور ۱۴۰۰rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. پس اتمام عمل سانتریفوژ، نمونه سوسیس بوسیله پنس از لوله‌های دستگاه خارج و لوله‌های اپندورف به همراه کاغذ صافی مجدا وزن شد. نهایتاً، ظرفیت نگهداری آب سوسیس‌ها از طریق رابطه زیر محاسبه و به صورت درصد گزارش گردید.

= درصد آب آزاد شده

×۱۰۰ (وزن نمونه قبل از سانتریفوژ/اختلاف وزن قبل و بعد از سانتریفوژ)

درصد آب آزاد شده = ۱۰۰- ظرفیت نگهداری آب

#### ۲-۶-۲- تخلخل سوسیس‌ها

آزمون تخلخل سوسیس‌ها در روزهای صفر و ۲۸ ارزیابی شد. به این صورت که نمونه سوسیس‌ها به ضخامت ۱ سانتی‌متر برش داده شدند. سپس این قطعات با استفاده پوشیگر مسطح با وضوح dpi ۳۰۰ تصویربرداری شدند. نهایتاً به منظور سنجش خصوصیات هر تصویر از نرم‌افزار ایمیج جی<sup>۱</sup> ۱/۴ استفاده شد [۲۱].

#### ۲-۶-۳- افت پخت سوسیس‌ها

این شاخص (در روزهای صفر و ۲۸) به صورت درصدی از اختلاف وزن سوسیس‌ها قبل و بعد از سرخ کردن تعیین و بر حسب درصد گزارش گردید [۲۰].

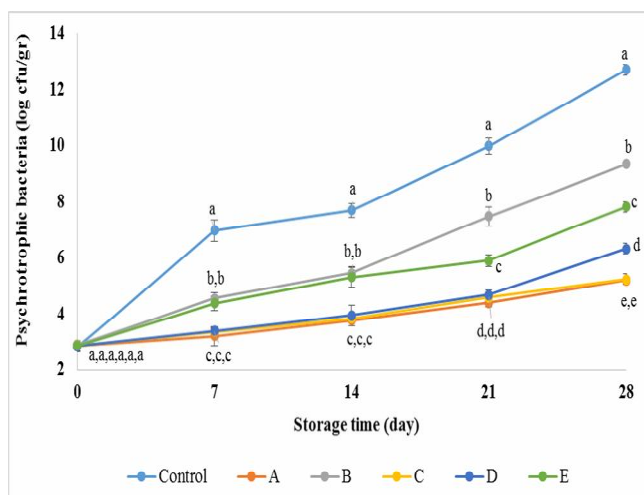
#### ۲-۶-۴- آزمون‌های بررسی پروفایل بافتی سوسیس‌ها

به منظور ارزیابی پروفایل بافتی سوسیس‌های فرموله شده (در روزهای صفر و ۲۸) از دستگاه ارزیابی بافت (ستام، STM-20، ایران) استفاده شد. جهت انجام آزمون‌های رئولوژیکی، دو سیکل با ۵۰ درصد فشردگی و به کمک سل بارگذاری ۵ تا ۵۰ کیلوگرم

1. Image j

## ۳-۲-۲- شمارش باکتری‌های سرماگرا

در شکل ۲، میزان باکتری‌های سرماگرای تیمارهای تحقیق ارائه شده است. مطابق این شکل، حداکثر میزان باکتری‌های سرماگرا در طول دوره نگهداری مربوط به شاهد ( $p < 0.05$ ) و حداقل آن مربوط به تیمارهای A، C و D است. این سه تیمار تا روز ۲۱ از نظر سطح باکتری‌های مذکور فاقد اختلاف معنی‌دار بودند ( $p > 0.05$ ) اما در روز ۲۸، اختلاف تیمار D با دو تیمار دیگر معنی‌دار شد ( $p < 0.05$ ). شمارش باکتری‌های سرماگرا در تیمار شاهد در روز ۲۸، ۱۲/۷۱ اما در تیمارهای A، C و D به ترتیب ۵/۱۹، ۵/۲۳ و ۶/۳۱ لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر گرم بود. سطح باکتری‌های سرماگرای دو تیمار B و E تا اواسط دوره نگهداری (روز ۱۴) اختلاف قابل ملاحظه‌ای نداشت ( $p > 0.05$ ) اما در روزهای ۲۱ و ۲۸ اختلاف سطح باکتری‌های مذکور در دو تیمار، معنی‌دار شد و تیمار B مقادیر بیشتری از باکتری‌های سرماگرا را نشان داد ( $p < 0.05$ ). به طور کلی این دو تیمار حاوی مقادیر بیشتری از باکتری‌های مذکور نسبت به تیمارهای A، C و D بودند ( $p < 0.05$ ).



**Fig 2** Psychrotrophic bacteria count of research treatments during storage time (log cfu/gr)

\*Different letters on each day indicate significant differences between the data ( $p < 0.05$ ).

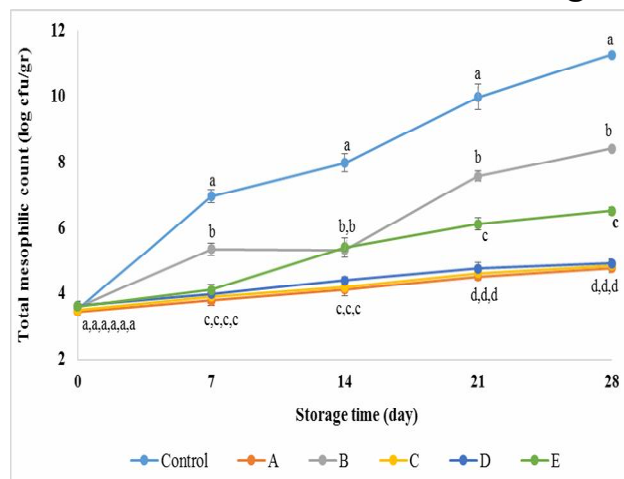
\*Control: without sodium nitrite and nanocapsules carrier astaxanthin, A: 120 mg/kg sodium nitrite, B: 120 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, C: 90 mg/kg sodium nitrite + 30 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, D: 60 mg/kg sodium nitrite + 60 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, E: 30 mg/kg sodium nitrite + 90 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin

## ۳-۲-۲- ارزیابی خصوصیات میکروبی تیمارهای

## تحقیق

## ۳-۲-۱- شمارش باکتری‌های مزوفیل هوازی

در شکل ۱، میزان باکتری‌های مزوفیل شاهد و سوسیس‌های فرموله‌شده ارائه شده است. مطابق این شکل، بیشترین میزان شمارش باکتری‌های مزوفیل در طول دوره نگهداری، مربوط به شاهد و کمترین حد آن مربوط به تیمارهای A، C و D است ( $p < 0.05$ ). این سه تیمار از نظر سطح باکتری‌های مزوفیل اختلاف معنی‌داری نداشتند ( $p > 0.05$ ) و شمارش کلی این باکتری‌ها در آن‌ها در روز ۲۸، به ترتیب ۴/۷۸، ۴/۸۶ و ۴/۹۲ لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر گرم بود. این میزان برای شاهد، ۱۱/۲۶ لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر گرم ثبت شد. تیمار E از نظر سطح باکتری‌های مزوفیل در روز ۷ با تیمارهای A، C و D و در روز ۱۴ با تیمار B اختلاف قابل ملاحظه‌ای نداشت ( $p > 0.05$ ) اما اختلافش در روزهای ۲۱ و ۲۸ با تیمارهای مذکور معنی‌دار شد ( $p < 0.05$ ). بعد از شاهد، بیشترین سطح باکتری‌های مذکور مربوط به تیمار B بود ( $p < 0.05$ ).



**Fig 1** Total mesophilic count of research treatments during storage time (log cfu/gr)

\*Different letters on each day indicate significant differences between the data ( $p < 0.05$ ).

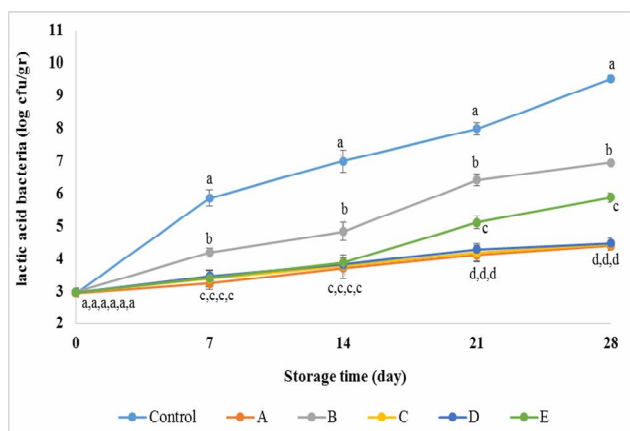
\*Control: without sodium nitrite and nanocapsules carrier astaxanthin, A: 120 mg/kg sodium nitrite, B: 120 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, C: 90 mg/kg sodium nitrite + 30 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, D: 60 mg/kg sodium nitrite + 60 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, E: 30 mg/kg sodium nitrite + 90 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin

## ۳-۲-۳- شمارش باکتری‌های انتروباکتریاسه

در شکل ۳، میزان باکتری‌های انتروباکتریاسه شاهد و سوسیس‌های فرموله‌شده با مقادیر مختلف نیتريت‌سدیم و نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین ارائه شده است. همانطور که در این شکل مشاهده می‌شود، کمترین میزان این باکتری‌ها در روزهای نمونه‌برداری در تیمارهای A، C و D ثبت شد ( $p < 0.05$ ). این سه تیمار از نظر شمارش باکتری‌های انتروباکتریاسه اختلاف معنی‌داری نداشتند ( $p > 0.05$ ). در تیمارهای مذکور، سطح این باکتری‌ها در روز صفر، ۱/۱۵ و در روز ۲۸، به ترتیب ۳/۵۱، ۳/۶۴ و ۳/۷۵ لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر گرم بود. دو تیمار E و B در طول دوره نگهداری از نظر شمارش باکتری‌های انتروباکتریاسه دارای اختلاف معنی‌دار بودند و به ترتیب در رده‌های بعدی قرار گرفتند ( $p < 0.05$ ). در واقع شمارش این باکتری‌ها در دو تیمار مذکور بیشتر از تیمارهای A، C و D و کمتر از شاهد بود. در طول دوره نگهداری حداکثر شمارش باکتری‌های انتروباکتریاسه در شاهد ثبت شد ( $p < 0.05$ ). میزان باکتری‌های مذکور در روز صفر در شاهد ۱/۱۴ و در روز ۲۸، ۸/۹۶ لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر گرم بود.

## ۳-۲-۴- شمارش باکتری‌های لاکتیک‌اسید

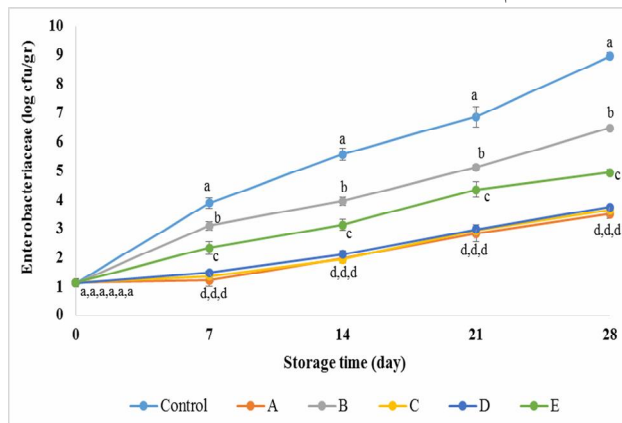
شکل ۴، شمارش باکتری‌های لاکتیک‌اسید تیمارهای تحقیق را نشان می‌دهد. مطابق این شکل، سه تیمار A، C و D ضمن اینکه در طول دوره نگهداری حداقل میزان باکتری‌های مذکور را نشان دادند ( $p < 0.05$ ), هیچ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند ( $p > 0.05$ ). البته تیمار E نیز تا اواسط دوره (روز ۱۴) با این سه تیمار از نظر سطح باکتری‌های لاکتیک‌اسید اختلاف قابل ملاحظه‌ای نداشت ( $p > 0.05$ ) اما در روزهای ۲۱ و ۲۸، اختلاف سطح، معنی‌دار شد و تیمار E مقادیر بیشتری از باکتری‌های مذکور را نشان داد ( $p < 0.05$ ). میزان باکتری‌های لاکتیک‌اسید در سه تیمار A، C و D در روز صفر حدود ۲/۹۸ و در روز ۲۸ به ترتیب ۴/۳۹، ۴/۴۵ و ۴/۴۸ لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر گرم بود. بالاترین میزان باکتری مورد بررسی در طول دوره نگهداری در شاهد ثبت شد ( $p < 0.05$ ) که این میزان از ۲/۹۵ در روز صفر به ۹/۵۱ لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر گرم در روز ۲۸ افزایش یافت. سطح باکتری‌های لاکتیک‌اسید تیمار B کل دوره نگهداری به صورت معنی‌داری از شاهد کمتر و از تیمار E بیشتر بود ( $p < 0.05$ ). این سطح در روز صفر حدود ۲/۹۹ و در روز ۲۸، ۶/۹۵ لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر گرم ثبت شد.



**Fig 4** Lactic acid bacteria count of research treatments during storage time (log cfu/gr)

\*Different letters on each day indicate significant differences between the data ( $p < 0.05$ ).

\*Control: without sodium nitrite and nanocapsules carrier astaxanthin, A: 120 mg/kg sodium nitrite, B: 120 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, C: 90 mg/kg sodium nitrite + 30 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, D: 60 mg/kg sodium nitrite + 60 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, E: 30 mg/kg sodium nitrite + 90 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin



**Fig 3** Enterobacteriaceae count of research treatments during storage time (log cfu/gr)

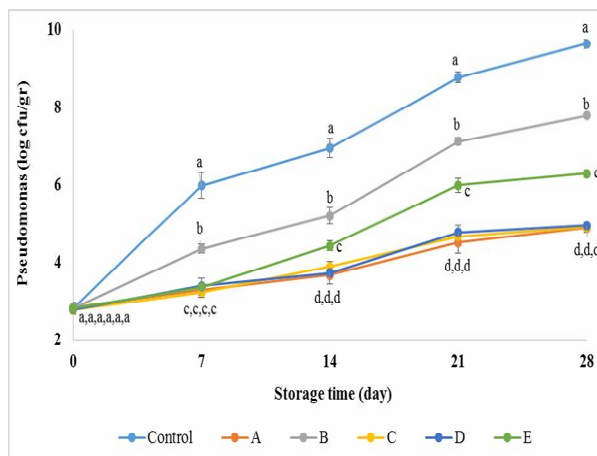
\*Different letters on each day indicate significant differences between the data ( $p < 0.05$ ).

\*Control: without sodium nitrite and nanocapsules carrier astaxanthin, A: 120 mg/kg sodium nitrite, B: 120 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, C: 90 mg/kg sodium nitrite + 30 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, D: 60 mg/kg sodium nitrite + 60 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, E: 30 mg/kg sodium nitrite + 90 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin



## ۳-۲-۵- شمارش باکتری‌های سودوموناس

در شکل ۵، میزان باکتری‌های سودوموناس شاهد و تیمارهای فرموله‌شده با نگهدارنده سنتتیک و طبیعی ارائه شده است. همانطور که در این شکل مشاهده می‌شود، کمترین میزان باکتری-های مذکور در تیمارهای A، C و D ثبت شده است ( $p < 0.05$ ).



**Fig 5** Pseudomonas count of research treatments during storage time (log cfu/gr)

\*Different letters on each day indicate significant differences between the data ( $p < 0.05$ ).

\*Control: without sodium nitrite and nanocapsules carrier astaxanthin, A: 120 mg/kg sodium nitrite, B: 120 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, C: 90 mg/kg sodium nitrite + 30 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, D: 60 mg/kg sodium nitrite + 60 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, E: 30 mg/kg sodium nitrite + 90 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin

این سه تیمار از نظر شمارش باکتری‌های سودوموناس در طول دوره نگهداری فاقد اختلاف معنی‌دار بودند ( $p > 0.05$ ) و میزان این باکتری‌ها در آن‌ها در روز صفر، حدود ۲/۸ و در روز ۲۸ به ترتیب به ۴/۸۹، ۴/۹۱ و ۴/۹۶ لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر گرم ثبت گردید. مطابق شکل پنج، تیمار E تا روز ۷ از نظر سطح، اختلاف قابل ملاحظه‌ای با تیمارهای A، C و D نداشت ( $p > 0.05$ ) اما پس از این روز، این اختلاف معنی‌دار شد و تیمار مذکور مقادیر بیشتری از باکتری‌های سودوموناس را نشان داد ( $p < 0.05$ ). بیشترین میزان شمارش باکتری‌های سودوموناس در طول دوره نگهداری مربوط به شاهد بود که این شمارش از حدود ۲/۸ در روز صفر به ۹/۶۴ لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده

کلنی بر گرم در روز ۲۸ افزایش یافت. تیمار B در طول دوره نگهداری حاوی مقادیر کمتری از باکتری‌های سودوموناس نسبت به شاهد بود ( $p < 0.05$ ). میزان این باکتری‌ها در تیمار مذکور در روز صفر حدود ۲/۸ و در روز ۲۸، ۷/۷۹ لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر گرم ثبت شد.

### ۳-۳- ارزیابی خصوصیات بافتی سوسیس‌های فرموله‌شده

در جدول ۳، ظرفیت نگهداری آب، افت پخت و تخلخل شاهد و سوسیس‌های فرموله‌شده در روزهای صفر و ۲۸ ارائه شده است. همانطور که در این جدول مشاهده می‌شود، ظرفیت نگهداری آب در تیمارهای فرموله‌شده با مقادیر مختلف نیتريت سدیم و نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین به صورت معنی‌داری (نسبت به شاهد) ارتقا یافته است ( $p < 0.05$ ). همچنین ظرفیت نگهداری آب در تیمارهای B، D و E فاقد اختلاف معنی‌دار ( $p > 0.05$ ) و به صورت قابل ملاحظه‌ای بیشتر از تیمارهای A و C ( $p > 0.05$ ) است ( $p < 0.05$ ). در ادامه مشخص شد، شاخص افت پخت تیمارهای فرموله‌شده نسبت به شاهد به صورت معنی‌داری کمتر است ( $p < 0.05$ ). در این زمینه تیمارهای B، D و E اختلاف قابل ملاحظه‌ای ندارند ( $p > 0.05$ ) و شاخص افت پخت آن‌ها به صورت قابل ملاحظه‌ای کمتر از تیمارهای A و C ( $p > 0.05$ ) است ( $p < 0.05$ ). مطابق جدول ۳، تخلخل بافت همه تیمارهای فرموله‌شده تقریباً یکسان ( $p > 0.05$ ) و به صورت معنی‌داری کمتر از تخلخل شاهد است ( $p < 0.05$ ). مقایسه خصوصیات بافتی تیمارها در روزهای صفر و ۲۸ نشان داد که ظرفیت نگهداری آب، افت پخت و تخلخل تیمارهای فرموله‌شده (با نیتريت سدیم و نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین) در طول دوره نگهداری (دو زمان صفر و ۲۸، دمای یخچال)، ثابت باقی ماندند ( $p > 0.05$ ). اما این خصوصیات در تیمار شاهد در دو زمان مذکور به صورت معنی‌داری تغییر کردند ( $p < 0.05$ )؛ به این صورت که ظرفیت نگهداری آب، کاهش اما افت پخت و تخلخل افزایش یافت.

**Table 3** Water holding capacity, cooking loss and porosity of research treatments on days 0 and 28

Treatment/Index	Time (day)	Water holding capacity (%)	Cooking loss (%)	Porosity
Control	0	51.365±0.95 <sup>c</sup>	30.6452±0.76 <sup>b</sup>	23.1125±0.65 <sup>b</sup>
	28	44.521±0.36 <sup>d</sup>	35.4110±1.23 <sup>a</sup>	29.3931±0.44 <sup>a</sup>
A	0	57.986±0.29 <sup>b</sup>	26.2384±0.15 <sup>c</sup>	18.2364±0.15 <sup>c</sup>
	28	58.092±1.15 <sup>b</sup>	26.1039±0.34 <sup>c</sup>	18.2151±1.08 <sup>c</sup>
B	0	64.158±0.77 <sup>a</sup>	20.9516±0.96 <sup>d</sup>	18.1969±0.93 <sup>c</sup>
	28	64.099±0.98 <sup>a</sup>	21.1035±1.02 <sup>d</sup>	18.2115±0.42 <sup>c</sup>
C	0	58.145±0.83 <sup>b</sup>	26.2538±0.75 <sup>c</sup>	18.1146±0.14 <sup>c</sup>
	28	58.031±0.71 <sup>b</sup>	26.1154±0.12 <sup>c</sup>	18.1423±0.29 <sup>c</sup>
D	0	64.016±1.09 <sup>a</sup>	20.9965±0.18 <sup>d</sup>	18.1965±0.38 <sup>c</sup>
	28	63.986±0.58 <sup>a</sup>	20.9941±0.49 <sup>d</sup>	18.2456±1.19 <sup>c</sup>
E	0	64.248±0.63 <sup>a</sup>	20.9691±0.84 <sup>d</sup>	18.2135±0.86 <sup>c</sup>
	28	64.181±0.45 <sup>a</sup>	20.9785±1.01 <sup>d</sup>	18.1279±1.24 <sup>c</sup>

\*Different letters in each column indicate significant differences between the data ( $p < 0.05$ ).

\*Control: without sodium nitrite and nanocapsules carrier astaxanthin, A: 120 mg/kg sodium nitrite, B: 120 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, C: 90 mg/kg sodium nitrite + 30 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, D: 60 mg/kg sodium nitrite + 60 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, E: 30 mg/kg sodium nitrite + 90 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin

نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین نسبت به شاهد، مقادیر بیشتری ارائه کردند ( $p < 0.05$ )؛ ضمن اینکه این تیمارها (همه تیمارهای فرموله‌شده) در زمینه هر یک از دو شاخص مذکور فاقد اختلاف معنی‌دار بودند ( $p > 0.05$ ). مقایسه تغییرات شاخص‌های سنجش بافت تیمارها در طول زمان نگهداری نشان داد که تیمارهای فرموله‌شده در روزهای صفر و ۲۸ مقادیر تقریباً برابری از هر شاخص ارائه کردند و از این نظر اختلاف معنی‌داری ثبت نشد ( $p > 0.05$ ). اما شاهد در طول دوره نگهداری از نظر شاخص‌های بافتی دچار تغییرات قابل ملاحظه‌ای شد ( $p < 0.05$ )؛ به این صورت که برای هر شش شاخص سنجش بافت (مورد مطالعه) در روز ۲۸، مقادیر کمتری نسبت به روز صفر ثبت گردید.

در جدول ۴، برخی دیگر از خصوصیات بافتی سوسیس‌های فرموله‌شده در کنار شاهد در دو زمان صفر و ۲۸ (نگهداری در دمای یخچال) ارائه شده است. مطابق این جدول، در تیمارهای فرموله‌شده (با نیتريت سدیم و نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین)، شاخص‌های سختی، صمغی‌بودن، قابلیت جویدن و برش به صورت معنی‌داری نسبت به شاهد (روز صفر) کاهش یافتند ( $p < 0.05$ ). تیمارهای B، D و E ضمن عدم اختلاف معنی‌دار در هر یک از شاخص‌های مذکور ( $p > 0.05$ )، مقادیر کمتری نسبت به تیمارهای A و C ( $p > 0.05$ ) نشان دادند ( $p < 0.05$ ). در مورد شاخص‌های قابلیت ارتجاع و پیوستگی میان بافتی، تیمارهای فرموله‌شده با مقادیر مختلف نیتريت سدیم و

**Table 4** Texture characteristics of research treatments

T/I	Time (day)	Hardness	Springiness	Cohesiveness	Gumminess	Chewiness	Cutting
Control	0	26.461±1.04 <sup>a</sup>	0.8135±0.04 <sup>b</sup>	0.6912±0.02 <sup>b</sup>	18.1489±0.15 <sup>a</sup>	18.1678±0.74 <sup>a</sup>	5.6514±0.05 <sup>a</sup>
	28	14.594±0.15 <sup>d</sup>	0.6949±0.01 <sup>c</sup>	0.5145±0.06 <sup>c</sup>	8.3541±0.08 <sup>d</sup>	7.9231±0.11 <sup>d</sup>	2.1652±0.04 <sup>d</sup>
A	0	21.925±0.37 <sup>b</sup>	0.9973±0.02 <sup>a</sup>	0.8705±0.05 <sup>a</sup>	15.6137±0.92 <sup>b</sup>	15.1528±0.62 <sup>b</sup>	4.8951±0.18 <sup>b</sup>
	28	22.112±0.31 <sup>b</sup>	0.9892±0.05 <sup>a</sup>	0.8812±0.08 <sup>a</sup>	15.4357±1.06 <sup>b</sup>	15.2423±0.89 <sup>b</sup>	4.9842±0.25 <sup>b</sup>
B	0	17.994±0.23 <sup>c</sup>	0.9886±0.03 <sup>a</sup>	0.8883±0.06 <sup>a</sup>	12.8892±0.67 <sup>c</sup>	11.9372±1.01 <sup>c</sup>	3.2563±0.08 <sup>c</sup>
	28	18.135±0.7 <sup>c</sup>	0.9923±0.04 <sup>a</sup>	0.8756±0.05 <sup>a</sup>	12.9248±0.18 <sup>c</sup>	11.9946±0.48 <sup>c</sup>	3.2834±0.1 <sup>c</sup>
C	0	21.985±0.52 <sup>b</sup>	0.9853±0.06 <sup>a</sup>	0.8796±0.05 <sup>a</sup>	15.7541±0.29 <sup>b</sup>	14.9836±0.39 <sup>b</sup>	4.8636±0.15 <sup>b</sup>
	28	21.931±0.18 <sup>b</sup>	0.9789±0.03 <sup>a</sup>	0.8752±0.04 <sup>a</sup>	15.5621±0.75 <sup>b</sup>	15.2921±0.14 <sup>b</sup>	4.9324±0.12 <sup>b</sup>
D	0	18.145±0.14 <sup>c</sup>	0.9785±0.09 <sup>a</sup>	0.8867±0.06 <sup>a</sup>	12.8935±0.32 <sup>c</sup>	12.1135±0.52 <sup>c</sup>	3.2531±0.06 <sup>c</sup>
	28	18.127±0.49 <sup>c</sup>	0.9761±0.05 <sup>a</sup>	0.8788±0.09 <sup>a</sup>	12.9163±0.15 <sup>c</sup>	11.9814±0.33 <sup>c</sup>	3.3112±0.05 <sup>c</sup>
E	0	17.989±0.97 <sup>c</sup>	0.9864±0.08 <sup>a</sup>	0.8775±0.02 <sup>a</sup>	12.9434±0.45 <sup>c</sup>	11.9548±0.09 <sup>c</sup>	3.2369±0.11 <sup>c</sup>
	28	18.115±0.21 <sup>c</sup>	0.9964±0.06 <sup>a</sup>	0.8811±0.06 <sup>a</sup>	12.9326±0.23 <sup>c</sup>	11.9669±0.21 <sup>c</sup>	3.2985±0.09 <sup>c</sup>

\*Different letters in each column indicate significant differences between the data ( $p < 0.05$ ), T: Treatment, I: Index

\*Control: without sodium nitrite and nanocapsules carrier astaxanthin, A: 120 mg/kg sodium nitrite, B: 120 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, C: 90 mg/kg sodium nitrite + 30 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, D: 60 mg/kg sodium nitrite + 60 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, E: 30 mg/kg sodium nitrite + 90 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin

## ۴- بحث و نتیجه گیری

نگهدارنده‌ها و ترکیبات ضد میکروبی سنتتیک که در فراوده‌های غذایی مختلف استفاده می‌شوند، تهدیدی بالقوه‌ای برای سلامت مصرف‌کنندگان هستند. به همین دلیل جایگزینی این نگهدارنده‌های سنتتیک با انواع طبیعی آن‌ها بسیار ضروری است. تحقیق حاضر هم به همین منظور پس از استخراج آستاگزانتین از میکروجلبک هماتوکوکوس و نانو ریزپوشانی آن با استفاده از پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات سدیم، نانوکپسول‌های حامل را (با نسبت‌های مختلف) در فرمولاسیون سوسیس معمولی به عنوان جایگزین نیتريت سدیم استفاده و خصوصیات میکروبی و بافتی محصول را طی دوره نگهداری در دمای یخچال (۲۸ روز) مورد بررسی قرار داد.

باکتری‌های مزوفیل هوازی، اولین گروه میکروبی مورد ارزیابی در تحقیق حاضر بودند. میزان اولیه این باکتری‌ها (روز صفر) در سوسیس‌ها حدود ۳/۶ لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر گرم بود. در تحقیق فاربر و همکاران (۱۹۸۸) تعداد اولیه باکتری‌های مزوفیل هوازی در سوسیس به صورت میانگین، ۵/۶۵ لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر گرم گزارش شد [۲۴] که این میزان بیشتر از تعداد باکتری‌های مذکور در پژوهش حاضر است. همچنین در پژوهش فیاض‌فر و همکاران (۱۴۰۰) شمارش اولیه باکتری‌های مزوفیل هوازی در سوسیس‌های فرموله‌شده با اسانس آویشن ۴/۳۹ لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر گرم بود [۱۹] که این میزان هم از تعداد اولیه این باکتری‌ها در تحقیق حاضر بیشتر است. حد قابل قبول باکتری‌های مزوفیل هوازی در مواد غذایی و فراورده‌های گوشتی حدود ۶ تا ۷ لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر گرم گزارش شده است [۲۵]. تیمارهای شاهد و B تحقیق پیش‌رو در روز ۲۸ از این حد عبور کردند اما سایر تیمارها با اختلاف زیاد از حد مجاز، در محدوده استاندارد قرار داشتند. از طرفی اعتقاد بر این است که شمارش باکتری‌های مزوفیل هوازی نمی‌تواند معیار خیلی دقیقی برای پذیرش یا رد فراورده‌های غذایی (گوشتی) باشد. چرا که اولاً این میکروارگانیزم‌ها به دلیل حساسیت زیاد به حرارت، در زمان پخت زودتر از باکتری‌های دیگر از بین می‌روند. دوماً باکتری‌های

مزوفیل هوازی جز فلور میکروبی اصلی در گوشت و فراورده‌های آن نیستند [۲۶].

بخش عمده باکتری‌های سرماگرا را لاکتوباسیلوس‌ها تشکیل می‌دهند و اعتقاد بر این است که بیشترین فساد در فراورده‌های گوشتی توسط همین میکروارگانیزم‌ها در دمای پائین انجام می‌شود [۱۹]. قابلیت و توانایی رشد باکتری‌های سرماگرا در دمای یخچال ( $\pm 4$  درجه سانتی‌گراد) از یک طرف و عدم رشد سایر میکروارگانیزم‌ها در چنین دمایی، دلیل اصلی فساد میکروبی فراورده‌های گوشتی حرارت‌دیده در طول نگهداری است [۲۷] و [۲۸]. در استاندارد ملی ایران در مورد فراورده‌های گوشتی حرارت‌دیده هیچ حد مجازی برای باکتری‌های سرماگرا در نظر گرفته نشده است [۲۶]. در سوسیس‌های تهیه‌شده از گوشت بوقلمون و نگهدارنده طبیعی آویشن، حد اولیه این باکتری‌ها ۳/۵ لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر گرم بود [۱۹] که این میزان از شمارش اولیه باکتری‌های مذکور در تیمارهای پژوهش حاضر (حدود ۲/۹ لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر گرم) بیشتر است.

باکتری‌های لاکتیک‌اسید یکی از میکروارگانیزم‌های اصلی عامل فساد فراورده‌های پروتئینی نگهداری‌شده در دمای یخچال هستند [۲۹]. حد قابل قبول این باکتری‌ها در سوسیس و سایر فراورده‌های پروتئینی، ۷ لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر گرم است [۳۰]. با توجه به نتایج تحقیق حاضر، هیچ کدام از تیمارهای فرموله‌شده طی دوره نگهداری از حد مجاز باکتری‌های لاکتیک-اسید عبور نکردند اما سطح باکتری‌های مذکور در تیمار شاهد در روز ۲۸ بالاتر از ۷ لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر گرم بود که این مورد حاکی از فساد باکتریایی سوسیس‌های شاهد یا فاقد نگهدارنده (نیتريت سدیم یا نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین) در این روز است. در تحقیقی که خصوصیات میکروبی سوسیس‌های تهیه‌شده از گوشت بوقلمون ترکیب‌شده با آویشن شیرازی ارزیابی شد، سطح اولیه باکتری‌های لاکتیک‌اسید ۳/۲۱ لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر گرم گزارش شد که این میزان کمی بیشتر از تیمارهای تحقیق حاضر (حدود ۲/۹۵ لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر گرم در روز صفر) می‌باشد. این تفاوت احتمالاً مربوط به اختلاف در نوع نگهدارنده طبیعی و گوشت مورد استفاده برای تهیه سوسیس است [۱۹].

نگهدارندگی دارند اما میزان اثرگذاری آن‌ها با توجه به حد پارامترهای فساد میکروبی باید مورد ارزیابی دقیق قرار گیرد. از آنجا که آستاگزانتین در فرم نانوکپسول، دارای منشا طبیعی و فاقد مضرات است (بلکه مزایای بسیار زیادی در زمینه حفظ سلامت و پیشگیری و درمان بیماری‌های مختلف دارد)، می‌توان در غلظت‌های بالاتری از این رنگدانه به منظور نگهداری مواد غذایی استفاده کرد که این مورد می‌تواند موضوعی برای تحقیقات آتی می‌باشد. شاید اگر نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین در غلظت‌های بالاتر از  $120\text{ mg/kg}$  در فرمولاسیون سوسیس استفاده شوند، کارایی بیشتری از مقدار  $120\text{ mg/kg}$  نیتريت سدیم داشته باشند.

تحقیقات انجام‌شده پیرامون استفاده از آستاگزانتین به عنوان آنتی‌باکتریال در فرمولاسیون سوسیس و مواد غذایی بسیار محدود و در حد چند مطالعه می‌باشد؛ ضمن اینکه تاکنون پژوهشی در زمینه بکارگیری نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات سدیم در فرمولاسیون سوسیس انجام نشده است. طی تحقیقی از غلظت‌های مختلف تیمول و آستاگزانتین به عنوان جایگزین نیتريت در فرمولاسیون سوسیس پروبیوتیک استفاده شد. نتایج نشان داد که ترکیب این دو ماده در طول دوره نگهداری سوسیس در دمای یخچال به مدت ۴۵ روز موجب کاهش باکتری‌های لاکتیک‌اسید و گونه کستریدیوم پرفرنژنس<sup>۱</sup> می‌گردد [۳۱] که این نتیجه با یافته‌های پژوهش حاضر تطابق دارد. در پژوهش عبدالمالک و همکاران (۲۰۱۶) از آستاگزانتین استخراج‌شده از ضایعات میگو<sup>۲</sup> به منظور افزایش زمان ماندگاری استیک مرغ در دمای یخچال استفاده شد. یافته‌های پژوهش مذکور موید آن بود که تیمار دارای آستاگزانتین نسبت به شاهد در مهار باکتری کل<sup>۳</sup>، سرماگراها، کلیفرم مدفوعی<sup>۴</sup>، استافیلوکوکوس و سالمونلا اثرگذاری بیشتری داشت و شمارش باکتری‌های مذکور به صورت معنی‌داری در این تیمار کمتر بود. این پژوهشگران عنوان کردند که افزودن آستاگزانتین طبیعی می‌تواند پایداری میکروبیولوژیکی استیک مرغ را در طول زمان نگهداری بهبود بخشد [۳۲]. تحقیقات مختلفی نیز فعالیت

نتایج شمارش همه گروه‌های باکتریایی مورد مطالعه نشان داد که استفاده از نیتريت سدیم و نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین (هم به صوت منفرد و هم به شکل ترکیبی) در فرمولاسیون سوسیس می‌تواند بر کاهش بار باکتریایی نسبت به شاهد موثر واقع گردد. اما این دو نگهدارنده از نظر میزان اثرگذاری بر مهار رشد باکتری‌ها تفاوت‌هایی دارند که در بیشتر موارد این اختلاف‌ها معنی‌دار بوده است. مطابق یافته‌ها، تیمار A که صرفاً حاوی  $120$  میلی‌گرم بر کیلوگرم نیتريت سدیم (حداکثر مجاز) بود، از نظر شمارش باکتریایی با دو تیمار C (حاوی  $90\text{ mg/kg}$  نیتريت سدیم و  $30\text{ mg/kg}$  نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین) و D (حاوی  $60\text{ mg/kg}$  نیتريت سدیم و  $60\text{ mg/kg}$  نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین) اختلاف معنی‌داری نداشت. البته در مورد باکتری‌های سرماگرا، تیمار D در روز ۲۸ مقادیر بالاتری از شمارش باکتری‌ها را نسبت به تیمارهای A و C نشان داد که این مورد در حد استثنا مطرح است. این نتایج موید آن است که حد مجاز استفاده از نیتريت سدیم ( $120$  میلی‌گرم بر کیلوگرم) در فرمولاسیون سوسیس، با  $30$  و  $60$  میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین قابلیت جایگزینی قطعی دارد. این قطعیت از آنجا مطرح شده که در مقالات دیگر مستخرج از طرح پژوهشی انجام‌شده توسط محققین مقاله حاضر، شاخص‌های رنگی، خواص حسی و پایداری اکسیداتیو سوسیس‌های فرموله‌شده با نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین ارزیابی و نتایج مثبتی ارائه شده است. در ادامه، یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد که تیمار حاوی  $30$  میلی‌گرم بر کیلوگرم نیتريت سدیم و  $90$  میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین (E) نیز در زمینه اثرگذاری بر رشد و تکثیر خانواده‌های باکتریایی مورد مطالعه موثر است تا جایی که در مورد برخی از گروه‌ها تا روز ۷ و ۱۴ از نظر شمارش با تیمارهای A، C و D اختلاف معنی‌داری ارائه نکرد. تیماری که صرفاً حاوی نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین ( $120$  میلی‌گرم بر کیلوگرم) بود (B)، در زمینه مقابله با رشد و تکثیر گروه‌های باکتریایی نسبت به شاهد، کارایی بیشتری داشت. به این صورت که همواره در طول دوره نگهداری، سطح شمارش در این تیمار به صورت قابل ملاحظه‌ای کمتر از شاهد بود. این موضوع موید آن است که نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین بدون جایگزینی با نیتريت سدیم نیز خاصیت

1. *Clostridium perfringens*  
2. *Parapenaeus longirostris*  
3. Total flora  
4. Fecal coliform

بخار) از دست می‌دهد؛ لذا شاخص افت پخت کاهش می‌یابد [۲۲]. در پژوهش حاضر نیز دقیقاً این موضوع تأیید شد؛ به این صورت که حداقل شاخص افت پخت در تیمارهایی دارای بیشترین ظرفیت نگهداری آب (B, D و E) ثبت شد. با ارتقا ظرفیت نگهداری آب سوسیس، رطوبت محصول افزایش می‌یابد که این مورد موجب آبداری بیشتر و نرمی بافت فرآورده گوشتی می‌شود. در تحقیق حاضر با افزودن نیتريت سدیم و نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین به بافت سوسیس، تخلخل بافت تیمارهای فرموله شده به صورت قابل ملاحظه‌ای نسبت به شاهد کاهش یافت اما تفاوت معنی‌داری در تخلخل تیمارهای مذکور ثبت نشد. به عبارت دیگر، اثرگذاری نیتريت سدیم و نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین بر تخلخل بافت سوسیس‌های فرموله شده، یکسان بود.

مطابق یافته‌ها با افزودن نیتريت سدیم و نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین به بافت سوسیس‌ها، شاخص‌های سختی، صمغی‌بودن، قابلیت جویدن و برش بافت (نسبت به شاهد در روز صفر) به صورت معنی‌داری کاهش یافتند؛ ضمن اینکه این کاهش در تیمارهای حاوی بیش از ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین (B, D و E)، بیشتر بود. در واقع این تیمارها در هر یک از چهار شاخص مذکور اختلاف قابل ملاحظه نداشتند و کمترین مقادیر برای آن‌ها ثبت شد. وضعیت مشابهی نیز برای تیمارهای A و C گزارش گردید؛ با این تفاوت که این دو تیمار در هر یک از شاخص‌های مذکور مقادیر بیشتری از تیمارهای B, D و E ارائه کردند. عکس این چهار شاخص بافتی، با فرموله شدن سوسیس‌ها، شاخص‌های قابلیت ارتجاعی و پیوستگی میان‌بافتی تیمارها نسبت به شاهد به صورت معنی‌داری افزایش یافتند. اما تیمارهای فرموله شده در هر یک از دو شاخص مذکور، فاقد اختلاف معنی‌دار و دارای سطوح یکسانی بودند. در واقع می‌توان ادعا کرد که اثرگذاری نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین و نیتريت سدیم بر این دو شاخص بافتی تفاوتی نداشت. مقایسه خصوصیات بافتی تیمارهای تحقیق در روزهای صفر و ۲۸ نشان داد که فرموله کردن سوسیس با ترکیباتی که مانع فساد اکسیداتیو و باکتریایی می‌شوند، می‌تواند از تغییرات اساسی و معنی‌دار بافت محصول جلوگیری کند. در تیمار شاهد که فاقد نیتريت سدیم و نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین بود، شاخص-

ضد باکتریایی آستاگزانتین را ارزیابی و نتایج مثبتی گزارش کردند. یافته‌های پژوهش ایرنا و همکاران (۲۰۱۷) در زمینه فعالیت ضد باکتریایی (قطر هاله عدم رشد) آستاگزانتین استخراج شده از میگو<sup>۱</sup> (با دو روش شیمیایی و فشار بالا) نشان داد که این رنگدانه قادر به مهار رشد و تکثیر باکتری‌های *اشریشیاکلی*<sup>۲</sup>، *انتروباکتر آئروژنز*<sup>۳</sup>، *استافیلوکوکوس اورئوس*<sup>۴</sup> و *باسیلوس سوبتیلیس*<sup>۵</sup> است [۳۳]. در تحقیق دیگری، رنگدانه آستاگزانتین با استفاده از روش حلال استون از سه گونه خرچنگ<sup>۶</sup> استخراج و فعالیت ضد باکتریایی آن علیه باکتری *اشریشیاکلی* ایزوله شده از شیر و گوشت فاسد بررسی شد. یافته‌ها حاکی از قابلیت مطلوب رنگدانه در مقابله با باکتری مذکور بود. به گونه‌ای که قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های ۳۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از حدود ۵ تا ۱۲ میلی‌متر متغیر گزارش شد [۳۴].

مطابق یافته‌ها، با فرموله شدن سوسیس با استفاده از مقادیر مختلف نیتريت سدیم و نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین، ظرفیت نگهداری آب تیمارها به صورت قابل توجهی نسبت به شاهد افزایش یافته است. حداکثر این افزایش مربوط به تیمارهای B, D و E بود که نسبت به سایر تیمارها محتوی مقادیر بیشتری از نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین بودند. در واقع این سه تیمار ضمن عدم اختلاف معنی‌دار، دارای بیشترین ظرفیت نگهداری آب بودند. به نظر می‌رسد نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین با پوشش مالتودکسترین-کازئینات سدیم ظرفیت نگهداری آب بالایی دارند. این شاخص در تیمار دارای ۱۲۰ mg/kg نیتريت سدیم (A) و تیمار دارای ۹۰ mg/kg نیتريت سدیم و ۳۰ mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین (C) تقریباً یکسان و در سطح پائین‌تری از تیمارهای B, D و E قرار داشت. ظرفیت نگهداری آب به صورت مستقیم بر شاخص افت پخت فرآورده‌های غذایی موثر است؛ هر چه ظرفیت نگهداری آب بیشتر باشد، آن محصول طی سرخ کردن آب کمتری (به صورت

1. *Penaeus monodon*
2. *Escherichia coli*
3. *Enterobacter aerogenes*
4. *Staphylococcus auerus*
5. *Bacillus subtilis*
6. *Portunus sanguinolentus, Callinectes sapidus, Paralithodes brevipes*

مقرون به صرفه بودن استخراج آستاگزانتین و تولید نانوکپسول‌های حامل باید مورد ارزیابی دقیق قرار گیرد.

## ۵- تشکر و قدردانی

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

## ۶- منابع

- [1] Toldrá, F., Aristoy, M. C., and Flores, M. (2009). Relevance of nitrate and nitrite in dry-cured ham and their effects on aroma development. *Grasas y Aceites*, 60(3), 291-296.
- [2] Ferguson, L. R., Philpott, M., and Karunasinghe, N. (2004). Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology*, 198(1-3), 147-159.
- [3] Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (2004). Susages. Characteristics and test methods. National standard number 2303 [In Persian].
- [4] Safari, R., Mirbakhsh, M., Ghaffari, H., Reyhani Poul, S., Rahmati, R., and Ebrahimzadeh, M. (2022). Effect of temperature, pH, and time factors on the stability and antioxidant activity of the extracted astaxanthin from haematococcus microalgae (*Haematococcus pluvialis*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 31 (1), 109-120 [In Persian].
- [5] Dong, S., Huang, Y., Zhang, R., Wang, S., and Liu, Y. (2014). Four different methods comparison for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. *The Scientific World Journal*, 1-7.
- [6] Yeganeh, S., and Reyhani Poul. (2021). Nanoencapsulation of bioactive peptides from shrimp wastes enzymatic hydrolysis with combined coating of nanoliposome -chitosan and evaluation of antibacterial, antioxidant and antihypertensive activity of the product. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 30 (6), 83-95 [In Persian].

های سنجش بافت در طول دوره نگهداری دچار تغییرات قابل ملاحظه‌ای شدند؛ به این صورت که هر کدام از این شش شاخص طی ۲۸ روز نگهداری در دمای یخچال، به صورت معنی‌دار و با شیب زیادی کاهش یافتند. احتمالاً فساد اکسیداتیو و باکتریایی سوسیس دلیل این تغییرات است. چرا که شاخص‌های سنجش بافت تیمارهای حاوی نیتريت سدیم و نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین در طول دوره نگهداری تغییر قابل ملاحظه‌ای نداشتند.

مطابق نتایج تحقیق حاضر، نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات سدیم پتانسیل بسیار مطلوبی برای جایگزین شدن بخشی از نیتريت سدیم مورد استفاده در فرمولاسیون سوسیس (و احتمالاً سایر فرآورده‌های گوشتی) دارند. به این صورت که تیمار بندی با نسبت‌های ۱ به ۳ و ۱ به ۱ نانوکپسول به نیتريت سدیم (مجموع دو نگهدارنده معادل ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، حد بهینه است و از نظر کارایی مقابله با رشد و تکثیر باکتری‌ها با تیمار بندی صرفاً نیتريت سدیم (۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تفاوت معنی‌داری ندارد. همچنین تیمار ۳ به ۱ نانوکپسول به نیتريت سدیم نیز تا حدی اثرگذاری مشابه تیمارهای مذکور را دارد. ضمن اینکه اگر به جای ۱۲۰ mg/kg نیتريت سدیم، از ۱۲۰ mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین در فرمولاسیون سوسیس استفاده شود، کاهش بار باکتریایی نسبت به شاهد ثبت خواهد شد و می‌توان گفت این تیمار خاصیت نگهدارندگی دارد. در بخش خصوصیات بافتی می‌توان ادعا کرد که اثر نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین بر افزایش ظرفیت نگهداری آب سوسیس‌ها و همچنین کاهش سختی، افت پخت، صمغیت، قابلیت جویدن و برش بافت بیشتر از نیتريت سدیم است. ضمن اینکه اثرگذاری نیتريت سدیم و نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین بر شاخص‌های قابلیت ارتجاعی، پیوستگی میان‌بافتی و تخلخل یکسان می‌باشد. حضور این دو نگهدارنده سنتتیک و طبیعی در فرمولاسیون سوسیس از تغییرات نامطلوب بافتی طی ۲۸ روز نگهداری در دمای یخچال جلوگیری می‌کند (بر خلاف شاهد). بنابراین با اندکی مطالعه بیشتر و آزمایشات پیشرفته‌تر (که مقالات آن در قالب طرح پژوهشی، چاپ شده و یا خواهد شد)، می‌توان نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین را در فرمولاسیون سوسیس جایگزین نیتريت سدیم کرد؛ ضمن اینکه

- solvent system. *Biotechnology Progress*, 23(4), 866-871.
- [16] Sun, W., Lin, H., Zhai, Y., Cao, L., Leng, K., and Xing, L. (2015). Separation, Purification, and Identification of (3S, 3' S) - trans-Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Separation Science and Technology*, 50(9), 1377-1383.
- [17] Hasani, Sh., Shahidi, M. and Ojagh. M. (2018). The production and evaluation of nanoliposomes containing bioactive peptides derived from fish wastes using the alkalase enzyme. *Research and Innovation in Food Science and Industry*, 8 (1), 31-44 [In Persian].
- [18] Khaleghi, A., Rezaei K., Kasai, M., Khosravi, K., and Soleymani, M. (2013). Evaluation of antioxidant properties of *Berberis crataegina* extract on fat oxidation of beef sausages during refrigerated storage. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*, 7 (5), 345-353 [In Persian].
- [19] Fayazfar, S., Khanjari, A., Gandomi, H., Akhondzadeh, A., Gholami, F., and Moghimi, N. (2021). The effect of the essential oil of zataria multiflora boiss on the shelf life of fresh turkey sausages at refrigerated temperature under aerobic packaging. *Journal of Veterinary Research*, 76 (3), 323-341 [In Persian].
- [20] Baliga, B. R., and Madaiah, N. (1970). Quality of sausage emulsion prepared from mutton. *Journal of Food Science*, 35(4), 383-385.
- [21] Fidantsi, A., and Doxastakis, G. (2001). Emulsifying and foaming properties of amaranth seed protein isolates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 21(1-3), 119-124.
- [22] Nourbehesht, N., Shekarchizadeh, H., and Soltanizadeh, N. (2019). Production and evaluation of low-fat frankfurter sausage by emulsion filled gel based on inulin and rice bran oil. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*, 14 (2), 85-94 [In Persian].
- [23] Fernández-López, J., Jiménez, S., Sayas-Barberá, E., Sendra, E., and Pérez-Alvarez, J. A. (2006). Quality characteristics of ostrich (*Struthio camelus*) burgers. *Meat Science*, 73(2), 295-303.
- [24] Farber, J. M., Malcolm, S. A., Weiss, K. F., & Johnston, M. A. (1988). Microbiological
- [7] Safari, R., Raftani Amiri, Z., Reyhani Poul, S., and Ghaffari, H. (2022). Nanoencapsulation of phycocyanin extracted from the alga *Spirulina (Spirulina platensis)* and use of resulting nanoparticles in ice cream formulation. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 123 (19), 145-159 [In Persian].
- [8] Yan, M., Liu, B., Jiao, X., and Qin, S. (2014). Preparation of phycocyanin microcapsules and its properties. *Food and Bioproducts Processing*, 92(1), 89-97.
- [9] Machado, A. R., Assis, L. M., Costa, J. A. V., Badiale-Furlong, E., Motta, A. S., Micheletto, Y. M. S., and Souza-Soares, L. A. (2014). Application of sonication and mixing for nanoencapsulation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in liposomes. *International Food Research Journal*, 21(6), 2201-2206.
- [10] Sallam, K. I. (2007). Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Food Control*, 18(5), 566-575.
- [11] Sarada, R., Vidhyavathi, R., Usha, D., and Ravishankar, G. A. (2006). An efficient method for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7585-7588.
- [12] Liu, Z. W., Zeng, X. A., Cheng, J. H., Liu, D. B., and Aadil, R. M. (2018). The efficiency and comparison of novel techniques for cell wall disruption in astaxanthin extraction from *Haematococcus pluvialis*. *International Journal of Food Science and Technology*, 53(9), 2212-2219.
- [13] Dewati, P. R., Rohman, A., and Budiman, A. (2020). A Preliminary Study of Extraction and Purification Processes of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* a Natural Antioxidant. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 778, No. 1, p. 012032). IOP Publishing.
- [14] Yuan, J. P., and Chen, F. (2000). Purification of trans-astaxanthin from a high-yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Food Chemistry*, 68(4), 443-448.
- [15] Kang, C. D., and Sim, S. J. (2007). Selective extraction of free astaxanthin from *Haematococcus* culture using a tandem organic

- [29] Korkeala, H. J., and Björkroth, K. J. (1997). Microbiological spoilage and contamination of vacuum-packaged cooked sausages. *Journal of Food Protection*, 60(6), 724-731.
- [30] Feng, C. H., Sun, D. W., Martín, J. F. G., and Zhang, Z. H. (2013). Effects of different cooling methods on shelf-life of cooked jumbo plain sausages. *LWT-Food Science and Technology*, 54(2), 426-433.
- [31] Mohammadpourfard, I., Khanjari, A., Akhonzadeh Basti, A., Herrero-Latorre, C., Shariatifar, N., and Hosseini, H. (2021). Evaluation of microbiological, chemical, and sensory properties of cooked probiotic sausages containing different concentrations of astaxanthin, thymol, and nitrite. *Food Science and Nutrition*, 9(1), 345-356.
- [32] Abdelmalek, B. E., Sila, A., Ghilissi, Z., Taktak, M. A., Ayadi, M. A., and Bougatef, A. (2016). The influence of natural astaxanthin on the formulation and storage of marinated chicken steaks. *Journal of Food Biochemistry*, 40(4), 393-403.
- [33] Irna, C., Jaswir, I., Othman, R., and Jimat, D. N. (2017). Document details. *International Food Research Journal*, 24, 508-513.
- [34] Suganya, V., and Asheeba, S. (2015). Antioxidant and antimicrobial activity of astaxanthin isolated from three varieties of crabs. *International Journal of Recent Scientific Research*, 6(10), 6753-6758.
- quality of fresh and frozen breakfast-type sausages sold in Canada. *Journal of Food Protection*, 51(5), 397-401.
- [25] Koutsoumanis, K., Lampropoulou, K., and Nychas, G. J. E. (1999). Biogenic amines and sensory changes associated with the microbial flora of Mediterranean gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) stored aerobically at 0, 8, and 15 C. *Journal of Food Protection*, 62(4), 398-402.
- [26] Hosseini, H., Ahmadi, H., Akhavan, H., Ferdowsi, R., Khaksar, R., Shahraz, F., and Kamran, M. (2008). The growth pattern of aerobic mesophilic microorganisms, psychrophilic, mold and yeast in 4 groups of heated red meat products during the storage period. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*, 3 (2), 33-40 [In Persian].
- [27] Borch, E., Nerbrink, E., and Svensson, P. (1988). Identification of major contamination sources during processing of emulsion sausage. *International Journal of Food Microbiology*, 7(4), 317-330.
- [28] Samelis, J., and Georgiadou, K. G. (2000). The microbial association of Greek taverna sausage stored at 4 and 10 C in air, vacuum or 100% carbon dioxide, and its spoilage potential. *Journal of Applied Microbiology*, 88(1), 58-68.





## Use of nanocapsules carrying astaxanthin from *Haematococcus* microalgae coated by maltodextrin-sodium caseinate as a substitute for sodium nitrite in formulation of common sausage and evaluating microbial and texture properties of the product

Yeganeh, S.<sup>1\*</sup>, Reyhani Poul, S.<sup>2</sup>

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

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

### ARTICLE INFO

### ABSTRACT

#### Article History:

Received 2022/ 09/ 10

Accepted 2022/ 12/ 03

#### Keywords:

Astaxanthin,  
Carrier nanocapsules,  
Maltodextrin,  
Sodium nitrite,  
Sausages,  
Microbial and texture characteristics

DOI: 10.22034/FSCT.19.131.143

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.131.12.3

\*Corresponding Author E-Mail:  
s.yeganeh@sanru.ac.ir

In the present research, after extracting astaxanthin from *Haematococcus* microalgae (*Haematococcus pluvialis*) and nanoencapsulation it by maltodextrin-sodium caseinate combination coating, carrier nanocapsules with different ratios replaced sodium nitrite (limit of 120 mg/kg) in the sausage formulation. Then, the microbial (count of mesophilic, psychrophilic, enterobacteriaceae, lactic acid and pseudomonas bacteria) and texture properties of the formulated sausages were evaluated and compared during the storage period (28 days at refrigerator temperature). The results showed that the treatments that were formulated with ratios of 1 (30 mg/kg) to 3 (90 mg/kg) and 1 (60 mg/kg) to 1 (60 mg/kg) of nanocapsule to sodium nitrite (C and D) have the same efficiency in terms of the ability to inhibit the growth and proliferation of bacterial groups compared to the treatment containing 120 mg/kg (A) of sodium nitrite ( $p > 0.05$ ) and in the all of storage period, the minimum count of bacteria is related to these treatments ( $p < 0.05$ ). The treatment containing 90 mg/kg of nanocapsules and 30 mg/kg of sodium nitrite (E) had the same ability as treatments A, C and D in inhibiting some bacterial groups until the middle of the storage period ( $p > 0.05$ ). Also, the count level in the treatment containing only nanocapsules (120 mg/kg, B) was significantly lower than the control ( $p < 0.05$ ). The results of measuring the texture characteristics of the treatments showed that the effect of nanocapsules carrying astaxanthin on increasing the water holding capacity of sausages and also reducing of cooking loss, hardness, gumminess, chewiness and texture cutting is more than sodium nitrite ( $p < 0.05$ ). Springiness, cohesiveness and porosity indices of sausages formulated with different proportions of nanocapsules and sodium nitrite had no significant difference ( $p > 0.05$ ) and were more favorable than the control ( $p < 0.05$ ). In the following, it was found that the texture indices of the formulated treatments (unlike the control) did not change significantly during the storage period ( $p > 0.05$ ). According to the findings, nanocapsules carrying astaxanthin have a potential to replace sodium nitrite in sausage formulation in order to improve microbial and texture properties.