بررسی امکان جایگزینی نیتریت سدیم با عصاره قارچ *گانودرمالوسیدیوم* و رنگدانه کارمین در فرمولاسیون مارتادلا

محمد مسجدی[a]، لیلا ناطقی[b] *، فاطمه کاویان[a]

[a] *دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین – پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران*
[b] *دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ورامین – پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران*

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۰۸/۲۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۱۰/۱۴
https://dorl.net/dor/20.1001.1.20080123.1402.20.3.8.0 DOI: 10.30495/jftn.2023.70300.11228

چکیده

مقدمه: هدف از این مطالعه بررسی امکان جایگزینی نیتریت سدیم با عصاره گانودرما لوسیدیوم (GLE) در فرمولاسیون مارتادلا بود.

مواد و روش‌ها: بدین منظور مقدار نیتریت سدیم مجاز در مارتادلا (۱۲۰ppm) با عصاره *گانودرما لوسیدیوم* (GLE) در مقادیر (۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد) به همراه ppm ۵۰ رنگدانه کارمین (CP) و بدون رنگدانه کارمین جایگزین گردید. بنابراین ۱۰ تیمار مطابق با طرح کاملا تصادفی طراحی گردید و میزان فلاونوئید، فنل کل، IC50، خصوصیات رنگی (L*, a*, b*)، میکروبی (شمارش کلی میکروبی، کپک و مخمر، کلی‌فرم‌ها، *کلستردیوم پرفرینجنس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*) آنها در روزهای ۱، ۲۵ و ۵۰ ام نگهداری در دمای C^{o} ۴ مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد با افزایش درصد جایگزینی (GLE) به جای نیتریت سدیم و استفاده از (CP) میزان فلاونوئید، فنل کل افزایش و IC50 کاهش یافت. با افزایش درصد جایگزینی (GLE) به جای نیتریت سدیم a*، L* کاهش و b* افزایش پیدا کرد. شایان ذکر است میزان کپک و مخمر و شمارش کلی در تمامی نمونه‌های مورد آزمون در تمامی بازه‌های زمانی در محدوده قابل قبول استاندارد ملی ایران (شماره ۲۳۰۳) بود و کلی‌فرم‌ها، *کلستردیوم پرفرینجنس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* در هیچ یک از نمونه‌های مورد بررسی در تمامی بازه‌های زمانی مشاهده نگردید.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد با استفاده از (GLE) به همراه (CP) به جای تمام یا بخشی از نیتریت سدیم مصرفی در فرمولاسیون مارتادلا می‌توان جایگزین نمود بدون اینکه اثر نامطلوب بر خصوصیات کیفی و میکروبی محصول داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: *خواص میکروبی، فنل کل، فلاونوئید، قارچ گانودرما لوسیدیوم، مارتادلا، نیتریت سدیم، IC50*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: leylanateghi@iauvaramin.ac.ir, ; Leylanateghi@yahoo.com

مقدمه

امروزه نگهدارنده‌ها نقش مهمی درعرضه غذاهای سالم و پایدار دارند. افزایش تقاضا برای غذاهای راحت و نگهداری طولانی مدت غذاهای فرآوری شده، استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی در مواد غذایی را ضروری کرده است (Richard and Paul, 2004; Sadeghi *et al*., 2013). نیترات و نیتریت سدیم به عنوان یک نگهدارنده بر علیه کلستردیوم و دیگر باکتری‌های مولد فساد مواد غذایی به کار می‌رود. مطالب زیادی در رابطه با اثر نیتریت بر سلامت انسان وجود دارد. نیتریت ممکن است در معده با ترکیبات قابل نیتروزه شدن (از قبیل آمین‌های ثانویه یا ثالثیه یا آمیدها در غذا) واکنش دهد. مشخص گردیده است که ۸۵٪ از ۲۰۹ نیتروزآمین و ۹۲٪ از ۸۶ نیتروزآمید شناخته شده دارای اثرات سرطانی‌زایی هستند. بیشتر نیتروزآمین‌ها باعث سرطان کبد می‌شوند، ولی تعدادی از آنها باعث ایجاد سرطان در عضو خاصی (مانند ریه، مثانه، مری، حفره‌های بینی و غیره) می‌شوند. تماس انسان با ترکیبات نیتروزآمین با خطر افزایش سرطان مری، معده و مثانه ارتباط داده شده است (Belitzed *et al*., 2009). گیاهان و قارچ‌ها حاوی ترکیبات موثره، از دیرباز به منظور اهداف درمانی و نیز طعم دهنده‌های غذا در سراسر جهان مورد استفاده قرار گرفته‌اند و به سبب چنین ترکیباتی، تاثیرات مثبت نگهدارندگی آنها بر غذا ها نیز به صورت ناخواسته فراهم شده است (Shan *et al*., 2011).

یکی از قارچ‌هایی که به لحاظ دارا بودن خواص درمانی متعدد به عنوان بهترین قارچ دارویی نام گذاری شده است، قارچ *گانودرما لوسیدوم*[1] (GLM) قارچی یکساله از تیره گانودرماتاسه[2] می‌باشد (Mayzumi *et al*., 1997). اندام باره یا Fruiting body، میسلیوم و اسپور (GLM) دارای ۴۰۰ ماده فعال هستند که از مهم‌ترین آنها می‌توان به تری ترپنوئیدها، پلی‌ساکاریدها، نوکلئوتیدها، استرول‌ها، استروئیدها، اسیدهای چرب، پروتئین‌ها، پپتیدها و بسیاری از مواد کمیاب دیگر اشاره کرد (Gao *et al*., 2004). پلی‌ساکاریدهای کل موجود در (GLM) شامل: β-D-گلوکان‌ها، هتروپلی‌ساکاریدها و گلیکوپروتئین‌ها هستند. پلی‌ساکارید موجود در (GLM) که دارای پیوند β (1→ 3) گلوکان هستند باعث تقویت سیستم ایمنی می‌شوند. که این پلی ساکاریدها خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی، ضدویروسی و محافظت کنندگی در برابر اشعه را دارند. Ghobadi در سال 2015 اثر ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی (GLM) در سوسیس را بررسی کردند و بیان کردند این قارچ دارای قابلیت استفاده به عنوان یک نگهدارنده طبیعی در فرآورده‌های گوشتی است.

ویژگی‌های ظاهری محصولات غذایی از عوامل مهمی است که در پذیرش آن توسط مشتری مد نظر قرار می‌گیرد. در میان این ویژگی‌ها که برای محصولات گوشتی شامل رنگ، طعم و بافت است، ویژگی رنگ، نقش مهمتری بازی می‌کند، زیرا اگر محصول رنگ نامطلوب داشته باشد، عموماً قضاوت مشتری از طعم و بافت آن نیز تحت تأثیر قرار می‌گیرد. در مورد گوشت‌های عمل آوری شده رنگ صورتی روشن آنها از فاکتورهایی است که همواره در فروش محصول مؤثر است. حذف نیتریت از فرمولاسیون محصولات گوشتی عمل‌آوری شده سبب ایجاد یک رنگ سبز مایل به خاکستری در محصول می‌شود که نامطلوب است (Pegg *et al*., 2000).

کارمین یک رنگ طبیعی است که از خالص‌سازی کوچنیل به دست می‌آید. این رنگ را به طور عمده در مواد آرایشی – بهداشتی، دسرها، کلوچه‌ها، مرباها، ژله‌ها، آبمیوه‌ها، پنیر چدار، سس‌ها، سوریمی، سوسیس‌ها، آبنبات‌ها و دیگر محصولات غذایی استفاده می‌کنند. پایداری رنگ قرمز– آبی کارمین، در حضور SO_2 آن را برای استفاده در فرآورده‌های گوشتی مناسب کرده است (Dillinger *et al*., 1974). همچنین این ترکیبات قرمز، باعث ایجاد رنگ پایدار در برابر حرارت شده که منجر به رنگ قرمز گیلاسی جذاب در گوشت پخته می‌شود که مورد پسند مصرف‌کنندگان است (Viuda-Martos *et al*., 2009).

Nateghi و همکاران (۲۰۲۱) به بررسی جایگزینی نیتریت سدیم با رنگدانه *Monascus purpureus* در سوسیس پرداختند و گزارش کردند با جایگزینی ۶۰ درصد رنگدانه *موناسکوس پورپورئوس* به جای نیتریت سدیم می‌توان یک سوسیس با خواص آنتی‌اکسیدانی، میکروبی و حسی مطلوب و قابل مقایسه با نمونه شاهد تولید نمود. Mohammadi و همکاران (۲۰۱۸) به بررسی خصوصیات

[1] *Ganoderma lucidum mushroom*

[2] Ganodermataceae

میکروبی و حسی نوعی سوسیس با استفاده از سه تیمار با ۱٪پودر گانودرما لوسیدیوم، ۰/۵ درصد پودر گانودرما لوسیدیوم +ppm ۸۰ نیتریت و ppm ۱۲۰ نیتریت پرداختند و بیان کردند در طول ۳۰ روز نگهداری در تمام فرمولاسیون‌های سوسیس شمارش کلی میکروبی کمتر از حد مجاز توصیه شده توسط استاندارد ملی ایران وجود داشت و هیچ گونه باکتری کلی‌فرم، *کلستریدیوم پرفرینجنس و استافیلوکوکوس اورئوس* یافت نشد. ارزیابی حسی نشان داد که بین نمونه‌ها از نظر بافت، طعم و بو تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. رنگ و مقبولیت کلی گروه N بالاتر و گروه N + P به گروه N نزدیک‌تر بود. Sa-Ard و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که عصاره پروتئین G. lucidum دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی است. همچنینWannasupchue و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که کاربرد G. lucidum در تولید سوسیس ماهی دودی اکسیداسیون لیپید را در طول دوره نگهداری به تاخیر می‌اندازد.

تولیدات فرآورده‌های گوشتی امروزه در دنیا بسیار رو به پیشرفت می‌باشد و این محصولات علاوه بر ویژگی‌های حسی مطلوب در مقایسه با گوشت معمولی تازه از قیمت مناسب‌تری هم برخوردار هستند. فرآورده‌های گوشتی حاوی نیتریت هستند، کاهش دادن نیتریت در امولسیون‌های گوشتی از بابت اثرات منفی یاد شده مطلوب است ولی سبب پیشرفت واکنش اکسیداسیون لیپید می‌شود، این واکنش یکی از مخرب‌ترین واکنش‌هایی است که عامل به وجود آمدن بو و طعم نامطبوع و در ادامه از بین رفتن رنگ پیگمان‌های مطلوب فرآورده‌های گوشتی می‌شود و همچنین تقاضای روز افزون مصرف‌کنندگان جهت استفاده از افزودنی‌های طبیعی به عنوان جایگزین و نگهدارنده در غذاها به دلیل ایمنی آنها نسبت به افزودنی‌های سنتزی است. اکنون نه تنها در این کشورها بلکه در اغلب کشورهای جهان ردپای قارچ‌ها را نه به جهت ارزش خوراکی به عنوان استفاده از خواص دارویی آنها می‌توان یافت. در سال‌های اخیر محققین از روش غربالگری برای استخراج ترکیبات (GLM) به عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی استفاده کردند. تلفیق (GLE)با داشتن خاصیت ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی و (CP) با ایجاد رنگدانه قرمز می‌تواند خصوصیات نیتریت سدیم را ایفا کند بدون اینکه اثر نامطلوب روی سلامت مصرف‌کننده‌ها داشته باشد. هدف از این پژوهش حذف تمام یا بخشی از نیتریت سدیم از فرمولاسیون مارتادلا و جایگزینی آن با (GLE) و (CP)، بود که برای اولین بار در ایران مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

– مواد

به منظور تهیه نمونه‌های مارتادلا ازگوشت گاو (برند استرلا، برزیل) ۵۵ درصد، روغن آفتابگردان (اویلا، ایران)، آرد گندم (کردان،ایران)، شیرخشک (پگاه، ایران)، فسفات پتاسیم (مرک، آلمان)، نمک طعام و ادویه (فلفل سیاه و قرمز و خردل) (شرکت گلها، ایران)، و سیر از بازار محلی استفاده گردید. (GLM) از عطاری واقع در قم خریداری گردید. سپس توسط هرباریوم گیاهان دارویی دانشکده داروسازی دانشگاه تهران، نام علمی آن بعنوان *گانودرما لوسیدیوم* متعلق به واریته گانودرماتاسه تایید شد.

مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمون‌ها شامل تتراسایکلین، محلول کربنات سدیم ، محلول پتاسیم استات، اتیل استات، اتانول، متانول، واکنشگر ۰/۲ نرمال فولین سیو کالتیو، اسید گالیک، آلومینیوم کلراید، کوئرستین، ۲و- ۲ دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل و محیط کشت‌های مصرفی شامل مولر هیلتون براث، Cooked Meat، DRBC Agar، Plate Count Agar، GB، VRBL، SC، و انواع محلول بافر که از شرکت مرک (آلمان) تهیه گردید.

– آماده‌سازی قارچ گانودرما لوسیدوم

ابتدا قارچ‌ها با آب شستشو داده شده، و به قطعات کوچک خرد شدند. در مرحله بعد در آون UF55/UN، شرکت Mommert (آلمان) با دمای $^{\circ}C$ ۴۵ و به مدت زمان ۲۴ ساعت خشک گردید تا به وزن ثابت رسید سپس با استفاده از آسیاب مدل ML-320P، شرکت پارس خزر (ایران) به‌صورت گرانول آردی شکل در آمد سپس به کمک مش ۱۶ الک گردید. پودر تولیدی در ظروف پلی‌اتیلنی و در جای خشک در دمای $^{\circ}C$ ۲۵ نگهداری گردید.

- استخراج عصاره از گانودرما لوسیدیوم

استخراج عصاره از (GLM) بر اساس نتایج مطالعات (Masjedi *et al*., 2022) انجام گردید. آنها گزارش کردند شرایط بهینه برای استخراج عصاره از (GLM) با بالاترین میزان ترکیبات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی به روش پیش تیمار فراصوت زمان ۱۲ دقیقه، قدرت فراصوت ۲۵۰ وات و استفاده از حلال اتانول بود. (GLE) استخراج شده در شرایط مذکور دارای میزان فلاونویید Mg/g ۱۴/۳۳۴۸، فنل کلMg/g ۲۴/۶۶۴۸وIC50, Mg/ml ۲/۳۹۸۷ بود. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی(MBC)، (GLE) استخراج شده به روش خیساندن بر علیه باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* و *اشرشیاکلای* به ترتیب µg/ml ۲۵۰۰ و ۵۰۰۰ بود. نتایج بررسی هاله عدم رشد عصاره مذکور اثرات ضدمیکروبی بیشتری بر علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با بیشترین قطر هاله‌ی عدم رشد (۱۴/۳۳mm) نسبت به *کلستریدیوم پرفرینجنس* و *اشرشیاکلای* را اثبات نمود (Masjedi *et al*., 2022).

- روش تولید نمونه مارتادلا

به منظور تهیه خمیر مارتادلا شاهد گوشت گاو ۵۵ درصد با ۸-۱۰ درصد چربی که شامل ۱/۶۵ کیلوگرم گوشت، ۰/۵۴ کیلوگرم یخ، ۰/۴۸ کیلوگرم روغن آفتابگردان، ۰/۱۵ کیلوگرم آرد گندم، ۰/۰۶ کیلوگرم شیرخشک، ۰/۰۱ کیلوگرم فسفات پتاسیم، ۰/۰۴ کیلوگرم نمک طعام و ۰/۰۵ کیلوگرم ادویه (فلفل سیاه و قرمز و خردل) ، و ۰/۰۶ کیلوگرم سیر مخلوط گردید تا ۳/۰۴ کیلوگرم خمیر به دست آمد. سپس نگه دارنده نیتریت سدیم به میزان ppm ۱۲۰ به فرمولاسیون اضافه شد. تمامی مواد در ماشین کاتر (آلفینا، آلمان) مخلوط گردیدند و در پوشش بسته بندی شدند (پوشش پلی آمید مصنوعی با قابلیت نفوذ کم آب و گاز). سپس نمونه ها در دمای°C ۷۴ پخته شدند و در زیر آب روان سرد شده و به مدت یک ماه در دمای یخچال (۴°C) نگهداری شدند (Zarringholami *et al*., 2009). نمونه‌ها پس از پر شدن در پوشش به اتاق پخت منتقل شدند. در اتاق پخت به مدت ۱ ساعت دمای مرکز محصول به °C ۷۰-۷۲ رسید و در این دما حدود ۱۵ دقیقه نگه داشته شد. سپس دمای محصول به سرعت با دوش آب سرد کاهش پیدا کرد و بلافاصله به سردخانه بالای صفر (دمای°C ۰ - ۴)، منتقل شد.

به منظور آماده سازی سایر تیمارهای مورد آزمون نیتریت سدیم مصرفی در فرمولاسیون مارتادلا با مقادیر (۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد) (GLE) به همراه ppm (CP) ۵۰ و بدون (CP) جایگزین گردید که در جدول (۱) نشان داده شد. تولید نمونه‌های مارتادلا با ۳ بار تکرار انجام شد و نمونه‌ها از نظر ویژگیهای شیمیایی (فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، مقدار کل ترکیب‌های فنولی و مقدار کل ترکیب‌های فلاونوئیدی)، رنگ (L*, a* , b*) و میکروبی در زمان‌های ۱، ۲۵ و۵۰ روز در دمای °C ۴ پس از تولید با نمونه شاهد مقایسه شدند.

جدول ۱- نمونه‌های مارتادلا حاوی غلظت‌های مختلف عصاره گانودرما لوسیدیوم، کارمین و نیتریت

Table 1- Martadella samples containing different concentrations of *Ganoderma Lucidium* extract, carmine and nitrite

Sample	Carmine pigment (ppm)	Sodium nitrite (٪)	*Ganoderma lucidium* extract (٪)
T_1	0	0	100
T_2	0	25	75
T_3	0	50	50
T_4	0	75	25
T_5	0	100	0
T_6	50	0	100
T_7	50	25	75
T_8	50	50	50
T_9	50	75	25
T_{10}	50	100	0

- آزمون‌های انجام شده بر نمونه‌های مارتادلا

- رنگ نمونه‌های مارتادلا

به منظور ارزیابی رنگ نمونه‌ها از رنگ سنج هانترلب (مدل CR400 ساخت ژاپن)، که توسط کاشی‌های سیاه و سفید استاندارد شده بود استفاده گردید. تمامی نمونه‌ها توسط دو تیغه متصل به هم با فاصله مشخص و ثابت، از وسط به صورت عرضی برش داده شدند تا دارای قطر مساوی باشند. سپس تکه‌های برش داده شده به گونه‌ای در فنجان شیشه‌ای مخصوص جای گرفتند که وقتی در محل قرارگیری نمونه دستگاه قرار داده شدند، کاملاً آن محل پوشیده شود و هیچ منفذی وجود نداشته باشد. سپس یک

ظرف سیاه رنگ و مات به اسم Light trap برای جلوگیری از تداخل نورهای خارجی، بر روی فنجان قرار داده شد و رنگ نمونه‌ها به صورت اعداد مربوط به a* , b* L*, ارزیابی شد (Viuda-Martos *et al*., 2009).

- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

توانایی دادن اتم هیدروژن یا الکترون توسط (GLM) از طریق بی رنگ شدن محلول اتانولی DPPH اندازه‌گیری گردید. ۲و- ۲ دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) یک ترکیب رادیکالی پایدار با رنگ بنفش می‌باشد که با احیا شدن توسط عناصر دهنده الکترون یا هیدروژن (ترکیبات آنتی‌اکسیدانی) به دی فنیل پیکریل هیدرازین زرد رنگ تبدیل می‌شود. در این روش به عنوان ترکیبات رادیکالی پایدار از ماده DPPH به عنوان معرف استفاده شد (Yao *et al*., 2013).

۲۰ گرم از نمونه مارتادلا به۲۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه گردیده و به مدت ۲ دقیقه با همزن به خوبی مخلوط کرده و نمونه همگن شده را به مدت ۲۰ دقیقه در سانتریفوژ با دورg ۶۰۰۰ قرار داده و ۲۵۰ میکرولیتر از محلول صاف شده عصاره را با ۳ میلی لیتر محلول ۶۰ میکرومولار DPPH در اتانول اضافه کرده و پس از نیم ساعت انکوبه کردن در تاریکی نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر در برابر شاهد قرائت شده و درصد مهار شدن رادیکال‌های آزاد با استفاده از رابطه ۱ محاسبه گردید.

رابطه ۱:

$$DPPH=\frac{Control\ absorbance(\%)-Sample\ ansorbance(\%)}{Control\ absorbance(\%)}\times 100$$

جهت بررسی بهتر فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره از فاکتور IC50 که بیانگر درصدی از عصاره که قادر به خنثی کردن ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد DPPH است، استفاده شد.

- مقدار فنل کل

۵ گرم از نمونه مارتادلا با ۲۰ میلی لیتر متانول در دو نوبت مخلوط و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و دورg ۴۵۰۰ سانتریفوژشد. عصاره متانولی حاصل با کاغذ واتمن شماره ۱ فیلتر گردید و با عصاره مرحله بعد مخلوط و در نهایت مجموع دو عصاره مجددا در دمای ۴ درجه سانتی گراد ، زمان ۱۵ دقیقه و دورg ۶۵۰۰ سانتریفوژ (مدل SW14R ، شرکت Friolabo ساخت کشور فرانسه) فیلتر گردید. از این عصاره جهت اندازه‌گیری فعالیت فنولی استفاده شد.

اندازه گیری فنل کل به کمک معرف فولین سیوکالتیو انجام گردید. بدین ترتیب ۲۰۰ میکرولیتر عصاره با ۱ میلی لیتر محلول فولین ۱۰ درصد و سپس ۸۰۰ میکرولیتر محلول بی کربنات سدیم ۱۰ درصد اضافه گردید. سپس جذب نمونه‌ها پس از ۲ ساعت در دمای اتاق توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر ماوراء بنفش (UV2100, US) در ۷۶۰ نانومتراندازه گیری گردید. نتایج به صورت مقادیر هم ارز با استاندارد اسید گالیک بیان گردید. به این صورت که میانگین جذب حاصل در معادله خط به دست آمده از ترسیم منحنی استاندارد گالیک اسید قرار داده شده و نتیجه به عنوان محتوای تام فنولی عصاره به صورت میلی گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره گزارش شد. (Ebrahimzadeh *et al*., 2009)

- مقدار فلاونوئید کل

مقدار کل ترکیب‌های فلاونوئیدی موجود در فلاونوئید مارتادلا طریق رنگ سنجی اندازه‌گیری گردید. ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره تهیه شده در روش قبلی درون لوله آزمایش در ۱/۵ میلی‌لیتر متانول حل شده سپس ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول پتاسیم استات ۱ مولار به آن اضافه گردید. در نهایت ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر به آن‌ها اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و بعد جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری خوانده شد. کوئرستین به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده گردید. مقدار فلاونوئید براساس میزان میلی‌گرم معادل کوئرستین در گرم نمونه خشک بیان شد(Chang *et al*., 2002).

- آزمون میکروبی

آزمایش‌های میکروبی مطابق با استانداردهای عنوان شده در استاندارد شماره ۲۳۰۳ (سوسیس و کالباس – ویژگی‌ها و روش‌های آزمون) انجام شد. طبق این

استاندارد، شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها، حضور یا عدم حضور کپک و مخمر، کلی‌فرم، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *کلستریدیوم پرفرینجنس* مورد بررسی قرار گرفت.

- شمارش کلی میکروارگانیسم ها

۱ گرم از نمونه را با قاشقک فلزی استریل برداشته و در بشر با ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی ریخته شد و کاملا همگن شد. بدین ترتیب، رقت ۰/۱ بدست آمد. برای رقت ۰/۰۱، با استفاده از یک پیپت سترون، یک میلی‌لیتر از رقت ۰/۱ را به لوله‌ی حاوی ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی اضافه نموده و توسط ورتکس، همگن کرده و برای تهیه رقت ۰/۰۰۱، ۱ میلی‌لیتر ازاین رقت به لوله محتوی ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی اضافه شده و رقت‌های لازم راتا رقت 10^{-4} تهیه شد. محیط کشت پلیت کانت آگار[1] طبق دستوالعمل ساخت تهیه شد. از رقت‌های تهیه شده، ۰/۱ میلی‌لیتر را برداشته و در آنها به روش کشت سطحی کشت داده شدند. قبل از برداشتن نمونه از هر رقت به منظور همگن سازی، لوله به خوبی تکان داده شد. درب پلیت‌ها را گذاشته (در کنار شعله) و پلیت‌ها به مدت ۳-۲ روز در دمای C° ۲۵-۲۷ انکوباتورگذاری شدند. پلیت‌هایی برای شمارش انتخاب شدند که دارای ۳۰۰-۳۰ کلنی باشند (استاندارد ملی ۲-۵۲۷۲، ۱۳۹۳).

عکس میزان تلقیح × عکس رقت × تعداد کلنی =تعداد شمارش کلی در هر گرم(Cfu/g)

- شمارش کپک و مخمر

۱ گرم از نمونه را با قاشقک فلزی تمیز برداشته و در بشر با ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی ریخته شد و به خوبی همگن شد. بدین ترتیب، رقت ۰/۱ بدست آمد. برای رقت ۰/۰۱، با استفاده از یک پیپت سترون، یک میلی‌لیتر از رقت ۰/۱ را به لوله‌ی حاوی ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی اضافه نموده و توسط ورتکس، همگن گردید. برای تهیه رقت ۰/۰۰۱، ۱cc میلی‌لیتر ازاین رقت به لوله محتوی ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی اضافه شده و رقت‌های لازم راتا رقت 10^{-4} تهیه شد. از قبل پلیت‌های محتوی محیط کشت دیکلوران رز بنگال کلرامفنیکول آگار[2]، تهیه شدند. محیط کشت طبق دستوالعمل ساخت تهیه شد. از رقت‌های تهیه شده، ۰/۱ میلی‌لیتر را برداشته و در آنها به روش کشت سطحی کشت داده شدند. قبل از برداشتن نمونه از هر رقت به منظور همگن سازی، لوله به خوبی تکان داده شد. درب پلیت‌ها را گذاشته (در کنار شعله) و پلیت‌ها به مدت ۳-۲ روز در دمای C° ۲۵-۲۷ انکوباتورگذاری شدند. پلیت‌هایی برای شمارش انتخاب شدند که دارای ۳۰۰-۳۰ کلنی باشند (استاندارد ملی ۱- ۱۰۸۹۹، ۱۳۸۷).

عکس میزان تلقیح × عکس رقت × تعداد کلنی =تعداد مخمر و کپک در هر گرم (Cfu/g)

- شمارش استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت

۱۰ میلی‌لیتر از محلول جیولیتی کانتونی براث[3] را در لوله آزمایش به رقت 10^{-1} تهیه شده در مرحله اول، هم حجم کرده و بعد از ۲۴-۴۸ ساعت گرمخانه گذاری، ۱ لوپ از محلول جیولیتی کانتونی براث به محیط کشت برد پارکر برده شد. در صورت مشاهده شدن نقاط سیاه محصول حاوی *استافیلوکوکوس* می‌باشد (استاندارد ملی ۳-۶۸۰۶، ۱۳۸۴).

- شمارش کلی‌فرم

۱ میلی‌لیتر از لوله آزمایش به رقت 10^{-1} تهیه شده در مرحله اول، به محیط کشت ویولت رد بایل آگار[4] برده شد و ۲۴-۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. در صورت مشاهده شدن کلنی قرمز محصول حاوی کلی‌فرم می‌باشد (استاندار ملی ۱۱۱۶۶، ۱۳۸۷).

- شمارش کلستریدیوم پرفرینجنس

۱ میلی‌لیتر از لوله آزمایش به رقت 10^{-1} تهیه شده در مرحله اول، به لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر گوشت پخته[5] برده شد و بعد از ۲۴-۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در شرایط بی‌هوازی، ۱ لوپ از محلول کوک میت به محیط کشت سلنیت سیستئین آگار[6] انتقال داده شد. در صورت مشاهده شدن نقاط سفید محصول حاوی *کلستریدیوم* می‌باشد (استاندارد ملی۹۴۳۲، ۱۳۸۶).

- تجزیه و تحلیل آماری

برای طراحی تیمارها با استفاده از طرح کاملاً تصادفی، ۱۰ تیمار طراحی گردید. آزمون‌ها با سه تکرار انجام گردید

[1] PCA [2] DRBC [3] GB [4] VRBL [5] Cooked Meat [6] Sc

به منظور تحلیل نتایج از آنالیز واریانس دانکن یک طرفه (One Way Anova) و دو طرفه (Two Way Anova) در نرم افزار مینی تب ۱۶ استفاده گردید.

یافته‌ها

– شاخص‌های رنگی *b ،*a و *L مارتادلا حاوی غلظت‌های متفاوت عصاره قارچ گانودرما لوسیدیوم، رنگدانه کارمین و نیتریت سدیم

رنگ یکی از ویژگی‌های ظاهری مواد غذایی است که درک کیفی مصرف کننده از محصول را تحت تأثیر قرار می‌دهد و در پذیرش محصول توسط مصرف کننده نقش به سزایی ایفا می‌کند. شکل **۱** تغییرات میزان شاخص‌های رنگی *a، *b و*L ،نمونه‌های مارتادلا حاوی غلظت‌های متفاوت (GLE)، (CP) و نیتریت سدیم طی ۵۰ روز نگهداری را نشان می‌دهد. مطابق با نتایج میزان شاخص‌های رنگی a^*، b^*، L^* نمونه‌های مارتادلا حاوی درصدهای متفاوت (GLE)، (CP) و نیتریت سدیم طی ۵۰ روز نگهداری، بطور معنی‌داری ($p\leq۰/۰۵$) کاهش یافت.

نتایج نشان داد با کاهش نیتریت سدیم، میزان شاخص رنگی *a، کاهش یافت. بالاترین میزان شاخص رنگی*a (۱۳/۲۸) متعلق به نمونه مارتادلا حاوی (CP) ۵۰ppm، ۱۰۰ درصد نیتریت سدیم بدون(GLE) و پائین‌ترین میزان شاخص رنگی*a (۶/۲۷) متعلق به نمونه مارتادلا حاوی ۱۰۰ درصد (GLE)، بدون (CP) و نیتریت سدیم در روز۵۰ ام نگهداری بود که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری ($p\leq۰/۰۵$) داشت.

بین میزان درصد نیتریت سدیم و شاخص رنگی*b رابطه عکس وجود داشت با کاهش نیتریت سدیم، میزان شاخص رنگی*b، افزایش یافت. کمترین میزان شاخص رنگی b^* (۱۷/۷۹) متعلق به نمونه مارتادلا حاوی (CP)۵۰ppm ، ۱۰۰ درصد نیتریت سدیم بدون (GLE) بالاترین میزان شاخص رنگی b^* (۲۱/۴۷) متعلق به نمونه مارتادلا حاوی ۱۰۰ درصد (GLE)، بدون (CP) و نیتریت سدیم در روز ۵۰ام نگهداری بود که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری ($p\leq۰/۰۵$) داشت.

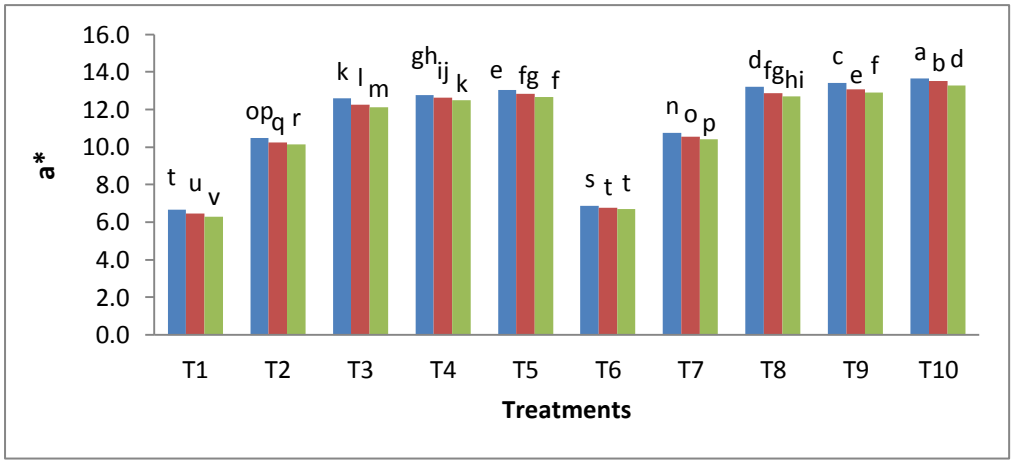
همچنین بالاترین میزان شاخص رنگی*L (۵۷/۶۵) متعلق به نمونه مارتادلا حاوی ۱۰۰ درصد نیتریت سدیم و بدون (GLE) و (CP) و پایین‌ترین میزان شاخص رنگی*L (۴۰/۳۲) در نمونه مارتادلا حاوی (CP) ۵۰ppm، ۱۰۰درصد (GLE) و بدون نیتریت سدیم در روز۵۰ ام نگهداری بود که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری ($p\leq۰/۰۵$) داشت. بنابراین با کاهش نیتریت میزان شاخص رنگی *L کاهش یافت.

– ترکیب‌های فلاونوئیدی مارتادلا حاوی غلظت‌های متفاوت عصاره قارچ گانودرما لوسیدیوم، رنگدانه کارمین و نیتریت سدیم

جدول (۲) بررسی تغییرات میزان ترکیب‌های فلاونوئیدی، نمونه‌های مارتادلا حاوی غلظت‌های متفاوت (GLE)، (CP) و نیتریت سدیم طی ۵۰ روز نگهداری را نشان می‌دهد. مطابق با نتایج با افزایش(GLE) و افزودن (CP) ۵۰ ppm میزان فلاونوئید در تمامی تیمارها به طور معنی‌داری افزایش پیدا نمود($p\leq۰/۰۵$) . به طوری که کمترین میزان ترکیب‌های فلاونوئیدی (۵/۳۳ mg/g) متعلق به نمونه مارتادلا حاوی ۱۰۰ درصد نیتریت سدیم و بالاترین میزان ترکیب‌های فلاونوئیدی (۱۹/۴۹ mg/g) در نمونه مارتادلا حاوی(CP) ۵۰ppm، ۱۰۰درصد (GLE) در روز ۵۰ ام نگهداری مشاهده گردید که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری ($p\leq۰/۰۵$) داشت.

– فنل کل مارتادلا حاوی غلظت‌های متفاوت عصاره قارچ گانودرما لوسیدیوم، رنگدانه کارمین و نیتریت سدیم

جدول (۳) بررسی تغییرات میزان فنل کل، نمونه‌های مارتادلا حاوی غلظت‌های متفاوت (GLE)، (CP) و نیتریت سدیم طی ۵۰ روز نگهداری را نشان می‌دهد. طبق نتایج با افزایش (GLE) و افزودن (CP) ۵۰ ppm میزان فنل کل در تمامی تیمارها به طور معنی‌داری ($p\leq۰/۰۵$) افزایش پیدا نمود. به طوری که بالاترین میزان فنل کل (۲۶/۵۵ mg/g) متعلق به نمونه مارتادلا حاوی (CP) ۵۰ppm، ۱۰۰ درصد (GLE) و بدون نیتریت سدیم و کمترین میزان فنل کل (۴/۹ mg/g) متعلق به نمونه مارتادلا حاوی ۱۰۰ درصد نیتریت سدیم و بدون (GLE) و (CP) در روز۵۰ ام مشاهده گردید که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری ($p\leq۰/۰۵$) داشت.



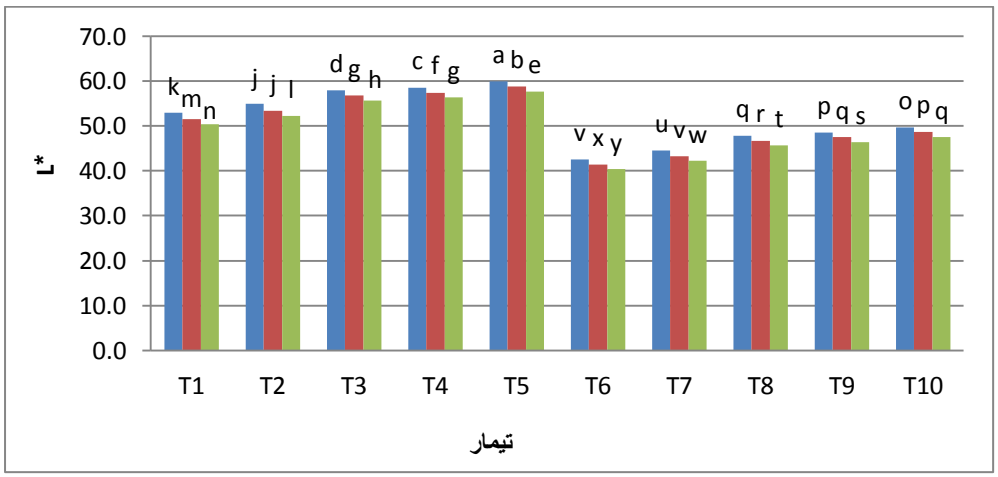


Figure 1- Changes in the amount of color indices a*, b* and L* Martadella samples containing different concentrations of *Ganoderma Lucidium* mushroom, carmine pigment and sodium nitrite during 50 days of storage
Different small letters indicate the difference in meaning in each column
Column chart of day 1 in blue, day 25 in red and day 50 in green

شکل ۱- تغییرات میزان شاخص‌های رنگی a*، b* و L* نمونه‌های مارتادلا حاوی غلظت‌های متفاوت عصاره قارچ *گانودرما لوسیدیوم*، رنگدانه کارمین و نیتریت سدیم طی ۵۰ روز نگهداری
حروف متفاوت کوچک نشانگر اختلاف معنی‌ار در هر ستون می باشد
نمودار ستونی روز ۱ام به رنگ آبی، روز ۲۵ام به رنگ قرمز و روز ۵۰ام به رنگ سبز

جدول ۲- بررسی تغییرات میزان ترکیب‌های فلاونوئیدی، نمونه‌های مارتادلا حاوی غلظت‌های متفاوت عصاره قارچ *گانودرما لوسیدیوم*، رنگدانه کارمین و نیتریت سدیم طی ۵۰ روز نگهداری

Table 2- Examination of changes in the amount of flavonoid compounds, Martadella samples containing different concentrations of *Ganoderma Lucidium* mushroom extract, carmine pigment and sodium nitrite during 50 days of storage

Sample	Carmine pigment (ppm)	Sodium nitrite (%)	*Ganoderma lucidium extract* (%)	1 Day	25 Day	50 Day
T_1	0	0	100	20.52 ± 0.17^{bA}	19.45 ± 0.14^{bB}	17.96 ± 0.25^{bC}
T_2	0	25	75	18.39 ± 0.16^{dA}	17.33 ± 0.05^{dB}	16.32 ± 0.52^{cC}
T_3	0	50	50	12.55 ± 0.19^{fA}	13.17 ± 0.12^{fB}	12.24 ± 0.32^{eC}
T_4	0	75	25	10.28 ± 0.12^{hA}	9.09 ± 0.02^{hB}	8.32 ± 0.47^{gC}
T_5	0	100	0	6.66 ± 0.16^{jA}	5.70 ± 0.07^{jB}	5.33 ± 0.14^{iC}
T_6	50	0	100	21.64 ± 0.07^{aA}	20.85 ± 0.07^{aB}	19.49 ± 0.53^{aC}
T_7	50	25	75	19.70 ± 0.08^{cA}	18.63 ± 0.11^{cB}	17.36 ± 0.36^{bC}
T_8	50	50	50	16.22 ± 0.05^{eA}	15.34 ± 0.09^{eB}	14.30 ± 0.27^{dC}
T_9	50	75	25	11.44 ± 0.10^{gA}	10.16 ± 0.03^{gB}	9.03 ± 0.06^{fC}
T_{10}	50	100	0	7.09 ± 0.09^{iA}	6.89 ± 0.01^{iB}	6.05 ± 0.05^{hC}

نتایج به‌صورت میانگین ±انحراف معیار نشان داده‌شده است.

حروف متفاوت کوچک نشانگر اختلاف معنی‌دار ($p\leq$۰/۰۵) در هر ستون می‌باشد.

حروف متفاوت بزرگ نشانگر اختلاف معنی‌دار ($p\leq$۰/۰۵) در هر سطر می‌باشد.

۱۰۰ درصد نیتریت سدیم معادل ۱۲۰ppm نیتریت سدیم.

The results are shown as mean ± standard deviation.
Small different letters indicate significant differences ($p\geq0.05$) in each column.
Different capital letters indicate significant differences ($p\geq0.05$) in each row.
100% of sodium nitrite is equivalent to 120 ppm of sodium nitrite.

جدول ۳- بررسی تغییرات میزان فنل کل ،نمونه‌های مارتادلا حاوی غلظت‌های متفاوت عصاره قارچ *گانودرما لوسیدیوم*، رنگدانه کارمین و نیتریت سدیم طی ۵۰ روز نگهداری

Table 3- Examining the changes in the amount of total phenol, Martadella samples containing different concentrations of *Ganoderma Lucidium* mushroom extract, carmine pigment and sodium nitrite during 50 days of storage

Sample	Carmine pigment (ppm)	Sodium nitrite (%)	*Ganoderma lucidium extract* (%)	1 Day	25 Day	50 Day
T_1	0	0	100	27.50 ± 0.24^{bA}	26.96 ± 0.12^{aB}	24.79 ± 0.81^{bC}
T_2	0	25	75	26.56 ± 0.20^{cA}	25.30 ± 0.85^{bB}	23.75 ± 0.59^{cC}
T_3	0	50	50	19.57 ± 0.17^{fA}	18.84 ± 0.55^{dB}	16.83 ± 0.62^{eC}
T_4	0	75	25	9.27 ± 0.15^{hA}	8.46 ± 0.47^{fB}	6.93 ± 0.50^{gC}
T_5	0	100	0	5.31 ± 0.19^{jA}	4.95 ± 0.10^{gB}	3.84 ± 0.05^{iC}
T_6	50	0	100	28.26 ± 0.08^{aA}	27.55 ± 0.48^{aB}	26.55 ± 0.22^{aC}
T_7	50	25	75	25.74 ± 0.09^{dA}	24.47 ± 0.28^{cB}	23.55 ± 0.42^{cC}
T_8	50	50	50	20.23 ± 0.09^{eA}	19.37 ± 0.39^{dB}	18.47 ± 0.35^{dC}
T_9	50	75	25	10.17 ± 0.07^{gA}	9.65 ± 0.28^{eB}	8.55 ± 0.36^{fC}
T_{10}	50	100	0	6.40 ± 0.19^{iA}	5.24 ± 0.17^{gB}	4.90 ± 0.02^{hC}

نتایج به صورت میانگین ±انحراف معیار نشان داده شده است.

حروف متفاوت کوچک نشانگر اختلاف معنی‌دار ($p\leq$۰/۰۵) در هر ستون می‌باشد.

حروف متفاوت بزرگ نشانگر اختلاف معنی‌دار ($p\leq$۰/۰۵) در هر سطر می‌باشد.

۱۰۰ درصد نیتریت سدیم معادل ۱۲۰ppm نیتریت سدیم.

The results are shown as mean ± standard deviation.
Small different letters indicate significant differences ($p\geq0.05$) in each column.
Different capital letters indicate significant differences ($p\geq0.05$) in each row.
100% of sodium nitrite is equivalent to 120 ppm of sodium nitrite.

– IC50 مارتادلا حاوی غلظت‌های متفاوت عصاره قارچ گانودرما لوسیدیوم، رنگدانه کارمین و نیتریت سدیم

جدول (۴) بررسی تغییرات میزان IC50 ،نمونه‌های مارتادلا حاوی غلظت‌های متفاوت (GLE)، (CP) و نیتریت سدیم طی ۵۰ روز نگهداری را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد میزان IC50 طی زمان نگهداری به طور معنی‌داری ($p\leq$۰/۰۵) افزایش پیدا نمود. با توجه به اینکه IC50 بیانگر غلظتی از عصاره می باشد که توانایی حذف ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد را داراست با افزایش زمان به دلیل افزایش فرآیندهای اکسیداسیون چربی و پروتئین طی دوره نگهداری و کاهش ترکیبات آنتی‌اکسیدانی تولید رادیکال‌های آزاد بیشتر و میزان IC50 افزایش یافت.

مطابق با نتایج با افزایش غلظت (GLE) و افزودن (CP) ۵۰ ppm میزان IC50 به طور معنی‌داری ($p\leq$۰/۰۵) کاهش پیدا نمود. به طوری که بالاترین میزان IC50, (۲۰/۱۰mg/ml) متعلق به نمونه مارتادلا حاوی ۱۰۰درصد نیتریت سدیم و کمترین میزان IC50 (۷/۴۶mg/ml) در نمونه مارتادلا حاوی (CP)۵۰ ppm ، ۱۰۰ درصد (GLE) در روز ۵۰ام نگهداری بود که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری ($p\leq$۰/۰۵) داشت.

– بررسی میکروبی مارتادلا حاوی غلظت‌های متفاوت عصاره قارچ گانودرما لوسیدیوم، رنگدانه کارمین و نیتریت سدیم

۱- بررسی شمارش کپک و مخمر مارتادلا حاوی غلظت‌های متفاوت عصاره قارچ *گانودرما لوسیدیوم*، رنگدانه کارمین و نیتریت سدیم

جدول ۵ بررسی تغییرات میزان شمارش کپک و مخمر، نمونه‌های مارتادلا حاوی غلظت‌های متفاوت (GLE) ، (CP) و نیتریت سدیم طی ۵۰ روز نگهداری را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد میزان کپک و مخمر طی دوره نگهداری در نمونه‌های مارتادلا که ۷۵ و ۱۰۰ درصد نیتریت سدیم مصرفی در فرمولاسیون شاهد با عصاره گانودرما لوسیدیوم جایگزین شده بود مشاهده گردید. بالاترین میزان کپک ومخمر (۸۶/۳۳ cfu/g) متعلق به نمونه ۱۰۰ درصد (GLE) و بدون (CP) و نیتریت سدیم طی ۵۰ روز نگهداری بود. همچنین پس از ۵۰ روز نگهداری کپک و مخمر در نمونه‌های مارتادلا که حاوی ۵۰، ۷۵، ۱۰۰درصد از نیتریت سدیم با (GLE) جایگزین شده بودند، مشاهده نگردید.

۲- بررسی شمارش کلی‌میکروارگانیسم‌ها مارتادلا حاوی غلظت‌های متفاوت عصاره قارچ *گانودرما لوسیدیوم*، رنگدانه کارمین و نیتریت سدیم

جدول ۶ بررسی تغییرات میزان شمارش کلی میکروارگانیسم ها، نمونه‌های مارتادلا حاوی غلظت‌های متفاوت (GLE)، (CP) و نیتریت سدیم طی ۵۰ روز نگهداری را نشان داد.

طبق نتایج میزان شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها، نمونه‌های مارتادلا حاوی غلظت‌های متفاوت (GLE)، (CP) و نیتریت سدیم طی ۵۰ روز نگهداری، بطور معنی‌داری ($p\leq$۰/۰۵) افزایش یافت. به طوری که بالاترین میزان شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها (۳/۵۹ /glog CFU) متعلق به نمونه مارتادلا حاوی ۱۰۰ درصد (GLE) و کمترین میزان شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها (log ۳/۰۰/g CFU) مربوط به نمونه حاوی ۱۰۰ درصد نیتریت و(CP) ۵۰ppm در روز ۵۰ ام نگهداری بود.

۳- بررسی میکروب‌های کلی‌فرمی، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *کلستریدیوم پرفرینجنس* مارتادلا حاوی غلظت‌های متفاوت عصاره *قارچ گانودرما لوسیدیوم*، رنگدانه کارمین و نیتریت سدیم

بررسی نتایج میکروبی مارتادلا حاوی غلظت‌های متفاوت (GLE)، (CP) و نیتریت سدیم نشان داد که میکروب‌های کلی‌فرمی، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *کلستریدیوم پرفرینجنس* در هیچ کدام از تیمارهای مورد بررسی مشاهده نگردید.

بحث

در گوشت تازه رنگدانه‌های گوشت بیشتر به صورت میوگلوبین، اکسی‌میوگلوبین (میوگلوبین به همراه اکسیژن که حاوی FE^{2+} می‌باشد) و میزان کمی مت‌میوگلوبین (حاوی FE^{3+}) است. به طور کلی رنگ گوشت طی فرایند پخته شدن تحت تاثیر تولید گلوبین هموکروموژن و میزان میوگلوبین دناتوره نشده مانند اکسی‌میوگلوبین قرار می‌گیرد.

جدول ٤- بررسی تغییرات میزان IC50 ،نمونه‌های مارتادلا حاوی غلظت‌های متفاوت عصاره قارچ *گانودرما لوسیدیوم*، رنگدانه کارمین و نیتریت سدیم طی ۵۰ روز نگهداری

Table 4- Investigation of changes in IC50, Martadella samples containing different concentrations of *Ganoderma Lucidium* mushroom extract, carmine pigment and sodium nitrite during 50 days of storage

Sample	Carmine pigment (ppm)	Sodium nitrite (٪)	*Ganoderma lucidium extract* (٪)	1 Day	25 Day	50 Day
T_1	0	0	100	6.16 ± 0.05^{hC}	6.78 ± 0.26^{gB}	8.99 ± 0.15^{hA}
T_2	0	25	75	8.27 ± 0.05^{eC}	8.36 ± 0.59^{fB}	11.053 ± 0.11^{fA}
T_3	0	50	50	9.19 ± 0.07^{dC}	9.76 ± 0.30^{eB}	11.82 ± 0.20^{eA}
T_4	0	75	25	15.27 ± 0.05^{cC}	16.34 ± 0.20^{cB}	17.19 ± 0.27^{cA}
T_5	0	100	0	18.24 ± 0.11^{aC}	19.52 ± 0.40^{aB}	20.10 ± 0.09^{aA}
T_6	50	0	100	5.20 ± 0.06^{iC}	5.72 ± 0.20^{hB}	7.46 ± 0.49^{iA}
T_7	50	25	75	6.80 ± 0.07^{gC}	7.19 ± 0.08^{gB}	9.95 ± 0.20^{gA}
T_8	50	50	50	8.15 ± 0.07^{fC}	8.52 ± 0.32^{fB}	10.80 ± 0.26^{fA}
T_9	50	75	25	15.21 ± 0.07^{cC}	15.47 ± 0.31^{dB}	16.67 ± 0.47^{dA}
T_{10}	50	100	0	17.91 ± 0.03^{bC}	18.47 ± 0.30^{bB}	19.15 ± 0.06^{bA}

نتایج به‌صورت میانگین ±انحراف معیار نشان داده‌شده است.

حروف متفاوت کوچک نشانگر اختلاف معنی‌دار ($p\leq$۰/۰۵) در هر ستون می‌باشد.

حروف متفاوت بزرگ نشانگر اختلاف معنی‌دار ($p\leq$۰/۰۵) در هر سطر می‌باشد.

۱۰۰ درصد نیتریت سدیم معادل ۱۲۰ppm نیتریت سدیم.

The results are shown as mean ± standard deviation.
Small different letters indicate significant differences ($p\geq0.05$) in each column.
Different capital letters indicate significant differences ($p\geq0.05$) in each row.
100% of sodium nitrite is equivalent to 120 ppm of sodium nitrite.

جدول ۵- بررسی تغییرات میزان شمارش کپک و مخمر بر حسب لگاریتم، نمونه‌های مارتادلا حاوی غلظت‌های متفاوت عصاره قارچ *گانودرما لوسیدیوم*، رنگدانه کارمین و نیتریت سدیم طی ۵۰ روز نگهداری

Table 5- Examining the changes in mold and yeast counts in terms of logarithms, in Martadella samples containing different concentrations of *Ganoderma Lucidium* mushroom extract, carmine pigment and sodium nitrite during 50 days of storage

Sample	Carmine pigment (ppm)	Sodium nitrite (٪)	*Ganoderma lucidium extract* (٪)	1 Day (CFU/g)	25 Day (CFU/g)	50 Day (CFU/g)
T_1	0	0	100	0.00 ± 0.00^{aC}	75.33 ± 0.57^{aB}	86.33 ± 1.15^{aA}
T_2	0	25	75	0.00 ± 0.00^{aC}	39.00 ± 0.00^{cc}	42.00 ± 0.00^{cA}
T_3	0	50	50	0.00 ± 0.00^{aA}	0.00 ± 0.00^{eA}	0.00 ± 0.00^{eA}
T_4	0	75	25	0.00 ± 0.00^{aA}	0.00 ± 0.00^{eA}	0.00 ± 0.00^{eA}
T_5	0	100	0	0.00 ± 0.00^{aA}	0.00 ± 0.00^{eA}	0.00 ± 0.00^{eA}
T_6	50	0	100	0.00 ± 0.00^{aC}	68.00 ± 0.00^{bB}	76.00 ± 0.00^{bA}
T_7	50	25	75	0.00 ± 0.00^{aC}	21.00 ± 0.00^{dB}	29.00 ± 0.00^{dA}
T_8	50	50	50	0.00 ± 0.00^{aA}	0.00 ± 0.00^{eA}	0.00 ± 0.00^{eA}
T_9	50	75	25	0.00 ± 0.00^{aA}	0.00 ± 0.00^{eA}	0.00 ± 0.00^{eA}
T_{10}	50	100	0	0.00 ± 0.00^{aA}	0.00 ± 0.00^{eA}	0.00 ± 0.00^{eA}

نتایج به صورت میانگین ±انحراف معیار نشان داده شده است.

حروف متفاوت کوچک نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ستون می‌باشد.

حروف متفاوت بزرگ نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر سطر می‌باشد.

۱۰۰ درصد نیتریت سدیم معادل ۱۲۰ppm نیتریت سدیم.

The results are shown as mean ± standard deviation.
Small different letters indicate significant differences in each column.
Different capital letters indicate significant differences in each line.
100% of sodium nitrite is equivalent to 120 ppm of sodium nitrite.

جدول ٦- بررسی تغییرات میزان شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها بر حسب لگاریتم، در نمونه‌های مارتادلا حاوی غلظت‌های متفاوت عصاره قارچ *گانودرما لوسیدیوم*، رنگدانه کارمین و نیتریت سدیم طی ۵۰ روز نگهداری

Table 6- Examining the changes in total count of microorganisms in terms of logarithms, in Martadella samples containing different concentrations of *Ganoderma Lucidium* mushroom extract, carmine pigment and sodium nitrite during 50 days of storage

Sample	Carmine pigment (ppm)	Sodium nitrite (٪)	*Ganoderma lucidium extract* (٪)	1 Day (CFU/g)	25 Day (CFU/g)	50 Day (CFU/g)
T_1	0	0	100	2.95 ± 0.00^{aC}	3.34 ± 0.00^{aB}	3.59 ± 0.00^{aA}
T_2	0	25	75	2.95 ± 0.00^{aC}	3.29 ± 0.00^{cB}	3.47 ± 0.00^{cA}
T_3	0	50	50	2.95 ± 0.00^{aC}	3.22 ± 0.00^{eB}	3.47 ± 0.00^{cA}
T_4	0	75	25	2.95 ± 0.00^{aC}	3.15 ± 0.00^{gB}	3.45 ± 0.00^{dA}
T_5	0	100	0	2.95 ± 0.00^{aC}	3.00 ± 0.00^{iB}	3.30 ± 0.00^{gA}
T_6	50	0	100	2.95 ± 0.00^{aC}	3.30 ± 0.00^{bB}	3.48 ± 0.00^{bA}
T_7	50	25	75	2.95 ± 0.00^{aC}	3.27 ± 0.00^{dB}	3.457 ± 0.00^{dA}
T_8	50	50	50	2.95 ± 0.00^{aC}	3.17 ± 0.00^{fB}	3.39 ± 0.00^{eA}
T_9	50	75	25	2.95 ± 0.00^{aC}	3.09 ± 0.00^{hB}	3.34 ± 0.00^{fA}
T_{10}	50	100	0	2.95 ± 0.00^{aC}	2.99 ± 0.00^{jB}	3.00 ± 0.00^{hA}

نتایج به‌صورت میانگین ±انحراف معیار نشان داده‌شده است.
حروف متفاوت کوچک نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ستون می‌باشد.
حروف متفاوت بزرگ نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر سطر می‌باشد.
۱۰۰ درصد نیتریت سدیم معادل ۱۲۰ppm نیتریت سدیم.

The results are shown as mean ± standard deviation.
Small different letters indicate significant differences in each column.
Different capital letters indicate significant differences in each line.
100% of sodium nitrite is equivalent to 120 ppm of sodium nitrite.

نیتروزومت میوگلوبین می‌شود. سپس در شرایط احیا، به نیتروزو میوگلوبین با رنگ قرمز درخشان تبدیل می‌شود. (Aliyari *et al*., 2020). بنابراین با کاهش این عوامل فاکتور a* کاهش یافت.

در مورد فاکتور b* با وجود آنکه این شاخص به لحاظ دستگاهی در مقیاس زردی- آبی تعریف شده است بررسی این فاکتور و ارزیابی حسی بیانگر میزان قهوه‌ای بودن این محصول است (O'sullivan *et al*., 2003). طی فرآیند پخت و حرارت دهی واکنش‌های قهوه ای شدن میلارد و کاراملیزاسیون ایجاد می‌شود که بر فاکتور زردی موثر واقع می‌شود (Goli *et al*., 2021). نتایج ارزیابی شاخص b* نشان داد افزودن (GLE) منجر به افزایش آن گردیده و کاهش آن میزان این فاکتور را در مقایسه با سایر متغیرها کاهش داده است.

براساس مقایسه فاکتور شفافیت و روشنایی محصول L* با (GLE) و (CP) منجر به کاهش روشنی نمونه‌ها گردید به‌طوریکه کمترین میزان آن مربوط به نمونه مارتادلا حاوی (CP)ppm ۵۰، ۱۰۰ درصد (GLE) و بدون نیتریت اکسیداسیون و پلیمریزه شدن چربی‌ها و سایر واکنش‌هایی که پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها در آن شرکت می‌کنند در ایجاد رنگ نهایی فرآورده‌های گوشتی پخته شده اثرگذار هستند. طی گذر زمان میزان قرمزی تمامی نمونه‌های مارتادلا کاهش داشت که به علت پیشرفت واکنش‌هایی نظیر اکسیداسیون لیپیدها است. با افزایش پیشرفت واکنش‌ها در طول دوره نگهداری تجمع مت‌میوگلوبین‌ها افزایش یافته و منجر به کاهش قرمزی در تمامی نمونه ها گردیده است (Sosa-Morales *et al*., 2006).

کارمین و نیتریت از عوامل رنگ دهنده (قرمز، صورتی) به محصول هستند. کارمین رنگدانه طبیعی است که از رسوب دادن کارمینیک اسید بر روی بستر آلومینا هیدرات بدست می‌آید و از بسیاری از رنگ های سنتزی که در غذا استفاده می‌شود، پایدارتر است و در مقادیر بسیار کم، رنگ مطلوب در غذا تولید می‌کند (Delgado-Vargas *et al.*, 2002). نیتریت در اثر یک سری واکنش‌های خاص باعث رنگ صورتی در گوشت حاصل می‌شود. نیتریت موجود در نمونه‌ها تبدیل به نیتروپراکسید و در نهایت کمپلکس

عنوان یک تیمار برتر انتخاب شد بار و خواص حسی با نمونه شاهد تفاوت معنی داری نداشتند.

فلاونوئیدها به عنوان متابولیت‌های ثانویه گیاهی به شمار می‌روند و مرکب از آنتوسیانین‌ها، کاتکین‌ها، فلاونول‌ها، ایزوفلاوون‌ها و پروآنتوسیانیدن‌ها هستند که نقش مهمی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی ایفا می‌کنند (Casimir & Min, 2008). به طور طبیعی محصول گوشتی در دوره نگهداری دچار فرایندهای اکسیداسیون چربی و پروتئین شده که باعث تولید رادیکال‌های آزاد بیشتر در گذر زمان می‌گردد. از همین رو ترکیبات فلاونوئیدی با شرکت در مهار رادیکال‌های آزاد در تمامی نمونه‌های مارتادلا کاهش یافت که این کاهش در تیمارهای حاوی گانودرما به دلیل وجود ترکیبات فلاونوئیدی کمتراز سایر نمونه‌ها بود. در تایید نتایج حاصل از این پژوهش (Kebaili *et al*., 2021) و (Siangu *et al*., 2019) و (Saltarelli *et al*., 2018) مقدار ترکیبات فلاونوئیدی کل موجود در(GLM) را به ترتیب mg/g ۴۸/۲۵، ۳۱/۱۶ و ۱۷/۱۷ گزارش کردند.

از آنجا که تمام بخش‌های خوراکی (GLM) به علت داشتن ترکیبات فنولیک بالا به عنوان یک داروی سنتی استفاده شده است (Fraile-Fabero *et al*., 2021) تاثیر آن در افزایش ترکیبات فنولیک انتظار می‌رود. به طور طبیعی محصول گوشتی در دوره نگهداری دچار فرآیندهای اکسیداسیون چربی و پروتئین شده که باعث تولید رادیکال‌های آزاد بیشتر در گذر زمان می‌گردد. از همین رو ترکیبات فنلی با شرکت در مهار رادیکال‌های آزاد در تمامی نمونه‌های مارتادلا کاهش یافته است. اما این کاهش در تیمارهای حاوی (GLM) به دلیل داشتن ترکیبات فنلی کمتر از سایر نمونه‌ها اتفاق افتاد. در تایید نتایج بدست آمده، (Wannasupchue *et al*., 2011) افزایش ترکیبات فنولیک در تمامی نمونه‌های سوسیس دودی گوشت ماهی غنی شده با (GLM) ملاحظه کردند. Liu *et al*., (2020) در بررسی تاثیر اسپرودرم (GLM) بر جوجه‌های گوشتی افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مهار اکسیداتیو توسط ترکیبات فنولیک موجود در (GLM) را گزارش کردند. پژوهش (Fraile-Fabero *et al*., 2021) در بررسی ترکیبات فنولیک انواع گونه‌های (GLM)بیانگر ترکیبات فنولیک ۵۶/۸ درصد بالاتر در (GLM) در مقایسه با سایر سدیم بود. Hosseinpour *et al*., (2013) با استفاده از رنگ‌های طبیعی کوچنیل و پاپریکا در سوسیس فراکفورتر مشاهده کردند فاکتور قرمزی در نمونه‌های حاوی ۱ میلی‌گرم پاپریکا و ۴۰ میلی‌گرم نیتریت و یا تیمار حاوی ۰/۰۰۲ درصد کوچنیل و ۴۰ میلی‌گرم نیتریت مشابه نمونه‌ی حاوی ۱۲۰ میلی‌گرم نیتریت بود. در راستای نتایج بدست آمده، (Amini Sarteshnizi *et al*., 2017) مشاهده کردند که فرآیند سرخ کردن باعث افزایش رنگ قرمز قهوه ای در سوسیس‌های پری‌بیوتیک شد ولی تاثیر معنی‌داری بر فاکتور روشنی نمونه‌ها نداشت. در تحقیقی مشابه توسط (Maghsoodlou *et al*., 2012) طی بررسی اثر مرزه بر سوسیس فرانکفورتر بیان کردند در تیمار حاوی نیتریت و مرزه (۲۵۰:۳۰۰ ppm) شاخص روشنایی و قرمزی افزایش یافت و غلظت‌های بالای اسانس مرزه تاثیر منفی بر تشکیل رنگ داشتند. نتایج آزمون رنگ سنجی توسط (Goli & Mohammadi Barkani, 2021) در بهینه سازی فرمولاسیون گز رژیمی نشان داد که با افزایش درصد استویا و گانودرما شاخص (L^*) و (b^*) کاهش و شاخص a^* افزایش یافت. (Maleki, 2016) جهت جایگزینی نیتریت با عصاره کرفس در سوسیس کوکتل گوشت مرغ کاهش و افزایش به ترتیب قرمزی و زردی را گزارش نمود. در مطالعه‌ای دیگر توسط (Zhou *et al*., 2012) در جایگزینی چربی با (GLM) در سوسیس گوشت خوک، کاهش قرمزی و افزایش فاکتورهای روشنی و زردی در نمونه‌های تیمار شده مشاهده کردند. Nateghi *et al*., (2010) به بررسی جایگزینی نیتریت سدیم با رنگدانه *Monascus purpureus* در سوسیس و ارزیابی خواص ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی، رنگی (L^*، a^* و b^*) و حسی آن به مدت ۳۰ روز در یخچال و مقایسه با نمونه شاهد (بدون رنگدانه *Monascus purpureus* و با ۱۰۰ درصد نیتریت) پرداختند. نتایج نشان داد شاخص L^* کاهش یافت، اما شاخص‌های a^* و b^* با جایگزینی رنگدانه *Monascus purpureus* با رنگدانه افزایش یافت. جایگزینی *Monascus purpureus* رنگدانه با نیتریت تأثیر معنی‌داری بر ویژگی‌های حسی نداشت و بار میکروبی نمونه‌های ۰، ۴۰ و ۶۰ درصد در محدوده استاندارد یافت شد. در نهایت نمونه حاوی ۶۰ درصد رنگدانه *Monascus purpureus* به دلیل خواص آنتی اکسیدانی، میکروبی به

Kunicka, 2003). همچنین آنزیم‌های موجود در فضای پری پلاسمی (فسسفاتازها وپروتئازها از گروه آنزیم‌های تجزیه‌ای و بتالاکتامازها (پنیسیلیناز) و آنزیم‌های فسفوریله‌کننده آمینوگلیکوزید از گروه آنزیم‌های سم زدا قادرند ملکول‌های وارد شده را تجزیه کنند. در مورد باکتریهای گرم مثبت مواد ضدمیکروبی به‌راحتی دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسمی را تخریب کرده که منجر به نشت سیتوپلاسم و انعقاد آن می‌شود (Duffy& Power, 2001; Negi *et al.*,2003). مکانیسم دیگر ضدمیکروبی ترکیبات فنولی توانایی آنها در شکل دهی ترکیبات محلول سنگین با پروتئین‌ها است. این ترکیبات با تخریب گیرنده‌های سطحی دیواره باکتری‌ها، در سنتز پروتئین‌ها اختلال ایجاد میکند (Almajano *et al.*, 2008). در باکتری‌های گرم مثبت تماس مستقیم ترکیبات هیدروفوب عصاره با ساختمان دیواره سلولی صورت می‌گیرد. این محل جایی است که این ترکیبات اثر خود را برجای می‌گذارند. این اثر یا به‌صورت افزایش نفوذپذیری یون‌ها و یا نشت ترکیبات حیاتی سلولی رخ می‌دهد و یا اینکه به‌صورت ناتوانی سیستم آنزیمی باکتریایی بروز می کند. برخی از محققین ارتباط بین ساختارهای شیمیایی برخی از اجزا غالب موجود در عصاره‌ها را با فعالیت ضدباکتریایی آنها گزارش نموده‌اند (Corbo *et al.*, 2008). درواقع بسیاری از ترکیبات ضدمیکروبی شامل ترپن‌ها، لکتین‌ها و پلی‌ساکاریدها هستند که بر روی غشای سیتوپلاسمی باکتری‌ها عمل می‌کند و نقش اصلی ترکیبات زیست فعال در خاصیت ضد میکروبی را ترکیبات پلی‌ساکاریدی بازی می‌کنند (Lin *et al.*, 1984). از دیگر عوامل موثر بر افزایش سرعت تخلیه انرژی متابولیکی شامل پایداری غذا نزدیک به حد آستانه برای رشد، افزایش دمای نگه‌داری، وجود ترکیبات ضدمیکروبی موجود و در نهایت صدمه به میکروارگانیسم‌ها در حد نزدیک به کشندگی می‌باشد (Leistner, 2000). لذا در مارتادلاهای تولید شده، ترکیب ضدمیکروبی (GLM) و صدمه به میکروارگانیسم‌ها با حرارت پخت، عامل کاهش بار میکروبی باشد. که طبق استاندارد ۲۳۰۳ (۱۳۹۳) حد قابل قبول برای شمارش کلی میکروب‌ها در سوسیس 10^5 CFU/g می‌باشد که شمارش کلی میکروبی تمامی تیمارهای پس از۵۰ روز نگهداری در محدوده قابل قبول استاندارد بود. بررسی نتایج میکروبی گونه‌ها بود. Masjedi *et al.* (2022) ترکیبات اصلی فنلی (GLE) استخراج شده به روش خیساندن را به روش HPLC بررسی نمودند و گزارش کردند بالاترین ترکیبات فنلی ان متعلق به گالیک اسید و کلروژنیک اسید با مقادیر ۱۸۹/۴۵ (µg/mL) و ۱۵۸/۱ (µg/mL)بود.

قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره را می‌توان به حضور گروه‌های عاملی دیگر در مولکول کامل مانند پیوندهای دوگانه و ترکیب گروه‌های هیدروکسیل و گروه‌های کتونی نسبت داد که نقش مهمی در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ایفا می‌کنند.GLM شامل بیش از چهارصد ترکیب فعال زیستی است که از آن میان می‌توان به ترپنوئیدها، استرول‌ها، استروئیدها، اسیدهای چرب، فنل‌ها، نوکلئوتیدها و مشتقات آن‌ها، گلیکوپروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها اشاره کرد. پلی‌ساکاریدهای استخراج‌شده از این قارچ به صورت هموگلوکان و هتروگلوکان قابلیت آنتی‌اکسیدانی ویژه‌ای از خود نشان می‌دهند).(Rezaei Ermi *et al*., 2015

Ghobadi و همکاران (۲۰۱۸) از (GLM) در امولسیون سوسیس به جای نیتریت استفاده کردند و افزایش خواص آنتی‌اکسیدانی محصول را بیان کردند. Tabari *et al.*, (2011) به بررسی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی ۸ غلظت (GLE) پرداختند و بیان کردند با افزایش غلظت عصاره میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد و میزان قدرت احیا افزایش می‌یابد.

طبق استاندارد ملی ۲۳۰۳، (۱۳۸۷) حد قابل قبول برای کپک و مخمر در سوسیس حداکثر 100 CFU/g می‌باشد لذا رشد کپک و مخمرها در تمامی تیمارها در محدوده قابل قبول استاندارد ملی ایران بود. علت این امر را می‌توان به دلیل حضور ترکیبات ضدمیکروبی و خاصیت آنتی اکسیدانی در عصاره گانودرما و همچنین نیتریت سدیم مصرفی دانست.

ترکیبات فنولی موجود در عصاره از طریق تغییر ساختار و عمل غشا سلولی اثرات ضدمیکروبی خود را اعمال می‌کنند. این ترکیبات با افزایش نفوذپذیری غشا منجر به افزایش حجم و متورم شدن سلول می‌شوند Ziech *et al.*, (2012). باکتری‌های گرم منفی علاوه بر پپتید و گلیکان، یک مایکولیک اسید هم دارند که سطح هیدروفیلی آن غنی از مولکول‌های لیپوپلی‌ساکاریدی می‌باشد و به‌عنوان مانع در برابر آنتی بیوتیک‌ها عمل می‌کند (Kalemba &

Amini Sarteshnizi, R., Hosseini, H., Amiri, Z., Kamili, R. & Azimi, M. (2017). Investigating the effect of frying on the texture and color of prebiotic sausage produced using beta-glucan and resistant starch. Iran food science and industry, 14(66), 174-65. [In Persian]

Belitz, H., Grosch, W. & Schieberle P. (2009). Food Chemistry, springer verlage, Berlin.

Casimir, A.C. & Min, B.M. (2008). Antioxidants in: FOOD LIPIDS Chemistry, Nutrition, and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, FL. p.409.

Chang, C., Yang, M., Wen, H. & Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis, 10, 178-182.

Corbo, M. R., Speranza, B., Filippone, A., Granatiero, S., Conte, A., Sinigaglia, M. & DelNobile, M. A. (2008). Study on the synergic effect of natural compounds on the microbial quality decay of packed fish hamburger. International Journal of Food Microbiology, 127(3), 261-267.

Dilliger, H.J. & Fengler G. (1974). Carminic acid. Turkish Journal of Biology, 30, 25-33.

Duffy, C. F. & Power, R. F. (2001). Antioxidant and antimicrobialproperties of some Chinese plant extracts. International Journal of Antimicrobial Agents, 17(6), 527-529.

Ebrahimzadeh, M.A, Pourmorad, F. & Hafezi, S. (2009). Antioxidant activities of Iranian corn silk. Turkish Journal of Biology, 32, 43-49.

Fraile-Fabero, R., Ozcariz-Fermosell, M.V., Oria-de-Rueda-Salgueiro, J.A., Garcia-Recio, V., Cordoba-Diaz, D., del P Jiménez-López, M. & Girbés-Juan, T. (2021). Differences in Antioxidants, Polyphenols, Protein Digestibility and Nutritional Profile between Ganoderma lingzhi from Industrial Crops in Asia and Ganoderma lucidum from Cultivation and Iberian Origin. Foods, 10(8),1750.

Gao,Y., Lan, J., Dai, X., Ye, J. & Zhou, S.H. (2004). A phase I/II study of Ling Zhi mushroom Ganoderma lucidum. (W. Curt.: Fr.) Lloyd (Aphyllophoromycetideae) extract in patients with type II diabetes mellitus. International Journal of Medicinal Mushrooms, 6(1), 33-40.

مارتادلا حاوی غلظت‌های متفاوت (GLE)، (CP) و نیتریت سدیم نشان داد که میکروب‌های کلیفرمی، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *کلستریدیوم‌پرفرنژنس* در هیچ کدام از تیمارهای مورد بررسی مشاهده نگردید. همسو با نتایج بدست آمده (Ghobadi *et al*., 2018) به بررسی ویژگی‌های میکروبی در امولسیون سوسیس حاوی (GLM) به جای نیتریت پرداختند و بیان کردند، *باکتری‌های کلیفرم، کلستریدیوم پرفرنژنس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در هیچ یک از نمونه‌ها یافت نشد.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش نیتریت سدیم مصرفی در فرمولاسیون مارتادلای شاهد (۱۲۰ ppm) با نسبت‌های مختلف (GLE)، (۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد) به تنهایی و به همراه (CP) ۵۰ ppm جایگزین گردید. نتایج نشان داد با افزایش درصد جایگزینی (GLE)، به جای نیتریت سدیم و استفاده از (CP) میزان فلاونوئید، فنل کل افزایش و IC50 کاهش یافت. با افزایش درصد جایگزینی (GLE) به جای نیتریت سدیم a^* و L^* کاهش و b^* افزایش پیدا کرد. شایان ذکر است میزان کپک و مخمر و شمارش کلی در تمامی نمونه‌های مورد آزمون در تمامی بازه‌های زمانی در محدوده قابل قبول استاندارد ملی ایران (شماره ۲۳۰۳) بود و کلی‌فرم‌ها، *کلستردیوم پرفرینجنس*، *استافیلوکوکوس‌اورئوس* در هیچ یک از نمونه‌های مورد بررسی در تمامی بازه‌های زمانی مشاهده نگردید. نتایج این پژوهش نشان داد با استفاده از (GLE) به همراه (CP)در فرمولاسیون مارتادلا به جای تمام یا بخشی از نیتریت سدیم مصرفی می‌توان محصولی ایمن با خواص کیفی مطلوب تر تولید نمود.

منابع

Almajano, M. P., Carbo, R., Jimenez, J.A. & Gorden, M.H. (2008). Antioxidant and Antimicrobial Activities of Tea Infusions.Food Chemistry, 108(1), 55-63.

Aliyari, P., Bakhshi Kazaj, F., Barzegar, M. & Ahmadi Gavlighi, H. (2020). Production of functional sausage using pomegranate peel and pistachio green hull extracts as natural preservatives. Journal of Agricultural Science and Technology, 22(1), 159-172.

Ghobadi, R., Mohammadi, R., Chabavizade, J. & Sami, M. (2018). Effect of Ganoderma lucidum powder on oxidative stability, microbial and sensory properties of emulsion type sausage. Advanced biomedical research. 7(24).

Ghobadi, R. (2015). Investigating the antimicrobial and antioxidant effects of Ganoderma lucidum mushroom extract and powder in sausages. Isfahan University of Medical Sciences. [In Persian]

Goli, M. & Mohammadi Barkani, Z. (2021). Optimizing the formulation of dietary gaz enriched with stevia sugar and Ganodermaulosidium mushroom by response surface method (RSM). Journal of Nutritional Sciences and Food Industries of Iran, 15(2), 55-69. [In Persian]

Hosseinpour, S., Eskandari, M.H., Mesbahi, G.R., Shokrforosh, S. & Farhanaki, A. (2013). Investigating the use of cochineal and paprika natural colors in order to create color in low-nitrite and nitrite-free frankfurter sausage. Iran Food Science and Industry Research Journal, 3 (9), 243-252. [In Persian]

Kalemba, D. & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungalproperties of essential oils. Current Medical Chemistry, 10(10), 813-829.

Kebaili, F.F., Tahar, N., Esseddik, T.M, Redouane, R., Chawki, B., Pablo, A. & Massimiliano, P. (2021). Antioxidant Activity and Phenolic Content of Extracts of Wild Algerian Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, Ganoderma lucidum (Agaricomycetes). International Journal of Medicinal Mushrooms, 23(6).

Lin, J.Y. & Chou, T.B. (1984). Isolation and characterization of a lectin from edible mushroom, Volvariella volvacea. Journal of Biochemistry, 96(1), 35-40.

Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. International Journal of Food Microbiology, 55, 181–186.

Liu, T., Zhou, J., Li, W., Rong, X., Gao, Y., Zhao, L., Fan, Y., Zhang, J., Ji, C. & Ma, Q. (2020). Effects of sporoderm-broken spores of Ganoderma lucidum on growth performance, antioxidant function and immune response of broilers. Animal Nutrition, 6(1), 39-46.

Maghsoodlou, Y., Asgharpour, A. & Aryai, P. (2012). Evaluation of antioxidant effect of savory essential oil on lipid oxidation, color and acceptability of frankfurter sausage. Journal of research and innovation in food science and industry, 2 (3), 279-294. [In Persian]

Maleki, A. (2016). Replacement of part of nitrite with celery extract as antioxidant effect and color additive in double cocktail sausage containing 55% chicken meat with cheese. Master's thesis. Mahalat Azad University. [In Persian]

Masjedi, M., Nateghi, L., Berenjy, SH. & Eshaghi, M.R. (2022). Determination of Antioxidant and Antimicrobial Compounds of Ganoderma lucidum Extract in Laboratory Different Conditions. Chemical Methodologies, 6(3), 212-227.

Mayzumi, F., Okamoto, H. & Mizuno, T. (1997). Cultivation of Reishi (Ganoderma lucidum). Food Reviw International, 13, 365 - 82.

Mohammadi, R., Ghobadi, R., Chabavizade, J. & Sami, M. (2018). Effect of Ganoderma lucidum Powder on Oxidative Stability, Microbial and Sensory Properties of Emulsion Type Sausage. Advanced biomedical research, 7, 24.

Nateghi, L., Maleki Kahaki, A.R. & Zarei, F. (2020). The Effect of Replacing Sodium Nitrite with Monascus Purpureus Pigment in German Sausage. Journal of nutrition and food security, 5 (4), 335-344.

National standard of Iran. (1400). Sausages and sausages - characteristics and test methods. First Edition. Standard No. 2303. [In Persian]

National standard of Iran. (2013). Microbiology of the food chain. Comprehensive method for enumeration of microorganisms. First edition. Standard No. 1-5272. [In Persian]

National standard of Iran. (1387). Microbiology of food and animal feed. A comprehensive method for the enumeration of molds and yeasts. First Edition. Standard number 1-10899. [In Persian]

National standard of Iran. (1387). Microbiology of food and animal feed. Comprehensive method for identification and total counting of forms. First Edition. Standard No. 11166. [In Persian]

National standard of Iran. (1386). Microbiology of food and animal feed. A comprehensive method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria under anaerobic conditions. First edition. Standard No. 9432. [In Persian]

National standard of Iran. (1384). Microbiology of food and animal feed. Staphylococcus aureus count positive coagulase. 1384. First edition. Standard number 1-6806. [In Persian]

Negi, P.S, Jayaprakasha, G. K. & Jena, B.S. (2003). Antioxidant and Antimutagenic Activities of Pomegranate Peel Extracts. Food Chemistry, 80(3), 393-397.

O'sullivan, M., Byrne, D.V., Martens, H., Gidskehaug, L.H., Andersen, H.J. & Martens, M. (2003). Evaluation of pork colour: prediction of visual sensory quality of meat from instrumental and computer vision methods of colour analysis. Meat science, 65(2), 909-918.

Pegg, R.B. & Shahidi, F. (2000). Nitrite curing of meat the n-nitrosamine problem and nitrite alternatives. Food and Nutrition Press, Inc., USA.

Piruti, K., Javadi, A. & Nahidi, F. (2016). The effect of garden thyme (Thymus vulgaria) extract on the chemical, microbial and sensory characteristics of sausages during the storage period. Health Food. 3 and 4, (15), 9-20. [In Persian]

Rezaei Ermi, S., Jafari, M., Khamari, M. & Bayat, H. (2015). Extraction of walnut shell extract of Shahmirzadi variety and the effect of solvent and extraction method on the antioxidant activity of the obtained extract. Food science and nutrition, 12(22), 85-98. [In Persian]

Sa-Ard, P., Sarnthima, R., Khammuang, S. & Kanchanarach W. (2015). Antioxidant, antibacterial and DNA protective activities of protein extracts from Ganoderma lucidum. Journal Food Science Technolgy, 52, 2966–2973.

Sadeghi, E., Hashemian, A.H., Mohammadi, M. & Mohammadi, R. (2012). Study on the microbiological and chemical characterization of the meat products consumed in Kermanshah in. Iranian Journal of Food Science and Food Technolgy, 7(5), 281-287.

Saltarelli, R., Ceccaroli, P., Lotti, M., Zambonelli, A., Buffalini, M., Casadei, L., Vallorani, L. & Stocchi, V. (2009). Biochemical characterisation and antioxidant activity of mycelium of Ganoderma lucidum from Central Italy. Food Chemistry, 116, 143 – 151.

Shan, B., Cai Y-ZH, D., Brooks, J. & Corke, H. (2011). Potential application of spice and herb extracts as natural preservatives in cheese. Journal of Medicinal Food, 14(3), 284-290.

Siangu, B.N., Sauda, S., John, M.K. & Njue, W.M. (2019). Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of selected Kenyan medicinal plants, sea algae and medicinal wild mushrooms. African Journal of Pure and Applied Chemistry, 13(3), 43-48.

Sosa-Morales, M.E., Orzuna-Espíritu, R. & Vélez-Ruiz, J.F. (2006). Mass thermal and quality aspects of deep-fat frying of pork meat. Journal of Food Engineering, 77(3), 731-738.

Tabari, S., Gurbanli, M., Safaian, S. & Mousavizadeh, A. (2011). Antioxidant properties of methanolic extract of Ganoderma Lucidium mushroom. The first national conference of biological sciences, Flowerjan. [In Persian]

Taherzadeh, A., Arianfar, A., Mahdian, A. & Mohseni, Sh. (2021). The effect of replacing sodium nitrite with zenian essential oil nanoemulsion and chitosan on some chemical characteristics and shelf life of red meat sausage at refrigerator temperature. Iran food science and industry, 18 (117), 247-263. [In Persian]

Viuda-Martos, J., Fernández-López, E., Sayas-Barbera, E., Sendra, C. & Navarro, J.A. (2009). Pérez-Álvarez Citrus co-products as technological strategy to reduce residual nitrite content in meat products. Journal Food Science, 74 (8), 93-100.

Wannasupchue, W., Siriamornpun, S., Huaisan, K. & Huaisan, J. (2011). Effect of adding Ling-zhi (Ganoderma lucidum) on oxidative stability, textural and sensory properties of smoked fish sausage. Thai Journal of Agricultural Science, 44(5), 505-512.

Yao, X., Zhang, D., Zu, Y., Fu, Y., Luo, M., Gu, C., Li, C. M. F. & Efferth, T. (2013). Free radical scavenging capability, antioxidant activity and chemical constituents of Pyrola incarnata Fisch. Leaves. Industrial Crops Products, 49, 247– 255.

Zarringhalami, S., Sahari, M.A. & Hamidi-Esfehani, Z. (2009). Partial replacement of nitrite by annatto as a colour additive in sausage. Meat Science, 81(1), 281-284.

Ziech, D., Anestopoulos, I., Hanafi, R., Voulgaridou, G.P, Franco, R., & Georgakilas, A. G. (2012). Pleiotrophic effects of natural products in ROS inducedcarcinogenesis: the role of plant-derivednatural products in oral

Backfat with Ganoderma Lucidum polysaccharides on Characteristic Properties of Pork Sausages. Food Research and Development.7.

cancer chemoprevention, Cancer Letters, 327(1), 16-25.

Zhou, c.l., Tang, Z., Ruan, M.M., Liu, J.H. & Ma, D.R. (2012). Effect of Replacement of

Investigating the Possibility of Replacing Sodium Nitrite with *Ganoderma Luciidium* Mushroom Extract and Carmine Pigment in Martadella Formulation

M. Masjedi [a], L. Nateghi [b] *, F. Kavian [a]

[a] PhD of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

[b] Associate Professor of the Department of Food Science and Technology, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

Received: 20 November 2022 Accepted: 2 January 2023

Abstract

Introduction: The aim of this study was to investigate the possibility of replacing sodium nitrite with *Ganoderma Lucidium* extract (GLE) in Martadella formulation.

Materials and Methods: In order to, concentration of sodium nitrite allowed in Martadella (ppm 120) was replaced by *Ganoderma Lucidium* extract at different concentration (25, 50, 75 and 100%) with 50 ppm carmine pigment (CP) and without carmine pigment. Therefore, 10 treatments were designed according to a completely randomized design and the amount of flavonoid, total phenol, IC50, color characteristics (b*, L*, a*), microbial (total microbial count, *mold* and *yeast*, *coliforms*, *Clostridium perfringens* , *Staphylococcus aureus*) were evaluated on the 1st, 25th and 50th days of storage at 4°C.

Results: The results showed that with the increase in replacement percentage (GLE) the amount of flavonoid, total phenol increased and IC50 decresed. Also, with the increase of replacement percentage (GLE), a* and L* decreased and b* increased. The amount of *mold* and *yeast* and the total count in all the tested samples were within the acceptable range of the national standard of Iran (No. 2303) and *coliforms*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus* were not observed in any of the tested samples.

Conclusion: The results of this research indicated that by using (GLE) along with (CP) it can be used instead of all or part of the sodium nitrite used in Martadella formulation might be replaced, without having an adverse effect on the quality and microbial properties of the product.

Keywords*: Flavonoid, IC50, Ganoderma Lucidium Mushroom, Martadella, Microbial Properties, Sodium Nitrite, Total Phenol.*

* Corresponding Author: leylanateghi@iauvaramin.ac.ir, Leylanateghi@yahoo.com