(مقاله پژوهشی)

ارزیابی عصاره گیاه پونه‌کوهی *Mentha pulegium* و ورکوآز بومی ایران *Allium sativum controversum* بر ویژگی‌های میکروبی سوسیس

عادله مدنی[۱]، نسرین چوبکار[۲*]

۱-گروه علوم و صنایع غذایی، واحد محلات، دانشگاه آزاد اسلامی، محلات، ایران.
۲-گروه شیلات، دانشکده کشاورزی، واحدکرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۱۸

چکیده

در سال‌ها اخیر، استفاده از منابع ترکیبات زیست فعال در فرمولاسیون گوشت و فرآورده‌های گوشتی مورد توجه متخصصین بوده است. این پژوهش، در دو فاز انجام گردید. در فاز اول، عصاره‌های آبی، اتانولی و آبی ـ اتانولی گیاه کمتر شناخته شده و ورکوآز(گونه‌ای از سیر وحشی) و پونه‌کوهی به روش خیساندن استخراج شده و مقادیر فنول کل، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها مورد سنجش قرارگرفت. نتایج فاز اول نشان داد که عصاره اتانولی هر دو گیاه، بیشترین میزان فنول کل، فلاونوئید و فعالیت آنتی اکسیدانی را داشت و در نتیجه، این عصاره جهت تزریق به فرمولاسیون سوسیس در سطوح ۰/۵ ، ۱ و ۱/۵ درصد انتخاب گردید. در فاز دوم، تیمارها در روزهای اول، پانزدهم و سی اُم در دمای یخچال نگهداری شده و طی این زمان، آزمون‌های میکروبی بر روی آن‌ها و نمونه کنترل انجام شد. از نظر شمارش کلی فرم، در روز اول، هیچ کلنی قابل شمارشی مشاهده نشد. طی روزهای پانزدهم تا سی اُم، نمونه کنترل بالاترین تعداد و تیمار حاوی ۱/۵ درصد عصاره ورکوآز کمترین شمارش کلی فرم را نشان داد. از نظر تعداد *استافیلوکوکوس اورئوس*، طی روزهای پانزدهم تا سی اُم، نمونه کنترل، بیشترین تعداد از این باکتری را داشت، در حالی که تیمار حاوی ۰/۵ درصد عصاره ورکوآز کمترین شمارش را نشان داد. طی پانزده روز اول، هیچ تعداد قابل شمارشی از کپک و مخمر در تیمارهای مورد بررسی مشاهده نگردید، اما در روز سی اُم، تیمار حاوی ۱/۵ درصد عصاره ورکوآز، کمترین تعداد کپک و مخمر، و نمونه کنترل دارای بیشترین تعداد بود.

واژه‌های کلیدی: ضد میکروبی، پونه کوهی، سوسیس، ورکوآز.

*مسئول مکاتبات: nchoobkar20@gmail.com

۱- مقدمه

گوشت و فرآورده‌های آن از جمله منابع با ارزش پروتئینی در ارتباط با تغذیه انسان محسوب می‌شوند و امروزه از نظر سهولت مصرف و ذائقه‌پسندی در اکثر نقاط جهان مورد توجه و استقبال می‌باشند(۴). سوسیس یکی از فرآورده‌های گوشتی است که مخلوط پایدار حاصل از گوشت حیوانات حلال گوشت، چربی و سایر مواد افزودنی نظیر انواع ادویه ها، رنگ ها، نگهدارنده‌های مجاز می‌باشد و در داخل پوشش‌های طبیعی یا مصنوعی در شرایط مناسب نیم پخته (دودی) یا پخته (توسط بخار آب یا آب گرم) تهیه و به بازار عرضه می‌گردد(۳۲). در سال‌های اخیر با توجه به نگرانی‌های موجود در مورد استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی و اثرات مضر احتمالی آن‌ها، گرایش به استفاده از منابع گیاهی دارای خواص نگهدارندگی به ویژه عصاره‌های گیاهی افزایش یافته است. عصاره‌های گیاهی و ترکیبات معطر به عنوان نگهدارنده‌های طبیعی، موجب افزایش زمان ماندگاری مواد غذایی می‌شوند (۱۰). عصاره گیاهان دارویی دارای فعالیت ممانعت کنندگی در جلوگیری از رشد تعدادی از گونه‌های باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و حتی کپک‌ها و مخمرها می‌باشد(۱۹). نعناعیان[1] شامل ۲۲۰ جنس و ۳۳۰۰ گونه است که مصارف مختلفی در زمینه‌های گوناگون دارد. پونه با نام علمی *Mentha Pulegium L.* یکی از گونه‌های جنس Mentha است(۱۴) وپونه کوهی با نام علمی *Mentha longifolia L.* از مهم ترین گونه‌های پونه بوده و به صورت خودرو در مناطق مرطوب ایران رشد می کند (۲۰, ۲۳). این گیاه، معطر بوده و با توجه به پتانسیل رشد در بسیاری از کشورها، مورد توجه صنایع مختلفی نظیر صنایع غذایی و دارویی قرار گرفته است. دلیل توجه به این گیاه، حضور ماده مؤثر پولگون به عنوان ترکیب اصلی روغن‌های ضروری پونه است که سبب ایجاد رایحه مخصوص، خواص ضد میکروبی وآنتی‌اکسیدانی گیاه‌می‌شود(۲۹). عصاره و اسانس پونه کوهی تأثیر زیادی در جلوگیری از رشد و گسترش چندین گونه باکتری‌های عامل فساد و بیماری زا دارد و به واسطه ممانعت از اکسیداسیون اسیدهای چرب اشباع نشده موجب بهبود کیفیت و افزایش زمان ماندگاری فرآورده‌های گوشتی می شود (۲۷). همچنین می‌تواند به عنوان گند زدا، ضد اسپاسم و ضد التهاب مورد استفاده قرار گیرد (۲۷). ورکوآز (نوعی سیر وحشی) با نام علمی *Allium sativum controversum* از خانواده Alliaceae بومی استان‌های لرستان (شهرستان بروجرد) و همدان (شهرستان نهاوند) در ایران است که گونه‌های دیگر آن در سایر کشورها شناخته شده است. از این گیاه به عنوان ماده غذایی نیز جهت درمان یا پیشگیری بعضی از بیماری‌ها در روش‌های‌سنتی‌استفاده‌می‌شود . در مورد اثرات مختلف عصاره یا اسانس گیاهان دارویی بر روی خواص کیفی گوشت و فرآورده‌های‌گوشتی تحقیقاتی انجام شده است. به عنوان مثال، شعبانی و همکاران (۱۳۹۴) طی بررسی خواص آنتی اکسیدانی عصاره سیر در همبرگر خام گزارش دادند که این عصاره به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی، به طور مؤثر مانع از اکسیداسیون چربی در همبرگر خام می‌شود(۷).دولاجی[2] و همکاران (۲۰۱۲) اثر سطوح مختلف عصاره رزماری را در ترکیب با مقادیر پایین سدیم نیتریت (۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ یک در میلیون) مورد بررسی قرار دادند. افزودن عصاره رزماری به طورمؤثری اکسایش پاته‌های جگر را به تأخیر انداخت. همچنین مشخص شد که با افزودن این عصاره در تمامی غلظت‌ها، می‌توان غلظت سدیم نیتریت را در پاته‌های جگر به طورمعنی‌داری کاهش داد، بدون این که اثری منفی بر اکسایش چربی، میزان آنتی اکسیدان‌ها و پایداری رنگ داشته باشد(۱۵). با توجه به اثرات گوناگون عصاره‌های گیاهی بر خواص‌کیفی فرآورده‌های گوشتی و با در نظر گرفتن این نکته که جنبه کیفیت، زمان ماندگاری، خواص سلامت بخش و قابلیت پذیرش این محصولات در بازار حائز اهمیّت است، در پژوهش حاضر تأثیر افزودن عصاره پونه کوهی و گیاه کمتر

1- Lamiaceae

2- Doolaege

شناخته شده ورکوآز در فاز اولیه بررسی ترکیبات مفید و سپس تاثیر ضدمیکروبی‌آن‌ها به عنوان مهم ترین پارامتر در زمان نگهداری محصول سوسیس غیر تخمیری طی زمان نگهداری ارزیابی گردید.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد

مهم‌ترین مواد مصرفی مورد استفاده در این پژوهش شامل اندام‌های هوایی گیاه ورکوآز (بروجرد، ایران) و پونه کوهی (عطاری معتبر در کاشان، ایران)، گوشت مرغ، گلوتن (پیشگامان شیمی آریا)، نیتریت سدیم (BASF، آلمان)، پلی‌فسفات‌پتاسیم(BUDENHEIM،آلمان)،اسید سکوربیک (ZIBO، چین)، کاتر (Friboi، چین)، نمک و ادویه جات (گُل‌ها، ایران)، شکر (فریمان، ایران)، روغن مایع (اُیلا، ایران)، سفیده تخم مرغ (تلاونگ، ایران)، مواد شیمیایی آزمایشگاهی (مرک،آلمان)،اتانول(کیاشیمی،ایران)، محیط‌های کشت LSB[1]، YGC[2]، YGC[3]،PCA[4]، VRBG[5] و MSA[6]و قرص رینگر (مرک، آلمان) است.

۲-۲- روش ها

۲-۲-۱- استخراج عصاره‌ها به روش خیساندن (غرقابی)

در روش خیساندن، از حلال‌های آب و اتانول ۹۶ درصد استفاده شد. برای این منظور، ۱۰۰ گرم ازبرگ های پودر شده گیاه به دقت توسط ترازوی دیجیتال وزن شد. سپس جهت تهیه عصاره های آبی، اتانولی و آبی ـ اتانولی هرکدام به طور جداگانه به ارلن حاوی۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و اتانول ۹۶ درجه اضافه شده و سر ارلن‌ها با پارافیلم بسته و به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق روی دستگاه همزن مغناطیسی قرار گرفت تا استخراج عصاره به طور کامل و مطلوب صورت گیرد. سپس مخلوط حلال وگیاه توسط کاغذ صافی (واتمن) از هم جدا شد. در ادامه، تفاله‌ها فشرده شد تا تخلیه به طور کامل انجام گیرد. در نهایت عصاره های اولیه به دست آمد. عصاره‌های اولیه حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفوژ شد.سپس محلول رویی جمع‌آوری شده و به منظور تبخیر حلال، عصاره‌های حاصل وارد دستگاه تقطیر در خلاء (روتاری) گردید و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد حلال آن‌ها به مدت یک ساعت تبخیر و عصاره‌های تغلیظ شده به دست آمد. پس از خشک شدن کامل عصاره ها، آن‌ها توسط کاردک آزمایشگاهی کاملاً تراشیده شدند. عصاره‌های حاصل تا زمان انجام آزمایشات در ظرف تیره استریل ریخته شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد(۸).

۲-۲-۲- اندازه گیری میزان فنول کل

مقدارکل ترکیبات فنولی موجود درعصاره‌ها از طریق رنگ سنجی به روش فولین سیوکالتو[7] اندازه گیری شد.اساس کار، احیاء معرف فولین‌توسط ترکیبات‌فنولی‌درمحیط قلیایی وایجاد کمپلکس آبی رنگ است که حداکثر جذب را درطول موج ۷۶۰ نانومتر نشان می‌دهد. به طور خلاصه در این روش، ۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره درون لوله آزمایش با ۱/۱۶۰ میلی لیتر آب‌مقطر و ۱۰۰میکرولیتر معرف فولین ـ سیوکالتو مخلوط شد. بعد از گذشت حداکثر ۸ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم (۲۰ درصد وزنی ـ حجمی) به محتوی لوله آزمایش افزوده شد. لوله های آزمایش بعد از تکان دادن، درون حمام آب با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرارگرفت و پس از گذشت۳۰ دقیقه، میزان جذب آن‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۰ نانومتر قرائت گردید. برای رسم منحنی استاندارد اسیدگالیک، محلول پایه ای از این ماده با غلظت ۱۰۰ میکروگرم برمیلی‌لیتر تهیه شد. سپس از این محلول پایه غلظت های مختلف آماده گردید و بعد از انجام

1- Lauryl Sulphate Broth
2- Yeast Extract Glucose Chloramphenicol
3- Yeast Extract Glucose Chloramphenicol
4- Principal Component Analysis
5- Violet Red Bile Glucose
6- Mannitol Salt Agar
7- Folin–Ciocalteu

مراحل مختلف مطابق روش ذکرشده در بالا مقدار جذب نمونه‌ها خوانده شد .بعد از رسم منحنی کالیبراسیون اسیدگالیک، با قرار دادن مقدار جذب عصاره در معادله خطی مربوط به منحنی استاندارد، مقدار کل فنول موجود درعصاره محاسبه گردید(۵). در نهایت، داده‌ها براساس معادل میلی‌گرم اسیدگالیک بر گرم عصاره بیان شد که Y میزان جذب و X مقدار ترکیبات فنولی است.

۲-۲-۳- اندازه‌گیری میزان فلاونوئید[1]

میزان فلاونوئید کل با استفاده از روش رنگی آلومینیوم کلرید انجام خواهد شد. ۰/۵میلی‌لیتر عصاره با ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شده و پس از نگهداری به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق، جذب مخلوط در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت گردید. میزان فلاونوئید براساس میزان معادل «میلی گرم روتین در گرم عصاره» گزارش شد.روتین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده گردید(۱۱).

۲-۲-٤- اندازه‌گیری فعالیت آنتی اکسیدانی

بررسی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با روش مهار رادیکال DPPH[2] انجام شد. ۴۰ میکرولیتر از عصاره به لوله آزمایش منتقل شده و یک میلی‌لیتر از محلول ۰/۲ میلی مولار ۲،۲- دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) به آن اضافه شد. کاهش جذب در۵۲۰ نانومتر بعد از ۳۰ دقیقه برای نمونه‌ها قرائت گردید. جذب رادیکال DPPH بدون عصاره به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. درصد جمع‌آوری رادیکال مطابق رابطه شماره ۱ محاسبه شد:

درصد مهار DPPH = $(A_0-A_1)/A_0)\times100$ (رابطه شماره ۱)

A_0 جذب کنترل بدون حضور عصاره (بلانک) و

A_1 جذب عصاره ضداکساینده در حضور عصاره است(۵).

۲-۲-۵- تهیه نمونه‌های سوسیس

جهت آماده سازی نمونه‌های سوسیس از فرمولاسیون تجاری مربوط به سوسیس ۶۰درصد استفاده شد. بدین منظور گوشت سر و گردن گوساله در حالت منجمد در دو مرحله با چرخ گوشت سپس با چرخ گوشت با قطر ۲۵ میلی‌متر چرخ می‌شود در مرحله بعد گوشت چرخ شده به همراه نیترات و ۱/۳ یخ، ادویه جات، نمک و فسفات به مدت ۲ تا ۳ دقیقه کاتر شده (برای ایجاد حالت خمیری) در مرحله بعد، روغن و نصف سفیده تخم مرغ و سپس ۱/۲ یخ اضافه شده و کاتریزاسیون ادامه خواهد یافت. بعد از ۲ دقیقه، بقیه تخم‌مرغ و یخ اضافه شده و بعد از چند دور کاتریزاسیون مواد پُرکننده (آرد و نشاسته) و سایر افزودنی‌ها (شکر و اسید آسکوربیک) اضافه شده و حدود ۵ تا ۶ دقیقه تا ایجاد یک خمیر کاملاً امولسیون شده با دمای حدود ۴ تا ۵ درجه سانتی‌گراد کامل شد. سپس خمیر تهیه شده به مدت ۱ ساعت در دمای بالای صفر نگهداری شد تا فرایند پُرکردن در غلاف سوسیس بهتر انجام گیرد. برای پُر کردن از چرخ گوشت خانگی مجهز به لوله سوسیس استفاده گردید و نمونه‌های سوسیس با استفاده از بخار آب با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت تا رسیدن دمای فراورده به ۷۰ تا ۷۲ درجه پخته شد. پس از پخت، سوسیس زیر دوش آب سرد تا دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد (دمای محیط) خنک شد و سپس به مدت ۳۰ روز در دمای صفر الی ۴ درجه (دمای یخچال) نگهداری گردید. آزمون تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی و آزمون میکروبی تیمارها و نمونه کنترل در بازه‌های زمانی روز اول، ۱۵ و ۳۰ نگهداری انجام شد.

۲-۲-٦- آزمون‌های نمونه‌های سوسیس

۲-۲-٦-۱- کُلی فُرم

آزمون کلی فرم سوسیس بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۹۲۶۲ صورت پذیرفت بدین ترتیب که یک سی‌سی از رقت ۰/۱ یعنی همان سوسپانسیون اولیه در پلیت مورد نظر اضافه شد. سپس ۱۵ تا ۲۰ سی‌سی محیط کشت ویولت رد

1- Flavonoid
2- Dipheny-l-Picrylhydrazyl

براث به پلیت اضافه گردید. هنگامی که محیط کاملاً به حالت جامد در آمد، پلیت به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از اتمام زمان انکوباتور، تعداد کلنی رشد یافته در پلیت که به صورت قرمز مایل به ارغوانی به قطر تقریبی ۰/۵ میلی‌متر می‌باشد، ضرب در عکس رقت برابر با تعداد کلی فرم در هر گرم از نمونه می‌باشد. در این قسمت کلنی‌های شمارش شده، گزارش نمی شود. از محیط ویولت رد براث، یک کلنی برداشت شده، به درون لوریل سولفات انتقال داده و طی زمان ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه قرار داده شد. در صورت تولید گاز و کدورت در لوله دورهام، کلی فرم مثبت گزارش شد. از آنجا که حداکثر مجاز کلی فرم در فرآورده مورد نظر۱۰ کلنی در هر گرم است، از رقت ۰/۱ استفاده گردید(۲).

۲-۲-٦-۲- کپک و مخمر

آزمون کپک و مخمر بر اساس استاندارد ملی به شماره ۴۳۷ به شرح زیر صورت گرفت.یک سی‌سی از رقت ۰/۱ یعنی همان سوسپانسیون اولیه در پلیت مورد نظر اضافه کرده، ۱۵ تا ۲۰ سی‌سی محیط کشت DRBC را به پلیت اضافه شد. هنگامی که محیط کاملاً به حالت جامد در آمد، پلیت به مدت ۳ تا ۵ روز در انکوباتور ۲۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از اتمام زمان انکوباتور، تعداد کلنی رشد یافته در پلیت که به صورت ریزوییدی و یا گچی و یا همان حالت کپک می‌باشد و کلنی هایی به صورت کره‌ای و براق و ریز و سوزنی و تیره رنگ مخمر ضرب در عکس رقت برابر با تعداد کپک و مخمر در هر گرم از نمونه می‌باشد.در صورت لزوم می‌توان از میکروسکوپ برای تشخیص مخمرها از کپک استفاده کرد.حد مجاز کپک و مخمر در این فرآورده حداکثر۱۰۰ است(۳).

۲-۲-٦-۳- شمارش استافیلوکوکوس اورئوس

شمارش باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ۱۱۹۴ تعیین گردید(۱). برای بررسی میزان آلودگی نمونه‌ها به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از محیط کشت برد پارکر آگار استفاده شد. پس از رقت سازی نمونه‌ها در محیط پپتون واتر، نمونه مورد نظر بر محیط کشت که از قبل مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده، تهیه شده است، به صورت سطحی کشت داده شد و بعد از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد پس از ۴۸ ساعت، شمارش کلنی‌ها صورت گرفت(۱).

۲-۲-٦-٤- تجزیه و تحلیل‌آماری

تمامی‌آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد و نتایج حاصله با آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ آنالیز گردید. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن (در سطح اطمینان ۹۵٪) و ترسیم نمودارها در نرم‌افزار EXCEL نسخه ۲۰۰۷ انجام گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج آنالیز عصاره ها

۳-۱-۱- اندازه‌گیری مقادیر فنول کل

ترکیبات فنولی را می توان به فنول‌های ساده، با یک حلقه آروماتیک که حداقل دارای یک گروه هیدروکسی روی آن است وترکیبات پلی‌فنولی تقسیم نمود.ترکیبات پلی فنولی حداقل دارای دو (نظیرفلاونوئیدها)، سه ویا بیش از سه بخش فنولی (تانن) می‌باشند (۲۵). ترکیبات فنولی متابولیت‌های ثانویه ای هستند که به وسیله حضور یک حلقه آروماتیک حاوی گروه هیدروکسیل آزاد شناخته می شوند. این مولکول‌ها تقریباً در تمام بخش های گیاه وجود دارند(۹) و در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک مانند رشد سلولی، تشکیل ریشه، جوانه زنی دانه و رسیدن میوه نقش دارند. همچنین یکی از مهم‌ترین خصوصیاتی که به این گروه از ترکیبات نسبت داده می شود، خاصیت آنتی اکسیدانی است که به آن‌ها امکان

از دست دادن هیدروژن و به دام انداختن رادیکال آزاد را می‌دهد(۲۵).مطابق جدول۱، بیشترین میزان فنول کل مربوط به عصاره اتانولی ورکوآز است که تفاوت معنی داری را با سایر تیمارها داشت ($p<0.05$).به طور کلی، میزان فنول کل در عصاره‌های ورکوآز استخراج شده با حلال‌های مختلف به طور معنی داری بیش از عصاره پونه کوهی بود ($p<0.05$). بین عصاره‌های پونه کوهی استخراجی با حلال‌های مختلف، عصاره اتانولی میزان فنول کل بیشتری داشت. کمترین میزان فنول مربوط به عصاره آبی ـ اتانولی پونه کوهی بود (جدول۱).

جدول ۱- مقایسه میانگین مقادیر فنول کل (mg GAE/g) عصاره‌های ورکوآز و پونه کوهی.

نوع گیاه	نوع عصاره	میزان فنول کل (mg GAE/g)
ورکوآز	آبی	۴/۶۷±۰/۱۹۷^{c}
	اتانولی	۱۱/۰۷±۰/۴۲۸^{a}
	آبی ـ اتانولی	۸/۸۹±۰/۵۱۷^{b}
پونه کوهی	آبی	۲/۴۹±۰/۰۵۸^{e}
	اتانولی	۳/۰۴±۰/۱۶^{d}
	آبی ـ اتانولی	۱/۵۶±۰/۰۹۷^{f}

*حروف مختلف در جدول نشان دهنده معنی دار بودن در سطح اطمینان ۹۵درصد می باشد.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که علاوه بر ماهیت خود عصاره‌ها، نوع حلال مورد استفاده جهت استخراج عصاره و اجزاء زیست فعال، تأثیر معنی داری بر میزان فنول کل دارد. این نتیجه با نتایج تحقیقات نیرمال و همکاران[1](۲۰۱۲) هم خوانی دارد. در مطالعه این محققین، میزان ترکیبات فنولی موجود در عصاره «گیاه تاجریزی» حاصل از استخراج با اتانول بیش از آب و پترولیوم اتر بود(۳۰). در عین حال، برخی از پژوهش‌ها نشان داده‌اند که این حلال توانایی بالاتری نسبت به بسیاری از حلال‌های دیگر در استخراج ترکیبات فنولی دارد(۳۳). دراین راستا، چانگ و همکاران[2](۲۰۰۳) در استخراج ترکیبات فنولی از قارچ خوراکی با استفاده از چهار نوع حلال شامل آب، متانول، اتیل استات و پترولیوم اترگزارش کردند که عصاره آبی بیشترین مقدارترکیبات فنولی را استخراج کرد (۱۳).قابل ذکر است که نتایج متفاوت در مورد آنالیز ترکیبات زیست فعال یک گیاه خاص توسط تحقیقات مختلف می‌تواند تحت تأثیر عوامل متفاوتی قرار گرفته باشد. نوع و میزان ترکیبات اسانس یا عصاره تابع تغییرات فصلی و جغرافیایی، فاز رویشی گیاه و بخش مورد استفاده گیاه و نوع و میزان ترکیبات پلی فنولی است (۳۴). غلظت ترکیبات فنولی در عصاره‌های تولیدی وابسته به فاکتورهایی نظیر به کارگیری نوع روش و حلال جهت استخراج، غلظت حلال و بازه زمانی خیساندن می‌باشد(۲۴).

۳-۱-۲- اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل

فلاونوئیدها با ساختار اصلی دی فنیل پروپان ($C_6+C_3+C_6$) با تفاوت‌هایی در حلقه پیران مرکزی، به طورگسترده درسلسله گیاهان توزیع دارند (۲۲). این ترکیبات عمدتاً شامل آنتوسیانین ها[3]، آنتوسیانیدین ها[4]،فلاوانول ها[5]،فلاون ها[6]،

1- Nirmal &et al
2- Cheung & et al

3- Anthocyanins
4- Anthocyanidins
5- Flavanols
6- Flavons

کاتکین‌ها[1]وفلاوانون ها[2]می باشند. مکانسیم عمل فلاونوئید ها، به دام‌اندازی رادیکال آزاد و یا چلاته (شلاته)کردن یون‌ها است (۲۵) .به دلیل اینکه فلاونوئیدها دارای فعالیت آنتی اکسیدانی هستند، مقادیر بالای آن‌ها در عصاره نشان دهنده این است که حداقل در سیستم‌های برون زیست، عصاره، فعالیت آنتی اکسیدانی بالایی خواهد داشت (۲۶). روتین یک فلاونول گلیکوزید و نوعی متابولیت گیاهی با اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد التهاب و ضد سرطانی است (۳۱).

مطابق جدول (۲)، میزان فلاونوئید عصاره اتانولی ورکوآز در مقایسه با سایر عصاره‌ها، بیشترین مقدار را نشان داد، در حالی که عصاره آبی پونه‌کوهی، کم‌ترین میزان فلاونوئید را نشان داد. برای هر دو گیاه، عصاره اتانولی توانست محتوی فلاونوئید بیشتری را نشان داد و به عبارت بهتر، حلال اتانول توانایی بیشتری جهت استخراج فلاونوئیدها از دو گیاه مورد بررسی را داشت (جدول۲). این نتیجه با نتایج پژوهش‌های Chen و همکاران (۲۰۰۷) مطابقت دارد (۱۲).

جدول۲- مقایسه میانگین مقادیر فلاونوئید (mg RE/g) عصاره‌های ورکوآز و پونه کوهی.

نوع گیاه	نوع عصاره	میزان فلاونوئید (mg RE/g)
ورکوآز	آبی	۳/۱۸±۰/۰۱^{d}
	اتانولی	۱۲/۰۳±۰/۰۹۵^{a}
	آبی ـ اتانولی	۸/۰۹±۰/۱۸۷^{bc}
پونه کوهی	آبی	۳/۱۱±۰/۰۸^{d}
	اتانولی	۹/۶۶±۰/۱۱^{b}
	آبی ـ اتانولی	۶/۱۸±۰/۲۰^{c}

*حروف مختلف در جدول نشان دهنده معنی دار بودن در سطح اطمینان ۹۵درصد می‌باشد.

1- Catchins
2- Flavanones

۳-۱-۳- اندازه‌گیری فعالیت آنتی اکسیدانی

مدل به دام اندازی رادیکال DPPH به طورگسترده برای ارزیابی توانایی به دام‌اندازی رادیکال‌آزاد در نمونه های مختلف مورد استفاده قرار می گیرد.این ترکیب یک رادیکال آزاد با اتم مرکزی نیتروژن است که با احیاء شدن و تولید مولکول پایداری می کند که از ارغوانی به زرد تغییر رنگ می دهد.این رادیکال در ۵۱۵ تا ۵۲۸ نانومتر جذب دارد (۲۵). به طوری که رنگ ارغوانی رادیکال‌های DPPH در طول موج ۵۱۷ نانومتر با آنتی اکسیدان‌ها یا دیگر گونه‌های رادیکالی واکنش داده و به رنگ زرد تبدیل می‌شود. بنابراین در روش DPPH پائین بودن میزان جذب دلیل بالابودن قدرت رویش رادیکال است. بر اساس اطلاعات موجود در جدول (۳) عصاره اتانولی هر دو گیاه بالاترین فعالیت رادیکال گیرندگی را نشان داد که تفاوت معنی داری با سایر تیمارها داشتند ($p<0.05$)، اما به طور کلی، بالاترین فعالیت رادیکال گیرندگی بین تمام عصاره‌ها، مربوط به عصاره اتانولی ورکوآز بود. کم‌ترین فعالیت رادیکال‌گیرندگی متعلق به عصاره آبی پونه کوهی بود که تفاوت معنی‌داری از نظر آماری با سایر عصاره‌ها داشت ($p<0.05$)(جدول۳).

جدول ۳- مقایسه میانگین فعالیت رادیکال گیرندگی (mg/g) عصاره‌های ورکوآز و پونه کوهی.

نوع گیاه	نوع عصاره	فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) (%)
ورکوآز	آبی	۱۲/۴۳±۰/۱۹^{d}
	اتانولی	۸/۲۲±۰/۲۲^{a}
	آبی ـ اتانولی	۱۰/۷۷±۰/۱۳^{bc}
پونه کوهی	آبی	۵۱/۰۶±۰/۰۱^{d}
	اتانولی	۱۶/۵۶±۰/۱۲^{b}
	آبی ـ اتانولی	۱۸/۹۳±۰/۹۰^{c}

*حروف مختلف در جدول نشان دهنده معنی دار بودن در سطح اطمینان ۹۵درصد می‌باشد

مهم‌ترین دلیل دستیابی به بهترین فعالیت رادیکال گیرندگی عصاره اتانولی، اشباعیت حلال از ترکیبات فنولی است. این مطلب در گزارشات برخی از محققین نظیر حیدری مجد و همکاران[1](۲۰۱۲) نیز بیان گردیده است که با نتایج گروجیک و همکاران[2] (۲۰۱۲) هم خوانی دارد(۱۸, ۲۱). محمدی و آتیک[3](۲۰۱۲)اعلام نمودند که فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره استخراج شده با اتانول۷۰ درصد از برگ‌های درختچه *Tamarix aphylla* بیش از عصاره آبی بود(۲۸) که تأییدی بر نتیجه حاصل از پژوهش حاضر است.

۳-۲- آزمون‌های نمونه‌های سوسیس

۳-۲-۱- نتایج شمارش کُلی فُرم

کلی فرم ها، به ویژه اشرشیاکلای از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده گاستروانتریت و شاخص میکروبی آلودگی آب و مواد غذایی محسوب می‌شود. جمعیت این باکتری‌ها در گوشت و فرآورده های گوشتی نشانی از کیفیت و نحوه تهیه محصول می‌باشد، به ویژه در مورد سوسیس وکالباس که دارای ترکیبات اولیه و فرایند های مختلف تولید می‌باشد(۱۶). مطابق اطلاعات جدول ۴، با افزایش زمان نگهداری از روز

1- Haydari-Majd & et al
2- Grujic & et al
3- Mohammadi & Atik

پانزدهم تا سی‌اُم، تعداد باکتری‌های کلی فرم افزایش معنی داری را نشان داد. قابل ذکر است که در روز اول (یک روز بعد از تولید) هیچ کلنی قابل شمارشی مشاهده نشد. در روز پانزدهم، بالاترین اعداد کلی فرم مربوط به نمونه کنترل بود که به طور معنی داری، تعداد بالاتری در مقایسه با سایر تیمارها داشت ($p<0.05$).

جدول٤- روند تغییرات تعداد کلی فرم‌ها (Log cfu/g) در نمونه‌های سوسیس طی زمان نگهداری.

نوع تیمار	شمارش تعداد کلی‌فرم (Log cfu/g)		
	روز اول	روز پانزدهم	روز سی‌اُم
V1	–	۰/۹±۰/۲۴^{b}	۱/۳۶±۰/۰۸^{d}
V2	–	۰/۴±۰/۱۱^{d}	۰/۹۸±۰/۱۷^{e}
V3	–	۰/۷±۰/۲۷^{c}	۰/۹۵±۰/۴۳^{e}
P1	–	۰/۹±۰/۰۱^{b}	۱/۵۰±۰/۰۲^{b}
P2	–	۰/۹۶±۰/۱۹^{b}	۱/۴۰±۰/۱۰^{c}
P3	–	۰/۳۶±۰/۰۳^{e}	۱/۳۳±۰/۰۹^{d}
C	–	۱/۱۸±۰/۴۵^{a}	۱/۷۶±۰/۱۷^{a}

V1: ۰/۵ درصد عصاره ورکوآز؛V2: ۱درصد عصاره ورکوآز؛V3: ۱/۵درصد عصاره ورکوآز ؛
P1: ۰/۵درصد پونه کوهی؛P2 : ۱درصد پونه کوهی؛P3: ۱/۵ درصد پونه کوهی.

کمترین تعداد کلی فرم مربوط به تیمار حاوی ۱/۵ درصد عصاره پونه کوهی بود که تفاوت معنی داری با نمونه کنترل و نیز سایر تیمارها داشت ($p<0.05$). اما در عین حال، تیمارهای حاوی سطوح مختلف عصاره ورکوآز شمارش کلی فرم کمتری در مقایسه با عصاره پونه کوهی داشتند (جدول۴). در روز سی اُم نیز بالاترین شمارش کلی فرم متعلق به نمونه کنترل بود که به دلیل عدم حضور عصاره، شدت آلودگی بیشتری در مقایسه با تیمارهای مورد بررسی به کلی فرم داشت. در روز پایانی، کمترین تعداد کلی فرم به تیمار حاوی ۱/۵درصد عصاره ورکوآز مربوط می‌شد که تفاوت معنی داری با نمونه کنترل و سایر تیمارها داشت ($p<0.05$)(جدول۴). این نتیجه را می‌توان به حضور مؤثر اجزاء ضدمیکروبی در عصاره ورکوآز نسبت داد که در سطوح مختلف، نتایج قابل توجهی را به دست داد. گوردون و همکاران[1](۲۰۰۸) در بررسی تأثیر عصاره‌های گیاهی بر روی فرانکفورتر نیز به این نتیجه رسیدند که بار میکروبی تیمارهای حاوی عصاره در مقایسه با نمونه کنترل، کاهش معنی داری می‌یابد. مهم‌ترین و بارزترین دلیل در این مورد مربوط به وجود ترکیب یا ترکیبات ضد میکروبی در عصاره‌ها یا اسانس‌های گیاهان دارویی مورد استفاده در فرمولاسیون فرآورده‌های گوشتی است(۱۷).

۳-۲-۲- نتایج شمارش استافیلوکوکوس اورئوس

مطابق اطلاعات جدول ۵، طی روزهای اول تا پانزدهم، کلنی قابل شمارشی *استافیلوکوکوس اورئوس* در اغلب تیمارها مشاهده نشد. در روز اول و پانزدهم، جز در نمونه کنترل، کلنی قابل مشاهده‌ای در تیمارهای مورد ارزیابی وجود نداشت. طی یک ماه نگهداری تیمارها و در پایان روز سی اُم، تعداد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* افزایش یافت، اما حتی کمتر از حد قابل قبول از نظر استاندارد بود. در هر حال، کمترین و بیشترین تعداد این باکتری در روز پایانی به ترتیب متعلق به تیمار حاوی کمترین سطح از عصاره ورکوآز (۰/۵درصد) و نمونه کنترل بود که با سایر تیمارها تفاوت

1- Gordon

معنی‌داری داشت ($p<0.05$). به طور کلی، تأثیر ضد میکروبی بر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* در عصاره ورکوآز به طور معنی داری بیش از عصاره پونه‌کوهی بود (جدول۵). این نتایج نشان‌دهنده این است که عصاره‌های مورد استفاده در فرمولاسیون‌سوسیس‌دارای‌اثرات ضد میکروبی هستند.اعتمادی و همکاران (۱۳۸۰) اثر ضد باکتریایی عصاره رزماری را بر ماهی قزل آلای رنگین کمان بسته بندی شده در خلاء بررسی و نشان دادند که آلودگی میکروبی به صورت معنی‌داری کاهش یافت که این موضوع منجر به افزایش مدت زمان نگهداری شد(۶).

جدول۵- روند تغییرات تعداد استافیلوکوکوس اورئوس (Log cfu/g) در نمونه‌های سوسیس طی زمان نگهداری.

نوع تیمار	شمارش تعداد استافیلوکوکوس اورئوس (Log cfu/g)		
	روز اول	روز پانزدهم	روز سی‌اُم
V1	–	–	۰/۴۲±۰/۱۱^{e}
V2	–	–	۰/۵۶±۰/۳۴^{d}
V3	–	–	۰/۵۶±۰/۵۰^{d}
P1	–	–	۰/۶۳±۰/۲۱^{c}
P2	–	–	۰/۸۴±۰/۱۷^{b}
P3	–	–	۰/۵۲±۰/۰۱^{d}
C	۰/۴±۰/۱۵	۰/۷۲±۰/۱۱	۰/۹۳±۰/۰۴^{a}

V1: ۰/۵ درصد عصاره ورکوآز؛V2: ۱درصد عصاره ورکوآز؛V3: ۱/۵درصد عصاره ورکوآز ؛ P1: ۰/۵درصد پونه کوهی؛P2: ۱درصد پونه کوهی؛P3: ۱/۵ درصد پونه کوهی.

۳-۲-۳- نتایج شمارش کپک و مخمر

کپک‌ها جزء میکروارگانیسم‌های هوازی هستند که در طیف وسیعی از محصولات‌غذایی به ویژه انواع فرآورده‌های‌گوشتی موجب کاهش کیفیت محصول تولیدی و در مواردی مسمومیت‌های شدید در مصرف کننده می‌گردند. انواع کپک‌ها می‌توانند به راحتی در فرآورده‌های گوشتی به ویژه انواع خشک، رشد و تکثیر یابند و در شرایط مساعد نظیر بالا بودن درجه حرارت محل نگهداری آن‌ها، تولید آفلاتوکسین نمایند. قضاوت کلی در زمینه فرآورده‌های گوشتی کپک زده بسیار مشکل است. آلودگی‌های خفیف غالباً قابل چشم‌پوشی است، اما به علت امکان تولید مایکوتوکسین ها، فرآورده‌های با آلودگی شدید قارچی می‌بایست غیرقابل مصرف اعلام گردد. حرارت حین پخت نقش تعیین‌کننده ای در افزایش زمان ماندگاری محصولات دارد و سبب می‌شود که بار میکروبی و رشد کپک و مخمر فارش کنترل گردد (۳۵).مطابق جدول ۶، بین تیمارهای مورد بررسی در روز پایانی (سی اُم) تفاوت معنی داری وجود داشت ($p<0.05$) و کمترین تعداد کپک و مخمر متعلق به تیمار حاوی ۱/۵ درصد عصاره ورکوآز بود که با نمونه کنترل تفاوت معنی داری داشت ($p<0.05$)(شکل۶). در مقابل، نمونه کنترل که فاقد هرگونه عصاره‌گیاهی بود، بالاترین شمارش را نشان داد. به طور کلی، تعداد کپک و مخمر موجود در تیمارهای حاوی سطوح مختلف عصاره ورکوآز در مقایسه با پونه کوهی، کمتر بود. مشابه این نتایج در پژوهش‌های برخی محققین نظیرگوردون و همکاران (۲۰۰۸)(۱۷)ارائه شده است.

جدول٦- روند تغییرات تعداد کپک و مخمر (Log cfu/g) در نمونه‌های سوسیس طی زمان نگهداری.

نوع تیمار	شمارشتعدادکپک و مخمر (Log cfu/g)		
	روز اول	روز پانزدهم	روز سی اُم
V1	–	–	۱/۳۶±۰/۱۹[d]
V2	–	–	۱/۲۹±۰/۶۵[e]
V3	–	–	۱/۱۷±۰/۰۵[f]
P1	–	–	۱/۷۴±۰/۱۰[a]
P2	–	–	۱/۳۴±۰/۰۹[d]
P3	–	–	۱/۵۶±۰/۷۶[c]
C	–	–	۱/۶۴±۰/۱۱[b]

V1: ۰/۵ درصد عصاره ورکوآز؛V2: ۱درصد عصاره ورکوآز؛V3: ۱/۵درصد عصاره ورکوآز ؛
P1: ۰/۵درصد پونه کوهی؛P2 : ۱درصد پونه کوهی؛P3: ۱/۵ درصد پونه کوهی.

٤- نتیجه گیری

پژوهش حاضر نشان داد که نوع عصاره و حلال مورد استفاده هر دو تأثیر معنی داری بر مقادیر فنول کل، فلاونوئید و فعالیت رادیکال گیرندگی دارد. مقادیر فنول کل، فلاونوئید و فعالیت رادیکال گیرندگی در عصاره ورکوآز بیش از عصاره پونه کوهی بود، ضمن اینکه نوع حلال نیز در این‌باره مؤثر ارزیابی گردید.در مورد نمونه‌های سوسیس حاوی عصاره‌های مربوطه، تیمار حاوی ۱/۵ درصد عصاره ورکوآز در مقایسه با سایر تیمارها، فعالیت رادیکال گیرندگی بیشتری را نشان داد که به واسطه حضور ترکیبات فنولی بیشتر در مقایسه با پونه کوهی است. کمترین فعالیت رادیکال گیرندگی متعلق به نمونه کنترل بود. از نظر آزمون‌های میکروبی، طی روزهای پانزدهم تا سی اُم، تعداد قابل شمارش کلی فرم وجود داشت که البته در حد استاندارد کلی فرم در سوسیس و کالباس بود.در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس*، کمترین و بیشترین تعداد باکتری در روز پایانی به ترتیب متعلق به تیمار حاوی ۰/۵ درصد عصاره ورکوآز و نمونه کنترل بود. در روز پایانی که کپک و مخمر قابل شمارش بودند، پایین‌ترین تعداد متعلق به تیمار حاوی ۱/۵ درصد عصاره ورکوآز بود. نتایج نشان داد که می‌توان از عصاره‌های مختلف ورکوآز بومی ایران و پونه کوهی به منظور بهبود کیفیت سوسیس طی زمان نگهداری استفاده نمود. وجود اجزاء زیست فعال نظیر ترکیبات ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی در این عصاره‌ها به ویژه گیاه کمتر شناخته شده ورکواز از مهم ترین ویژگی‌های آن‌ها است که پتانسیل بالایی را جهت کاربرد در فرمولاسیون انواع مواد غذایی گوشتی نشان می‌دهد.

٥- منابع

١. استاندارد ملی ایران. ١٣٨٢. روش آزمون شمارش *استافیلوکوکوساورئوس* در گوشت و محصولات گوشتی. شماره ١١٩٤. مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.

٢. استاندارد ملی ایران. ١٣٨٥. روش آزمون شمارش باکتری‌های کلی فرم در گوشت و محصولات گوشتی شماره ٩٢٦٢ . استاندارد مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.

٣. استاندارد ملی ایران. ١٣٨٥. روش آزمون شمارش کپکو مخمر در گوشت و محصولات گوشتی. شماره ٤٣٧. مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.

٤. آرا فضل ، ع.، زند مقدم، ا.، لویمی، م.١٣٨٥. بررسی میزان خاکستر، نمک و باقیمانده نیتریت در سوسیس و

کالباس‌های حرارت دیده و مقایسه آن با استانداردهای ملی. شانزدهمین گنگره ملی صنایع غذایی ایران.

۵. آقاجانی، ع. ر.، مرتضوی، س. ع.، طباطبایی یزدی، ف.، شفافی زنوزیان، م. و سعیدی اصل، م.ر. ۱۳۹۸. تعیین مقادیر ترکیبات فنولی و فعالیت رادیکال‌گیرندگی عصاره استخراج شده از برگ‌های گیاه چویل (*Ferulagoangulata*) با تکنیک مایکروویو و روش غرقابی. *فصلنامه علوم و صنایع غذایی*، سال۱۶، شماره۸۶، ۱۳۱-۱۱۹.

۶. حلیمه, ا., مسعود, ر. و عبدالمحمد, ع. ک. ۱۳۸۷. پتانسیل آنتی‌باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی عصاره رزماری در افزایش عمر ماندگاری ماهی قزل‌آلای رنگین کمان. مجله *علوم و صنایع غذایی*، جلد۵، شماره٤، ۷۷-٦۷.

۷. شعبانی، ش.، حسینی، ه.، مهستی، پ. و گودرزی، ل. ۱۳۹۵. مطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی سیر بر روی همبرگر خام. *مجله علمی پژوهشی نوآوری در علوم و صنایع غذایی*، ۳۷:۱-۳۱.

۸. طباطبایی یزدی، ف.، علیزاده بهبهانی، ب، و حیدری سورشجانی،م. ۱۳۹۳. مقایسه اثر ضد میکروبی عصاره گیاه چویل (*Ferulagoangulata*) با انواع آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی در شرایط آزمایشگاهی، *مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک*، جلد۷، شماره۳، ٤٦-۳۵.

9. Ahmadi, F., Kadivar, M. and Shahedi, M. 2007 .Antioxidant activity of *Kelussia odoratissima* Mozaff. in model and food systems. *Food chemistry,* 105: 57-64.

10. Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P. and Ferreira, I. C. 2014. Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural foodadditives. *Comprehensive reviews in food science and food safety,* 13: 377-399.

11. Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M &Chern, J.C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and druganalysis,* 10.

12. Chen, Y., Xie, M.Y and Gong, X.F. 2007. Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*. *Journal of Food Engineering,* 81: 162-170.

13. Cheung, L., Cheung, P. C. and Ooi, V. E. 2003. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food chemistry,* 81: 249-255.

14. Dietz, B. M. &Bolton, J. L. 2011. Biological reactive intermediates (BRIs) formed from botanical dietary supplements. *Chemico-biological interactions,* 192: 72-80.

15. Doolaege, E. H., Raes, K., Smet, K., Andjelkovic, M., Van Poucke, C., DE Smet, S and Verhe, R. 2007. Characterization of two unknown compounds in methanol extracts of rosemary oil. *Journal of agricultural and food chemistry,* 55: 7283-7287.

16. Filimon, M. N., Borozan, A., Bordean, D., Radu, F. and Popescu, R. 2010. Microorganisms, qualitative indicators for meat products. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies,* 43: 346-349.

17. Gordon, W. P., Forte, A. J., Mcmurtry, R. J., Gal, J. and Nelson, S. D. 1982. Hepatotoxicity and pulmonary toxicity of pennyroyal oil and its constituent terpenes in the mouse. *Toxicology and applied pharmacology,* 65: 413-424.

18. Grujic, N., Lepojevic, Z., Srdjenovic, B., Vladic, J and Sudji, J. 2012. Effects of different extractionmethods and conditions on the phenolic composition of mate tea extracts. *Molecules,* 17: 2518-2528.

19. Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J. and Jiang, Y. 2003. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAPassay. *Nutrition research,* 23: 1719-1726.

20. Hassanpour, H., Khavari-Nejad, R. A., Niknam, V., Najafi, F &Razavi, K. 2012. Effects of penconazole and water deficit stress on physiological and antioxidative responses in pennyroyal (*Mentha pulegium L.*). *Acta physiologiae plantarum,* 34: 1537-1549.

21. Haydari-Majd, M., Mortazavi, S. A., Asili, J., Bolorian, S., Armin, M &Abdolshahi, A. 2012. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Flomidoschema parviflora. *Journal of Herbal Drugs (An International Journal on Medicinal Herbs),* 3: 7-13.

phenolic compounds from endemic shrub of arid environment Tamarix pauciovulata J. Gay. *Journal of Life Sciences,* 6: 883.
29. Mozaffarian, V. 2013. *Identification of medicinal and aromatic plants of Iran*, éditeur non identifié.
30. Nirmal, S., Patel, A., Bhawar, S& .Pattan, S. 2012. Antihistaminic and antiallergic actions of extracts of Solanum nigrum berries: possible role in the treatment of asthma. *Journal of ethnopharmacology,* 142: 91-97.
31. Sun, Y., XU, W., Zhang, W., Hu, Q. and Zeng, X. 2011. Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from kudingcha made frrom Ilex kudingcha CJ Tseng by using response surface methodology. *Separation and purification technology,* 78: 311-320.
32. Verbeke, W., Perez-Cueto, F. J., DE Barcellos, M. D., Krystallis, A. and Grunert, K . G. 2010. European citizen and consumer attitudes and preferences regarding beef and pork. *Meat science,* 84: 284-292.
33. Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L &Bates, D. 2008. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry.A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies,* 9: 161-169.
34. Wang, S. Y., Zheng, W &Galletta, G. J. 2002. Cultural system affects fruit quality and antioxidant capacity in strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 50: 6534-6٥٤٢.
35. Yang, H.S., Choi, S.G., Jeon, J.T., Park, G.B. and Joo, S.-T. 2007. Textural and sensory properties of low fat pork sausages with added hydrated oatmeal and tofu as texture-modifying agents. *Meat science,* 75: 283-289.
22. Heim, K. E., Tagliaferro, A. R &Bobilya, D. J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry,* 13: 572-584.
23. Kanakis, C. D., Petrakis, E. A., Kimbaris, A. C., Pappas, C., Tarantilis, P. A &Polissiou, M. G. 2012. Classification of Greek *Mentha pulegium L.*(Pennyroyal) samples, according to geographical location by Fourier transform infrared spectroscopy. *Phytochemical analysis,* 23: 34-43.
24. Kasparavičienė, G., Ramanauskienė, K., Savickas, A., Velžienė, S., Kalvėnienė, Z., Kazlauskienė, D., Ragažinskienė, O &Ivanauskas, K. 2013. Evaluation of total phenolic content and antioxidant activity of different *Rosmarinus officinalis L.* ethanolic extracts. *Biologija,* 59.
25. Khalili, M . and Ebrahimzadeh, M. A. 2015. A review on antioxidants and some of their common evaluation methods. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences,* 24: 188-208.
26. Lotito, S. B and Frei, B. 2004 .The increase in human plasma antioxidant capacity after apple consumption is due to the metabolic effect of fructose on urate, not apple-derived antioxidant flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine,* 37: 251-258.
27. Martins, H. N. M., Martins, M. L. G ,.Dias, M. I. and Bernardo, F. 2001. Evaluation of microbiological quality of medicinal plants used in natural infusions. *International journal of food microbiology,* 68:149-153.
28. Mohammedi, Z. and Atik, F. 2012. HPLC-UV Analysis and antioxidant potential of

(Original Research Paper)

Assessment of *MenthalongifoliaL.* and Iranian *Allium sativum controversum* Extracts on Microbial Properties of Susages

Adeleh Madani[1], Nasrin Choobkar[2*]

1-Department of Food Science and Technology, Mahallat Branch, Islamic Azad University, Mahallat, Iran.
2- Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran.

Received: 26/07/2020 Accepted:08/09/2020

Abstract

In recent years, the use of bioactive compounds in the formulation of meat and meat products has attracted the attention of experts.This research was conducted in two phases. In the first phase, aqueous, ethanolic and hydro-ethanolic extracts of *Allium sativum controversum*(Varcoaz) and *Mentha pulegium* were extracted by soaking and the total phenols, flavonoids and antioxidant activity of the extracts were measured. The results of the first phase showed that the ethanolic extract of both plants had the highest amount of total phenol, flavonoids and antioxidant activity and as a result, this extract was selected for injection into sausage formulation at levels of 0.5, 1 and 1.5%. In the second phase, the treatments were kept at refrigerator temperature on۱,15 and30 days, during which time a number of microbial tests were performed on them and a control sample (sausage without any extract). In terms of coliform count, no countable colony was observed on first day. During the 15th to 30th days, the control sample showed the highest number and the treatment containing 1.5% of Varcoaz extract showed the lowest number of coliforms. In terms of the number of *Staphylococcus aureus*, during the 15th to 30th days, the control sample had the highest number of this bacterium, while the treatment containing 0.5% of *Allium sativum controversum* extract showed the lowest number. During the first 15 days, no countable number of molds and yeasts were observed in the studied treatments, but on 30th day, the treatment containing 1.5% of Varcoaz extract showed the lowest number of molds and yeasts and the control sample had the highest number of them.

Keywords: Antimicrobial, *MenthalongifoliaL.*, Sausage, *Allium sativum controversum*.

*Corresponding Author: nchoobkar20@gmail.com