Journal of Microbial World
Volume 13, No. 3, September 2020

Short Communication

Optimization of nisin concentration in fermented beef sausage to decrease sodium nitrite concentration in the final product

Fatemeh Vaheb[1], Nafiseh Sadat Naghavi[2], Zarrindokht Emami-Karvani [2]

[1]M.Sc, Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Abstract

Bacteriocins such as nisin produced by lactic acid bacteria exhibit antimicrobial activity at very low concentrations without side effects. The aim of the present study was to optimize nisin content in fermented beef to achieve optimum pH and microbial community as well as reduction of nitrite concentration in the final product. In this experimental laboratory research, fermented beef was prepared using *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus sakei*. Then, optimization of nisin and sodium nitrite concentrations were done by response surface methodology based on the pH decrease and spoilage causing microbial count in fermented product. Among treatments 3 treatments with respectively 80 and 100 ppm sodium nistrit and nisin, 128.28 and 140 ppm sodium nitrite and nisin and 180 and 196 ppm sodium nistrit and nisin showed the best results based on pH and spoilage causing microbial count reduction. The residual nitrite contents in these three treatments reduced to 5.7 to 8.47 ppm, which were lower than the limited amount. *Clostridium* was absent in all three beef products after one mount storage at 4 °C. Addition of nisin to fermented beef significantly decreased the nitrite concentration. Therefore, the usage of nisin is recommended as a preservative in beef sausage industries in Iran.

Keywords: Fermented beef, Nisin, nitrite, Microbial count.

Correspondence to: Nafiseh Sadat Naghavi

Tel: +98 9133692496

E-mail: nafiseh_naghavy@yahoo.com

Journal of Microbial World 2020, 13 (3): 277-289.

DOI:

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال سیزدهم شماره سوم (پیاپی ۴۴) پاییز ۱۳۹۹
صفحات ۲۸۹-۲۷۷

Short Communication

بهینه سازی غلظت نگه‌دارنده نیسین در سوسیس تخمیری گوشت گاو به منظور کاهش غلظت نیتریت سدیم در فرآورده نهایی

فاطمه واهب[۱]، نفیسه سادات نقوی*[۲]، زرین دخت امامی کرونی[۲]

[۱] کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

[۲] استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

چکیده

باکتریوسین های تولید شده توسط باکتری های اسید لاکتیک مانند نیسین فعالیت ضد میکروبی را در غلظت های بسیار کم و بدون عوارض جانبی نشان می دهند. هدف از پژوهش حاضر، بهینه سازی مقدار نیسین در گوشت گاو تخمیر شده برای دست یابی به اسیدیته و جامعه میکروبی بهینه و همچنین کاهش غلظت نیتریت در محصول نهایی بود. در این تحقیق تجربی آزمایشگاهی، ابتدا گوشت گاو تخمیر شده با استفاده از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیوس ساکئی* تهیه شد. سپس بهینه سازی مقادیر نیسین و نیتریت سدیم بر اساس کاهش اسیدیته و تعداد میکروب های عامل فساد در محصول تخمیری با استفاده از روش سطح پاسخ انجام شد. از بین تیمارها، ۳ تیمار شامل غلظت های به ترتیب ۸۰ و ۱۰۰ ppm نیتریت سدیم و نیسین، غلظت های به ترتیب ۱۲۸/۲۸ و ۱۴۰ ppm نیتریت سدیم و نیسین و غلظت های به ترتیب ۱۸۰ و ۱۹۶ ppm نیتریت سدیم و نیسین بهترین پاسخ را بر اساس کاهش اسیدیته و بار میکروبی مولد فساد نشان دادند. مقدار نیتریت باقی مانده در این سه تیمار به ۵/۷ تا ۸/۴۷ ppm کاهش یافت که کمتر از سطح محدودیت بود. *کلاستریدیوم* در هر سه محصول گوشتی پس از نگهداری یک ماهه در ۴ درجه سلسیوس مشاهده نشد. افزودن نیسین به گوشت گاو تخمیر شده به طور معنی داری غلظت نیتریت را کاهش داد. بنابراین، استفاده از نیسین به عنوان نگهدارنده در صنایع سوسیس گوشت گاو در ایران توصیه می شود.

واژه های کلیدی: گوشت تخمیری گاو، نیسین، نیتریت سدیم، اسیدیته، شمارش میکروبی.

دریافت مقاله: اردیبهشت ماه ۹۹ پذیرش برای چاپ: شهریور ماه ۹۹

مقدمه

افزودن نیتریت به فرآورده های گوشتی نه تنها اثرات ضدمیکروبی دارد بلکه باعث تثبیت رنگ فرآورده، ممانعت از اکسیداسیون لیپیدها، ایجاد طعم مطبوع و بهبود بافت فرآورده می شود. زمانی که آزاد سازی و رهایی آرام نیتریت در فرآورده مورد نظر باشد از نیترات استفاده می شود. نیترات قبل از این که به نیتریت احیاء شود در بافت منتشر می شود (۱). حداکثر مجاز نیترات و نیتریت که در ایران می توان به فرآورده های گوشتی اضافه کرد ۱۲۰ میلی گرم در کیلوگرم می باشد. مقدار نیتریت لازم برای جلوگیری از رشد *کلاستریدیوم* (*Clostridium*) از فرآورده ای به فرآورده دیگر متفاوت می باشد و به نوع فرآیند بستگی دارد. نیتریت با بعضی ترکیبات موجود در بافت واکنش می دهد، به همین دلیل تعیین نیترات و یا نیتریت در فرآورده نهایی بیانگر میزان اضافه شده اولیه نیست، مخصوصاً زمانی که از آسکوربیک اسید و یا اریتروبیک اسید به منظور تسهیل رهایی نیتریک اکساید از

*) آدرس برای مکاتبه: فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه میکروبیولوژی.
تلفن: ۰۹۱۳۳۶۹۲۴۹۶ پست الکترونیک: nafiseh_naghavy@yahoo.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

نیتریت طی فرآیند حرارتی استفاده می شود. بخش عمده نیتریت که به نیتریک اکساید تبدیل شده است با میوگلوبین (۵ تا ۱۵ درصد)، گروه های سولفیدریل (۱۵-۵ درصد)، چربی ها (۵-۱ درصد) و پروتئین ها (۳۰-۲۰ درصد) ترکیب می شود و تنها بخش کوچکی (کمتر از ۱۰ درصد) به شکل های نیترات و نیتریت (۱۵-۱۰ درصد) باقی می ماند (۲). باکتریوسین ها ترکیبات پروتئینی یا پپتید خارج سلولی هستند که توسط برخی از باکتری ها تولید می شوند و دارای خواص ضد باکتریایی نسبتاً محدودی می باشند. باکتریوسین ها بر روی برخی گونه ها و سویه های نزدیک به خود اثر مهاری دارند (۳). لاکتیک اسید باکتری ها مانند گونه های مختلف *لاکتوباسیلوس* (*Lactobacillus*)، *لاکتوکوکوس* (*Lactococcus*)، *لوکونوستوک* (*Leoconostoc*)، *انتروکوکوس* (*Enterococcus*)، *پدیوکوکوس* (*Pediococcus*) و *کارنوباکتریوم* (*Carnobacterium*) محدوده وسیعی از باکتریوسین ها را علیه باکتری های گرم مثبت دیگر مانند گونه ها و سویه‌های دیگر لاکتیک اسید باکتری ها، *کلاستریدیوم* و *لیستریا* (*Listeria*) تولید می کند. بیشتر باکتریوسین هایی که توسط لاکتیک اسید باکتری ها تولید می شوند، خواص مطلوب زیادی دارند که آن ها را به عنوان نگه دارنده در مواد غذایی مناسب می گرداند. این باکتریوسین ها ضمن این که بر روی پاتوژن ها و باکتری های فسادزای غذایی طیف اثر ضد میکروبی نسبتاً وسیعی دارند، بر روی سلول های یوکاریوت غیرسمی هستند؛ به وسیله پروتئازهای سلولی هضم می شوند و به تغییرات pH و حرارت مقاوم هستند (۴). اگرچه استفاده از باکتریوسین ها در مواد غذایی اثرات سودمند زیادی دارد اما از آن جایی که ویژگی های بسیاری از آن ها به طور کامل شناخته نشده است، نمی توان آن ها را به صورت گسترده به عنوان نگه دارنده در محصولات غذایی به کار برد. امروزه تنها باکتریوسینی که موسسه غذا و داروی ایالت متحده آمریکا استفاده از آن را به شکل خالص در مواد غذایی مجاز دانسته است نیسین می باشد. این ماده اولین بار در سال ۱۹۲۸ در انگلستان کشف شد و در سال های بعدی شناخته و نام گذاری گردید (۵). نیسین دارای ویژگی های مطلوب زیادی به عنوان یک نگه دارنده مواد غذایی است، که استفاده از آن را در محدوده وسیعی از غذاها امکان پذیر می سازد این ویژگی ها شامل غیرسمی بودن، تولید طبیعی توسط *لاکتوکوکوس لاکتیس* (*Lactococcus lactis*)، پایداری حرارتی و قابلیت انبارداری، عدم تغییر طعم یا بو و دامنه محدود فعالیت ضد میکروبی می شود (۶). اما عوامل محیطی زیادی به ویژه اسیدیته، تعداد میکروارگانیسم های اولیه، فعالیت آنزیم های پروتئولیتیک، میزان فاز مایع در دسترس و واکنش با اجزای غذا (لیپیدها و پروتین ها) بر عملکرد این ماده مؤثر هستند. عملکرد نیسین با کاهش تعداد میکروارگانیسم ها و اسیدیته افزایش می یابد (۷). از طرفی روش های نگه داری و محافظت از محصولات غذایی مانند حرارت دادن، کاهش دما، بسته بندی در اتمسفر تغییر یافته و کاهش فعالیت آبی نیز می توانند توانایی نیسین را تقویت کنند (۸). نیسین بر روی باکتری های پاتوژن و فسادزای غذایی گرم مثبت به خصوص لاکتیک اسید باکتری ها که از مهم ترین عوامل مسئول فساد در محصولات گوشتی پخته وکیوم شده هستند و اندوسپورهای مقاوم به حرارت میکروارگانیسم هایی مانند *باسیلوس* (*Bacillus*) و *کلاستریدیوم* اثر دارد (۹). مطالعه حاضر با هدف غنی کردن سوسیس تخمیری تهیه شده از گوشت گاو با نگه دارنده نیسین و بهینه سازی غلظت این نگه دارنده با روش سطح پاسخ به منظور کاهش غلظت نیتریت سدیم و بار میکروبی مولد فساد در سوسیس تخمیری انجام شد.

مواد و روش ها

این پژوهش در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان و به صورت توصیفی انجام پذیرفت. *الف) تهیه سوسیس تخمیری:* فرمولاسیون سوسیس تخمیری حاوی گوشت گاو ۸۴٪، چربی ۲۰٪، یخ ۱۰٪، سویا ۳٪، نمک ۱٪، پودرگلوکز ۱/۵٪، فلفل سیاه ۰/۳٪، پودر سیر ۰/۳٪، نشاسته ۲٪ و سوربات پتاسیم ۰/۳٪ بود. نمونه های سوسیس

در غلاف مخصوص بسته بندی شد. تعداد $۱/۵\times۱۰^{۸}$ از سلول های باکتریایی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (*Lactobacillus plantarum*) و *لاکتوباسیلوس ساکئی* (*Lactobacillus sakei*) به طور هم زمان به ازای هر گرم گوشت با ۳ تکرار به نمونه های سوسیس اضافه گردید و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد (۱۰ و ۱۱). میزان اسیدیته سوسیس پس از طی شدن دوره تخمیر و پس از مرحله پخت ۹۰ دقیقه ای در دمای ۶۰ درجه سلسیوس روی گوشت تخمیر شده انجام گرفت. به این منظور ۱میلی‌گرم از سوسپانسیون نمونه سوسیس در ۵ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه شد و سپس سوسپانسیون بر روی شیکر مخلوط گردید و اسیدیته آن توسط دستگاه اسیدیته متر خوانده شد (۱۰).

ب) بهینه‌سازی با استفاده از طراحی آزمایش سطح پاسخ Rersponse surface methodology, (RSM) به منظور بهینه‌سازی تأثیر هم زمان غلظت‌های مختلف نگه‌دارنده های غذایی نیتریت سدیم و نیسین بر کاهش اسیدیته و بار میکروبی سوسیس تخمیری، طراحی آزمایش به روش RSM مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از نرم افزار RSM نسخه ۱۰ (Design Expert 10) (۱۲) و با در نظر گرفتن نتایج به دست آمده در برخی آزمون های تک فاکتوری انجام شده، دو فاکتور نیتریت سدیم و نیسین وارد برنامه شد. پاسخ های در نظر گرفته شده شامل مقدار اسیدیته، شمارش کل باکتری ها در محیط کشت Plate Count Agar، باکتری های اسید لاکتیک در محیط کشت آگار مان روگوزا شارپ (Man, Rogosa, Sharpe Agar) ، باکتری های روده ای در محیط کشت آگار مک کانکی (MacConkey Agar)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) در محیط کشت آگار نمک مانتیتول (Mannitol Salt Agar) و کپک-مخمر در محیط کشت آگار سیب زمینی دکستروز (Potato Dextrose Agar) بودند (۱۳). برای انجام آزمایش‌های پیش‌بینی شده توسط نرم افزار، میزان نگه‌دارنده‌های مورد نیاز به صورت توأم به سوسیس تخمیری اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه‌گذاری شد. سپس سوسیس‌های تخمیر شده، پس از خشک شدن در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ دقیقه مورد آنالیز میکروبی و اسیدیته قرار گرفتند. هم چنین سوسیس های پخته شده به مدت یک هفته در یخچال ۴ درجه سلسیوس نگه داری شدند و کلیه آزمایش ها پس از طی شدن این زمان بر روی آن ها تکرار گردید (۱۲).

د) بررسی میزان بار میکروبی و نیتریت سدیم باقی مانده در محصول نهایی پس از یک ماه نگه داری در یخچال: با توجه به آنالیز نتایج طراحی آزمایش RSM، نمونه‌های سوسیس پخته شده که نتایج مطلوب از نظر کم ترین رشد باکتری‌های غیر مفید را داشتند انتخاب شدند و به مدت یک ماه در دمای ۴ درجه سلسیوس یخچال نگه‌داری گردیدند. سپس آنالیز میکروبی و اندازه گیری میزان نیتریت سدیم باقی مانده در محصول نهایی انجام شد. برای سنجش نیتریت باقی مانده ابتدا از نمونه‌های انتخابی سوسیس تخمیری به میزان ۱۰ گرم در ارلن ریخته شد و به آن ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۵ میلی‌لیتر ترا بورات سدیم (بوراکس اشباع) اضافه شد. ترا بورات سدیم نقش بازکنندگی بافت را دارد. سپس محتویات ارلن به مدت ۳۰ دقیقه بر روی حرارت به جوش آمد. پس از خنک شدن محلول شفاف کننده استات روی (۳۰٪ وزنی حجمی) و فروسیانور پتاسیم (۱۵٪ وزنی حجمی) از هر کدام به میزان ۳ میلی‌لیتر اضافه گردید و محتویات ارلن از کاغذ صافی عبور داده شد و در بالون ژوژه ۲۵۰ میلی‌لیتری با آب مقطر به حجم رسانده شد. سپس ۲۵ میلی‌لیتر از محلول‌های به دست آمده به ۶ میلی‌لیتر هیدروژن کلرید و ۱۰ میلی‌لیتر سولفونامید اضافه شد و در محیط تاریک به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری شد. سپس ۲ میلی‌لیتر آلفا نفتیل به محلول اضافه شد و در دمای محیط و تاریکی به مدت ۱۰ دقیقه نگه‌داری گردید. جذب نوری محلول به دست آمده در طول موج ۵۳۸ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد و میزان نیتریت سدیم باقی مانده در هر نمونه مقایسه با استاندارد مورد سنجش قرار گرفت (۱۴). همچنین میزان اثر نگه دارنده ها بر روی کنترل *کلاستریدیوم*، به منظور اطمینان از عدم رشد آن در محصول نهایی پس از یک ماه نگه‌داری در دمای یخچال مورد ارزیابی

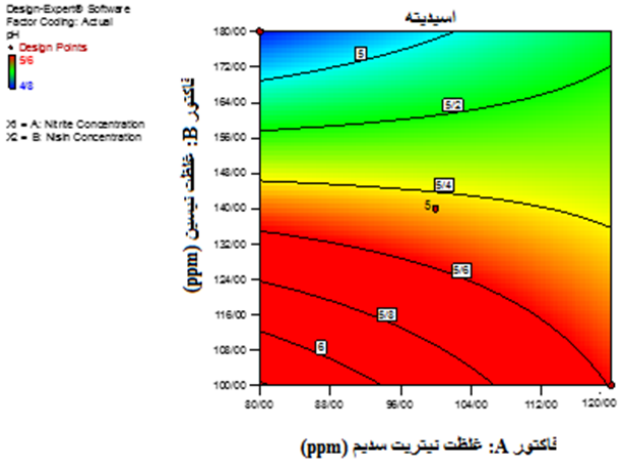
قرار گرفت. به این منظور از نمونه های سوسیس تخمیری منتخب که اسیدیته و بار میکروبی مطلوب داشتند رقت تهیه شد و رقت‌های مختلف به طور جداگانه بر روی محیط کشت آگار خون دار به صورت گسترده کشت داده شد. پس از ۴۸ ساعت رشد در شرایط بی هوازی با استفاده از گاز پگ در جار بی هوازی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، شمارش کلنی انجام گرفت (۱۳).

ه) آنالیز آماری داده ها: برای مقایسه میانگین نتایج از آزمون آماری ANOVA استفاده شد و مرز معنی داری روی ($p<0.05$) قرار داده شد.

نتایج

الف) طراحی آزمون های سطح پاسخ: با توجه به نتایج به دست آمده از آزمون های تک فاکتوری جهت بهینه سازی غلظت های نیتریت سدیم و نیسین و محدودیت هایی که استاندارد ملی (شماره ۲۳۰۳) برای غلظت نیتریت در محصولات گوشتی تعیین کرده است، کمینه و بیشینه ۸۰ و ۱۲۰ ppm جهت نیتریت سدیم و کمینه و بیشینه ۱۰۰ و ۱۸۰ ppm برای نیسین وارد نرم افزار گردید. بر همین اساس نرم افزار ۱۳ آزمایش طراحی نمود که در آزمایشگاه انجام شد. بعضی آزمون ها تکرار آزمون های دیگر بودند.

ب) بررسی کاهش اسیدیته و میزان بار میکروبی سوسیس های تخمیری: نتایج اسیدیته و بار میکروبی در سوسیس های تخمیری تیمارشده با مقادیر مختلف نیتریت سدیم و نیسین در جدول ۱ مشاهده می شود. اسیدیته مطلوب ۴/۵ تا ۴/۸ در تیمارهای ۶ (نیتریت و نیسین به ترتیب ۱۰۰ و ۱۹۶/۵۷ ppm) و ۱۲ (نیتریت و نیسین به ترتیب ۸۰ و ۱۸۰ ppm) مشاهده شد. آنالیز ANOVA بر روی نتایج نشان داد نمودار اثر فاکتورها برروی اسیدیته رابطه میانکنش دو فاکتوریال (2 Factor interaction, 2FI) بود (رابطه ۱). بنابراین این مدل ارزش بررسی را دارا بود. هم چنین رابطه مدل طراحی شده با عوامل مورد بررسی معنی دار بود در حالی که عدم تناسب (Lack of Fit) رابطه معنی دار نبود. مقادیر به دست آمده دارای توزیع نرمال بودند و با مقادیر مورد انتظار اختلاف نداشتند (p برابر با ۰/۰۸). در شکل ۱ توزیع دو بعدی اسیدیته بر



شکل ۱: توزیع دو بعدی نرمال مقادیر به دست آمده از اسیدیته در نمونه های سوسیس تخمیری طراحی شده. میان کنش عوامل غلظت نیتریت سدیم و نیسین و تأثیر هم زمان آن ها بر اسیدیته گوشت تخمیری نشان داده شده است.

جدول ۱: اسیدیته و شمارش انواع باکتری ها در سوسیس های تخمیری پخته شده در شرایط طراحی شده توسط نرم افزار RSM.

آزمایش	نیتریت سدیم (ppm)	نیسین (ppm)	اسیدیته	شمارش کلی باکتری ها (×۱۰^{۵}/ml)	تعداد باکتری های روده ای (×۱۰^{۵}/ml)	تعداد کپک و مخمر (×۱۰^{۵} ml)	تعداد *Staphylococcus aureus* (×۱۰^{۵} ml)	تعداد باکتری های اسید لاکتیک (×۱۰^{۵} ml)
۱	۱۰۰	۱۴۰	۵/۵	۱۳۹۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۳۷۰۰
۲	۱۰۰	۱۴۰	۵/۴	۹۹۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۴۰۰۰
۳	۱۰۰	۱۴۰	۵/۵	۱۰۰۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۴۲۰۰
۴	۱۰۰	۱۴۰	۵/۴	۱۲۰۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۴۰۰۰
۵	۱۰۰	۱۴۰	۵/۵	۱۲۰۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۴۰۰۰
۶	۱۰۰	۱۹۶/۵۷	۴/۸	۴۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۵۰۰
۷	۱۰۰	۸۳/۴۳	۵/۱	۸۶۰۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۸۰۰۰۰
۸	۷۲/۷۲	۱۴۰	۵/۵	۴۸۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۲۸۰۰
۹	۱۲۸/۲۸	۱۴۰	۵/۳	۱۴۰۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۶۸۰۰
۱۰	۸۰	۱۰۰	۵/۴	۵۰۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۱۵۰۰
۱۱	۱۲۰	۱۰۰	۵/۶	۳۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۱۶۰
۱۲	۸۰	۱۸۰	۴/۸	۳۰۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۲۴۰۰
۱۳	۱۸۰	۱۲۰	۵/۲	۵۰۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۳۵۰۰

فاکتورهای بررسی شده نشان داده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده، تأثیر همزمان دو عامل نیتریت سدیم و نیسین در کاهش اسیدیته گوشت تخمیری با مقدار p برابر با ۰/۰۰۰۱ معنادار بود.

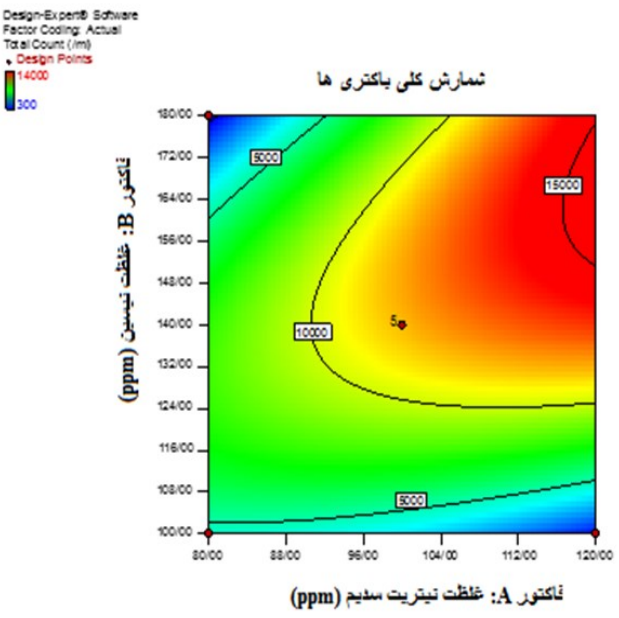
رابطه ۱: A) غلظت نیتریت سدیم و B غلظت نیسین می باشد.) اسیدیته= 0.068A– 0.46B+5.44

نتایج آنالیز ANOVA نشان داد رابطه درجه دو بین اثر فاکتورها و شمارش کلی باکتری وجود دارد (رابطه ۲). در این رابطه A غلظت نیتریت سدیم و B غلظت نیسین را نشان می دهد. بنابراین این مدل ارزش بررسی را دارا بود. هم چنین رابطه مدل طراحی شده با عوامل مورد بررسی معنی دار بود در حالی که عدم تناسب رابطه معنی دار نبود. مقادیر به دست آمده دارای توزیع نرمال بودند و با مقادیر مورد انتظار با مقدار p برابر با ۰/۰۸۱ اختلاف نداشتند. در شکل ۲ توزیع دو بعدی شمارش کل نشان داده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده، تأثیر هم زمان دو عامل نیتریت سدیم و نیسین بر کاهش تعداد کل باکتری ها در گوشت تخمیری با مقدار p برابر با ۰/۰۰۲۶ معنادار بود. نتایج آنالیز ANOVA نشان داد رابطه درجه دو بین اثر فاکتورها و شمارش کلی باکتری وجود دارد (رابطه ۲). در این رابطه A غلظت نیتریت سدیم و B غلظت نیسین را نشان می دهد. بنابراین این مدل ارزش بررسی را دارا بود. هم چنین رابطه مدل طراحی شده با عوامل مورد بررسی معنی دار بود در حالی که عدم تناسب رابطه معنی دار نبود. مقادیر به دست آمده دارای توزیع نرمال بودند و با مقادیر مورد انتظار با مقدار p برابر با ۰/۰۸۱ اختلاف نداشتند. در شکل ۲ توزیع دو بعدی شمارش کل نشان داده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده، تأثیر هم زمان دو عامل نیتریت سدیم و نیسین بر کاهش تعداد کل باکتری ها در گوشت تخمیری با مقدار p برابر با ۰/۰۰۲۶ معنادار بود.

رابطه ۲: A) غلظت نیتریت سدیم و B غلظت نیسین می باشد). شمارش کل = 2848.94A+2327.94B+11560.00

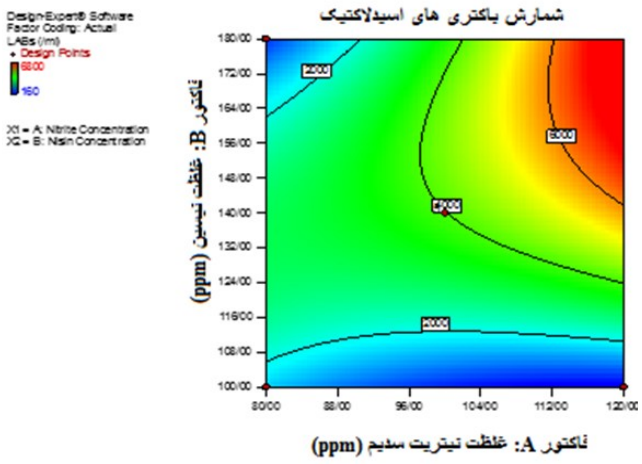
نتایج آنالیز ANOVA نشان داد اثر عوامل بر روی شمارش میکروارگانیسم های مولد فساد در سوسیس تخمیری خطی می باشد. بنابراین نرم‌افزار قادر به پیش‌گویی شرایط بهینه نبود. همچنین رابطه درجه دو بین اثر فاکتورها و شمارش باکتری های اسید لاکتیک وجود داشت (رابطه ۳). در این رابطه A غلظت نیتریت سدیم و B غلظت نیسین را نشان می دهد. بنابراین این مدل ارزش بررسی داشت. هم چنین رابطه مدل طراحی شده با عوامل مورد بررسی معنی دار بود در حالی که عدم تناسب رابطه معنی دار نبود. مقادیر به دست آمده دارای توزیع نرمال بودند و با مقادیر مورد انتظار اختلاف زیادی نداشتند. در شکل ۳ توزیع دو بعدی باکتری های اسیدلاکتیک نشان داده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده، تأثیر همزمان دو عامل نیتریت سدیم و نیسین بر کاهش تعداد باکتری های اسید لاکتیک در گوشت تخمیری با مقدار p برابر با ۰/۰۰۰۱ معنادار بود.

رابطه ۳: A) غلظت نیتریت سدیم و B غلظت نیسین می باشد): شمارش= 1459.90A+1594.52B+3980.00 باکتری های اسیدلاکتیک



شکل ۲: توزیع دو بعدی نرمال مقادیر به دست آمده از شمارش کلی باکتری ها در نمونه های سوسیس تخمیری طراحی شده. میان کنش عوامل غلظت نیتریت سدیم و نیسین و تأثیر هم زمان آن ها بر تعداد کل باکتری های گوشت تخمیری نشان داده شده است.

ب) بررسی کاهش اسیدیته و میزان بار میکروبی سوسیس های تخمیری پس از یک هفته نگه داری در یخچال: جهت اطمینان از حذف قطعی بار میکروبی عامل فساد از سوسیس های پخته شده توسط نگه دارنده های افزوده شده، این نمونه ها به مدت یک هفته در یخچال ۴ درجه سلسیوس نگه داری شدند. نتایج در جدول ۲ مشاهده می شود. در این شرایط نیز اسیدیته مطلوب ۴/۵ تا ۴/۸ در تیمارهای ۶ (نیتریت و نیسین به ترتیب ۱۰۰ و ۱۹۶/۵۷ ppm) و ۱۲ (نیتریت و نیسین به ترتیب ۸۰ و ۱۸۰ ppm) مشاهده شد. در برخی آزمون ها شمارش عوامل ایجادکننده فساد به بالاتر از سطح استاندارد رسیده است (استاندارد ملی ایران شماره ۲۳۰۳) اما در تیمار ۶ و ۱۲ که از نظر اسیدیته مطلوب هستند شمارش عوامل ایجاد کننده فساد (باکتری های روده ای، *استافیلوکوکوس اورئوس* و کپک- مخمر) نیز صفر بوده است. البته در تیمار ۱۲ تعداد باکتری های اسید لاکتیک به طور معنی داری بیشتر از تعداد آن ها در تیمار ۶ می باشد. از آن جایی که شمارش بالای این باکتری ها شاخص مطلوب سوسیس های تخمیری می باشد (استاندارد ملی ایران شماره ۲۳۰۳) تیمار ۱۲ به عنوان تیمار برگزیده در نظر گرفته شد. آنالیز ANOVA نشان داد نمودار اثر فاکتورها برروی اسیدیته رابطه درجه دو (Quadratic) بود (رابطه ۴). در این رابطه A غلظت نیتریت سدیم و B غلظت نیسین می باشد. بنابراین بررسی این مدل ارزش بررسی را داشت. هم چنین رابطه مدل طراحی شده با عوامل مورد بررسی معنی دار بود اما عدم تناسب رابطه معنی دار نبود. مقادیر به دست آمده دارای توزیع نرمال بودند و با مقادیر مورد انتظار اختلاف زیادی نداشتند. در شکل ۴ توزیع دو بعدی اسیدیته نشان داده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده، تأثیر همزمان دو عامل نیتریت سدیم و نیسین بر کاهش اسیدیته گوشت تخمیری پس از یک هفته نگه داری در یخچال معنادار بود (p= ۰/۰۰۱۳).



شکل ۳: توزیع دو بعدی نرمال مقادیر به دست آمده از شمارش باکتری های اسید لاکتیک در نمونه های سوسیس تخمیری طراحی شده. میان کنش عوامل غلظت نیتریت سدیم و نیسین و تأثیر هم زمان آن ها بر تعداد باکتری های اسیدلاکتیک گوشت تخمیری نشان داده شده است.

جدول ۲: اسیدیته و شمارش انواع باکتری ها در سوسیس های تخمیری پخته شده در شرایط طراحی شده توسط نرم افزار RSM پس از یک هفته نگه داری در ۴ درجه سلسیوس.

آزمایش	نیتریت سدیم (ppm)	نیسین (ppm)	اسیدیته	شمارش کلی باکتری ها (/ml ×۱۰^5)	تعداد باکتری های روده ای (/ml ×۱۰^5)	تعداد کپک و مخمر (ml ×۱۰^5)	تعداد *استافیلوکوس اورئوس* (ml ×۱۰^5)	تعداد باکتری های اسید لاکتیک (ml ×۱۰^5)
۱	۱۰۰	۱۴۰	۵	۴۱۰۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۴۰۰۰۰
۲	۱۰۰	۱۴۰	۴/۹	۳۸۰۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۳۵۰۰۰
۳	۱۰۰	۱۴۰	۵	۳۹۵۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۳۸۰۰۰
۴	۱۰۰	۱۴۰	۴/۹	۳۹۰۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۳۶۰۰۰
۵	۱۰۰	۱۴۰	۵	۳۶۰۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۳۵۰۰۰
۶	۱۰۰	۱۹۶/۵۷	۴/۸	۱۰۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۵۰۰
۷	۱۰۰	۸۳/۴۳	۴/۴	۴۰۰۰۰	۲۵۰	۱۶۰	۰/۰۰	۳۷۰۰۰
۸	۷۲/۷۲	۱۴۰	۵	۶۵۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۲۹۰۰
۹	۱۲۸/۲۸	۱۴۰	۴/۴	۱۰۰۰	۱۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۱۰۰
۱۰	۸۰	۱۰۰	۵/۲	۶۰۰۰۰	۴۵۰	۵۰۰	۶۵۰	۴۸۵۰۰
۱۱	۱۲۰	۱۰۰	۴/۴	۵۷۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۴۸۰۰
۱۲	۸۰	۱۸۰	۴/۷	۱۰۰۰۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۸۰۰۰۰
۱۳	۱۸۰	۱۲۰	۵	۲۴۰۰۰	۶۰۰	۲۵۰	۰/۰۰	۱۷۰۰۰

رابطه ۴: A) غلظت نیتریت سدیم و B غلظت نیسین می باشد):

اسیدیته= -0.22A+0.13B+4/95

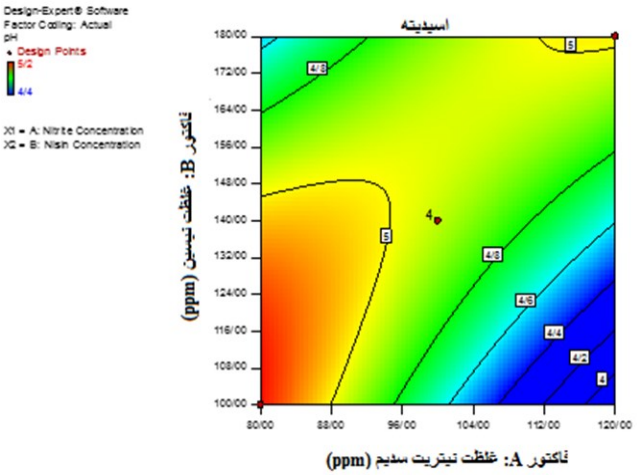
نتایج آنالیز ANOVA نشان داد رابطه درجه دو بین اثر عوامل و شمارش کلی باکتری وجود دارد (رابطه ۵). در این رابطه A غلظت نیتریت سدیم و B غلظت نیسین می باشد. بنابراین این مدل ارزش بررسی را داشت. هم چنین رابطه مدل طراحی شده با عوامل مورد بررسی معنی دار بود در حالی که عدم تناسب رابطه معنی دار نبود. مقادیر به دست آمده دارای توزیع نرمال بودند و با مقادیر مورد انتظار اختلاف زیادی نداشتند. در شکل ۵ توزیع دو بعدی شمارش کل باکتری ها نشان داده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده، تأثیر هم زمان دو عامل نیتریت سدیم و نیسین در کاهش تعداد کل باکتری ها در گوشت تخمیری پس از یک هفته نگه داری در یخچال معنادار بود (p= ۰/۰۰۹).

رابطه ۵: A) غلظت نیتریت سدیم و B غلظت نیسین می باشد):

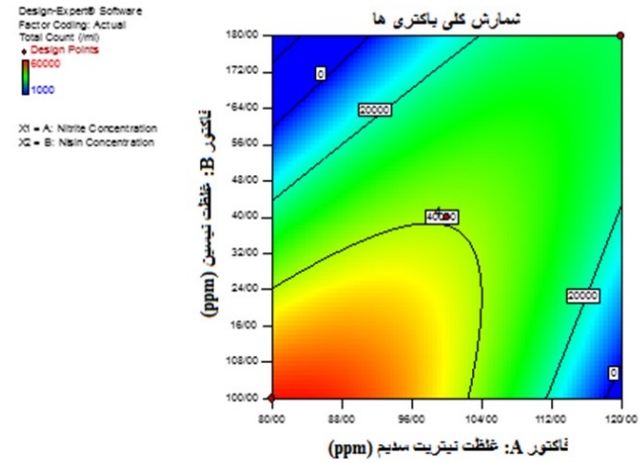
شمارش کل= 2987.37A+2662.15BB+10987.26

نتایج آنالیز ANOVA نشان داد اثر عوامل بر روی شمارش میکروارگانیسم های مولد فساد در سوسیس تخمیری خطی می باشد. بنابراین نمی‌توان نرم‌افزار قادر به پیش‌گویی شرایط بهینه نبود. همچنین رابطه درجه دو بین اثر فاکتورها و شمارش باکتری های اسید لاکتیک وجود داشت (رابطه ۶). در این رابطه A غلظت نیتریت سدیم و B غلظت نیسین می باشد. بنابراین این مدل ارزش بررسی را داشت. هم چنین رابطه مدل طراحی شده با عوامل مورد بررسی معنی دار بود در حالی که عدم تناسب رابطه معنی دار نبود. مقادیر به دست آمده دارای توزیع نرمال بودند و با مقادیر مورد انتظار اختلاف زیادی نداشتند. در شکل ۶ توزیع دو بعدی شمارش باکتری های اسیدلاکتیک نشان داده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده، تأثیر همزمان دو عامل نیتریت سدیم و نیسین در کاهش تعداد باکتری های اسید لاکتیک پس از یک هفته نگه داری در یخچال در گوشت تخمیری معنادار بود (p= ۰/۰۰۲).

رابطه ۶: A) غلظت نیتریت سدیم و B غلظت نیسین می باشد):



شکل ۴: توزیع دو بعدی مقادیر به دست آمده از اسیدیته در نمونه های سوسیس تخمیری طراحی شده پس از یک هفته نگه داری در یخچال. میان کنش عوامل غلظت نیتریت سدیم و نیسین و تأثیر هم زمان آن ها بر اسیدیته گوشت تخمیری نشان داده شده است.



شکل ۵: توزیع مقادیر به دست آمده از شمارش کل باکتری ها در نمونه های سوسیس تخمیری طراحی شده پس از یک هفته نگه داری در یخچال. میان کنش عوامل غلظت نیتریت سدیم و نیسین و تأثیر هم زمان آن ها بر تعداد باکتری های اسیدلاکتیک گوشت تخمیری نشان داده شده است.

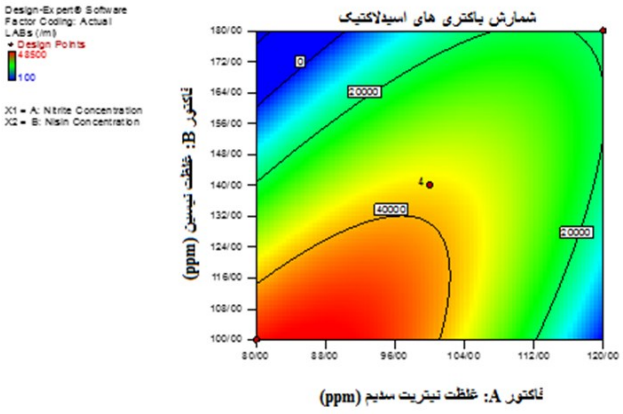
شمارش باکتری های اسیدلاکتیک= -1453.79A-13368.54B+37250/00

ج) *بررسی کاهش اسیدیته و میزان بار میکروبی سوسیس های تخمیری پس از یک ماه نگه داری در یخچال:* با توجه به نتایج طراحی آزمایش RSM از بین ۱۳ آزمایش طراحی شده، علاوه بر محصول آزمایش شماره ۱۲، دو محصول دیگر مربوط به تیمارهای ۶ و ۹ نیز که میزان باکتری های غیر مفید آن به صفر

می‌رسید و اسیدیته مطلوب را داشت باتوجه به جدول ۲ انتخاب گردید. علاوه بر اندازه گیری اسیدیته و آنالیزهای میکروبی که در مراحل قبل بر روی نمونه ها انجام می شد، این محصولات از نظر شمارش *کلاستریدیوم* نیز مورد بررسی قرار گرفتند. هم چنین میزان نیتریت باقی مانده در آن ها نیز اندازه گیری شد (جدول ۳). اسیدیته محصول نهایی در حد مطلوب (۴/۸-۴/۵) باقی مانده بود و در هر ۳ نمونه هم چنان شمارش میکروبی شامل شمارش کل، شمارش باکتری های اسید لاکتیک، باکتری های روده ای، *استافیلوکوس اورئوس*، مخمر-کپک و هم چنین *کلاستریدیوم* در حد صفر تعیین شد. نیتریت سدیم بعد از یک ماه نگه داری در یخچال تا حد مجاز استاندارد (استاندارد ملی ایران شماره ۲۳۰۳ و استاندارد بین المللی ISO 17604) کاهش یافت.

بحث

افزودن نگه دارنده به فرآورده های گوشتی امری لازم است. نمک های نیتریت و نیترات معمول ترین نگه دارنده های فرآورده های گوشتی هستند. افزودن باکتریوسین های خالص شده به گوشت می تواند موجب کاهش میزان نیاز به افزودن ترکیبات نیتریتی و نیتراتی شود. نیسین از جمله این ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی است که به طور وسیع توسط *لاکتوکوکوس لاکتیس* تولید می شود و در برخی از صنایع غذایی کاربرد پیدا کرده است. این باکتریوسین مورد تأیید سازمان بهداشت جهانی است (۱۵). در بررسی حاضر شمارش کلی باکتری ها در محیط کشت Plate Count Agar انجام شد (۱۳). سایر باکتری ها در محیط های اختصاصی رشد یافتند که از رشد باکتری های محیطی جلوگیری می کنند. نیسین قادر به حذف کامل اسپور باکتری ها در غذا نمی باشد. پژوهی (Pajohi) و همکاران در سال ۲۰۱۰ از غلظت های ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ ppm نیسین برای کنترل سلول های رویشی *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus*) و *باسیلوس سوبتیلیس* (*Bacillus subtilis*) در سوپ جو تجاری استفاده کردند. نیسین موجب افزایش مدت زمان ماندگاری سوپ جو در دمای ۸ درجه سلسیوس شد اما به طور کامل باکتری ها را حذف نکرد. باقی ماندن *باسیلوس* می تواند به دلیل کارایی پایین نیسین در حذف باکتری هایی باشد که طی نگه داری غذا به شکل اسپور تبدیل شده اند (۱۶). بنابراین در بررسی حاضر از نیسین همراه با نیتریت سدیم جهت دست یابی به اسیدیته مناسب و بار میکروبی مجاز در سوسیس تخمیری گوشت گاو استفاده شد. با استفاده هم زمان از نیتریت سدیم و نیسین در برخی از آزمون های طراحی شده با روش سطح پاسخ، تعداد باکتری های روده ای به صفر رسید و این اثر تا یک هفته و سپس یک ماه پس از نگه داری در یخچال پایدار بود. در بررسی حاضر، مقایسه اثر نیسین و



شکل ۶: توزیع دو بعدی مقادیر به دست آمده از شمارش باکتری های اسید لاکتیک در نمونه های سوسیس تخمیری طراحی شده پس از یک هفته نگه داری در یخچال. میان کنش عوامل غلظت نیتریت سدیم و نیسین و تأثیر همزمان آن ها بر تعداد باکتری های اسیدلاکتیک گوشت تخمیری نشان داده شده است.

جدول ۳: اسیدیته، آنالیز میکروبی و میزان نیتریت باقی مانده در نمونه های سوسیس منتخب پس از یک ماه نگه داری در یخچال.

آزمایش	نیتریت اولیه (ppm)	شمارش کلی باکتری (cfu/g)	*استافیلوکوس اورئوس* (cfu/g)	باکتری های روده ای (cfu/g)	کپک –مخمر (cfu/g)	باکتری های اسید لاکتیک (cfu/g)	اسیدیته	باقی مانده نیتریت (ppm)
۱۲	۸۰	۱۷۱۰۰۰	۰	۰	۰	۱۶۵۰۰۰	۴/۵	۷/۳
۶	۱۰۰	۲۰۰۰۰۰	۰	۰	۰	۱۱۹۰۰۰	۴/۵	۸/۴۷
۹	۱۲۸/۲۸	۳۰۰۰۰۰	۰	۰	۰	۲۴۲۰۰۰	۴/۸	۵/۷

نیتریت سدیم بر روی شمارش کل باکتری ها در آزمایش های تک فاکتوری نشان داد با افزودن نیسین در همه غلظت ها کاهش معنی داری در شمارش کل در سوسیس های خام مشاهده نگردید اما بعد از پخت و نگه داری سوسیس های پخته شده به مدت یک هفته، شمارش کل باکتری ها نسبت به شمارش کل در نمونه شاهد کاهش یافته بود اما اثر نیتریت سدیم در حفظ تعداد کل باکتری ها پس از یک هفته نگه داری در یخچال پایدار بود. بنابراین می توان نتیجه گرفت نیتریت در مقایسه با نیسین اثر ضدباکتریایی پایدارتری دارد. ریندهه (Rindhe) و همکاران در سال ۲۰۱۷ با هدف تولید سوسیس مرغ، از گوشت مرغ همراه با پروتئین سویا جهت ایجاد بافت مناسب و ادویه و چاشنی استفاده کردند. اسید لاکتیک و نیسین به عنوان نگه دارنده به گوشت مرغ اضافه شد. سوسیس های تولید شده در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس بدون تحمل فشار به مدت ۲۰ دقیقه پخته شدند و همراه با نمونه های شاهد بدون نیسین در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگه داری شدند. نتایج نشان داد افزودن مقدار ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم نیسین به گوشت مرغ موجب کاهش شمارش کلی باکتری ها در مقایسه با نمونه شاهد شد و جمعیت کپک- مخمر را به طور کامل حذف کرد. علاوه بر آن افزودن نیسین موجب افزایش شاخص های رطوبت، میزان اسید آمینه تیروزین و کیفیت حسی سوسیس شد. البته افزودن اسید لاکتیک موجب پایین آمدن اسیدیتهگوشت تا حد مطلوب در چهار روز اول شد اما در روزهای بعد اسیدیته افزایش یافت. این افزایش همراه با بالا رفتن شمارش کلی باکتری ها بود و نشان داد غلظت ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم نیسین به تنهایی قادر به کنترل بار میکروبی مولد فساد در گوشت های مورد بررسی نمی باشد (۱۷). کارا (Kara) و همکاران در سال ۲۰۱۴ از غلظت های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ ppm نیسین جهت کنترل رشد *لیستریا مونوسایتوژنز* (*Listeria monocytogenes*) در گوشت مرغ استفاده کردند. در یکی از تیمارها 10^6 سلول باکتری همراه با ۱۰۰ ppm نیسین به گوشت اضافه شد. البته نیسین که در بالاترین غلظت در این تیمار اضافه شده بود، قادر به حذف کامل باکتری از گوشت پس از یک هفته نگه داری در یخچال نبود (۱۸). این در حالی است که در مطالعه همپیکیان و اوگر (Hampikyan and Ugur) در سال ۲۰۰۷، غلظت ۱۰۰ ppm نیسین همراه با ۲۰۰ ppm نیتریت سدیم به طور کامل *لیستریا مونوسایتوژنز* را در گوشت قرمز از بین برد (۱۹). در تحقیق حاضر با استفاده هم زمان از نیتریت سدیم و نیسین، در تیمارهایی که از غلظت های نیتریت و نیسین به ترتیب ۸۰ و ۱۸۰ ppm (تیمار شماره ۱۲)، ۱۰۰ و ۱۹۶ ppm (تیمار شماره ۶) و ۱۲۸/۲۸ و ۱۴۰ ppm (تیمار شماره ۹) استفاده شده بود، رشد میکروب های مولد فساد به طور کامل کنترل شده بود، ضمن این که شمارش باکتری های اسید لاکتیک از حد 10^6 که تعداد گزارش شده در سوسیس های تخمیری می باشد (۱۰ و ۱۱)، بیش تر نشده بود و هم چنین در اثر رشد بیش از حد آن ها اسیدیته گوشت از حد مطلوب ۴/۸ تا ۴/۵ کمتر نشده بود. ریمن (Rayman) و همکاران در سال ۱۹۸۱ در بررسی خود گزارش کردند که استفاده از نیسین با غلظت ۷۵ ppm در مهار رشد *کلاستریدیوم اسپوروژنز* (*sporogenes Clostridium*) در گوشت تخمیر شده، بهتر از ۱۵۰ ppm نیتریت بود. البته فعالیت مهاری نیسین با افزایش تعداد اسپورها یا افزایشاسیدیته گوشت، کاهش می یافت. در گوشت تحت تیمار با ۷۵ ppm نیسین، ذخیره سازی در یخچال و فریزر به مدت ۵۶ روز منجر به کاهش میزان نیسین شد اما استفاده ترکیبی از ۴۰ ppm نیتریت و ۷۵ یا ۱۰۰ ppm نیسین تقریباً به طور کامل رشد *کلاستریدیوم اسپوروژنز* را در گوشت تخمیر شده کنترل کرد. این محققین پیشنهاد دادند ترکیب نیتریت و نیسین به نظر می رسد دارای اثر هم افزایی باشند (۲۰). در مطالعه حاضر نیز استفاده توأم نیتریت و نیسین موجب کنترل کامل گونه های *کلاستریدیوم* در سوسیس تخمیری گاو گردید. البته با توجه به نتایج آزمون های تک فاکتوری که نشان دادند پایداری اثر نیتریت بیش تر از نیسین در مهار رشد باکتری هاست و با وجود توانایی تشکیل اسپور در گونه های *کلاستریدیوم* و قدرت ماندگاری آن ها، پیشنهاد می شود در صورت استفاده از نیسین جهت نگه داری گوشت های تخمیری، نیتریت به طور

کامل از ترکیبات افزوده شده حذف نگردد. زیونگ (Xiong) و همکاران در سال ۲۰۲۰ استفاده همزمان نیسین و عصاره هسته انگور را برای نگه داری گوشت مورد استفاده قرار دادند و این دو عامل به طور همزمان قادر به کنترل کامل عوامل فساد در گوشت نبودند (۲۱). چارکلم (Churklam) و همکاران در سال ۲۰۲۰ اثر متقابل هم افزایی کارواکرول (carvacrol) و نیسین را در برابر *لیستریا مونوسایتوژنز* در مدت ۷ روز نگه داری کالباس های بولونیای قطعه قطعه شده در ۴ درجه سلسیوس مورد بررسی قرار دادند. حضور کارواکرول همراه با نیسین منجر به کاهش قابل توجهی در رشد *لیستریا مونوسایتوژنز* در مقایسه با نمونه های شاهد شد و البته در مطالعه ایشان اثر هم افزایی این دو عامل بر روی سایر باکتری های مولد فساد در گوشت ارزیابی نشد (۲۲). افزودن نیسین به فرآورده های غذایی علاوه بر کنترل بار میکروبی عامل فساد، به عنوان عامل کنترل کننده بیماری نیز با اهمیت شمرده می شود به طوری که نگیوئن (Nguyen) و همکاران در سال ۲۰۲۰ اثر تقویت شده پروبیوتیک های مولد نیسین را بر کنترل بیماری های سیستمیک و دهان پیشنهاد دادند (۲۳). میزان نیتریت موجود در فرآورده های گوشتی با توجه به استاندارد ملی ۲۳۰۳ حداکثر ۱۲۰ ppm می باشد و طبق نظر کارشناسان سازمان خوار و بار ملل متحد، میزان مجاز مصرف نیتریت در غذا روزانه ۰/۴ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن انسان است (۱۴). در تحقیق حاضر پس از اعمال تیمارهای برگزیده در بهینه سازی سطح پاسخ، نیتریت سدیم پس از یک ماه نگه داری در یخچال تا حد مجاز استاندارد (استاندارد ملی ایران شماره ۲۳۰۳) کاهش یافت و حتی به مقدار بسیار پایین ۵/۷ تا ۸/۴۷ رسید. دلیل این امر می تواند به دلیل فعالیت باکتری های موجود در گوشت تخمیری باشد. این باکتری ها با تولید آنزیم نیتریت ردکتاز می توانند نیتریت را به آمونیوم تبدیل کنند. در سوسیس هایی که فرایند تخمیر در آنها به خوبی انجام نشده است، نیتریت باقی مانده می تواند طی واکنش های شیمیایی به اکسید نیترو تبدیل شود که در صورت ترکیب با میوگلوبین گوشت به نیتروزومیوگلوبولین تبدیل می شود (۲۴).

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر با افزودن نگه دارنده طبیعی نیسین به سوسیس تخمیری، غلظت نگه دارنده نیتریت به میزان قابل توجهی کاهش یافت و این کاهش تأثیری در رشد بیش از حد مجاز میکروارگانیسم های مولد فساد نداشت. همچنین اسیدیته سوسیس تخمیری و میزان نیتریت باقی مانده نیز در گوشت تا حد مطلوب کاهش یافت. هم چنین نیتریت افزوده شده همراه با نیسین توانست رشد *کلاستریدیوم* را تا یک ماه پس از نگه داری در یخچال کنترل کند که همه این پارامترها در حد مجاز استانداردهای ملی ایران و استانداردهای بین المللی ISO بودند. بنابراین افزودن ۱۸۰ ppm نیسین جهت تولید سوسیس تخمیری گوشت گاو پس از اخذ مجوزهای لازم پیشنهاد می شود. در این تیمار میزان نیتریت تا حد ۸۰ ppm کاهش یافته است.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمام نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده اند.

تشکر و قدردانی

این بررسی با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان از طریق در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی انجام شده است که بدین وسیله از ریاست و معاونت علمی این دانشگاه تشکر می نماییم.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. Merino L, Edberg U, Fuchs G, Aman P. Liquid chromatographic determination of residual nitrite/nitratein foods: NMKL collaborative study. J AOAC Int. 2010; 83 (2): 365-75.

2. Ferreira IMPL, Silva S. Quantification of residual nitrite and nitrate in ham by reverse phase high performance liquid choromatography/diode detector. Talanta. 2018; 74: 1598-1602.

3. Aran HK, Biscola V, Jaffrès E Dousset X, Pillot G. Bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* KT2W2G isolated from mangrove forests in southern Thailand: purification characterization and safety evaluation. Food Control. 2015; 54: 126-134.

4. Birri DJ, Brede DA, Forberg T, Holo H, Nes IF. Molecular and genetic characterization of a novel bacteriocin locus in *Enterococcus avium* isolates from infants. Appl Environ Microbiol. 2010; 76: 483-492.

5. Solomakos N, Govaris A, Koidis P, Botsoglou N. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. Meat Sci. 2008; 80: 159-166.

6. Monica F, Sara C. *Yarrowia lipolytica* strains in dried fermented sausage manufacture. J Meat Sci. 2015; 75: 669-675.

7. Sadler GD, Murphy PA. pH and titratable acidity. In: Nielsen SS, editors. Food analysis. 3rd ed. New York. Springer Science and Business Media Publishers; 2003: 207–225.

8. Alvarez-Sieiro P, Montalbán-López M, Mu D, Kuipers OP. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. Appl Microbiol Biotechnol. 2016; 100(7): 2939-51.

9. Hereu A, Bover-Cid S, Garriga M, Aymerich T. High hydrostatic pressure and biopreservation of dry-cured ham to meet the Food Safety Objectives for *Listeria monocytogenes*. Int J Food Microbiol. 2012; 154 (3): 107-112.

10. Rahnama E, Naghavi NS. Optimization of fermented cow meat quality by lactic acid bacteria in batch fermentation JMW. 2017; 10(3): 263-274.

11. Wang W, Wang XH, Ren HY, Liu DY, Zhu WY. Effect of inoculating *Lactobacillus sakei* starter cultures on themicrobiological quality and nitrite depletion of Chinese fermented sausages. J Food Control. 2013; 32: 591-596.

12. Khairul Anwar M S, Mohamed Afizal M A. Overview on the response surface methodology (RSM) in extraction processes. J. Appl. Sci. Eng. 2015; 2(1): 1-10.

13. Riazi F, Zeynali F, Hoseini H, Behmadi H. Effect of dry red grape pomace as a nitrite substitute on the microbiological and physicochemical properties and residual nitrite of dry-cured sausage. Nut Food Sci Res. 2016; 3(3): 37-44.

14. Jansen S, Dera RT, Ruth MS, Syofyasti MN, Yosy CS. Analysis of nitrite and nitrate in the corned beef and smoked beef by using visible spectrophotometry method. InIOP Conference Series: Earth and Environ Sci. 2018; 205(1): 012039.

15. Harris LJ, Fleming HP, Klaenhammer TR. Developments in nisin research. Food Res Int. 1992; 25: 57-66.

16. Pajohi MR, Tajik H, Farshid AA. Antimicrobial activity of Nisin on *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in a food model and their ultra structural investigation. Iranian J Med Microbiol. 2010; 4(3): 45-52. [n Persian]

17. Rindhe SN, Shinde AT, Jadhav BA, Kumbhar VH. Application of hurdle technology for

preservation of chiken susage at ambient temperature (37±1 °C). Int J Pure Appl Biosci. 2017; 5(4): 480-488.

18. Kara R, Yaman H, Gök V, Akkaya L. The effect of nisin on *Listeria monocytogenes* in chicken burgers. Indian J Anim Res. 2014; 48 (2): 171-176.

19. Hampikyan H, Ugur M. The effect of nisin on *L. monocytogenes* in Turkish fermented sausages (sucuks). Meat Sci. 2007; 76(2): 327-332.

20. Rayman MK, Aris B, Hurst A. Nisin: a possible alternative or adjunct to nitrite in the preservation of meats. Appl Environ Microbiol. 1981; 41(2): 375-380.

21. Xiong Y, Chen M, Warner RD, Fang Z. Incorporating nisin and grape seed extract in chitosan-gelatine edible coating and its effect on cold storage of fresh pork. Food Control. 2020; 110: 107018.

22. Churklam W, Chaturongakul S, Ngamwongsatit B, Aunpad R. The mechanisms of action of carvacrol and its synergism with nisin against *Listeria monocytogenes* on sliced bologna sausage. Food Control. 2020; 108: 106864.

23. Nguyen T, Brody H, Lin GH, Rangé H, Kuraji R, Ye C, Kamarajan P, Radaic A, Gao L, Kapila Y. Probiotics, including nisin-based probiotics, improve clinical and microbial outcomes relevant to oral and systemic diseases. Periodontol. 2020; 82(1): 173-85.

24. Hammes WP. Metabolism of nitrate in fermented meats: the characteristic feature of a specific group of fermented foods. Food Microbiol. 2012; 29(2): 151-6.