بررسی اثرات ضد میکروبی روغن سیاه دانه در سوسیس با نیتریت کاهش یافته

امین ابوالحسن زاده[1] ، محمدرضا خانی[2*] ، مریم فهیم دانش[2]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهرقدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهرقدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

***نویسنده مسئول:** *m.khani@qodsiau.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۰۱

چکیده

این تحقیق با هدف بررسی اثرات ضد میکروبی روغن سیاه‌دانه در سوسیس همراه با بررسی امکان کاهش نیتریت در آن انجام پذیرفت. به این منظور نمونه‌های سوسیس با غلظت‌های ۲ و ۳ درصد روغن سیاه‌دانه حاوی مقادیر مختلف نیتریت (شامل ۰، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ پی پی ام) در قالب هشت تیمار و یک نمونه شاهد بدون روغن سیاه‌دانه و با ۱۲۰ppm نیتریت تهیه گردیدند و برای مدت یک ماه در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس ویژگی‌های میکروبی تمامی نمونه‌های تولیدی شامل شمارش‌های کلی باکتریایی، کلیفرم‌ها، سالمونلا، *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *کلستریدیوم پرفرینجنس*، کپک و مخمر در طی روزهای ۱، ۱۱، ۲۱ و ۳۱ نگهداری و ویژگی‌های ارگانولپتیکی پس از تولید مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تیمارهای حاوی ۲ و ۳ درصد روغن سیاه دانه با مقادیر ۹۰ppm و ۶۰ppm نیتریت عمدتاً در طی مدت نگهداری دارای نتایج شمارش‌های کلی باکتریایی، کلیفرم‌ها، *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و کپک و مخمری مشابه با نمونه شاهد بودند. اما شمارش‌های میکروبی انجام شده در تمامی نمونه‌ها تا انتهای زمان نگهداری افزایش معنی داری داشتند ($P<0/05$). سالمونلا و *کلستریدیوم پرفرینجنس* نیز در هیچ یک از نمونه‌ها جداسازی نگردید. به طور کلی نتایج حاکی از آن بود که افزایش روغن سیاه‌دانه از ۲ به ۳ درصد موجب کاهش بار میکروبی در غلظت‌های ثابت نیتریت شد. همچنین کاهش نیتریت در تیمارها همراه با افزودن روغن سیاه-دانه عمدتاً سبب کاهش معنی‌دار امتیاز رنگ، طعم و پذیرش کلی در مقایسه با شاهد گردید اما روی ویژگی‌های بافت و بو تاثیر معنی‌داری نداشت.

واژگان کلیدی: کاهش نیتریت، روغن سیاه دانه، سوسیس، ویژگی‌های میکروبی.

مقدمه

سوسیس‌های حرارت دیده از جمله مواد غذایی آماده مصرف هستند که می‌توانند بصورت سرد یا گرم، به عنوان جزئی از غذا یا به تنهایی مصرف شوند. در این محصولات استفاده از نیتریت و حرارت دهی سبب بهبود ایمنی و ماندگاری بیشتر آن‌ها نسبت به گوشت خام می شود (رکنی، ۱۳۸۵؛ Toldra, 2010). نیتریت در بسیاری از فراورده‌های گوشتی با هدف بازدارندگی از رشد میکروارگانیسم‌ها به خصوص *کلستریدیوم بوتولینوم* و همچنین برای تثبیت رنگ و کنترل اکسیداسیون چربی‌ها استفاده می شود. با وجود مزایای مختلف، نیتریت یک ماده سمی با دوز کشنده انسانی ۲۲-۲۳ میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن است. البته مقادیر پایین استفاده از آن در فراورده‌های گوشتی، ۲۰۰ppm یا کمتر، تقریباً هر گونه خطر مسمومیت را از طریق مصرف گوشت‌های عمل آوری شده از بین می برد (Jensen, 2004; Nollet and Toldra, 2006). علاوه بر سمیت مستقیم، نیتریت ممکن است با آمین‌های نوع دوم حاصل از تجزیه پروتئین‌ها در طی فرآیند حرارت‌دهی یا تحت شرایط اسیدی معده واکنش دهد و ترکیبات نیتروزآمین را تولید کند که تقریباً ۸۰ درصد آنها حداقل در یک گونه حیوانی سرطان زا بوده اند. هرچند تاکنون هیچ دوز آستانه مشخصی برای سرطان‌زایی نیتروزامین ها در رژیم غذایی تعیین نشده است (Shibamoto and Bjeldanes, 2009). بنابراین بدیهی است که مصرف کنندگان به دلایل فوق ترجیح می-دهند فرآورده‌های گوشتی با مقادیر کمتر افزودنی‌های شیمیایی و بویژه نیترات و نیتریت را مصرف نمایند. کاهش نیتریت باقیمانده در این محصولات با راهکارهایی مانند

اصلاح فرمولاسیون، استفاده از باکتری‌های احیا کننده نیتریت، بسته‌بندی تحت خلاء و استفاده از پرتو گاما صورت گرفته است (زاهدی، ۱۳۹۰). همچنین یکی دیگر از راه‌های جایگزینی یا کاهش نیتریت استفاده از ادویه‌ها و گیاهان حاوی مواد ضدمیکروبی است (خورسندی و اسکندری، ۱۳۹۳). سیاه دانه[1] با نام علمی *نایجلا ساتیوا*[2] گیاهی یکساله از خانواده *رانکولاسه آ*[3] می باشد. دانه‌های این گیاه حاوی ترکیبات ضد باکتریایی، آنتی اکسیدانی و همچنین ترکیبات سودمند متنوع مثل تیموکینون، اسیدهای چرب چند غیر اشباع، فیتواسترول‌ها، توکوفرول‌ها و غیره می‌باشد (Sultan et al., 2012). در بررسی خواص ضد میکروبی روغن پرس سرد سیاه دانه علیه گونه‌های میکروبی متفاوت از قبیل *اشریشیاکلی، سودوموناس آئروژنس، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتلیس، آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس فلاووس، کاندیدا آلبیکانس و ساکارومایسس سرویزیه* مشخص شده است که روغن سیاه دانه علیه همه این میکروارگانیسم‌ها به جز *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس فلاووس* اثر بازدارندگی داشته است (Ramadan et al., 2012). به علاوه روغن سیاه دانه فعالیت محافظتی و درمانی دارد. گزارش شده است که روغن سیاه دانه دارای فعالیت ضد توموری، ضد التهابی، شبه آنتی هیستامینی و تحریک کننده سیستم ایمنی می باشد و برای درمان مشکلات تنفسی مثل احتقان، برونشیت، آسم و آمفیزم و برای سلامت و فعالیت مناسب دستگاه گوارش و بهبود عملکرد کلیه و کبد استفاده می شود. همچنین روغن سیاه دانه می‌تواند اثرات سوء نیتریت را کاهش داده و اثر بازدارندگی بر سرطان کبد ناشی از نیتروز آمین ایجاد کند (Khoddami et al., 2011؛ Helal *et al*., 2003؛ Waer et al., 2005). لازم به ذکر است که روغن سیاه دانه از سوی سازمان غذا و داروی آمریکا به عنوان GRAS[4] طبقه بندی شده است (Kaskoos, 2011). دانه های خشک شده سیاه دانه برای دهه‌ها جهت مقاصد آشپزی و دارویی استفاده شده است. همچنین دانه‌ها و روغن سیاه دانه به عنوان یک مکمل غذایی کاربرد دارد (Lutterodt et al., 2010; Khoddami et al., 2011). علیرغم اینکه خواص ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی سیاه دانه در مطالعات متعدد گزارش شده و در برخی تحقیقات جهت بهره مندی از اثرات آن، در مواد غذایی مختلف استفاده شده است، اما تاکنون اثرات ضد میکروبی روغن سیاه دانه با رویکرد کاهش میزان استفاده از نیتریت در فراورده‌های گوشتی مورد توجه قرار نگرفته است. بعلاوه بواسطه گزارشاتی مبنی بر کاهش اثرات سوء نیتریت توسط سیاه دانه و همچنین اثرات سلامت‌بخش آن، به نظر می رسد استفاده از روغن سیاه دانه در تولید فراورده‌های گوشتی حاوی نیتریت حائز اهمیت است. لذا در این مطالعه امکان کاهش میزان نیتریت در فرمولاسیون سوسیس با بررسی اثرات ضد میکروبی روغن سیاه دانه مورد توجه قرار گرفته است.

مواد و روش کار

روش تهیه سیاه دانه و استخراج روغن

در این مطالعه دانه‌های تایید شده سیاه دانه از نظر جنس و گونه (با نام علمی *نایجلا ساتیوا*) از شرکت پاکان بذر اصفهان (تولید کننده ی بذر گیاهان دارویی) تهیه شد.دانه ها تمیز شده، شسته شده و با جریان هوا خشک گردید و با دستگاه پرس حلزونی، بطور مکانیکی با فشار حدود ۱۶۰۰ bar و با جریان حدود ۱۰ kg/h، بدون اعمال گرما در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی گراد) روغن گیری شد (Gupta, 2012). روغن حاصله به مدت ۱۲ ساعت در دمای اتاق بی حرکت گذاشته شد تا فاز روغنی جدا شود و سپس فاز روغنی از طریق سر

1. Black cumin
2 .*Nigella sativa*
3. *Ranunculaceae*
4 .Generally Regarded as Safe

ریز کردن جدا گردید و در ظرف در بسته تا روز تحقیق در دمای یخچال (۴ درجه سانتیگراد) نگهداری شد.

روش تولید سوسیس

در فرمولاسیون نمونه‌های سوسیس از گوشت (۵۰٪)، روغن مایع (۱۶٪)، نشاسته (۲/۴٪)، ایزوله سویا (۲٪)، گلوتن (۱/۳٪)، شیر خشک (۰/۹٪)، آب و یخ (۲۵٪)، پلی فسفات سدیم (۰/۵٪)، نمک (۱/۲٪) و مخلوط ادویه جات (۰/۶٪) (شامل سیر، جوز هندی، زنجبیل ، فلفل سیاه و قرمز)، اسید آسکوربیک (۰/۰۵٪)، نیتریت سدیم و روغن سیاه دانه (جدول ۱) استفاده شد.

جدول۱- معرفی نمونه‌های مورد استفاده در تحقیق

نمونه	نیتریت (ppm)	درصد روغن سیاه دانه	درصدروغن نباتی
C	۱۲۰	۰	۱۶
T1	۹۰	۲	۱۴
T2	۹۰	۳	۱۳
T3	۶۰	۲	۱۴
T4	۶۰	۳	۱۳
T5	۳۰	۲	۱۴
T6	۳۰	۳	۱۳
T7	۰	۲	۱۴
T8	۰	۳	۱۳

میزان نیتریت مورد استفاده در نمونه شاهد ۱۲۰ppm بود که این میزان در تیمارها با استفاده از غلظت‌های ۲ و ۳ درصد روغن سیاه دانه در فرمولاسیون به سطوح ppm ۹۰، ۶۰، ۳۰ و ۰ کاهش داده شد. برای تهیه نمونه‌ها، ابتدا گوشت انجماد زدایی شده، به قطعات کوچک‌تر بریده شده و توسط چرخ گوشت چرخ گردید. گوشت چرخ کرده، سیر، مخلوط نمک‌های عمل‌آورنده شامل نمک طعام، پلی‌فسفات سدیم و نیتریت سدیم به داخل کاتر اضافه شد و با دور کند (کمتر از ۳۰۰۰rpm) به مدت ۲ دقیقه مخلوط شد. سپس ادویه جات و نیمی از یخ خرد شده وارد محفظه کاتر شد و با دور تند (۶۰۰۰-۵۰۰۰rpm) به مدت ۳۰-۲۰ ثانیه کاتریزاسیون انجام گردید. در ادامه روغن مایع نباتی و روغن سیاه دانه (مطابق جدول ۱) وارد محفظه کاتر شد و با دور تند به مدت ۳۰-۲۰ ثانیه مخلوط گردید. سپس پروتئین ایزوله سویا، شیر خشک، نشاسته و گلوتن و باقیمانده یخ خرد وارد محفظه کاتر شده و با دور تند به مدت ۳۰-۲۰ ثانیه مخلوط شد و در پایان مرحله کاتریزاسیون اسید آسکوربیک وارد محفظه کاتر شد و با دور تند به مدت ۳۰-۲۰ ثانیه مخلوط گردید. در ادامه مخلوط وارد محفظه دستگاه پرکن شده و ضمن مخلوط شدن ثانویه در پوشش-های پلی آمیدی با قطر mm ۲۴ پرگردید و به مدت یک ساعت و در دمای ۷۵ درجه سانتیگراد (تارسیدن دمای مرکز محصول به ۷۲ درجه سانتیگراد) در اتاق پخت قرار گرفت. سپس نمونه‌های سوسیس توسط دوش آب سرد (با دمای ۱۵-۱۰ درجه سانتیگراد) به مدت ۱۰ دقیقه تارسیدن دمای مرکز محصول به ۴۰ درجه سانتیگراد سرد گردید و در نهایت وارد سردخانه شده و به مدت یک ماه در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد تا ویژگی‌های میکروبی مورد نظر در فواصل زمانی ده روزه و در طی روزهای ۱، ۱۱، ۲۱ و ۳۱ نگهداری مورد بررسی قرار گیرند.

آزمون‌های میکروبی

به منظور ارزیابی ویژگیهای میکروبی نمونه ها، ابتدا ۱۰ گرم از هر نمونه توزین و با۹۰ گرم آب پپتونه همگن شد و سوسپانسیون اولیه تهیه گردید و رقت‌سازی نیز با آب پپتونه تا رسیدن به رقت‌های مورد نظر صورت پذیرفت و آزمون-های میکروبی به شرح ذیل در سه تکرار انجام گردیدند.

شمارش کلی باکتریایی

با روش کشت آمیخته و با استفاده از محیط کشت پلیت کانت آگار انجام شد و در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید (سازمان ملی استاندارد ایران، ۱۳۸۶).

شمارش کلیفرم

با روش شمارش بیشترین تعداد احتمالی (MPN[1]) و با استفاده ازمحیط کشت آبگوشت لوریل سولفات تریپتوز با غلظت مضاعف و غلظت معمولی، انجام شد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت زمان ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شد. از لوله های گرمخانه گذاری شده با غلظت مضاعف و همچنین لوله‌های گرمخانه گذاری شده با غلظت معمولی که در آنها گاز مشاهده شد به محیط کشت برلیانت گرین لاکتوز بایل براث تلقیح شد و در دمای۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شد. سپس لوله هایی که در لوله دورهام ایجاد گاز کرده اند مثبت در نظر گرفته شده و شمارش شدند و براساس MPN محاسبه و گزارش گردید (سازمان ملی استاندارد ایران، ۱۳۸۷).

شمارش *اشریشیاکلی*

با روش شمارش بیشترین تعداد احتمالی و با استفاده ازمحیط کشت آبگوشت لوریل سولفات با غلظت مضاعف و غلظت معمولی، انجام شد و در در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت زمان ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شد. از هر لوله محیط کشت آبگوشت لوریل سولفات با غلظت مضاعف که در آن کدورت یا گاز مشاهده شد و از هر لوله محیط کشت آبگوشت لوریل سولفات با غلظت معمولی که فقط گاز در آن مشاهده شد، به لوله حاوی محیط کشت EC تلقیح گردید. لوله‌های تلقیح شده در حمام آب گرم در ۴۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. از هر لوله محیط کشت EC گرمخانه گذاری شده که در آن گاز مشاهده شد، به لوله حاوی آب پپتونه که دمای آن به ۴۴ درجه سانتیگراد رسیده است، تلقیح گردید و به مدت زمان ۴۸ ساعت در دمای ۴۴ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد. ۰/۵ میلی لیتر از معرف اندول به لوله های آب پپتونه که گرمخانه گذاری شده اند افزوده شد، سپس خوب هم زده و پس از یک دقیقه بررسی گردید. لوله‌هایی که پس از کشت و گرمخانه گذاری در محیط کشت EC در آنها گاز مشاهده شد و لوله‌های آب پپتونه ای که در آنها اندول تولید شده بود از نظر وجود *اشریشیاکلی* مثبت در نظر گرفته شد. لوله‌های مثبت شمارش گردید و براساس MPN محاسبه و گزارش گردید (سازمان ملی استاندارد ایران، ۱۳۸۴).

شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس*

استافیلوکوکوس اورئوس‌های کوآگولاز مثبت با روش شمارش بیشترین تعداد احتمالی و با استفاده از محیط کشت آبگوشت اصلاح شده جیولیتی و کانتونی با غلظت مضاعف و غلظت معمولی که محلول تلوریت پتاسیم به آن افزوده شده بود انجام شد و روی هر لوله کشت داده شده ۲ تا ۳ میلی لیتر پارافین با دمای ۴۴ تا ۴۷ درجه سانتیگراد ریخته شد و تا جامد شدن پارافین در دمای محیط قرار گرفت. لوله‌های کشت داده شده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت زمان ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. به منظور تایید کوآگولاز مثبت بودن از همه لوله ها در محیط کشت پلاسمای خرگوش فیبرینوژن آگار کشت داده شد و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت دیگر گرمخانه گذاری شد. در مواردی که حتی یک کلنی واکنش مثبت کواگولاز نشان داد

1 .Most probable number

آزمون مثبت در نظر گرفته شد. لوله‌های مثبت شمارش گردید و براساس MPN محاسبه و گزارش گردید (سازمان ملی استاندارد ایران، ۱۳۸۵).

جستجوی سالمونلا

به این منظور، پس از انجام پیش غنی سازی از محیط‌های کشت مایع RVS[1] و MKTTn[2] برای غنی سازی استفاده شد. سپس یک حلقه از کشت به دست آمده از RVS بر روی سطح محیط کشت جامد انتخابی (XLD[3] آگار) و یک حلقه از محیط کشت MKTTn بر روی سطح محیط کشت SS[4] آگار به گونه‌ای که کلنی‌های مجزا در سطح آگار تشکیل شود کشت داده شد. پلیت‌های به دست آمده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت زمان ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. سپس پتری‌ها از نظر وجود کلنی‌های مشخص و غیر مشخص سالمونلا بررسی شد. برای تایید کلنی‌های مشخص از هر یک از پتری‌های دارای محیط کشت انتخابی کشت داده شده چند کلنی مشکوک انتخاب شد. کلنی‌های مشکوک بر روی سطح محیط کشت نوترینت آگار به گونه‌ای که کلنی‌های مشخص و جدا رشد کنند کشت داده شد. پتری‌های کشت داده شده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت زمان ۲۴ ساعت، گرمخانه گذاری شد. کلنی‌های بدست آمده به دو محیط کشت TSI[5] آگار و اوره آگار منتقل شد. محیط‌های کشت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت زمان ۲۴ ساعت، گرمخانه گذاری شده و در فواصل زمانی معین بررسی و نتایج حاصله تفسیر شدند (سازمان ملی استاندارد ایران، ۱۳۸۱).

شمارش *کلستریدیوم پرفرینجنس*

با روش کشت آمیخته به صورت کشت دو لایه و با استفاده از محیط کشت SC[6] آگار که حاوی محلول د – سیکلوسرین بود انجام شد و در شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت زمان ۲۰ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. پس از پایان مدت زمان گرمخانه‌گذاری کلنی های سیاه رنگ که نشان دهنده احتمال وجود *کلستریدیوم پرفرینجنس* بود شمارش شد. سپس تعداد ۵ کلنی سیاه رنگ از هر یک از پلیت‌ها انتخاب شد و به لوله‌های حاوی محیط کشت تیوگلیکولات مایع منتقل گردید و در شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت زمان ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. سپس ۰/۵ میلی لیتر از محلول دی سدیم دی سولفیت و ۰/۵ میلی لیتر از محلول سیترات آهن آمونیم به محیط لاکتوز سولفیت اضافه گردید. پس از پایان زمان گرمخانه‌گذاری بلافاصله ۵ قطره از محیط تیوگلیکولات مایع به محیط کشت لاکتوز سولفیت حاوی محلول دی سدیم دی سولفیت و محلول سیترات آهن آمونیم منتقل شد. سپس در شرایط هوازی در دمای ۴۶ درجه سانتیگراد به مدت زمان ۲۴ ساعت در حمام آب گرمخانه‌گذاری شد. پس از پایان مدت زمان گرمخانه‌گذاری، لوله های حاوی محیط کشت لاکتوز سولفیت را از نظر وجود گاز و رنگ سیاه به دلیل وجود رسوب سولفیت آهن بررسی شد. کلنی‌های مشخص در محیط SC و مثبت بودن آزمون در محیط لاکتوز سولفیت به عنوان *کلستریدیوم پرفرینجنس* در نظر گرفته شد (سازمان ملی استاندارد ایران، ۱۳۸۵).

شمارش کپک ها و مخمر ها

با روش کشت سطحی و با استفاده از محیط کشت[7] DRBCانجام شد و در دمای ۲۵ سانتیگراد به مدت زمان

1. Rappaport Vassiliadis Soya
2. Muller-Kauffmann tetrathionate/novobiocin broth
3. Xylose lysine deoxycholate agar
4. Salmonella higella agar
5. Triple sugar/iron agar
6. Sulfite-cycloserin agar
7. Dichloran- rose bengal chloramphenicol agar

پنج روز گرمخانه‌گذاری گردید (سازمان ملی استاندارد ایران، ۱۳۸۷).

ارزیابی حسی

ویژگی‌های حسی نمونه‌های تولیدی شامل رنگ، طعم، بو، بافت و پذیرش کلی به روش هدونیک پنج نقطه ای توسط ۸ نفر ارزیاب آموزش دیده مطابق با روش محمدی و همکاران (۱۳۸۶) انجام شد. به این منظور نمونه‌های سوسیس از طریق سرخ کردن سطحی گرم شدند و سپس در اختیار ارزیابان قرار گرفتند و امتیازدهی به ویژگی‌های هر نمونه از ۱ تا ۵ انجام گردید. بدین صورت که امتیاز ۱: غیر قابل مصرف یا خیلی ضعیف، ۲: غیر قابل قبول یا ضعیف، ۳: قابل قبول یا متوسط، ۴: رضایت بخش یا خوب و ۵: بسیار رضایت بخش یا خیلی خوب در نظر گرفته شد.

تجزیه تحلیل آماری

نتایج بدست آمده با استفاده از آنالیز واریانس و مقایسه میانگین‌ها از طریق آزمون چند دامنه ای دانکن توسط نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج

نتایج بدست آمده از شمارش کلی باکتریایی (جدول ۲) نشان داد که کاهش نیتریت در کنار افزودن روغن سیاه دانه، موجب افزایش معنی دار میانگین شمارش کلی همه تیمارها نسبت به شاهد در دوره زمانی اول (روز۱) شد. در دوره زمانی دوم (روز ۱۱) شمارش کلی باکتریایی تمامی تیمارهای حاوی روغن سیاه دانه نسبت به دوره اول (روز۱) کاهش معنی داری یافت ($P<۰/۰۵$)، اما نمونه شاهد که فاقد روغن سیاه دانه بود کاهش معنی داری نسبت به دوره اول (روز۱) نداشت ($P<۰/۰۵$). در دوره زمانی دوم بیشتر تیمارها (به غیر از T5 و T7) به طور معنی داری نسبت به شاهد دارای میانگین کمتری بودند. در دوره زمانی سوم و چهارم (روزهای ۲۱ و ۳۱) شمارش کلی میکروبی نسبت به دوره قبل افزایش یافت. با این حال، تیمارهای T1 تا T4 در روز ۲۱ و تیمارهای T1، T2 و T4 در روز ۳۱ دارای شمارش کلی میکروبی کمتری نسبت به نمونه شاهد بودند ($P<۰/۰۵$). به علاوه در روزهای ۱۱، ۲۱ و ۳۱ نگهداری (بر خلاف روز اول) در غلظت های ثابت نیتریت، تیمارهای حاوی ۳ درصد روغن سیاه دانه نسبت به تیمارهای حاوی ۲ درصد روغن سیاه دانه بطور معنی دار میانگین شمارش کلی میکروبی کمتری داشتند ($P<۰/۰۵$).

جدول۲- شمارش کلی باکتریایی(log cfu/g) نمونه های سوسیس در طول ۳۱ روز نگهداری در ^{o}C ۴ (میانگین± انحراف معیار)

نمونه/ زمان	روز ۱	روز۱۱	روز۲۱	روز۳۱
C	۳/۰۶± ۰/۰۶ ^{Fc}	۳/۰۴± ۰/۰۷ ^{BCc}	۴/۲۱±۰/۰۵ ^{Cb}	۴/۸۸±۰/۰۲ ^{Ca}
T1	۳/۲۵± ۰/۰۵ ^{DEc}	۲/۶۳± ۰/۰۲ ^{Ed}	۳/۹۱± ۰/۰۷ ^{Db}	۴/۷۳±۰/۰۲ ^{Da}
T2	۳/۱۸± ۰/۰۴ ^{Eb}	۲/۴۱± ۰/۰۶ ^{Fc}	۳/۲۱±۰/۰۵ ^{Gb}	۳/۷۹± ۰/۰۷ ^{Fa}
T3	۳/۳۵± ۰/۰۷ ^{CDc}	۲/۸۴± ۰/۰۶ ^{Dd}	۳/۷۲±۰/۰۷ ^{Eb}	۴/۹۹±۰/۰۵ ^{Ba}
T4	۳/۳۱± ۰/۰۳ ^{Dc}	۲/۵۸± ۰/۰۳ ^{Ed}	۳/۴۵±۰/۰۷ ^{Fb}	۴/۵۰±۰ /۰۵ ^{Ea}
T5	۳/۵± ۰/۰۷ ^{ABc}	۳/۱۱± ۰/۰۵ ^{ABd}	۴/۵۹± ۰/۰۷ ^{Ab}	۵/۵۹±۰/۰۸ ^{Aa}
T6	۳/۴۵± ۰/۰۶ ^{BCc}	۲/۸۶± ۰/۰۶ ^{Dd}	۴/۱۱±۰/۰۷ ^{Cb}	۵/۰۴±۰/۰۳ ^{Ba}
T7	۳/۵۸± ۰/۰۴ ^{Ac}	۳/۱۸± ۰/۰۴ ^{Ad}	۴/۶۵±۰/۰۶ ^{Ab}	۴/۶۵±۰/۰۷ ^{Aa}
T8	۳/۶۰± ۰/۰۶ ^{Ac}	۲/۹۷± ۰/۰۷ ^{Cd}	۴/۳۳± ۰/۰۴ ^{Bb}	۵/۰۲±۰/۰۷ ^{Ba}

A-G حروف بزرگ متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار میان تیمارها در سطح $P<۰/۰۵$ است

a-d حروف کوچک متفاوت در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار بین روزها در سطح $P<۰/۰۵$ است.

نتایج بدست آمده از شمارش کلیفرم نمونه های سوسیس (در جدول۳) نشان داد افزودن روغن سیاه دانه در کنار کاهش نیتریت تا ۶۰ppm در تیمارهای T1 تا T4 تغییر معناداری نسبت به شاهد در هیچ یک از دوره های زمانی ایجاد نکرد (P>۰/۰۵). اما در بین تیمارها، دو تیمارحاوی ۳۰ppm نیتریت و بدون نیتریت همراه با ۲ درصد روغن سیاه دانه (T5 و T7)در تمامی دوره های زمانی بطور معنی دار میانگین بیشتری نسبت به شاهد داشتند. در روزهای ۱ و ۱۱ بررسی، افزایش غلظت روغن سیاه دانه از ۲ به ۳ درصد در غلظت‌های ثابت نیتریت تغییر معنی‌داری در بیشترین تعداد احتمالی کلیفرم ایجاد نکرد. تغییرات شمارش کلیفرم ها در ۱۰ روز ابتدایی نگهداری نیز در هیچ یک از تیمارها معنی دار نبود. در دوره زمانی سوم (روز۲۱) نسبت به دوره زمانی دوم، تیمار حاوی ۹۰ppm نیتریت و ۲ ٪ روغن سیاه دانه (T1) و همچنین تیمار حاوی ۶۰ppm نیتریت و ۳ درصد روغن سیاه دانه (T4) و در دوره زمانی چهارم (روز۳۱) نسبت به دوره زمانی سوم همه تیمارها افزایش معنی‌داری در شمارش کلیفرم ها داشتند (P<۰/۰۵).

جدول ۳- شمارش کلیفرم (MPN/g) نمونه های سوسیس در طول ۳۱ روز نگهداری در ^{o}C ۴ (میانگین± انحراف معیار)

نمونه/ زمان	روز ۱	روز۱۱	روز۲۱	روز۳۱
C	۲/۲۳± ۰/۱۱ ^{CDEc}	۳/۵۳± ۰/۶۳ ^{BCDbc}	۴/۸۶± ۱/۳۴ ^{CDb}	۷/۷۳± ۱/۴۶ ^{DEa}
T1	۲/۰۶± ۰/۰۵ ^{DEc}	۲/۴۶± ۰/۲۸ ^{Dc}	۴/۱۶± ۰/۲۳ ^{CDb}	۵/۷± ۱/۲۱ ^{DEa}
T2	۱/۸۳± ۰/۲۸ ^{Ec}	۲/۴± ۰/۳۶ ^{Dbc}	۳/۱۶± ۰/۶۳ ^{Db}	۴/۱۶± ۰/۲۳ ^{Ea}
T3	۲/۴۶± ۰/۲۸ ^{BCDc}	۴/۰۳±۰/۲۳ ^{ABCbc}	۵/۷± ۱/۲۱ ^{BCb}	۹/۶± ۲/۲۶ ^{CDa}
T4	۲/۳± ۰/۰۰ ^{BCDEc}	۳± ۰/۸۱ ^{CDc}	۵± ۱/۲۱ ^{CDb}	۹/۳± ۰/۰۰ ^{CDa}
T5	۲/۸± ۰/۰۰ ^{ABc}	۵± ۱/۲۱ ^{Abc}	۷/۷۳± ۱/۴۶ ^{ABb}	۱۷± ۳/۴۶ ^{ABa}
T6	۲/۶۳± ۰/۲۸ ^{BCc}	۴/۱۶± ۰/۲۳ ^{ABCbc}	۶/۰۶± ۱/۶۲ ^{ABCb}	۱۳± ۱/۷۳ ^{BCa}
T7	۳/۱۶± ۰/۶۳ ^{Ac}	۴/۸۶± ۱/۳۴ ^{ABbc}	۸/۱±۱/۰۳ ^{Ab}	۲۰± ۴/۵۸ ^{Aa}
T8	۲/۸± ۰/۰۰ ^{ABc}	۴/۳± ۰/۰۰ ^{ABCbc}	۵/۷± ۱/۲۱ ^{BCb}	۱۴± ۱/۷۳ ^{Ba}

A-G حروف بزرگ متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار میان تیمارها در سطح P<۰/۰۵ است.

a-d حروف کوچک متفاوت در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار بین روزها در سطح P<۰/۰۵ است.

نتایج بدست آمده از شمارش *اشریشیاکلی* (جدول۴) نشان داد در دوره زمانی اول و دوم همه تیمارها به لحاظ شمارش *اشریشیاکلی* منفی بودند و در دوره زمانی سوم، کاهش غلظت نیتریت موجب شد در تیمارهای حاوی ۲٪ روغن سیاه دانه در غلظتهای ppm ۳۰ و صفر نیتریت (T5 و T7) نسبت به شاهد و سایر تیمارها، که به لحاظ شمارش *اشریشیاکلی* منفی بودند، این باکتری رشد نموده و جداسازی صورت پذیرد. در دوره زمانی چهارم نیز علاوه بر افزایش شمارش دو تیماری که در دوره قبلی این باکتری در آن‌ها شمارش گردیده بود، در تیمار حاوی ۳٪ روغن سیاه دانه که فاقد نیتریت بود (T8) نیز اشریشیاکلی جداسازی شد و سایر تیمارها از نظر این آزمون منفی بودند. در این دوره زمانی بیشترین میانگین مربوط به تیمارهای حاوی ۲٪ روغن سیاه دانه به تنهایی و تیمار حاوی ۲٪ روغن سیاه دانه و ppm ۳۰ نیتریت بود. قابل توجه است که تیمار حاوی ۳٪ روغن سیاه دانه به تنهایی (T8) میانگین کمتری نسبت به تیمار حاوی ۲٪ روغن سیاه دانه و ppm ۳۰ نیتریت (T5) در دوره زمانی سوم و چهارم داشت (P<۰/۰۵).

جدول ۴- شمارش *اشریشیاکلی* (MPN/g) نمونه های سوسیس در طول ۳۱ روز نگهداری در ^{o}C ۴ (میانگین± انحراف معیار)

نمونه/ زمان	روز ۱	روز۱۱	روز۲۱	روز۳۱
C	ND	ND	ND	ND
T1	ND	ND	ND	ND
T2	ND	ND	ND	ND
T3	ND	ND	ND	ND
T4	ND	ND	ND	ND
T5	ND	ND	۰/۸۳±۰/۲۳ ^{Ab}	۱/۳۳±۰/۲۰ ^{Aa}
T6	ND	ND	ND	ND
T7	ND	ND	۰/۹۶±۰/۱۱ ^{Ab}	۱/۴۳±۰/۰۶ ^{Aa}
T8	ND	ND	ND	۰/۷۶±۰/۱۱ ^{Ba}

A-G حروف بزرگ متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار میان تیمارها در سطح P<۰/۰۵ است

a-d حروف کوچک متفاوت در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار بین روزها در سطح P<۰/۰۵ است.

ND: یافت نشد.

نتایج جستجوی سالمونلا در نمونه‌های سوسیس تیمار شده با غلظت‌های مختلف نیتریت و روغن سیاه دانه منفی بود و این باکتری در هیچ یک از تیمارها در طی مدت زمان نگهداری یافت نشد. نتایج بدست آمده از شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* (جدول ۵) در ابتدای زمان نگهداری حاکی از عدم جداسازی این باکتری در برخی نمونه‌ها (شاهد، T1، T2و T4) و شمارش کمتر از ۵ باکتری در هر گرم در سایر تیمارهای مورد بررسی بود. در ادامه در طی روزهای ۱۱، ۲۱ و همچنین در پایان زمان نگهداری با کاهش نیتریت از ppm ۹۰ به ppm ۶۰ در غلظت ۲٪ روغن سیاه دانه شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* افزایش یافت (T1<T3). در پایان زمان نگهداری تفاوت معنی داری بین هیچ یک از تیمارهای حاوی ۳ درصد روغن سیاه دانه با یکدیگر و نمونه شاهد دیده نشد (P>۰/۰۵). به علاوه در تیمارهای حاوی ppm۶۰، ppm۳۰ و بدون نیتریت با افزایش غلظت روغن سیاه دانه از ۲٪ به ۳٪ شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* بطور معنی داری کاهش یافت (P<۰/۰۵). بطور کلی شمارش تعداد احتمالی *استافیلوکوکوس اورئوس* تمامی نمونه‌ها در انتهای زمان نگهداری نسبت به روز اول افزایش معنی دار نشان داد.

جدول ۵- شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* (MPN/g) نمونه‌های سوسیس در طول ۳۱ روز نگهداری در ^{o}C ۴ (میانگین± انحراف معیار)

نمونه/ زمان	روز ۱	روز۱۱	روز۲۱	روز۳۱
C	ND	۴/۰۳±۰/۲۳ ^{BCc}	۵/۷±۱/۲۱ ^{CDb}	۸/۷±۱/۰۳ ^{BCa}
T1	ND	۳±۰/۸۱ ^{CDb}	۴/۰۳±۰/۲۳ ^{Eb}	۶/۰۶±۱/۶۲ ^{CDa}
T2	ND	۲/۰۶±۰/۰۵ ^{Dc}	۳/۵۳±۰/۶۳ ^{Eb}	۵/۷±۱/۲۱ ^{Da}
T3	۳/۹±۰/۰۰ ^{Ac}	۴/۸۶±۱/۳۴ ^{Bbc}	۶/۷۶±۰/۶۳ ^{BCb}	۱۰/۲±۱/۵۵ ^{ABa}
T4	ND	۳/۱۶±۰/۶۳ ^{CDc}	۴/۳±۰/۰۰ ^{DEb}	۶/۴±۰/۰۰ ^{CDa}
T5	۴/۸۶±۱/۳۴ ^{Ab}	۵/۷±۱/۲۱ ^{ABb}	۸/۱±۱/۰۳ ^{ABb}	۱۲/۱±۲/۸۵ ^{Aa}
T6	۴/۱۶±۰/۲۳ ^{Ab}	۵±۱/۲۱ ^{Bb}	۶/۰۶±۱/۶۲ ^{Cab}	۷/۷۳±۱/۴۶ ^{BCDa}
T7	۵±۱/۲۱ ^{Ac}	۶/۷۶±۰/۶۳ ^{Abc}	۸/۷±۱/۰۳ ^{Ab}	۱۳±۱/۷۳ ^{Aa}
T8	۴/۳±۰/۰۰ ^{Ac}	۵±۱/۲۱ ^{Bbc}	۶/۴±۰/۰۰ ^{Cb}	۸/۱±۱/۰۳ ^{BCDa}

A-G حروف بزرگ متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار میان تیمارها در سطح P<۰/۰۵ است.

a-d حروف کوچک متفاوت در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار بین روزها در سطح P<۰/۰۵ است.

ND: یافت نشد.

نتایج شمارش *کلستریدیوم پرفرینجنس* در نمونه‌های سوسیس تیمار شده با غلظت‌های مختلف نیتریت و روغن سیاه دانه منفی بود. این باکتری در هیچ یک از تیمارها و در طی مدت زمان نگهداری یافت نشد. نتایج بدست آمده از شمارش کپک ها و مخمرها (جدول ۶) نشان داد در ابتدای زمان نگهداری بیشترین میانگین‌ها مربوط به تیمارهای بدون نیتریت حاوی ۲٪ و ۳٪ روغن سیاه دانه (T7 و T8)بوده و در سایر نمونه‌ها جداسازی صورت نگرفته است. طی روزهای ۱۱، ۲۱ و ۳۱ نگهداری، با کاهش نیتریت در غلظت‌های ۲٪ و همچنین با کاهش نیتریت در غلظت‌های ۳٪، شمارش کپک‌ها و مخمرها در غالب موارد به طور معنی دار افزایش یافت (P<۰/۰۵). به علاوه با افزایش روغن سیاه دانه از ۲٪ به ۳٪ در غلظت های ثابت نیتریت، شمارش کپک‌ها و مخمرها در غالب موارد به طور معنی دار کاهش یافت. شمارش کپک‌ها و مخمرها در اکثر تیمارها، در هر دوره زمانی نسبت به دوره قبل افزایش معنی دار داشت.

جدول ۶- شمارش کپک و مخمر (log cfu/g) نمونه های سوسیس در طول ۳۱ روز نگهداری در ^{o}C ۴ (میانگین± انحراف معیار)

نمونه/ زمان	روز ۱	روز۱۱	روز۲۱	روز۳۱
C	ND	۰/۶۳±۰/۰۴ ^{Fc}	۱/۳۲±۰/۰۸ ^{EFb}	۱/۸۰±۰/۰۴ ^{DEa}
T1	ND	۰/۷۷±۰/۰۷ ^{Ec}	۱/۴۱±۰/۰۷ ^{Eb}	۱/۸۰±۰/۰۶ ^{DEa}
T2	ND	۰/۴۲±۰/۰۸ ^{Gc}	۱/۲۸±۰/۰۳ ^{Fb}	۱/۷۳±۰/۰۷ ^{Ea}
T3	ND	۰/۸۸±۰/۰۴ ^{Dc}	۱/۶۴±۰/۰۵ ^{Db}	۲/۱۷±۰/۰۸ ^{Ca}
T4	ND	۰/۷۷±۰/۰۶ ^{Ec}	۱/۵۳±۰/۰۵ ^{Db}	۱/۸۷±۰/۰۳ ^{Da}
T5	ND	۱/۰۴±۰/۰۳ ^{BCc}	۱/۸۸±۰/۰۸ ^{Cb}	۲/۶۰±۰/۰۲ ^{Ba}
T6	ND	۰/۹۶±۰/۰۵ ^{CDc}	۱/۶۳±۰/۰۷ ^{Db}	۲/۲۶±۰/۰۶ ^{Ca}
T7	۰/۶۳±۰/۰۵ ^{Ad}	۱/۲۴±۰/۰۶ ^{Ac}	۲/۵۲±۰/۰۲ ^{Ab}	۲/۷۷±۰/۰۸ ^{Aa}
T8	۰/۴۲±۰/۰۵ ^{Bd}	۱/۰۹±۰/۰۶ ^{Bc}	۲/۳۸±۰/۰۸ ^{Bb}	۲/۵۵±۰/۰۸ ^{Ba}

A-G حروف بزرگ متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار میان تیمارها در سطح P<۰/۰۵ است

a-d حروف کوچک متفاوت در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار بین روزها در سطح P<۰/۰۵ است.

ND: یافت نشد.

نتایج بدست آمده از ارزیابی حسی (جدول ۷) نشان داد بیشترین امتیاز رنگ مربوط به نمونه شاهد و تیمار حاوی ۹۰ppm نیتریت و ۳٪ روغن سیاه دانه (T2) بود و با کاهش نیتریت امتیاز رنگ کاهش یافت اما افزایش غلظت روغن سیاه دانه از ۲٪ به ۳٪ بر امتیاز رنگ اثر معنی داری نداشت. افزودن روغن سیاه دانه موجب کاهش امتیاز طعم همه تیمارها نسبت به شاهد شد و با افزایش غلظت روغن سیاه دانه از ۲ به ۳ درصد نیز امتیاز طعم بطور معنی‌دار کاهش یافت (P<۰/۰۵)، در حالیکه افزودن روغن سیاه دانه سبب افزایش امتیاز بو نسبت به شاهد در تیمارهای حاوی ۹۰ppm و ۶۰ppm نیتریت در سطح جایگزینی با ۳ درصد روغن سیاه دانه گردید. اما در سایر تیمارها به لحاظ امتیاز بو، تفاوت معنی‌داری با شاهد مشاهده نشد. همچنین اثر غلظت‌های متفاوت نیتریت و روغن سیاه دانه بر بافت نمونه های سوسیس معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). نتایج آزمون پذیرش کلی نیز نشان داد تیمار شاهد دارای بیشترین امتیاز پذیرش کلی و تیمارهای فاقد نیتریت دارای پایین ترین امتیاز پذیرش کلی بودند. اما تمامی تیمارهای حاوی ۹۰ppm تا ۳۰ppm نیتریت در سطوح مختلف روغن سیاه دانه از امتیاز پذیرش کلی قابل قبولی برخوردار بودند و با افزایش غلظت روغن سیاه دانه از ۲٪ به ۳٪ در مقادیر ثابت نیتریت تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید.

جدول ۷- نتایج حاصل از ارزیابی ویژگیهای حسی نمونه های سوسیس پس از تولید (میانگین± انحراف معیار)

تیمار	رنگ	طعم	بو	بافت	پذیرش کلی
C	۴/۷۵± ۰/۴۶ ^{A}	۴/۵۰±۰/۵۳ ^{A}	۴/۱۲±۰/۳۵ ^{B}	۴/۱۲±۰/۳۵ ^{A}	۴/۲۵±۰/۴۶ ^{A}
T1	۴/۱۲± ۰/۳۵ ^{BC}	۳/۳۷±۰/۵۲ ^{B}	۴/۶۲±۰/۵۲ ^{AB}	۴/۲۵ ±۰/۴۶ ^{A}	۳/۸۷±۰/۳۵ ^{AB}
T2	۴/۵۰± ۰/۵۳ ^{AB}	۲/۳۷±۰/۵۲ ^{DEF}	۴/۸۷±۰/۳۵ ^{A}	۴/۲۵±۰/۴۶ ^{A}	۳/۶۲±۰/۵۲ ^{BC}
T3	۳/۶۲± ۰/۵۲ ^{DE}	۳/۰۰±۰/۵۳ ^{BC}	۴/۶۲±۰/۵۲ ^{AB}	۴/۱۲±۰/۳۵ ^{A}	۳/۵۰±۰/۵۳ ^{BCD}
T4	۴/۰۰±۰/۵۳ ^{CD}	۲/۰۰±۰/۵۳ ^{F}	۴/۸۷±۰/۳۵ ^{A}	۴/۳۷±۰/۵۲ ^{A}	۳/۳۷±۰/۵۳ ^{CD}
T5	۳/۰۰± ۰/۵۳ ^{F}	۲/۶۲±۰/۵۲ ^{CDE}	۴/۳۷±۰/۵۲ ^{AB}	۴/۱۲±۰/۳۵ ^{A}	۳/۱۲±۰/۳۵ ^{DE}
T6	۳/۲۵±۰/۴۶ ^{EF}	۲/۱۲±۰/۳۵ ^{EF}	۴/۶۲±۰/۵۲ ^{AB}	۴/۲۵ ±۰/۴۶ ^{A}	۳/۱۲±۰/۳۵ ^{DE}
T7	۱/۷۵±۰/۴۶ ^{G}	۲/۷۵±۰/۴۶ ^{CD}	۴/۱۲±۰/۳۵ ^{B}	۴/۱۲±۰/۳۵ ^{A}	۲/۸۷±۰/۳۵ ^{E}
T8	۱/۸۷±۰/۳۵ ^{G}	۲/۱۲±۰/۳۵ ^{EF}	۴/۶۲±۰/۵۲ ^{AB}	۴/۳۷ ±۰/۵۲ ^{A}	۲/۷۵±۰/۴۶ ^{E}

A-G حروف بزرگ متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار میان تیمارها در سطح $P<0/05$ است.

بحث

نتایج نشان داد که شمارش کلی باکتریایی تمامی تیمارها در روز اول نسبت به شاهد به طور معنی دار افزایش یافت اما میانگین این شمارش در تیمارهای حاوی روغن سیاه دانه با ۹۰ppm و ۶۰ppm نیتریت در طی روزهای ۱۱، ۲۱ و ۳۱ نگهداری بیش از ۰/۱ تا ۱ چرخه سیکل لگاریتمی کمتر از نمونه شاهد بود ($P<0/05$) و این کاهش در تیمارهای حاوی ۳ درصد روغن سیاه دانه نسبت به تیمارهای حاوی ۲ درصد آن بیشتر بوده است که این حالت مربوط به اثرات ضد باکتریایی روغن سیاه دانه می باشد که در وهله اول با حضور تیموکینون (یکی از ترکیبات عمده در روغن سیاه دانه) در ارتباط است. مکانیسم اثر تیموکینون، بازدارندگی آن از سنتز RNA و پروتئین در باکتری است. همچنین آلفا-پینن موجود در روغن سیاه دانه نیز دارای فعالیت ضد باکتریایی می باشد (Kahsai, 2002). با این حال با گذشت زمان و در طی روزهای ۲۱ و ۳۱ نگهداری میانگین شمارش کلی باکتریایی تمامی نمونه ها نسبت به دوره قبلی افزایش یافت. این نتایج موافق نتایج بدست آمده توسط الصواف و النعیمی (۲۰۱۰) بود که دریافتند افزودن دانه و روغن سیاه دانه موجب کاهش شمارش کلی باکتریایی پنیر سفید نرم در ۶ روز ابتدایی زمان نگهداری می شود و با افزایش غلظت از ۰/۳ به ۱ درصد شمارش کلی باکتریایی کاهش بیشتری یافت (Alsawaf and Alnaemi, 2010). همچنین نتایج ربیع و مرزوق (۲۰۱۰) در بررسی اثر افزودن غلظتهای متفاوت روغن سیاه دانه به فیله مرغ در طول زمان نگهداری در سرما با نتایج این پژوهش همخوانی دارد، زیرا آن‌ها نیز دریافتند که افزودن روغن سیاه دانه موجب کاهش شمارش کلی باکتریایی در ۷ روز ابتدایی و سپس افزایش آن در ادامه زمان نگهداری می شود و همچنین با افزایش غلظت روغن سیاه دانه، شمارش کلی باکتریایی در ۷ روز ابتدایی کاهش بیشتری یافت (Rabie and Marzouk, 2010). مطابق استاندارد ملی شماره ۲۳۰۳ (۱۳۸۴)، شمارش کلی باکتریایی می‌بایست کمتر از $\log$ CFU/g ۵ باشد که نتایج حاصل از شمارش کلی باکتریایی نشان داد نمونه شاهد (حاوی ppm ۱۲۰ نیتریت) و تیمارهای حاوی ppm ۹۰ و ppm ۶۰ نیتریت همراه با ۲ و ۳ درصد روغن سیاه دانه در محدوده استاندارد تعیین شده برای سوسیس قرار دارند و سایر تیمارها با سطوح مختلف نیتریت و روغن سیاه دانه در این محدوده قرار نداشتند. همچنین در تحقیق خالقی و همکاران (۲۰۱۶) در جایگزینی نیتریت سوسیس با عصاره زرشک سیاه، گزارش کردند که تیمار حاوی بالاترین غلظت عصاره به همراه نیتریت دارای پایین‌ترین میانگین شمارش کلی و تیمار فاقد هرگونه افزودنی بیشترین میانگین شمارش

کلی را داشت (Khaleghi et al., 2016). نتایج شمارش کلیفرم‌ها نشان داد که که تیمارهای حاوی روغن سیاه دانه با ۹۰ppm و ۶۰ppm نیتریت در طول مدت زمان نگهداری با نمونه شاهد اختلاف معنی داری نداشتند ($P>0/05$) که این حالت نشان دهنده اثر بازدارندگی روغن سیاه دانه در این تیمارها است. به علاوه افزایش غلظت روغن سیاه دانه از ۲ به ۳ درصد صرفاً در تیمارهای فاقد نیتریت (در روزهای ۲۱ و ۳۱) منجر به کاهش معنی دار شمارش کلیفرم‌ها شد و در سایر موارد این اختلاف معنی دار نبود. این عدم تفاوت بین تیمارهای حاوی ۲ و ۳ درصد روغن سیاه دانه نشان دهنده سقف اثر روغن سیاه دانه بر شمارش کلیفرم در این بازه زمانی بوده که حداکثر تاثیر را در غلظت ۲ درصد به نمایش گذاشته است. از طرف دیگر به غیر از روز ۳۱، در سایر روزهای مورد بررسی، افزایش معنی داری در شمارش کلیفرم اکثر نمونه‌ها نسبت به دوره قبلی مشاهده نگردید. این نتایج موافق نتایج بدست آمده توسط ربیع و مرزوق (۲۰۱۰) بود که گزارش نمودند با افزودن غلظت‌های متفاوت روغن سیاه دانه به فیله مرغ، میانگین بیشترین تعداد احتمالی کلیفرم نمونه‌ها در طول زمان نگهداری ۱۰ روزه نسبتاً ثابت بود و موثرترین غلظت روغن سیاه دانه مربوط به تیمار حاوی ۲٪ روغن سیاه دانه در روز چهارم نگهداری بود(Rabie and Marzouk, 2010). مطابق استاندارد ملی شماره ۲۳۰۳ (۱۳۸۴)، بیشترین تعداد احتمالی کلیفرم میبایست کمتر از ۱۰ باشد. لذا نتایج حاصل از آزمون شمارش کلیفرم نشان داد تمامی نمونه ها تا روز ۲۱ در محدوده مجاز بودند اما در روز ۳۱، صرفاً نمونه شاهد (حاوی ۱۲۰ ppm نیتریت) و تیمارهای حاوی ۲ و ۳ درصد روغن سیاه دانه با ۹۰ ppm و ۶۰ ppm نیتریت در محدوده استاندارد تعیین شده برای سوسیس قرار داشته و سایر تیمارها با سطوح مختلف نیتریت و روغن سیاه دانه در این محدوده قرار نداشتند .نتایج شمارش *اشریشیاکلی* حاکی از عدم جداسازی این باکتری در اکثر نمونه‌ها در طی مدت زمان نگهداری بود و صرفاً ظهور تعداد معدود اشریشیاکلی در روزهای ۲۱ و ۳۱ نگهداری در تیمار حاوی ۳۰ppm نیتریت با ۲ درصد روغن سیاه دانه و در تیمارهای بدون نیتریت حاوی ۲ و ۳ درصد روغن سیاه دانه مشاهده گردید که می تواند به علت کاهش اثر ضدمیکروبی روغن سیاه دانه در اثر گذشت زمان و همچنین کاهش باقیمانده نیتریت در نمونه های سوسیس باشد که موجب می شود سلول‌های باکتریایی آسیب دیده در این تیمارها فرصت ترمیم یابند و این در واقع به نوعی موید اثر بازدارندگی بیشتر نیتریت بر اشریشیاکلی است (Yarbrough et al., 1980). این نتایج با نتایج بدست آمده توسط معارفیان و همکاران (۲۰۱۱) مطابقت دارد. آنها اسانس دارچین را در سطوح ppm ۲۰، ۴۰ و ۶۰ جایگزین ۲۰ppm، ۴۰ و ۶۰ از نیتریت در فرمولاسیون سوسیس کردند و گزارش نمودند که در سوسیس‌های با نیتریت کاهش یافته در طول ۳۰ روز نگهداری در ۴ درجه سانتیگراد اشریشیاکلی یافت نشد (Moarefian et al., 2011). پایین تر بودن میانگین شمارش تیمار حاوی ۳٪ روغن سیاه دانه بدون نیتریت (T8)نسبت به تیمار حاوی ۲٪ روغن سیاه دانه و ۳۰ ppm نیتریت (T5) در روز ۳۱ نیز نشان دهنده موثر بودن افزایش غلظت روغن سیاه دانه بر *اشریشیاکلی* است. علت این امر، اثر بازدارندگی تیموکینون بر *اشریشیاکلی*، از طریق مهار آنزیم ATP سنتاز و جلوگیری از رشد سلولی می باشد (Ahmad et al., 2015). اریسی و همکاران (۲۰۰۵) نیز نتایجی موافق نتایج این پژوهش بدست آوردند. آنها اثر ضد باکتری روغن سیاه دانه ترکیه را در غلظت‌های مختلف بر *اشریشیاکلی* بررسی کردند و گزارش نمودند که روغن سیاه دانه در غلظت ۱ و ۲ درصد اثر مهار کنندگی بر این باکتری داشته و با افزایش غلظت از ۱ به ۲ درصد این اثر افزایش می‌یابد (Arici et al., 2005). مطابق استاندارد ملی شماره

۲۳۰۳ (۱۳۸۴)، نتایج آزمون شمارش *اشریشیاکلی* در سوسیس میبایست منفی باشد. لذا نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد به غیر از تیمارهای حاوی ppm ۳۰ نیتریت و ۲٪ روغن سیاه دانه (T5) و ۲٪ روغن سیاه دانه به تنهایی (T7) در طی روزهای ۲۱ و۳۱ و تیمار حاوی ۳٪ روغن سیاه دانه به تنهایی (T8) در روز۳۱، تمامی تیمارها در طی مدت زمان نگهداری در محدوده استاندارد قرار داشتند .عدم جداسازی سالمونلا در نمونه شاهد و نمونه های تیمار شده با غلظت‌های مختلف نیتریت و روغن سیاه دانه می تواند در ارتباط با مواد اولیه مورد استفاده در تولید سوسیس، فرایند حرارتی اعمال شده و همچنین اثر ضد میکروبی نیتریت و روغن سیاه دانه باشد. الزینی و همکاران (۲۰۱۶)، نتایجی موافق نتایج بدست آمده در این پژوهش بدست آوردند، آنها پلی فنول‌های دانه انگور را به عنوان ترکیب ضد میکروبی در تولید سوسیس گوشت گاو، جایگزین نیتریت نمودند و گزارش نمودند که نمونه‌های سوسیس از نظر وجود سالمونلا منفی بوده است (El-Zainy et al., 2016). مطابق استاندارد ملی شماره ۲۳۰۳ (۱۳۸۴)، نتایج آزمون سالمونلا در سوسیس میبایست منفی باشد که نتایج این پژوهش حاکی از آن است، همه تیمارها از این نظر در محدوده استاندارد قرار داشتند. نتایج شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* در تیمارهای حاوی ۳ درصد روغن سیاه دانه با ppm۹۰ و ppm۶۰ نیتریت و تیمار حاوی ۲ درصد روغن سیاه دانه با ppm۹۰ در طول مدت زمان نگهداری کمتر از نمونه شاهد بود ($P>0/05$) اما سایر تیمارها به طور معنی دار میانگین شمارش بیشتری داشتند. همچنین این شمارش باکتریایی در تمامی نمونه‌ها در انتهای زمان نگهداری نسبت به روز اول افزایش معنی داری را نشان داد که می‌تواند به علت کاهش اثر نیتریت و سیاه دانه در طول زمان و نیز توانایی رشد این باکتری در دمای یخچال باشد (Javadi et al., 2011). این نتایج موافق نتایج بدست آمده توسط ربیع و مرزوق (۲۰۱۰) بود، که دریافتند با افزودن غلظت‌های متفاوت روغن سیاه دانه به فیله مرغ، شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* از روز هفتم تا پایان زمان نگهداری ۱۰ روز افزایش یافت. از طرف دیگر، با افزایش غلظت روغن سیاه دانه از ۲ به ۳ درصد در مقادیر ثابت نیتریت، میانگین شمارش باکتری کمتری بدست آمد (Rabie and Marzouk, 2010). این نتایج موافق نتایج بدست آمده توسط محجوب و همکاران (۲۰۱۳) بود که دریافتند افزودن غلظت های متفاوت روغن سیاه دانه به پنیر دومیاتی در طول زمان نگهداری در سرما موجب کاهش شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به شاهد می شود و همچنین با افزایش غلظت روغن سیاه دانه کاهش شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر شد (Mahgoub et al., 2013). با این حال، تفاوت معنی داری بین تیمارهای حاوی ۳ درصد روغن سیاه دانه در پایان زمان نگهداری دیده نشد که احتمالاً به دلیل غالب بودن اثر روغن سیاه دانه نسبت به اثر نیتریت بر شمارش استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز مثبت در این دوره زمانی است. مطابق استاندارد ملی شماره ۲۳۰۳ (۱۳۸۴)، شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* میبایست کمتر از۱۰ باشد، لذا نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که همه تیمارها در طول مدت زمان نگهداری (غیر از تیمارهای حاوی ppm ۶۰، ۳۰ و بدون نیتریت همراه با ۲ درصد روغن سیاه دانه در روز ۳۱) در محدوده استاندارد تعیین شده برای سوسیس قرار داشتند. عدم جداسازی و شمارش *کلستریدیوم پرفرینجنس* در نمونه‌های مورد مطالعه می تواند در ارتباط با مواد اولیه مورد استفاده در تولید سوسیس و همچنین اثر ضد میکروبی نیتریت و روغن سیاه دانه باشد. خالقی و همکاران (۲۰۱۶)، نتایجی موافق نتایج بدست آمده در این پژوهش بدست آوردند، آنها اثر جایگزینی نیتریت با زرشک سیاه را بر سوسیس حرارت دیده تهیه شده از گوشت گاو در طول نگهداری در یخچال بررسی کردند و گزارش

نمودند که نمونه های سوسیس از نظر وجود *کلستریدیوم پرفرینجنس* منفی بوده است (Khaleghi et al., 2016). مطابق استاندارد ملی شماره ۲۳۰۳ (۱۳۸۴)، نتایج آزمون شمارش *کلستریدیوم پرفرینجنس* در نمونه های سوسیس میبایست کمتر از ۵۰ باشد که نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد همه تیمارها از این نظر در محدوده استاندارد قرار داشتند. نتایج شمارش کپک‌ها و مخمرها حاکی از افزایش شمارش آن‌ها با کاهش مقدار نیتریت در غلظتهای ۲٪ سیاه دانه و همچنین با کاهش مقدار نیتریت در غلظت های ۳٪ سیاه دانه بود که نشان دهنده اثر بازدارندگی بهتر تیمارهای حاوی مقادیر بیشتر نیتریت بر شمارش کپک‌ها و مخمرها در نمونه‌های سوسیس می باشد. با این حال، در روزهای ۲۱ و ۳۱ نگهداری، تفاوت معنی داری بین نمونه شاهد و تیمارهای حاوی ۹۰ppm نیتریت با ۲ و ۳ درصد روغن سیاه دانه مشاهده نگردید، هرچند در سایر مواد این تفاوت معنی-دار بود اما اختلاف شمارش با نمونه شاهد کمتر از ۱ چرخه سیکل لگاریتمی بود. همچنین کاهش معنی دار شمارش کپک ها و مخمرها با افزایش غلظت روغن سیاه دانه از ۲٪ به ۳٪ در غلظت های ثابت نیتریت مشاهده گردید که حاکی از اثرات ضد قارچی روغن سیاه دانه است. اثر ضد قارچی روغن سیاه دانه با محتوای کینون‌ها (تیموکینون و تیموهیدروکینون) مرتبط دانسته می شود. این ترکیبات با ایجاد کمپلکس برگشت ناپذیر با پروتئین‌های هسته باعث غیر فعال شدن پروتئین می شوند. همچنین تیموکینون به پلی پپتیدهای دیواره سلولی و آنزیم‌ها و پروتئین‌های محدود شده در غشای پلاسمایی متصل شده و باعث از دست رفتن عملکرد آن‌ها و بازدارندگی از رشد قارچ‌ها می شود. به علاوه سیاه دانه حاوی دو پپتید ضد قارچی به نام های Ns-D1 و Ns-D2 می باشد که از اثرات ضد قارچی قدرتمندی برخوردارند (Rogozhin et al., 2011; Taha *et al.*, 2010). شمارش کپک‌ها و مخمرها در اکثر تیمارها، در هر دوره زمانی نسبت به دوره قبل افزایش معنی دار داشت. مطابق استاندارد ملی شماره ۲۳۰۳ (۱۳۸۴)، بیشینه شمارش کپک‌ها و مخمرها میبایست ۱۰۰ باشد. نتایج حاصل از شمارش کپک‌ها و مخمرها نشان داد همه تیمارها غیر از تیمارهای T7 و T8 فاقد نیتریت در روز ۲۱ و تیمارهای T3 و T5 تا T8 در روز ۳۱ در محدوده استاندارد تعیین شده برای سوسیس قرار دارند و پنج تیمار یاد شده در روزهای مذکور در این محدوده قرار نداشتند. نتایج ارزیابی حسی رنگ نشان داد که نمونه شاهد و تیمارهای حاوی ۹۰ppm ، ۶۰ppm و ۳۰ppm نیتریت با ۲ و ۳ درصد روغن سیاه دانه از امتیاز رنگ قابل قبول و رضایت بخشی برخوردار بودند اما صرفاً تیمارهای فاقد نیتریت با ۲ و ۳ درصد روغن سیاه دانه به لحاظ رنگ قابل قبول نبودند. به طور کلی کاهش امتیاز رنگ نمونه‌های سوسیس با کاهش نیتریت، به علت کاهش تشکیل نیتروزو میوگلوبین می باشد زیرا نیتریت در مقادیر ppm ۲۰ – ۵ سبب ایجاد رنگ صورتی شده که با گذشت زمان محو می‌شود اما در مقادیر ppm ۵۰ – ۴۰ باعث ایجاد رنگ پایدار و طعم مطلوبی می گردد (Toldra, 2010; Belitz et al, 2009). این نتایج موافق نتایج بدست آمده توسط سیندلار و میلکوسکی (۲۰۱۱) بود که گزارش نمودند تیمارهای فرانکفورتر با غلظت‌های بالاتر نیتریت به لحاظ رنگ از پذیرش بیشتری برخوردار بودند (Sindelar and Milkowski., 2011). در ارزیابی طعم، نمونه شاهد بالاترین امتیاز را به خود اختصاص داد و پس از آن تیمارهای ۹۰ppm و ۶۰ppm نیتریت حاوی ۲ درصد روغن سیاه دانه از طعم قابل قبولی برخوردار بودند اما سایر تیمارها با غلظت‌های متفاوت نیتریت و روغن سیاه دانه مورد قبول واقع نشدند. این نتایج موافق نتایج بدست آمده توسط مقصودلو و همکاران (۱۳۹۲) بود، آنها اثر افزودن اسانس مرزه خوزستانی را بر خصوصیات حسی سوسیس فرانکفورتر بررسی کردند و

گزارش نمودند که افزودن اسانس مرزه موجب کاهش طعم نمونه‌های سوسیس شد (مقصودلو و همکاران، ۱۳۹۲). با این حال، امتیاز بوی همه نمونه‌ها رضایت بخش بود و تیمارهای حاوی ۳ درصد روغن سیاه دانه در غلظت ۹۰ppm و ۶۰ppm نیتریت به طور معنی دار دارای امتیاز بوی بالاتری نسبت به شاهد بودند. این نتایج موافق نتایج بدست آمده توسط طایل و التراس (۲۰۱۱) بود که گزارش نمودند افزودن عصاره سیاه دانه موجب بهبود ویژگی حسی بوی نمونه‌های گوشت چرخ کرده شد (Tayel and El-Tras., 2011). اثر غلظت‌های متفاوت نیتریت و روغن سیاه دانه بر بافت نمونه‌های سوسیس معنی دار نبود. با توجه به اینکه نیتریت در مقادیر بسیار اندک استفاده شده و همچنین در ازای افزودن روغن سیاه دانه از میزان روغن مایع مصرفی کاسته شد عدم تغییر در بافت نمونه‌های سوسیس دور از ذهن نیست و اگرچه تغییراتی بین تیمارها به لحاظ امتیاز بافت مشاهده شد اما این تغییرات به لحاظ آماری معنی دار نبود. نتایج حاصل از ارزیابی پذیرش کلی حاکی از آن بود که نمونه شاهد و نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های متفاوت نیتریت و روغن سیاه دانه (T1-T6) دارای امتیاز پذیرش در محدوده قابل قبول تا رضایت بخش قرار داشتند و تنها تیمارهای فاقد نیتریت که ۲ و ۳ درصد روغن سیاه دانه داشتند (T7 و T8) امتیاز قابل قبولی نداشتند که عمدتاً مربوط به اثر رنگ بر پذیرش کلی این نمونه‌ها است. کاهش نیتریت همراه با افزودن روغن سیاه دانه، عمدتاً با اثر بر رنگ و طعم تیمارها موجب کاهش پذیرش کلی نمونه های سوسیس شد. این نتایج موافق نتایج بدست آمده توسط مقصودلو و همکاران (۱۳۹۲) بود که گزارش نمودند افزودن اسانس مرزه موجب کاهش امتیاز پذیرش کلی نمونه های سوسیس فرانکفورتر شد و تیمار حاوی بیشترین میزان نیتریت بالاترین امتیاز پذیرش کلی را کسب کرد (مقصودلو و همکاران، ۱۳۹۲).

نتیجه گیری

ارزیابی خطرات همراه با نیتریت موجود در رژیم غذایی و نیتروزامین‌ها برای سلامتی انسان مشکل است اما با این حال، به حداقل رساندن میزان مواجهه با نیتریت در مواردی که قابل کنترل است، امری معقول و محتاطانه می باشد. نتایج این تحقیق دلالت بر آن داشت که شمارش‌های کلی باکتریایی، کلیفرم‌ها و *اشریشیاکلای* عمدتاً در تیمارهای حاوی ۹۰ppm و ۶۰ppm نیتریت با ۲ و ۳ درصد روغن سیاه دانه در طول زمان نگهداری کمتر یا مشابه نمونه شاهد بود و در هیچ یک از تیمارها باکتری سالمونلا و *کلستریدیوم پرفرینجنس* جداسازی نگردید. همچنین شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* در تیمارهای حاوی ۹۰ppm و ۶۰ppm نیتریت با ۳ درصد روغن سیاه دانه و شمارش کپک و مخمر در تیمارهای حاوی ۹۰ppm نیتریت با ۲ و ۳ درصد روغن سیاه دانه در اکثر روزهای نگهداری با نمونه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. به علاوه با افزایش غلظت روغن سیاه دانه از ۲ به ۳ درصد در مقادیر ثابت نیتریت، شمارش‌های میکروبی انجام شده در غالب موارد به طور معنی دار کاهش یافت. هرچند این شمارش‌ها در اکثر تیمارها و نمونه شاهد، در هر دوره زمانی نسبت به دوره قبل افزایش معنی‌داری داشت. با این حال، با مقایسه نتایج آزمون های میکروبی با حداکثر میزان مجاز تعیین شده مشخص گردید که تیمارهای سوسیس حاوی ۲ و ۳ درصد روغن سیاه دانه با ۹۰ppm نیتریت و تیمار سوسیس حاوی ۳ درصد روغن سیاه دانه با ۶۰ppm نیتریت در طی مدت یک ماه نگهداری در محدوده استاندارد تعیین شده قرار داشتند. همچنین ارزیابی ویژگیهای حسی تیمارهای حاوی روغن سیاه دانه تا ۶۰ppm نیتریت عمدتاً قابل قبول و رضایت بخش تلقی گردید. بنابراین با نظر به نتایج میکروبی و حسی بدست آمده، جایگزینی بخشی از نیتریت (تا حدود

۶۰ppm) در فرمولاسیون سوسیس با استفاده از روغن سیاه دانه امکان‌پذیر است

منابع

۱. خورسندی، آزیتا و اسکندری، محمد هادی. (۱۳۹۳). بررسی جایگزینی نیتریت با سایر ترکیبات در فراوری گوشت. بیست و دومین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی ایران، گرگان، ۹-۸ شهریور ۹۳، صفحه ۱۱۳.

۲. رکنی، نوردهر. (۱۳۸۵). علوم و صنایع گوشت. چاپ چهارم، انتشارات دانشگاه تهران، صفحه ۱۵۰-۱۳۰.

۳. زاهدی، یونس. (۱۳۹۰). روشهای کاهش یا جایگزینی نیترات و نیتریت در فراورده های گوشتی. بیستمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی، تهران، ۳-۱ آذر ۹۰، صفحه ۱۰.

۴. سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۸۱). میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - روش جستجوی سالمونلا در مواد غذایی، تجدید نظر سوم. استاندارد شماره ۱۸۱۰.

۵. سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۸۴). سوسیس و کالباس - ویژگیها و روشهای آزمون، تجدید نظر سوم. استاندارد شماره ۲۳۰۳.

۶. سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۸۴). میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - روش جستجو و شمارش اشریشیاکلی با استفاده از روش بیشترین تعداد احتمالی، تجدید نظر دوم. استاندارد شماره ۲۹۴۶.

۷. سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۸۵). میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - روش جامع برای جستجو، شناسایی و شمارش کلستریدیوم پرفرنژانس. استاندارد شماره ۲۱۹۷.

۸. سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۸۵). میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - روش جامع شمارش برای استافیلوکوکوسهای کواگولاز مثبت (استافیلوکوکوس ارئوس و سایر گونه ها) - قسمت سوم: جستجو، شناسایی و شمارش به شیوه محتمل ترین تعداد (MPN) برای تعداد کم میکروارگانیسم. استاندارد شماره ۳- ۶۸۰۶.

۹. سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۸۶). میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - روش جامع برای شمارش کلی میکروارگانیسم ها در ۳۰ درجه سلیسیوس، تجدید نظر اول. استاندارد شماره ۵۲۷۲.

۱۰. سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۸۷). میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - روش جامع برای شناسایی و شمارش کلی فرمها، چاپ اول. استاندارد شماره ۱۱۱۶۶.

۱۱. سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۸۷). میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - روش جامع برای شمارش کپکها و مخمرها - قسمت اول: روش شمارش کلنی در فرآورده های با فعالیت آبی (AW) بیشتر از ۰/۹۵، چاپ اول. استاندارد شماره ۱-۰۸۹۹.

۱۲. مقصودلو، یحیی.، اصغرپور، اطهر و آریایی، پیمان. (۱۳۹۲) اثر افزودن اسانس مرزه خوزستانی(*Satureja khusestanica*) بر خصوصیات باکتریایی، شیمیایی و حسی سوسیس فرانکفورتر. نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی، سال ۲، شماره ۳، صفحه ۲۹۴-۲۷۹.

۱۳. محمدی، مهرداد.، عقابی، فیروز و سیداحمدیان، فریبا. (۱۳۸۶). ارزیابی ویژگیهای حسی کالباس. مجله علوم و صنایع غذایی ایران، سال ۴، شماره ۴، صفحه ۱۸-۹.

14. Ahmad, Z., Laughlin, T., and Kady, I .2015. Thymoquinone Inhibits *Escherichia coli* ATP Synthase and Cell Growth. PLOS One. 10(5): e0127802.

15. Alsawaf, S., and Alnaemi, H. 2010. Effect of *Nigella sativa* (seed and oil) on the bacteriological quality of soft white cheese. Iraqi J Vet Sci. 25(1): 21-27.

16. Arici, M., sagdic, O., and Gecgel, U. 2005. Antibacterial effect of Turkish black cumin (*Nigella sativa L.*) oils. Grasas y Aceites. 56(4): 259-262.

17. Belitz, H., Grosch W., and Schieberle, P. 2009. Food Chemistry. 4th edn. Springer Publishing, Leipzig, Germany.

18. El-Zainy, A.R., Morsy, A.E., Sedki, A.G., and Mosa, N.M. 2009. Polyphenols grape seeds extract as antioxidant and antimicrobial in beef sausage. Int J Curr Sci. 19(2): 112-121.
19. Gupta, S.K. 2012. Technological Innovations in Major World Oil Crops, Springer Publishing, Berlin, Germany.
20. Helal, E., Zaahkouk, S., and Rashed, S. 2003. Progressive effects of *Nigella sativa* against the interaction of sodium nitrite and sun - set yellow in albino rats. Egypt J Hosp Med. 10: 109-129.
21. Javadi, A., Safarmashaei, S., and Dehbandi, A., 2011. Study on microbial properties of Frankfurters during shelf life. Ann Biol Res. 2(5): 407-412.
22. Jensen, W. 2004. Encyclopedia of Meat Sciences. 1st edn. Elsevier Publishing, Wellington, New Zealand.
23. Kahsai, A.W. 2002. Isolation and characterization of active ingredients from *Nigella sativa* for antibacterial screening. MSc thesis. East Tennessee State University, USA.
24. Khaleghi, A., Kasaai, R., Khosravi-Darani, K., and Rezaei, K. 2016. Combined use of black barberry (*Berberis crataegina L.*) extract and nitrite in cooked beef sausages during the refrigerated storage. J Agr Sci Tech. 18: 601-614.
25. Khoddami, A., Ghazali, H., Yassoralipour, A., Ramakrishnan, Y., and Ganjloo, A., 2011. Physicochemical characteristics of Nigella seed (*Nigella sativa L.*) oil as affected by different extraction methods. J Am Oil Chem Soc. 88: 533–540.
26. Kaskoos, R. 2011. Fatty acid composition of black cumin oil from Iraq. Res J Med Plant. 5:85-89.
27. Lutterodt, H., Luther, M., Slavin, M., Yin, J., Parry, J., Gao, J., and Yu, L. 2010. Fatty acid profile, thymoquinone content, oxidative stability, and antioxidant properties of cold-pressed black cumin seed oil. LWT-Food Sci Technol. 43: 1409-1413.
28. Mahgoub, S., Ramadan, M., and El-Zahar, K. 2013. Cold pressed *Nigella sativa* oil inhibits the growth of foodborne pathogens and improves the quality of domiati cheese. J Food Safet. 33: 470-480.
29. Moarefian, M., Barzegar, M., and Sattar, I.M. 2011. *Cinnamomum zeylanicum* essential oil as a natural antioxidant and antibactrial in cooked sausage. J Food Biochem. 600: 62-69.
30. Nollet, L.M.L., and Toldra, F. 2006. Advanced Technologies For Meat Processing. CRC Press, New York, USA.
31. Rabie, A., and Marzouk, N. 2010. Effect of *Nigella sativa* oil on the microbial quality of chilled chicken fillets. AJVS. 29(1): 51-59.
32. Ramadan, M., Asker, M., and Tadros, M .2012. Antiradical and antimicrobial properties of cold-pressed black cumin and cumin oils. Eur Food Res Technol. 234: 833–844.
33. Rogozhin, E.A., Oshchepkova, Y.I., Odintsova, T.I., Khadeeva, N.V., Veshkurova, O.N., and Egorov, T.A. 2011. Novel antifungal defensins from *Nigella sativa L.* seeds. Plant Physiol Biochem. 49(2): 131-137.
34. Shibamoto, T., and Bejeldanes, L. 2009. Introduction to Food Toxicology. 2nd edition. Academic Press, California, USA.
35. Sindelar, J.J., and Milkowski, A.L. 2011.Sodium nitrite in processed meat and poultry meats: A review of curing and examining the risk/benefit of its use. American Meat Sci Ass. White Paper Series.
36. Sultan, M., Butt, M., Ahmad, A., Ahmad, N., Amanullah, M., and Batool, R. 2012. Utilization of *Nigella sativa L.* essential oil to improve the nutritive quality and thymoquinone contents of baked products. Pak J Nutr. 11: 812-817.
37. Taha, M., Abdelazeiz, A., and Saudi, W. 2010. Antifungal effect of thymol, thymoquinone and thymohydroquinone against yeasts, dermatophytes and non-dermatophyte molds isolated from skin and nails fungal infections. Egypt J Biochem Mol Biol. 23: 109-126.

experimental hepato-carcinogenesis induced by nitrosamine precursor in rats. Egypt J Hosp Med. 18: 88-115.

41. Yarbrough, J.M., Rake, J.B., and Eagon, R.G. 1980. Bacterial inhibitory effects of nitrite: Inhibition of active transport, but not of group translocation, and of intracellular enzymes. Appl Environ Microbiol. 39(4): 831-834.

38. Tayel A., and El-Tras, W. 2011. Plant extracts as potent biopreservatives for *Salmonella typhimurium* control and quality enhancement in ground beef. J Food Safet. 32(1): 115-121.

39. Toldra, F. 2010. Handbook of Meat Processing. 1st ed., Wiley-Blackwell Publishing, Iowa, USA.

40. Waer, H., Asser, A., Ibrahim, H., Khalfa, M., Elgendy, S., and Magrabi, K. 2005. Modifying effects of soybean and *Nigella Sativa* against

Antimicrobial Effects of Black Cumin (*Nigella Sativa*) Oil in Nitrite Reduced Sausage

Abolhasanzadeh A[1]، Khani M[2*]، Fahimdanesh M[2]

1. MSc Graduated of Food Science and Technology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Department of Food Science and Technology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[*]**Corresponding author:** *m.khani@qodsiau.ac.ir*

Received: 23 December 2017 Accepted: 23 July 2017

Abstract

This study was aimed to investigate the antimicrobial effects of black cumin oil in sausage and evaluate the possibility of reduction of its nitrite. For this purpose, sausage samples were prepared at concentrations of 2 and 3 percent of black cumin oil containing various amounts of nitrite (including 0,30,60,90 ppm) in eight treatments and a control sample without black cumin oil and with 120 ppm nitrite and all stored for a month at 4°C. Then microbial properties of all samples such as total bacterial counts, coliforms, Salmonella, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, yeasts and moulds were examined on 1, 11, 21 and 31 days of storage time and organoleptic properties were evaluated after production of samples. The results showed that treatments containing 2 and 3 percent of black cumin oil with 90 ppm and 60 ppm nitrite, mainly had total bacterial counts, coliforms counts, *E.coli*, *S.aureus*, yeasts and moulds counts similar to those had control sample during the storage. But these microbial counts showed significant increase in all the samples at the end of the storage period ($P<0.05$). Salmonella and *Cl. perfringens* was not detected in samples. Generally, the results indicated that microbial load decreased by increasing the concentration of black cumin oil from 2 to 3 percent in equal concentrations of nitrite. Also, reduction of nitrite in treatments containing black cumin oil, mainly led to significant decrease of color, flavour, and general acceptance scors comparing with control sample, but had no significant effect on texture and odor properties.

Keywords: Nitrite reduction, black cumin oil, sausage, microbial properties.