

## کاهش میزان نیتريت فرمولاسيون سوسيس با استفاده از بهينه سازي هردل‌هاي فعاليت آبي و مدت زمان فرايند حرارتي

فاطمه کبيری<sup>۱</sup>، نفيسه جهان بخشيان<sup>۲\*</sup>، مريم خاکباز حشمتی<sup>۳</sup>

۱- دانش آموزخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۳- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

(تاریخ دریافت: ۹۶/۰۴/۰۳ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۸/۲۹)

### چکیده

با توجه به حساسیت بالایی که در حال حاضر در رابطه با میزان مصرف نیتريت در محصولات فرآوری شده گوشتی وجود دارد، جهت کاهش مصرف میزان نیتريت فرمولاسيون سوسيس، در این تحقیق با استفاده از روش سطح پاسخ اثر همزمان سه هرذل زمان حرارت دهی، کاهش فعالیت آبی (توسط پودر موسیلاژ تخم شربتی) و میزان نیتريت سدیم طی مدت زمان ماندگاری بر خواص کیفی سوسيس ۴۰ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. در بخش اول این مطالعه اثر هرذل‌های مختلف (میزان نیتريت صفر تا ۳۰۰ ppm و پودر موسیلاژ تخم شربتی صفر تا ۱/۵ درصد وزنی/وزنی و زمان حرارت دهی ۱۰۵ تا ۱۳۵ دقیقه) بر خواص کیفی سوسيس شامل نیتريت باقیمانده، رنگ، شمارش کلستریدیوم پرفرنزنس و بافت بررسی شده و در بخش دوم بهینه سازی و اعتبار سنجی مدل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که با توجه به افزودن نیتريت سدیم اولیه، درصد قابل توجهی از آن، با افزایش زمان حرارت دهی و زمان نگهداری کاهش می‌یابد (به دلیل واکنش بین نیتريت و میوگلوبین گوشت و تشکیل کمپلکس نیتريت-هم نیتروزومیوگلوبین). تغییرات کلی رنگی تحت تأثیر میزان نیتريت، پودر موسیلاژ تخم شربتی و زمان حرارت دهی می‌باشد. شمارش کلستریدیوم تحت تأثیر مربع نیتريت و زمان نگهداری بود. به طوری که کمترین میزان کلستریدیوم در بالاترین غلظت نیتريت حاصل شد. همچنین تنها پارامتر مؤثر بر بافت سوسيس، میزان پودر موسیلاژ تخم شربتی می‌باشد که با افزایش آن از سفتی بافت کاسته می‌شود. در بخش بهینه سازی، فرمولاسيون سوسيس با میزان نیتريت (۹۵/۳۸ ppm)، پودر موسیلاژ تخم شربتی (۰/۷۶ درصد)، زمان حرارت دهی (۱۱۲/۱۵ دقیقه) و زمان نگهداری حداکثر (۲۴ روز) انتخاب شد؛ که این فرمول بهینه باعث کاهش حدود ۳۰ ppm از میزان نیتريت افزوده شده طبق استاندارد ملی ایران به فرآورده‌های گوشتی می‌شود. نتایج آزمایشات با نتایج پیش‌بینی شده توسط نرم افزار مطابقت خوبی داشت که نشان‌دهنده اعتبار مدل بوده و برای تخمین نتایج آزمایش قابل استفاده می‌باشد. نتایج حاصل از تحقیق بیانگر کارایی مفید روش سطح پاسخ در بهینه سازی فرمولاسيون سوسيس با تکنولوژی هرذل بود.

**کلید واژگان:** پودر موسیلاژ تخم شربتی، تکنولوژی هرذل، روش سطح پاسخ، سوسيس، نیتريت.

\* مسئول مکاتبات: njahanbakhshian@yahoo.com

## ۱- مقدمه

محصولات گوشتی عامل خطرزای اصلی، باکتری کلسترییدیوم بوتولینیوم می‌باشد و برای ممانعت از رشد اسپور و سلول‌های رویشی این میکروارگانیسم می‌توان از مجموعه عواملی چون فعالیت آبی، پتانسیل اکسیداسیون و احیاء، اسیدیته، نمک، حرارت، شرایط نگهداری، نوع بسته بندی و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی استفاده کرد و مانع رشد آن شد [۱۰]. در بعضی از مناطق آسیا مانند ایران و هند، دانه‌های ریحان (*Ocimum basilicum*) معروف به تخم شربتی اغلب در نوشیدنی‌ها (شربت) و دسرهای یخی (فالوده) برای زیبایی و همچنین منبع فیبر رژیمی استفاده می‌شوند. دانه‌های ریحان پس جذب آب ژلاتینه می‌شوند. قدرت بالای تولید لعاب دانه‌های ریحان (۲۰ درصد وزنی/وزنی بر پایه مرطوب) آنها را به عنوان منبع جدیدی از هیدروکلئید طبیعی با ویژگی‌های عملکردی بسیار ارزشمند معرفی می‌کند که با برخی از صمغ‌های تجاری دیگر قابل مقایسه است [۱۱]. به تازگی برخی از محققان صنایع غذایی به استفاده از صمغ بذر ریحان (BSG) به عنوان عامل تغلیظ کننده و تشکیل دهنده‌ی ژل (به دلیل ویژگی‌های عملکردی و راحتی استخراج) علاقه مند شده اند [۱۲].

بنابر موارد ذکر شده، با توجه به اهمیت کاهش میزان مصرف نیتريت و نیز دستیابی به فرمولاسیونی بهینه که دارای بالاترین ویژگی‌های کیفی نیز باشد، هدف از این پژوهش کاهش میزان مصرف نیتريت همراه با استفاده از هردل‌های کاهش فعالیت آبی (با استفاده از پودر موسیلاژ تخم شربتی) و تغییر زمان فرایند حرارتی می‌باشد.

## ۲- مواد و روش‌ها

## ۲-۱- فرایند تولید سوسیس

گوشت چرخ شده توسط کاتر حدود نیم دقیقه کاملاً خرد شده و سپس نمک طعام، املاح اسیدهای خوراکی و حدود یک سوم از یخ خرد شده به آن اضافه شد و عمل کاتریزاسیون ادامه یافت. در ادامه به منظور تنظیم درجه حرارت دو سوم خرد یخ باقی مانده در چند وعده اضافه گردید تا زمان کافی برای جذب آب توسط گوشت داده شود. زمانی که قوام فارش (خمیر) تهیه شده به حد کافی رسید روغن مایع اضافه شده و عمل کاتریزاسیون ادامه یافت. سپس میزان نیتريت طبق فرمولاسیون‌های ذکر شده اضافه شد و جهت کاهش فعالیت آبی نیز از پودر موسیلاژ تخم شربتی استفاده شد. بعد از آن

منطبق با استاندارد ملی ایران، عنوان سوسیس و کالباس منحصرأ به نوعی از فرآورده‌های گوشتی حرارت دیده که به صورت خمیر تهیه شده و در برخی از موارد برای ایجاد تنوع در داخل آن تکه‌های گوشت عمل‌آوری شده نیز اضافه می‌گردد، اطلاق می‌گردد [۱]. از جمله فسادهای رایج در فرآورده‌های گوشتی می‌توان به رشد میکروبی و فساد شیمیایی اشاره کرد [۲]. در تمامی محصولات گوشتی فرآوری شده، به منظور جلوگیری از تغییرات اکسیداتیو، از آنتی‌اکسیدان‌ها استفاده می‌شود که یکی از دلایل استفاده از نیتريت سدیم نیز در فرآورده‌های گوشتی نقش آنتی‌اکسیدانی آن می‌باشد [۳]. به طور کلی می‌توان بیان کرد، نیتريت می‌تواند با آمین‌ها، آمیدها و اسیدهای آمینه در گوشت واکنش داده و منجر به تشکیل ترکیبات سرطان‌زای N- نیتروزو گردد و به منظور کاهش این اثر نامطلوب، راه‌های مختلفی از جمله کاهش میزان مصرف نیتريت، استفاده از جایگزینی برای نیتريت، استفاده از عوامل مسدود کننده ترکیبات سرطان‌زا و کنترل نیتريت باقیمانده وجود دارد [۴ و ۵ و ۶]. اما دلایل متعدد پر اهمیت تری از پائین آوردن میزان نیتروزآمین‌ها وجود دارد، از جمله خطر مسمومیت غذایی ناشی از بوتولیسم، که ممکن است در اثر حذف نیتريت‌ها مخصوصاً در گوشت‌های عمل‌آمده رخ دهد، بنابراین تلاش محققان در راستای کاهش بیش از پیش این ماده در فرمولاسیون محصولات گوشتی فرآوری شده ادامه دارد [۶].

طبق مطالعات انجام شده بهترین و مؤثرترین روش، کاهش مستقیم نیتريت در محصولات گوشتی می‌باشد. تا به امروز اکثر تحقیقات انجام شده در جهت یافتن جایگزینی ایمن و مناسب برای نیتريت و نیز استفاده از عوامل مسدود کننده ترکیبات سرطان‌زا بوده است [۷ و ۸ و ۹]. اما در ارتباط با کاهش مصرف نیتريت کار مؤثر و عملی از بعد میکروبی، انجام نگرفته است. در این ارتباط، از تکنولوژی هردل که یکی از روش‌های جدید نگهداری است می‌توان استفاده کرد. این روش نگهداری ترکیبی از روش‌های نگهداری منفرد است که در ترکیب با یکدیگر جهت فرآوری محصول بدون از دست دادن خصوصیات تغذیه‌ای و حسی آن، مورد استفاده قرار می‌گیرد. در واقع برای جلوگیری از رشد یک میکروارگانیسم و یا آنزیم، با انتخاب هوشمندانه چندین فاکتور (هردل) در کنار هم، از رشد آن میکروارگانیسم ممانعت می‌شود. در ارتباط با

غلظت که به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر رسیده است) به محلول فوق اضافه گردید و کاملاً مخلوط شدند و به مدت ۵ دقیقه در جای تاریک قرار داده شدند. سپس ۲ میلی لیتر از محلول شماره ۲ نفتیل اتیلن دی آمید دی هیدروکلراید، که به  $N-1 (0.25/100)$  گرم حجم ۲۵۰ میلی لیتر رسیده است) به محلول فوق افزوده شد و کاملاً مخلوط گردید و مجدداً به مدت ۳-۱۰ دقیقه در تاریکی نگه داشته شد. سپس تا خط نشانه، به وسیله آب مقطر، به حجم رسانیده شد و جذب محلول در طول موج ۵۳۸ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر اندازه گیری گردید. مقدار نیتريت نمونه محاسبه گردید و بر حسب میلی گرم نیتريت سدیم در هر کیلوگرم با استفاده از این فرمول گزارش گردید [۱۴].

$$NaNO_2 = C \times \frac{2000}{m \times v}$$

۲-۲-۲- اندازه گیری رنگ

رنگ مهمترین پارامتری است که نشانگر کیفیت ماده غذایی می باشد. اندازه گیری رنگ با استفاده از دستگاه هانتربل (کالرفلکس - آمریکا) صورت گرفت و سه شاخص ( $L^*$ ) بیانگر رنگ سفید تا سیاه، ( $a^*$ ) سبز تا قرمز و ( $b^*$ ) آبی تا زرد تعیین شد. فاکتور تغییرات کلی رنگ از این رابطه پیروی می کند.

Equation 1

$$\Delta E = \sqrt{(a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2 + (L^* - L_0^*)^2}$$

۲-۲-۳- شمارش کلستریدیوم پرفرنزئس (ولشای)

شمارش کلستریدیوم پرفرنزئس بر اساس استاندارد شماره ۸۹۲۳ صورت گرفت. مقدار ۱۰ گرم از نمونه همگن شده به ۹۰ میلی لیتر آب پیتون استریل اضافه گردید و سری رقت های متوالی آماده سازی شد. سپس نمونه ها جهت قرار گرفتن رد معرض شوک حرارتی، به مدت ۱۰ دقیقه در حمام بن ماری ۶۵-۶۰ درجه سلسیوس قرار گرفته و سپس لوله ها سرد شدند. به دنبال تهیه رقت ها، کشت میکروبی با استفاده از روش پور پلیت انجام گردید و سپس محیط ها به مدت ۴۸ ساعت در جار بی هوای و در گرمخانه ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند. پلیت شاهد به مدت ۴۸ ساعت در شرایط هوای در گرمخانه ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از مدت زمان مذکور، شمارش کلونی های سیاه صورت گرفت. میانگین کلونی هایی

خمیر آماده شده در پوشش کالباس به صورت دستی پر شد و تحت دماها و زمان های مورد نظر تحت فرایند پخت قرار گرفت [۱۳].

۲-۲-۲- آزمونهای فیزیکوشیمیایی و میکروبی

۲-۲-۲-۱- اندازه گیری نیتريت

برای اندازه گیری مقدار نیتريت در نمونه سوسیس از استاندارد ملی ایران به شماره ۱۰۲۸ که برگردان فارسی بدون تغییر از استاندارد ایزو، می باشد، استفاده گردید. منظور از مقدار نیتريت در گوشت و فرآورده های آن، مقدار نیتريتی است که بر اساس روش ارائه شده تعیین و بر حسب میلی گرم نیتريت در یک کیلوگرم نمونه (قسمت در میلیون) بیان می شود. اصول این روش عبارت است از استخراج آزمون با آب داغ، رسوب دادن پروتئین ها، صاف کردن، افزودن سولفانیل آمید،  $N$ -آلفانفتیل دی هیدروکلراید به مایع صاف شده در حضور نیتريت که باعث گسترش یک رنگ قرمز شده که در نهایت با روش اندازه گیری فتومتری در طول موج ۵۳۸ نانومتر اندازه گیری می شود.

ابتدا ۱۰ گرم از نمونه با دقت  $\pm 0.001$  وزن گردید. سپس نمونه به یک ارلن مایر انتقال داده شد و ۵ میلی لیتر از محلول بوراکس اشباع شده و ۱۰۰ میلی لیتر آب ۷۰ درجه سانتی گراد به آن اضافه شد و ارلن مایر به مدت ۱۵ دقیقه خنک شد و (۱۰۶ گرم فروسیانید پتاسیم که در ۱ اسپس ۲ میلی لیتر از کارز آب حل شده و به حجم هزار میلی لیتر رسیده) و ۲ میلی لیتر (۲۲۰ گرم استات روی و ۳۰ میلی لیتر اسید استیک II کارز گلاسیال در آب حل شده و به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر رسیده است) اضافه گردید و پس از هر بار، ارلن کاملاً به هم زده می شد تا محتویات مخلوط گردند. محتویات ارلن به بالن ژوژه ۲۰۰ میلی لیتری منتقل گردید و سپس تا خط نشانه، با آب مقطر رقیق و مخلوط گردید. سپس بالن به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق به طور ساکن قرار گرفت. محلول رویی به دقت جدا گردید و با کاغذ صافی بدون نیتريت صاف گردید. جهت اندازه گیری رنگ، ۲۵ میلی لیتر از محلول صاف شده را به وسیله پیت، به بالن حجمی ۱۰۰ میلی لیتری انتقال داده و تا رسیدن به حجم ۶۰ میلی لیتر، آب مقطر اضافه گردید. سپس (۲ گرم سولفانیل آمید در ۱۰ I ۸۰۰ میلی لیتر از محلول کارز میلی لیتر آب که به همراه ۱۰۰ میلی لیتر اسید هیدروکلریک غلیظ شده و به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر رسیده است) و سپس ۶ میلی لیتر محلول شماره ۳ (۴۴۵ میلی لیتر اسید هیدروکلریک

### ۳-۲- تجزيه و تحليل آماری

جهت تجزيه و تحليل داده‌ها با توجه به درصد‌های به دست‌آمده از تست‌های اولیه، حد بالا و پايين متغيرها به دست‌آمد، سپس با استفاده از نرم افزار ديزاين اكسپرت ( Design Expert V 9.0) روش سطح پاسخ انتخاب و در سطح احتمال ۰/۹۵ بررسی‌ها انجام شد. در اين طرح، نيتريت در محدوده صفر تا ۳۰۰ ppm، هيدروكلويد در محدوده صفر تا ۱/۵ درصد (وزني/وزني)، زمان حرارت دهی در محدوده ۱۳۵-۱۰۵ دقیقه و زمان نگهداری در محدوده صفر تا ۲۴ روز انتخاب شده است. کلیه تست‌ها با دو تکرار انجام شده و میانگین آن‌ها در طرح RSM گزارش شد.

که در پلیتها در شرایط بی‌هوای و نیز در شرایط هوای رشد کردند شمارش گردید و تعداد کلونی‌های شرایط بی‌هوای از تعداد کلونی‌های شرایط هوای کم شد و سپس فاکتور رقت و تعداد باکتری در هر رقت محاسبه گردید [۱۵].

### ۴-۲-۲- اندازه‌گیری بافت

از آزمون TPA با استفاده از دستگاه بافت سنج ( Brook Field 30-3, Texture analyser) به منظور بررسی بافت نمونه‌ها طی مدت زمان مورد نظر استفاده شد. یک برش از سوسیس به طول ۵ سانتی‌متر تحت آزمون فشاری قرار گرفت. نمونه‌های سوسیس تا ۰۵ درصد ارتفاع اولیه توسط دستگاه با یک پروب مسطح ۲۵ درصد فشرده شد و قطر پروب ۵ سانتی‌متر لحاظ شد و سختی بافت بر حسب نیوتن گزارش شد.

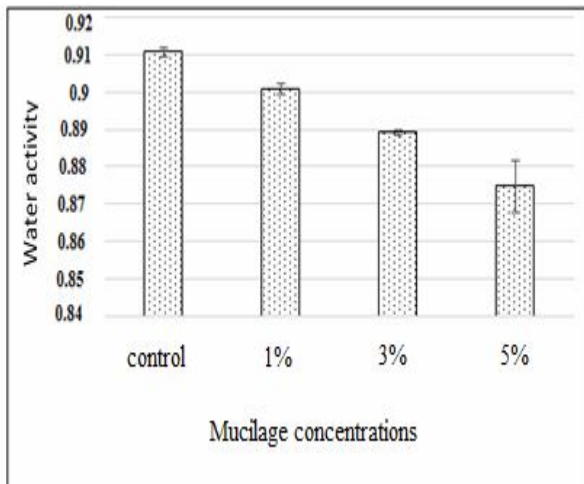
Table 1 Selected formulations for sausage production

Std	Run	Block	Factor 1 A: Nitrite (ppm)	Factor 2 B: Hydrocolloid (%)	Factor 3 C: Heating time (min)	Factor 4 D: Storage time (day)
19	1	Block 1	300.00	0.16	105	0.00
25	2	Block 1	300.00	0.00	105	24.00
24	3	Block 1	156.48	1.50	105	24.00
11	4	Block 1	156.48	1.50	105	24.00
17	5	Block 1	141.38	0.79	108.28	0.00
1	6	Block 1	0.00	1.50	119.53	0.00
9	7	Block 1	300.00	0.00	135	0.00
22	8	Block 1	300.00	0.00	135	0.00
10	9	Block 1	300.00	1.50	135	11.58
14	10	Block 1	300.00	0.95	120.55	24.00
8	11	Block 1	0.00	1.50	135	24.00
6	12	Block 1	0.00	0.00	135	4.51
2	13	Block 1	0.00	0.00	105	0.00
5	14	Block 1	244.21	0.00	135	24.00
13	15	Block 1	300.00	1.50	105	0.00
15	16	Block 1	0.00	0.96	105	12.41
4	17	Block 1	0.00	0.00	110.36	24.00
20	18	Block 1	0.00	0.35	118.49	9.00
23	19	Block 1	300.00	0.95	120.55	24.00
18	20	Block 1	109.75	0.92	123.75	15.41
16	21	Block 1	0.00	0.19	135	24.00
21	22	Block 1	0.00	1.50	119.53	0.00
7	23	Block 1	144.39	0.95	135	0.00
12	24	Block 1	183.03	0.00	116.67	9.35
3	25	Block 1	300.00	0.00	105	24.00

### ۴-۲-۲- اندازه‌گیری فعالیت آبی

برای اندازه‌گیری فعالیت آبی از دستگاه هیگرومتر استفاده شد. فعالیت آبی نمونه‌های خمیر سوسیس در دمای ۲۵ درجه‌ی

سانتی‌گراد اندازه‌گیری شدند. برای نمونه‌های خمیر، مقداری خمیر در ظرف مخصوص نمونه قرار داد شد و پروب دستگاه بر روی آن قرار گرفت تا کاملاً درز بندی شود.



**Fig. 1** Changes in water activity with variations in the amount of Basil seed mucilage powder

### ۳-۲- نیتريت باقی مانده در سوسیس

یکی از مهم ترین مسائل مربوط به افزودنی‌ها مخصوصاً نیتريت و نیتريت خطر سرطان‌زایی آن‌ها می‌باشد. واکنش اسید نیترو که به وسیله شکستن نیتريت تولید می‌شود با آمین‌های نوع دوم تولید نیتروزآمین می‌کند. بنابراین دانشمندان تصمیم به حذف نیتريت و نیتريت و جایگزین نمودن آن با ماده و یا موادی دیگر نموده‌اند. اما دلایل متعدد پر اهمیت تری از پائین آوردن میزان نیتروزآمین‌ها وجود دارد، از جمله خطر مسمومیت غذایی ناشی از بوتولسم، که ممکن است در اثر حذف نیتريت‌ها مخصوصاً در گوشت‌های عمل آمده رخ دهد، بنابراین تلاش محققان در راستای کاهش بیش از پیش این ماده در فرمولاسیون محصولات گوشتی فراوری شده ادامه دارد [۶].

پس از آنالیز داده‌ها توسط نرم افزار، نرم افزار مدلی را پیشنهاد می‌کند که دارای انحراف استاندارد (S.D.) و مجموع مربعات باقیمانده برآورد شده (PRESS) کم و ضریب همبستگی ( $R^2$ ) زیاد باشد. در این پاسخ (نیتريت باقیمانده) نرم افزار، مدل فاکتور متقابل دوگانه را به دلیل داشتن این ویژگی‌ها پیشنهاد کرد که نتایج آن در جدول (۲) آمده است. به منظور مدل سازی باید مشخص کرد هر یک از موارد تعیین شده اعم از درجه یک، درجه دو و اثر متقابل در چه سطحی معنی دار شده‌اند که این مطلب با بررسی  $p$  جداول مشخص می‌شود. برای تهیه معادله در سطح اطمینان ۹۵ درصد، مواردی که  $p < 0.05$  و برای سطح اطمینان ۹۰ درصد مواردی که  $p < 0.1$  دارند در مدل استفاده می‌شوند. همان‌طور که در نتایج این جدول و معادله (۲) آمده است، اثر میزان نیتريت، زمان

### ۳- نتایج و بحث

به منظور بهینه سازی شرایط فرآیند تولید سوسیس، اثر متغیرهای مستقل شامل A میزان نیتريت (ppm)، B، هیدروکلئید (پودر موسیلاژ تخم شربتی)، C زمان فرایند حرارتی (دقیقه) و D زمان نگهداری (روز) انتخاب شدند. در روش RSM برای هر متغیر وابسته، مدلی تعریف می‌شود که آثار اصلی و متقابل فاکتورها را بر روی هر متغیر جداگانه بیان می‌کند، مدل چند متغیره به صورت زیر می‌باشد.

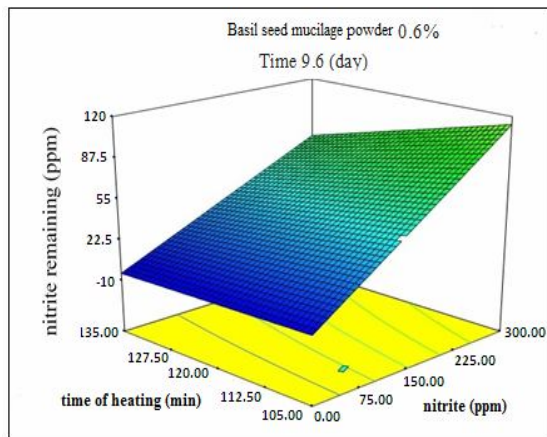
در معادله ذکر شده  $Y$  پاسخ پیش‌بینی شده،  $\beta_0$  ضریب ثابت،  $\beta_a$ ،  $\beta_b$ ،  $\beta_c$  اثرات خطی،  $\beta_{aa}$ ،  $\beta_{bb}$ ،  $\beta_{cc}$  اثرات مربعی و  $\beta_{ab}$ ،  $\beta_{bc}$ ،  $\beta_{ac}$  اثرات متقابل می‌باشند.

$$Y = \beta_0 + \beta_a A + \beta_b B + \beta_c C + \beta_{aa} A^2 + \beta_{bb} B^2 + \beta_{cc} C^2 + \beta_{ab} A B + \beta_{ac} A C + \beta_{bc} B C$$

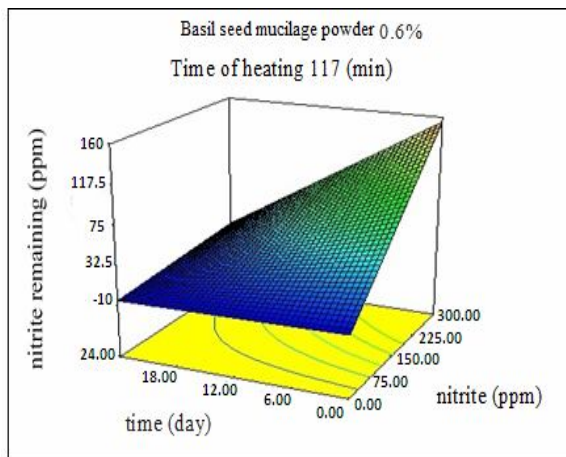
جستجوی شرایط عملیاتی بهینه برای دستیابی به بهترین پاسخ‌ها با استفاده از تکنیک بهینه‌سازی عددی انجام شد. در تکنیک مذکور فضای پاسخ با استفاده از مدل‌های ایجاد شده و به منظور یافتن بهترین شرایطی که اهداف بهینه‌سازی مورد نظر را برآورده کند، جستجو شد. بدین منظور ابتدا اهداف بهینه‌سازی مشخص شده و سپس سطوح پاسخ و متغیرهای مستقل را تنظیم کرده و با استفاده از تکنیک فاین تیونینگ (Fine tune)، بهترین جواب‌ها به دست آمد [۱۶].

### ۳-۱- اندازه گیری فعالیت آبی

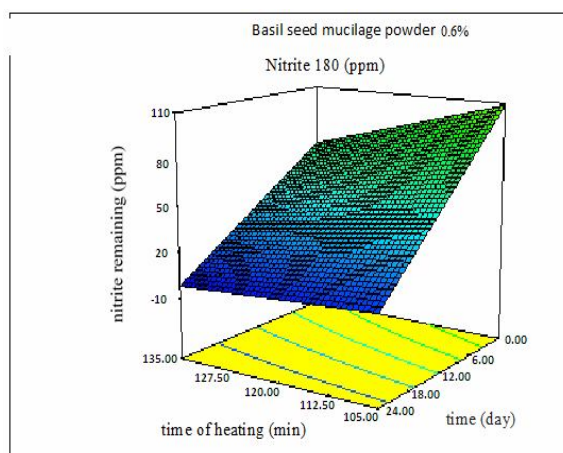
شکل ۱ تغییرات میزان فعالیت آبی خمیر سوسیس با درصدهای مختلف پودر موسیلاژ تخم شربتی را نشان می‌دهد. همان‌گونه که در شکل مشخص است با افزایش درصد پودر موسیلاژ تخم شربتی از فعالیت آبی کاسته می‌شود، به طوری که در غلظت ۵ درصد پودر موسیلاژ تخم شربتی، کمترین میزان فعالیت آبی را دارد. کاهش فعالیت آبی به عنوان هر دل در نظر گرفته می‌شود به این دلیل که رشد میکروارگانیسم‌ها با کاهش فعالیت آبی کاهش چشمگیری پیدا می‌کنند. صمغ‌ها با کاهش آب در دسترس برای میکروب‌ها، می‌تواند تا حدودی از رشد آن‌ها جلوگیری کند.



**Fig. 2** Response surface graph of the usage residual nitrite with changes in the heating time and nitrite of formulation



**Fig. 3** Response surface graph of the usage residual nitrite with changes in the storage time and nitrite of formulation



**Fig. 4** Response surface graph of the usage residual nitrite with changes in the heating and storage time

نگهداری، زمان فرایند حرارتی، اثر متقابل نیتريت-زمان نگهداری، نیتريت-زمان فرایند حرارتی و زمان فرایند حرارتی-زمان نگهداری بر میزان نیتريت معنی دار است (در سطح ۵ درصد).

در نمودارهای سطح پاسخ (اشکال ۲ تا ۴) مشاهده می شود با افزایش میزان نیتريت افزوده شده میزان نیتريت باقیمانده افزایش می یابد. همچنین با افزایش زمان فرایند حرارتی و زمان نگهداری در بالاترین میزان نیتريت سدیم افزوده شده، نیتريت باقیمانده کاهش می یابد، به طوری که در بالاترین زمان نگهداری و زمان فرایند حرارتی کمترین میزان نیتريت باقیمانده را خواهیم داشت. در سوسيس تولید شده با ۱۸۰ ppm نیتريت سدیم و میزان ۰/۶ درصد پودر موسیلاژ تخم شربتی در تمامی زمان های فرایند حرارتی، با افزایش زمان نگهداری میزان نیتريت باقیمانده کاسته می شود. میزان تشکیل نیتروز آمین ها با مجذور غلظت نیتريت سدیم موجود در فرآورده، رابطه مستقیم دارد. از این رو، با کاهش حتی مقدار کمی نیتريت سدیم افزوده شده، می توان تشکیل نیتروز آمین ها را به طور قابل ملاحظه ای کاهش داد. حداقل نیتريت سدیم مورد نیاز برای جلوگیری از رشد کلستریدیوم بوتولینیوم در محصولات گوشتی عمل آوری بین ۴۰ تا ۸۰ پی پی ام می باشد [۱۷ و ۱۹].

نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان می دهد که با توجه به افزودن نیتريت سدیم اولیه، درصد قابل توجهی از آن، با افزایش زمان حرارت دهی و زمان نگهداری کاهش می یابد. دلیل این افت را می توان به واکنش بین نیتريت و میوگلوبین گوشت و تشکیل کمپلکس نیتريت-هم نیتروزومیوگلوبین نسبت داد که عامل اصلی ایجاد رنگ سرخ گوشت های عمل آوری شده است. هر اندازه، میزان گوشت فرآورده ها بیشتر باشد، به دلیل وجود میوگلوبین بیشتر در محیط، نیتريت سدیم بیشتری با آن ترکیب و از محیط حذف می شود در نتیجه میزان باقیمانده نیتريت سدیم، کمتر است [۱۸].

**Table 2** Analysis of variances of the effect of formulation variables on residual nitrite of susage samples

p- value	F value	Sum of squares	df	source
0.0001	165.30	7695.23	10	Model
0.0001	585.92	27276.11	1	nitrite-A
0.7749	0.085	3.96	1	hydrocolloid (Percent)-B
0.0001	37.88	1763.33	1	time of heating(min)-C
0.0001	492.86	22943.83	1	time(day)-D
0.6424	0.23	10.49	1	AB
0.0004	21.30	991.65	1	AC
0.0001	328.66	15300.13	1	AD
0.2677	1.33	62.03	1	BC
0.5519	0.37	17.30	1	BD
0.0018	14.85	691.07	1	CD

**Equation 2**

$$\text{Nitrite residual} = 38.20 + 40.43A - 10.77C - 36.14D - 9.49AC - 35.22AD + 7.62CD$$

با افزایش زمان نگهداری فرآورده‌های گوشتی در طی انبارمانی رنگ دچار تغییر می‌شود و تغییرات کلی رنگ افزایش می‌یابد [۲۰ و ۱۳]. این در حالی است که در این تحقیق با افزایش زمان نگهداری تغییرات کلی رنگ دچار تغییرات معناداری نشد. نتایج دالتوریا و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد تغییرات کلی رنگ سوسیس‌های تولید شده با افزایش میزان نیتريت افزایش پیدا می‌کند. زیرا نیتريت نقش مهمی در رنگ فرآورده‌های گوشتی ایفا می‌کند. نتایج ددا و همکاران (۲۰۰۷) نشان داد افزایش میزان نیتريت باعث تغییرات پارامترهای رنگی می‌شود. همچنین از آنجایی که پودر موسیلاژ تخم شربتی بکار رفته در فرمولاسیون سوسیس باعث تغییر در هر سه پارامتر اصلی رنگ شامل  $L^*$ ،  $a^*$  و  $b^*$  می‌شود دور از انتظار نیست که هم افزایی این سه شاخص در فرمول محاسبه تغییرات کلی رنگ باعث افزایش میزان این پارامتر رنگی شود.

**۳-۳- تغییرات کلی رنگ ( $\Delta E$ )**

در بررسی تغییرات کلی رنگ، نرم‌افزار مدل خطی را پیشنهاد کرد که نتایج آن در جدول (۳) ارائه شده است. همان‌طور که در نتایج این جدول و معادله (۳) آمده است، اثر میزان نیتريت، پودر موسیلاژ تخم شربتی و مدت زمان حرارت دهی بر میزان تغییرات کلی رنگ سوسیس در سطح ۵ درصد معنی‌دار است. همان‌گونه که در نمودار سطح پاسخ (شکل ۵) مشاهده می‌شود تغییرات کلی رنگ سوسیس‌های تولید شده با افزایش میزان نیتريت افزایش پیدا می‌کند. همچنین با افزایش میزان پودر موسیلاژ تخم شربتی و زمان حرارت دهی تغییرات کلی رنگ سوسیس افزایش می‌یابد (اشکال ۶ و ۷). کاهش شاخص  $a^*$  و افزایش شاخص  $b^*$  همراه با تغییر شاخص روشنایی و یا بدون این شاخص رنگی باعث کاهش رنگ فرآورده گوشتی می‌شود [۲۰]. بررسی منابع نشان می‌دهد

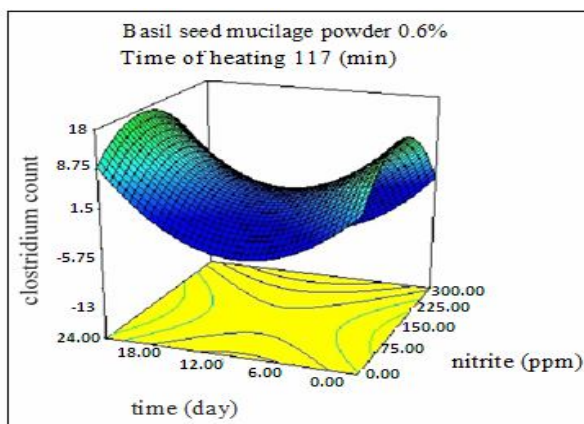
**Table 3** Analysis of variances of the effect of formulation variables on total color changes of susage samples

p-value	F value	Sum of squares	df	Source
0.0001	20.65	33.03	4	Model
0.0002	19.98	7.99	1	nitrite-A
0.0001	63.40	25.35	1	hydrocolloid (Percent)-B
0.0171	6.77	2.71	1	time of heating(min)-C
0.1814	1.92	0.77	1	time(day)-D

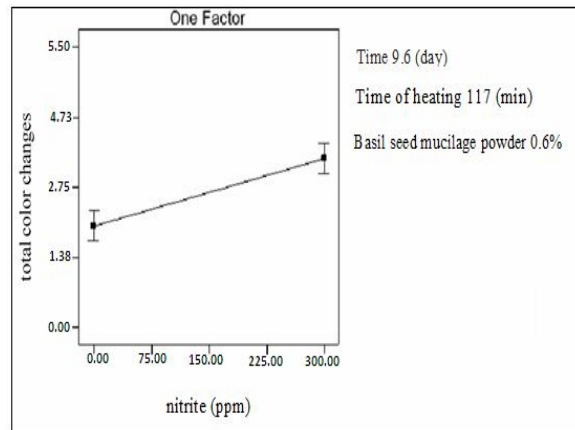
$$\Delta E = -1.4 + 0.6532.42490 \times 10^{-3}A + 1.161875B + 0.026701C$$

میزان بار میکروبی سوسیس در سطح ۵ درصد معنی دار می باشد. همان گونه که در نمودار سطح پاسخ (شکل ۸) مشاهده می شود تأثیر زمان نگهداری و نیتريت بر شمارش کلستریدیوم سوسیس های تولید شده با تکنولوژی هردل نشان می دهد با افزایش میزان نیتريت میزان کلستریدیوم ابتدا افزایش و سپس کاهش می یابد به طوری که در روز صفر شاهد کمترین میزان کلستریدیوم در سوسیس تولید شده با بالاترین میزان نیتريت بودیم.

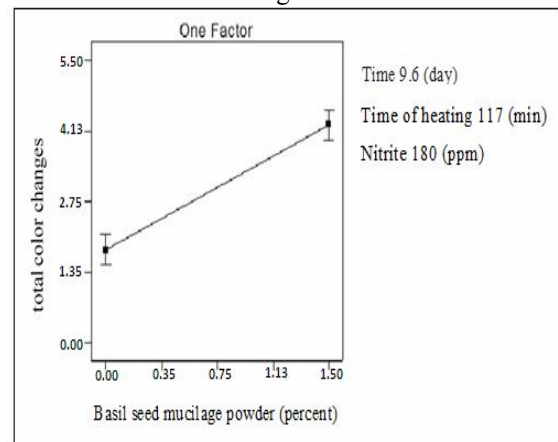
با افزایش زمان نگهداری سوسیس میزان کلستریدیوم ابتدا کاهش و در روزهای پایانی روندی افزایشی داشت. چنین اتفاقی به دلیل تغییر میزان نیتريت باقیمانده سوسیس در طول زمان نگهداری می باشد. از آنجایی که در روزهای ابتدایی نگهداری سوسیس میزان نیتريت بالا بوده و به تبع آن خاصیت ضد میکروبی سوسیس بالا می باشد تا حد زیادی از رشد کلستریدیوم کاسته شده و میزان آن کاهش می یابد. اما با ماندگاری بیشتر سوسیس و کاهش میزان نیتريت باقیمانده، کلستریدیوم فرصت رشد بیشتری پیدا کرده و میزان آن افزایش پیدا می کند. نیتريت باعث کاهش رشد باکتری های اسپورزا [۴] و همچنین باعث کاهش رشد باکتری کلستریدیوم بوتولینیوم که باعث تولید سم بوتولیسیم می شود، خواهد شد [۲۱]. گزارش شده با استفاده از ترکیب سه عامل تابش و کاهش فعالیت آبی و کاهش pH در محصولات گوشتی می توان از رشد کلستریدیوم اسپورژنس و استافیلوکوکوس اورئوس جلوگیری کرد و باعث بهبود ایمنی میکروبی از طریق تخریب میکروارگانيسم های پاتوژن گردید و ترکیب این سه هردل باعث ایجاد محصولات گوشتی ایمن می شود [۲۲].



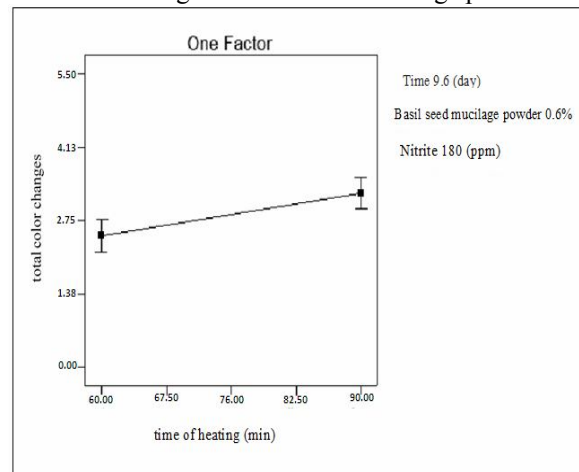
**Fig. 8** Response surface graph of the usage clostridium count with changes in the storage time and nitrite of formulation



**Fig. 5** One factor graph of the total color changes with changes in nitrite



**Fig. 6** One factor graph of the total color changes with changes in Basil seed mucilage powder



**Fig. 7** One factor graph of the total color changes with changes in heating time

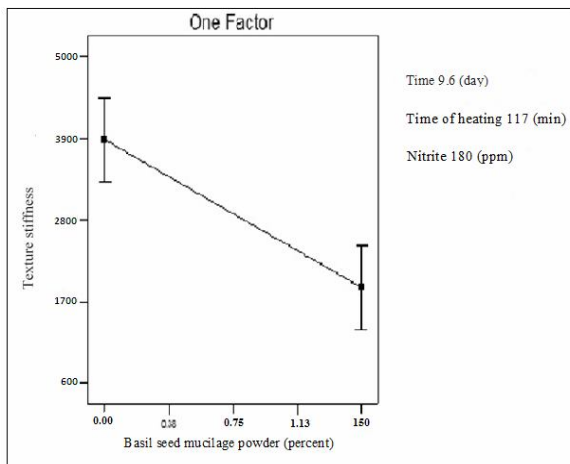
### ۴-۳- شمارش کلستریدیوم پرفرنژنس

در بررسی تغییرات میزان شمارش کلستریدیوم پرفرنژنس، نرم افزار مدل فاکتور متقابل دوگانه را پیشنهاد کرد که نتایج آن در جدول (۴) ارائه شده است. همان طور که در نتایج جدول و معادله (۴) آمده است، اثر مربع نیتريت و زمان نگهداری بر



## ۳-۵- تغییرات بافت

در بررسی تغییرات بافت سوسیس‌های تولیدشده، نرم‌افزار مدل خطی را پیشنهاد کرد که نتایج آن در جدول (۵) ارائه شده است. همان‌طور که از نتایج جدول و معادله (۵) آمده است، تنها اثر افزودن پودر موسیلاژ تخم شربتی بر بافت معنی‌دار بوده و سایر پارامترها دارای تفاوت معناداری در سطح ۵ درصد نمی‌باشند. همان‌گونه که در نمودار سطح پاسخ (شکل ۹) مشاهده می‌شود با افزایش میزان پودر موسیلاژ تخم شربتی میزان سفتی بافت سوسیس کاهش پیدا می‌کند. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که با افزایش زمان نگهداری به علت خروج رطوبت میزان سفتی بافت کاسته می‌شود [۱۳]. این در حالی است که در این تحقیق پارامتر زمان نگهداری معنی‌دار نمی‌باشد. یکی از دلایل کاهش سفتی به دلیل افزایش هیدروکلوئید می‌تواند به دلیل محصور شدن رطوبت توسط آن و تغییر نسبت میزان چربی به رطوبت آزاد باشد که باعث نرم‌تر شدن بافت می‌شود. روسونن و همکاران (۲۰۰۳) بیان کردند که هنگامی که نسبت چربی و رطوبت فرآورده گوشتی برابر باشد، بافت نرم‌تر می‌شود [۲۳].



**Fig. 9** One factor graph of the tissue texture changes with changes in Basil seed mucilage powder

**Table 4** Analysis of variances of the effect of formulation variables on amount of clostridium in sausage samples

p-value	F-value	Sum of square	df	source
0.121	2.10	2238.20	14	Model
0.115	2.97	226.41	1	nitrite -A
0.262	1.41	107.59	1	hydrocolloid (Percent) -B
0.309	1.15	87.47	1	time of heating(min) -C
0.899	0.017	1.27	1	time(day) -D
0.903	0.016	1.18	1	AB
0.777	0.085	6.44	1	AC
0.649	0.22	16.70	1	AD
0.498	0.49	37.62	1	BC
0.702	0.15	11.79	1	BD
0.0533	4.80	365.32	1	CD
0.046	5.16	392.72	1	A2
0.848	0.038	2.92	1	B2
0.390	0.81	61.50	1	C2
0.041	5.48	417.21	1	D2

$$\text{Clostridium count} = +70.4 - 76747.67294 \times 10^{-4} A^2 + 0.083194 D^2 \quad \text{Equation 4}$$

**Table 3** Analysis of variances of the effect of formulation variables on tissue stiffness of susage samples

p-value	F value	Sum of squares	df	Source
0.0335	3.24	1.78×107	4	Model
0.8889	0.020	27588.87	1	nitrite-A
0.0021	12.40	1.71×107	1	hydrocolloid (Percent)-B
0.7142	0.14	1.9×105	1	time of heating(min)-C
0.5316	0.41	5.58×105	1	time(day)-D

$$\text{Texture stiffness} = 4571.03 - 1328.91 B$$

Equation5

پيش بينی کرد که در جدول ۱ مشخص است. در مرحله بعد به توليد سوسيس با توجه به شرايط بهينه پرداخته شد تا با نتايج پيش بينی شده توسط نرم افزار مقايسه شود. همان گونه که ملاحظه می شود نتايج آزمایشات با نتايج پيش بينی شده توسط نرم افزار مطابقت خوبی دارد و در نتیجه اثبات می کند که مدل مناسب بوده و برای تخمین نتايج آزمایش قابل استفاده است.

#### ۴- بهينه سازی و اعتبار سنجی مدل

در روند بهينه سازی میزان نیتريت (۹۵/۳۸ppm)، پودر موسیلاژ تخم شربتی (۰/۷۶ درصد) و زمان حرارت دهی (۱۱۲/۱۵ دقیقه) در محدوده مورد آزمون، زمان نگهداری حداکثر (۲۴ روز)، میزان نیتريت باقیمانده، بار میکروبی، شمارش کلستریدیوم و تغییرات کلی رنگ حداقل در نظر گرفته شد. نرم افزار با انتخاب شرايط بهينه، پارامترهای کیفی سوسيس را

**Table 6** Comparison of model predicted and laboratory measured results

Measured in laboratory	Predicted by the software	
73.79	73.08	L
2.25	3.21	a
16.06	16.22	b
2.3418	2.32	Nitrite remaining
158936	158801	Microbial load
18.2401	18.21	Clostridium

باعث کاهش حدود 30 ppm از میزان نیتريت افزوده شده طبق استاندارد ملی ایران به فرآورده های گوشتی می شود. نتايج آزمایشات با نتايج پيش بينی شده توسط نرم افزار مطابقت خوبی دارد و در نتیجه اثبات می کند که مدل مناسب بوده و برای تخمین نتايج آزمایش قابل استفاده است. نتايج حاصل از تحقیق بیانگر کارایی مفید روش سطح پاسخ در بهينه سازی فرمولاسيون سوسيس با تکنولوژی هردل بود.

#### ۶- تقدیر و تشکر

بدینوسیله از همکاران محترم گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد و از مسئولین محترم کارخانه شقایق سامان (واحد آزمایشگاه و خط تولید) که در مراحل مختلف این پژوهش ما را یاری نمودند، کمال تشکر را داریم.

#### ۵- نتیجه گیری کلی

بررسی نتايج نشان داد با افزایش میزان نیتريت افزوده شده میزان نیتريت باقیمانده افزایش می یابد و باگذشت زمان میزان نیتريت کاهش می یابد. تغییرات کلی رنگ تحت تأثیر میزان نیتريت، پودر موسیلاژ تخم شربتی و زمان حرارت دهی می باشد. شمارش کلستریدیوم تحت تأثیر مربع نیتريت و زمان نگهداری بود. به طوری که کمترین میزان کلستریدیوم در بالاترین غلظت نیتريت حاصل شد. همچنین تنها پارامتر مؤثر بر بافت سوسيس، میزان پودر موسیلاژ تخم شربتی می باشد که افزایش آن از سفتی بافت کاسته می شود. در روند بهينه سازی میزان نیتريت (۹۵/۳۸ ppm)، پودر موسیلاژ تخم شربتی (۰/۷۶ درصد)، زمان حرارت دهی (۱۱۲/۱۵ دقیقه) و زمان نگهداری حداکثر (۲۴ روز) انتخاب شد. که این فرمول بهينه

## ۷- منابع

- of basil seed gum: An overview. Food Hydrocolloids, 73, 313-325.
- [13] Yousefi, A., Moosavi-Nasab, M & Govahian, M. (2013). Investigation and comparison of some physicochemical and sensory properties of produced sausage from minced meat and surimi of Talang Queenfish (*Scomberoides Commersonianus*). Iranian Fisheries Science Research Institute, 22 (1): 157-170.
- [14] ISO 2918. (1975). International standards meat and meat products—determination of nitrite content. Geneva: International organization for standardization.
- [15] Institute of Standards & Industrial Research of Iran. (1995). Nitrite in meat and meat product:923.
- [16] Milani, E., Pourazarang, H., Vatankhah, Sh & Vakilian, H. (2010). Optimization of Inulin Extraction from *Helianthus tuberosus* Using Response Surface Methodology. Iranian Food Science and Technology Research Journal, 6: 176-183.
- [17] Bozkurt, H & Erkmen, O. (2004). Effect of nitrate/nitrite on the quality of sausage during ripening and storage, 84(3): 29-286.
- [18] Sanz, Y., Vila, R., Toldrá, F., Nieto, P. and Flores, J. (1997). Effect of nitrate and nitrite curing salts on microbial changes and sensory quality of rapid ripened sausages. International Journal of food microbiology, 37: 225-229.
- [19] Qvisit, S & Bernbom, N. (2000). Effect of sodium lactat, sodium nitrite, pH and tempreture on grows of listeria monocytogenes. Food Control, 7: 249-252.
- [20] AMSA, American Meat Science Association. (1991). Guidelines for meat color evaluation. In: 44th Annual Reciprocal Meat Conference, June 9-12, 1991, Manhattan, Kans. Chicago, IL: Natl. Livestock and Meat Board: 3-17.
- [21] Cassens, R.G. (1995). Use of sodium nitrite in cured meats today. Food Technology, 49: 72-80.
- [22] Chawla, S. P., Charder, R & Sharam, A. (2004). Shelf-stable natural casing using hurdle technology, Food Control, 15: 169-172.
- [23] Ruusunen, M., Vainionpa, J., Puolanne, E., Lyly, M., La, L., Niemisto, M & Ahvenainen, R. (2003). Effect of sodium citrate, carboxymethyl cellulose and carrageenan leves on quality characteristic of salt and low fat bologna type sausages. Meat Science, 64: 371-381.
- [1] Rokni, N. (1374). Science and industry of meat. Publication of Tehran University, pp: 234-251.
- [2] Mirzaee, H., Hosseyni, H & Rokni, N. (1386). Study on the decreasing curve of nitrite residue in sausages containing 40,60 and 90 percent meat during storage time. 18 National Congress of Food Industry.
- [3] Morissey, P.A & Tichivangana, J.Z. (1985). The antioxidant activities of nitrite and nitrosylmyoglobin in cooked meats. Meat Science, 14: 175-190.
- [4] Cammack, R., Joannou, C.L., Cui, Y., Martinez, C.T., Maraj, S.R & Hughes, M.N. (1999). Nitrite and nitrozyll compounds in food preservation. Biochimica et Biophysica Acta, 1411: 475-488.
- [5] Deda, M.S., Bloukas, J.G & Fista, G.A. (2007). Effect of tomato paste and nitrite level on processing and quality characteristics of frankfurters. Meat Science, 76: 501-508
- [6] Peg, B.R & Shahidi, F. (2000). Nitrite curing of meat. The N-nitrosamine problem and nitrite alternatives. Trumbull, Connecticut: Food & Nutrition Press, Inc.
- [7] Sofos, J.N & Busta, F.F. (1980). Alternatives to the use of nitrite as an antibotulinal agent. Food Technology, 31(5): 244-250.
- [8] Kanatt, S.R., Chander, R & Sharma, A. (2008). Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and products, food chemistry, 107: 845-852.
- [9] De oliveria, T & Soraes, E.R. (2011). Activity of saturej a montanal essential oil aqainst *clostridium perfreqenes* type a incalated in mortadelia type sussaage formulated whit different level nitrite sodium. food microbiology, 144: 546-555.
- [10] Vladimir, S., Kurčić Pavle, Z., Mašković Jelena, M., Vujić Danijela, V., Vranić Slavica, M., Vesković-Moračanin Đorđe, G & Okanović Slobodan, V. (2014). Antioxidant and antimicrobial activity of Kitaibelia vitifolia extract as alternative to the added nitrite in fermented dry sausage. Meat Science, 97: 459-467.
- [11] Hosseini-Parvar, S., Matia-Merino, L., Goh, K., Razavi, S., & Mortazavi, S. (2010). Steady shearflow behavior of gum extracted from *Ocimum basilicum* L. seed: Effect of concentration and temperature.
- [12] Naji-Tabasi, S., Razavi S.M.A. (2017). Functional properties and applications

## Nitrit reduction of the sausage formulation by optimization of water activity and time of heating as hurdles

Kabiri, F. <sup>1</sup>, Jahanbakhshian, N. <sup>2\*</sup>, Khakbaz Heshmati, M. <sup>3</sup>

1. M.Sc Graduated, Department of Food Science, Faculty of Agriculture, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Food Science, Faculty of Agriculture, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Food Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

(Received: 2017/06/24 Accepted:2017/11/20)

Regarding the high sensitivity of the current consumption of nitrite in processed meat products, in order to reduce nitrite in sausage formulation in this study, the hurdle effects of heating time, basil seed mucilage and sodium nitrite were investigated during preserving time on qualitative characteristics of 40% sausage by RSM method. At first section, the effect of different hurdles ( nitrite at the range of 0-300 ppm, basil seed mucilage 0-1.5% (W/W) and heating time 105-135 min) on qualitative characteristics of sausage including residual nitrite, color and the number of *Clostridium Perfringens* and texture were investigated. In the second part, the optimization and the validity of developed model were performed. The results indicated that the amount of residual nitrite decreased by increasing preservation and storage time (due to the reaction between nitrite and myoglobin and the formation of nitrosomyoglobin complex). Overall changes are influenced by nitrite amount, basil seed mucilage, and heating time. Chlorostidium number was influenced by nitrite square and preservation time, so that the lowest *Clostridium Perfringens* amount was acquired at the highest nitrite concentration. Also the only effective parameter on the sausage texture was basil seed mucilage. By increasing of mucilage content hardness of sausage was decreased. For optimization, the formulation with 95.38 ppm nitrite, 0.76% basil seed mucilage, the heating time of 112.15 minute at the preservation time of (24 days) was selected. Applying this formula lead to decrease at about 30ppm of the added nitrite- based on Iran national standard. The theoretical results of model and the experimental data were in the great agreement so RSM could be useful for modeling and optimization of such processes.

**Key words:** Basil seed powder, Hurdle technology, Nitrit, Response surface methodology, Sausage.

---

\*Corresponding Author E-Mail Address: njahanbakhshian@yahoo.com