کاهش میزان نیتریت فرمولاسیون سوسیس با استفاده از بهینه سازی هردل‌های فعالیت آبی و مدت زمان فرایند حرارتی

فاطمه کبیری [۱]، نفیسه جهان بخشیان [۲*]، مریم خاکباز حشمتی [۳]

۱- دانش آموخته 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: ۹٦/۰٤/۰۳ تاریخ پذیرش: ۹٦/۰۸/۲۹)

چکیده

با توجه به حساسیت بالایی که در حال حاضر در رابطه با میزان مصرف نیتریت در محصولات فراوری شده گوشتی وجود دارد، جهت کاهش مصرف میزان نیتریت فرمولاسیون سوسیس، در این تحقیق با استفاده از روش سطح پاسخ اثر همزمان سه هردل زمان حرارت دهی، کاهش فعالیت آبی (توسط پودر موسیلاژ تخم شربتی) و میزان نیتریت سدیم طی مدت زمان ماندگاری بر خواص کیفی سوسیس ٤۰ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. در بخش اول این مطالعه اثر هردل‌های مختلف (میزان نیتریت صفر تا ۳۰۰ppm و پودر موسیلاژ تخم شربتی صفر تا ۱/۵ درصد وزنی/وزنی و زمان حرارت دهی ۱۰۵ تا ۱۳۵ دقیقه) بر خواص کیفی سوسیس شامل نیتریت باقیمانده، رنگ، شمارش *کلستریدیوم پرفرنژنس* 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 نیتریت سدیم اولیه، درصد قابل‌توجهی از آن، با افزایش زمان حرارت دهی و زمان نگهداری کاهش می‌یابد (به دلیل واکنش بین نیتریت و میوگلوبین گوشت و تشکیل کمپلکس نیتریت-هم نیتروزومیوگلوبین). تغییرات کلی رنگی تحت تأثیر میزان نیتریت، پودر موسیلاژ تخم شربتی و زمان حرارت دهی می‌باشد. شمارش کلستریدیوم تحت تأثیر مربع نیتریت و زمان نگهداری بود. به طوری که کمترین میزان کلستریدیوم در بالاترین غلظت نیتریت حاصل شد. همچنین تنها پارامتر مؤثر بر بافت سوسیس، میزان پودر موسیلاژ تخم شربتی می‌باشد که با افزایش آن از سفتی بافت کاسته می‌شود. در بخش بهینه سازی، فرمولاسیون سوسیس با میزان نیتریت (۹۵/۳۸ ppm)، پودر موسیلاژ تخم شربتی (۰/۷٦ درصد)، زمان حرارت دهی (۱۱۲/۱۵ دقیقه) و زمان نگهداری حداکثر (۲٤ روز) انتخاب شد؛ که این فرمول بهینه باعث کاهش حدود ۳۰ ppm از میزان نیترات 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 فرمولاسیون سوسیس با تکنولوژی هردل بود.

کلید واژگان: پودر موسیلاژ تخم شربتی، تکنولوژی هردل، روش سطح پاسخ، سوسیس، نیتریت.

* مسئول مکاتبات: njahanbakhshian@yahoo.com

۱- مقدمه

منطبق با استاندارد ملی ایران، عنوان سوسیس و کالباس منحصراً به نوعی از فراورده‌های 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]. ازجمله 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 آنتی اکسیدان‌ها استفاده می‌شود که یکی از دلایل استفاده از نیتریت سدیم نیز در فرآورده‌های گوشتی نقش آنتی‌اکسیدانی آن می‌باشد [۳]. به طور کلی می‌توان بیان کرد، نیتریت 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 ازجمله کاهش میزان مصرف نیتریت، استفاده از جایگزینی برای نیتریت، استفاده از عوامل مسدود کننده ترکیبات سرطان‌زا و کنترل نیتریت باقیمانده وجود دارد [٤ و ٥ و ٦]. اما دلایل متعدد پر اهمیت‌تری از پائین آوردن میزان نیتروزآمین‌ها وجود دارد، ازجمله خطر مسمومیت غذایی ناشی از بوتولیسم، که ممکن است در اثر حذف نیتریت‌ها مخصوصاً در گوشت‌های عمل‌آمده رخ دهد، بنابراین تلاش محققان در راستای کاهش بیش از پیش این ماده در فرمولاسیون محصولات گوشتی فراوری شده ادامه دارد [٦].

طبق مطالعات انجام شده بهترین و مؤثرترین روش، کاهش مستقیم نیتریت در محصولات گوشتی می‌باشد. تا به امروز اکثر تحقیقات انجام شده در جهت یافتن جایگزینی ایمن و مناسب برای نیتریت و نیز استفاده از عوامل مسدود کننده ترکیبات سرطان‌زا بوده است [۷ و ۸ و ۹]. اما در ارتباط با کاهش مصرف نیتریت 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 فراوری 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 محصولات گوشتی عامل خطرزای اصلی، باکتری *کلستریدیوم 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 هیدروکلوئید 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 نیتریت و نیز دستیابی به فرمولاسیونی بهینه که دارای بالاترین ویژگی‌های کیفی نیز باشد، هدف از این پژوهش کاهش میزان مصرف نیتریت 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 خرده 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 نیتریت طبق فرمولاسیون‌های ذکر شده اضافه شد و جهت کاهش فعالیت آبی نیز از پودر موسیلاژ تخم شربتی استفاده شد. بعد از آن

خمیر آماده شده در پوشش کالباس به‌صورت دستی پر شد و تحت دماها و زمان‌های مورد نظر تحت فرایند پخت قرار گرفت [۱۳].

۲-۲-آزمونهای فیزیکوشیمیایی و میکروبی

۲-۲-۱- اندازه گیری نیتریت

برای اندازه گیری مقدار نیتریت در نمونه سوسیس از استاندارد ملی ایران به شماره ۱۰۲۸ که برگردان فارسی بدون تغییر از استاندارد ایزو، می‌باشد، استفاده گردید. منظور از مقدار نیتریت در گوشت و فرآورده‌های آن، مقدار نیتریتی است که بر اساس روش ارائه شده تعیین و بر حسب میلی گرم نیتریت در یک کیلوگرم نمونه (قسمت در میلیون) بیان می‌شود. اصول این روش عبارت است از استخراج آزمونه با آب داغ، رسوب دادن پروتئین‌ها، صاف کردن، افزودن سولفانیل آمید، N- آلفانفتیل دی هیدروکلراید به مایع صاف شده در حضور نیتریت که باعث گسترش یک رنگ قرمز شده که در نهایت با روش اندازه گیری فتومتری در طول موج ۵۳۸ نانومتر اندازه گیری می‌شود. ابتدا ۱۰ گرم از نمونه با دقت ۰/۰۰۱ ± 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 (۱۰٦ گرم فروسیانید پتاسیم که در Iسپس 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 IIکارز 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 می‌شد 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 نیتریت صاف گردید. جهت اندازه گیری رنگ، ۲۵ میلی لیتر از محلول صاف شده را به وسیله پیپت، به بالن حجمی ۱۰۰ میلی لیتری انتقال داده و تا رسیدن به حجم ٦۰ میلی لیتر، آب مقطر اضافه گردید. سپس (۲ گرم سولفانیل آمید در ۸۰۰ I۱۰ 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 ٦ میلی لیتر محلول شماره ۳ (٤٤۵ میلی لیتر اسید هیدروکلریک غلیظ 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 ۱ -N(۰/۲۵ 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 نیتریت نمونه محاسبه گردید و بر حسب میلی گرم نیتریت سدیم در هر کیلوگرم با استفاده از این فرمول گزارش گردید [۱٤].

$$NaNO2=C\times\frac{2000}{m\times v}$$

۲-۲-۲- اندازه گیری رنگ

رنگ مهمترین پارامتری است که نشانگر کیفیت ماده غذایی می‌باشد. اندازه گیری رنگ با استفاده از دستگاه هانترلب (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 می‌کند.

Equation 1

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

۲-۲-۳- شمارش *کلستریدیوم پرفرنژنس* (ولشای)

شمارش *کلستریدیوم پرفرنژنس* بر اساس استاندارد شماره ۸۹۲۳ صورت گرفت. مقدار ۱۰ گرم از نمونه همگن شده به ۹۰ میلی‌لیتر آب پپتون استریل اضافه گردید و سری رقت‌های متوالی آماده‌سازی شد. سپس نمونه‌ها جهت قرار گرفتن رد معرض شوک حرارتی، به مدت ۱۰ دقیقه در حمام بن ماری ٦۵-٦۰ درجه سلسیوس قرار گرفته و سپس لوله‌ها سرد شدند. به دنبال تهیه رقت‌ها، کشت میکروبی با استفاده از روش پور پلیت انجام گردید و سپس محیط‌ها به مدت ٤۸ ساعت در جار بی‌هوازی و در گرمخانه ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند. پلیت شاهد به مدت ٤۸ ساعت در شرایط هوازی در گرمخانه ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از مدت زمان مذکور، شمارش کلونی‌های سیاه صورت گرفت. میانگین کلونی‌هایی

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

۲-۲-٤- اندازه گیری بافت

از آزمون TPA با استفاده از دستگاه بافت سنج (Brook Field 30-3,Texture analyser) به‌منظور 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 سانتی متر لحاظ شد و سفتی بافت بر حسب نیوتن گزارش شد.

۲-۳- تجزیه و تحلیل آماری

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها با توجه به درصدهای به دست‌آمده از تست‌های اولیه، حد بالا و پایین متغیرها به دست آمد، سپس با استفاده از نرم افزار دیزاین اکسپرت (Design Expert V 9.0) روش سطح پاسخ انتخاب و در سطح احتمال ۰/۹۵ بررسی‌ها انجام شد. در این طرح، نیتریت در محدوده صفر تا ۳۰۰ ppm، هیدروکلوئید در محدوده صفر تا ۱/۵ درصد (وزنی/وزنی)، زمان حرارت دهی در محدوده ۱۳۵-۱۰۵ دقیقه و زمان نگهداری در محدوده صفر تا ۲٤ روز انتخاب شده است. کلیه تست‌ها با دو تکرار انجام شده و میانگین آن‌ها در طرح RSM 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

۲-٤-اندازه گیری فعالیت آبی

برای اندازه گیری فعالیت آبی از دستگاه هیگرومتر استفاده شد. فعالیت آبی نمونه‌های خمیر سوسیس در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی گراد اندازه گیری شدند. برای نمونه‌های خمیر، مقداری خمیر در ظرف مخصوص نمونه قرار داد شد و پروپ دستگاه بر روی آن قرار گرفت تا کاملاً درز بندی شود.

۳- نتایج و بحث

به‌منظور بهینه سازی شرایط فرآیند تولید سوسیس، اثر متغیرهای مستقل شامل A میزان نیتریت (ppm)، B هیدروکلوئید (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 ذکرشده Y پاسخ پیش‌بینی شده، β0 ضریب ثابت، βa، βb، βc اثرات خطی، βaa، βbb، βcc اثرات مربعی و βab، βac، βbc اثرات متقابل می‌باشند.

$$Y=\beta_0+\beta_aA+\beta_bB+\beta_cC+\beta_{aa}A^2+\beta_{bb}B^2+\beta_{cc}C^2+\beta_{ab}AB+\beta_{ac}AC+\beta_{bc}BC$$

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 [۱٦].

۳-۱- اندازه گیری فعالیت آبی

شکل ۱ تغییرات میزان فعالیت آبی خمیر سوسیس با درصدهای مختلف پودر موسیلاژ تخم شربتی را نشان می‌دهد. همان گونه 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 هردل 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.

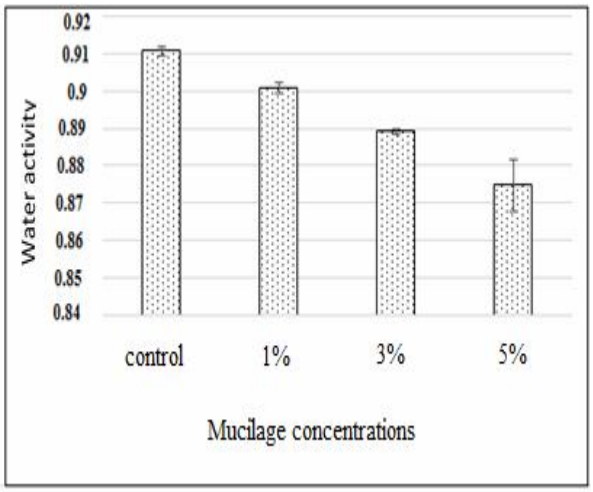

Fig. 1 Changes in water activity with variations in the amount of Basil seed mucilage powder

۳-۲- نیتریت باقی‌مانده در سوسیس

یکی از مهم‌ترین مسائل مربوط به افزودنی‌ها مخصوصاً نیترات و نیتریت خطر سرطان‌زایی آن‌ها می‌باشد. واکنش اسید نیترو که به‌وسیله شکستن نیتریت تولید می‌شود با آمین‌های نوع دوم تولید نیتروزآمین می‌کند. بنابراین دانشمندان تصمیم به حذف نیترات و نیتریت و جایگزین نمودن آن با ماده و یا موادی دیگر نموده‌اند. اما دلایل متعدد پر اهمیت‌تری از پائین آوردن میزان نیتروزآمین‌هاوجود دارد، ازجمله خطر مسمومیت غذایی ناشی از بوتولیسم، که ممکن است در اثر حذف نیتریت‌ها مخصوصاً در گوشت‌های عمل‌آمده رخ دهد، بنابراین تلاش محققان در راستای کاهش بیش از پیش این ماده در فرمولاسیون محصولات گوشتی فراوری شده ادامه دارد [٦].

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 (نیتریت 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 معنی‌دار شده‌اند که این مطلب با بررسی p جداول مشخص می‌شود. برای تهیه معادله در سطح اطمینان ۹۵ درصد، مواردی که $p<۰/۰۵$ و برای سطح اطمینان ۹۰ درصد مواردی که $p<۰/۱$ دارند در مدل استفاده می‌شوند. همان‌طور که در نتایج این جدول و معادله (۲) آمده است، اثر میزان نیتریت، زمان

نگهداری، زمان فرایند حرارتی، اثر متقابل نیتریت-زمان نگهداری، نیتریت-زمان فرآیند حرارتی و زمان فرآیند حرارتی-زمان نگهداری بر میزان نیتریت معنی‌دار است (در سطح ۵ درصد).

در نمودارهای سطح پاسخ (اشکال ۲ تا ٤) مشاهده می‌شود با افزایش میزان نیتریت افزوده شده میزان نیتریت باقیمانده افزایش می‌یابد. همچنین با افزایش زمان فرآیند حرارتی و زمان نگهداری در بالاترین میزان نیتریت سدیم افزوده شده، نیتریت باقیمانده کاهش می‌یابد، به طوری‌که در بالاترین زمان نگهداری و زمان فرآیند حرارتی کمترین میزان نیتریت باقیمانده را خواهیم داشت. در سوسیس تولید شده با ۱۸۰ppm نیتریت سدیم و میزان ۰/٦ درصد پودر موسیلاژ تخم شربتی در تمامی زمان‌های فرآیند حرارتی، با افزایش زمان نگهداری میزان نیتریت باقیمانده کاسته می‌شود. میزان تشکیل نیتروز آمین‌ها با مجذور غلظت نیتریت سدیم موجود در فرآورده، رابطه مستقیم دارد. از این رو، با کاهش حتی مقدار کمی نیتریت سدیم افزوده شده، می‌توان تشکیل نیتروزآمین‌ها را به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش داد. حداقل نیتریت سدیم مورد نیاز برای جلوگیری از رشد *کلستریدیوم بوتولینیوم* در محصولات گوشتی عمل‌آوری بین ٤۰ تا ۸۰ پی پی‌ام می‌باشد [۱۷و۱۸و۱۹].

نتایج به دست‌آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که با توجه به افزودن نیتریت سدیم اولیه، درصد قابل‌توجهی از آن، با افزایش زمان حرارت دهی و زمان نگهداری کاهش می‌یابد. دلیل این افت را می‌توان به واکنش بین نیتریت و میوگلوبین گوشت و تشکیل کمپلکس نیتریت-هم نیتروزومیوگلوبین نسبت داد که عامل اصلی ایجاد رنگ سرخ گوشت‌های عمل‌آوری شده است. هر اندازه، میزان گوشت فراورده‌ها بیشتر باشد، به دلیل وجود میوگلوبین بیشتر در محیط، نیتریت سدیم بیشتری با آن ترکیب و از محیط حذف می‌شود در نتیجه میزان باقیماندهٔ نیتریت سدیم، کمتر است [۱۸].

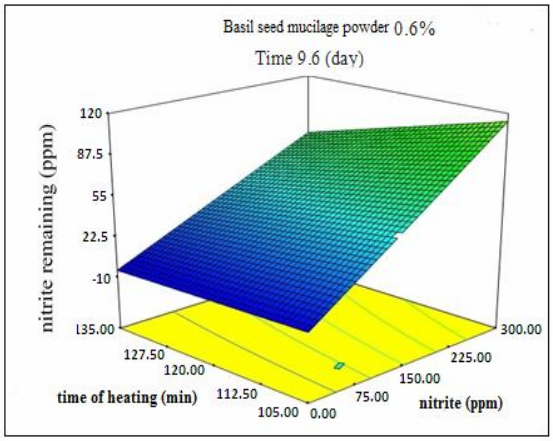

Fig. 2 Response surface graph of the susage residual nitrite with changes in the heating time and nitrite of formulation

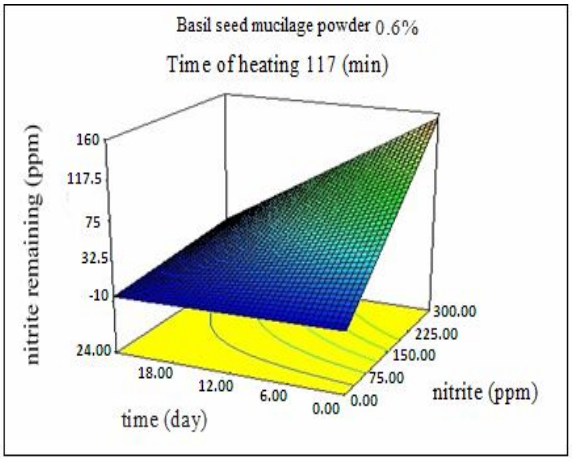

Fig. 3 Response surface graph of the susage residual nitrite with changes in the storage time and nitrite of formulation

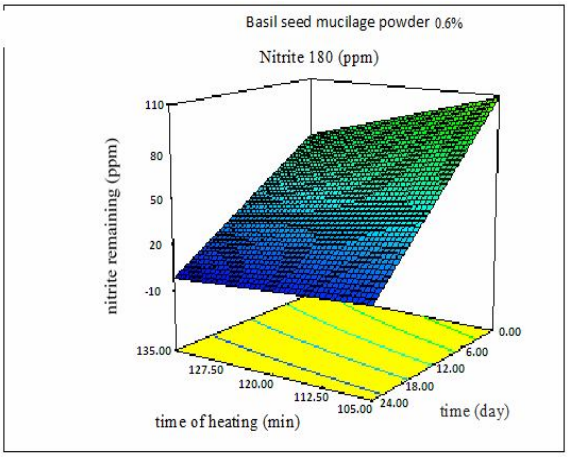

Fig. 4 Response surface graph of the susage residual nitrite with changes in the heating and storage time

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

Nitrite residual =38.20+40.43A -10.77C -36.14D -9.49AC -35.22AD +7.62CD

۳-۳- تغییرات کلی رنگ (ΔE)

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 نیتریت، پودر موسیلاژ تخم شربتی و مدت‌زمان 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 نیتریت افزایش پیدا می‌کند. همچنین با افزایش میزان پودر موسیلاژ تخم شربتی و زمان حرارت دهی تغییرات کلی رنگ سوسیس افزایش می‌یابد (اشکال ٦و 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 با افزایش زمان نگهداری فرآورده‌های گوشتی در طی انبارمانی رنگ دچار تغییر می‌شود و تغییرات کلی رنگ افزایش می‌یابد [۱۳و۲۰]. این در حالی است که در این تحقیق با افزایش زمان نگهداری تغییرات کلی رنگ دچار تغییرات معناداری نشد. نتایج دالئوریا و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد تغییرات کلی رنگ سوسیس‌های تولید شده با افزایش میزان نیتریت افزایش پیدا می‌کند. زیرا نیتریت نقش مهمی در رنگ فرآورده‌های گوشتی ایفا می‌کند. نتایج ددا و همکاران (۲۰۰۷) نشان داد افزایش میزان نیتریت باعث تغییرات پارامترهای رنگی می‌شود. همچنین از آنجایی‌که پودر موسیلاژ تخم شربتی بکار رفته در فرمولاسیون سوسیس باعث تغییر در هر سه پارامتر اصلی رنگ شامل L* و b* و a* می‌شود دور از انتظار نیست که هم افزایی این سه شاخص در فرمول محاسبه تغییرات کلی رنگ باعث افزایش میزان این پارامتر رنگی شود.

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

ΔE = -1.4+06532.42490×10-3A+1.161875B+0.026701C

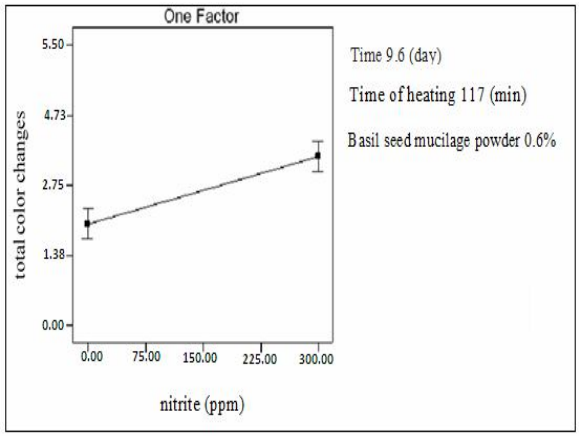

Fig. 5 One factor graph of the total color changes with changes in nitrite

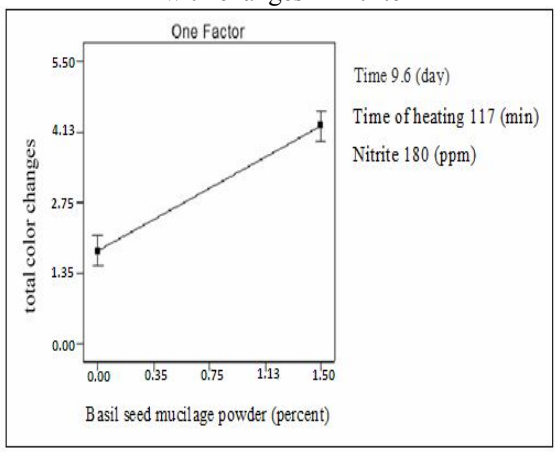

Fig. 6 One factor graph of the total color changes with changes in Basil seed mucilage powder

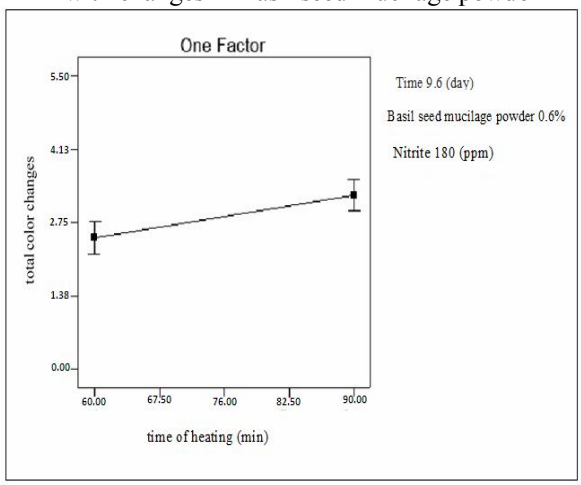

Fig. 7 One factor graph of the total color changes with changes in heating time

۳-٤- شمارش *کلستریدیوم پرفرنژنس*

در بررسی تغییرات میزان شمارش *کلستریدیوم پرفرنژنس*، نرم‌افزار مدل فاکتور متقابل دوگانه را پیشنهاد کرد که نتایج آن درجدول (٤) ارائه شده است. همان‌طور که در نتایج جدول و معادله (٤) آمده است، اثر مربع نیتریت و زمان نگهداری بر میزان بار میکروبی سوسیس در سطح ۵ درصد معنی‌دار می‌باشد. همان‌گونه که در نمودار سطح پاسخ (شکل ۸) مشاهده می‌شود تأثیر زمان نگهداری و نیتریت برشمارش کلستریدیوم سوسیس‌های تولید شده با تکنولوژی هردل نشان می‌دهد با افزایش میزان نیتریت میزان کلستریدیوم ابتدا افزایش و سپس کاهش می‌یابد به طوری که در روز صفر شاهد کمترین میزان کلستریدیوم در سوسیس تولید شده با بالاترین میزان نیتریت بودیم.

با افزایش زمان نگهداری سوسیس میزان کلستریدیوم ابتدا کاهش و در روزهای پایانی روندی افزایشی داشت. چنین اتفاقی به دلیل تغییر میزان نیتریت باقیمانده سوسیس در طول زمان نگهداری می‌باشد. از آنجایی که در روزهای ابتدایی نگهداری سوسیس میزان نیتریت بالا بوده و به تبع آن خاصیت ضد میکروبی سوسیس بالا می‌باشد تا حد زیادی از رشد کلستریدیوم کاسته شده و میزان آن کاهش می‌یابد. اما با ماندگاری بیشتر سوسیس و کاهش میزان نیترات باقیمانده، کلستریدیوم فرصت رشد بیشتری پیدا کرده و میزان آن افزایش پیدا می‌کند. نیتریت باعث کاهش رشد باکتری‌های اسپورزا [٤]. و همچنین باعث کاهش رشد باکتری *کلستریدیوم بوتولینیوم* که باعث تولید سم بوتولیسم می‌شود، خواهد شد [۲۱]. گزارش شده با استفاده از ترکیب سه عامل تابش و کاهش فعالیت آبی و کاهش pH در محصولات گوشتی می‌توان از رشد *کلستریدیوم اسپورژنس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* جلوگیری کرد و باعث بهبود ایمنی میکروبی از طریق تخریب میکروارگانیسم‌های پاتوژن گردید و ترکیب این سه هردل باعث ایجاد محصولات گوشتی ایمن می‌شود [۲۲].

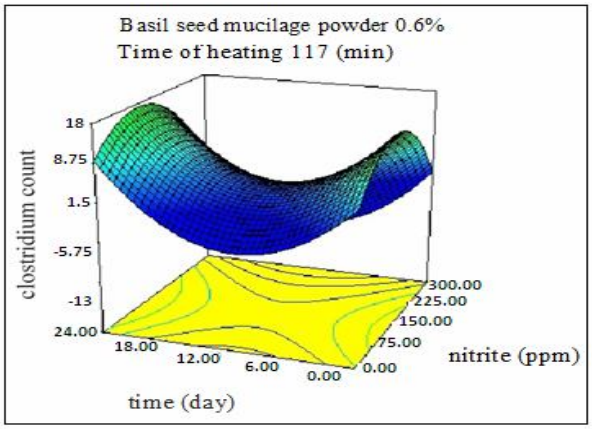

Fig. 8 Response surface graph of the susage clostridium count with changes in the storage time and nitrite of formulation

۳-۵- تغییرات بافت

در بررسی تغییرات بافت سوسیس‌های تولیدشده، نرم‌افزار مدل خطی را پیشنهاد کرد کـه نتـایج آن در جـدول (۵) ارائـه شـده است. همان طور که از نتایج جدول و معادله (۵) آمـده اسـت، تنها اثر افزودن پودر موسیلاژ تخم شربتی بر بافت معنی‌دار بوده و سایر پارامترها دارای تفـاوت معنـاداری در سـطح ۵ درصـد نمی‌باشند. همان‌گونه کـه در نمـودار سـطح پاسـخ (شـکل ۹) مشاهده می‌شود با افزایش میزان پـودر موسـیلاژ تخـم شـربتی 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]. ایـن در حـالی است که در این تحقیق پارامتر زمان نگهداری معنی‌دار نمـی‌باشـد. یکـی از دلایـل کـاهش سـفتی بـه دلیـل افـزایش 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 کردنـد که هنگامی که نسبت چربی و رطوبت فـرآورده گوشـتی برابـر باشد، بافت نرم‌تر می‌شود [۲۳].

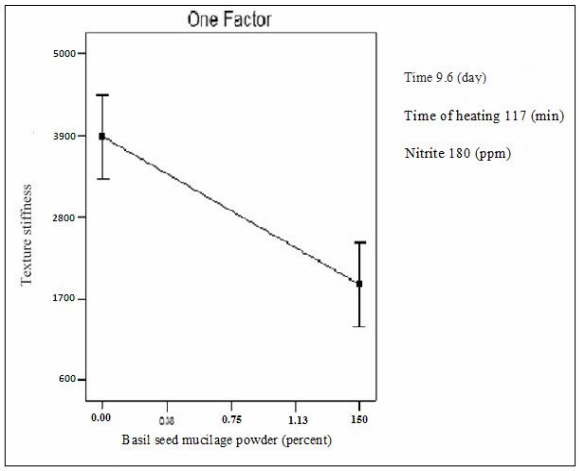

Fig. 9 One factor graph of the tissue texture changes with changes in Basil seed mucilage powder

Table 4 Analysis of variances of the effect of formulation variables on amount of clostridium in susage 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

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

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

Texture stiffness= 4571.03 – 1328.91 B **Equation5**

٤- بهینه‌سازی و اعتبار سنجی مدل

در روند بهینه‌سازی میزان نیتریت (۹۵/۳۸ppm)، پودر موسیلاژ تخم شربتی (۰/۷٦ درصد) و زمان حرارت دهی (۱۱۲/۱۵ دقیقه) در محدوده مورد آزمون، زمان نگهداری حداکثر (۲٤ روز)، میزان نیتریت باقیمانده، بار میکروبی، شمارش کلستریدیوم و تغییرات کلی رنگ حداقل در نظر گرفته شد. نرم‌افزار با انتخاب شرایط بهینه، پارامترهای کیفی سوسیس را پیش‌بینی کرد که در جدول ۱ مشخص است. در مرحله بعد به تولید سوسیس با توجه به شرایط بهینه پرداخته شد تا با نتایج پیش‌بینی‌شده توسط نرم‌افزار مقایسه شود. همان‌گونه که ملاحظه می‌شود نتایج آزمایشات با نتایج پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار مطابقت خوبی دارد و درنتیجه اثبات می‌کند که مدل مناسب بوده و برای تخمین نتایج آزمایش قابل‌استفاده است.

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

٥- نتیجه‌گیری کلی

بررسی نتایج نشان داد با افزایش میزان نیتریت افزوده شده میزان نیتریت باقیمانده افزایش می‌یابد و باگذشت زمان میزان نیتریت کاهش می‌یابد. تغییرات کلی رنگ تحت تأثیر میزان نیتریت، پودر موسیلاژ تخم شربتی و زمان حرارت دهی می‌باشد. شمارش کلستریدیوم تحت تأثیر مربع نیتریت و زمان نگهداری بود. به‌طوری‌که کمترین میزان کلستریدیوم در بالاترین غلظت نیتریت حاصل شد. همچنین تنها پارامتر مؤثر بر بافت سوسیس، میزان پودر موسیلاژ تخم شربتی می‌باشد که افزایش آن از سفتی بافت کاسته می‌شود. درروند بهینه‌سازی میزان نیتریت (۹۵/۳۸ ppm)، پودر موسیلاژ تخم شربتی (۰/۷٦ درصد)، زمان حرارت دهی (۱۱۲/۱۵ دقیقه) و زمان نگهداری حداکثر (۲٤ روز) انتخاب شد. که این فرمول بهینه باعث کاهش حدود 30 ppm از میزان نیترات افزوده شده طبق استاندارد ملی ایران به فرآوردههای گوشتی می‌شود. نتایج آزمایشات با نتایج پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار مطابقت خوبی دارد و درنتیجه اثبات می‌کند که مدل مناسب بوده و برای تخمین نتایج آزمایش قابل‌استفاده است. نتایج حاصل از تحقیق بیانگر کارایی مفید روش سطح پاسخ در بهینه‌سازی فرمولاسیون سوسیس با تکنولوژی هردل بود.

٦-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.

۷- منابع

[1] Rokni, N. (1374). Science and industry of meat. Publication of Tehran University, pp: 234-251.

[2] Mirazaee, 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 nitrozyl 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 *clostrodium perfreqenes* type a incalated in mortadelia type sussaqe formulated whit different level nitrite sodium. food microbiology, 144: 546-555.

[10] Vladimir, S., Kurćubić 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 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 Commersonnianuus). Iranian Fisheries Science Research Institute, 22 (1): 157-170.

[14] ISO 2918. (1975). International standards meat and meat products–determination of nitrite content. Geneve: 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.

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

Kabiri, F. [1], Jahanbakhshian, N. [2*], Khakbaz Heshmati, M. [3]

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 preservating 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 texure 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