

بهینه سازی تولید نیتروزوهم در شرایط آزمایشگاهی به منظور حذف نیتريت از فرآورده های گوشتی

نفيسه سلطانی زاده (دانشجوی دکترا، دانشگاه صنعتی اصفهان)

*N\_soltanizadeh@ag.iut.ac.ir*

دکتر مهدی کدیور

*kadivar@cc.iut.ac.ir*

## چکیده

یکی از عملکردهای اصلی نیتريت ایجاد رنگ صورتی در فرآورده های عمل آوری شده است. نیتريت پس از واکنش با آمین های نوع دوم و سوم، موجب شکل گیری نیتروز آمین سرطانزا می شود. بمنظور حذف نیتريت از فرآورده های گوشتی و در عین حال تولید رنگ صورتی مناسب در آن می توان واکنش های تشکیل رنگ را در شرایط آزمایشگاهی انجام داده و سپس رنگیزه حاصل را به فرآورده گوشتی افزود. در این آزمون اثر سه متغیر مقدار نیتريت سدیم، مقدار آسکوربات و درصد اسید کلریدریک، هر یک در سه سطح بر میزان تولید نیتروزوهم بررسی شد. به طور کلی افزایش سه عامل درصد اسید کلریدریک، غلظت اسید آسکوربیک و نیتريت، راندمان را افزایش داده به گونه ای که در برخی موارد راندمان به ۱۰۰٪ افزایش یافت. با افزایش میزان نیتروزوهم، طول موج مربوط به حداکثر جذب در طول موج های بلندتر دیده شد. کلیه این ویژگی ها رنگدانه سنتز شده را جایگزین مناسبی برای نیتريت بمنظور استفاده در فرآورده های گوشتی می سازد.

## کلمات کلیدی

نیتروزوهم، راندمان، بهینه سازی، نیتريت، اسید آسکوربیک

## ۱. مقدمه

عمل آوری گوشت عبارت است از افزایش زمان ماندگاری گوشت با استفاده از مواد نگهدارنده شیمیایی از قبیل نمک، نیتريت، نیترات و شکر و ایجاد تغییرات در کیفیت ارگانولپتیک آن از طریق تاثیر این مواد بر روی اجزاء ترکیبی گوشت و بهبود طعم و بوی فرآورده به وسیله ادویه‌ها و چاشنی‌ها [۷]. نیتريت سدیم به عنوان ترکیبی ضد میکروبی از رشد کلاستریدیوم بوتولینم جلوگیری کرده و از این رو مانع از تولید سم کشنده آن می‌گردد. این ترکیب همچنین به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل نموده و بنابراین عطر و طعم آشنای گوشت‌های عمل‌آوری شده را از طریق مکانیزم‌های تشکیل کمپلکس و حذف *warmed over flavor* ایجاد می‌کند. دیگر عملکرد اصلی نیتريت به عنوان ترکیب عمل‌آورنده، ایجاد رنگ صورتی در فرآورده‌های عمل‌آوری شده است [۱۱]. شیمی تشکیل رنگ عمل‌آوری پیچیده بوده، با تولید ترکیبات نیتروزه کننده آغاز شده و با ایجاد نیتروزیل میوگلوبین پایان می‌یابد.

با وجود محاسن ذکر شده برای نیتريت، خطرات بالقوه آن نیز باید مورد توجه قرار گیرد. نیتريت در غلظت‌های بالا سمی است و موجب شکل‌گیری نیتروزآمین سرطانزا می‌شود. این ترکیب می‌تواند میزان ویتامین A را در کبد کاهش داده و در عملکرد تیروئید اختلال ایجاد نماید. نیتريت همچنین می‌تواند هموگلوبین و مت‌هموگلوبین را اکسید کرده و توانایی خون را برای انتقال اکسیژن کاهش دهد [۸]. این ترکیب قادر به واکنش با آمین‌های نوع دوم و سوم است و این واکنش می‌تواند در حین پخت و یا هضم در *pH* پائین معده نیز رخ دهد. [۲۱]. علیرغم نگرانی‌های موجود در مورد حضور نیتريت در گوشت‌های عمل‌آوری شده، صنعت فرآورده‌های گوشتی هنوز جایگزین مناسبی برای آن نیافته است. از آن جایی که سرعت و بنابراین مقدار تولید *N*-نیتروزآمین به مربع غلظت نیتريت باقی مانده در فرآورده‌های گوشتی بستگی دارد، کاهش مقدار نیتريت در فرآورده‌های گوشتی شاخص مؤثری در کاهش خطر شکل‌گیری *N*-نیتروزآمین خواهد بود. از سوی دیگر ترکیباتی نیز وجود دارند که شکل‌گیری نیتروزآمین را کاهش خواهند داد به گونه‌ای که تا کنون آسکوربات سدیم و اریتروبات سدیم در این زمینه مورد توجه قرار گرفته‌اند.

بهترین روش برای حل مشکل شکل‌گیری *N*-نیتروزآمین در فرآورده‌های گوشتی یا طی هضم در بدن، حذف کامل نیتريت و نیترات از فرایندهای عمل‌آوری است. بنابراین یافتن جایگزینی که دارای همه خصوصیات نیتريت باشد، هدف مناسبی خواهد بود. *Sweet* (۱۹۷۵) استفاده از مخلوط عمل‌آوری بدون نیتريت را پیشنهاد داد که در آن از یک ترکیب رنگی، یک ترکیب آنتی‌اکسیدان و یک ماده ضدباکتریایی به همراه سایر مواد مورد نیاز در عمل‌آوری استفاده شده بود [۲۰]. در مجموعه‌ای از تحقیقات که توسط *Shahidi* و *Pegg* (۱۹۸۵، ۱۹۹۱، ۱۹۹۲، ۱۹۹۵، *a*، ۱۹۹۵) انجام گرفت از این روش استفاده گردید اما ماده رنگی، پیگمان عمل‌آوری شده‌ای بود که در خارج از مخلوط گوشت شکل گرفته و سپس به آن اضافه شده بود [۱۴-۱۷، ۱۹]. آن‌ها رنگدانه را با استفاده از سلول‌های قرمز خون و گاز اکسیدنیتريك به عنوان ترکیب نیتروزه کننده در حضور اسیدآسکوربیک تهیه نمودند. در این روش از «همین» استفاده شده و پس از وارد کردن گاز اکسیدنیتريك به محلول حاوی این ترکیب، نیتروزوهموگلوبین به دست آمده و با افزودن این رنگدانه در مقادیر ۳ تا ۳۰ پی‌پی‌ام رنگ صورتی مناسبی مشاهده گردید. اگرچه آن‌ها دریافتند افزایش مقدار این رنگدانه به صورت خطی مقدار قرمزی را افزایش می‌دهد اما رنگ نهایی فرآورده به مقدار میوگلوبین گوشت بستگی داشته و گوشت‌های دارای مقدار بیشتر میوگلوبین به مقدار بیشتری از این رنگدانه برای ایجاد رنگ مناسب نیاز داشتند [۱۰].

در این تحقیق تلاش شده است تا با بکارگیری روشی جدید، سریع و آسان، رنگدانه عمل‌آوری تولید شده و جایگزین نیتريت در تولید رنگ عمل‌آوری گردد تا از شکل‌گیری نیتروزآمین سرطانزا ممانعت به عمل آید. همچنین اثر متغیرهای تولید رنگدانه و شرایط بهینه برای سنتز آن مشخص شود.

## ۲. مواد و روش‌ها

به منظور بررسی و بهینه‌سازی واکنش تولید نیتروزوهم در شرایط آزمایشگاهی اثر سه متغیر مقدار اسید کلریدریک (٪)، میزان نیتريت (*mM*)، میزان اسید آسکوربیک (*mM*) بر راندمان و حداکثر طول موج جذبی هر یک در سه سطح طبق جدول ۱ مورد بررسی قرار گرفتند. با استفاده از طراحی فاکتوریل جزئی در قالب طرح مکعب مرکزی، ۲۰ تیمار مختلف بر اساس سطوح

متغیرهای مورد بررسی (جدول ۲) مشخص گردید و سپس واکنش‌ها بر اساس تیمارهای تعیین شده انجام شد. معادله درجه دوم زیر برای ساخت مدل استفاده می‌گردد.

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} X_j^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j, \quad (1)$$

که در آن Y پاسخ سامانه،  $X_{ijk}$  متغیرهای سامانه،  $\beta_0$  = ضریب رگرسیون برای ضریب ثابت،  $\beta_j$  = ضریب رگرسیون برای جملات خطی،  $\beta_{jj}$  = ضریب رگرسیون برای جملات مربع و  $\beta_{jk}$  = ضریب رگرسیون برای جملات برهم‌کنش است.

جدول ۱- متغیرها و سطوح اندازه‌گیری

متغیرها	سطوح				
کد	$-\alpha = -1/68$	-۱	۰	+۱	$+\alpha = 1/68$
غلظت اسید کلریدریک (%)	۰/۳۲	۱	۲	۳	۳/۶۸
غلظت نیتريت (میلی مول)	۶۵/۹۱	۱۰۰	۱۵۰	۲۰۰	۲۳۴/۰۸
غلظت اسید آسکوربیک (میلی مول)	۱۵/۹۱	۵۰	۱۰۰	۱۵۰	۱۸۴/۰۸

غلظت هم استخراج شده از گوشت با استفاده از مخلوط استون، آب و اسید به کار رفته در استخراج هم به ۱ میلی مول رسید. سپس مقادیر اسید آسکوربیک و نیتريت تعیین شده براساس جدول ۲-۲ به آن اضافه شد و پس از چند ثانیه تکان دادن آرام آن برای تولید گاز اکسید نیتريت و خروج هوا از فضای بالای ظرف، درب آن محکم بسته شده و به مدت ۳۰ ثانیه به شدت تکان داده شد. طی این مدت در اثر تماس اسید آسکوربیک و نیتريت، گاز اکسید نیتريت تولید شده و نیتروزوهم سنتز گردید. به منظور اندازه‌گیری غلظت نیتروزوهم ۲ میلی لیتر از رنگدانه سنتز شده با استفاده از مخلوط ۸۰٪ استون-۲۰٪ آب به حجم ۲۵ میلی لیتر رسید و میزان جذب آن در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت شد. غلظت نیتروزوهم برحسب پی پی پیام با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید [۵]. راندمان تولید نیتروزوهم با تقسیم غلظت آن بر غلظت هم برحسب پی پی پیام محاسبه می‌گردد.

$$\text{غلظت نیتروزوهم (ppm)} = \frac{(A_{540} \times 11/3 \times 25)}{(652 \times 2)} \quad (2)$$

محلول هم و نیتروزوهم رقیق شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر دو پرتویی، در طول موج ۳۸۰ تا ۷۰۰ نانومتر و در برابر شاهد استون، آب اسکن گردید و منحنی حاصل ثبت شد.

تجزیه و تحلیل نتایج واکنش تشکیل نیتروزوهم، در چهار بخش تجزیه واریانس و مدل‌سازی فرآیند، رسم نمودارهای کانتور دو بعدی، تعیین شرایط بهینه برای حصول بهترین نمونه و در نهایت پیش‌بینی مقادیر متغیرهای هدف در شرایط بهینه به کمک نرم‌افزار آماری ۱۴ Minitab version انجام گرفت.

### ۳. نتایج و بحث

به منظور تهیه مدلی که اثر متغیرهای مورد بررسی را بر روی هر یک از فاکتورهای هدف توصیف کند، از معادله ۱ و ضرایب برآورد شده از تجزیه واریانس نتایج که در جدول ۳ آورده شده است، استفاده گردید. بر اساس این جدول  $\beta_1$  تا  $\beta_3$  به ترتیب ضرایب هر یک از فاکتورهای غلظت اسید کلریدریک، غلظت اسید آسکوربیک و غلظت نیتريت می‌باشند وقتی که اثر آن‌ها بر نتایج به صورت معادله درجه یک باشد. ضرایب این فاکتورها در حالتی که به صورت معادله درجه دوم اثرگذار باشند،  $\beta_{11}$  تا  $\beta_{33}$  بوده و چنانچه این فاکتورها اثر متقابل بر یکدیگر داشته باشند از ضرایب  $\beta_{12}$  تا  $\beta_{23}$  استفاده می‌گردد.

جدول ۲- تیمارهای انتخابی مطابق طرح مرکب مرکزی و مقادیر واقعی حاصل از آزمایشات و پیش‌بینی شده از مدل

مشاهدات	غلظت اسید کلریدریک (/.)	غلظت اسید آسکوربیک (mM)	غلظت نیتريت (mM)		مقادیر واقعی		مقادیر پیش‌بینی شده	
			راندمان	طول موج	راندمان	طول موج	راندمان	طول موج
۱	۰	۰	۹۷/۰۱۴	۵۵۵	۹۹/۰۶۹	۵۴۹/۱۰۰	۱/۶۸	
۲	-۱	۱	۱۰۰/۰۰	۵۵۹	۹۶/۱۷۲	۵۵۷/۶۷۲	-۱	
۳	۱/۶۸	۰	۸۹/۴۰۵	۵۵۵	۹۵/۳۰۳	۵۵۶/۷۴۱	۰	
۴	۰	۰	۹۵/۲۰۵	۵۴۰	۹۵/۰۸۸	۵۴۰/۰۶۷	۰	
۵	۱	-۱	۸۰/۷۳۷	۵۲۹	۸۲/۰۱۳	۵۳۶/۹۶۲	۱	
۶	۰	۰	۹۵/۱۳۰	۵۴۰	۹۵/۰۸۸	۵۴۰/۰۶۷	۰	
۷	-۱/۶۸	۰	۸۵/۶۷۰	۵۲۸	۹۱/۱۰۷	۵۳۱/۰۲۷	۰	
۸	۰	۰	۹۴/۵۱۰	۵۴۰	۹۵/۰۸۸	۵۴۰/۰۶۷	۰	
۹	-۱	۱	۱۰۰/۰۰	۵۵۸	۱۰۰/۰۰۶	۵۶۰/۹۲۲	۱	
۱۰	۰	۰	۹۴/۹۷۳	۵۴۰	۹۵/۰۸۸	۵۴۰/۰۶۷	۰	
۱۱	۱	۱	۸۵/۰۲۵	۵۲۹	۸۶/۵۵۸	۵۳۴/۰۹۲	۱	
۱۲	-۱	-۱	۹۸/۲۵۰	۵۵۶	۹۶/۳۶۱	۵۴۹/۷۹۲	-۱	
۱۳	۱	-۱	۷۶/۲۰۰	۵۲۶	۷۷/۲۷۹	۵۱۸/۷۱۲	-۱	
۱۴	۱/۶۸	۰	۷۴/۰۹۲	۵۲۸	۷۱/۱۷۲	۵۲۳/۳۹۲	۰	
۱۵	۰	۰	۹۶/۵۹۳	۵۴۰	۹۵/۰۸۸	۵۴۰/۰۶۷	۰	
۱۶	-۱	-۱	۹۵/۲۵۰	۵۳۰	۹۱/۹۲۷	۵۳۱/۵۴۲	-۱	
۱۷	۰	۱/۶۸	۹۳/۵۸۵	۵۵۵	۹۳/۸۰۲	۵۴۹/۸۴۷	۰	
۱۸	۰	۰	۹۴/۶۲۶	۵۴۰	۹۵/۰۸۸	۵۴۰/۰۶۷	۰	
۱۹	۱	۱	۷۹/۳۱۵	۵۲۹	۸۱/۸۲۴	۵۳۰/۸۴۲	۱	
۲۰	۰	-۱/۶۸	۸۳/۳۹۷	۵۲۸	۸۶/۱۵۸	۵۳۰/۲۸۷	۰	

در این بررسی مدل‌های مربوط به راندمان (مدل ۳) و طول موج مربوط به حداکثر جذب نمونه‌ها (مدل ۴) در سطح احتمال ۹۰٪ تعیین شده‌اند.

$$Y = 95/088 - 7/174 X_1 + 2/273 X_2 + 2/367 X_3 - 4/188 X_1^2 - 1/806 X_2^2 \quad (3)$$

$$Y = 540/068 - 9/915 X_1 + 5/815 X_2 + 5/375 X_3 - 3/500 X_1 X_2 - 3/750 X_2 X_3 \quad (4)$$

۱.۳. راندمان

نتایج حاصل از اندازه‌گیری راندمان، نوسانی ۲۶ درصدی را نشان می‌دهد که از ۷۶ تا ۱۰۰ درصد بسته به شرایط متغیر است. *Shahidi* و همکاران (۱۹۸۴) در اولین تلاش خود برای سنتز نیتروزوهم از نیتريت و اسید آسکوربیک در محیط آبی، رنگدانه‌ای با رنگ نامطلوب و راندمان بسیار پائین (۷۲-۶۵٪) تولید کردند [۱۸]. به دلیل حلالیت بسیار بالای نیتريت و اسید آسکوربیک در محیط آبی، واکنش‌ها با سرعت بسیار بالایی انجام گرفته و رنگ تولیدی به سمت رنگدانه‌های کُگلوبین و با نیتري‌همین خواهد رفت.

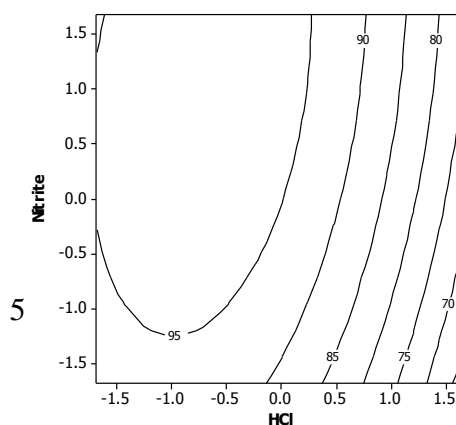
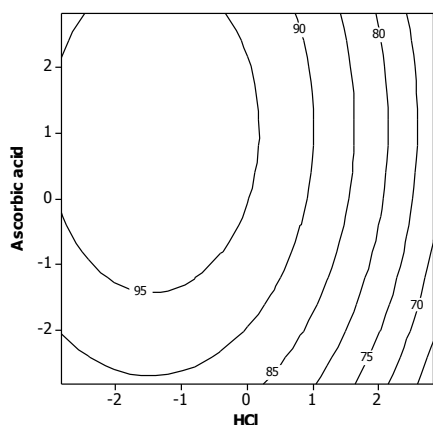
جدول ۳- ضرایب برآورد شده از تجزیه واریانس

جذب		راندمان		فاکتور
<i>p</i>	ضریب	<i>p</i>	ضریب	متغیر
<sup>a</sup> /۰۰۰	۵۴۰/۰۶۸	<sup>a</sup> /۰۰۰	۹۵/۰۸۸	ثابت ( $\beta$ )

$\beta_1$	$a./0.00$	-۷/۱۷۴	$a./0.00$	-۹/۹۱۵
$\beta_2$	$a./0.01$	۲/۲۷۳	$a./0.۲۹$	۵/۸۱۵
$\beta_3$	$a./0.02$	۲/۳۶۷	$a./0.۲۴$	۵/۳۷۵
$\beta_{11}$	$a./0.01$	-۴/۱۸۹	$ns./0.۸۹$	$ns./0.۹۴۶$
$\beta_{22}$	$b./0.۶۴$	-۱/۸۰۶	$ns./0.۸۹$	$ns./0.۹۴۶$
$\beta_{33}$	$ns./0.۳۸۰$	-۰/۷۹۸	$ns./0.۸۹$	$ns./0.۹۴۶$
$\beta_{12}$	$ns./0.۹۲۵$	۰/۱۱۳	$b./0.۶۹$	-۳/۵۰۰
$\beta_{13}$	$ns./0.۴۵۵$	۰/۹۰۶	$ns./0.۱۴۰$	-۲/۷۵۰
$\beta_{23}$	$ns./0.۸۴۹$	-۰/۲۲۸	$b./0.۵۴$	-۳/۷۵۰

در روش مورد استفاده در این تحقیق به دلیل محدود کردن آب موجود و جایگزینی آن با استون، واکنش تا جایی پیش می‌رود که نیتريت و اسید آسکوربیک در آب حل می‌گردند. پس از واکنش این دو ترکیب و خروج آن‌ها از محیط آب به واسطه تولید گاز اکسید نیتريت، مجدداً نیتريت و اسید آسکوربیک حل خواهند شد و این فرایند مرتباً ادامه خواهد یافت. بنابراین همیشه واکنش به صورت کنترل شده پیش خواهد رفت و تنها گاز اکسید نیتريت در تماس با هم قرار خواهد گرفت. *Shahidi* و همکاران در تحقیقات بعدی خود استفاده از نیتريت برای تولید رنگدانه را نامناسب دانسته و از گاز اکسید نیتريت در شرایط کنترل شده استفاده نمودند. راندمان آن‌ها در این روش به ۹۶٪ افزایش یافت [۱۴، ۱۵، ۱۹]. با این وجود گاز اکسید نیتريت ترکیبی بی‌رنگ و سمی است که استنشاق آن خطرات بسیاری را برای انسان به همراه دارد. با افزایش مدت زمان قرارگیری در معرض این گاز، مشکلاتی همچون مت‌هموگلوبینمیا، یرقان، آماس ریه، اختلال ذهنی، بی‌هوشی و مرگ به وجود خواهد آمد [۶]. با توجه به خطرات موجود، استفاده از گاز اکسید نیتريت عملاً امکانپذیر نبوده و به نظر می‌رسد به همین دلیل روش مورد استفاده توسط *Shahidi* و همکاران نه تنها به صورت تجاری در نیامد بلکه تحقیقات در این زمینه ادامه نیافت.

آنچنان که در شکل ۱- الف و ب دیده می‌شود، با افزایش غلظت اسید کلریدریک تا حدود یک درصد، راندمان به حداکثر مقدار خود رسیده ولی با افزایش بیشتر آن، کاهش راندمان دیده خواهد شد. هرچند تا کنون به بررسی نقش اسید کلریدریک در تولید رنگدانه‌های عمل‌آوری پرداخته نشده است اما به نظر می‌رسد این ترکیب نقش دوگانه‌ای را در واکنش‌های سنتز نیتروزوهم ایفا نماید. اسید کلریدریک نه تنها با کاهش *pH* واکنش‌های تبدیل نیتريت به اسید نیتروز و اسید نیتريت را کنترل می‌نماید بلکه با تامین یون کلر در محیط بر چگونگی واکنش اثر می‌گذارد. *Sebranek* (۱۹۷۹) دریافت ۰/۲ واحد کاهش *pH* می‌تواند سرعت تشکیل رنگ در فرایند عمل‌آوری را دو برابر کند که به دلیل مساعد شدن شرایط برای واکنش نیتريت با هم است. وی همچنین اهمیت کلرید سدیم در فرایند عمل‌آوری گوشت را بررسی کرده و بیان نمود که یون‌های کلر در واقع به کاتالیز واکنش‌های نیتروزه شدن کمک می‌نمایند. هرچند وی نقش چنین واکنش‌هایی را به هنگام تولید فرآورده‌های گوشتی اندک دانست زیرا به *pH* بسیار پایینی برای کاتالیز این واکنش‌ها نیاز است [۱۲] اما استفاده از اسید کلریدریک برای تولید رنگدانه نیتروزوهم نه تنها یون کلر را تامین می‌نماید بلکه *pH* را تا حد مورد نیاز برای انجام این واکنش‌ها کاهش می‌دهد. با افزایش غلظت اسید کلریدریک از کمتر از ۰/۵٪ به حدود ۱٪ غلظت یون کلر در محیط افزایش یافته و راندمان تولید نیتروزوهم افزایش خواهد یافت.



(الف)

(ب)

(ج)

شکل ۱- نمودار سطح پاسخ سه بعدی و کانتور دو بعدی راندمان در مقابل الف) میزان نیتريت و درصد اسيد کلريدريك، ب)میزان اسيد کلريدريك و اسيد اسکوربيک، ج) میزان نیتريت و اسيد اسکوربيک (اعداد نشان داده شده در اشکال به صورت کد می باشند)

به نظر می رسد با افزایش درصد اسيد کلريدريك، توانایی حلقه هم برای ترکیب با اکسيد نیتريك کاهش یابد و از این رو درصد تولید نیتروزوهم روند نزولی به خود گیرد. همچنین  $pH$  های پائین واکنش پذیری اسيد اسکوربيک را کاهش داده [۹] و بنابراین نیتروزومت میوگلوبین در محیط تولید شده اما به نیتروزومیوگلوبین تبدیل نخواهد شد. با افزایش غلظت اسيد اسکوربيک تا حدود ۱۴۰-۱۲۰ میلی مول، راندمان به حداکثر مقدار خود رسیده ولی با افزایش بیشتر آن، کاهش راندمان دیده خواهد شد. با وجود این که در سنتز نیتروزومیوگلوبین در محیط آبی با افزایش غلظت اسيد اسکوربيک رنگ سبز در محیط به وجود آمده و راندمان تولید نیتروزوهم کاهش می یابد اما در محیط استون-آب این پدیده با شدت کمتری دیده می شود. Fox و Thomson (۱۹۶۳) اثر غلظت اسيد اسکوربيک بر شکل گیری نیتروزومیوگلوبین را بررسی کرده و دریافتند با افزایش نسبت اسيد اسکوربيک به میوگلوبین از ۱۰:۱ تا ۱۰۰:۱ سرعت تولید نیتروزوهم افزایش می یابد [۲]. Fujimaki و همکاران (۱۹۷۵) نیز به اثر افزایش غلظت اسيد اسکوربيک در سنتز نیتروزوهم اشاره نمودند. آن ها نتایج حاصل را اینگونه توجیه نمودند که غلظت بالای اسيد اسکوربيک موجب تجزیه نیتريت و تولید گاز اکسيد نیتريك می گردد. به دلیل نقش اسيد اسکوربيک در حذف اکسیژن محلول از محیط، گاز اکسيد نیتريك تولید شده با اکسیژن واکنش نداده و بنابراین غلظت گاز موجود برای واکنش با هم افزایش می یابد [۳]. تحقیقات دیگر نیز نشان داد که افزایش غلظت اسيد اسکوربيک میزان نیتريت باقی مانده را کاهش می دهد که در نتیجه تبدیل آن به گاز اکسيد نیتريك است [۱]. افزایش میزان گاز اکسيد نیتريك می تواند راندمان تولید رنگدانه عمل آوری را افزایش دهد.

اثر غلظت نیتريت بر راندمان به صورت درجه اول می باشد و هیچ گونه اثر متقابلی با سایر متغیرها نشان نمی دهد. با افزایش غلظت نیتريت به صورت خطی راندمان افزایش می یابد. در واقع به دلیل وجود محیط به شدت احیاء کننده (اسيد اسکوربيک) و اسیدی (اسيد کلريدريك) نیتريت به طور کامل به گاز اکسيد نیتريك تبدیل می شود که پس از واکنش با هم، راندمان تولید نیتروزوهم را افزایش خواهد داد (شکل ۱-ج).  $pK$  نیتريت بسیار پائین و در حدود ۳/۳۷ است به این مفهوم که در این  $pH$  حدود ۵۰٪ نیتريت تجزیه خواهد شد. در فرآورده های گوشتی به دلیل محدودیت در کاهش  $pH$  (۵/۵) ۹۹٪ نیتريت به صورت تفکیک نشده باقی می ماند [۴] اما از آن جایی که در این روش سنتز با محدودیت کاهش  $pH$  مواجه نبوده و به دلیل شرایط اسیدی موجود، نیتريت احتمالاً به صورت کامل تجزیه شده و با تولید گاز  $NO$  راندمان را افزایش خواهد بخشید.

نیتریت همچنین ترکیب اکسید کننده قوی بوده که سبب تبدیل آهن دو ظرفیتی هم به آهن سه ظرفیتی می گردد اما به دلیل حضور مقادیر کافی ترکیبات احیاء کننده در محیط، آهن مجدداً احیاء شده و نیتروزوهم به وجود خواهد آمد.

### ۲.۳. طول موج مربوط به حداکثر جذب

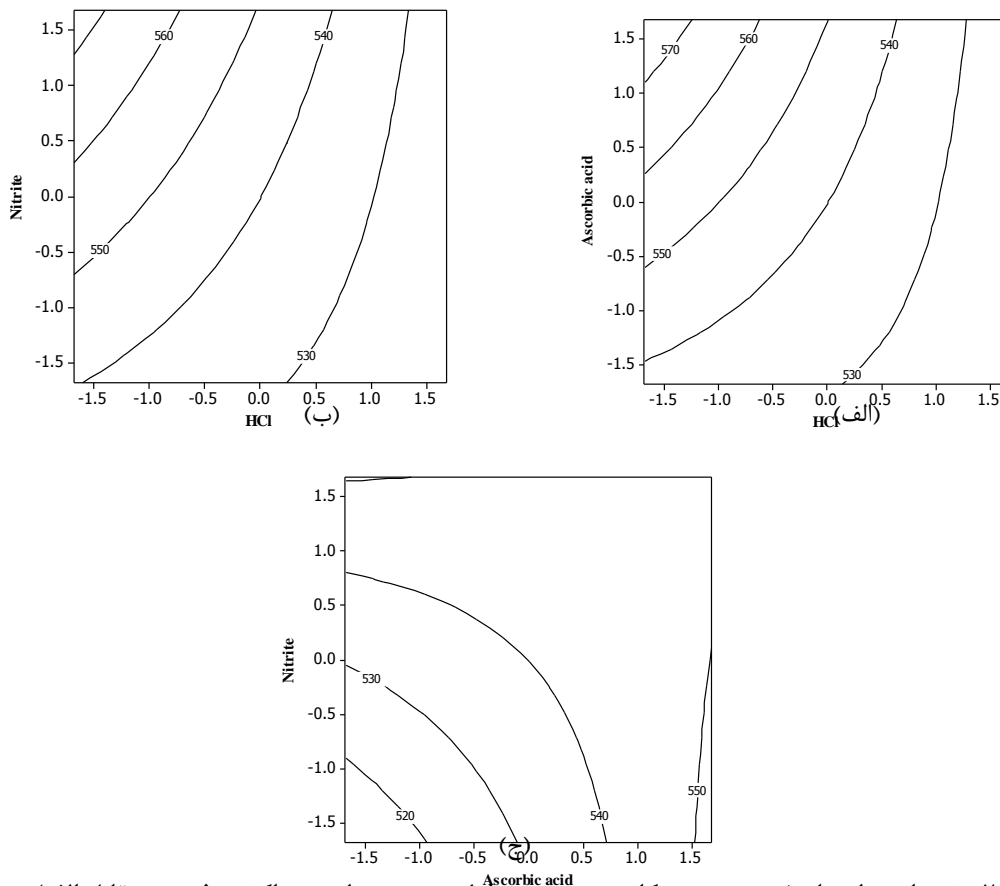
رنگدانه هم که در اثر افزودن اسید کلریدریک به همین کلراید تبدیل شده است بدون توجه به مقدار اسید مورد استفاده در آن دارای حداکثر جذب در ۵۲۹، ۵۵۷ و ۶۵۷ نانومتر می باشد و *soret band* آن در طول موج ۴۳۵ نانومتر قرار دارد. با تبدیل این رنگدانه به نیتروزوهم حداکثر جذب در سه طول موج ۴۹۹-۴۷۲، ۵۵۸-۵۲۶ و ۵۵۵-۵۷۹ نانومتر بسته به شرایط مورد استفاده دیده خواهد شد. *Shahidi* و *Pegg* (۱۹۹۱) حداکثر جذب رنگدانه‌های سنتز شده با استفاده از گاز اکسید نیتریک را در طول موج های ۵۴۰ و ۵۶۳ نانومتر گزارش نمودند [۱۳]. هرچند این مقدار توسط *Hornsey* (۱۹۵۶) ۵۳۵ و ۵۶۳ نانومتر اعلام شده است [۵]. *Fox* و *Thompson* (۱۹۶۳) نحوه تبدیل نیتروزومت میوگلوبین به نیتروزومیوگلوبین را با بررسی طیف جذبی آن مطالعه نمودند. بر اساس تحقیقات انجام گرفته توسط آن ها حداکثر جذب برای نیتروزومت هموگلوبین در محدوده ۵۳۵ نانومتر قرار دارد و با تبدیل آن به نیتروزومیوگلوبین حداکثر جذب به ۵۴۵ نانومتر انتقال خواهد یافت. در نمونه های سنتز شده در این تحقیق مشاهده شد با افزایش راندمان تولید نیتروزوهم، طول موج مربوط به حداکثر جذب حتی به طول موج های بلندتر نیز منتقل می گردد.

با کاهش غلظت اسید کلریدریک به صورت خطی، طول موج مربوط به حداکثر جذب به سمت طول موج های بیشتر منتقل می شود. در واقع با افزایش غلظت اسید کلریدریک و کاهش *pH*، با وجود این که گاز اکسید نیتریک تولید می شود اما شرایط بسیار اسیدی موجب تجزیه مجدد گروه *NO* از حلقه هم شده و طیف جذبی نیتروزوهم به طیف جذبی هم شباهت خواهد یافت. همین امر باعث می شود با افزایش غلظت اسید کلریدریک به بیش از ۱٪ راندمان تولید نیتروزوهم کاهش یابد. بر اساس معادله ۴ غلظت اسید کلریدریک همچنین با غلظت اسید آسکوربیک اثر متقابل دارد. آنچنان که در شکل ۲-الف دیده می شود در غلظت های زیاد اسید کلریدریک، افزایش غلظت اسید آسکوربیک اثر چندانی بر طول موج مربوط به حداکثر جذب نداشته که به دلیل عدم تشکیل نیتروزوهم در این غلظت هاست اما در غلظت های کمتر اسید کلریدریک که راندمان تولید نیتروزوهم نیز بالاتر است، افزایش غلظت اسید آسکوربیک منجر به تغییر طول موج به سمت طول موج های بلندتر می شود. همانگونه که در بخش های قبل اشاره شد زمانی که غلظت اسید آسکوربیک کم باشد نیتروزومت هم به وجود می آید اما به دلیل عدم وجود مقادیر کافی احیاء کننده به نیتروزوهم تبدیل نخواهد شد. از آن جایی که این ترکیب حداکثر جذب خود را در طول موج های کمتر نشان می دهد با کاهش غلظت اسید آسکوربیک طول موج مربوط به حداکثر جذب به سمت طول موج های کوتاهتر جا به جا می شود اما با افزایش غلظت آن میزان نیتروزوهم افزایش یافته و همگام با آن حداکثر جذب در طول موج های بلندتر دیده خواهد شد.

اثر غلظت اسید آسکوربیک به صورت درجه اول ( $X_2$ ) و به صورت اثر متقابل با غلظت اسید کلریدریک ( $X_1X_2$ ) و نیتریت ( $X_2X_3$ ) می باشد. با افزایش غلظت اسید آسکوربیک به صورت خطی، طول موج مربوط به حداکثر جذب به سمت طول موج های بیشتر منتقل می گردد. در اینجا نیز باید به نقش احیاء کنندگی اسید آسکوربیک در تبدیل نیتروزومت هم به نیتروزوهم و در نتیجه انتقال حداکثر جذب به طول موج های بلندتر اشاره نمود. نمودار سطح پاسخ سه بعدی و نمودار کانتور دو بعدی طول موج مربوط به حداکثر جذب در مقابل غلظت اسید کلریدریک و غلظت اسید آسکوربیک (شکل ۲-الف) و نیتریت (شکل ۲-ب) رسم شده است.

به اثر متقابل اسید کلریدریک و اسید آسکوربیک در تغییرات طول موج حداکثر جذب در قسمت قبل اشاره شد. در رابطه با اثر متقابل نیتریت و اسید آسکوربیک همانگونه که در شکل دیده می شود با افزایش همزمان غلظت اسید آسکوربیک و نیتریت، حداکثر جذب به سمت طول موج های بلندتر می رود. از آن جایی که در واکنش تولید گاز اکسید نیتریک، حضور همزمان نیتریت و اسید آسکوربیک (به عنوان احیاء کننده در واکنش تبدیل اسید نیتروز به اکسید نیتریک و در واکنش تبدیل نیتروزومت هم به نیتروزوهم) لازم است، افزایش غلظت این دو ترکیب موجب تولید بیشتر گاز *NO* و تولید مقادیر بیشتری نیتروزوهم می شود که حداکثر جذب آن در طول موج های بلندتر قرار دارد.

اثر غلظت نیتريت ( $X_2$ ) به صورت درجه اول و به صورت اثر متقابل با غلظت اسید آسکوربیک ( $X_3$ ) می‌باشد. با افزایش غلظت نیتريت به صورت خطی، حداکثر طول موج جذب به سمت طول موج‌های بیشتر منتقل می‌گردد. بر اساس معادله ۴ غلظت نیتريت همچنین با غلظت اسید آسکوربیک اثر متقابل دارد. نمودار سطح پاسخ سه بعدی و نمودار کانتور دو بعدی طول موج مربوط به حداکثر جذب اثر متقابل غلظت نیتريت و اسید آسکوربیک را نشان می‌دهند (شکل ۲-ج). در رابطه با نیتريت و اثر متقابل آن با اسید آسکوربیک نیز باید به تولید مقادیر بیشتر گاز اکسید نیتريك و نیتروزوهم اشاره نمود.



شکل ۲- نمودار سطح پاسخ سه بعدی و کانتور دو بعدی طول موج مربوط به حداکثر جذب در مقابل الف) میزان نیتريت و درصد اسید کلریدريك، ب) میزان اسید کلریدريك و اسید اسکوربیک، ج) میزان نیتريت و اسید آسکوربیک (اعداد نشان داده شده در اشکال به صورت کد می‌باشند)

### ۳.۳. بهینه سازی

پس از تعیین مدل، بهینه سازی به منظور دستیابی به سطوحی از متغیرهای مستقل که در نتیجه به کارگیری آنها بهترین محصول از واکنش به دست خواهد آمد، انجام می‌شود. لذا نرم افزار بر اساس مدل توصیفی و همچنین سطوح تعیین شده، ترکیبی از متغیرها را تعیین می‌کند که نتیجه آن بهترین محصول می‌باشد.

بر اساس پیش بینی های انجام گرفته در نرم افزار مینی تب، بهترین شرایط برای به دست آوردن بیشترین راندمان و طول موج حداکثر جذب در محدوده ۵۴۰ تا ۵۶۰ نانومتر براساس کدهای تعیین شده، اسید کلریدريك = ۰/۸۰، اسید آسکوربیک = ۰/۴۶ و نیتريت = ۱ است که معادل ۱/۱۹٪ اسید کلریدريك، ۱۲۳/۰۸ میلی مول اسید آسکوربیک و ۲۰۰ میلی مول نیتريت بازای هر میلی مول هم می باشد. پس از تولید نیتروزوهم در شرایط بهینه راندمان، طول موج حداکثر جذب به ترتیب برابر بود با ۰/۱۰۰±۰/۱، ۵۵۸±۱ نانومتر که اختلاف معنی داری با آنچه توسط نرم افزار مینی تب پیش بینی شده بود (راندمان = ۹۹/۵٪، طول موج حاکثر



جذب=۵۵۸ نانومتر) نداشت. به این ترتیب می توان امیدوار بود که پس از افزودن نیتريت، اسيد اسکوربيک و اسيد کلريدريک در مقادير بهينه، نيتريت باقيمانده اي وجود نخواهد داشت.

۴. منابع و مراجع

- [۱] Brown, C. L., Hedrick, H. B., Bailey, M. E. Characteristics of cured ham as influenced by levels of sodium nitrite and sodium ascorbate. *J. Food Sci.*, Nr. ۳۹, ۱۹۷۴, pp. ۹۷۷-۹۷۹.
- [۲] Fox, Jr. J. B., Thomson, J. S. Formation of bovine nitrosylmyoglobin. I. pH ۴.۵-۶.۵. Nr. ۲, *Biochem.*, ۱۹۶۳, pp. ۴۶۵-۴۷۰.
- [۳] Fujimaki, M., Emi, M., Okitani, A. Fate of nitrite in meat-curing model systems composed of myoglobin, nitrite and ascorbate. *Agric. Biolog. Chem.*, Nr. ۳۹, ۱۹۷۵, pp. ۳۷۱-۳۷۷.
- [۴] Honikel, K. O. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Sci.*, Nr. ۷۸, ۲۰۰۸, pp. ۶۸-۷۶.
- [۵] Hornsey, H. C. The colour of cooked cured pork. I.-Estimation of the nitric oxide-haem pigment. *J. Sci. Food Agric.*, Nr. ۷, ۱۹۵۶, pp. ۵۳۴-۵۴۰.
- [۶] [http://avogadro.chem.iastate.edu/MSDS/nitric\\_oxide.pdf](http://avogadro.chem.iastate.edu/MSDS/nitric_oxide.pdf).
- [۷] Lawrie, R. A., Ledward, D. A. *Lawrie's Meat Science*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, ۲۰۰۶.
- [۸] Mratin, M. *Meat Curing Technology*. In: Hui YH, Nip W-K, Rogers RW, Young O, A., editors. *Meat Science and Applications*. Marcel Dekker, Inc, New York, ۲۰۰۱.
- [۹] Pegg, R. B., Shahidi, F. Nitrite curing of meat: The N-nitrosamine problem and nitrite alternatives. *Food & Nutrition Press, INC.*, Connecticut, ۲۰۰۰.
- [۱۰] Pegg, R. B., Shahidi, F. Nitrite curing of meat: The N-nitrosamine problem and nitrite alternatives: Wiley-Blackwell, ۲۰۰۴.
- [۱۱] Pittioni, S. *Nitrosohemoglobin synthesis*. Toronto: University of Toronto, ۱۹۹۸.
- [۱۲] Sebranek, J. G. *Advances in the technology of nitrite use and consideration of alternatives*. *Food Technol.*, Nr. ۳۳, ۱۹۷۹, pp. ۵۸-۶۲, ۹۳.
- [۱۳] Shahidi, F., Pegg, R. Encapsulation of the preformed cooked cured meat pigment. *J. Food Sci.*, Nr. ۵۶, ۱۹۹۱, ۱۵۰۰-۱۵۰۴.
- [۱۴] Shahidi, F., Pegg, R. Powdered Cooked Cured-Meat Pigment Which is a Non-Nitrite Meat Preservative. *WO Patent WO/۱۹۹۲/۰۰۷,۴۷۶*, ۱۹۹۲.
- [۱۵] Shahidi, F., Pegg, R. B. Novel synthesis of cooked cured-meat pigment. *J. Food Sci.*, Nr. ۵۶, ۱۹۹۱, pp. ۱۲۰۵-۱۲۰۸.
- [۱۶] Shahidi, F., Pegg, R. B. Proteinaceous food product containing stabilized cooked cured-meat pigment. *US Patent ۵۴۴۳۸۵۲*, ۱۹۹۵.
- [۱۷] Shahidi, F., Pegg, R. B. Stabilized cooked cured-meat pigment. *US Patent ۵۴۲۵۹۵۶*, ۱۹۹۵.
- [۱۸] Shahidi, F., Rubin, L. J., Diosady, L. L., Chew, V. Preparation of dinitrosyl ferrohemochrome from hemin and sodium nitrite. *Canad. Inst. Food Sci. Technol. J.*, Nr. ۱۷, ۱۹۸۴, pp. ۳۳-۳۷.

- [19] Shahidi, F., Rubin, L. J., Diosady, L. L., Wood, D. F. Preparation of the cooked cured-meat pigment, dinitrosyl ferrohemochrome, from hemin and nitric oxide. *J. Food Sci.*, Nr. 50, 1988, pp. 272-273.
- [20] Sweet, C. W. Additive composition for reduced particle size meats in the curing thereof. *US Patent* 3899600, 1975.
- [21] Varnam, A. H., Sutherland, J. P. *Meat and Meat Products, Technology, Chemistry and Microbiology*. Chapman and Hall, London, 1995.