

# Comparison of the effect of sodium nitrite and nanocapsules carrying astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* with maltodextrin-sodium caseinate combined coating in controlling oxidative and microbial spoilage of common sausage

Soheyl Reyhani Poul<sup>1</sup>, Sakineh Yeganeh<sup>2\*</sup>, Reza Safari<sup>3</sup>

1. PhD graduate, Department of Processing of Fishery Products, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2. Professor, Department of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
3. Assistant professor, Caspian Sea Ecology Research Institute, Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education And Extension Organization, Sari, Iran

\*Corresponding author (skyeganeh@gmail.com; s.yeganeh@sanru.ac.ir)

**Introduction:** One of the synthetic and harmful preservatives used in sausage is sodium nitrite. This compound in meat products helps to increase the storage period and marketability of the product by preventing the growth of anaerobic bacteria, especially clostridium, exerting an antioxidant effect, stabilizing the red color of the meat and improving the taste. Besides these benefits, sodium nitrite is very dangerous for health and it can cause malignant diseases. For this reason, it is necessary to replace this substance using a natural preservative. Pigments extracted from aquatics such as astaxanthin due to having antioxidant activity, antimicrobial properties and pink color may be a good substitute for sodium nitrite. But these pigments must be nanoencapsulated at first due to their sensitivity to food production conditions, including high temperatures. The aim of the current research at the first was to extract astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* microalgae using the acid-acetone method and pigment nanoencapsulation using maltodextrin-sodium caseinate combined coating. Then, sodium nitrite in the sausage formulation were replaced by the carrier nanocapsules with different proportions and oxidative and microbial spoilage tests, color and sensory evaluations were performed for different treatments.

**Materials and Methods:** At first, astaxanthin pigment was extracted from *Haematococcus pluvialis* using the acid-acetone technique. Then, the extracted pigment was nanoencapsulated using maltodextrin-sodium caseinate combined coating and the resulting (carrier) nanocapsules in the form of treatments A (120 mg/kg sodium nitrite), B (120 mg/kg nanocapsules carrying astaxanthin), C (90 mg/kg sodium nitrite+30 mg/kg nanocapsules carrying astaxanthin), D (60 mg/kg sodium nitrite+60 mg/kg nanocapsules carrying astaxanthin) and E (30 mg/kg sodium nitrite+90 mg/kg nanocapsules carrying astaxanthin) replaced sodium nitrite in the sausage formulation. These treatments were evaluated in terms of oxidative and microbial spoilage, color indices and sensory properties during 28 days of storage at refrigerator temperature along with the control (without sodium nitrite and carrier nanocapsules). This research was conducted in a completely randomized design. Data were analyzed by one-way analysis of variance and the difference between the means was evaluated by Duncan's test at 95% confidence level.

**Results and Discussion:** According to the results, the lowest levels of thiobarbituric acid and peroxide value during the storage period were related to B, E and D ( $p>0.05$ ) treatments ( $p<0.05$ ). A and C treatments had no significant difference in terms of thiobarbituric acid and peroxide value until day 14 ( $p>0.05$ ), but with increasing storage time, this difference became significant and treatment A showed higher values ( $p<0.05$ ). The results of this section showed that the power of astaxanthin in controlling oxidative spoilage is significantly greater than sodium nitrite, and if the purpose is only to control this type of spoilage, there is no need to replace or use sodium nitrite. In the following, the results showed that in terms of controlling microbial spoilage, sodium nitrite has more power than nanocapsules carrying astaxanthin. So that, the lowest amount of total volatile basic nitrogen (TVB-N) and the most standardized pH were related to A, C and D treatments ( $p>0.05$ ) during the storage period ( $p<0.05$ ). B and E treatments ( $p>0.05$ ) were ranked next ( $p<0.05$ ) in terms of the two mentioned indicators. The results of this section showed that if from 120 mg/kg sodium nitrite to 60 mg/kg is

replaced by nanocapsules carrying astaxanthin in the sausage formulation, the resulting product has the same antimicrobial power as the product containing 120 mg/kg sodium nitrite. Evaluation of the color and sensory properties of treatments showed that A, C and D treatments are at a higher level than B, E (treatments) and control in terms of color indices and general acceptance ( $p < 0.05$ ). The comparison of the color indices and sensory properties of the treatments on days 0 and 28 of storage at refrigerator temperature showed that the color and sensory indices remained constant in the formulated treatments, unlike the control.

**Conclusions:** Nanocapsules carrying astaxanthin with maltodextrin-sodium caseinate combined coating as a natural product with many properties in health, control and prevention of various diseases, have a high efficiency to replace the sodium nitrite in sausage formulation. So that, if 30 to 60 mg/kg of the permissible limit of 120 mg/kg of sodium nitrite in the sausage formulation is replaced by nanocapsules carrying astaxanthin, the resulting product will be similar to the product containing 120 mg/kg of sodium nitrite in terms of shelf life, resistance to oxidative and microbial spoilage, color indices and sensory properties.

**Keywords:** Sausage, *Haematococcus* microalgae, Nanocapsules carrying astaxanthin, Sodium nitrite, Oxidative spoilage

# مقایسه اثر نیتريت سدیم و نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین میکروجلبک هماتوکوکوس (*Haematococcus pluvialis*) با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات سدیم در کنترل فساد اکسیداتیو و میکروبی سوسپیس معمولی

سهیل ریحانی پول<sup>۱</sup>، سکینه یگانه<sup>۲\*</sup>، رضا صفری<sup>۳</sup>

۱. دانش آموخته دکتری تخصصی، گروه فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۲. استاد، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۳. استادیار، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران

\*نویسنده مسئول skyeganeh@gmail.com ; s.yeganeh@sanru.ac.ir

## چکیده

هدف تحقیق حاضر امکان‌سنجی جایگزینی نیتريت سدیم در فرمولاسیون سوسپیس معمولی با استفاده از نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین بود تا از این طریق از مضرات سوسپیس کاسته و به ارزش غذایی آن افزوده شود. به همین منظور پس از استخراج رنگدانه آستاگزانتین از میکروجلبک هماتوکوکوس پلوویالیس با استفاده از تکنیک اسید-استون و نانو ریزپوشانی آن با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات سدیم، نانوکپسول‌های حامل با نسبت‌های مختلف، جایگزین نیتريت سدیم در فرمولاسیون سوسپیس معمولی شدند و تیمارهای حاصل از نظر اکسیداسیون، فساد میکروبی، شاخص‌های رنگی و خواص حسی طی ۲۸ روز نگهداری در دمای یخچال مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد اثرگذاری نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین در زمینه کنترل دو شاخص فساد اکسیداسیونی یعنی تیوباریتوریک‌اسید و عدد پراکسید به صورت معنی‌داری بیشتر از نیتريت سدیم است ( $p < 0.05$ ) و کمترین حد این دو شاخص در تیمارهای دارای بیشترین میزان نانوکپسول‌های حامل ثبت شد. عکس این نتیجه در مورد بازهای ازته فرار و pH مشاهده شد؛ به این صورت که قدرت نیتريت سدیم در کنترل این دو شاخص به صورت قابل ملاحظه‌ای بیشتر از نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین بود ( $p < 0.05$ ). مطابق یافته‌ها، وقتی ۳۰ تا ۶۰ mg/kg از ۱۲۰ mg/kg حد مجاز نیتريت سدیم در فرمولاسیون سوسپیس با نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین جایگزین شد، تیمارهای حاصل از نظر میزان و روند بازهای ازته فرار و pH طی دوره نگهداری با تیماری که صرفاً حاوی ۱۲۰ mg/kg نیتريت سدیم است، فاقد اختلاف معنی‌دار بودند ( $p > 0.05$ ). در ادامه مشخص شد همین تیمارها از نظر شاخص‌های رنگی و ارزیابی حسی (رنگ، بو، طعم و بافت) تفاوت قابل ملاحظه‌ای با تیمار حاوی ۱۲۰ mg/kg نیتريت سدیم ندارند ( $p > 0.05$ ) و بیشترین پذیرش کلی هم مربوط به همین تیمارها می‌باشد ( $p < 0.05$ ). بنابر یافته‌های تحقیق حاضر، نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین پتانسیل مطلوبی جهت جایگزینی نیتريت سدیم در فرمولاسیون سوسپیس دارند.

**واژه‌های کلیدی:** سوسپیس، میکروجلبک هماتوکوکوس، نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین، نیتريت سدیم، فساد اکسیداتیو

## مقدمه

با پیشرفت تکنولوژی در علوم و صنایع غذایی، همواره دغدغه حذف نگهدارنده‌های سنتتیک و مضر و جایگزینی آن‌ها با ترکیبات طبیعی وجود داشته و دارد. با حذف این ترکیبات مضر، نگرانی مصرف‌کنندگان در استفاده از انواع مختلف مواد غذایی کاهش می‌یابد که این امر به نوبه خود به بازایابی و افزایش فروش محصول کمک شایانی می‌نماید. امروزه با افزایش ساعات کاری افراد و به دنبال آن کمبود وقت

جهت طبخ انواع غذا، مصرف فرآورده‌های مختلفی از جمله سوسیس و کالباس افزایش چشمگیری یافته است. این محصولات نیز به لحاظ دارابودن نگهدارنده‌های سنتتیک و مضر مستثنی نیستند. نیترات و نیتريت سدیم از جمله این نگهدارنده‌ها هستند که در سوسیس و کالباس کاربرد گسترده‌ای دارند که این مورد افزایش نگرانی مصرف‌کنندگان و کاهش تمایل به خرید را موجب می‌شود. سوسیس و کالباس مانند سایر فرآورده‌های گوشتی دارای پایداری اکسیداتیو پائین و به تندشدن چربی در طی دوره نگهداری بسیار حساس هستند. بنابراین به منظور کنترل بار میکروبی و تغییرات اکسیداتیو، استفاده از برخی افزودنی‌ها (نیترات و نیتريت سدیم) در این فرآورده‌ها ضروری است (Sebranek *et al.*, 2005). نیترات و نیتريت سدیم در فرآورده‌های گوشتی با جلوگیری از رشد باکتری‌های بی‌هوازی به ویژه کلسترییدیوم‌ها، اعمال اثر آنتی‌اکسیدانی، تثبیت رنگ قرمز گوشت و بهبود طعم به افزایش دوره نگهداری و بازاریابی محصول کمک می‌کنند (Toldra *et al.*, 2009).

با همه مزایایی که از نیتريت سدیم ذکر شد، این ترکیب ممکن است در معده انسان با ترکیبات قابل نیتروزه‌شدن واکنش دهد که ماحصل آن بروز انواع بیماری‌های خطرناکی است که بشر در قرن حاضر با آن‌ها رو به رو است (Ferguson *et al.*, 2004). به همین دلیل سازمان‌های استاندارد، حد مشخصی را برای استفاده از نیتريت در فرآورده‌های گوشتی تعیین کرده‌اند. بر اساس استاندارد ملی شماره ۲۳۰۳ حداکثر مقدار مجاز نیتريت قابل استفاده در انواع سوسیس و کالباس ۱۲۰ ppm می‌باشد. با توجه به نگرانی‌هایی که در زمینه استفاده از نیتريت سدیم در فرآورده‌های گوشتی وجود دارد، بنابراین پرداختن متخصصین حوزه صنایع غذایی برای یافتن جایگزینی مناسب، امری ضروری می‌باشد.

آستاگزانتین ( $C_{40}H_{52}O_4$ ) رنگدانه‌ای از خانواده کاروتنوئیدها (از دسته ترپن‌ها) است و در حالت آزاد به رنگ‌های صورتی تا قرمز دیده می‌شود. این رنگدانه در جانوران دریایی مانند ماهی آزاد، ماهی قزل‌آلا، خرچنگ و میگو وجود دارد. ارزش اقتصادی آستاگزانتین بسیار بالا بوده و از آن بعنوان یک رنگ‌دهنده طبیعی، مکمل غذایی، عامل آنتی‌اکسیدان و ضد سرطان استفاده می‌شود (Ambati *et al.*, 2014). آستاگزانتین رنگدانه محلول در چربی است و در حلال‌هایی مانند استن، اتانول، کلروفرم و ... حل می‌شود. این رنگدانه بیشترین فعالیت بیولوژیکی در مقایسه با سایر کاروتنوئیدها را داراست. آستاگزانتین حاوی زنجیره بلند از پیوند دوگانه کونژوگه و گروه‌های کتونی و کربوکسیل می‌باشد. این ویژگی در آستاگزانتین موجب می‌گردد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن افزایش یافته و رادیکال‌های آزاد به سرعت غیر فعال شوند. در مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین با سایر آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، محققان به این نتیجه رسیدند که آستاگزانتین در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد قوی‌تر از کاروتنوئیدهای دیگر نظیر بتاکاروتن عمل می‌کند و در جلوگیری از پراکسیداسیون استرهای متیلی اسیدهای چرب اشباع‌نشده موثرتر است. مطابق نتایج تحقیقات، فعالیت آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین ۱۰ برابر بیشتر از زاگزانتین<sup>۱</sup>، لوتین<sup>۲</sup>، کانتاگزانتین<sup>۳</sup>، بتاکاروتن<sup>۴</sup> و ۱۰۰ برابر بیشتر از آلفا توکوفرول<sup>۵</sup> می‌باشد (Miki, 1991). از کاربردهای آستاگزانتین در صنعت غذا علاوه بر تولید رنگ طبیعی در فرآورده‌های غذایی (Chen and Meyers, 1982) می‌توان به نقش آنتی‌اکسیدانی (Ambati *et al.*, 2014; Safari *et al.*, 2022a) و ضد میکروبی آن (Irna *et al.*, 2017; Suganya and Asheeba, 2015) اشاره کرد. تحقیقات مختلف، اثرات درمانی و دارویی آستاگزانتین را بررسی و نتایج مثبتی گزارش کرده‌اند. این رنگدانه دارای فعالیت ضد سرطانی (Tanaka *et al.*, 1994) است و در پیشگیری از بیماری قلبی-عروقی و التهابی (Tracy, 1999) و همچنین بهبود سلامت چشم (Jacques, 1999) کارایی دارد. اثرات ضد التهابی (Liu and Lee, 2003) و ضد دیابتی (Uchiyama *et al.*, 2002) آستاگزانتین نیز ثابت شده است. با توجه به ویژگی‌های ذکرشده برای آستاگزانتین و مزایای آن، لازم است استفاده از آن به عنوان جایگزینی برای نیتريت سدیم در فرمولاسیون سوسیس مورد بررسی دقیق قرار گیرد. چرا که مطابق موارد ذکرشده در بالا، این رنگدانه می‌تواند با فساد اکسیداتیو و میکروبی مقابله کند. ضمن اینکه رنگی صورتی متمایل به قرمز دارد و احتمالاً در ترکیب با سوسیس، به تثبیت رنگ صورتی (مانند نیتريت سدیم) کمک خواهد کرد. اما از آنجا که ساختار آستاگزانتین در فرم خالص ممکن است تحت تاثیر تیمارهای دمایی، آنزیمی، اسیدی، بازی و ... اعمال شده در روند تولید و نگهداری مواد غذایی (سوسیس) تخریب و در نتیجه عملکردش تغییر کند، استفاده از روشی جهت حفاظت از آن بسیار ضروری است. در صنعت غذا و دارو در چنین مواردی از تکنیک نانو ریزپوشانی استفاده می‌شود (Safari *et al.*, 2022b). طی این فرایند کپسولی اطراف رنگدانه را احاطه کرده و آن را در شرایط نامساعد از تغییرات احتمالی حفاظت می‌کند. ضمن اینکه کپسول‌های تشکیل شده اطراف رنگدانه در این تکنیک، محتویات خود را با سرعت کنترل شده و شرایط ویژه رها می‌کنند.

<sup>1</sup> Zeaxanthin

<sup>2</sup> Lutein

<sup>3</sup> Canthaxanthin

<sup>4</sup> Beta Carotene

<sup>5</sup> Alfa Tocopherol

هدف تحقیق حاضر در ابتدا استخراج آستاگزانتین از میکروجلبک هماتوکوکوس پلوویالیس با استفاده از روش اسید-استون و نانو ریزپوشانی رنگدانه با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات است. سپس نانوکپسول‌های تولیدشده با نسبت‌های مختلف جایگزین نیتريت سدیم در فرمولاسیون سوسیس شده و آزمون‌های سنجش فساد اکسیداتیو و میکروبی برای تیمارهای مختلف انجام خواهد شد.

## مواد و روش

### استخراج، صابونی کردن و تخلیص آستاگزانتین

در تحقیق حاضر، بعد از تهیه پودر خالص میکروجلبک هماتوکوکوس پلوویالیس از شرکت پرتوغذای آبزین سورنا (مازندران) و خرید مواد شیمیایی مورد نیاز، با استفاده از روش ترکیبی (پیش تیمار اولیه با اسیدکلریدریک و سپس استخراج با استون خالص) به استخراج آستاگزانتین اقدام شد (Sarada et al., 2006; Dong et al., 2014; Liu et al., 2018). پس از استخراج رنگدانه مذکور، به منظور هیدرولیز یا صابونی کردن آستاگزانتین و تبدیل فرم‌های مونواستر و دی‌استر آن به فرم آزاد، از روش Dewati و همکاران (۲۰۲۰) استفاده گردید. بدین ترتیب که مخلوط حاوی سود ۰/۰۲ نرمال و عصاره حاوی رنگدانه به مدت ۳ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و مکان تاریک قرار داده شد. بعد از پایان فرآیند هیدرولیز، غلظت آستاگزانتین با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر و طول موج ۴۷۸ نانومتر قرائت گردید. به منظور خالص‌سازی آستاگزانتین از تکنیک کروماتوگرافی ستونی و روش‌های ارائه‌شده در تحقیقات Yuan و Chen (۲۰۰۰)، Sim و Kang (۲۰۰۷) و Sun و همکاران (۲۰۱۵) استفاده شد.

### نانو ریزپوشانی کردن آستاگزانتین

به منظور نانو ریزپوشانی آستاگزانتین، از پوشش ترکیبی مالتودکسترین و کازئینات سدیم با نسبت برابر استفاده و نسبت پوشش‌ها به هسته نیز ۴ به ۱ در نظر گرفته شد. ابتدا سوسپانسیون همگنی از مالتودکسترین در آب مقطر (۴ گرم در ۵۰ میلی‌لیتر) تهیه شد. سپس جهت تهیه پوشش دوم، سوسپانسیونی از کازئینات سدیم در آب مقطر (۴ گرم در ۵۰ میلی‌لیتر) ایجاد و با قراردادن بر روی همزن مغناطیسی و دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه، سوسپانسیون همگنی از آن حاصل شد. محلول حاوی کازئینات سدیم (پس از کاهش دما به ۲۵ درجه سانتی‌گراد) به محلول دارای مالتودکسترین اضافه و ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جهت افزایش جذب آب نگهداری گردید. در مرحله انتهایی، ۲ گرم آستاگزانتین به محلول حاوی پوشش‌ها اضافه و پس از حل شدن آن، جهت تولید نانوکپسول، از دستگاه اولتراسوند (Hilscher, UP200، آلمان) با طول موج ۴۰ کیلوهرتز به مدت ۱۵ دقیقه و تعداد ۶ سیکل (زمان هر سیکل ۳۰ ثانیه و زمان استراحت ۱۵ ثانیه بین سیکل‌ها، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) استفاده شد. برای کاهش بیشتر اندازه ذرات و افزایش راندمان ذرات نانوکپسوله، از دستگاه هموژنایزر با دور بالا (اولتراتوراکس، IKA، ایتالیا) با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۱۵ دقیقه استفاده گردید. محلول حاصل از فرآیند، در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد منجمد و با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی (Vaco 2 Zirbus، آلمان) در فشار ۰/۰۵۱ میلی‌بار و دمای ۵۰- درجه سانتی‌گراد خشک گردید (Yan et al., 2014; Machado et al., 2014; Safari et al., 2022).

### تولید سوسیس

در مجموع ۶ نمونه سوسیس با مقادیر مشخص از نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین و نیتريت سدیم تولید شد (جدول ۱). ترکیبات اصلی سوسیس شامل گوشت سر و گردن گوساله (۶۰ درصد)، آب و یخ (۱۸/۵۱ درصد)، روغن سویا (۱۴ درصد)، نمک (۱/۵ درصد)، نشاسته (۲/۸ درصد)، ایزوله سویا (۱/۸ درصد)، فسفات سدیم (۰/۴ درصد)، آسکوربیک‌اسید (۰/۰۵ درصد) و ادویه (۰/۹ درصد) بود. تمام مواد مذکور با یکدیگر در کاتر (Seydelmann, Aalen) مخلوط و خمیر حاصله در بچ‌های جداگانه در کاتر به همراه نیتريت سدیم، نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین و آب و یخ باقیمانده ترکیب شد. در مرحله بعد، بچ‌ها در بسته‌های استریل پلی‌آمیدی به صورت جداگانه بسته‌بندی و به مدت یک ساعت در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد پخته شدند. نهایتاً محصول تولیدشده بوسیله دوش آب سرد خنک و به یخچال با دمای  $4 \pm 1$  منتقل شد. دوره نگهداری ۲۸ روز بود و نمونه‌گیری جهت انجام آزمایشات میکروبی با فاصله ۷ روز انجام گردید (Khaleghi et al., 2013).

## جدول ۱- تیمارهای تحقیق

Table 1- Research treatments

| Treatments | Sodium nitrite (mg/kg)            | Nanocapsules carrying astaxanthin (mg/kg)            |
|------------|-----------------------------------|--|
| تیمارها    | نیتريت سدیم (میلی‌گرم بر کیلوگرم) | نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین (میلی‌گرم بر کیلوگرم) |

|         |     |     |
|---------|-----|-----|
| Control | -   | -   |
| A       | 120 | -   |
| B       | -   | 120 |
| C       | 90  | 30  |
| D       | 60  | 60  |
| E       | 30  | 90  |

### ترکیب شیمیایی نمونه‌های سوسیس

سنجش ترکیب شیمیایی سوسیس‌های فرموله شده با مقادیر مختلف نیتريت سدیم و نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین شامل پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر (در روز صفر) بر اساس روش AOAC انجام شد (AOAC, 2016).

### ارزیابی شاخص تیوباربتوریک‌اسید (TBARS<sup>6</sup>)

به منظور اندازه‌گیری شاخص تیوباربتوریک‌اسید، ابتدا ۵ گرم نمونه در لوله‌هایی با حجم ۵۰ میلی‌لیتر با ۱۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه هم‌وزن گردید. یک میلی‌لیتر از محلول حاصل جداسازی و در لوله‌ای جداگانه با ۵۰ میکرولیتر بوتیل‌هیدروکسی‌تولون و ۲ میلی‌لیتر تیوباربتوریک‌اسید/تری‌کلرواستیک‌اسید (۲۰ میلی‌مولار تیوباربتوریک‌اسید + ۱۵ درصد وزنی حجمی تری‌کلرواستیک‌اسید) مخلوط شد. مخلوط حاصل پس از ورتکس، به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری با دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از طی شدن زمان مذکور، به مخلوط اجازه داده شد تا در دمای محیط خنک شود. در مرحله بعد، مخلوط مذکور ابتدا ورتکس و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد و دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و جذب نوری لایه بالایی در طول موج ۵۳۱ نانومتر قرائت شد. شاهد نیز حاوی ۱ میلی‌لیتر آب دیونیزه و ۲ میلی‌لیتر محلول تیوباربتوریک‌اسید/تری‌کلرواستیک‌اسید بود. مقادیر تیوباربتوریک‌اسید تیمارها بر حسب میلی‌گرم مالون دی‌آلدهید بر کیلوگرم سوسیس گزارش شد (Nam and Ahn, 2003).

### تعیین عدد پراکسید تیمارها (PV<sup>7</sup>)

به منظور سنجش عدد پراکسید تیمارها، ابتدا ۶۰ میلی‌لیتر کلروفرم و ۶۰ میلی‌لیتر متانول به دکانتور حاوی ۱۵ گرم نمونه اضافه گردید. بعد از ۲۴ ساعت با افزودن ۳۶ میلی‌لیتر آب مقطر به دکانتور اجازه داده شد تا سه فاز تشکیل شود. ۲۰ میلی‌لیتر از فاز زیرین به یک ارلن منتقل و با ۲۵ میلی‌لیتر کلروفرم و استیک‌اسید (با نسبت ۳ به ۲) ترکیب شد. در مرحله بعد ۰/۵ میلی‌لیتر یدور پتاسیم و ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر به ترکیب حاصل اضافه شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف نشاسته ۱٪ وارد ارلن و درب آن بسته شد. بعد از تکان دادن ارلن، ید آزاد شده رنگ محلول را تغییر داد. در انتها محلول حاصل با تیوسولفات ۰/۰۱ نرمال تیترو و عدد پراکسید از رابطه زیر بر حسب میلی‌اکی‌والان اکسیژن در کیلوگرم چربی محاسبه شد. در این رابطه V حجم تیوسولفات مصرفی، N نرمالیت و w وزن نمونه روغن است (Egan et al., 1997).

$$\text{meqO}_2/\text{kg} = 100 \cdot \text{VN}/\text{W}$$

### تعیین مواد از ته فرار (TVB-N<sup>8</sup>)

به منظور اندازه‌گیری میزان مواد از ته فرار در تیمارها، ابتدا ۱۰ گرم نمونه، ۲ گرم اکسید منیزیم و ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و چند عدد گوی شیشه‌ای به بالن هضم دستگاه کلدال اضافه شد. سپس در ارلن گیرنده (زیر میرد) مقدار ۲۵ میلی‌لیتر اسیدبوریک ۲ درصد و چند قطره معرف اضافه شد. در مرحله بعد بالن دستگاه تحت حرارت به مدت ۱۰ دقیقه به جوش آمد و عمل تقطیر از همین زمان تا ۲۵۰ دقیقه انجام شد. پس از قطع حرارت، محلول تقطیر شده به وسیله اسیدسولفوریک ۰/۱ نرمال تیترو شد. در نهایت میزان مواد از ته فرار در سوسیس‌ها فرموله شده از رابطه زیر محاسبه شد. در این رابطه، V حجم اسید ۰/۱ نرمال مصرفی است (Goulas et al., 2005).

$$\text{TVB-N (mg/100g)} = 14 \times V$$

### اندازه‌گیری pH تیمارها

به منظور سنجش pH نمونه‌های سوسیس، ابتدا ۸ میلی‌لیتر آب مقطر به ۲ گرم نمونه اضافه و به مدت یک دقیقه هم‌وزن شد. اندازه‌گیری pH مخلوط حاصل با استفاده از دستگاه پی‌اچ متر دستی (Oakton, Malaysia) انجام شد (AOAC, 2016).

<sup>6</sup> Thiobarbituric acid reactive substance

<sup>7</sup> Peroxide value

<sup>8</sup> Total volatile basic nitrogen

## ارزیابی رنگ و تغییرات آن در سوسیس

آنالیز رنگ برای نمونه‌های سوسیس با استفاده از دستگاه رنگ‌سنج (IMG- pardazesh cam- system XI) در سیستم CIE انجام گرفت. شاخص‌های مورد استفاده  $L^*$ ،  $a^*$ ،  $b^*$  (به ترتیب شاخص روشنی، قرمزی، زردی) بودند (Kunte et al., 1997).

## ارزیابی ویژگی‌های حسی سوسیس فرموله‌شده

به منظور ارزیابی خواص حسی از تعداد ۱۵ نفر از کارشناسان صنایع غذایی متشکل از ۷ مرد و ۸ زن با بازه سنی ۲۵ تا ۴۰ سال (شاغل در کارخانه) استفاده شد (ارزیابان از قبل، آموزش‌های تئوری و عملی لازم جهت امتیازدهی و تشخیص ویژگی‌های حسی را گذرانده بودند). تیمارهای تحقیق پس از سرخ‌شدن در روغن سرخ‌کردنی در دمای محیط سرد شدند. سوسیس‌ها به قطعات با ضخامت ۵ سانتی‌متر برش و در ظروف یکبار مصرف قرار داده شدند. ارزیابی حسی به وسیله آزمون هدونیک ۹ نقطه‌ای (۹: بسیار مناسب، ۸: تا حدود زیادی مناسب، ۷: مناسب، ۶: نسبتاً مناسب، ۵: نه مناسب و نه نامناسب، ۴: نسبتاً نامناسب، ۳: نامناسب، ۲: تا حدود زیادی نامناسب، ۱: بسیار نامناسب) انجام شد (Khaleghi et al., 2013).

## تجزیه و تحلیل آماری

پژوهش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا و به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One way Anova) و آزمون دانکن (در سطح اطمینان ۹۵ درصد) استفاده شد. از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۲) برای آنالیز داده‌ها و نرم‌افزار EXCEL (نسخه ۲۰۱۹) جهت رسم جداول و اشکال استفاده گردید. لازم به ذکر است که آزمون‌های مورد بررسی به منظور ارزیابی خصوصیات مختلف تیمارها در سه تکرار انجام شدند.

## نتایج

### ویژگی‌های فیزیکی نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین

نتایج مربوط به خواص فیزیکی نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین در جدول ۲ ارائه شده است. مطابق این جدول میانگین سایز ذرات  $269.1 \pm 3.95$  نانومتر، شاخص پراکندگی آن‌ها  $0.423 \pm 1.28$  و پتانسیل زتای سطح نانوکپسول‌ها  $+46.71 \pm 2.88$  میلی‌ولت است. همچنین بازده ریزپوشانی فرایند  $85.19 \pm 4.09$  درصد ثبت شد. در پژوهش صفری و همکاران (۱۴۰۱) که رنگدانه فیکوسیانین استخراج‌شده از میکروجلیک اسپیرولینا با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات سدیم نانو ریزپوشانی و در فرمولاسیون بستنی استفاده شد، نانوکپسول‌های تولیدشده دارای میانگین سایز  $397.1$  نانومتر بودند که نسبت به نانوکپسول‌های تحقیق حاضر اندازه‌ای بزرگتر داشتند. همچنین در تحقیق مذکور بازده ریزپوشانی فرایند  $73/41$  درصد ثبت شد که به صورت قابل ملاحظه‌ای کمتر از این شاخص در پژوهش حاضر می‌باشد.

جدول ۲- خواص فیزیکی نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین

Table 2- Physical properties of nanocapsules carrying astaxanthin

| Physical properties                                       | Level             |
|---|-------------------|
| خواص فیزیکی   | سطح               |
| Average particle size (nm)<br>میانگین سایز ذرات (نانومتر) | $269.1 \pm 3.95$  |
| Particle dispersity index<br>شاخص توزیع اندازه ذره‌ای     | $0.423 \pm 1.28$  |
| Zeta potential (mv)<br>پتانسیل زتا (میلی‌ولت)             | $+46.71 \pm 2.88$ |
| Encapsulation efficiency (%)<br>بازده ریزپوشانی (درصد)    | $85.19 \pm 4.09$  |

## ترکیب شیمیایی تیمارها

جدول ۳، ترکیب شیمیایی شاهد و سوسیس‌های فرموله‌شده با مقادیر مختلف نیتريت سدیم و نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین را نشان می‌دهد (مربوط به روز صفر). مطابق این جدول، میزان تقریبی پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر سوسیس‌ها به ترتیب ۱۸/۱، ۱۵، ۶۱ و

۵/۱ درصد است. ضمن اینکه شاهد و تیمارهای فرموله شده از نظر ترکیب شیمیایی اختلاف قابل ملاحظه‌ای نداشتند ( $p > 0.05$ ). در تحقیقی که از آستاگزانتین در فرمولاسیون سوسیس‌های گوشت خوک استفاده شد، مقادیر پروتئین، چربی و رطوبت تیمارها به ترتیب حدود ۱۵، ۱۴/۵ و ۶۱ درصد گزارش شد که میزان پروتئین این سوسیس‌ها از تیمارهای تحقیق حاضر کمتر است (Mohammadpourfard *et al.*, 2021). سوسیس‌های تولیدشده (گوشت گوساله) در پژوهش Nourbehesht و همکاران (۲۰۱۹) به ترتیب دارای حدود ۳۳، ۱۹ تا ۳۰، ۵۴ تا ۶۱ و ۶ درصد پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر بودند که مقادیر پروتئین و چربی این سوسیس‌ها از سوسیس‌های تحقیق حاضر بیشتر است. ترکیب شیمیایی سوسیس به میزان و نوع مواد اولیه (بخصوص گوشت و چربی) جهت تولید بستگی دارد و احتمالاً علت اختلاف در ترکیب شیمیایی تیمارهای تحقیق حاضر با سوسیس‌های تولیدشده در دو پژوهش مذکور مربوط به این مورد است.

### جدول ۳- ترکیب شیمیایی تیمارهای تحقیق

Table 3- Chemical composition of research treatments

| Treatments | Protein                  | Fat                     | Moisture                | Ash                    |
|------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| تیمارها    | پروتئین                  | چربی                    | رطوبت                   | خاکستر                 |
| Control    | 18.21±0.75 <sup>a</sup>  | 14.95±0.28 <sup>a</sup> | 61.12±1.19 <sup>a</sup> | 5.12±0.14 <sup>a</sup> |
| A          | 18.01±1.66 <sup>a</sup>  | 14.89±0.63 <sup>a</sup> | 60.98±1.49 <sup>a</sup> | 5.18±0.15 <sup>a</sup> |
| B          | 18.25±0.98 <sup>a</sup>  | 14.93±0.81 <sup>a</sup> | 61.08±0.52 <sup>a</sup> | 5.15±0.27 <sup>a</sup> |
| C          | 18.09±0.84 <sup>a</sup>  | 15.03±0.24 <sup>a</sup> | 61.01±0.74 <sup>a</sup> | 5.16±0.31 <sup>a</sup> |
| D          | 18.1±0.0.57 <sup>a</sup> | 14.9±1.39 <sup>a</sup>  | 60.92±1.15 <sup>a</sup> | 5.14±0.29 <sup>a</sup> |
| E          | 18.24±0.63 <sup>a</sup>  | 15.02±0.21 <sup>a</sup> | 61.04±0.11 <sup>a</sup> | 5.19±0.46 <sup>a</sup> |

- حروف یکسان در هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است ( $p > 0.05$ ).
- Control: بدون نیتريت سدیم و نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین، A: حاوی ۱۲۰ mg/kg نیتريت سدیم، B: حاوی ۱۲۰ mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین، C: حاوی ۹۰ mg/kg نیتريت سدیم + ۳۰ mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین، D: حاوی ۶۰ mg/kg نیتريت سدیم + ۶۰ mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین، E: حاوی ۳۰ mg/kg نیتريت سدیم + ۹۰ mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین
- The same letters in each column indicate that there is no difference between the data ( $p > 0.05$ ).
- Control: without sodium nitrite and nanocapsules carrier astaxanthin, A: 120 mg/kg sodium nitrite, B: 120 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, C: 90 mg/kg sodium nitrite + 30 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, D: 60 mg/kg sodium nitrite + 60 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, E: 30 mg/kg sodium nitrite + 90 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin

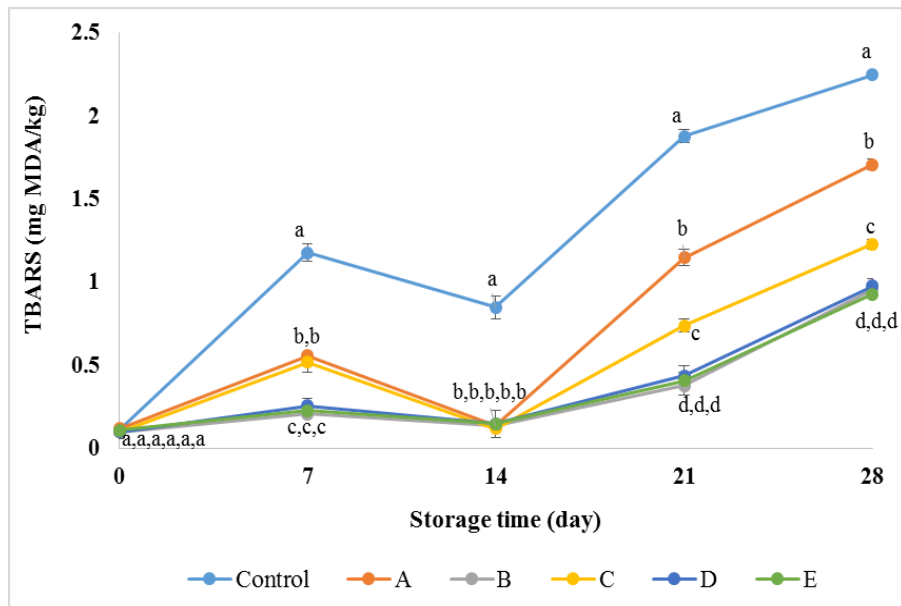
### بررسی روند فساد اکسیداتیو سوسیس‌ها

#### عدد تیوباریتوریک اسید (TBARS)

عدد تیوباریتوریک‌اسید، شاخصی جهت سنجش اکسیداسیون چربی‌ها و در واقع میلی‌گرم مالون‌دی‌آلدهید تولیدشده در یک کیلوگرم نمونه است که در پایان اکسیداسیون چربی‌ها تولید می‌گردد. شکل ۱ روند تغییرات شاخص تیوباریتوریک‌اسید را در تیمارهای تحقیق نشان می‌دهد. مطابق این شکل طی روزهای نگهداری، حداکثر ( $p < 0.05$ ) شاخص تیوباریتوریک‌اسید در تیمار شاهد و حداقل ( $p < 0.05$ ) آن در تیمارهای B، D و E ثبت شد. در واقع تیمارهای مذکور از نظر شاخص مورد بررسی طی دوره نگهداری فاقد اختلاف معنی‌دار بودند ( $p > 0.05$ ). در ادامه مشخص شد در روز ۱۴، همه تیمارهای فرموله‌شده از نظر عدد تیوباریتوریک‌اسید در یک سطح قرار دارند ( $p > 0.05$ ). مطابق نتایج، دو تیمار A و C تا اواسط دوره (روز ۱۴)، مقادیر تیوباریتوریک‌اسید برابری داشتند و نمودار آن‌ها بر هم منطبق بود ( $p > 0.05$ ) اما از روز ۱۴ به بعد، اختلاف این دو تیمار از نظر شاخص مورد نظر معنی‌دار شد و تیمار C سطح تیوباریتوریک‌اسید کمتری نشان داد ( $p < 0.05$ ). یافته‌های این بخش نشان داد که نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین در زمینه جلوگیری از فساد اکسیداتیو (کاهش تیوباریتوریک‌اسید)، قوی‌تر از نیتريت سدیم هستند. به این صورت که تیمار حاوی ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین (B) نسبت به تیمار دارای ۱۲۰ میلی‌گرم نیتريت سدیم (A) در طول دوره نگهداری همواره حاوی تیوباریتوریک‌اسید کمتری بوده است. همچنین مقادیر تیوباریتوریک‌اسید دو تیمار A و C در روزهای ۱۴ به بعد نشان داد که اگر فقط ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم حد مجاز نیتريت سدیم کم و با نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین جایگزین شود (C)، نتایج مطلوب‌تری در زمینه کنترل فساد اکسیداتیو ثبت خواهد شد. این یافته‌ها موید آن هستند که آستاگزانتین یک آنتی‌اکسیدان بسیار قوی است که در مقدمه به تفصیل به آن اشاره شد (Miki, 1991). اگرچه تیمارهای حاوی ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم نیتريت سدیم (E و D) هم با تیمار حاوی صرفاً نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین از نظر مقابله با فساد اکسیداتیو توانایی یکسانی داشتند اما به دلیل مضر بودن نیتريت



سدیم برای سلامتی، دیگر نیازی به این جایگزینی نیست (البته اگر هدف صرفاً مقابله با فساد اکسیداتیو باشد). نتایج پژوهشی که طی آن از آستاگزانتین خالص در فرمولاسیون سوسیس خوک جهت افزایش ماندگاری در دمای یخچال استفاده شد نشان داد که تیمار حاوی آستاگزانتین در کل دوره، محتوی تیوباریتوریک‌اسید کمتری است که این یافته با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد (Seo *et al.*, 2021). در تحقیق دیگری از آستاگزانتین در فرمولاسیون سوسیس پروبیوتیک استفاده شد و طی ۴۵ روز نگهداری در دمای یخچال، فرایند فساد اکسیداتیو ارزیابی گردید. یافته‌ها حاکی از کاهش معنی‌دار عدد تیوباریتوریک‌اسید در تیمار حاوی آستاگزانتین نسبت به شاهد بود (Mohammadpourfard *et al.*, 2021). Abdelmalek و همکاران (۲۰۱۶) طی تحقیقی از آستاگزانتین استخراج‌شده از میگو جهت تأخیر در فساد استیک مرغ نگهداری‌شده در دمای یخچال (به مدت ۷ روز) استفاده کردند. نتایج نشان داد که تیمار حاوی آستاگزانتین نسبت به شاهد به صورت معنی‌داری حاوی مقادیر کمتری از تیوباریتوریک‌اسید است و لذا این رنگدانه می‌تواند فساد اکسیداتیو را به تأخیر بیندازد که این نتیجه هم یافته‌های پژوهش حاضر را تأیید می‌کند. حد مجاز تیوباریتوریک‌اسید در فرآورده‌های گوشتی ۱ یا ۲ میلی‌گرم مالون‌دی‌آلدهید بر کیلوگرم است (Moarefian *et al.*, 2011). البته برخی از محققین معتقدند در مواد غذایی با کیفیت بالا، خوب و قابل مصرف، میزان این شاخص به ترتیب باید کمتر از ۳، ۵ و ۸ میلی‌گرم مالون‌دی‌آلدهید بر کیلوگرم باشد. در مورد فرآورده‌های شیلاتی (دریایی)، میزان تیوباریتوریک‌اسید کمتر از ۳ میلی‌گرم در کیلوگرم نمونه قابل قبول است (Cadun *et al.*, 2005). بنابر این اطلاعات، همه تیمارهای فرموله‌شده تا روز ۲۸ از نظر شاخص مذکور در حد استاندارد قرار دارند. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، شاخص تیوباریتوریک‌اسید همه تیمارها در روز ۱۴ کاهش محسوسی داشته است. این یافته با سایر تحقیقات انجام‌شده در این زمینه مطابقت دارد (Ghiretti *et al.*, 1997; Georgantelis *et al.*, 2007). این مورد می‌تواند دلایل مختلفی داشته باشد. Moerck و Ball (۱۹۷۴) اعتقاد دارند که تخریب مالون‌دی‌آلدهید حد فاصل روزهای ۹ تا ۲۳ بوسیله برخی از میکروارگانیسم‌ها علت کاهش تیوباریتوریک‌اسید است. دلیل احتمالی دیگر مربوط به اکسیداسیون مالون‌دی‌آلدهید به الکل و اسید می‌باشد که در نتیجه آن مالون‌دی‌آلدهید لازم برای واکنش با تیوباریتوریک‌اسید کاهش می‌یابد (Fernández-López, 1997). ضمن اینکه واکنش مالون‌دی‌آلدهید با ترکیبات قندی و پروتئینی سوسیس می‌تواند موجب کاهش ماده جهت واکنش با تیوباریتوریک‌اسید شود (Georgantelis *et al.*, 2007).



شکل ۱- مقادیر تیوباریتوریک اسید تیمارهای تحقیق طی دوره نگهداری (میلی گرم مالون دی آلدیید بر کیلوگرم)

- حروف متفاوت در هر روز نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین داده‌ها است ( $p < 0.05$ ).
- Control: بدون نیتريت سدیم و نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین، A: حاوی ۱۲۰ mg/kg نیتريت سدیم، B: حاوی ۱۲۰ mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین، C: حاوی ۹۰ mg/kg نیتريت سدیم + ۳۰ mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین، D: حاوی ۶۰ mg/kg نیتريت سدیم + ۶۰ mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین، E: حاوی ۳۰ mg/kg نیتريت سدیم + ۹۰ mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین

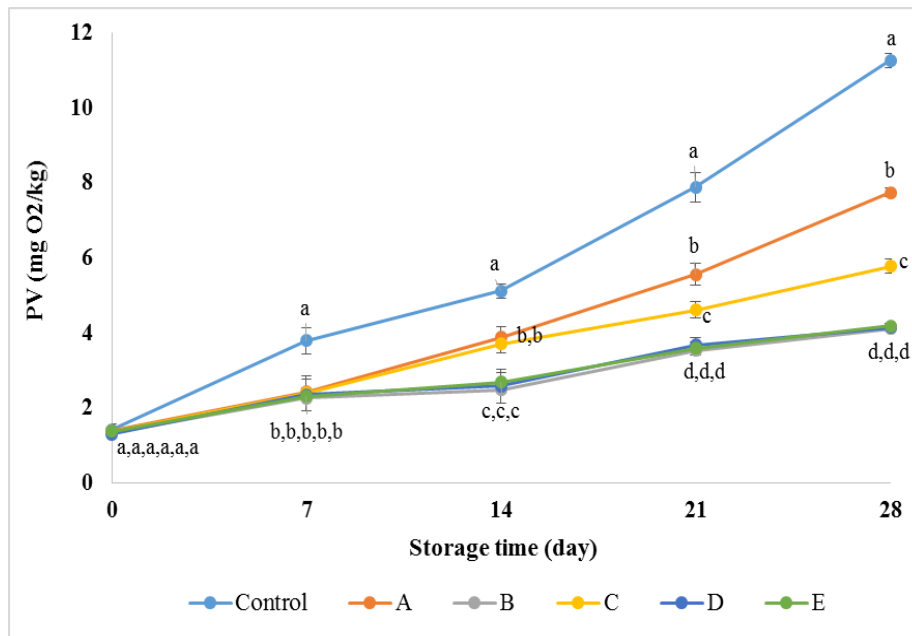
Figure 1- TBARS value of research treatments during the storage period (mg MDA/Kg)

- Different letters in each day indicate significant difference between the data ( $p < 0.05$ ).
- Control: without sodium nitrite and nanocapsules carrier astaxanthin, A: 120 mg/kg sodium nitrite, B: 120 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, C: 90 mg/kg sodium nitrite + 30 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, D: 60 mg/kg sodium nitrite + 60 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, E: 30 mg/kg sodium nitrite + 90 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin

#### عدد پراکسید (PV)

عدد پراکسید شاخصی جهت تشخیص میزان هیدروپراکسیدها که محصولات اولیه اکسیداسیون چربی‌ها هستند، می‌باشد. در شکل ۲ مقادیر عدد پراکسید سوسیس‌های فرموله‌شده و شاهد ارائه شده است. همانطور که در این شکل مشاهده می‌شود، بیشترین ( $p < 0.05$ ) مقادیر عدد پراکسید طی دوره نگهداری مربوط به شاهد و کمترین ( $p < 0.05$ ) حد این شاخص مربوط به تیمارهای B، D و E است و این تیمارها در این زمینه فاقد اختلاف معنی دار هستند ( $p > 0.05$ ). البته تا روز ۷، تیمارهای A و C نیز با سه تیمار مذکور از نظر عدد پراکسید اختلاف معنی داری نشان ندادند ( $p > 0.05$ ). اما از روز ۷ به بعد، این اختلاف معنی دار شد ( $p < 0.05$ ). مطابق شکل ۲، دو تیمار A و C در روز ۱۴ هم عدد پراکسید یکسانی داشتند ( $p > 0.05$ ) اما در روزهای ۲۱ و ۲۸، اختلاف عدد پراکسید این دو تیمار معنی دار شد و تیمار A، عدد پراکسید بیشتری نشان داد ( $p < 0.05$ ). یافته‌های عدد پراکسید نیز مانند تیوباریتوریک اسید موید آن است که کارایی نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین در مهار فرایند فساد اکسیداتیو بسیار بیشتر از نیتريت سدیم است. نتایج نشان داد که اگر از ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین، تا حد ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با نیتريت سدیم در فرمولاسیون سوسیس جایگزین شود، قدرت این محصول در مقابله با فساد اکسیداتیو تغییری نخواهد کرد. اما از آنجا که در شاخص پراکسید هم تیمار حاوی صرفاً نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین (۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) نسبت به تیمار دارای صرفاً نیتريت سدیم (۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در زمینه مقابله با فساد اکسیداتیو موثرتر بود، و با توجه به مضرات نیتريت سدیم، دیگر نیازی به جایگزینی نیست (البته اگر هدف صرفاً مقابله با فساد اکسیداتیو باشد). Seo و همکاران (۲۰۲۱) در پژوهشی به منظور مقابله با فساد اکسیداتیو سوسیس خوک طی ۲۱ روز نگهداری در دمای یخچال ( $4 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد)، از آستاگزانتین در فرمولاسیون محصول استفاده کردند. یافته‌های تحقیق مذکور نشان داد که عدد پراکسید تیمار حاوی آستاگزانتین در طول دوره نگهداری به صورت معنی داری کمتر از شاهد و از ۲/۱۴ در روز یک تا ۶/۵۲ میلی‌اکی‌والان پراکسید بر کیلوگرم لیپید در روز ۲۱ متغیر بود. در تحقیق حاضر، حداکثر مقادیر پراکسید در تیمارهای فرموله‌شده (روز ۲۸) حدود ۴/۱۵ (در تیمارهای B، D و E)، ۵/۷۸ (تیمار C) و ۷/۷۵ (تیمار A) میلی‌اکی‌والان پراکسید بر کیلوگرم لیپید ثبت شد. این شاخص در شاهد از ۱/۴۲ (روز صفر)

تا ۱۱/۲۸ (روز ۲۸) میلی‌اکی‌والان پراکسید بر کیلوگرم لیپید متفاوت بود. حد مجاز عدد پراکسید برای مواد غذایی چرب مانند سوسیس، ۲۵ میلی‌گرم پراکسید در کیلوگرم لیپید است (Sallam *et al.*, 2004). بنابراین همه تیمارهای تحقیق (حتی شاهد) در طول مدت نگهداری از نظر عدد پراکسید در بازه استاندارد قرار دارند. ضمن اینکه هیدروپراکسیدها به تنهایی موجب تغییرات در طعم، بو و مزه محصول نمی‌شوند اما تجزیه آن‌ها به ترکیبات ثانویه مانند آلدهیدها، خواص حسی سوسیس‌ها را تحت تاثیر قرار خواهد داد.



شکل ۲- عدد پراکسید تیمارهای تحقیق طی دوره نگهداری (میلی گرم اکسیژن بر کیلوگرم)

- حروف متفاوت در هر روز نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است ( $p < 0.05$ ).
- Control: بدون نیتريت سدیم و نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین، A: حاوی ۱۲۰ mg/kg نیتريت سدیم، B: حاوی ۱۲۰ mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین، C: حاوی ۹۰ mg/kg نیتريت سدیم + ۳۰ mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین، D: حاوی ۶۰ mg/kg نیتريت سدیم + ۶۰ mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین، E: حاوی ۳۰ mg/kg نیتريت سدیم + ۹۰ mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین

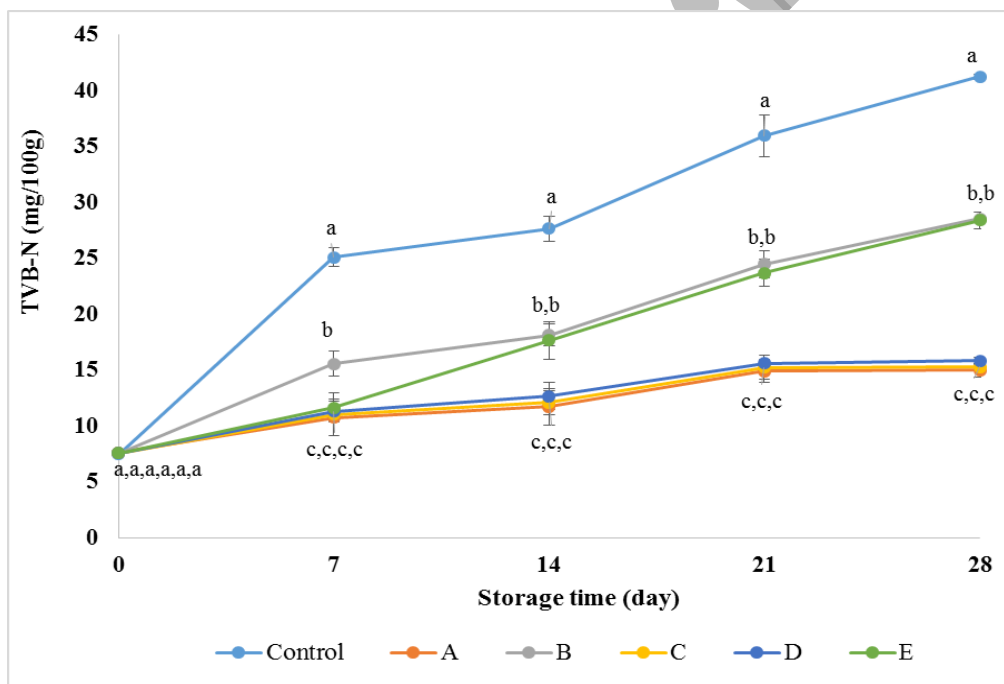
Figure 2- Peroxide value of research treatments during the storage period (mg O<sub>2</sub> /Kg)

- Different letters in each day indicate significant difference between the data ( $p < 0.05$ ).
- Control: without sodium nitrite and nanocapsules carrier astaxanthin, A: 120 mg/kg sodium nitrite, B: 120 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, C: 90 mg/kg sodium nitrite + 30 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, D: 60 mg/kg sodium nitrite + 60 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, E: 30 mg/kg sodium nitrite + 90 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin

### بازهای ازته فرار (TVB-N)

بازهای ازته فرار حاصل فساد و تجزیه مولکول‌های پروتئینی و اسیدهای آمینه هستند که در اثر فعالیت‌های میکروبی و آنزیم‌های اتولیتیک تولید می‌شوند. از جمله این بازها می‌توان به آمونیاک، آمونوم، مونومتیل‌آمین، دی‌متیل‌آمین، تری‌متیل‌آمین، نوکلئوتیدها و ... اشاره که تجمع آن‌ها در سوسیس می‌تواند ویژگی‌های کیفی آن (طعم، بو و مزه) را تحت تاثیر قرار دهد (Duan *et al.*, 2010). شکل ۳، میزان بازهای ازته فرار تیمارهای تحقیق را نشان می‌دهد. مطابق این شکل، بیشترین میزان مواد ازته فرار در طول دوره نگهداری در تیمار شاهد و کمترین مقادیر این شاخص در تیمارهای A، C و D ( $p > 0.05$ ) ثبت شد ( $p < 0.05$ ). در واقع سه تیمار مذکور از نظر مواد ازته فرار در کل دوره نگهداری اختلاف معنی‌داری نداشتند ( $p > 0.05$ ). تیمار E نیز تا روز ۷ از این نظر با سه تیمار مذکور اختلاف قابل ملاحظه‌ای ارائه نکرد ( $p > 0.05$ ). اگر چه مقادیر بازهای ازته فرار در تیمار E نسبت به تیمار B کمتر بود اما این اختلاف فقط در روز ۷ به صورت معنی‌دار ثبت شد ( $p < 0.05$ ). در تیمار شاهد، میزان بازهای ازته فرار از روز ۷ به بعد از حد مجاز که در واقع ۲۵ میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه است (Gimenez *et al.*, 2002; Kilincceker *et al.*, 2009) عبور کرد. حتی اگر حداکثر مجاز این شاخص را ۳۵-۳۰ میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه در نظر بگیریم (Jeya *et al.*, 2005)، باز هم در روزهای مذکور تیمار شاهد برای مصرف، استاندارد نیست چرا که در روزهای ۲۱ و ۲۸ میزان شاخص مورد بررسی به ترتیب ۳۵/۹۸ و ۴۱/۲۶ میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه اندازه‌گیری شده است. اما در

تیمارهای فرموله‌شده در کل دوره نگهداری مقادیر بازهای ازته فرار در بازه استاندارد قرار دارد که این یافته موید آن است که نیتريت سدیم و نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین چه به صورت منفرد و چه به صورت ترکیبی قادر به مهار فعالیت‌های میکروبی فسادزا هستند. حداکثر مقادیر بازهای ازته فرار در تیمارهای فرموله‌شده تحقیق پیش‌رو (روز ۲۸) حدود ۱۵/۵ (تیمارهای A، C و D) و ۲۸/۵ میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه (تیمارهای B و E) ثبت شد. برخلاف دو شاخص سنجش فساد اکسیداتیو که یافته‌های مربوطه نشان از کارایی بیشتر نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین نسبت به نیتريت سدیم داشت، در شاخص بازهای ازته فرار مشخص شد که نیتريت سدیم قدرت بالاتری برای مقابله با فساد میکروبی دارد. با توجه به این نتیجه و همچنین کارایی نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین در کنترل بازهای ازته فرار، جایگزینی بخشی از نیتريت سدیم با نگهدارنده طبیعی مورد بررسی توجیه‌پذیر است. نتایج تحقیق پیش‌رو نشان داد که اگر از ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم حد مجاز نیتريت سدیم تا حد ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آن با نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین جایگزین گردد، ترکیب حاصل، همان قدرت ضد میکروبی ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیتريت سدیم را دارد. نکته مهم در این بخش این است که با توجه به مفید بودن آستاگزانتین برای سلامتی و متعاقباً عدم وجود محدودیت در میزان مصرف، اگر نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین در غلظتی بالاتر از ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در سوسیس استفاده شوند (به شرط عدم تغییر خواص حسی)، شاید دیگر نیازی به نیتريت سدیم و جایگزینی نباشد. البته این احتمال می‌تواند به عنوان موضوعی برای تحقیقات آتی محققین مورد ارزیابی قرار گیرد. بر فرض که اگر چنین نتیجه‌ای تأیید گردد، باید مقرون‌به‌صرفه بودن تولید نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین نسبت به قیمت تجاری نیتريت سدیم نیز بررسی شود. در تحقیقی که خصوصیات میکروبی سوسیس پروبیوتیک حاوی مقادیر مختلف آستاگزانتین، تیمول و نیتريت بررسی شد، مشخص شد که میزان بازهای ازته فرار در تیمار دارای آستاگزانتین به صورت قابل ملاحظه‌ای کمتر از شاهد است که این یافته هم مانند تحقیق حاضر، قابلیت آستاگزانتین را برای مقابله با فساد میکروبی تأیید کرد (Mohammadpourfard *et al.*, 2021).



شکل ۳- مقادیر بازهای ازته فرار تیمارهای تحقیق طی دوره نگهداری (میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم)

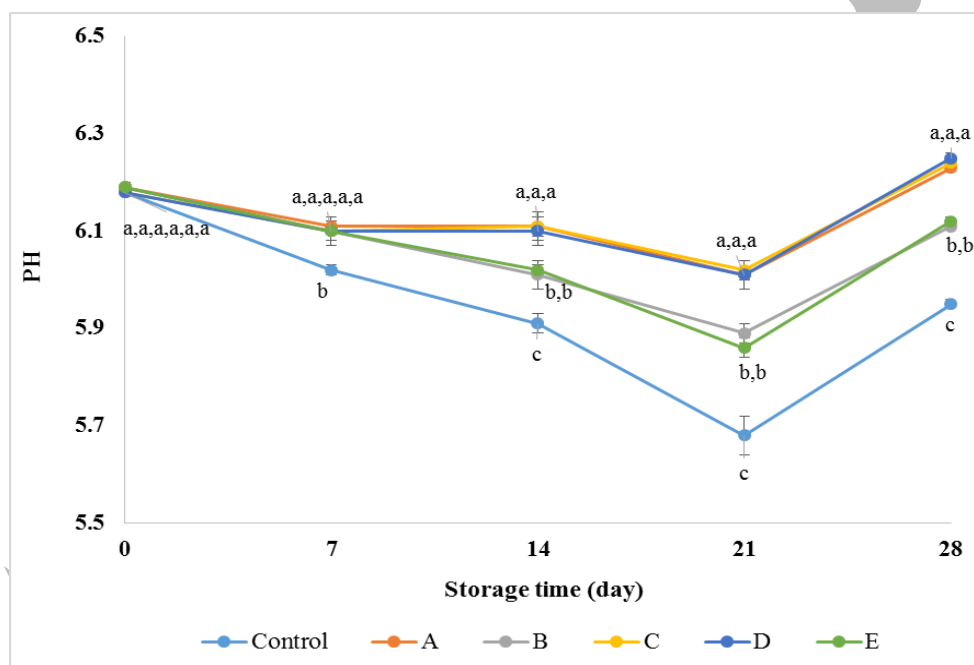
- حروف متفاوت در هر روز نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است ( $p < 0.05$ ).
- Control: بدون نیتريت سدیم و نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین، A: حاوی ۱۲۰ mg/kg نیتريت سدیم، B: حاوی ۱۲۰ mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین، C: حاوی ۹۰ mg/kg نیتريت سدیم + ۳۰ mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین، D: حاوی ۶۰ mg/kg نیتريت سدیم + ۶۰ mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین، E: حاوی ۳۰ mg/kg نیتريت سدیم + ۹۰ mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین

Figure 3- TVB-N value of research treatments during the storage period (mg/100g)

- Different letters in each day indicate significant difference between the data ( $p < 0.05$ ).
- Control: without sodium nitrite and nanocapsules carrier astaxanthin, A: 120 mg/kg sodium nitrite, B: 120 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, C: 90 mg/kg sodium nitrite + 30 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, D: 60 mg/kg sodium nitrite + 60 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, E: 30 mg/kg sodium nitrite + 90 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin

## PH

نتایج مربوط به pH تیمارهای تحقیق طی دوره نگهداری در شکل ۴ ارائه شده است. مطابق این شکل بیشترین میزان pH ( $p < 0.05$ ) در کل دوره مربوط به تیمارهای A، C و D است و این سه تیمار با یکدیگر اختلاف معنی‌داری از نظر pH ندارند ( $p > 0.05$ ). البته دو تیمار B و E نیز تا روز ۷، مقادیر برابر با سه تیمار مذکور ارائه کردند ( $p > 0.05$ ) اما در روزهای بعد، اختلافات این دو دسته تیمار معنی‌دار شد و تیمارهای B و E ضمن عدم اختلاف معنی‌دار با یکدیگر ( $p > 0.05$ )، pH کمتری نسبت به تیمارهای A، C و D نشان دادند ( $p < 0.05$ ). کمترین میزان pH نیز در کل دوره نگهداری در شاهد ثبت شد ( $p < 0.05$ ). در تیمارهای فرموله‌شده در طول دوره نگهداری میزان pH در بازه ۵/۸۵ تا ۶/۲۵ قرار داشت که این یافته با پژوهش Nourbehesht و همکاران (۲۰۱۹) مطابقت دارد. همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، میزان pH شاهد و تیمارهای فرموله‌شده در روز ۲۱ با شیب تندی کاهش یافت. دلیل احتمالی این مورد می‌تواند تولید اسیدهای آلی توسط باکتری‌ها و همچنین اکسیداسیون لیپید و ایجاد ترکیبات اسیدی باشد (Liu *et al.*, 2009). افزایش pH پس از روز ۲۱ را می‌توان به افزایش فعالیت باکتری‌هایی نظیر انتروباکتریاسه و سودوموناس‌ها و همچنین مخمرها و کپک‌ها نسبت داد که در نتیجه فعالیت‌های این میکروارگانیسم‌ها، پروتئین‌ها تجزیه و ترکیبات افزایش‌دهنده pH مانند آمونیوم، آمونیاک، تری‌متیل‌آمین تولید می‌شوند (Georgantelis *et al.*, 2007; Kilincceker *et al.*, 2009). کاهش تند pH در میانه دوره نگهداری و سپس افزایش آن در سایر تحقیقات نیز گزارش شده است (Sallam *et al.*, 2004; Georgantelis *et al.*, 2007).



شکل ۴- pH تیمارهای تحقیق در طول دوره نگهداری

- حروف متفاوت در هر روز نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است ( $p < 0.05$ ).
- Control: بدون نیتريت سدیم و نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین، A: حاوی ۱۲۰ mg/kg نیتريت سدیم، B: حاوی ۱۲۰ mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین، C: حاوی ۹۰ mg/kg نیتريت سدیم + ۳۰ mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین، D: حاوی ۶۰ mg/kg نیتريت سدیم + ۶۰ mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین، E: حاوی ۳۰ mg/kg نیتريت سدیم + ۹۰ mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین

Figure 4- pH of research treatments during the storage period

- Different letters in each day indicate significant difference between the data ( $p < 0.05$ ).
- Control: without sodium nitrite and nanocapsules carrier astaxanthin, A: 120 mg/kg sodium nitrite, B: 120 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, C: 90 mg/kg sodium nitrite + 30 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, D: 60 mg/kg sodium nitrite + 60 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, E: 30 mg/kg sodium nitrite + 90 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin

## ارزیابی رنگ تیمارها

رنگ فرآورده‌های گوشتی و به طور کلی محصولات غذایی بر بازارپسندی آن تاثیر بسزایی دارد. جدول ۴، شاخص‌های رنگی سوسیس‌های فرموله‌شده و شاهد را در روزهای صفر و ۲۸ نشان می‌دهد. مطابق این جدول با اضافه‌کردن نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین و نیتريت-

سدیم به فرمولاسیون، شاخص‌های روشنایی ( $L^*$ ) و زردی ( $b^*$ ) در همه تیمارهای فرموله‌شده نسبت به شاهد (روز صفر) کاهش یافتند ( $p < 0.05$ )، اما شاخص قرمزی ( $a^*$ ) به صورت معنی‌داری بیشتر شد ( $p < 0.05$ )، در بین تیمارهای فرموله‌شده، دو تیمار B و E از نظر هر سه شاخص رنگی اختلاف معنی‌داری نداشتند ( $p > 0.05$ )، وضعیت مشابهی بین تیمارهای A، C و D ثبت شد ( $p > 0.05$ ) اما مقادیر هر سه شاخص رنگی در این سه تیمار، بیشتر از تیمارهای B و E بود ( $p < 0.05$ )، مقایسه شاخص‌های رنگی تیمارها در روزهای صفر و ۲۸ نشان داد که در تیمارهای فرموله‌شده، شاخص‌های رنگی در طول دوره نگهداری، ثابت و بدون تغییر معنی‌دار باقی ماندند ( $p > 0.05$ ) اما این شاخص‌ها در شاهد به صورت قابل ملاحظه‌ای کاهش یافتند ( $p < 0.05$ )، احتمالاً عدم تغییر رنگ در تیمارهای فرموله‌شده به دلیل حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدان و ضد میکروب است که از فساد محصول و متعاقباً از تغییر رنگ آن طی دوره نگهداری جلوگیری می‌کنند. نتایج این بخش نشان داد که اولاً؛ نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین به تنهایی می‌توانند به ارتقا و بهبود شاخص رنگی سوسیس کمک کنند اما از این نظر قابلیت کمتری نسبت به نگهدارنده سنتتیک نیتريت سدیم دارند. دوماً؛ اگر از ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیتريت سدیم (حد مجاز) تا حد ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین جایگزین شود، شاخص‌های رنگی محصول حاصل با تیماری که صرفاً حاوی ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیتريت سدیم است، برابری می‌کنند؛ ضمن اینکه از مضرات نیتريت سدیم کم و به ایمنی سوسیس برای سلامتی اضافه می‌شود.

Abdelmalek و همکاران (۲۰۱۶) طی تحقیقی به منظور بهبود رنگ استیک مرغ (نگهداری‌شده در دمای یخچال به مدت ۷ روز) از آستاگزانتین استخراج‌شده از ضایعات میگو<sup>۹</sup> در فرمولاسیون استفاده کردند. نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از آستاگزانتین تغییر معنی‌داری در شاخص‌های رنگی ایجاد نمی‌کند که این یافته مغایر با نتیجه تحقیق حاضر است. در پژوهش دیگری که از آستاگزانتین در فرمولاسیون سوسیس امولسیون‌شده استفاده شد، کاهش شاخص روشنایی و افزایش شاخص قرمزی گزارش شد که این نتیجه با پژوهش پیش رو مطابقت دارد (Seo et al., 2021).

#### جدول ۴- ارزیابی شاخص‌های رنگی تیمارهای تحقیق

Table 4- Color indices evaluation of research treatments

| Treatments<br>تیمارها | Time (day)<br>زمان (روز) | $L^*$<br>روشنایی        | $a^*$<br>قرمزی          | $b^*$<br>زردی           |
|-----------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Control               | 0                        | 65.28±0.05 <sup>a</sup> | 6.84±0.01 <sup>c</sup>  | 25.63±0.21 <sup>a</sup> |
|                       | 28                       | 41.73±0.64 <sup>d</sup> | 4.21±0.08 <sup>d</sup>  | 15.34±0.09 <sup>c</sup> |
| A                     | 0                        | 59.15±0.61 <sup>b</sup> | 14.38±0.19 <sup>a</sup> | 18.42±0.33 <sup>b</sup> |
|                       | 28                       | 58.97±0.76 <sup>b</sup> | 14.11±0.69 <sup>a</sup> | 18.21±0.84 <sup>b</sup> |
| B                     | 0                        | 54.12±0.47 <sup>c</sup> | 11.14±0.44 <sup>b</sup> | 12.14±0.48 <sup>d</sup> |
|                       | 28                       | 53.93±0.85 <sup>c</sup> | 11.12±0.71 <sup>b</sup> | 12.29±0.26 <sup>d</sup> |
| C                     | 0                        | 58.98±1.03 <sup>b</sup> | 14.33±0.64 <sup>a</sup> | 18.45±0.62 <sup>b</sup> |
|                       | 28                       | 58.95±0.77 <sup>b</sup> | 14.12±0.45 <sup>a</sup> | 18.11±0.84 <sup>b</sup> |
| D                     | 0                        | 59.12±1.06 <sup>b</sup> | 14.26±0.51 <sup>a</sup> | 18.15±0.39 <sup>b</sup> |
|                       | 28                       | 58.99±0.38 <sup>b</sup> | 14.21±0.85 <sup>a</sup> | 18.29±1.01 <sup>b</sup> |
| E                     | 0                        | 54.19±0.23 <sup>c</sup> | 11.11±0.75 <sup>b</sup> | 12.1±0.41 <sup>d</sup>  |
|                       | 28                       | 54.1±0.87 <sup>c</sup>  | 11.15±0.42 <sup>b</sup> | 11.96±0.53 <sup>d</sup> |

- حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است ( $p < 0.05$ ).
- Control: بدون نیتريت سدیم و نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین، A: حاوی ۱۲۰ mg/kg نیتريت سدیم، B: حاوی ۱۲۰ mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین، C: حاوی ۹۰ mg/kg نیتريت سدیم + ۳۰ mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین، D: حاوی ۶۰ mg/kg نیتريت سدیم + ۶۰ mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین، E: حاوی ۳۰ mg/kg نیتريت سدیم + ۹۰ mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین
- Different letters in each column indicate significant difference between the data ( $p < 0.05$ ).
- Control: without sodium nitrite and nanocapsules carrier astaxanthin, A: 120 mg/kg sodium nitrite, B: 120 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, C: 90 mg/kg sodium nitrite + 30 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, D: 60 mg/kg sodium nitrite + 60 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, E: 30 mg/kg sodium nitrite + 90 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin

<sup>9</sup> Parapenaeus longirostris

## ارزیابی حسی سوسیس‌ها

هر ترکیب سودمندی که با اهداف مختلف (آنتی‌اکسیدان، ضد میکروب، غنی‌کننده و ...) در فرمولاسیون مواد غذایی استفاده می‌شود تا جایی کارایی دارد که بر ویژگی‌های حسی آن ماده غذایی اثرات منفی اعمال نکند. به همین دلیل همواره در صنعت غذا ارزیابی حسی فرآورده‌های غذایی از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. نتایج ارزیابی حسی سوسیس‌های فرموله‌شده با مقادیر مختلف نیتريت سدیم و نانو کپسول‌های حامل آستاگزانتین در جدول ۵ ارائه شده است. همانطور که در این جدول مشاهده می‌شود سه تیمار A، C و D از نظر شاخص‌های رنگ، بو، طعم، بافت و پذیرش کلی اختلاف قابل ملاحظه‌ای نشان ندادند ( $p > 0.05$ ). در مورد شاخص بافت، تیمارهای B و E ( $p > 0.05$ ) نیز با سه تیمار مذکور اختلاف معنی‌داری نداشتند ( $p > 0.05$ ). این دو تیمار از نظر رنگ، بو، طعم و پذیرش کلی، امتیازهای تقریباً برابری کسب کردند ( $p > 0.05$ ). همچنین از نظر ارزیابان، این دو تیمار و شاهد از نظر شاخص‌های بو و طعم فاقد اختلاف معنی‌داری بودند ( $p > 0.05$ ). مطابق جدول ۵، همه تیمارهای فرموله‌شده در شاخص‌های رنگ، بافت و پذیرش کلی نسبت به شاهد امتیازات بیشتری کسب کردند ( $p < 0.05$ ). این وضعیت در تیمارهای A، C و D برای شاخص‌های بو و طعم نیز برقرار بود. به صورت خلاصه و مطابق یافته‌ها، تیمارهای A، C و D در همه شاخص‌های حسی مورد مطالعه و متعاقباً در پذیرش کلی در سطح بالاتری از شاهد و دو تیمار B و E قرار داشتند (به غیر از شاخص بافت که همه تیمارهای فرموله‌شده از نظر ارزیابان ارزش و امتیاز برابری داشتند).

نتایج این بخش موید آن است که بدون استفاده از ترکیب‌های بهبوددهنده و تثبیت‌کننده رنگ مانند نیتريت سدیم و نانو کپسول‌های حامل آستاگزانتین، رنگ سوسیس از نظر مصرف‌کننده قابل قبول نیست. همچنین وقتی از نسبت‌های ۳ (۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به ۱ (۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و ۱ (۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به ۱ (۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) نیتريت سدیم به نانو کپسول‌های حامل آستاگزانتین جهت بهبود رنگ سوسیس استفاده گردد (تیمارهای C و D)، از نظر ارزیابان، تاثیر آن (بر رنگ) با زمانی که نیتريت سدیم به تنهایی (۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) وارد فرمولاسیون شود، برابر است. این مورد نه تنها از نظر ارزیابان، بلکه از طریق رنگ‌سنجی با دستگاه هم تأیید شد که نتایج آن در بخش قبل ارائه گردید. به این طریق می‌توان نانو کپسول‌های حامل آستاگزانتین را جایگزین نیتريت سدیم کرد و مضرات این نگهدارنده سنتتیک و خطرناک را کاهش داد. نتایج دو شاخص بو و طعم نشان داد که اضافه کردن نانو کپسول‌های حامل آستاگزانتین به تنهایی (تیمار B) و با نسبت ۳ به ۱ به نیتريت سدیم (تیمار E) نمی‌تواند تغییر قابل توجهی در این دو شاخص نسبت به شاهد ایجاد کند. اما وقتی نسبت نانو کپسول به نیتريت سدیم به نسبت‌های ۱ به ۱ (C) و ۱ به ۱ (D) تغییر داده شود، دو شاخص مذکور مانند تیمار حاوی صرفاً نیتريت سدیم (A) بهبود می‌یابند و در واقع بالاترین امتیاز در پذیرش کلی نیز مربوط به همین نسبت‌ها (تیمارها) می‌باشد. مطابق امتیاز-دهی ارزیابان، هیچ اختلافی بین تیمارهای فرموله‌شده از نظر بافت وجود نداشت. البته اگر پارامترهای بافتی با دستگاه بافت‌سنج مورد ارزیابی قرار گیرد، شاید نتیجه دیگری در این زمینه گزارش گردد. جمع‌بندی بخش ارزیابی حسی نشان داد که به طور کلی همه تیمارهای فرموله‌شده از نظر شاخص‌های ارزیابی حسی و همچنین پذیرش کلی در وضعیت مناسب و تا حدود زیادی مناسب قرار داشتند که این نتیجه موید کارایی بالای نانو کپسول‌های حامل آستاگزانتین در جایگزینی نیتريت سدیم و کاهش اثرات مضر این نگهدارنده سنتتیک است. مقایسه شاخص‌های حسی مورد مطالعه در سوسیس‌ها در دو روز صفر و ۲۸ موید آن بود که خواص حسی تیمارهای فرموله‌شده بر خلاف شاهد در طول دوره نگهداری ثابت و بدون تغییر باقی می‌ماند ( $p > 0.05$ ). اما در تیمار شاهد، شاخص‌های رنگ و بافت در طول دوره نگهداری (۲۸ روز) با افت کیفیت و کاهش امتیاز مواجه شدند. با توجه به مثبت شدن نتایج تست‌های سنجش ایمنی سوسیس‌ها و ثبت انواع فساد در شاهد طی دوره نگهداری، دو شاخص بو و طعم در سوسیس‌ها در روز ۲۸ به دلیل احتمال آلودگی و انتقال بیماری مورد بررسی قرار نگرفتند.

## جدول ۵- ارزیابی حسی تیمارهای تحقیق

Table 5- Sensory evaluation of research treatments

| Treatments<br>تیمارها | Time (day)<br>زمان (روز) | Color<br>رنگ            | Smell<br>بو            | Taste<br>طعم           | Texture<br>بافت        | General acceptance<br>پذیرش کلی |
|-----------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|---------------------------------|
| Control               | 0                        | 3.61±0.45 <sup>c</sup>  | 7.05±0.19 <sup>b</sup> | 6.29±0.23 <sup>b</sup> | 5.25±0.04 <sup>a</sup> | 5.44±0.39 <sup>c</sup>          |
|                       | 28                       | 2.26±0.32 <sup>d</sup>  | -                      | -                      | 3.82±0.57 <sup>c</sup> | -                               |
| A                     | 0                        | 8.12±0.24 <sup>a</sup>  | 7.91±0.35 <sup>a</sup> | 8.23±0.12 <sup>a</sup> | 7.35±0.19 <sup>b</sup> | 7.95±0.21 <sup>a</sup>          |
|                       | 28                       | 8.1±0.32 <sup>a</sup>   | 7.87±0.24 <sup>a</sup> | 8.2±0.14 <sup>a</sup>  | 7.31±0.34 <sup>b</sup> | 7.93±0.23 <sup>a</sup>          |
| B                     | 0                        | 7.15 ±0.1 <sup>b</sup>  | 7.08±0.1 <sup>b</sup>  | 6.33±0.18 <sup>b</sup> | 7.21±0.57 <sup>b</sup> | 7.06±0.25 <sup>b</sup>          |
|                       | 28                       | 7.11 ±0.07 <sup>b</sup> | 7.03±0.09 <sup>b</sup> | 6.36±0.09 <sup>b</sup> | 7.32±0.71 <sup>b</sup> | 7.02±0.21 <sup>b</sup>          |
| C                     | 0                        | 8.11±0.06 <sup>a</sup>  | 7.88±0.11 <sup>a</sup> | 8.26±0.14 <sup>a</sup> | 7.25±0.43 <sup>b</sup> | 7.99±0.1 <sup>a</sup>           |
|                       | 28                       | 8.12±0.08 <sup>a</sup>  | 7.92±0.12 <sup>a</sup> | 8.23±0.16 <sup>a</sup> | 7.28±0.51 <sup>b</sup> | 7.96±0.12 <sup>a</sup>          |
| D                     | 0                        | 8.14±0.09 <sup>a</sup>  | 7.85±0.28 <sup>a</sup> | 8.25±0.11 <sup>a</sup> | 7.29±0.86 <sup>b</sup> | 7.92±0.15 <sup>a</sup>          |
|                       | 28                       | 8.11±0.12 <sup>a</sup>  | 7.89±0.19 <sup>a</sup> | 8.21±0.17 <sup>a</sup> | 7.3±0.62 <sup>b</sup>  | 7.95±0.17 <sup>a</sup>          |
| E                     | 0                        | 7.18±0.11 <sup>b</sup>  | 7.02±0.36 <sup>b</sup> | 6.31±0.32 <sup>b</sup> | 7.28±0.84 <sup>b</sup> | 7.09±0.08 <sup>b</sup>          |
|                       | 28                       | 7.14±0.18 <sup>b</sup>  | 7.05±0.15 <sup>b</sup> | 6.28±0.26 <sup>b</sup> | 7.24±0.49 <sup>b</sup> | 7.04±0.1 <sup>b</sup>           |

• حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین داده‌ها است ( $p < 0.05$ ).

• Control: بدون نیتريت سدیم و نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین، A: حاوی ۱۲۰mg/kg نیتريت سدیم، B: حاوی ۱۲۰mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین، C: حاوی ۹۰mg/kg نیتريت سدیم + ۳۰mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین، D: حاوی ۹۰mg/kg نیتريت سدیم + ۶۰mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین، E: حاوی ۳۰mg/kg نیتريت سدیم + ۹۰mg/kg نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین

- Different letters in each column indicate significant difference between the data ( $p < 0.05$ ).
- Control: without sodium nitrite and nanocapsules carrier astaxanthin, A: 120 mg/kg sodium nitrite, B: 120 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, C: 90 mg/kg sodium nitrite + 30 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, D: 60 mg/kg sodium nitrite + 60 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin, E: 30 mg/kg sodium nitrite + 90 mg/kg nanocapsules carrier astaxanthin

### نتیجه‌گیری کلی

نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات سدیم به عنوان یک محصول طبیعی و دارای خواص بسیار زیاد در حفظ سلامتی، کنترل و پیشگیری از بیماری‌های مختلف، کارایی بالایی جهت جایگزینی نگهدارنده مضر و شیمیایی نیتريت سدیم در فرمولاسیون سوسیس دارند. به این صورت که اگر ۳۰ تا ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از ۱۲۰mg/kg حد مجاز نیتريت سدیم در فرمولاسیون سوسیس با نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین جایگزین شود، محصول حاصل از نظر زمان ماندگاری، مقابله با فساد اکسیداتیو و میکروبی، شاخص‌های رنگی و خواص حسی همانند محصول حاوی ۱۲۰mg/kg نیتريت سدیم است. البته اگر صرفاً هدف مقابله با فساد اکسیداتیو باشد، دیگر نیازی به نیتريت سدیم نیست؛ چرا که مطابق نتایج، آستاگزانتین در این زمینه کارایی بیشتری نسبت به نیتريت سدیم دارد.

### تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تحت قرارداد با شماره ۰۳-۱۴۰۱-۰۳ انجام شد که به این وسیله سپاسگزاری می‌شود.

### منابع

1. Ambati, R. R., Siew Moi, P., Ravi, S., and Aswathanarayana, R. G. 2014. Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications—A review. *Marine Drugs*, 12(1), 128-152. <https://doi.org/10.3390/md12010128>
2. AOAC. Official Method of Analysis, 20<sup>th</sup> Edition. International AOAC, Virginia 2016.
3. Abdelmalek, B. E., Sila, A., Ghilissi, Z., Taktak, M. A., Ayadi, M. A., and Bougatef, A. 2016. The influence of natural astaxanthin on the formulation and storage of marinated chicken steaks. *Journal of Food Biochemistry*, 40(4), 393-403. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12224>



4. Cadun, A., Cakli, S., and Kisla, D. 2005. A study of marination of deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*, Lucas, 1846) and its shelf life. *Food Chemistry*, 90(1-2), 53-59. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.024>
5. Duan, J., Jiang, Y., Cherian, G., and Zhao, Y. 2010. Effect of combined chitosan-krill oil coating and modified atmosphere packaging on the storability of cold-stored lingcod (*Ophiodon elongates*) fillets. *Food Chemistry*, 122(4), 1035-1042.
6. Dong, S., Huang, Y., Zhang, R., Wang, S., and Liu, Y. 2014. Four different methods comparison for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. *The Scientific World Journal*, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2014/694305>
7. Dewati, P. R., Rohman, A., and Budiman, A. 2020. A Preliminary Study of Extraction and Purification Processes of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* a Natural Antioxidant. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 778, No. 1, p. 012032). IOP Publishing. <https://doi:10.1088/1757-899X/778/1/012032>
8. Egan, H., and Sawyer, R. 1997. Pearson's chemical Analysis of food. 9th. Edition, Edinburgh, Scotland, Churchill. Livingstone, UK, 609-634.
9. Fernández, J., Pérez-Álvarez, J. A., and Fernández-López, J. A. 1997. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry*, 59(3), 345-353.
10. Ferguson, L. R., Philpott, M., and Karunasinghe, N. 2004. Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology*, 198(1-3), 147-159. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.01.035>
11. Ghiretti, G. P., Zanardi, E., Novelli, E., Campanini, G., Dazzi, G., Madarena, G., and Chizzolini, R. 1997. Comparative evaluation of some antioxidants in salame Milano and mortadella production. *Meat Science*, 47(1-2), 167-176.
12. Gimenez, B., Roncales, P., and Beltran, J. A. 2002. Modified atmosphere packaging of filleted rainbow trout. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(10), 1154-1159. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1136>
13. Goulas, A. E., and Kontominas, M. G. 2005. Effect of salting and smoking-method on the keeping quality of chub mackerel (*Scomber japonicus*): biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry*, 93(3), 511-520. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.040>
14. Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G., and Georgakis, S. A. 2007. Effect of rosemary extract, chitosan and  $\alpha$ -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 C. *Meat Science*, 76(1), 172-181. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.10.026>
15. Irna, C., Jaswir, I., Othman, R., and Jimat, D. N. 2017. Document details. *International Food Research Journal*, 24, 508-513.
16. Jeya, S. R., Jeyasekaran, G., and Vijayalakshmi, S. K. 2005. Effect of vacuum packaging on the quality characteristics of seer fish (*Scomberomorus commersonii*) chunks during refrigerated storage. *Journal of Food Science and Technology*, 42(5), 438-443.
17. Kunte, L. A., Gennadios, A., Cuppett, S. L., Hanna, M. A., and Weller, C. L. 1997. Cast films from soy protein isolates and fractions. *Cereal Chemistry*, 74(2), 115-118. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.1997.74.2.115>
18. Kang, C. D., and Sim, S. J. 2007. Selective extraction of free astaxanthin from *Haematococcus* culture using a tandem organic solvent system. *Biotechnology Progress*, 23(4), 866-871. <https://doi.org/10.1021/bp0700354>
19. Kilincceker, O., Dogan, I. S., and Kucukoner, E. 2009. Effect of edible coatings on the quality of frozen fish fillets. *LWT-Food Science and Technology*, 42(4), 868-873. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.11.003>
20. Khaleghi, A., Rezaei K., Kasai, M., Khosravi, K., and Soleymani, M. 2013. Evaluation of antioxidant properties of *Berberis crataegina* extract on fat oxidation of beef sausages during refrigerated storage. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*, 7 (5), 345-353 [In Persian].
21. Liu, B. H., and Lee, Y. K. 2003. Effect of total secondary carotenoids extracts from *Chlorococcum* sp. on *Helicobacter pylori*-infected BALB/c mice. *International Immunopharmacology*, 3(7), 979-986. [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(03\)00096-1](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(03)00096-1)
22. Liu, D. C., Tsau, R. T., Lin, Y. C., Jan, S. S., and Tan, F. J. 2009. Effect of various levels of rosemary or Chinese mahogany on the quality of fresh chicken sausage during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 117(1), 106-113. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.083>
23. Liu, Z. W., Zeng, X. A., Cheng, J. H., Liu, D. B., and Aadil, R. M. 2018. The efficiency and comparison of novel techniques for cell wall disruption in astaxanthin extraction from *Haematococcus*

- pluvialis*. *International Journal of Food Science and Technology*, 53(9), 2212-2219. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13810>
24. Moerck, K. E., and Ball Jr, H. R. 1974. Lipid autoxidation in mechanically deboned chicken meat. *Journal of Food Science*, 39(5), 876-879. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1974.tb07265.x>
  25. Miki, W. 1991. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, 63(1), 141-146. <https://doi.org/10.1351/pac199163010141>
  26. Moarefian, M., Barzegar, M., and Sattari, M. 2013. *Cinnamomum zeylanicum* essential oil as a natural antioxidant and antibacterial in cooked sausage. *Journal of Food Biochemistry*, 37(1), 62-69. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2011.00600.x>
  27. Machado, A. R., Assis, L. M., Costa, J. A. V., Badiale-Furlong, E., Motta, A. S., Micheletto, Y. M. S., and Souza-Soares, L. A. 2014. Application of sonication and mixing for nanoencapsulation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in liposomes. *International Food Research Journal*, 21(6), 2201-2206.
  28. Mohammadpourfard, I., Khanjari, A., Akhonzadeh Basti, A., Herrero-Latorre, C., Shariatifar, N., and Hosseini, H. 2021. Evaluation of microbiological, chemical, and sensory properties of cooked probiotic sausages containing different concentrations of astaxanthin, thymol, and nitrite. *Food Science & Nutrition*, 9(1), 345-356. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2000>
  29. Nam, K. C., and Ahn, D. U. 2003. Use of antioxidants to reduce lipid oxidation and off-odor volatiles of irradiated pork homogenates and patties. *Meat Science*, 63(1), 1-8. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00043-8](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00043-8)
  30. Nourbehesht, N., Shekarchizadeh, H., and Soltanizadeh, N. 2019. Production and evaluation of low-fat frankfurter sausage by emulsion filled gel based on inulin and rice bran oil. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*, 14 (2), 85-94 [In Persian].
  31. Sallam, K. I., Ishioroshi, M., and Samejima, K. 2004. Antioxidant and antimicrobial effects of garlic in chicken sausage. *LWT-Food Science and Technology*, 37(8), 849-855. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.04.001>
  32. Sebranek, J. G., Sewalt, V. J. H., Robbins, K., and Houser, T. A. 2005. Comparison of a natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. *Meat Science*, 69(2), 289-296. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.07.010>
  33. Sarada, R., Vidhyavathi, R., Usha, D., and Ravishankar, G. A. 2006. An efficient method for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7585-7588. <https://doi.org/10.1021/jf060737t>
  34. Sun, W., Lin, H., Zhai, Y., Cao, L., Leng, K., and Xing, L. 2015. Separation, Purification, and Identification of (3S, 3' S)- trans-Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Separation Science and Technology*, 50(9), 1377-1383. <https://doi.org/10.1080/01496395.2014.976873>
  35. Suganya, V., and Asheeba, S. 2015. Antioxidant and antimicrobial activity of astaxanthin isolated from three varieties of crabs. *International Journal of Recent Scientific Research*, 6(10), 6753-6758.
  36. Seo, J. K., Parvin, R., Park, J., and Yang, H. S. 2021. Utilization of astaxanthin as a synthetic antioxidant replacement for emulsified sausages. *Antioxidants*, 10(3), 1-11. <https://doi.org/10.3390/antiox10030407>
  37. Safari, R., Mirbakhsh, M., Ghaffari, H., Reyhani Poul, S., Rahmati, R., and Ebrahimzadeh, M. 2022a. Effect of temperature, pH, and time factors on the stability and antioxidant activity of the extracted astaxanthin from *Haematococcus* microalgae (*Haematococcus pluvialis*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 31 (1), 109-120 [In Persian]. <http://dorl.net/dor/20.1001.1.10261354.1401.31.1.10.2>
  38. Safari, R., Raftani Amiri, Z., Reyhani Poul, S., and Ghaffari, H. 2022b. Nanoencapsulation of phycocyanin extracted from the alga *Spirulina* (*Spirulina platensis*) and use of resulting nanoparticles in ice cream formulation. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 123 (19), 145-159 [In Persian]. <http://dx.doi.org/10.52547/fsct.19.123.145>
  39. Tanaka, T., Morishita, Y., Suzui, M., Kojima, T., Okumura, A., and Mori, H. 1994. Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by the naturally occurring carotenoid astaxanthin. *Carcinogenesis*, 15(1), 15-19. <https://doi.org/10.1093/carcin/15.1.15>
  40. Tracy, R. P. 1999. Inflammation markers and coronary heart disease. *Current Opinion in Lipidology*, 10(5), 435-441. <https://doi.org/10.1097/00041433-199910000-00008>
  41. Toldrá, F., Aristoy, M. C., and Flores, M. 2009. Relevance of nitrate and nitrite in dry-cured ham and their effects on aroma development. *Grasas y Aceites*, 60(3), 291-296.

42. Uchiyama, K., Naito, Y., Hasegawa, G., Nakamura, N., Takahashi, J., and Yoshikawa, T. 2002. Astaxanthin protects  $\beta$ -cells against glucose toxicity in diabetic db/db mice. *Redox Report*, 7(5), 290-293. <https://doi.org/10.1179/135100002125000811>
43. Yuan, J. P., and Chen, F. 2000. Purification of trans-astaxanthin from a high-yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Food Chemistry*, 68(4), 443-448. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00219-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00219-8)

مجله دانش کشاورزی