تولید سوسیس تخمیری پروبیوتیک بعنوان غذایی فراسودمند با استفاده از سویه های لاکتوباسیلوس پلانتاروم ۲۹۹V و لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG

الهام عطار[۱]، سارا موحد[۲*]، مهناز مظاهری اسدی[۳]

۱- کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاداسلامی، واحد ورامین- پیشوا، گروه علوم و صنایع غذایی، ورامین، ایران.
۲- دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین- پیشوا، گروه علوم و صنایع غذایی، ورامین، ایران.
۳- دانشیار سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران ، گروه بیوتکنولوژی، تهران، ایران.

(تاریخ دریافت: ۹٤/۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹٤/٦/۳۱)

چکیده

در دهه های اخیر تقاضا برای مصرف غذاهای پروبیوتیک یا فراسودمند افزایش یافته است و تلاش های متعددی برای استفاده از آنها در محصولات گوشتی تخمیری شده است. هدف از تحقیق حاضر، تولید سوسیس های تخمیری پروبیوتیک با استفاده از باکتری های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم ۲۹۹V و لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG (با میزان تلقیح اولیه 10^{7} cfu/gr) بعنوان یک غذای فراسودمند و بررسی خواص شیمیایی ، میکروبی و حسی آنها بوده است.نتایج آزمون شیمیایی نشان داد که نمونه های پروبیوتیکی دارای بیشترین میزان درصد پروتئین و کمترین میزان درصد رطوبت نسبت به نمونه شاهد بودند.نتایج آزمون شمارش کلی باکتری های پروبیوتیک در زمان های مورد نظر، مشخص نمود که در نمونه های حاوی باکتری پروبیوتیک، 10^{6}-10^{7} سلول باکتریایی زنده در هر گرم از محصول نهایی وجود دارد.نتایج آزمون میکروبی شمارش باکتریهای غیر لاکتیک نشان داد که تیمارحاوی لاکتوباسیلوس پلانتاروم ۲۹۹V از بیشترین میزان و تیمار شاهد از کمترین میزان باکتریهای مذکور برخوردار بود.در محصولات نهایی کلیه نمونه ها،هیچ گونه اثری از وجود باکتری های پاتوژن مشاهده نگردید.نتایج ارزیابی ویژگی های حسی نشان داد که در اکثر موارد، نمونه‌های سوسیس تخمیری پروبیوتیک نسبت به نمونه شاهد از امتیاز بالاتری برخوردار بودند.

کلیدواژگان : سوسیس تخمیری، پروبیوتیک،لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس رامنوسوس

* مسئول مکاتبات: movahed@iauvaramin.ac.ir

۱- مقدمه

گوشت و فرآورده های آن یکی از منابع مهم پروتئین در رژیم غذایی افراد محسوب می شود و مصرف به اندازه آنها تامین کننده مواد مغذی مهم می باشد[۱]. اما امروزه بازار مصرف، شاهد افزایش تقاضا برای غذاهای عملگرا[1] نظیر غذاهای پروبیوتیک بوده است[۲]. فرآورده های غذایی پروبیوتیک به عنوان مواد غذایی ارتقاء دهنده سلامت مطرح هستند و از فواید سلامتی برخوردارند که به دلیل حضور سویه های زیستی باکتری های اسید لاکتیک (LAB) [2] می باشد[۳]. فرآورده های غذایی پروبیوتیک حدود ٦٠ تا ٧٠ درصد از کل مواد غذایی عملگرا را تشکیل می دهند[٤] . در سال 2001 سازمان جهانی غذا و کشاورزی[3] و نیز سازمان جهانی بهداشت[4] به یک تعریف مشترک رسیدند که "پروبیوتیک ها،میکروارگانیسم های زنده ای هستند و مصرف مقادیر کافی آن ها موجب بروز اثرات مفید بر سلامت میزبان می گردد [۸-۵].

سوسیس های تخمیری[5] فرآورده هایی هستند که از قطعات ریز و درشت گوشت خام،چربی،نمک طعام،نیتریت و ادویه جات تشکیل شده اند و پس از طی دوران رسیدن[6] به صورت دودی یا بدون آن خشک می شوند و نسبت به میزان درجه رسیدن، به دو دسته خشک[7] و نیمه خشک[8] تقسیم بندی می گردند.عموما سوسیس‌های تخمیری از pH کم (٥/٥-٤/٥) و فعالیت آبی[9] پایین(٠/٩>) برخوردار می باشند [۹].

محصولات گوشتی تخمیری، معمولا یا حرارت داده نمی شوند و یا از حرارت ملایمی برخوردارند که برای رشد باکتری های پروبیوتیک مناسب می باشند[۱۰،۱۱] . چنین ویژگی باعث افزایش زنده مانی باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس در دستگاه گوارش می شود[۱۲]. فعالیت و زنده ماندن پروبیوتیک ها در هنگام رسیدن به روده شرط لازم برای بروز اثرات سلامت بخشی آنها است،لذا غلظت 10^{6}-10^{7} باکتری پروبیوتیک زنده در هر گرم از محصول توصیه می شود [۱۳،۱٤]. کشت های آغازگر پروبیوتیک مناسب به دو طریق سبب افزایش ایمنی گوشت های تخمیری می شوند یا از فعالیت باکتریهای پاتوژن جلوگیری می کنند[٥] و یا سبب محدود کردن فعالیت آنها می گردند [۱٥].

در سال ۲۰۱۱ Radulović و همکاران از باکتری های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس هلوتیکوس RO52 و بیفیدوباکتریوم لانگوم RO175 بعنوان کشت آغازگر پروبیوتیکی و از کشت آغازگر Bactoferm T-SPX برای تولید نمونه شاهد استفاده نمودند.نتایج آزمون مشخص نمود که مقدار pH و ویژگی های حسی در نمونه های سوسیس پروبیوتیک و شاهد مشابه بود اما تا حدی بهترین عطر، طعم و بافت مربوط به نمونه سوسیس تولیدی با لاکتوباسیلوس هلوتیکوس RO52 بود[۱٦]. همچنین در سال ۲۰۱۱ Ruiz-Moyano و همکاران به بررسی استفاده ازسویه های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس فرمنتیوم HL.57 و پدیوکوکوس اسیدی لاکتیک SP79 در سوسیس های تخمیری خشک پرداختند.نتایج مشخص نمود که سوسیس های خشک تخمیری تولیدی می توانند به عنوان غذای فرا سودمند معرفی شوند[۷]. Rubio و همکاران نیز در سال ۲۰۱۳ به بررسی استفاده از استارتر کالچرهای پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم۲۹۹V و لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG در سوسیس‌های تخمیری اسپانیایی پرداختند. نتایج نشان داد که هر دو گونه فوق در مقادیر بالای تلقیح (10^{7} cfu/gr) باعث کاهش شدید pH و همچنین جلوگیری از رشد باکتری های پاتوژن در محصول نهایی شده بودند [۱۷]. هدف از تحقیق حاضر تولید سوسیس های تخمیری پروبیوتیک با استفاده از باکتریهای پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم۲۹۹V و لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG (میزان تلقیح اولیه cfu/gr 10^{7}) بود و در نهایت آزمون های شیمیایی ، میکروبی و حسی بر روی آنها صورت گرفت.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- استارتر میکروبی تجاری غیر پروبیوتیک و میکروارگانیسم های پروبیوتیک

- جهت تخمیر نمونه های شاهد و پروبیوتیک از استارترمیکروبی غیر پروبیوتیک Biobak K ساخت شرکت

1. Functional Food
2. Lactic Acid Bacteria
3. Food and Agriculture Organization (FAO)
4. World Health Organization (WHO)
5. Fermented Sausage
6. Maturation
7. Dry Fermented Sausage
8. Semi- Dry Fermented Sausage
9. Water activity

ویبرگ[1] المان استفاده گردید.این استارتر بـه شـکل لیـوفیلیزه و حاوی مخلوطی از ٤ گونه باکتریایی بنام هـای لاکتوباسـیلوس ساکئی،پدیوکوکوس پنتوساکسز، استافیلوکوکوس زایلوسوس و استافیلوکوکوس کارنوسوس می باشد که تعداد کل سلول های زنـده باکتریـایی در هـر بـسته اسـتارتر Biobak K بـیش از ١/٨ ×١٠E١٠cfu/gr بود.

- بـه منظـور تولیـد سوسـیس تخمیـری پروبیوتیـک از میکروارگانیـسم هـای پروبیوتیـک لاکتوباسـیلوس پلانتـاروم ٢٩٩V و لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG استفاده گردیـد کـه این میکروارگانیسم هـا بـشکل پـودر هـای لیـوفیلیزه شـده از شـرکت دانـش بنیـان زیـست تخمیـر ایـران خریـداری شدند.همچنین تعـداد کـل سـلول هـای زنـده در هـر گـرم از پودرهای پروبیوتیک مذکور معادل cfu/gr ١٠^٩ بود.

٢-٢-آماده سازی سوسیس

٧٣/٥٪ گوشت گاو منجمد و ١٥/٥٪ پی قلوه یا چربی گاو یخ زده ،به ترتیب با چرخ گوشت با منافذی به قطر ٢٠mm و ٥mm چرخ گردید و سپس با ترکیبات زیر مخلوط شدند:

٥/٥٪ یخ،١/٨٪ نمک تصفیه شده و آسیاب شده،٠/١٢٪ نیتریت سدیم،٣/٧٪ ادویه Sucuk Combi شرکت ویبرگ و ٠/٠٥٥٪ استارتر میکروبی غیر پروبیوتیک Biobak K .

پس از مخلوط کردن مواد با یکدیگر، خمیر گوشت حاصل بـه دو قسمت تقسیم شد،یک قسمت به دستگاه فیلر فرسـتاده شـد تا بعنوان نمونه شاهد داخل پوشش های فیبـروزی بـا قطـر ٤٠ میلیمتر پر گردد. مابقی خمیر نیز مجددا به سه قـسمت تقـسیم گردید که به دو قسمت آن بطـور جداگانـه ،پـودر هـای هـای پروبیوتیـک لاکتوباسـیلوس پلانتـاروم ٢٩٩V ولاکتوباسـیلوس رامنوسوس GG با غلظت تلقیح cfu/gr ١٠^٧ اضافه شـد و بـه بچ آخر نیز مخلوط دو پودر میکروبی لاکتوباسیلوس پلانتـاروم ٢٩٩V و لاکتوباسیلوس رامنوسـوس GG بـا غلظـت cfu/gr ١٠^٧ تلقیح شد[١٧]. سپس خمیر حاصل از سه بـچ بـه قـسمت فیلر فرستاده شد و داخل پوشـش هـای فیبـروزی بـا قطـر ٤٠ میلیمتر پر گردید.

تمامی سوسیس ها در دمای ℃٢٤-٢٥ و رطوبت نسبی ٧٠-٨٠ درصد بمدت ٢٤ ساعت تخمیر شدند تا pH آنها به محدوده ٥/٣ -٥/٥ برسد.سپس عملیات پخت در دمای ℃ ٦٨ صورت گرفت تا دمای مغز محصول به ℃ ٥٨- ٦٠ برسد پس از آن سوسیس ها بمدت ٢٤ ساعت در دمای℃ ٢٢-٢٣ و رطوبت نسبی ٦٠-٧٠ درصد قرار گرفتند تا دوره رسیدن را طی کنند و فعالیت آبی (a_W) آن ها به محدوده ٠/٩٣ - ٠/٩٥ برسد .در آخر نیز محصول تحت شرایط خلاء بسته بندی شد و بمدت یک ماه در سردخانه ℃ ٠-٤ نگهداری گردید. در جدول ١ به تیمارهای مورد آزمون در تحقیق اشاره شده است.

٢-٣- آزمون های شیمیایی

کلیه تیمارها در سه زمان صفر(پس از پر کردن خمیر به داخل پوشش)، پایان دوره تخمیر (٢٤ ساعت پس از پرکردن خمیر به داخل پوشش) و پایان دوره رسیدن(٢٤ ساعت پس از مرحله پخت) از لحاظ pH ، فعالیت آبی و رطوبت مورد ارزیابی شیمیایی قرار گرفتند.همچنین آزمون اندازه گیری پروتئین محصول نهایی در زمان پایان دوره رسیدن بر روی کلیه نمونه های سوسیس صورت پذیرفت. کلیه آزمون های شیمیایی با سه تکرار برای هر تیمار در زمان های مورد نظر انجام پذیرفت.

- اندازه گیری pH نمونه ها با استفاده از pH متر دیجیتالی(Cyberscan،سنگاپور) و بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ١٠٢٨ انجام پذیرفت.
- اندازه گیری میزان فعالیت آبی نمونه ها توسط دستگاه واتر اکتیویته(Novasina،سوئیس) و بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ٩٦٥٧ صورت پذیرفت.
- اندازه گیری میزان رطوبت نمونه ها مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ٧٤٥ انجام گردید.
- اندازه گیری پروتئین نمونه ها طبق روش کلدال و مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ٩٢٤ صورت گرفت.

٢-٤- آزمون های میکروبی

جهت انجام آزمون های میکروبی،تیمارهای حاوی باکتری های پروبیوتیک،در زمان های مختلف (زمان صفر،پایان دوره تخمیر و پایان دوره رسیدن) و نیز در روزهای پنجم،پانزدهم و سی ام نگهداری محصول در دمای ℃٤ ،از نظر شمارش کلی باکتری های پروبیوتیک مورد ارزیابی میکروبی قرار گرفتند.همچنین آزمون های شمارش کلی باکتری های غیر لاکتیک و شناسایی و شمارش باکتریهای پاتوژن در زمان پایان دوره رسیدن بر روی نمونه شاهد و تیمارهای حاوی باکتری های پروبیوتیک صورت پذیرفت.

1.Wiberg

Table 1 name of treatment tested in the study

Code of treatments	Descriptions
C	Control sausage inoculated with starter of Biobak k (*Lactobacillus sakei, Pediococcus pentosaceus, Staphylococcus carnosus, Staphylococcus xylosus*)
P_1	sausage inoculated with starter of Biobak k with the probiotic species of *Lactobacillus plantarum* 299V
P_2	sausage inoculated with starter of Biobak k with the probiotic species of *Lactobacillus rhamnosus* GG
P_3	sausage inoculated with starter of Biobak k with the probiotic species of *Lactobacillus plantarum* 299V and *Lactobacillus rhamnosus* GG

۲-٤-۱- شمارش کلی باکتری های پروبیوتیک در نمونه های سوسیس تخمیری پروبیوتیک

جهت بررسی شمارش کلی باکتری های پروبیوتیک در سوسیس های تخمیری پروبیوتیک،از محیط کشت MRS-Agar (Merck,Germany) حاوی ۰/۱۵ درصد نمک صفراوی استفاده گردید.وجود سدیم استات و آمونیوم سیترات باعث مهار رشد باکتری های گرم منفی، فلورهای دهانی و قارچ ها گردید و محیط مناسبی را برای رشد باکتری های پروبیوتیک فراهم کرد. pH محیط کشت مورد استفاده برابر۶/۲ بود.انکوباسیون در شرایط بی هوازی و در ۳۷ ℃ به مدت ۴۸-۷۲ ساعت صورت پذیرفت[۱۸].

۲-٤-۲-شمارش کلی میکروارگانیسم ها (باکتری های غیر لاکتیک) در نمونه های سوسیس تخمیری شاهد و پروبیوتیک

برای شمارش کلی میکروارگانیسم ها (باکتری های غیر لاکتیک) از محیط کشت Peptone - Agar (Merck,Germany) استفاده شد.انکوباسیون در شرایط هوازی و در ۳۰ ℃ به مدت ۲۴-۷۲ ساعت صورت پذیرفت[۱۹].

۲-٤-۳-شناسایی و شمارش باکتری های پاتوژن

شناسایی و شمارش باکتری های پاتوژن در نمونه های سوسیس،شامل موارد ذیل بود:

- شناسایی و شمارش کلیفرم مطابق استاندارد ملی ایران،شماره ۹۲۶۳ صورت گرفت.
- شناسایی و شمارش استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت مطابق استاندارد ملی ایران،شماره ۱-۶۸۰۶ انجام پذیرفت.
- شناسایی و شمارش اشریشیا کلی مطابق استاندارد ملی ایران، شماره ۲۹۴۶صورت گرفت.
- شناسایی و شمارش کپک و مخمر مطابق استاندارد ملی ایران، شماره ۲- ۱۰۸۹۹ انجام گرفت.

۲-۵- ارزیابی حسی

به منظور ارزیابی ویژگی های حسی نمونه های سوسیس از استانداردهای درون سازمانی شرکت گوشتیران استفاده گردید که طی آن ۱۰ نفر ارزیاب حسی (۵ نفر زن و ۵ نفر مرد) آموزش دیده از قبل توسط شرکت، با محدوده سنی ۴۰-۲۸ سال جهت انجام ارزیابی حسی معرفی گردیدند[۲۰، ۲۱]. نمونه های سوسیس تولید شده،توسط داوران حسی،از نظر ویژگی هایی نظیر ظاهر[1]، بافت (قابلیت جویدن و ترد بودن[2]) و میزان کام پذیری[3] مورد ارزیابی قرار گرفتند و برای هر کدام از فاکتورهای مذکور، از ۱ تا ۵ نمره داده شد[۲۲]. بطوریکه عدد یک نشان دهنده صفت خیلی خوب و عدد پنج نشاندهنده صفت خیلی ضعیف بود.این آزمون در اتاقی با درجه حرارت

1. Appearance
2. Tender
3. Mouth Feel

۲۵ درجه سلسیوس و با روشنایی کافی و بدون هرگونه بو انجام گرفت. ارزیابی حسی در سه زمان برای هر محصول انجام شد به طوریکه هر ارزیاب در هر مرتبه تمام محصولات را امتحان کرد.میانگین نمره های داده شده توسط ارزیاب ها برای هر نمونه یادداشت و در آنالیز آماری ثبت گردید[۲۳].

۲-٦- تجزیه و تحلیل آماری

برای انجام تحقیق از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی استفاده شد و با توجه به اینکه کلیه آزمون ها در تحقیق (شیمیایی،میکروبی و حسی) با سه تکرار برای ٤ تیمار انجام شد در مجموع ۱۲ واحد آزمایشی موجود بود.به منظور تجزیه و تحلیل داده ها از روش "ANOVA" و برای مقایسه میانگین ها واثرات متقابل تیمار و زمان از آزمون چند دامنه ای دانکن ، در سطح احتمال(٪ ۱ = α) و برای رسم نمودارها از نرم افزار"EXCEL" استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱-نتایج روند تغییرات شیمیایی pH و فعالیت آبی در طی فرآیند تولید

pH و فعالیت آبی (a_w) دو فاکتور اساسی جهت ارزیابی و کنترل دو مرحله اصلی (تخمیر و رسیدن)در تولید سوسیس های تخمیری شاهد و پروبیوتیک می باشند،بطوریکه می بایست محصول طی دوره تخمیر و رسیدن به حد مشخصی از pH و فعالیت آبی برسد.بدین ترتیب روند تغییرات این دو پارامتر در زمان های تعیین شده طی فرآیند تولید محصول مورد بررسی قرار گرفت و نتایج مقایسه میانگین اثرات تیمار و زمان بر تغییرات میزان pH و فعالیت آبی (a_w) در نمونه شاهد بهمراه سایر تیمارها بترتیب در شکل های ۱و۲ آورده شده است.

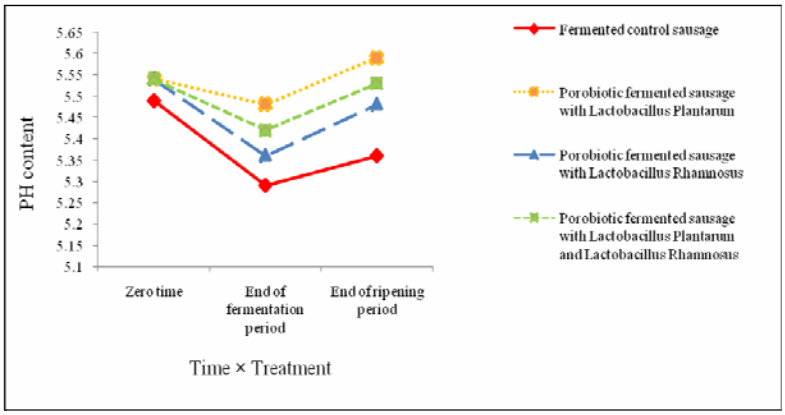

Fig 1 The results of mean comparison of interaction of treatment and time on pH changes in sausage samples

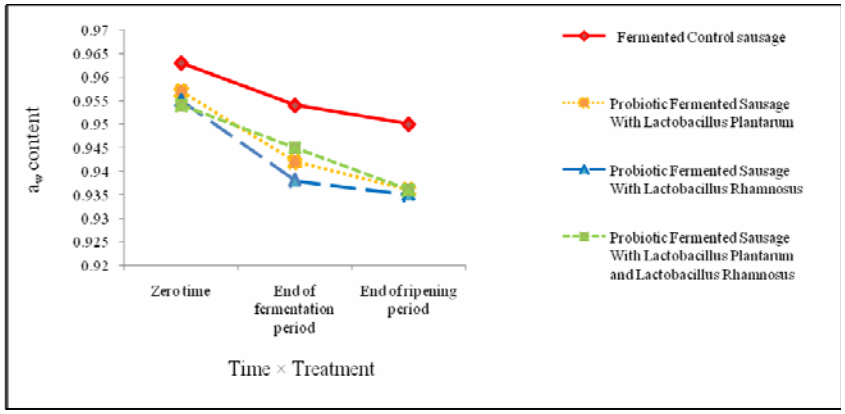

Fig 2 The results of mean comparison of interaction of treatment and time on a_w changes in sausage samples

۳-۲- نتایج آزمون شمیایی درصد رطوبت نمونه های سوسیس

نتایج مقایسه میانگین اثرات تیمار و زمان بر تغییرات میزان رطوبت در جدول ۲ نشان می دهد که در کلیه زمان ها ،تیمار شاهد(C) از بیشترین و سایر تیمارها P_1، P_2 وP_3 از کمترین میزان درصد رطوبت برخوردار بودند($P<0.01$).علت این امر فعالیت متابولیکی میکروارگانیسم های استارتر و پروبیوتیک موجود در نمونه ها می باشد زیرا میکروارگانیسم ها برای فعالیت های متابولیکی خود طی مرحله تخمیر به آب نیاز دارند از سویی بین تیمارهای پروبیوتیک، مطابق با شکل۱،تیمار P_2 نسبت به سایر تیمارها از کمترین میزان pH در طی دوره تخمیر برخوردار بوده که این ویژگی می تواند سبب کاهش ظرفیت پیوند با آب توسط پروتئین های گوشت شود و بدین ترتیب سرعت از دست رفتن رطوبت تسهیل شده و در نتیجه میزان درصد رطوبت در این تیمار به لحاظ کمی، کمتر گردیده است.

همانطور که در جدول ۲ مشاهده می شود،طی دوره رسیدن ،میزان رطوبت تمامی نمونه ها کاهش یافته است.علت این امر می تواند مربوط به از دست دادن رطوبت محصول، طی فرآیند پخت باشد که متعاقبا سبب کاهش فعالیت آبی (مطابق شکل۲) محصول نیز می گردد. همچنین وجود پوشش فیبروز مصرفی در نمونه ها و کاهش رطوبت نسبی هوای اطراف محصول در مرحله رسیدن نسبت به مرحله تخمیر دلیل دیگری برای کاهش درصد رطوبت محصول بوده است.مهم تر از دلایل دیگر،فرآیند کاهش pH در اثر تخمیر در نمونه های مذکور می باشد که سبب از دست دادن رطوبت و کاهش فعالیت آبی(مطابق شکل۲) محصولات شده است[۲٤]. نتایج حاصل با نتایج تحقیقات Dalmis & Soyer در سال ۲۰۰۸ مطابقت داشت که گزارش نمودند در سوسیس های تخمیری ترکی حرارت دیده حاوی استارتر ترکیبی آغازگر استافیلوکوکوس زایلوسوس و پدیوکوکوس پنتوسایسز ، میزان رطوبت نمونه ها در پایان دوره رسیدن کاهش یافته است[۲۵].

Table 2 The results of mean comparison of interaction of treatment and time on water content in sausage samples (٪)

Treatment/time	Zero time	End of fermentation period	End of ripening period
C	67/2±0/01[a]	64/91±0/03[a]	62/98±0/01[c]
P_1	63/8±0/02[b]	66/22±0/02[c]	61/87±0/02[d]
P_2	63/7±0/03[b]	62/05±0/01[c]	60/45±0/03[e]
P_3	63/7±0/01[b]	62/34±0/02[c]	61/45±0/02[d]

Means with similar letters, according to Duncan test at 1% difference is not significant.

۳-۳- نتایج آزمون شیمیایی درصد پروتئین نمونه های سوسیس

نتایج مقایسه میانگین میزان پروتئین در تیمارهای مختلف در جدول۳ نشان می دهد که در تیمارهای حاوی باکتریهای پروبیوتیک،از لحاظ میزان درصد پروتئین هیچ گونه اختلاف معنی داری وجود نداشته اما بین آنها با تیمار شاهد(C) تفاوت معنی داری مشاهده شد($P<0.01$) ضمن آن که تیمار شاهد(C) از کمترین و سایر تیمارهای P_1، P_2 وP_3 از بیشترین میزان درصد پروتئین برخوردار بودند. علت این امر از دست دادن بیشتر رطوبت محصول در حین دوره تخمیر و پخت / رسیدن می باشد که باعث افزایش میزان ماده خشک محصول و در نتیجه افزایش میزان درصد پروتئین آنها شده است.

Table 3 The results of mean comparison of interaction of treatment on protein content in sausage samples (٪)

Treatment/time	C	P_1	P_2	P_3
Mean of protein (%)	17/73±0/1[b]	17/90±0/1[a]	17/98±0/2[a]	17/92±0/2[a]

In each row, has the same letters as mean of Duncan, at 1%, the difference was not significant.

٣-٤- نتایج آزمون شیمیایی نسبت رطوبت به پروتئین در نمونه های سوسیس

نتایج مقایسه میانگین نسبت رطوبت به پروتئین در تیمارهای مختلف در جدول ٤ نشان می دهد که در کلیه تیمارها،نسبت رطوبت به پروتئین بین ١ تا ٣/٦ بوده ضمن آنکه بین نمونه شاهد با سایر تیمارها (عدم تفاوت معنی دار با یکدیگر) اختلاف معنی دار مشاهده گردید($P<0.01$).

نتایج حاصل با تحقیقات تبعه امامی و همکاران در سال ١٣٧٦ مطابقت داشت که ارائه نمودند نسبت رطوبت به پروتئین در سوسیس های تخمیری حاوی سوش های آغازگر لاکتوباسیلوس پلانتاروم PTCC١٠٥٨ و پدیوکوکوس اسید لاکتیک PTCC١٤٢٤ ، بین ١ تا ٣/٧ بوده است[٢٦]. Toldra در سال ٢٠٠٧ نسبت رطوبت به پروتئین را در سوسیس های نیمه خشک تخمیری بین ١ تا ٣/٧ معرفی نمود[٢٧]. همچنین Ercoskun در سال ٢٠٠٦ نسبت رطوبت به پروتئین را در سوسیس های تخمیری سوجوک(نوعی سوسیس تخمیری ترکی) نیمه خشک بین ١ تا ٣/٦ عنوان نمود که با نتایج تحقیق حاضر تطابق داشت[٢٨].

Table 4 The results of mean comparison of ratio water to proteins

Treatment/time	C	P_1	P_2	P_3
Mean ratio water to protein	3/6677^{a}	3/4988^{b}	3/4516^{b}	3/4871^{b}

In each row, has the same letters as mean of Duncan, at 1%, the difference was not significant.

٣-٥-نتایج آزمون میکروبی شمارش باکتری های پروبیوتیک در نمونه های سوسیس

نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل تیمار و زمان بر شمارش باکتری های پروبیوتیک در جدول ٥ مشخص می کند که بیشترین میزان متعلق به تیمار P_1 بوده و در اکثر موارد دارای اختلاف معنی دار با سایر تیمارها می باشد($P<0.01$).همچنین کمترین میزان میانگین صفت مذکور مربوط به تیمارهای P_2 و P_3 بود.نتایج بیانگر این مطلب می باشد که باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم ٢٩٩V سازگاری بیشتری نسبت به باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG در محیط گوشتی داشته است.همچنین طبق جدول مذکور مشخص گردید که بین دو گروه زمانی T_0 و T_1 با T_2،T_5، T_{15}و T_{30} از نظر شمارش باکتری های پروبیوتیک اختلاف معنی داری وجود داشته است که به وجود شوک حرارتی در مرحله پخت و در نتیجه کاهش نسبی تعداد باکتری های پروبیوتیک مربوط می باشد.

Table 5 The results of mean comparison of interaction of treatment and time on total count of probiotic bacteria in samples of sausage (cfu/gr)

T_{30}	T_{15}	T_5	T_2	T_1	T_0	Treatment/time
0/4×107±0/43^{e}	0/4×107±0/26^{e}	0/5×107±0/27^{e}	0/5×107±0/34^{e}	2/5×107±0/51^{b}	2/7×107±0/74^{a}	P_1
0/5×107±0/54^{e}	0/5×107±0/15^{e}	0/5×107±0/81^{e}	0/5×107±0/35^{e}	2/2×107±0/52^{d}	2/4×107±0/53^{bc}	P_2
0/3×107±0/68	0/3×107±0/95^{f}	0/3×107±0/54^{f}	0/3×107±0/72^{f}	2/3×107±0/43^{cd}	2/5×107±0/42^{b}	**P_3**

Means with similar letters, according to Duncan test at 1% difference is not significant.

T_0: zero time (when Farsh enters into the cover), T_1: end of fermentation period, T_2: end of ripening period, T_5: fifth day of the product storage, T_{15}: the fifteenth day of the product storage, T_{30}: thirtieth day during product storage

٣-٦- نتایج آزمون میکروبی شمارش کلی باکتریهای غیر لاکتیکی در نمونه های سوسیس

نتایج مقایسه میانگین شمارش کلی باکتری های غیر لاکتیکی در تیمار های مختلف در جدول ٦ مشخص می کند که بیشترین میانگین صفت مذکور مربوط به تیمار P_1 و دارای

تفاوت معنی دار با سایر تیمارها و کمترین میانگین آن متعلق به تیمار شاهد (C) و P_2 (عدم تفاوت معنی دار با یکدیگر) بوده است.علت این امر کاهش pH در اثر واکنش های تخمیری است که زمینه رشد میکروارگانیسم ها را نامساعد نموده است همچنین دلیل دیگر تولید مواد باکتری کش به وسیله سوش های آغازگر و باکتریهای پروبیوتیک می باشد.علاوه بر این عوامل، کاهش رطوبت در طول رسیدن که کاهش فعالیت آبی را به دنبال دارد،از عوامل مهم کاهش میکروارگانیسم های بیماریزا محسوب می گردد. همانطور که در آنالیزهای قبلی مشاهده شد تیمار P_1 از میانگین pH ،رطوبت و فعالیت آبی بیشتری نسبت به سایر تیمارها برخوردار بوده بنابراین داشتن بیشترین میانگین شمارش کلی باکتری های غیر لاکتیک در این تیمار امری طبیعی می باشد.

Table 6 The results of mean comparison of interaction of treatment and time on total count of Non-lactic bacteria in samples of sausage (cfu/gr)

P_3	P_2	P_1	C	Treatment/time
$5/9\times10^7\pm1/51^b$	$10^7\pm0/84^c$	$7\times10^7\pm1/51^a$	$10^7\pm0/97^c$	Mean of total count of Non-lactic bacteria (cfu/gr)

In each row, has the same letters as mean of Duncan, at 1%, the difference was not significant.

۳-۷- نتایج آزمون های میکروبی باکتری های پاتوژن در نمونه های سوسیس

نتایج حاصل از آزمون های میکروبی باکتری های پاتوژن مشخص کرد که در هیچ یک از تیمارهای مورد آزمون اثری از باکتری های کلیفرم و استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت مشاهده نشد(مقادیر زیر حد تشخیص cfu/gr ۱۰>). همچنین مطابق با آزمایشات انجام شده مشخص گردید که در هیچ یک از تیمارها،اثری از باکتری پاتوژن اشریشیاکلی (عدم حضور در هر گرم از نمونه) و همچنین کپک و مخمر (مقادیر کمتر از ۳۳/۳۳ کلنی در هر گرم از نمونه) مشاهده نگردید.کاهش pH در اثر واکنش های تخمیری و در نتیجه کاهش رشد میکروارگانیسم های پاتوژن ، تولید مواد باکتری کش به وسیله سوش های آغازگر و پروبیوتیک، شوک حرارتی ایجاد شده در مرحله پخت وکاهش رطوبت در طول رسیدن که کاهش فعالیت آبی را نیز به دنبال دارد، از عوامل مهم کاهش باکتری های پاتوژن مذکور و عدم حضور آنها در تمامی نمونه های تحقیق بوده است.

نتایج بدست آمده با تحقیقات Trzaskowska و همکاران در سال ۲۰۱٤ و نیز Rubio و همکاران در سال ۲۰۱۳ مطابقت داشت که گزارش نمودند در سوسیس های تخمیری شاهد و پروبیوتیک حاوی لاکتو باسیلوس کازئی LOCK 0900 (cfu/gr ۱۰^۷) و لاکتوباسیلوس پلانتاروم V ۲۹۹ (cfu/gr ۱۰^۷و۱۰^۵) و لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG (cfu/gr ۱۰^۷و۱۰^۵)، هیچ اثری از کلیفرم و استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت مشاهده نشده است[۱۷،۲۹].

۳-۸-نتایج آزمون ویژگی های حسی نمونه های سوسیس

نتایج مقایسه میانگین ارزیابی ویژگی های حسی در نمونه های سوسیس در جدول ۷ نشان می دهد که بین کلیه تیمارها با نمونه شاهد هیچ گونه اختلاف معنی داری وجود نداشته است($P>0.01$) ،بطوریکه از لحاظ صفت شکل ظاهری، تمامی تیمارها امتیاز خیلی خوب را طی ارزیابی حسی به خود اختصاص دادند.همچنین به لحاظ قابلیت جویدن وترد بودن، تیمارهای شاهد(C) و P_1 امتیاز خیلی خوب و تیمارهای P_2 و P_3 امتیاز خوب را به خود اختصاص دادند.البته تیمار P_1 بدلیل داشتن میزان pH بیشتر در طی مرحله تخمیر نسبت به نمونه شاهد(مطابق شکل۱) از میزان سفتی کمتر و در نتیجه قابلیت جویدن مطلوبتری برخوردار بود.لازم بذکر است که هرچه pH نمونه به pH ایزوالکتریک گوشت نزدیک تر شود میزان سفتی نمونه بیشتر و در نتیجه قابلیت جویدن یا ترد بودن آن کاهش میابد. بعلاوه از لحاظ میزان کام پذیری، تیمار P_1 امتیاز خیلی خوب و تیمارهای شاهد ، P_2 و P_3 امتیاز خوب را به خود اختصاص دادند.همانطور که اشاره شد علت این امر بالا بودن میزان pH در تیمار P_1 نسبت به سایر تیمارها طی دوره تخمیر

بوده است(مطابق شکل۱).در کل تیمار شاهد،از کاهش میزان سفتی، قابلیت جویدن بالا و کاهش طعم و مزه اسیدی نسبت به سایر تیمارها برخوردار بود.

نتایج بدست آمده با تحقیقات Rubio و همکاران در سال ۲۰۱۳ مطابقت داشت که گزارش نمودند تیمار حاوی لاکتوباسیلوس پلانتاروم ۲۹۹V نسبت به تیمار شاهد و تیمار حاوی لاکتوباسیلوس رامنوسوسGG از میزان pH بالاتری طی دوره تخمیر برخوردار بوده در نتیجه محصول نهایی از قابلیت جویدن مطلوبتر و میزان کام پذیری بیشتر برخوردار بوده است [۱۷].

Table 7 Results of the mean comparison of evaluating the organoleptic characteristics in samples of sausage

Characteristic/treatment	C	P_1	P_2	P_3
Mean point of appearance	1/6±0/02[a]	1/6±0/02[a]	1/4±0/03[a]	1/5±0/01[a]
Mean point of tender	1/9±0/01[a]	1/6±0/01[a]	2/1±0/03[a]	2/1±0/02[a]
Mean point of mouth feel	2/1±0/02[a]	1/6±0/02[a]	2/5±0/01[a]	2/4±0/02[a]

Means with similar letters, according to Duncan test at 1% difference is not significant.

٤- نتیجه گیری

نتایج تحقیق نشان داد که سوسیس های تخمیری پروبیوتیک تلقیح شده با لاکتوباسیلوس پلانتاروم ۲۹۹V و لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG با غلظت تلقیح اولیه 10^7 cfu/gr،می توانند بعنوان غذای فراسودمند به حساب آیند. همچنین مشخص گردید که باکتری های پروبیوتیک مذکور، تاثیر نامطلوبی روی ویژگی های شیمیایی ، میکروبی و حسی سوسیس های تولیدی نداشته، ضمن آنکه در طی فرآیند تولید و نگهداری ،شمارش باکتری های پروبیوتیک در حد قابل قبول (10^6 – 10^7 سلول باکتریایی زنده در هر گرم از محصول نهایی) حفظ شده است.بعلاوه کلیه تیمارها، فاقد باکتری های پاتوژن بوده و از نظر ارزیابی ویژگی های حسی در اکثر موارد، سوسیس های تخمیری پروبیوتیک نسبت به نمونه شاهد از امتیاز بالاتری برخوردار بودند و بالاترین امتیاز حسی متعلق به تیمارحاوی باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم ۲۹۹V بود.در نهایت می توان نتیجه گرفت که افزودن باکتری های پروبیوتیک مذکور به محصولات گوشتی به عنوان حامل پروبیوتیک قابل انجام است.

۵- منابع

[1] Movahed, S., 2008, technology of producing the kinds of sausages, salami, ham and determining standard and quality control, first edition, Marze Danesh press, page: 239.

[2] Khan, M. I., Arshad, M. S., Anjum, F.M., Sameen, A., Aneeq-ur-Rehman.and Gill, T.W., 2011, Meat as a functional food with special reference to probiotic sausages.Food Research International,44:3125–3133.

[3] Anonymous., 2001, Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, Joint Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report.

[4] Golian, A; Mazhari, M; Akbarian, A., Hosseini Ghaffari, M; Aref Nejad, B, 2011; the principles of peribiotics in nutrition, first edition, the publication of Ferdowsi University of Mashhad, page: 558.

[5] Erkkila, S., Petaja, E., Eerola, S., Lilleberg, L., Mattila-Sandholm, T.,Suihko, M. L., 2001, Flavour profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter cultures, Meat Science,58:111– 116.

[6] Rouhi, M., Sohrabvandi , S.,Mortazavian, A. M., 2013, Probiotic fermented sausage: viability of probiotic microorganisms and sensory characteristics, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 53(4):331-348.

[7] Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Benito,M.J., Hernández, A., Casquete, R., Córdoba, M.D.G.,2011, Application of *Lactobacillus fermentum* HL57 and *Pediococcus acidilactici* SP979 as potential probiotics in the manufacture of traditional Iberian dry-fermented sausages, Food Microbiology, 28:839-847.

[8] Vuyst, L.D., Falony, G., Leroy, F.,2008,Probiotics in fermented sausages,Meat Science, 80,75–7.

[9] Rockni N.2008.Meat Science and Technology, Fifth Edition, Tehran University Press, pp.307.

[10] Ammor, M. S., Mayo, B.,2007,Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production, Meat Science, 76(1): 138-146.

[11] Arihara,K.,2006,Strategies for designing novel functional meat products,Meat Science,74, 219–229.

[12] Klingberg, T.D. and Budde, B.B.,2006,The survival and persistence in the human gastrointestinal tract of five potential probiotic lactobacilli consumed as freeze-dried cultures or as probiotic sausage. International Journal of Food Microbiology,109: 157–159.

[13] Robinson, R. K.,1987,Survival of *Lactobacillus acidophilus* in fermented products, Suid Afrikaanse Tydkrif Vir Suiwelkunde,19:25–27.

[14] Salminen, S., Von Wright , A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart , D., de Vos, W. M.,1998, Demonstration of safety of probiotic – A review, International Journal of Food Microbiology,44:93–106.

[15] Henriksson, A.,Conway, P. L.,2001,Isolation of the human faecal bifidobacteria which reduce signs of *Salmonella* infection when orogastrically dosed to mice, Journal of Applied Microbiology, 90:223–228.

[16] Radulović, Z., Živković, D., Mirković, N., Petrušić, M., Stajić, S., Perunović, M. , Paunović, D.,2011,Effect of probiotic bacteria on chemical composition and sensory quality of fermented sausages, edia – Food Science,1:1516 - 1522.

[17] Rubio, R., Aymerich, T., Bover-Cid, S., DolorsGuàrdia, M., DolorsGuàrdia , J., Dolors Guàrdia , M., 2013, Probiotic strains *Lactobacillus plantarum* 299V and *Lactobacillus rhamnosus* GG as starter cultures for fermented sausages.LWT - Food Science and Technology,54:51-56.

[18] Sohrabvandi, S., Mortazavian, A. M., Dolatkhahnejad, M.R., Bahadori Monfared, A., 2012, Suitability of MRS-bile agar for the selective enumeration of mixed probiotic bacteria in presence of mesophilic lactic acid cultures and yoghurt bacteria, Iranian Journal of Biotechnology,10(1):16-21.

[19] Erkkila, S., Petaja, E., Eerola, S., Lilleberg, L., Mattila-Sandholm,T.,Suihko, M. L., 2001, Flavour profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter cultures, Meat Science, 58:111– 116.

[20] Khan, M.I., Arshad, M.S., Anjum, F.M., Sameen, A., Aneeq-ur-Rehman.and Gill, T.W.,2011,Meat as a functional food with special reference to probiotic sausages.Food Research International,44:3125–3133.

[21] Anonymous.,2001,Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, Joint Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report.

[22] Rubio, R., Aymerich, T., Bover-Cid, S., DolorsGuàrdia, M., DolorsGuàrdia , J., Dolors Guàrdia, M., 2013, Probiotic strains *Lactobacillus plantarum* 299V and *Lactobacillus rhamnosus* GG as starter cultures for fermented sausages.LWT - Food Science and Technology, 54:51-56.

[23] Klingberg, T. D. and Budde, B. B. ,2006, The survival and persistence in the human gastrointestinal tract of five potential probiotic lactobacilli consumed as freeze-dried cultures or as probiotic sausage. International Journal of Food Microbiology, 109: 157–159.

[24] Mortazavi A, Zia Alhagh H. 2009. Modern Food Microbiology, Volume I, First Edition, Mashhad Firdausi University Press, pp. 794.

[25] Dalmis,U.,Soyar,A.,2008, Effect of processing methods and starter culture

(*Staphylococcus xylosus and Pediococcus pentosaceus*) on proteolytic changes in Turkish sausages (sucuk) during ripening and storage, Meat Science, 80: 345–354.

[26] Tabae Emami Sh, Oghabi F, Seyed Nasaj M.1997.effect of two different times of fermentation and ripening in a kind of fermented sausage by using starter microorganisms. A Thesis Presented to The University of Tarbiat Modarres, Iran.p.1-165.

[27] Toldra, F., 2007, Hand Book of fermented meat and poultry, First published, Wiley-Black well, USA, ISBN978-0-8138-1477-3,545 pages.

[28] Ercoskun, H., 2006, Effects of fermentation time on some quality characteristics of heat processed sucuks, Ph.D. Dissertation, Graduate School of Natural and Applied Science, Ankara University, 85:174–181.

Production of probiotic fermented sausages as a functional food using strains of *Lactobacillus plantarum* 299V and *Lactobacillus rhamnosus* GG

Attar, E. [1], Movahed, S. [2*], Mazaheri Asadi, M. [3]

1. Graduate Student,Department Of Food Science,Varamin-Pishva Branch,Islamic Azad University,Varamin,Iran.
2. Department Of Food Science,Varamin-Pishva Branch,Islamic Azad University,Varamin,Iran.
3. Department Of Biotechnology,Iraniain Reasearch Organization For Science And Technology (IROST) ,Tehran,Iran.

(Received: 94/2/20 Accepted: 94/6/31)

In recent decades,the demand of consumption for probiotics or functional foods has increased and several attempts to use them in fermented meat products.The study aims to produce the probiotic fermented sausages by using the probiotic bacteria of *Lactobacillus plantarum* 299V and *Lactobacillus rhamnosus* GG (with the initial inoculation of 10^7 cfu / gr) as a functional food and to study their chemical, microbial and organoleptic properties.The results of chemical tests showed that the probiotic samples have the highest amount of protein content and lowest amount of moisture content compared to the control.The results of the overall count of probiotic bacteria in the desired times showed that in the samples containing probiotic bacteria,there are 10^6-10^7 of living bacterial cells per gram of final product.The microbial test results of non-lactic bacteria count showed that the treatment containing *Lactobacillus plantarum* 299V had the highest amount of mentioned bacteria and the control had the lowest amount.In the final products of all samples, no trace of the presence of pathogenic bacteria was observed.The results of the organoleptic property evaluation showed that in most cases, the probiotic fermented sausage samples had higher scores than controls.

Keywords: Fermented sausage, Probiotic, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*

* Corresponding Author E-Mail Address: movahed@iauvaramin.ac.ir