# بررسی اثر دو گونه کشت های آغازگر لاکتیکی *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus sakei* بربرخی ویژگی های فیزیکوشیمیایی و میکروبی محصول گوشتی تخمیری

مهسا محمدطاهری[۱]، سید ابراهیم حسینی[۲*]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲- دانشیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

**(تاریخ دریافت: ۹۴/۰۹/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۹/۰۳)**

## چکیده

محصول گوشتی تخمیری یک محصول سنتی و قدیمی است که در تمام نقاط جهان وجود دارد. باکتری های اسید لاکتیک به طور گسترده برای تولید محصولات گوشتی تخمیری استفاده می شوند. هدف این تحقیق، بررسی اثر کشت های آغازگر لاکتیکی *Lactobacillus Plantarum* و *Lactobacillus Sakei* بر ویژگی های شیمیایی و میکروبی و بافت محصول گوشتی تخمیری می باشد. بدین منظور دو گونه لاکتیکی فوق انتخاب شدند و پس از کشت و آماده سازی به تیمار ها تلقیح شدند. آزمون های فیزیکی و شیمیایی در طی دوره تخمیر و رسیدن صورت گرفته و روند آنها در روزهای صفر، ۵ ، ۱۰ و ۱۵ بررسی شده است. همچنین آزمون بافت سنجی نمونه ها، جهت بررسی ویژگی های بافتی، در روز صفر و در انتهای فرایند رسیدن در روز ۱۵ صورت گرفت. نتایج نشان می دهند که نمونه تلقیح شده با *Lactobacillus sakei* بیشترین میانگین pH و بیشترین میانگین باکتری های اسید لاکتیک را دارد. رطوبت در همه نمونه ها کاهش یافته و مقدار پروتئین، چربی و خاکستر در همه نمونه ها افزایش یافته است. در رابطه با میانگین چربی، نمونه تلقیح شده با کشت مخلوط بیشترین مقدار و نمونه تلقیح شده با *Lactobacillus plantarum* کمترین مقدار را داردهمچنین نتایج حاصل از آزمون بافت سنجی نشان می دهد که نمونه تلقیح شده با *Lactobacillus sakei* بیشترین میانگین حداکثر نیروی برشی را دارا می باشد.

**کلید واژگان:** محصول گوشتی تخمیری، باکتری های اسید لاکتیک، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس ساکئی

* مسئول مکاتبات: ebhoseini@yahoo.com

## ۱- مقدمه

تولید سنتی محصولات خام گوشتی بر پایه تخمیر کربوهیدراتهای طبیعی یا اضافه شده به محیط توسط باکتریهای اسید لاکتیک است. طی تخمیر ترکیبات بی شماری از جمله اسید لاکتیک، اسید استیک، الکل، آلدئید، کتون و باکتریوسین تولید می شود که می توانند بر کیفیت، ایمنی و پایداری انباری محصول گوشتی اثر بگذارند [۱].

محصول گوشتی تخمیری از گوشت خرد شده و چربی، نمک، نیتریت و نیترات، شکر و ادویه تشکیل شده است که این مواد درون یک پوشش قرار گرفته و زمان تخمیر و سپس فرایند خشک کردن را طی می کنند. کیفیت محصول گوشتی تخمیری به شدت وابسته به فرایند رسیدن است که رنگ، طعم، عطر و بو و استحکامی به محصول می دهد که بوسیله کمپلکسی از برهم کنش های شیمیایی و فیزیکی حاصل از عمل تخمیری فلور میکروبی حاضر در محصول گوشتی ایجاد می شود[۲].

میکروارگانیسم هایی که در تخمیر محصولات گوشتی نقش دارند شامل گونه های باکتری های اسید لاکتیک ، کوکسی های گرم مثبت کاتالاز مثبت، مخمرها و قارچ ها می باشند[۳و ٤].

باکتری های اسید لاکتیک به طور گسترده برای تولید مواد غذایی تخمیری استفاده می شوند و حجم و ارزش عمده کشت های آغازگر تجاری را تشکیل می دهند.

نقش متابولیت های تخمیری باکتری های اسید لاکتیک جلوگیری از رشد پاتوژن ها و مولدین فساد با اسیدی کردن محصول،تثبیت رنگ،بهبود بافت،تأثیر بر ترکیب مواد فرار و غیر فرار طی تجزیه اسیدهای آمینه،جلوگیری از اکسیداسیون اسیدهای چرب آزاد غیراشباع ودر بعضی موارد تولید باکتریوسین می باشد[۱].

عملکرد اصلی باکتری های لاکتیکی در تخمیر گوشت، افت سریع pH در خمیر است که این عمل خود سبب ایمنی محصول با غیر فعال شدن پاتوژن ها ،پایداری و ماندگاری محصول با جلوگیری از تغییرات نامطلوب ایجاد شده توسط میکروارگانسیمهای مولد فساد،ایجاد شرایط بیوشیمیایی برای دستیابی به خواص حسی جدید در محصول رسیده با تغییر مواد اولیه میگردد[٥].

اسماعیل زاده و همکاران در سال ۱۳۸۹، اثر باکتری های *Lactobacillus fermentum* و *Lactobacillus plantarum* را بر کاهش نیتریت محصول گوشتی تخمیری بررسی و مشاهده کرند که *Lactobacillus plantarum* بیشترین پتانسیل را در کاهش نیتریت و بهترین کیفیت حسی را دارد[٦].

در سال ۲۰۰۷ Lanciotti و همکاران، اثر مخمرهای *Debaryomyces hanseii* و *Yarrowia lipolytica* همراه با کشت آغازگر *Lactobacillus plantarum* را بر پروفیل ترکیبات فرار، محتوی آمین های بیوژنیک و خواص حسی محصول گوشتی تخمیری خشک بررسی کردند. نتایج نشان می دهند که هر مخمر پروفایل خاصی از متابولیتهای فرار تولید می کند. بر اساس آنالیزهای حاصل از کروماتوگرافی گازی ، پروفیل ترکیبات فرار هر مخمر به شدت به درجه خرد شدن محصول گوشتی بستگی دارد. اما این فاکتورها اثری بر میزان آمین های بیوژنیک ندارند[۷].

Wang و همکاران در سال ۲۰۱۳، اثر باکتری *Lactobacillus sakei* را بر کیفیت میکروبی و کاهش نیتریت در نوعی محصول گوشتی تخمیری چینی بررسی کردند و مشاهده کردند که این کشت آغازگر به علت جلوگیری از رشد میکروارگانیسم های مولد فساد گوشت، برای کیفیت میکروبی محصول مفید است. همچنین این میکروارگانیسم نیتریت را به میزان زیادی کاهش می دهد و سبب بهبود خواص حسی می گردد[۸].

Arief و همکاران در سال ۲۰۱٤، خواص فیزیکوشیمیایی و میکروبی محصول گوشتی تخمیری تهیه شده از گوشت بره با استفاده از *Lactobacillus plantarum* را بررسی کردند. نتایج نشان می دهند که تلقیح این باکتری سبب بهبود کیفیت محصول گوشتی تخمیری در مقایسه با نمونه شاهد میگردد. نتایج آنالیز های فیزیکوشیمیایی نشان می دهند که نمونه تلقیح شده با این باکتری بافت نرمی دارد. به علاوه حضور این باکتری میزان چربی را کاهش می دهد و سبب افزایش پروتئین می گردد. نتایج آنالیزهای میکروبی نشان می دهند که نمونه تلقیح شده با این باکتری دارای تعداد باکتری های اسید لاکتیک بالا( حدود ۹ سیکل لگاریتمی) و تعداد اشریشیا کلی پایین( حدود ۱ سیکل لگاریتمی) می باشد[۹].

Sidira و همکاران در سال ۲۰۱۵، اثر گونه اصلاح شده *Lactobacillus casei* را بر تولید ترکیبات مولد عطر و طعم در محصول گوشتی تخمیری خشک بررسی کردند.نتایج نشان می دهند که غلظت کشت های آغازگر اصلاح شده بر روی ترکیبات فرار موثر بوده و بیشترین مقدار ترکیبات فرار، استرها و الکل ها در محصول گوشتی تلقیح شده با میزان بالای کشت آغازگر اصلاح شده دیده میشود[۱۰].

با توجه به اثرات مثبت فرایند تخمیر، معرفی و تولید محصولات گوشتی تخمیری با استفاده از سویه های سلامتی بخش و فرمولاسیون مناسب می تواند گام مهمی در سلامت جامعه باشد. از آنجاییکه سویه های *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus sakei* که در این تحقیق استفاده می شوند دارای خواصی از جمله پروبیوتیک بودن، تولید باکتریوسین و کاهش نیتریت هستند از این طریق می توان به آثار مثبت غذاهای پروبیوتیک دست یافت. همچنین از آنجاییکه محصول گوشتی تخمیری در بازار کشور ما وجود ندارد، تحقیقات در مورد تولید آن در صنعت سبب ایجاد تنوع در محصولات گوشتی می شود. ضمن اینکه طعم خاص این محصولات می تواند مورد پسند افرادی باشد که ذائقه خاصی برای مصرف این نوع محصولات دارند و از این طریق می توان در رفع نیاز جامعه گام برداشت. در واقع هدف از این تحقیق بررسی اثر دو گونه لاکتیکی منتخب و همچنین اثر توام آنها بر ویژگی های فیزیکوشیمیایی و میکروبی و بافت محصول گوشتی تخمیری و دستیابی به مناسب ترین گونه در تولید این محصولات می باشد.

## ۲- مواد و روش ها

### کشت های لاکتیکی و فعال سازی آنها

آمپول های لیوفیلیزه گونه های PTCC 1058 *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus sakei* PTCC 1712 از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه شده و طبق دستورالعمل ارسالی از بانک میکروبی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران فعال شدند.بدین صورت که پس از استریل کردن وسایل مورد نیاز و میز کار، آمپول ها مابین دو شعله در شرایط کاملاً استریل باز گردید و به وسیله پیپت پاستور چند میلی لیتر از محیط کشت MRS broth را به داخل آمپول ها وارد کرده، سپس مخلوط ها را به لوله های حاوی MRS broth انتقال داده و همراه با نمونه شاهد در شرایط بی هوازی در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند. . پس از این مدت، لوله ها با انواع شاهد آنها مقایسه گردید، با بررسی کدورت لوله ها این مطلب که باکتری ها رشد کرده اند، اثبات گردید. سپس از این کشت های اولیه کشت های خطی بر رویMRS agar انجام گرفت و در همان شرایط ذکر شده فوق نگهداری گردیدند، سر لوله های کشت های اولیه به وسیله پارافیلم بسته و در شرایط بی هوازی در داخل یخچال نگهداری گردید تا درموقع لزوم از آنها استفاده گردند و پس از نگهداری، پلیت ها از نظر رشد کلنی بررسی شدند[۱۱و ۱۲].

### تهیه غلظت های میکروبی

برای تعیین میزان دقیق تلقیح، استاندارد ۰/۵ مک فارلند تهیه می گردد و سپس با توجه به اینکه ماکسیمم جذب استاندارد ۰/۵ مک فارلند در دستگاه اسپکتروفتومتردر طول موج۶۰۰ نانومتر ۰/۱۳۴ می باشد،کلنی ها را به سرم فیزیولوژی انتقال داده و آن ها را طوری تنظیم میکنیم که در همان طول موج،همان جذب را نشان دهد. همچنین جهت تایید آن، غلظت های متوالی از سوسپانسیون میکروبی را تهیه کرده،کشت داده و تعداد کلنی ها شمارش شد و بدین صورت تعداد دقیق باکتری ها و میزان تلقیح تعیین شد.[13,14] لازم به ذکر است که تعداد باکتری ها در کشت های تاییدیه برای تلقیح به محصول گوشتی برای دو سویه *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus sakei* به ترتیب برابر با ٤ × $10^{8}$ و ٦× $10^{8}$ بوده است.

### فرمولاسیون

تمامی مراحل تولید و فرمولاسیون محصول گوشتی در یکی از کارخانه های فراورده های گوشتی صورت گرفت.فرمولاسیون به شرح زیر می باشد:

محصول گوشتی شامل70% گوشت گاو بدون استخوان حاوی 16/6% چربی گاوی( ۵۸,۳۸٪ گوشت و ۱۱,۶۲٪ چربی)، ۱٪ نمک تصفیه و آسیاب شده، ۱/۳٪ پودر شکر، 0/4 پودر پلی فسفات، ۰/012٪ نیتریت سدیم، ۰/۲٪ گلوکنودلتالاکتون، ۰/۱۵٪

پودر فلفل سیاه، ۰/۱۵٪ فلفل سفید، ۰/۰۳٪پودر سیر، ۰/۱۵٪ دود مایع و ۵٪ آب بوده است. میزان سوسپانسیون میکروبی اضافه شده ، در این تحقیق ۵٪ وزن فارش بوده است. . سپس تیمارها در پوشش های فیبروزی با کالیبر ٤٥ پر شدند و به اتاق تخمیر انتقال یافتند و مراحل تخمیر و رساندن بشرح زیر صورت گرفت. مشخصات تیمارها به صورت زیر است:

نمونه ۱: محصول گوشتی تخمیری تلقیح شده با گونه *Lactobacillus plantarum*

نمونه ۲: محصول گوشتی تخمیری تلقیح شده با گونه *Lactobacillus sakei*

نمونه ۳: محصول گوشتی تخمیری تلقیح شده با کشت مخلوط دو میکروارگانیسم فوق به نسبت ۱ به ۱

نمونه ٤: محصول گوشتی شاهد (فاقد کشت آغازگر و با شرایط تولید یکسان با دیگر تیمارها)

مدت زمان انجام آزمون ۱۵ روز است که ۵ روز اول به عنوان دوره تخمیر و ۱۰ روز دوم به عنوان دوره رسیدن در نظر گرفته شده است.بدین منظور نمونه ها به مدت ٤ روز در درجه حرارت ۳۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۹۵٪ جهت تخمیر نگهداری شدند. سپس در روز پنجم دما ۵ درجه سلسیوس کاهش یافت و به دمای ۲۵ درجه سلسیوس رسید و مجدداً در روز ششم ۵ درجه سلسیوس دیگر کاهش یافت و به دمای ۲۰ درجه سلسیوس رسید تا دمای آن جهت مرحله رسیدن مناسب باشد. علت کاهش تدریجی دما کاهش آسیب وارد شده به فلور تخمیری و همچنین بافت محصول می باشد. لازم به ذکر است که رطوبت نسبی اولیه ۹۵٪ بوده که هر ۳ روز یکبار ۵٪ کاهش یافته تا نهایتاً در روز ۱۲ به ۷۵٪ رسیده و در همان رطوبت مرحله رسیدن را به اتمام رسانده است [۱۵و ۱٦].

زمان قبل از انکوباسیون و بعد از پرکنی به عنوان زمان صفر انتخاب شده و اولین نمونه در این زمان تهیه گردید. سپس هر ۵ روز یکبار از محصولات گوشتی نمونه گیری شده و آزمون ها در روز های ۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ بر روی آنها صورت گرفت. در رابطه با آزمون بافت سنجی نمونه ها در روزهای ۰ و ۱۵ ارزیابی شدند [۱۷].

## آزمون ها

### تعیین pH

مقادیر pH در طول مدت تخمیر و رسیدن اندازه گیری می شوند، ۵ گرم نمونه را برداشته و دو بار آنرا چرخ کرده و با ۵ میلی لیتر آب مخلوط می گردد و سپس pH آن به وسیله دستگاه pH متر MS tecnopon مدل mPA210، بر اساس استاندارد ملی ایران، شماره ۱۰۲۸ خوانده می شود[ ۱۸].

### اندازه گیری مقدار رطوبت

نمونه ها را در بوته چینی وزن کرده و در اتوو که در ۱۰۳ تنظیم شده به مدت ۲ ساعت قرار داده و سپس نمونه ها توزین گردید و بر اساس استاندارد ملی ایران،شماره ۷٤٥ صورت می گیرد [۱۹].

### تعیین پروتئین تام

مقدار پروتئین بر اساس میزان ازت تام توسط روش کلدال اندازه گیری شد(ضریب تبدیل:٦/۲٥).آزمایشات در سه تکرار برای هر نمونه بر اساس استاندارد ملی ایران، شماره ۹۲٤ انجام گرفت[۲۰].

### تعیین چربی تام

چربی نمونه ها به وسیله ی دستگاه سوکسله اخراج گردیده،حلال(n-هگزان) آن تبخیر شده و بالن حاوی چربی وزن گردیده وآزمایشات در سه تکرار برای هر نمونه بر اساس استاندارد ملی ایران، شماره ۷٤۲ انجام گرفت[۲۱].

### تعیین خاکستر کل

نمونه ها وزن شده و در دمای ٥٥٠ در کوره ی الکتریکی سوزانده شده و وزن گردید.آزمایشات در سه تکرار برای هر نمونه براساس استاندارد ملی ایران، شماره ۷٤٤ انجام گرفت[۲۲].

### آزمون بافت سنجی

مقاومت برشی نمونه ها با استفاده از روش Warner-Bratzlerبررسی شد و دو فاکتور حداکثر نیروی برشی و انرژی مورد نیاز برای برش به ترتیب توسط نقطه پیک منحنی و محاسبه سطح زیر منحنی توسط دستگاه بافت سنج مدل M350-10CTساخت انگلیس در روز صفر بر روی خمیر اولیه و در روز پانزدهم بر روی محصول نهایی چهار تیمار اندازه گیری شد[۲۳].

برای انجام این آزمون ابتدا پوشش خارجی نمونه ها به دقت جدا

شد ، سپس از قسمت مرکزی هر محصول گوشتی نمونه هایی به ضخامت ۲ cm بریده شدند و مقاومت بافت در برابر نیروی برشی[1] با تیغه ای صاف از جنس فولاد ضد زنگ در دمای اتاق سنجیده شد . لودسل[2] ۵۰۰ نیوتن و سرعت حرکت پروب 120 میلی متر در دقیقه بود.

## شمارش باکتری های لاکتیکی

۵ گرم نمونه را در شرایط اسپتیک، برداشته و به ۴۵ میلی لیتر آب پپتونه استریل، اضافه گردید، رقت بعدی نیز با اضافه کردن یک میلی لیتر از سوسپانسیون اولیه به ۹ میلی لیتر آب پپتونه، تهیه شد. سایر رقت ها نیز به همین ترتیب تهیه گشتند. باکتری های لاکتیکی در محیط کشت MRS Agar به مدت ۷۲ ساعت در ۳۰ درجه سلسیوس کشت داده شده و مطابق با استاندارد ملی ایران،شماره ۴۷۲۱ شمارش می شوند[24]

## روش آماری

تجزیه و تحلیل آماری با روش تجزیه و تحلیل واریانس با استفاده ازروش مدل خطی از سیستم آنالیز آماری (SAS) که نشان دهنده میزان تفاوت و اثر متقابل بین پارامترها است در قالب طرح کاملاً تصادفی صورت گرفته است. مقایسه میانگین میان پارامترها بوسیله تست چندگانه دانکن بوده و میزان معنی داری در محدوده $P < 0.05$ سنجیده شده و هر آزمون سه بار انجام شده است.

# ۳- نتایج و بحث

## بررسی تغییرات pH

روند تغییرات pH در نمودار۱ آمده است.میانگین pH در روز صفر در حدود ۵,۷۷ بوده است و در طی پنج روز اول به حدود ۴,۶۳ کاهش یافته است. علت کاهش شدید pH در روزهای نخست به دلیل تولید اسیدهای ارگانیک بویژه اسید لاکتیک موجود در این محصول گوشتی در اثر شکست کربوهیدراتها در طی تخمیر می باشد. رشد سریع باکتری های اسید لاکتیک در مراحل اولیه تخمیر در کاهش pH محصولات گوشتی تخمیری مفید بوده است و همچنین مسئول کاهش رشد باکتری های نامطلوب می باشند [۲۵-۲۷].

احتمال میرود که به دلیل غیاب کشت های آغازگر در نمونه شاهد و در نتیجه تولید ناکافی اسید، کلی فرم ها فرصت بیشتری برای رشد یافته اند و سبب کاهش شدید pH در این نمونه شده اند. در روز دهم pH کاهش یافته و به حدود ۴,۶۳ می رسد سپس تا روز پانزدهم دوباره اندکی افزایش یافته و به مقدار حدود ۴,۷۲ می رسد که تفاوت میانگین pH در بین تمامی روزهای تخمیر و رسیدن معنادار می باشد. علت افزایش pH در انتهای مرحله رسیدن محصول گوشتی تخمیری می تواند به دلیل فعالیت پروتئولیتیک میکروارگانیسم ها باشد. پروتئازهای میکروبی سبب تجزیه پروتئولیتیک می شوند و پپتید، آمینو اسید و آمین تولید می کنند که اثر بافری بر اسیدهای ارگانیک تولید شده توسط باکتری های لاکتیکی در طی تخمیر دارند[۲۵و۲۶]. همچنین در بین تیمارها،میانگین pH نمونه ی تلقیح شده با *Lactobacillus plantarum* و نمونه تلقیح شده با کشت مخلوط، تفاوت معناداری نداشته اما با سایر نمونه ها دارای تفاوت معنی دار می باشند. بدین صورت که نمونه تلقیح شده با *Lactobacillus sakei* بیشترین میانگین pH و نمونه شاهد کمترین میانگین pH را دارا می باشد.

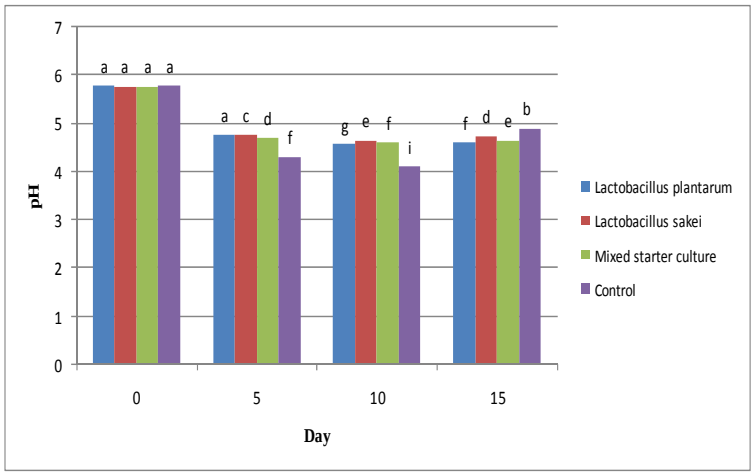


**Fig1** The changes of the pH during fermentation and ripening

میزان pH نهایی در تحقیقات متفاوت می باشد اما به طور کلی روند تغییرات آن در بیشتر مطالعات مشابه روند تغییرات pH در این تحقیق می باشد.

در تحقیقی که بر روی نوعی محصول گوشتی تخمیری ترکیه

1. Warner Bratzler Shear(WBC)
2. Load cell

(سوجوک) صورت گرفت میزان pH در سه روز اول رسیدن به طور چشمگیری کاهش یافت پس از آن در طول دوره رسیدن به آرامی افزایش یافت و تقریباً ثابت شد. بر طبق استاندارد کشور ترکیهpH سوجوک با کیفیت مناسب باید در رنج ۴,۷-۵,۲ باشد. [28] همچنین طبق استاندارد اروپا، pH محصول گوشتی تخمیری نیمه خشک باید کمتر از ۵/۳ باشد[۲۹].

در تحقیقی دیگر که بر روی محصول گوشتی خشک تخمیری صورت گرفت مقدار pH نمونه ها از حدود ۵,۶ در طی هفت روز تخمیر کاهش یافته و به مقدار حدود ۴,۹-۵ رسید و سپس تا پایان دوره رسیدن در همان رنج باقی ماند[۳۰].

## بررسی تغییرات رطوبت

روند تغییرات رطوبت در نمودار ۲ نشان داده شده است.مقدار رطوبت در روز صفر در حدود ۶۳,۲۹ درصد بوده است . مطالعات نشان داده اند که میزان رطوبت در طی رسیدن محصول گوشتی می تواند تحت تاثیر روش و زمان فرایند باشد. تحقیقات نشان می دهند که به دلیل بالا بودن رطوبت نسبی اتاق تخمیر در روز های نخست (حدود ۹۵٪) و جذب رطوبت از محیط ، ابتدا مقدار رطوبت کمی افزایش می یابد [28]سپس رطوبت کاهش یافته و به مقدار ۶۰,۴۳ درصد در روز پنجم می رسد .روند کاهش رطوبت در روز دهم با شدت بیشتری صورت می گیرد که علت آن کاهش رطوبت نسبی اتاق تخمیر به میزان ۵ درصد در هر سه روز یکبار می باشد. سپس در روز پانزدهم رطوبت به مقدار نهایی۲۹,۲۷ درصد می رسد. به طور کلی علت کاهش رطوبت به دلیل کاهش رطوبت نسبی اتاق تخمیر و همچنین استفاده از پوشش فیبروز در این تحقیق می باشد که به اکسیژن و رطوبت نفوذپذیر بوده تا کشت های آغازگر استفاده شده در این تحقیق که هوازی می باشند، به راحتی رشد و فعالیت کنند. تفاوت میانگین رطوبت در بین تمامی روزهای تخمیر و رسیدن معنادار می باشد. همچنین در بین تیمارها، اختلاف معناداری در میانگین رطوبت هیچ یک از نمونه ها با نمونه دیگر وجود نداشته است.

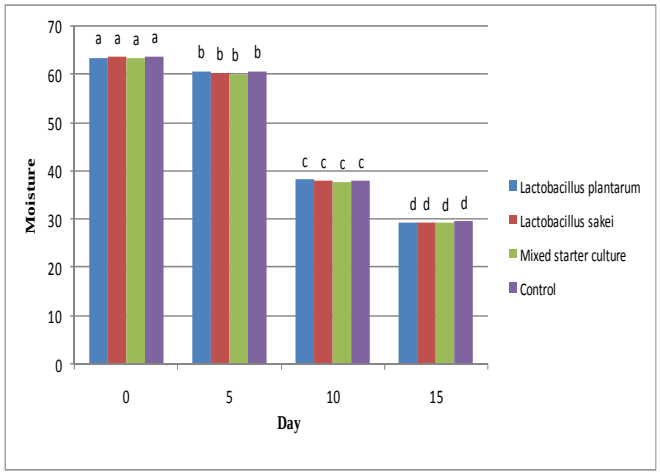


**Fig 2** The changes of the moisture during fermentation and ripening

در تحقیقات مختلف ،مقادیر متفاوتی از رطوبت نهایی در محصولات گوشتی تخمیری گزارش شده است که بستگی به شرایط تولید و میزان خشک شدن محصول دارد اما در کل نتایج حاصل از این بخش در راستای نتایج حاصل از تحقیقات دیگر می باشد.

در تحقیقی که بر روی نوعی محصول گوشتی تخمیری ترکیه (سوجوک) صورت گرفت میزان رطوبت در ابتدا مقدار رطوبت در حدود ۶۳,۳ درصد بوده است که در سه روز نخست به مقدار ناچیزی افزایش یافته است که به دلیل رطوبت نسبی بالای اتاق تخمیر می باشد و سپس مقدار آن کاهش یافته و در انتهای تخمیر به حدود ۳۱,۸ درصد رسیده است[۲۸].

در تحقیقی دیگر که بر روی نوعی محصول گوشتی تخمیری تایلندی صورت گرفت محتوی رطوبت در ابتدا حدود ۷۰-۷۲ درصد بوده و در روز سوم به حدود ۵۲-۵۵ درصد کاهش یافته است و در روز چهاردهم به حدود ۳۹ درصد رسیده است[۳۱].

## بررسی تغییرات پروتئین ، چربی و خاکستر

روند تغییرات پروتئین، چربی و خاکستر به ترتیب در نمودار ۳، ٤ و ۵ آمده است. همانطور که مشاهده می کنید مقدار پروتئین، چربی و خاکستر در روز صفربه ترتیب در حدود ۱٤,۱۳ ، ۲۰,۰۹ و ۲,۳۱ درصد بوده است که به تدریج افزایش یافته و در نهایت در محصول نهایی به مقادیر ۲۷,۱٦ ، ۳۸,۸٤ و ٤,٤٤ درصد رسیده است. افزایش میزان پروتئین، چربی و خاکستر در

راستای کاهش رطوبت محصول و خشک شدن آن است که در نتیجه سبب افزایش مقدار ماده خشک می گردد. همچنین در بین تیمارها از لحاظ میانگین پروتئین و میانگین خاکستر تفاوت معناداری وجود نداشته است اما در رابطه با میانگین چربی، بین نمونه تلقیح شده با *Lactobacillus plantarum* و نمونه تلقیح شده با کشت مخلوط تفاوت معنادار وجود دارد و این مقدار در نمونه تلقیح شده با کشت مخلوط بیشتر است.

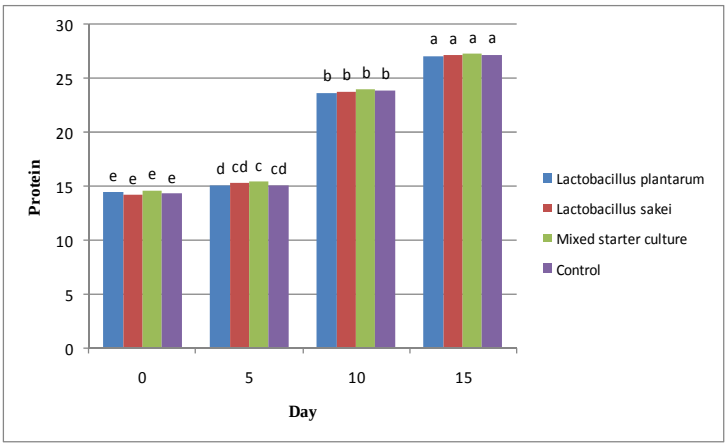


**Fig 3** The changes of the protein during fermentation and ripening

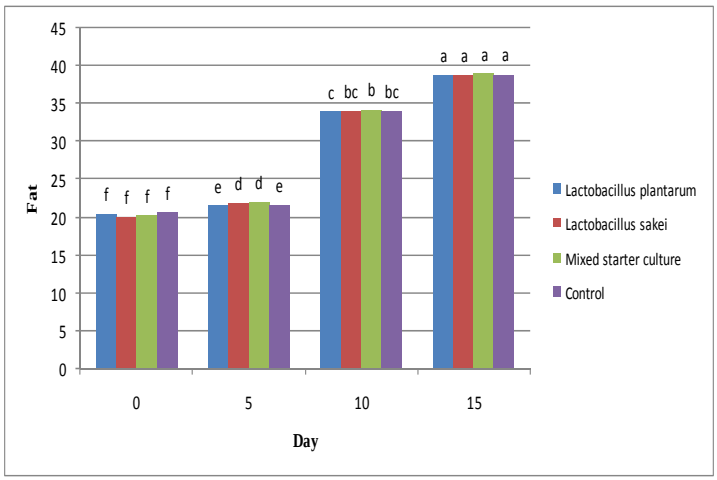


**Fig 4** The changes of the fat during fermentation and ripening

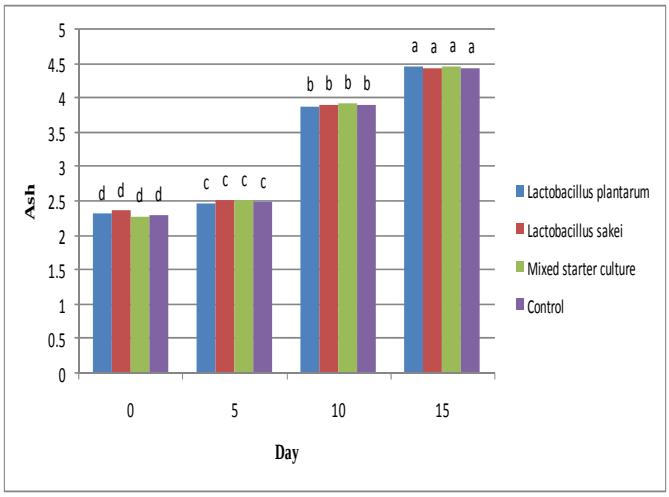


**Fig 5** The changes of the ash during fermentation and ripening

نتایج به دست آمده در این مورد در راستای نتایج حاصل از Tan و همکاران می باشد که ویژگی های شیمیایی مورد نظر را در محصول گوشتی تخمیری تایلندی مورد مطالعه قرار دادند و در هر سه مورد پروتئین ، چربی و خاکستر روند افزایشی را گزارش کرده اند[۳۱].

همچنین در تحقیقی که کیفیت حسی و میکروبی محصول گوشتی خشک تخمیری با میکروکپسول های حاوی باکتری *Lactobacillus reuteri* بررسی شد، روند تغییرات پروتئین و چربی مورد مطالعه قرار گرفته و روند افزایشی آنها تصدیق شد[ ۳۲].

در تحقیقی دیگر که اثر باکتری های پروبیوتیک بر ترکیبات شیمیایی و کیفیت حسی محصول گوشتی تخمیری را بررسی کردند، میزان پروتئین در ابتدای کار در تمامی نمونه ها در حدود ۱۸٪ بوده که در پایان دوره رسیدن به حدود ۲۷٪ رسیده است. همچنین میزان چربی از مقدار ۱۵٫۵–۱۹٫۸۲٪ در ابتدا به حدود ۴۱٪ در پایان دوره رسیدن افزایش یافته است که این نتایج در راستای نتایج حاصل از تحقیق کنونی می باشد[۳۳].

## بررسی تغییرات آزمون بافت سنجی

### بررسی تغییرات در حداکثر نیروی برشی

روند تغییرات حداکثر نیروی برشی در نمودار ۶ آمده است.نتایج نشان می دهد که میانگین حداکثر نیروی برشی در روز صفر حدود ۲۰/۷۶ بوده است که این مقدار در طی دوره تخمیر و

رسیدن به صورت معناداری افزایش یافته است و به حدود ۳۸/۱۲ در روز آخر رسیده است یا به عبارتی دیگر بافت محصولات گوشتی تولیدی، سفت تر یا منسجم تر شده است. همچنین در بین نمونه ها تنها میانگین حداکثر نیروی برشی نمونه تلقیح شده با *Lactobacillus sakei* با دیگر نمونه ها اختلاف معنادار دارد و دارای بیشترین مقدار حداکثر نیروی برشی در بین نمونه ها می باشد. سفت تر شدن بافت محصولات گوشتی تولیدی دلایل زیادی می تواند داشته باشد که در زیر به برخی از آنها اشاره شده است:

میزان چربی نقش مهمی را در کیفیت بافت فرآورده گوشتی دارد و ارتباط زیادی بین میزان چربی و سفتی در بافت محصول گوشتی توسط محققین مختلف گزارش شده است .طبق مطالعات، کاهش میزان چربی ، منجر به سخت تر شدن (افزایش سختی) محصول تولیدی می شود[۳٤]. میزان پروتئین نیز نقشی مهمی را در سفتی(کیفیت بافت) فرآورده نهایی ایفا می کند [۳۵]. همچنین میزان رطوبت بیشتر باعث کاهش نیروی برش و افزایش تردی می شود[۳۵].

اختلاف در مقدار حداکثر نیروی برشی در نمونه تلقیح شده با *Lactobacillus sakei* احتمالاً به دلیل اختلاف در مقدار و فعالیت لیپازها و پروتئازهای باکتریایی موجود در تیمارها در نظر گرفت.

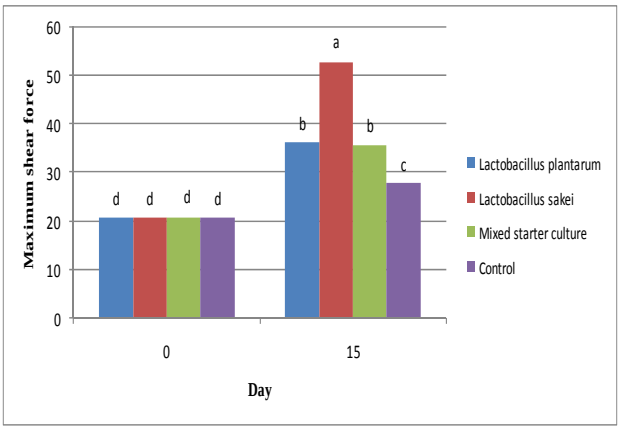


**Fig 6** The changes of the maximum shear force during fermentation and ripening

Serdaroglue در سال ۲۰۰۵ گزارش کرد ، به نظر می رسد افزایش میزان پروتئین در مقایسه با کاهش چربی تاثیر بیشتری بر روی بافت دارد. همچنین گزارش کردند، ذرات پروتئینی باعث تقویت کردن اتصالات در ماتریکس غذایی می شود و میتواند منجر به افزایش سفتی شود [۳٦].

## بررسی تغییرات در انرژی مورد نیاز برای برش

روند تغییرات انرژی مورد نیاز برای برش در نمودار ۷ آمده است. نتایج نشان می دهند که میانگین انرژی مورد نیاز برای برش در طی دوره تخمیر و رسیدن تغییر چندانی نداشته و تنها به مقدار ناچیزی کاهش یافته است یعنی از حدود ۰/٦۳ در روز صفر به ۰/۵۷ در روز آخر رسیده است که این کاهش معنادار نبوده است. همچنین در بین نمونه ها نیز تفاوت معناداری در میانگین انرژی مورد نیاز برای برش وجود ندارد .

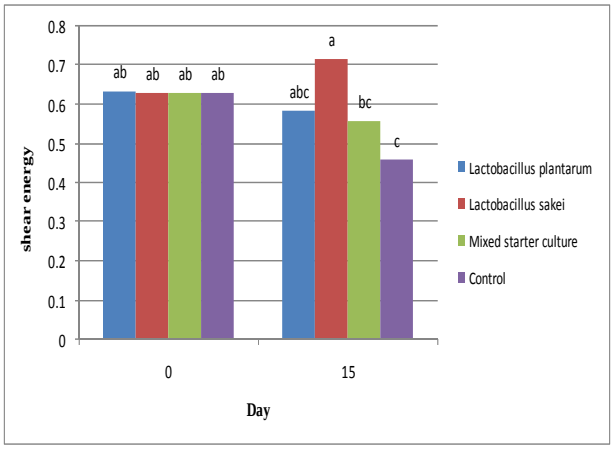


**Fig 7** The changes of the shear energy during fermentation and ripening

## بررسی تغییرات در شمارش باکتری های اسید لاکتیک

روند تغییرات شمارش باکتری های اسید لاکتیک در نمودار ۸ نشان داده شده است. همنطور که در نمودار مشاهده می کنید تعداد باکتری های اسید لاکتیک در روز صفر در حدود ٤,٦ سیکل لگاریتمی بوده است که در طی روزهای نخست به سرعت رشد کرده است و در روز پنجم به حدود ۷,۷ سیکل لگاریتمی رسیده است. نتایج نشان می دهند که باکتری های اسید لاکتیک به سرعت فلور میکروبی غالب در محصول گوشتی می گردند. رشد سریع باکتری های لاکتیکی در روزهای نخست توانایی آنها در انطباق خود با محیط گوشت را نشان می دهد و این امر بدین دلیل است که این دو گونه از گونه های موجود در فلور طبیعی

گوشت می باشند. در مورد نمونه شاهد به دلیل عدم استفاده از کشت آغازگر ، سرعت رشد باکتری های لاکتیکی بسیار پایین بوده و در حدود ۴/۴۷ سیکل لگاریتمی می باشد. لازم به ذکر است که همین رشد اندک باکتری های لاکتیکی در نمونه شاهد نیز به دلیل وجود گلوکنودلتالاکتون در فرمولاسیون محصول گوشتی می باشد که محرک رشد باکتری های لاکتیکی است. از روز پنجم به بعد تعداد باکتری های لاکتیکی تقریبا ثابت باقی مانده است و در نهایت در انتهای رسیدن و در روز پانزدهم به حدود ۸٫۴ سیکل لگاریتمی رسیده است. ثبات و عدم رشد بیشتر در این دوران را می توان به دلیل کاهش دما به میزان ۱۰ درجه سلسیوس در روز پنجم دانست.در مورد نمونه شاهد، با گذشت زمان تعداد باکتری های لاکتیکی افزایش یافته است که نشان دهنده سرعت پایین رشد در عدم حضور کشت آغازگر می باشد و در نهایت به مقدار حدود ۶/۸ سیکل لگاریتمی در روز پانزدهم می رسد. تفاوت میانگین شمارش باکتری های اسید لاکتیک در بین تمامی روزهای تخمیر و رسیدن معنادار می باشد همچنین میانگین شمارش باکتری های اسید لاکتیک نمونه تلقیح شده با *Lactobacillus plantarum* و نمونه تلقیح شده با کشت مخلوط، اختلاف معنی داری ندارند اما با سایر نمونه ها دارای تفاوت معنی دار می باشند.بدین صورت که نمونه تلقیح شده با *Lactobacillus sakei* بیشترین تعداد باکتری های اسید لاکتیک و نمونه شاهد کمترین تعداد را دارا می باشد.

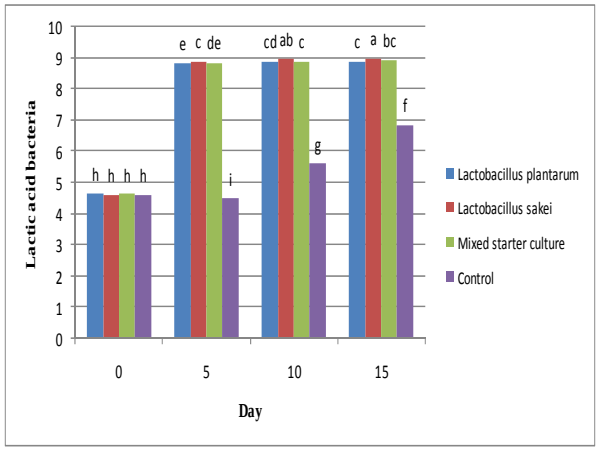


**Fig 8** The changes of the lactic acid bacteria during fermentation and ripening

در تحقیقی که اثر تلقیح باکتری *Lactobacillus Sakei* بر کیفیت میکروبی نوعی محصول گوشتی تخمیری چینی بررسی شد، نتایج حاصل از شمارش باکتری های لاکتیکی در طی روز های نخست به سرعت افزایش یافت و به حدود log 8.79 رسید [۸].

همچنین در تحقیقی که در جهت بهبود خصوصیات حسی محصول گوشتی تخمیری خشک با افزودن *Debaryomyces hanseni* و *Lactobacillus Sakei* صورت گرفت تعداد باکتری های اسید لاکتیک در طی هفت روز نخست به بیشترین مقدار خود (log 8.5-9) و سپس تعداد آنها تا انتهای فرایند تقریبا ثابت باقی ماند[۳۷].

همچنین در تحقیقی دیگر که خصوصیات میکروبی و فیزیکوشیمیایی نوعی محصول گوشتی تخمیری با گونه های تولید کننده باکتریوسین *Lactobacillus sakei* صورت گرفت، تعداد باکتری های اسید لاکتیک در ابتدا در حدود log 5-6 گزارش شد که در سه روز نخست به بیشترین مقدار خود یعنی در حدود log7.8-8.5 در میان نمونه ها رسید و سپس تا انتهای فرایند رسیدن تقریبا ثابت باقی ماند[۲۷].

در تحقیقی که ویژگی های بیوشیمیایی و حسی نوعی محصول گوشتی تخمیری جنوب ایتالیا مورد بررسی قرار گرفت گزارش شده است که باکتری های اسید لاکتیک از ابتدا فلور میکروبی غالب می باشند وتعداد آنها پس از سه روز به حدود log 8 میرسد و این مقدار در طول دوره رسیدن حفظ می شود[۳۸].

در تحقیقی دیگر که ویژگی های محصولات گوشتی تخمیری طبیعی منطقه شمال شرق ایتالیا را بررسی کرده است، تعداد باکتری های لاکتیکی در شروع تخمیر در حدود log 4-6 در میان نمونه ها گزارش شده است که به سرعت در روزهای ابتدایی تخمیر افزایش یافته اند و در روز سوم به حدود log8-9 رسیدند و تا پایان زمان تخمیر ثابت باقی ماندند[۳۳].

## ۴- نتیجه گیری

نتایج آنالیزهای شیمیایی نشان دادند که تلقیح باکتری های لاکتیکی سبب تولید اسید و کاهش pH در نمونه ها شده است که البته در پایان فرایند تخمیر و رسیدن، pH نمونه شاهد از بقیه

نمونه ها کمتر بوده است و نمونه تلقیح شده با کشت مخلوط بیشترین pH را داشته است. در طی تخمیر و رسیدن رطوبت روند کاهشی داشته است.در رابطه با شمارش باکتری های لاکتیکی بین نمونه تلقیح شده با *Lactobacillus plantarum* و کشت مخلوط تفاوت معناداری وجود ندارد اما با سایر نمونه ها در سطح ۵٪ دارای تفاوت معنادار می باشند. در این مورد نمونه تلقیح شده با *Lactobacillus sakei* بیشترین تعداد باکتری های اسید لاکتیک را دارا می باشد که به دلیل فاز سکون کوتاه و سرعت رشد بالا و مقاومت این باکتری به شرایط محیطی می باشد و نمونه شاهد کمترین تعداد را دارا می باشد. نتایج حاصل از آزمون بافت سنجی وارنر نشان می دهند که در بین روزهای صفر و ۱۵ میانگین حداکثر نیروی برشی با تفاوت معناداری افزایش یافته است در حالیکه میانگین انرژی مورد نیاز برای برش تفاوت معناداری نداشته است. در بین تیمارها، میانگین حداکثر نیروی برشی نمونه تلقیح شده با *Lactobacillus sakei* با تفاوت معناداری از بقیه نمونه ها بیشتر بوده است در حالیکه میانگین انرژی مورد نیاز برای برش تیمارها تفاوت معناداری با یکدیگر نداشته است.

## ۵- قدردانی

از شرکت فراورده های گوشتی کاله (سـولیکو) بابـت حمایـت از این پروژه تشکر و قدردانی میگردد.

## ٦- منابع

[1] Kolozyn-Krajewska,D and Dolatowski,Z.J. 2012. Probiotic meat products and human nutrition. Journal of Process Biochemistry, 47:1761-1772.

[2] De Macedo,R.E.F.,. Pflanzer, S.B ., Gomes,C.L. 2012. Probiotic meat products. http:// dx.doi. org/ 10.5772/50057.

[3] De Vuyst,L., Verluyten,J ., Leroy,F. 2006. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. Journal of Food Microbiology, 106: 270-285.

[4] Hugas,M and Monfort,J.M. 1996. Bacterial starter cultures for meat fermentation. Journal of Food chemistry, 4: 547-554.

[5] Ammor,M.S and.Mayo, B. 2007. Selection criteria for lactic acid bacteria to bea used as functional starter cultures in dry sausage production:An update. Journal of Meat Science, 76: 138-146.

[6] Esmaeilzadeh ,P., Mirahmadi, F., Mzaheri,M. 1389. Effect of Lactobacillus plantarum and Lactobacillus fermentum on aerobic bacteria, lactic acid bacteria, antrobacteriace and decrease of nitrite during fermentation in a fermented sausage.journal of veterinary medicine, 10: 47-60.

[7] Lanciotti, R., Iucci, L., Patrignani, F., Belletti, N., Ndagijimana,M., Guerzoni, M. E., Gardini,F. 2007. Role of surface inoculated Debaryomyces hansenii and Yarrowia lipolytica strains in dried fermented sausage manufacture. Journal of Meat Science, 75: 669-675.

[8]Wang,W., Wang,X.H., Ren,H.Y., Liu,D.Y ., Zhu,W.Y. 2013. Effect of inoculating Lactobacillus sakei starter cultures on the microbiological quality and nitrite depletion of Chinese fermented sausages. Journal of Food Control, 32: 591-596.

[9] Arief, I., Wulandari, E. L., Aditia, M., Baihaqi,M., Noraimeh., Hendrawan. 2014. Physicochemical and microbiological properties of fermented lamb sausage using probiotic Lactobacillus plantarum IIA-2C12 as starter culture. Environmental sciences, 20: 352-356.

[10]Sidira,M., Kandylis,P., Kanellaki,M., Kourkoutas,Y. 2015. Effect of immobilized Lactobacillus casei on the evolution of flavor compounds in probiotic dry fermented sausages during ripening. Journal of meat science, 100: 41-51.

[11]Unknown. (۱۳78).Guidelines of activation of liofilized cultures., Iranian Research Organization for Science and Technology. [Farsi]

[12] Lame ,H. 1380. Fermentation of foods. Azad university publication.

[13] Mc Farland standards- Wikipedia. The free encyclopedia. Wikipedia. 5 July 2009. Available from : http//Wikipedia.com

[14] Sutton,S. 2006. Measurement of cell concentration in suspention by optical density. PMF Newsletter. Available from http// www.linkedin.com

[15] Giuseppe,C., Rosalinda,U., Lucilla,I ., Kalliopi,R. 2005. Characterization of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. Meat Science, 69: 381-392.

[16] Huseyn,B., Mustafa,B. 2006. Colour and textural attributes of sucuk during ripening. Meat Science, 73: 344-350.

[17] Jouhan,L. 1998. Sausage fermentation and greening. Bacteriology/Food science. University of Wisconcin-Madison. 324.

[18] Unknown. (١٣74). Meat and meat products-pH measurment. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Iranian National Standard No1028, the third revision. [Farsi]

[19] Unknown. (١٣83). Meat and meat products-Moisture measurment. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Iranian National Standard No745, the third revision. [Farsi]

[20]Unknown. (١٣٧٥). Meat and meat products-Protein measurment. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Iranian National Standard No924, the third revision. [Farsi]

[21]Unknown. (١٣83). Meat and meat products-Fat measurment. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Iranian National Standard No742, the third revision. [Farsi]

[22] Unknown. (١٣82). Meat and meat products-Ash measurment. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Iranian National Standard No744, the third revision. [Farsi]

[23] Serdaroglu,M and Ozsumer,M.S. 2003. Effect of soy protein,whey powder and wheat gluten on quality characteristic of cooked beef sausages formulated with 5,10 and 20% fat. Journal of Food science and Technology, 6:2

[24]Unknown. (1379). Meat and meat products-Lactic acid bacteria count. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Iranian National Standard No5272, the third revision. [Farsi]

[25] Essid,I and Hassouna,M. 2013. Effect of inoculation of selected Staphylococcus xylosus and Lactobacillus plantarum strains on biochemical, microbiological and textural characteristics of a Tunisian dry fermented sausage. Journal of Food Control, 32: 707-714.

[26] Jin.Y., Zhao, L., Ma, C., Song, H., Li, H., Wang,Z., Xiao, S. 2011. Physico chemical characteristics and free fatty acid composition of dry fermented mutton sausages as affected by the use of various composition of starter cultures and spices. Meat science.88:761-766.

[27] Zdolec, N., Hadziosmanovic, M., Kozacinski, L., Cvrtila, Z., Filipovic, I., Skrivanko, M., Leskovar, K. 2008. Microbial and physicochemical succession in fermented sausages produced with bacteriocinogenic culture of Lactobacillus sakei and semi-purified bacteriocin mesenterocin Y.Meat Science,80:480-487.

[28]Bozkurt,H and Bayram,M.2006.Colour and textural attributes of sucuk during ripening.Meat Science,73:344-350

[29] Ockerman,H., Basu,L.2010.Fermented sausage production.The ohio state university publication.

[30] Erkkila,S., Ptaja,E., Erola,S., Lilleberg,L., Mattila-Sandholm,T ., Suihko,M.L. 2001. Flavour profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter cultures. Journal of Meat Science, 85: 111-116.

[31] Tan,F.J., Wanangkam, A., Liu, D. C., Swetwiwanthana,A. 2012. An innovative mwthod for the preparation of mum (Thai fermented sausages) with acceptable technological quality and extended shelf life. Journal of Food chemistry, 135: 515-521.

[32] Holley, R. A and Muthukumarasamy, P. 2006. Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate microencapsulated Lactobacillus reuteri . journal of Food Microbiology, 111: 164-169.

[33] Radulvic,Z., Zivkovic,D., Mirkovic, N., Petrusic, M., Stajic, S., Perunovic, M., Paunovic, D. 2011.Effect of probiotic bacteria on chemical composition and sensory quality of fermented sausages.Food Science,1:1516-1522.

[34] Mendoza, E., Garcia, M. L., Cassas, C., Selgas,M.D. 2001. Inulin as fat substitute in low fat, dry fermented sausages. Journal of Meat science, 57(4): 387-393.

[35] Pietrasik,Z. 1999. Effect of content of protein, fat and modified starch on binding textural characteristics, and colour of comminuted scalded sausages. Journal of Meat science, 51(1): 17-25.

[36] Serdaroglu, M., Yildiz, G., Abrodimov, K.

2005. Quality of low fat meatballs containing Legume flours as extenders. Journal of Meat science, 70(1): 99-105.

[37] Sanz,Y., Bolumar,T., Flores, M., Aristoy, M-C., Toldra, F., Flores, J. 2006. Sensory improvement of dry-fermented sausages by the addition of cell-free extracts from Debaryomyces hansenii and Lactobacillus sake. Meat science,72:457-466.

[38] Villani,F., Casaburi,A., Aristoy, M. C., Cavella,S., Di Monaco, R., Ercolini, D., Toldra,F. 2007. Biochemical and sensory characteristics of traditional fermented sausages of Vallo di Diano (southern Italy) as affected by the use of starter cultures.

# Effect of Lactobacillus plantarum and Lactobacillus sakei on some physicochemical and microbial properties of fermented sausage

**Mohammadtaheri, M. [1], Hoseini, E. [2*]**

1. MSc, Department of Food Science and Technology, Science and Research branch. Islamic Azad university, Tehran, Iran.
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Science and Research branch. Islamic Azad university, Tehran, Iran.

**(Received: 2015/12/13 Accepted: 2016/11/23)**

Fermented sausage is a traditional product that exist in all parts of the world. Lactic acid bacteria widely used for fermented sausage production. The aim of this study was to evaluate , the effect of two types of lactic starter culture (*Lactobacillus sakei* & *Lactobacillus plantarum*) on texture, chemical and microbial properties of fermented sausage. For this purpose, following the cultivation and preparation, starter cultures were inoculated into samples. physico-chemical and microbial tests were done during the course of fermentation and ripening period and their changes have been investigated on days 0, 5, 10 and 15. Also texture analysis tests were evaluated on day 0 and 15. The results show that sample inoculated with *Lactobacillus plantarum* had the most pH and lactic acid bacteria average. Moisture has been reduced and protein, fat and ash content have been increased in all samples. Also the results show that sample inoculated with *Lactobacillus sakei* has the most maximum shear force average**.**

**Key words:** Fermented sausage, Lactic acid bacteria, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus sakei

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