بررسی اثر *Lactobacillus fermentum* ,*Lactobacillus plantarum* بر باکتری‌های هوازی مزوفیل، باکتری‌های اسید لاکتیک، آنتروباکتریاسه و کاهش نیتریت طی دوره تخمیر در نوعی سوسیس تخمیری.

پیمان اسماعیل زاده[1]*، فردین میراحمدی[2]، مهناز مظاهری[3]

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۱/۱۷ تاریخ پذیرش: ۸۹/۳/۱۰

چکیده

املاح نیتریت سدیم غالباً به عنوان نگهدارنده، آنتی اکسیدان و تثبیت کننده رنگ در محصولات گوشتی استفاده می شوند و نیتریت به عنوان یک ماده سرطانزا شناخته شده است. هدف از این تحقیق مطالعه اثرات تلقیح باکتری های اسید لاکتیک در میزان کاهش نیتریت محصولات گوشتی (سوسیس تخمیری) می‌باشد. سه سویه *L. fermentum* PTCC 1638, *L. plantarum* PTCC 1058 و *Leu. mesenteroides subsp mesenteroides* PTCC 1563 برای بررسی توانایی کاهش نیتریت و بار میکروبی انتخاب گردیدند. دو سوش *L. plantarum*, *L. fermentum* و مخلوط آنها، به عنوان مایه های کشت میکروبی در تولید سوسیس استفاده شده است. تراکم میکروبی با استفاده از غلظت 0/5 مک فارلند در طول موج ۶۰۰nm به وسیله روش اسپکتروفتومتری استاندارد گردید. مایه های کشت، با تعداد معادل 108 cfu/gfarsh به سوسیس‌های حاوی ۱۲۰ µg/g نیتریت، تلقیح شد ند. میانگین میزان نیتریت باقیمانده، pH، اسیدیته، تعداد کل لاکتوباسیلوس‌ها، تعداد کل باکتری های هوازی مزوفیل و تعداد کل باکتری های آنتروباکتریاسه درطول دوره تخمیر، در مقایسه با تیمار شاهد معنی دار شده است($P<0.05$). میانگین نیتریت باقیمانده در سوسیس تخمیری تلقیح شده با *L. fermentum*، *L. plantarum* و مخلوط، به ترتیب به میزان۶۵/۸٪، ۷۵/۴٪ و ۶۸/۳٪ کاهش یافته است، در حالیکه در تیمار شاهد این میزان کاهش ۶۰٪ بوده است. همچنین بررسی های آماری نشان داده است که بین میانگین تعداد کل باکتری های هوازی مزوفیل در سوسیس های تلقیح شده با مایه کشت مخلوط و *L. fermentum* تفاوت معنی داری وجود ندارد($P>0.05$).

واژگان کلیدی: نیتریت، لاکتوباسیلوس فرمنتوم، لاکتوباسیلوی پلانتاروم، سوسیس تخمیری

مقدمه

در فرمولاسیون سوسیس‌ها، نیتریت یا نیترات سدیم به عنوان عمل آورنده و نگه‌دارنده استفاده می‌شوند، استعمال این نگه‌دارنده در ساخت فراورده‌های گوشتی، بخصوص در سوسیس و کالباس‌ها، رایج‌تر از سایر مواد نگه‌دارنده است(۲۷). اضافه کردن نیتریت در سوسیس‌ها (تخمیری و غیر تخمیری) بدلیل عملکردهای مختلف آن در این فراورده‌ها می باشد، از جمله مهمترین عملکرد های آن شامل: ترکیب با ماده رنگی گوشت و تولید رنگ قرمز صورتی، ایجاد عطر و طعم مطلوب، استقرار و تسلط باکتری‌های گرم مثبت مفید. جلوگیری از اکسیداسیون چربی ها که باعث تولید طعم تند می شود، می‌باشد (۲۳،۲٤،۲۷). نیتریت‌ها به خاطر قدرت شدید اکسیدکنندگی و احیاءکنندگی، سموم خطرناکی هستند، اهم خطرات آن عبارتند از تبدیل هموگلوبین به مت هموگلوبین، مهار زنجیره تنفسی سلول و آنزیم‌های میکروزوم ها همچنین تخریب ویتامین A، بتاکاروتن و ویتامینC در غذا و داشتن خاصیت تراتوژن و خطر سنتز نیتروزامین‌های سرطانزا توسط نیتریت‌ها امکان دارد. موتاژن بودن و خاصیت سرطانزایی ترکیبات نیتروز، به اثبات رسیده است خصوصاً در کودکان و افراد مستعد می‌تواند این عامل خطرناکتر باشد (٤٦،۹) علاوه بر این باکتری‌های لاکتیکی توانایی کاهشpH را تا دامنه ۳/۵–٤ دارند، این باکتری‌ها بدلیل تولید اسید و کاهشpH و تولید سایر مواد آنتی باکتریالی و باکتریوسینی قادر به جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم منفی هستند (۵۲،٤٦،٤۲،۳۲). نشان داد که تخمیرهای لاکتیکی قادر به مهار تکثیر و رشد پاتوژن های gr منفی مثل: *Salmonella typhimurium ,Shiglla flexreri ,Escherichia coli, Compylobacter jejoni* هستند (۵۱).

مواد و روش کار

باکتری های اسید لاکتیک وفعال سازی: با توجه به سوش‌های مورد استفاده در سوسیس های تخمیری سه سویه *Leu. meseneteriodes* subsp.*mesenteroides* PTCC 1563, *L. fermentum* PTCC 1638, *L. plantarum* PTCC 1058 که در ایران (سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران) بصورت رسمی وجود دارند برای بررسی انتخاب شدند. آمپول‌های لیوفلیزه این باکتری ها طبق دستورالعمل ارسالی از بانک میکروبی فعال گردیدند، پس از همگن سازی کامل آنها، مخلوط‌ها را به سه لوله حاوی MRS broth انتقال داده و آنرا در شرایط بی‌هوازی (جار بی هوازی) قرار داده و همراه با نمونه‌های شاهد در انکوباتور قرار داده شدند، لوله‌های حاوی *L. fermentum*, *L. plantarum,* را در دمای۳۷°c و leu. mesenteroides را در30°c به مدت ۸۰ ساعت قرار داده شدند. پس از این مدت، لوله‌ها با انواع شاهد آنها مقایسه گردید، با بررسی کدورت لوله ها این مطلب که باکتری‌ها رشد کرده اند، اثبات گردید. سپس از این کشت‌های اولیه و از نمونه های شاهد آنها کشت‌های خطی بر رویMRS agar انجام گرفت و در همان شرایط ذکر شده فوق نگهداری گردیدند. پلیت ها پس از ٤۲ ساعت بررسی شدند، کلنی‌ها به تعداد زیاد مشاهده شدند و در پلیت‌های شاهد هیچ کلنیی مشاهده نشد. در این مرحله آزمایش‌های حسی و کاتالاز بر روی آنها انجام گرفت.[بوی اسیدی بصورت سبک به مشام رسید و تست کاتالاز آن نیز منفی بود] (۲۱،۱۱).

غلظت‌های میکروبی: برای تهیه غلظت های میکروبی با استفاده از روش"کدورت سنجی" میزان جذب نور در طول موج ٦۰۰nm در دستگاه اسپکتروفتومتر Jenway 6315 UV, Vis اندازه گیری شد، سپس بر اساس اعداد حاصله و با استفاده از میزان جذب لوله ۰/۵ مک فارلند (Mc. Farland)، تعداد باکتری‌ها در سوسپانسیون های مورد استفاده محاسبه

گردیدند. علاوه برآن کشت های متوالی از سوسپانسیون های میکروبی گرفته شد تا دانسته میکروبی کنترل گردد. تراکم میکروبی، برای تلقیح به سوسیس ها برابر با 8.5×108 سلول در میلی لیتر بود (۵۷،۵۶،۲۴).

فرمولاسیون: سوسیس برطبق سنن و رسوم ایران از گوشت حلال خریداری شده از کشتارگاه صنعتی استفاده شده است و ترکیبات افزودنی نیر بر طبق ذائقه ایرانی اضافه گردیده است. فرمولاسیون به شرح زیر می‌باشد:

۸۴٪ گوشت گاو بدون استخوان با ۲۰ ٪ چربی- ۹/۳٪ یخ-۲/۸٪ سویا -۰/۹۳٪ نمک تصفیه و آسیاب شده-۱/۳٪ پودر شکر-۰/۱۷٪ پلی فسفات-۰/۱۲٪ نیتریت سدیم- ۰/۱۹٪ دلتا گلوکونولاکتون سدیم- ۰/۳۷٪ پودر فلفل سیاه-۰/۳۷٪ سیر تازه. میزان سوسپانسیون میکروبی اضافه شده، ۵٪ وزن فارش بوده است. نمونه‌ها، در درجه حرارت۳۰°c در شرایط میکروآئروفیلیک به مدت پنج روز (دوره تخمیر) نگهداری شدند. بررسی‌ها از زمان صفر (درست بعداز از پر کنی به داخل لفاف) شروع و هر ۲۴ ساعت، آزمونها انجام گرفت. آزمونها برای هر چهار نوع سوسیس با سه تکرار انجام گرفته است(۴۲،۴۴،۶۹).

توانایی کاهش نیتریت در محیط کشت MRS broth :پس از انتخاب سویه ها، فعال سازی آنها و تهیه غلظت های مورد نیاز، مایه های کشت، به محیط کشت MRS broth که حاوی $120\ \mu g/ml$ نیتریت سدیم است اضافه می گردد. محلول نیتریت سدیم به میزان ۱ میلی لیتر به لوله های حاوی ۹ میلی لیتر محیط کشت فوق اضافه گردید(۳۳،۳۴). میزان نیتریت کشت‌ها در روز دوم و چهارم، طبق استاندارد ۹۳۲ اندازه‌گیری گردید(۳۲،۷،۵).

مقدار نیتریت باقیمانده: این آزمون طبق استاندارد ۹۳۲ انجام می گیرد، اصول این روش عبارت است از استخراج ماده مورد آزمایش با آب گرم، رسوب دادن پروتئین‌ها با استفاده از بوراکس، فروسیانور پتاسیم و استات روی، صاف کردن و ایجاد کمپلکس رنگی درنتیجه اظافه کردن سولفانیل آمید و الفا نفتیل آمین به عصاره استخراج شده و اندازه گیری شدت رنگ قزمز ایجاد شده در مجاورت نیتریت با روش اسپکتروفتومتری به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر Jenway 1563 ساخت انگلیس در طول موج ۵۳۸ نانومتر و محاسبه مقدار نیترات با مقایسه با محلول های استاندارد تهیه شده، صورت گرفت(۵).

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 WTW 720 ساخت آلمان خوانده شد(۳،۲).

اسیدیته: مقادیر اسیدیته نیز در طول مدت تخمیر و رسیدن اندازه گیری شدند، ۵ گرم نمونه را برداشته و دو بار آنرا چرخ کرده و با ۵ میلی لیتر آب مخلوط گردیدند، برای اندازه گیری اسیدیته، نمونه تهیه شده به روش فوق در حضور معرف فنل فتالئین و به وسیله NaOH ۰/۱ نرمال، تیتر گردیده و اسیدیته آن بر حسب اسید لاکتیک گزارش شد(۲۵،۲).

شمارش باکتری ها هوازی مزوفیل، باکتری های لاکتیکی و آنتروباکتریاسه: ۵گرم 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 گردیدند و در محیط کشت های مربوطه کشت داده شدند. (۲،۶،۷،۸،۹،۱۰). شرایط کشت، انکوباسیون و شمارش به شرح جدول شماره ۱ می باشد.

جدول شماره ۱- شرایط کشت و انکوباسیون شاخص های میکروبی مورد اندازه گیری در سوسیس ها.

شماره رفرنس استاندارد	شرایط هوایی	نحوه شمارش	نحوه کشت دادن	گرمخانه‌گذاری (ساعت)	شرایط انکوباسیون	محیط کشت	میکروب
۴۷۲۱	بی‌هوازی	Total Count	Pure Plate	۷۲	$^{c}۳۰^{\circ}$	MRS	LAB*
۵۲۷۲	هوازی	Total Count	Surface	۴۸	$^{c}۳۰^{\circ}$	PCA	AMB**
۱-۲۴۶۲	هوازی	MNP	-	۱۸	$^{c}۳۷^{\circ}$	WPB	EB***
			-	۲۴		EE broth	
			Surface	۲۴		WRBG	

* باکتریهای اسید لاکتیک
** باکتریهای نوزوفیل
***باکتریهای بی‌هوازی

جدول شماره ۲- شرایط انکوباسیون و میزان کاهش نیتریت در محیط کشت MRS broth

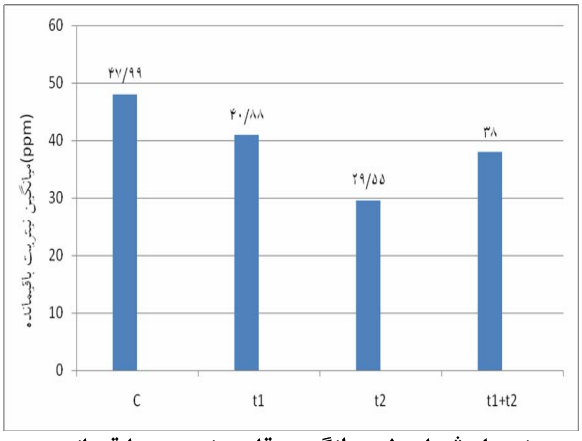
روز چهارم	روز دوم	شرایط	میکروارگانیسم
۳۰ ppm	۶۸ ppm	بی‌هوازی- ۳۰^{oc}	لاکتوباسیلوس مزانتروئیدوس
۱۰ ppm	۴۰ ppm	بی‌هوازی- ۳۷^{oc}	لاکتوباسیلوس پلانتاروم
۸ ppm	۳۳ ppm	بی‌هوازی- ۳۷^{oc}	لاکتوباسیلوس فرمنتوم

تمام بررسی‌های آماری به وسیله تجزیه واریانس و بر اساس طرح فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی و در سطح معنی‌داری ۵٪ (α=۰،۰۵) به وسیله نرم افزار SAS انجام گرفته است و مقایسه میانگین ها به روش دانکن صورت گرفت.

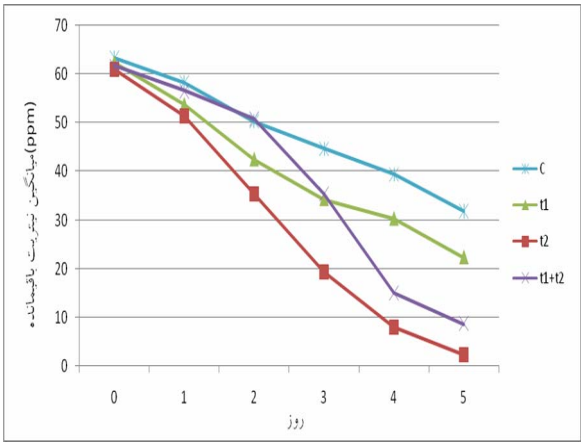
نتایج

شرایط انکوباسیون دراین تحقیق در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. در بررسی اولیه نشان داده شد که هر سه سوش مورد نظر توانایی کاهش نیتریت را در MRS broth دارند.

با توجه به نتایج بدست آمده از بررسی کاهش نیتریت در محیط MRS broth دو سوش *L. plantarum*، *L. fermentum* و یک کشت مخلوط از آنها در حضور شاهد برای بررسی‌های بیشتری انتخاب گردیدند و به سوسیس‌ها تلقیح شدند. نمودار ۲ نشان دهنده روند کاهش نیتریت باقیمانده در سوسیس‌ها است.



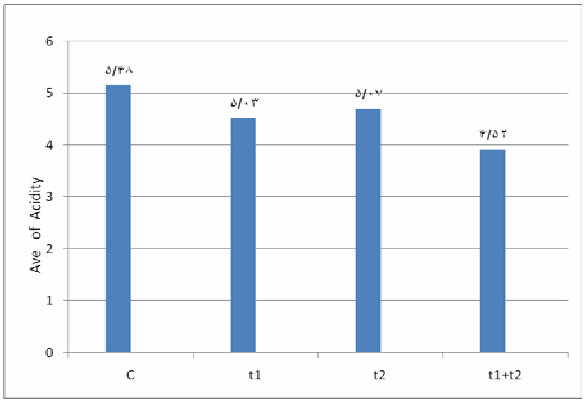
نمودار شماره۱- میانگین مقادیر نیتریت با قیمانده سوسیس‌ها در مدت ۵ روز



نمودار شماره ۲- روند کاهش نیتریت در سوسیس ها، در مدت ۵ روز

سوسیس تلقیح نشده:(C)
سوسیس تلقیح شده با *L. fermentum*: (t_1)
سوسیس تلقیح شده با*L. plantarum*: (t_2)
سوسیس تلقیح شده با کشت مخلوط: (t_1+t_2)

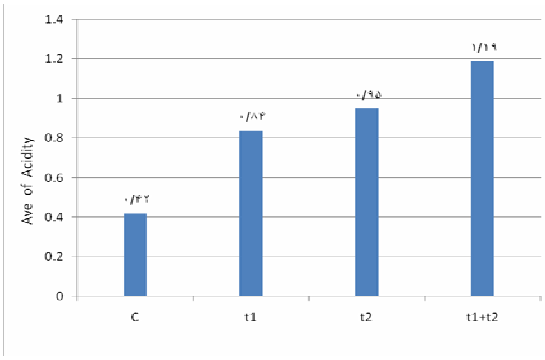
در تمامی نمونه‌ها میزان pH یک روند نزولی را طی کرده است، درسوسیس تلقیح شده با کشت‌های *L. plantarum*، *L. fermentum*، مخلوط و شاهد، میزان pH اولیه سوسیس‌ها ۶/۲ بوده است. میزان میانگین pH سوسیس‌ها در نمودار ۳ نشان داده شده است.



نمودار شماره ۳- میانگین pH سوسیس ها در مدت ۵ روز

سوسیس تلقیح نشده:(C)
سوسیس تلقیح شده با *L. fermentum*: (t_1)
سوسیس تلقیح شده با*L. plantarum*: (t_2)
سوسیس تلقیح شده با کشت مخلوط: (t_1+t_2)

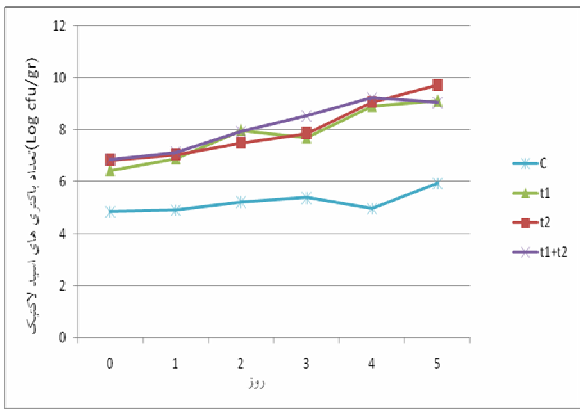
در این تحقیق میزات اسیدیته اولیه برابر با ۰/۳ بوده است و نتایج حاصل از بررسی ها در نمودار ۳-٤ نشان داده شده است.



نمودار شماره۴- میانگین اسیدیته سوسیس ها در مدت ۵ روز

سوسیس تلقیح نشده:(C)
سوسیس تلقیح شده با *L. fermentum*: (t1)
سوسیس تلقیح شده با*L. plantarum*: (t2)
سوسیس تلقیح شده با کشت مخلوط: (t1+t2)

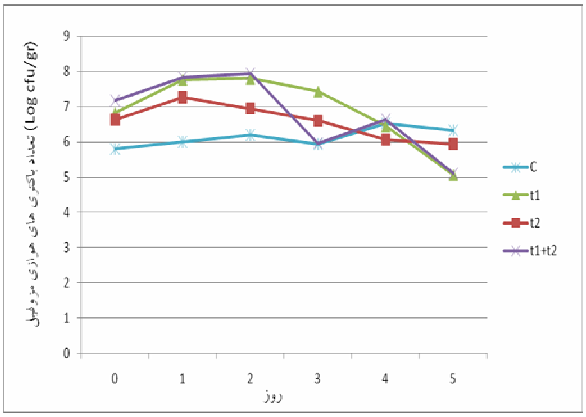
درسوسیس تلقیح شده با *L. plantarum*، *L. fermentum* و مخلوط در طی ۵ روز (دوره تخمیر)، شمارش تعداد باکتری‌ها، از Log6.7cfu/g به Log9.7cfu/g، Log9.1cfu/g، Log9cfu/g افزایش پیدا کرد. سوسیس تلقیح نشده (شاهد) تا روز ۵ تقریباً افزایش کمی داشته است و از Log4.5cfu/g به Log5.9cfu/g رسیده است. نمودار شماره ۵ نشان دهنده تغییرات میانگین تعداد باکتری های لاکتیک در مدت ۵ روز در نمونه‌های مورد آزمون است.



نمودار شماره ۵- روند تغییرات میانگین تعداد باکتری های اسید لاکتیک در۵ روز

سوسیس تلقیح نشده:(C)
سوسیس تلقیح شده با *L. fermentum*: (t1)
سوسیس تلقیح شده با *L. plantarum*: (t2)
سوسیس تلقیح شده با کشت مخلوط: (t1+t2)

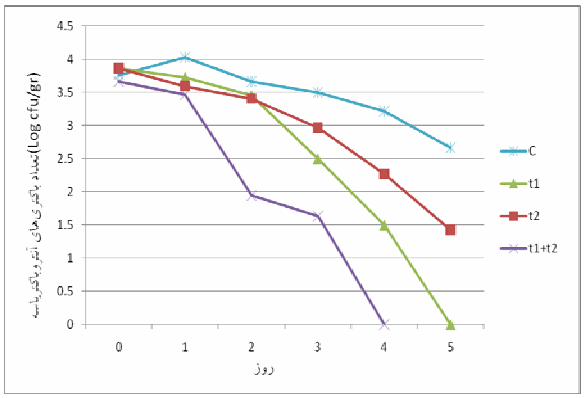
در سوسیس تلقیح شده با *L. plantarum*، *L. fermentum* و مخلوط تعداد کلی باکتری‌های هوازی مزوفیل در زمان صفر برابر با Log6.6cfu/g بود که در ۵ روز بترتیب به Log5.9cfu/g، Log5.1cfu/g و Log5.1 کاهش یافت. در نمونه تلقیح نشده تعداد کلی باکتری‌ها در طی ۵ روز با شیب ملایم کاهش پیدا کرد و از Log5.8cfu/g به Log6.3cfu/g رسید. نمودار شماره ٦ نشان دهنده روند تغییرات میانگین تعداد لگاریتمی کل باکتری‌های هوازی مزوفیل در مدت ۵ روز است.



نمودار شماره ۶- روند تغییرات میانگین تعداد باکتری های هوازی مزوفیل در ۵ روز

سوسیس تلقیح نشده:(C)
سوسیس تلقیح شده با *L. fermentum*: (t1)
سوسیس تلقیح شده با *L. plantarum*: (t2)
سوسیس تلقیح شده با کشت مخلوط: (t1+t2)

روند کاهش میانگین شمارش لگاریتمی کلی آنتروباکتریاسه در نمودارهای شماره۳-۷ و در مدت۵ روز نشان داده شده است.



نمودار شماره ۷- روند تغییرات میانگین شمارش کلی آنتروباکتریاسه در مدت ۵ روز

سوسیس تلقیح نشده:(C)
سوسیس تلقیح شده با *L. fermentum*: (t1)
سوسیس تلقیح شده با *L. plantarum*: (t2)
سوسیس تلقیح شده با کشت مخلوط: (t1+t2)

بحث

هر سه سوش انتخابی *L. fermentum*، *L. plantarum* و *leu . mesenteroides* توانایی رشد و کاهش نیتریت را در محیط کشت MRS broth دارند، تحقیقات گذشته نیز نشان داده است که باکتری های اسیدلاکتیک در سوسیس‌ها و محیط کشت‌هایی که دارای نیتریت و نیترات هستند، رشد کرده اند و این باکتری‌ها، در حضور نیترات‌ها رشد بیشتری دارند(۵۹). نتایج بررسی‌ها در مورد مقاومت باکتری‌های مورد آزمون، به نیتریت و رشد آنها در MRS broth حاوی نیتریت با نتایج Lee and Park(2000), Navarro et al.,(2006) Change et al.,(1997) مطابقت دارد. ولی بر خلاف تحقیقات انجام شده در گذشته این باکتری‌ها در ٤٨ ساعت نتوانسته اند میزان نیتریت را در بالای ۹۰ ٪ کاهش دهند و Leu. Mesenteroides توانایی کاهش نیتریت کمتری را نسبت به سایر سوش‌ها دارد، در این مورد نتایج بر خلاف نتایج تحقیقات Kalliopi et al.,(2005),Lee and Park (2000) است. با توجه به یکسان بودن محیط‌های کشت و شراط انکوباسیون مشابه در این تحقیق و تحقیقات

گذشته می‌توان دلیل این امر را در تفاوت‌های ژنتیکی و منابع ایزولاسیون اولیه آنها جستجو کرد، ضمن اینکه شرایط نگهداری و لیوفلیزاسیون باکتری‌ها نیز می‌تواند در تغییر توانایی‌های آنزماتیکی و متابولیکی آنها موثر باشد.

در تحقیقات گذشته نشان داده شد که نیترات ونیتریت بدلیل رشد باکتری های احیاء کننده نیتریت در سوسیس‌های تخمیری کاهش پیدا کرده‌اند (٤٦،٤١). لاکتوباسیلوس‌های ایزوله شده از گوشت خوک توانسته‌اند ppm ۱۰۰۰–۲۰۰ نیتریت را در مدت ٢٤ تا٧٢ ساعت کاهش دهند(٧٦). در نوعی سوسیس تخمیری ترکی(Sucuk) نیتریت در مدت هشت روز از ۱۵۰ppm به ppm ۲ کاهش پیدا کرد(٦٣). درگوشت عمل آوری شده و گوشت خردشده که به وسیله *L. plantarum* ,*L. lactice* میزان نیتریت در مدت ٢٤ ساعت و ۳۲ درجه سانتیگراد به ترتیب از ۹۲/۳٪ به ۸۷/٦٪ و از ٦٤/٤٪ به ٤٥/٥٪ کاهش داده شد(٤٤). سوش های لاکتوباسیلوس دارای آنزیم های نیتریت /نیترات رودوکتاز هستند، *L. plantarum* هم در شرایط هوازی و هم بی هوازی دارای فعالیت نیتریت رودوکتازی است (٣٧،٧٧). با توجه به نمودار ۳–۱، در این تحقیق*L. plantarum* دارای بیشترین توانایی در بین نمونه ها تلقیح شده برای کاهش میزان نیتریت در محیط گوشتی سوسیس است و کمترین فعالیت مربوط به *L. fermentum* است. در محیط کشت MRS broth، توانایی *L. fermentum* بیشتر از *L. plantarum*گزارش گردید و بر عکس در محیط گوشتی توانایی *L. plantarum* در کاهش نیتریت بسیار بالاتر از *L. fermentum* دیده شد. ممکن است که وجود اختلاف در توانایی آنها برای کاهش نیتریت در محیط کشت اختصاصی (MRS broth) و محیط گوشتی سوسیس ناشی از وجود ترکیبات مختلف پروتئینی، لیپیدی و کربوهیدراتی و عملکرد متفاوت آنها در حضور این ترکیبات باشد. نتایج بدست آمده در مورد توانایی کاهش نیتریت باکتری‌های لاکتیک مورد آزمون و تفاوت عملکرد آنها در محیط ماده غذایی و محیط کشت MRS broth، با نتایج بدست آمده با تحقیقات Panthitra and Contipra (2005). Woodbury (1984), Hosyin and Osman (2004), Garmeine et مطابقت دارد و تفاوت آنها در سرعت و میزان کاهش نیتریت است که ممکن است به دلیل شرایط متفاوت مورد استفاده در تولید سوسیس‌ها و یا اساساً تفاوت ژنتیکی باکتری‌ها با همدیگر باشد. با توجه به بررسی‌های انجام گرفته در این تحقیق نشان داده شده است که با افزایش اسیدیته و تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک توانایی کاهش نیتریت افزایش، حتی نوع مایه کشت میکروبی (تکی یا مخلوط) در سرعت و میزان کاهش نیتریت موثر است. در این بررسی تفاوت معنی‌داری بین میانگین نیتریت باقیمانده سوسیس‌ها وجود دارد ($P<0.05$). نتایج بدست آمده در خصوص کاهش نیتریت با نتایج بدست آمده به وسیله Garmeine et al.,(2005), Huseyin and Mustafa(2006), Panthitra and Contipra (2005) مطابقت دارد.

در تولید سوسیس‌های تخمیری در طی دوره تخمیر میزان pH بالا رفته و سپس همراه با کاهش درجه حرارت pH در "دوره رسیدن" و "انبار" ثابت می‌ماند (٤٥،٤٣). میزان کاهش pH در سوسیس‌های مختلف بسیار متفاوت است و بسته به شرایط تولید، ذائقه جوامع، نحوه یا روش تولید و استفاده از کشت‌های استارتر متفاوت خواهد بود، مثلاً در سوسیس‌های ترکی باید ٥/٤ ≤pH باشد(٣٤). در طول دوره تخمیر میزان pH به موازات افزایش شمارش باکتری های لاکتیک، کاهش می یابد(٥٩). اگرچه *L. fermentum* در مدت ٥ روز pH را کمی بیشتر کاهش داده است اما از لحاظ آماری، سوسیس های تلقیح شده با *L. fermentum* و *L. plantarum* با هم تفاوت معنی داری ندارند($P>0.05$) و در عین حال هر سه نمونه تلقیح شده دارای تفاوت معنی داری با نمونه شاهد هستند($P<0.05$)، ممکن است بافری بودن محیط باعث شده است که pH در نمونه تلقیح شده با *L.*

fermentum و *L. plantarum* کاهش بیشتری نیابد. همچنانکه در نمودار ۳-۳ دیده می شود، مطلوبترین وضعیت از نظر pH مربوط به سوسیس تلقیح نشده است که بعداز ۵ روز برابر با ۵/۵ بوده است. نشان داده شده است که در طی دوره تخمیر تعداد باکتری‌های لاکتیک افزایش میابد و همزمان با آن pH کاهش پیدا کرده است (٦٥) این روند نیز در این تحقیق به وضوح دیده شده است. در کل نتایج بدست آمده از این تحقیق مطابق با نتایج بدست آمده از تحقیقات Doods and Collins(1984), Hoseyin and Osman(2002), Conter et al.,(2002), Hoseiy and Hidayt(2007) می‌باشد. تنها تفاوت آنها شدت کاهش pH است که بدلیل شرایط متفاوت تولید و توانایی متابولیکی سویه‌های بکار رفته است.

معمولاً اسیدیته به نوع و مقدار اسید تولیدی در محیط بستگی دارد، بنابر این با توجه به استفاده از استارتر و یا عدم استفاده از آن و یا نوع استارترهای مختلف مورد استفاده در تولید سوسیس‌های تخمیری و شرایط متفاوت تولید (درجه حرارت، رطوبت،...) مقادیر مختلفی از اسیدیته گزارش شده است، در درجه حرارت بالاتر "دوره تخمیر" میزان اسیدیته بیشتری گزارش شده است، در این مورد در درجه حرارت ۳۵°c تخمیر به مدت٢٤ ساعت و پس از ۱۵ روز "دوره رسیدن" میزان اسیدیته به ۱/٦ رسیده است(٦٨). همچنان که انتظار می رفت، *L plantarum* میانگین اسیدیته را نسبت به *L. fermentum* بیشتر بالا برده است ولی طبق بررسی‌های آماری در سطح۵٪، تفاوت معنی‌داری بین آنها وجود ندارد(P>0.05). *L. plantarum* تقریباً دو برابر *L. fermentum* اسید لاکتیک تولید می کند. ممکن است این بدلیل عدم فرصت کافی برای افزایش تولید متابولیت ها و یا یکسان بودن فعالیت باکتری های لاکتیک در این دو نمونه باشد. در اینجا نیز خواص سینرژیستی باکتری‌های لاکتیک در سوسیس تلقیح شده با کشت مخلوط کاملاً مشهود است. در سوسیس تلقیح نشده میزان اسیدیته بسیار پایین تر از سایر انواع سوسیس ها گزارش گردیده است. افزایش اسیدیته علاوه بر نوع میکروارگانیسم، به تعداد و فعالیت آنها نیز بستگی دارد. تمام سوسیس های تلقیح شده دارای اختلاف معنی داری با نوع شاهد هستند هستند(P<0.05). نتایج بدست آمده با تحقیقات انجام گرفته توسط(Kalliopi et al., (2005) Frederic and . Hui et al.,(2004) Rabi et al., (2006). Luce(2004) مطابقت دارد.

شمارش باکتری‌ها در محصولات بسیار متفاوت بوده است و از104 تا 109 شمارش شده است و این بستگی به شرایط تولید، نحوه فرایند، مواد اولیه، بار میکروبی اولیه آنها و... دارد. شمارش باکتری‌های لاکتیکی در طی دوره تخمیر بالا می رود ولی با توجه به فعالیت باکتری‌ها شدت افزایش آنها متفاوت است(٦٥). در تمام سوسیس‌های تولیدی، منحنی تعداد باکتری‌های لاکتیک در ۱-۲ روز اول افزایش ملایمی دارد (نمودار۳-۵)، این ممکن است به دلیل عدم سازگاری باکتری‌ها با شرایط محیط رشد و سایر شرایط محیط مثل دما و رطوبت باشد، در این تحقیق بیشترین شدت افزایش مربوط به سوسیس تلقیح شده با کشت مخلوط و کمترین آن مربوط به سوسیس تلقیح نشده است. بررسی‌های آماری نشان داده است که در سوسیس‌های تلقیحی با *L. fermentum* و *L. plantarum* بین میانگین تعداد باکتری های لاکتیک تفاوت معنی داری وجود ندارد(P>0.05). حدس زده می‌شود که در سوسیس تلقیح شده با کشت مخلوط ابتدا *L. fermentum* در طی ٤٨ ساعت اولیه و سپس *L. plantarum* غالب گشته است. با توجه به توضیحات بالا، نتایج بدست آمده با نتایج بدست آمده از Phromraksa et al.,(2003), Parvathy et al.,(2004) Belgin et al.,(2005) در روند رشد باکتری های لاکتیک در طی فرایند تخمیر در سوسیس‌های تخمیری مطابقت دارد.

به نظر می‌رسد که عدم غالب شدن باکتری‌های لاکتیک در روزهای نخست باعث افزایش تعداد کلی

باکتری‌ها گردیده است، سپس با افزایش باکتری‌های لاکتیکی، کم کم تعداد باکتری‌های هوازی مزوفیل کاهش می‌یابد. در بسیاری از تحقیقات نشان داده شده است که شمارش کلی باکتری ها طی دوره تخمیر کاهش و یا افزایش پیدا کرده است (٤٦). همچنان که در نمودار شماره ۳-٦ دیده می شود، از روز ۲ و ۳ به بعد بخصوص در مورد سوسیس های تلقیح شده با *L. fermentum* و مخلوط، شمارش کلی باکتری ها بشدت کاهش می یابد. در انتهای روز پنجم بین میانگین تعداد کلی باکتری های سوسیس تلقیح شده با نمونه شاهد اختلاف معنی داری وجود دارد($P<0.05$) ولی بین میانگین نمونه های تلقیح شده با مایه کشت مخلوط و *L. fermentum* تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ($P>0.05$). در مورد سوسیس تلقیح نشده باید گفت که، افزایش تعداد باکتری ها دیده می شود که احتمالاً به دلیل عدم تولید ترکیبات ضد باکتریائی و یا کافی نبودن آنها باشد، همچنین ممکن است که وجود pH و اسدیته مناسب و نیز نبود میکروارگانیسم‌های رقیب در این نمونه باعث افزایش رشد میکروارگانیسم‌ها گردیده باشد. نتایج بدست آمده در تحقیقات مختلف بسیار متفاوت بوده Hoseyin and Osman(2002), Gonzalez and Diez(2002), Lee and Park(2002) و در این تحقیق تعداد باکتری های هوازی مزوفیل کاهش پیدا کرده است.

در بسیاری از تحقیقات نشان داده شده است که تعدادی از باکتری های حساس و غیر مفید مثل:اشرشیا، استافیلوکوکوس های کواگولانز مثبت، باسیلوس سرئوس، آنتروباکتریاسه و... در حین فرایند تخمیر و تولید سوسیس تخمیری به صفر و یا زیر ۱۰۲ کاهش می یابند (٦٥،٥٩) در تحقیقات گذشته شمارش آن بین ۱۰٤ تا کمتر از ۱۰ گزارش شده است(۳۲). رشد آنتروباکتریاسه‌ها در سوسیس تخمیر شده به وسیله *L. plantarum* در اوایل، کاهش پیدا کرده و درطی ۵ روز شمارش آن از Log 3.7cfu/g به Log1.4، در سوسیس تخمیری *L. fermentum* میزان آن از Log3.9cfu/g در مدت ۵ روز به صفر کاهش پیدا کرد و در سوسیس تلقیح شده با کشت مخلوط در مدت ٤ روز شمارش آنتروباکتریاسه‌ها به صفر رسیده است. نتایج بدست آمده با نتایج حاصل از تحقیقات Phromraksa et al.,(2003), Chang et al.,(2004), Navarro et al.,(2006) ولی میزان کاهش در سوسیس های تلقیح نشده متفاوت است، بطوریکه شمارش آنها در مدت ده روز از Log3.8cfu/g به Log1.1cfu/g رسید و درواقع این باکتری ها از بین نمی روند(نمودار۳-۷).

با توجه به مطالب فوق نشان داده شده است که باکتری‌های لاکتیک در محصولات تخمیری گوشتی یا گیاهی، چه بصورت مخلوط و چه بصورت کشت خالص توانایی کاهش بار میکروبی و نیتریت را در حد بالایی دارند. در این تحقیق، *L. plantarum* دارای بیشترین توانایی در بین نمونه‌ها تلقیح شده برای کاهش میزان نیتریت در محیط گوشتی سوسیس است. همچنین بیشترین تعداد باکتری های اسید لاکتیک مربوط به سوسیس تلقیح شده با کشت مخلوط می‌باشد و مایه کشت مخلوط، دارای عملکرد بالایی در کاهش باکتری‌های هوازی مزوفیل و آنتروباکتریاسه در سوسیس‌ها داشته‌اند. نشان داده شده است که سوسیس‌های تلقیح نشده نسبت به انواع تلقیح شده دارای تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک کمتر و باکتری‌های هوازی مزوفیل و آنتروباکتریاسه بیشتری هستند. شرایط فرایند تولید محصول و نوع مایه کشت میکروبی، همچنین محیط رشد باکتری‌ها بر توانایی آنها در کاهش بار میکروبی و نیتریت بسیار موثر است.

منابع

۱- استاندارد ملی ایران شماره ۲۳۰۳ .(۱۳۷۸): اداره استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. سوسیس و کالباس-ویژگی ها.

۲- استاندارد ملی ایران شماره ٦٩١. (١٣٧٠): اداره استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. گوشت و فراورده‌های آن-آماده کردن نمونه.

۳- استاندارد ملی ایران شماره ١٠٢٨. (١٣٧٤): اداره استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. تعیین pH در گوشت و فراورده‌های آن.

٤- استاندارد ملی ایران شماره ٥٣٢٢. (١٣٧٠): اداره استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. تعیین اسیدیته کل.

٥- استاندارد ملی ایران شماره ٩٢٣. (١٣٧٤): اداره استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. نیتریت در گوشت و فراورده های آن.

٦- استاندارد ملی ایران شماره ٥٢٧٢. (١٣٧٥): اداره استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. شمارش کلی پرگنه ها در ۳۰ درجه سانتیگراد.

۷- استاندارد ملی ایران شماره ٤٧٢١. (١٣٧٧): اداره استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک مزوفیل به روش شمارش پرگنه در دمای 30 درجه سلسیوس در مواد غذائی

۸- استاندارد ملی ایران شماره۱-٢٤٦١. (١٣٧٨): اداره استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. میکرو بیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – روش جامع برای جستجو ، شناسایی و شمارش آنتروباکتریاسه – قسمت اول : جستجو ، شناسایی و شمارش به شیوهٔ محتمل ترین تعداد (MPN) با پیش غنی سازی.

۹- استاندارد ملی ایران شماره ۱-۸۹۲۳. (۱۳۸۷): اداره استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – آماده سازی آزمایه، سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمون‌های میکروبیولوژی - قسمت اول : مقررات کلی برای آماده سازی سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری

۱۰- استاندارد ملی ایران شماره ۲-۸۹۲۳. (۱۳۷۸): اداره استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – آماده سازی آزمایه، سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمون های میکروبیولوژی - قسمت دوم : مقررات کلی برای آماده سازی گوشت و فراورده های آن.

۱۱- استاندارد داخلی. (۱۳۷۸): راهنمای فعال سازس کشت‌های لیوفلیزه. انتشارات سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران.

۱۲- جیمز. ام. جی. (١٣٧٦): میکروبیولوژی غذایی مدرن. مرتضوی، ع. ، علی. م، مهران. الف، کوشان. ن. انتشارات دانشگاه مشهد.

۱۳- درویشی، شعله. (۱۳۸۸): فرهنگ میکروبیولوژی صنایع غذایی. انتشارات احمد. صفحه های٦٠-٧٥.

١٤-رکنی، ن. (١٣٧٧): علوم و صنایع گوشت. انتشارات دانشگاه تهران.

۱۵- شاکریان، ا.، نورد. ر. (۱۳۸۷): تاثیر مدت نگهداری فراورده های گوشتی بر غلظت باقیمانده سدیم. مجله علوم غذایی و تغذیه. دانشگاه آزاد اسلا می واحد علوم و تحقیقات تهران. سال دوم. شماره ۵ . صفحه های:۳۱-۲۵.

١٦- عبدالله زاده، ع.، (١٣٨١): بررسی میزان باقیمانده نیتریت درمحصولات گوشتی(سوسیس و کالباس)

عرضه شده در تهران. پایان نامه جهت دریافت درجه دکترای دامپزشکی. دانشگاه تهران. شماره پایان نامه ۲۸٦۵.صفحه های:۳۲-۲۹.

۱۷- علوی، س.، باهنر. علی، کامکار. الف، حسینی. ه. ۱۳۸۱. مطالعه میزان باقیمانده نیتریت در فراورده گوشتی عرضه شده در تهران در سال (۱۳۸۱): مجله پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان. دوره ۵۷. شماره٦۳. صفحه های:٦۰-٦۵.

۱۸- کامکار، الف.، نورد. ر، علی. چ، هدایت. ح، محمد. ر. م، علیرضا. ع. (۱۳۸۳): اندازه‌گیری میزان باقیمانده نیتریت در انواع فراورده‌های گوشتی عرضه شده در ایران به وسیله روش اسپکتوفتومتری. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. دوره۵۹. شماره۲. صفحه:۱۸۲-۱۷۹.

۱۹- کریم، گ. (۱۳۸۷): آزمون های میکروبی مواد غذایی. انتشارات دانشگاه تهران. چاپ سوم. صفحه‌ها: ۳۳۹-۳٤۹.

۲۰-کشاورز دهنو، ع. (۱۳٦٦): خطرات ناشی از مصرف بی‌رویه نیترات‌ها و نیتریت‌ها در فراورده‌های غذایی. کنگره ملی نگهداری مواد غذایی. دانشکده فنی دانشگاه تهران. چاپ دانشگاه تهران.صفحه های:٤٦٦-٤٦۱.

۲۱-لامع، ح. (۱۳۸۰): مقدمه ای بر تخمیر های غذایی. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی. صفحه‌های:۲۰-۱ و ۲-۲٤۳.

۲۲- ناصری، ع.، آرش. ن. (۱۳۸٤): تکنولوژی ساخت فراورده‌های گوشتی. انتشارات جهاد دانشگاهی تهران. صفحه‌های:۲۱۵-۱٤۹.

۲۳- نوری سپهری، م.، حمیدرضا. ن، سید محمود. م، رضا. ق. (۱۳۸۷): میزان نیتریت موجود در فراورده‌های گوشتی سوسیس و کالباس توزیع شده در استان سمنان. فصلنامه پایش. شماره۳. تابستان۱۳۸۷. صفحه های ۱۹۷-۲۰۲.

24- Anonymous. (1999); Antimicrobial susceptibility testing (Agar disk diffusion method). 9:61-73

25- AOAC. Official method of analysis. 15th edn. AOAC. Arlington. VA.

26- Belgin, S., O. Mehmet, Y. Hedayet. (2005): The microbiological quality and residual nitrate/nitrite levels in Turkish sausage (soudjouck) produced in Afyon Province. Turkey Food control. 17:923-928.

27- Beverly, J. H., A. F. Egan, P.J. Rpger. (1982): Characteristics of lactic acid bacterian isolated from vacuum-packaged beef. Journal of Applied Bacteriology. 52:31-37.

28- Conter, M., T. Muscariello, E. Zanardi, S. Ghidini, A. Vergara, G. Campanini, A. Ianieri. (2005): Characterization of lactic acid bacteria isolated from an Italian dry fermented sausage. Ann Fac Medic Vet di Parma. 25:167-174.

29- Chun, k.C., et.al. (1994): Change of nitrite and nitrate residues in meat products whiteout prior addition of nitrates. Journal Chinese Society Animal Science. 23:67-73.

30- Collins D.L., J.P. Lopez. (1981): Depletion of sodium nitrite by lactic acid bacteria isolated from vacuum-packed bologna. Food Protection. 44:593-595.

31- Chang, K.O., C.O. Myung, K.H. Soo. (2004): The depletion of sodium nitrite by lactic acid bacteria isolated from Kimchi. Journal of Medicinal Food. 7(1): 38-44.

32- Chang, K.O., J.S. Hyon. (1997): Depletion of nitrite by lactic acid bacteria isolated from Kimchi. Journal of the Korean society of food science and nutrition. 26(4):45-50.

33- Dodds, K.L., D.L. Collins–Thompson. 1984. Incidence of nitrite depleting lactic acid bacteria in cured meats and in meat starter cultures. Food Protection. 47:7-10.

34- Dodds, K.L., D.L. Collins-Thompson. (1984): Nitrite tolerance and nitrite reduction in lactic acid bacteria associated with cured meat products. International Journal of Food Microbiology. 1(3):163-170

35- Derecher, M. (1976): Metabolism of nitrtes-nitrites. Ann Nuter Aliment. 30(5-6):823-9

36- Friendrich, L., L. Kurl. (2000): Quality and safety issue in fermented meat product. Meat Fermentation. 35:45-18.

37- Frederic, L., D.V. Luce. (2004): Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends in Food Science & Technology. 15:67-78.

38- Frederic, L., V. Jurgen, D.V. Luce. (2006): Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. Journal of Food microbiology. 106:270-285.

39- Filiz, K., O. Gulsum. 2006. Chemical and microbiological quality of fermented sausages made from camel meat. Journal of Medicine. 62(8) 893-896.

40- Gonzalez, B., V. Diez. (2002): The effect of nitrite and starter culture on microbiological quality of Choriz a Spanish dry cured sausage. Meat Science. 60:295-298.

41- Garmeine, G., A. Salasevuciene, A. Sarkinas. (2005): Investigation of influence of probiotic cultures on the safety of fermented meat products. Maisto Chemija ir Tecknolojia. 39:Nr2.

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

43- Hoseyin, B., E. Osman. (2002): Effects of starter cultures and additives on the quality of Turkish style sausage (sucuk). Meat Science. 61:149–156

44- Huseyin, B., B. Mustafa. (2006): Colour and textural attributes of sucuk during ripening. Meat Science. 73: 344–350

45- Hoseyin, C., Y. Hidayt. (2007): Effect of starter cultures and nitrite levels on formation of biogenic amines in Susak. Microbiological Safety of Food. 36:25-27.

46- Hosyin, B., E. Osman. (2004): Effect of nitrate / nitrite on the quality of sausage (susuk) during ripening and storage. Journal of the Science of Food and Agriculture. 84:279-286.

47- Hui, Y. H., et.al. (2004): Hand Book of and Beverage Fermentation Technology. Printed in the USA

48- Ito, Y., M. Yodoshi, J.I. Tanaka, M. Iwadia. (1979): Copersion of tow methods and improvements for colorimetric determination of nitrite in cod roe. Journal of Food Protection. 42:715-718.

49- Jurgen, V., B. Gonzalez. (2003): The curing agent nitrite used in the production of fermented sausages in less inhibiting to the bacteriocin-producing meat culture lactobacillus curvatus under anaerobic conditions. Food Science and Technology. 45:36-40.

50- Jouhan L. (1998): Sausage fermentation and greening . Bacteriology/ Food science . university of Wisconcin-Madison. 324.

51- Kalliopi., B. Rantsioua, H. Eleftherios, Drosinosb, M. Gialitakib, R. Ursoa. (2005): Molecular characterization of Lactobacillus species isolated from naturally fermented sausages produced in Greece. Hungary and Italy. Food Microbiology. 22:19–28

52- Lee, S.H., L. Y. Park. (2000): Nitrite depletion and antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Kimchi. San'oeb misaengmul haghoeji. Korean Society for Applied Microbiology. 28:39-44

53- Lidija, K.، et.al. (2008). Investigation of

microbial association of traditionally fermented sausages. Food Tech Bio. 46(1):93-106.

54- Majumdar, D. (2003): The blue babye syndrome:nitrite poisoning humans. Resonans. 10:20-30.

55- Marcelo, A., M. Alejandro, Crespo, E. Sara, A. Fabio, Doctorovich, and A. Darío, Estrin. 2004. QM–MM Study of nitrite reduction by nitrite reductase of Pseudomonas. aeruginosa. The journal of physical chemistry, 108(46)

56- McFarland standards- Wikipedia. The free encyclopedia. Wikipedia. 5 July (2009): Available from:http//Wikipedia.com

57- Measurement of Cell Concentration in Suspension by Optical Density. Scott Sutton**.** PMF Newsletter. August (2006): Available from http//www.linkedin.com

58- Meat scince and meat sence. Information on sausages and sausage manufacture .Dennicr, B. Meat science laboratory. Guly 2004. Available from:http// www.uwex.edu /ces/flp/meatscience/sausage.html

59- Navarro, J.L., A. Marco, M. Flores. (2006): The influence of nitrite and nitrate on microboil,chemical and sensory parameters of slow fermented sausage. Meat Science 73: 660–673

60- Oh, C.K., S.H. Kim. (2004): The depletion of sodium nitrite by lactic acid bacteria isolated from Kimchi. Journal of Medicinal Food. 7(1):38-44.

61- Otto, K. (2004). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. Antonie van leeuwenhoek. 6072:209-224

62- Ping Mei, Y., X. Wen Tang, T. Sze Sze, Z. Hui, C. Xio Hui. (2007). Effect of inoculation lactic acid bacteria starter cultures on the nitrite concentration of fermenting Chinese Paocai. Food Control. 19:50-55.

63- Panthitra, P., V. Contipra. (2005). Identification of main factors affecting quality of Thai fermented Pork sausage. Food Control. 17:86-88.

64- Park, K.Y., H.S. Cheigh. (1992): Kimchi and nitrosamines. korean Journal of Food Nutrition. 21:109-116.

65- Phromraksa, P., P. Wiriyacharee, L. Rujanakraikarn, P. Pathomrungsiyungkul. 2003. Identification of main factors affecting quality of Thai fermented Pork sausage (Sai Krok Prew). CMU Journal. 2(2) 89

66- Parvathy, S.N., P. K. Surendran. (2004): Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from fish and Prawn. Journal of Culture Collection. 4:48-58.

67- Qsterlin, M.j., Lerfall. 2005. Lycopen from tomato products added minced meat effect on storage quality and color. International Food Science. 69:58-60.

68- Rabi, S., B. Ray, R. Chakraborty. (2006): Effect of fermentation and drying temperature on the characteristics of goat meat (Black Bengal variety) dry sausage. African journal of Biotechnology. 5:1499-1504.

69- Rosalinda, U., K. Rantsiou, C. Cantoni, G. Comi, L. Cocolin. (2006): Technological characterization of a bacteriocin-producing Lactobacillus sakei and its usem in fermented Lactobacillus sakei and its use in fermented. International Journal of Food Microbiology. 110 (2006) 232–239

70- Small-scale sausage prudaction. Agriculture and consumer protection. 2005. Available http// fao.org.

71- Sataz, Mark. V. inventors; Trumark, Inc(Rosolle.NJ), assignee . (1980) /09/03. Method and compostion for the production of fermented sausage. U.S patent 4238513.

72- Shea, B. Isolation identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota. (2004). Academic Dissertation in Microbiology University of Helsinki Finland.

73- Soomro, A.H., T. Masud, K. Anwaar. (2002). Of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health–A Review. Pakistan Journal of Nutrition.

1(1):20-24.

74- Signorini, J.A., E. Salazar, A. I. Ponce, L. Guerrero .(2009). Effect of lactic acid and lactic acid bacteria treatment on myofibrillar protein degradation and dynamic rheology of beef. Journal of texture studies. 38(3):373-392.

75- Talon, R., S. Leroy, I. Lebert. (2008): Microbial ecosystems of traditional fermented meat products: The importance of indigenous starters.

76- Woodbury, B.L. (1984): Effect of lactic acid bacteria on residual nitrite in a summery style sausage. Journal of the Science of Food and Agriculture. 84:279-284.

77- Wolf., P.H. Hammes. (1987) Effect of hematin on the activities of nitrite reductase and catalase in lactobacilli. Journal Archives of Microgiology. 149:220-22432.

78- Wgore, Z. (2009): Cell Biology and Molecular Basis of Denitrification. Microbiology and Molecular Biology Reveiwes. 61:533-616.

79- Wichman, L. (2004): Evaluation of nitric oxide production by lactobacillus. Journal Applied Microbiology and Biotechnology. 56:504-507.

80- Walter, P.H., A. Bantleon , S. Min . (2006): Lactic acid bacteria in meat fermentation. FEMS Microbiology letters. 87(1-2):165-174.

81- Yongyin, H., C. Xiao, C. Hui. (2007): Change biogenic amines in fermented Silver carp sausage inoculated with mixed starter cultures .Journal of food Science and Technology. 29(3):105-109.

82- Yang X.M., Q.M. Liu, X. Tang. (2004): Study on the control of nitrite content in the pickled of potherb mustard .Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology. 4(1):48-51.

83- Yalcin, S. (1998): Nitrite and nitrate content of meat products. Archive Diseases children. 79:198.

84- Zhang, J.J., T.Y. Cai, C. Zhang. (1987). Study on the lactic acid fermentation of cabbage and asparagus lettuce. Zhongguo Tiaoweipin. 1:17-21.