بررسی اثر *Lactobacillus. plantarum , Leuconostoc. mesenteroides* برکاهش نیتریت طی دوره تخمیر در کلم تخمیری (کلم شور)

جمال محمد حسنی [a*]، شعله درویشی [b]، سید ابراهیم حسینی [c]، فردین میراحمدی [d]

[a] دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

[b] استادیار گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج

[c] استادیار گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

[d] عضو هیئت علمی گروه مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۸/۲۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۹/۹/۳۰

چکیده

مقدمه: کاربرد بیش از اندازه کودهای ازته و همچنین فعالیت کم آنزیم نیتریت و نیترات ردوکتاز در برگ گیاهان، باعث تجمع نیتریت و نیترات در گیاهان برگی همچون کلم پیچ سفید (*B.o.var.alba*) می شود. نیتریت به عنوان یک ماده سرطانزا شناخته شده است. بنابراین در این تحقیق تغییرات غلظت نیتریت در کلم شور حین تخمیر خود بخودی و تخمیر تلقیح شده بوسیله مایه کشت میکروبی بررسی شد.

مواد و روش‌ها: سوش‌های مورد استفاده در کلم شورها شامل *Leu.* PPTC 1563, *L. plantarum* PTCC 1058 *meseneteriodes,subsp.mesenteroides* که درکلکسیون میکروبی ایران (سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران) وجود دارند، فعال گشته و مایه‌های کشت، با تعداد معادل $۵/۶\times۱۰^{۶}$cfu/gr برای بررسی انتخاب شدند. تخمیر کلم در تیمارهای، تلقیح‌شده با مایه کشت خالص لاکتیکی (هموفرمانتاتیو)، تلقیح‌شده با مایه کشت خالص لاکتیکی (هتروفرمانتاتیو)، تلقیح‌شده با مایه کشت مخلوط به نسبت یک به یک و کلم تلقیح‌نشده (شاهد) انجام گرفت.

یافته ها: نتایج نشان داد بین مقادیر میانگین نیتریت، pH، تعداد باکتری های اسیدلاکتیک، در نمونه شاهد (تلقیح نشده) با نمونه های تلقیح شده تفاوت معنی داری وجود دارد ($P<0.05$). میانگین میزان نیتریت باقیمانده در کلم شور تلقیح شده با *L. plantarum* ، *Leu.mesentroides* و کشت مخلوط به ترتیب به میزان ۶۷/۷ ٪ ،۶۸/۹٪ ، ۸۴/۵٪ کاهش یافته، درحالیکه در تیمار شاهد به میزان ۵۱/۹٪ کاهش داشته است.

نتیجه‌گیری: مناسبترین سویه برای کاهش نیتریت، مایه کشت مخلوط(*Leu. mesenteries، L. plantarum*) است. مناسبترین کلم شور از لحاظ میزان pH و اسیدیته نوع تلقیح شده با *Leu. mesenteroides* می‌باشد.

واژه های کلیدی: *کلم شور، لوکونستوک مزانترئیدس، لاکتو باسیلوس پلانتاروم، نیتریت*

[*]نویسنده مسئول مکاتبات email: j.mohammadhasani@yahoo.com

jftn.srbiau.ac.ir

مقدمه

در سال های اخیر محققین تحقیقات زیادی بر روی میزان نیتریت و نیترات محصولات غذایی انجام داده اند. نیتریت‌ها به خاطر قدرت شدید اکسیدکنندگی و احیاء-کنندگی، سموم خطرناکی هستند، اهم خطرات آن عبارتند از تبدیل هموگلوبین به مت هموگلوبین، مهار زنجیره تنفسی سلول و آنزیم‌های میکروزوم‌ها 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، بعلاوه نیتریت بعنوان عامل مت هموگلوبین در کودکان شناخته شده است (Ping *et al.*, *2007*; Majumdar, 2003). گیاهان تازه و فرایند شده، بخصوص انواع برگی آنها منبع تغذیه‌ای نیترات به حساب می آیند (بهتاش، ۱۳۷۴). نیترات و نیتریت بطور طبیعی در خانواده کلم (*Brassica oleracea*) بیشتر از حد استاندارد می‌باشد، که مصرف آنها برای سلامتی انسان مضر می‌باشد (Shahlaei *et al.*, *2006*، Ping *et al.*, 2007، Uwah, *et al.*, 2009). گزارش شده است که به طور طبیعی افراد از سبزیجات نیترات بیشتری نسبت به محصولات گوشتی به عمل آمده دریافت می کنند. به طور کلی اسفناج، چغندر، تربچه، کرفس و کلم ها در میان سبزیجات غلظت بالایی از نیترات دارند (Hunt *et al.*, 1994 و بهتاش، ۱۳۷۴). تخمین زده می شود که ۱۰ ٪ نیتریت موجود در دستگاه گوارش انسان در نتیجه گوشت های عمل آوری شده و ۹۰ درصد آن از سبزیجات و دیگر منابع وارد می شود. تحقیقات نشان داده است که محصولات گیاهی تخمیر شده بوسیله تلقیح باکتری های اسید لاکتیک در مقایسه با انواع تلقیح نشده دارای اثر کاهندگی بیشتری بر غلظت نیتریت 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 (hui *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2004). از ویژگی‌های باکتری‌های آنتروباکتریاسه احیای نیترات می‌باشد در نتیجه باعث بالا رفتن میزان نیتریت می‌گردد. همچنین آنتروباکتریاسه جزوء شاخص کیفی و ایمنی مواد غذایی محسوب می‌گردد (جیمز، ام.جی. ۱۳۷۶).

کلم شور یکی از محصولات سنتی تخمیری بوسیله باکتری‌های اسیدلاکتیک می‌باشد. بنابراین هدف این مطالعه علاوه بر بررسی تغییرات غلظت نیتریت، شاخص ایمنی و کیفی در کلم شور حین تخمیر خود بخودی و تخمیر تلقیح شده بوسیله مایه کشت میکروبی، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

برای اندازه گیری نیتریت از دستگاه اسپکتوفتومتر Younak 2100s vis-uv ساخت آمریکا، pH از pH متر Easy مدل 256x ساخت سوئیس، برای گرمخانه گذاری از انکوباتور memert ساخت آلمان استفاده شد. مواد شیمیایی و محیط‌های کشت مورد استفاده از شرکت Merck آلمان تولید شده بود.

- **باکتری های اسید لاکتیک وفعال سازی**

با توجه به سوش‌های مورد استفاده در کلم تخمیری سه سویه *Leu. Meseneteriodes*[1] 1563 *subsp.mesenteroides* PTCC[2], 1638 *L. fermentum*[3] PTCC, *L. plantarum*[4] PTCC 1058 که در ایران (سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران) بصورت رسمی وجود دارند برای بررسی انتخاب شدند. آمپول های لیوفلیزه این باکتری‌ها، طبق دستورالعمل ارسالی از بانک میکروبی فعال گردیدند.

- **تهیه غلظت های میکروبی**

برای تهیه غلظت‌های میکروبی، محلول ۰/۵ مک فارلند[5] تهیه گردید و جذب سوسپانسیون های میکروبی در ۶۰۰nm خوانده شد. تراکم میکروبی، برای تلقیح به کلم‌ها برابر با $۵/۶\times۱۰^{۶}$cfu/gr سلول در میلی لیتر بود (Anonymous, 1999;Marcia *et al.*, 2005). با توجه به اینکه میزان کاهش نیتریت توسط *Leu. mesentroides* ، *L. plantarum* بیشتر از *L. fermentum* بود، همچنین بدلیل اینکه هدف مقایسه دو نوع باکتری هترو و هموفرمانتاتیو بوده است. پس دو سوش *Leu. mesentroides*.، *L. plantarum* برای ادامه کار انتخاب گردیدند.

[1]- Leuconostoc *mesentroides*
[2]- Persian Type Culture Collection
[3]- Lactobacillus *fermentum*
[4]- Lactobacillus *plantarum*
[5]- McFarland standards

jftn.srbiau.ac.ir

- **فرمولاسیون کلم شور**

در این تحقیق تخمیر به روش خود بخودی و بوسیله تلقیح باکتری های اسید لاکتیک انجام گرفت. کلم مورد استفاده، کلم سفید برگی (*B.o.var .alba*)[1]، واقع در حومه شهرستان بوکان واقع در استان آذربایجان غربی بود. ابتدا کلم را چند روز پس از برداشت در محل مناسبی نگهداری کرده تا کمی پژمرده شده و از شکنندگی برگ‌های آن کاسته شد. با حذف برگ های سبز خارجی و مغز کلم، بقیه آن را تمیز نموده. سپس کلم تمیز شده را شسته وخشک نموده، کلم ها را به اندازه ورقه های ۲×۱ سانتی‌متری بریده شده و داخل چهار ظرف درب‌دار شیشه‌ای۱۵۰۰میلی لیتری گذاشته شدند، در هر ظرف ۱۰۰۰ گرم کلم ریخته شده و ۵/۲۲ گرم نمک طعام خشک استریل استفاده کرده و به صورت لایه‌ای از کلم و لایه‌ای از نمک بطور مساوی ریخته شدند. سپس به سه عدد از ظروف بطور جداگانه با *Leu. mesentroides*، *L. plantarum* مایه کشت مخلوط آن دو، تلقیح گردید. برای انجام عمل تخمیر مایه کشت به نسبت ۱٪ v/v (حجمی، حجمی) به میزان $۵/۶ \times ۱۰^{۶}$ cfu/ml به نمونه‌ها اضافه گردد. سپس ظرفها را به وسیله کتان پوشیده شدند و در۳۰ درجه‌سانتی گراد به مدت ۷ روز در شرایط بی هوازی انکوبه‌گردیدند (شجاعی آرانی، ۱۳۷۸; لامع، ۱۳۸۰; Collins *et al*., 1981).

- **زمانبندی و شرایط نگهداری**

نمونه ها در دمای ۳۰ درجه‌سانتی گراد به مدت ۷ روز در شرایط بی هوازی انکوبه گردیدند. بدلیل اینکه هدف از این کار کاهش نیتریت و رسیدن به نیتریت مطلوب است در نتیجه با افزایش بیش از هفت روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در مقایسه با نمونه شاهد فاکتورهای کیفی افت پیدا می کند. بنابراین در ادامه برای نگهداری پاستوریزه گردیدند (شجاعی آرانی، ۱۳۷۸ ; لامع،۱۳۸۰).

- **بررسی توانایی کاهش نیتریت توسط باکتری‌های منتخب در محیط کشت MRS broth**[2]

پس از انتخاب سویه‌ها، فعال‌سازی آنها و تهیه غلظت‌های مورد نیاز، مایه‌های کشت، به محیط کشت MRS broth که حاوی 100 µg/ml نیتریت سدیم است اضافه می‌گردد. میزان نیتریت کشت‌ها در روز چهارم، طبق استاندارد ۶۹۶۳ اندازه‌گیری گردید (Ping *et al*., 2007). شرایط انکوباسیون در جدول ۲ نشان داده شده است.

- **بررسی مقدار نیتریت باقیمانده، pH و اسیدیته**

بررسی مقدار نیتریت باقیمانده، pH و اسیدیته به ترتیب طبق استانداردهای۶۹۶۳، ۱۰۲۸ و ۵۳۲۲ ذکر شده در منابع انجام گرفت.

- **شمارش باکتری های لاکتیکی و آنتروباکتریاسه**

شمارش باکتری های لاکتیکی و آنتروباکتریاسه به ترتیب طبق استانداردهای شماره ۴۷۲۱، ۱-۲۴۶۱ ذکر شده در منابع انجام گرفت.

- **تجریه وتحلیل آماری**

بررسی و تجریه و تحلیل داده‌ها به وسیله تجزیه واریانس و بر اساس طرح فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی و در سطح معنی داری ۵٪ (α=۰/۰۵) به وسیله نرم افزار SAS انجام گرفته است و مقایسه میانگین ها به روش دانکن صورت گرفت.

یافته ها

جدول ۱ خصوصیات شیمیایی و میکروبی کلم شورها را قبل از تلقیح و تخمیر (زمان صفر) نشان می دهد.

جدول ۲ بررسی اولیه هر سه سوش مورد نظرکه توانایی کاهش نیتریت را در MRS broth دارند، را نشان می دهد.

جدول۳ نتایج آزمونهای شیمیایی و میکروبی را پس از ۷ روز نشان می‌دهد.

نتایج بدست آمده در جدول ۳ بیانگر وجود تفاوت معنی دار بین کلم های تلقیح شده و تلقیح نشده از لحاظ محتوی نیتریت باقیمانده است ($P<0.05$). بین مقادیر میانگین اسیدیته کلم شورهای تخمیری به وسیله *L. plantarum*، *Leu. mesentroides* وجود دارد. تفاوت معنی-داری بین مقادیر میانگین نیتریت، pH، تعداد باکتری های اسیدلاکتیک در نمونه شاهد (تلقیح نشده) با نمونه های تلفیح شده وجود دارد ($P<0.05$).

[1]-Brassica oleracea variety alba

[2]-Man, Rogosa and Sharpe broth

ijtn.srbiau.ac.ir

جدول ۱ - ویژگی های کلم‌شورها در زمان صفر (قبل از پرکنی)

تیمار	مایه کشت	pH	اسیدیته	میزان نیتریت (µg/g)	لگاریتمTCL[1]	لگاریتمTCE[2]
t_1	*L. plantarum*	۷/۶	۰/۲	۲۷	۴/۱	۳/۴
t_2	*Leu. mesentroides*	۷/۵	۰/۳	۲۸	۳/۹	۳/۵
t_1+t_2	Mixture	۷/۶	۰/۳	۲۸	۴/۲	۳/۳
C	-	۷/۵	۰/۳	۲۸/۵	۳/۱	۳/۵

جدول۲- شرایط انکوباسیون و میزان کاهش نیتریت در محیط کشت MRS broth

Microorganism	Condition	Day-6
Leuconostoc. mesenteroides	30˚c –MRS broth-anaerobic	14ppm
Lactobasillus. plantarum	37˚c –MRS broth-anaerobic	9ppm
Lactobacillus. fermentum	37˚c –MRS broth-anaerobic	21ppm

جدول ۳- میانگین آزمون های انجام گرفته در مدت ۷ روز (دوره تخمیر)

تیمار	مایه کشت	pH	اسیدیته	میزان کاهش نیتریت (٪)	لگاریتم TCL	لگاریتم TCE
t_1	*L. plantarum*	۳/۱^{b}	۹/۱^{a}	۷/۶۷^{b}	۷/۴^{b}	۰/۵^{b}
t_2	*Leu. mesentroides*	۳/۵^{b}	۲/۲^{b}	۹/۶۸^{b}	۶/۷^{b}	۰/۵^{b}
t_1+t_2	Mixture	۲/۴^{c}	۲/۷^{a}	۵/۸۴^{c}	۶/۲^{a}	۰/۶^{b}
C	-	۳/۹^{a}	۱/۸^{b}	۹/۵۱^{a}	۶/۹^{c}	۱/۳^{a}

میانگین ها در صورت معنی دار بودن در هر ستون در سطح $p < ۰/۰۵$ با حروف متفاوت نشان داده شده است.

بحث

هر سه سویه انتخابی توانایی رشد و کاهش نیتریت را در محیط‌کشت MRS broth داشتند، شرایط انکوباسیون در جدول ۲ نشان داده شده است. تحقیقات Change و همکاران در سال ۱۹۹۷و Lee and Park وهمکاران در سال ۲۰۰۰ نشان داد که باکتری های اسید لاکتیک در کلم شورها و محیط‌های کشت حاوی نیتریت رشد کرده اند. همچنین نتایج بدست آمده در مورد توانایی کاهش نیتریت در محیط کشت MRS با نتایج تحقیقاتChang و همکاران در سال ۱۹۹۷ و Lee and Park در سال ۲۰۰۰ مطابقت دارد. با توجه به یکسان بودن محیط‌های کشت و شرایط انکوباسیون مشابه در این تحقیق و تحقیقات گذشته می توان دلیل این امر را در تفاوت‌های ژنتیکی و منابع ایزولاسیون اولیه آنها جستجو کرد، ضمن اینکه شرایط نگهداری و لیوفلیزاسیون باکتری ها نیز می تواند در تغییر توانایی های آنزماتیکی و متابولیکی آنها موثر باشد.

تعداد باکتری های لاکتیک در طی دوره تخمیر بالا می‌رود ولی با توجه فعالیت باکتری ها، سرعت افزایش آنها متفاوت است. در این تحقیق افزایش تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک تا روز هفتم ادامه پیدا کرده است، همچنان که در جدول ۳ دیده می شود میانگین تعداد باکتری‌های

[1]-Total count of Lactic acid bacteria [2]-Total count of *Entrobacteriace*

jftn.srbiau.ac.ir

اسیدلاکتیک، pH و اسیدیته در دو نمونه تلقیح شده با *Leu. mesentroides* و *L. plantarum* تفاوت معنی‌داری با همدیگر ندارند ($P> 0.05$). عوامل مختلفی مانند pH، اسیدیته، درجه حرارت و ویژگی های خود مایه میکروبی، در این مورد دخالت دارد ولی به نظر می رسد که درجه حرارت و pH عمده ترین عوامل کنترل کننده تعداد آنها در طی فرایند باشند. در کلم تلقیح نشده (شاهد) بدلیل متفاوت بودن فلور میکروبی و عدم استفاده از مایه کشت، بطوریکه در جدول ۳ نشان داده شده است، تفاوت معنی داری، در بین میانگین شمارش باکتری های لاکتیک در بین کلم شورهای تلقیح شده و تلقیح نشده وجود دارد ($P<0.05$). در تمامی نمونه ها میزان pH یک روند نزولی را طی کرده است. در این تحقیق، طی دوره تخمیر pH پایین و اسیدیته بالا آمده است و بعد از هفت روز تفاوت میانگین هر دوی آنها معنی دار بوده است ($P<0.05$). از آنجایی که pH و اسیدیته از مهمترین فاکتور های موثر بر ویژگی های کلم شور است، پس با کاهش درجه حرارت می توان تا حدودی شدت کاهش pH و افزایش اسیدیته را کنترل کرد ولی با این وجود، در کلم تلقیح شده با کشت مخلوط، خاصیت سنرژیستی باکتری ها بسیار مشهود است و pH کاهش و اسیدیته نیز افزایش بیشتری را نشان داده است. بطور کلی می‌توان گفت که سه عامل تعداد باکتری های لاکتیک، و درجه حرارت، نوع، فعالیت و ترکیب آنها، از جمله موارد موثر بر کاهش pH است. فلور میکروبی موجود در کلم شور شاهد، بطور طبیعی دارای توانایی کمتری در کاهش pH هستند و میزان فعالیت متابولیکی آنها کمتر از کشت های استارتر مورد استفاده در سایر انواع کلم شور ها تولیدی می باشد.

به ترتیب کلم شور تلقیح شده با کشت مخلوط (*Leu. mesenteroides، L. plantarum*)، *Leu. mesentroides، L. plantarum* و نمونه شاهد بیشترین میزان کاهش pH را داشته اند

هر سه نوع کلم شور تلقیح شده با نمونه شاهد دارای اختلاف معنی‌داری هستند و این اختلاف معنی‌دار در طول مدت آزمون وجود دارد ($P<0.05$)، و با نتایج Park and heigh., در سال ۲۰۰۰ و Ping و همکاران در سال ۲۰۰۷ همخوانی دارد. باتوجه به pH کلم شور که ۴/۳ تا ۸/۳ در منابع ذکر شده (لامع، ۱۳۸۰و Ping *et al., 2007*)، کلم شور تلقیح شده با لوکونستوک مزانترئیدس و کلم شور تلقیح نشده مناسب ترین میزان pH را در پایان ۷ روز بدست آورده‌اند.

تنها تفاوت آنها شدت کاهش pH است که بدلیل شرایط متفاوت تولید و توانایی متابولیکی سویه های بکار رفته است. از نقطه نظر اسیدیته، نمونه تلقیح نشده و نمونه تلقیح‌شده با *Leu. mesentroides* اختلاف معنی‌داری را با هم نشان نداده اند. ولی بین این دو دسته اختلاف معنی داری وجود دارد ($P<0.05$). به ترتیب کلم شور تلقیح شده با کشت مخلوط (*Leu. mesenteroides، L. plantarum*)، *L. plantarum، Leu. mesentroides* و نمونه شاهد بیشترین میزان افزایش اسیدیته را داشته‌اند. مناسب‌ترین اسیدیته برای کلم شور بین ۱/۷ تا ۲/۵ ذکر شده است (لامع،۱۳۸۰و Ping *et al., 2007*)، بنابراین بجز کلم‌شور تلقیح شده با کشت مخلوط بقیه کلم‌شورهای تولیدی اسیدیته مناسبی را تولید کرده اند. در مجموع نتایج بدست آمده از روند کلی افزایش اسیدیته کاملاً مطابق با نتایج بدست آمده توسط oh و همکاران در سال ۲۰۰۴ و Ping و همکاران در سال ۲۰۰۷ و Park و همکاران در سال ۲۰۰۲ می باشد. تفاوت‌های‌موجود، ناشی‌از توانایی متفاوت میکروارگانیسم‌ها در تولید ترکیبات مختلف باشد.

باکتری ها لاکتیک دارای اثر سنرژیستی بر روی همدیگر هستند و به همین دلیل انتظار می‌رفت که سرعت کاهش نیتریت در این کلم شور از سایر نمونه ها بیشتر باشد و عملاً میزان نیتریت باقیمانده، بیشتر از انواع تلقیح شده با *L. plantarum* و *Leu. mesentroides* است. ممکن است که کم بودن میزان کاهش نیتریت در کلم تلقیح نشده بدلیل عدم غالب شدن باکتری‌های لاکتیک خاص باشد (عدم استفاده از مایه‌های تلقیح). شاید باکتری‌های لاکتیک که جزو فلور طبیعی کلم هستند، دارای توانایی کمتری در کاهش نیتریت باشند و یا اصولاً فاقد چنین توانایی باشند. لازم به ذکر است که در تمامی نمونه ها باکتری های احیاء کننده نیتریت مثل آنتروباکتریاسه ها و میکروکوکوس ها به کاهش نیتریت کمک می کنند. درکل می توان با توجه به جدول ۳ گفت که درجه حرارت، pH، تعداد باکتری های اسید لاکتیک، نوع مایه کشت (مخلوط یا تکی)، خواص ژنتیکی میکروارگانیسم‌های مورد استفاده و محیط رشد آنها بر توانایی میکروارگانیسم ها در کاهش نیتریت موثر هستند.

jftn.srbiau.ac.ir

تحقیقات (Shea, 2004) نیز نشان داده است که باکتری‌های اسید لاکتیک توانایی کاهش نیتریت را در کلم شورها را دارند، ضمن اینکه لاکتوباسیلوس‌ها در این مورد بیشترین نقش را دارند. تفاوت های موجود در سرعت و زمان کاهش نیتریت در این تحقیق و سایر تحقیقات ناشی از تفاوت در تمام موارد ذکر شده فوق می باشد. همچنین باید متذکر شد که سوش های لاکتوباسیلوس دارای آنزیم های نیتریت/ نیترات رودوکتاز هستند،پس ممکن است که نوع مایه کشت (نوع باکتری اسید لاکتیک) مهمترین عامل کاهش نیتریت باشد. در نتیجه بترتیب کشت مخلوط (*Leu. mesenteroides، L. plantarum*) و (*L. plantarum، Leu. mesenteroides،Leu.*) نمونه شاهد، بیشترین توانایی کاهش نیتریت را داشته‌اند. و با نتایج *Park and Cheigh.*, در سال ۲۰۰۷ و *Ping*و همکاران در سال ۲۰۰۲ همخوانی دارد. تنها تفاوت آنها شدت کاهش نیتریت است که بدلیل شرایط متفاوت تولید و توانایی متابولیکی سویه های بکار رفته است در کل باید توجه داشت که اختلافات ژنتیکی در توانایی آنها برای کاهش نیتریت بسیار موثر است، علاوه بر آن شرایط دمایی و محیطی رشد باکتری در این مسئله موثر می‌باشد. کاهش میزان نیتریت کاملاً به درجه حرارت، زمان و شرایط تولید (غلظت نمک، عدم نفوذ هوا)، مقدار و نوع کربوهیدرات بستگی دارد.

بدلیل کاهش pH فلور میکروبی طبیعی کلم مانند: پدیوکوکوس‌ها، لاکتوباسیلوس‌های هموفرمانتاتیو، استرپتوکوکوس‌ها و قارچ ها غالب گشته است. در واقع درجه حرارت و pH یک انتخابگری را ایجاد می کند. در کلم شور تلقیح نشده (شاهد) شرایط به گونه ای متفاوت مشاهده شد، روند افزایش باکتری‌های اسید لاکتیک تقریبا یکسانی نشان می‌دهد. بترتیب کلم شور تلقیح‌شده با کشت مخلوط (*Leu. mesenteroides، L. plantarum*) و *Leu. mesenteroides ،L. plantarum*، نمونه شاهد، بیشترین توانایی میانگین افزایش شمارش باکتری های اسید لاکتیک را داشته‌اند. نتایج بدست آمده مخالف نتایج Ping و همکاران در سال ۲۰۰۷ می‌باشد، و با نتایج Oh و همکاران در سال ۲۰۰۴ و Chang و همکاران در سال ۲۰۰۴ و .Park and Cheigh در سال ۲۰۰۲ موافق است.

جدول۳ نشان می دهد که اختلاف معنی‌داری در تعداد شمارش کلی آنتروباکتریاسه همه نمونه‌ها طول مدت آزمون وجود دارد ($P< 0.05$) در حقیت نشانگر این است که در طی تخمیر کلم شور شمارش کلی آنتروباکتریاسه کاهش یافته است. بررسی‌های آماری در جدول ۳ نشان‌داده است که اختلاف معنی‌داری در بین میانگین شمارش آنتروباکتریاسه در هر سه نوع کلم شور تلقیح شده باپلانتاروم، مزانتروئیدس و کشت مخلوط وجوددارد ($P>0.05$)، ولی نمونه شاهد دارای اختلاف معنی‌داری با هر سه نوع تلقیح شده می‌باشند ($P<0.05$).

با این تفاسیر بترتیب کلم شور تلقیح‌شده با *L. plantarum*، کشت مخلوط، *mesenteroides* *Leu.* و تلقیح نشده بیشترین توانایی کاهش شمارش کلی آنتروباکتریاسه را داشته‌اند. نتایج بدست آمده در این تحقیق موافق نتایج Ping و همکاران در سال ۲۰۰۷ است.

نتیجه گیری

بررسی های انجام گرفته در این تحقیق نشان داد که مایه کشت مخلوط(*mesenteries، L. plantarum* *Leu.*) دارای بهترین پتانسیل برای کاهش نیتریت در کلم شور می‌باشد. توانایی باکتری های لاکتیک تحت تاثیر محیط رشد و شرایط محیطی آنها قرار می گیرد. استفاده از مایه کشت های مناسب نتنها در کاهش نیتریت بلکه در بهینه سازی سایر فاکتورهای محصول نیز موثرند. مناسبترین کلم شور از لحاظ میزان pH و اسیدیته نوع تلقیح شده با *Leu. mesenteroides* می باشد. تحقیقات آینده می‌تواند شامل بررسی سایر سوش های ایزوله شده از کلم‌ها و یا طراحی یک مایه کشت مناسب برای تولید کلم‌تخمیری مطابق با ذائقه ایرانی، باشد.

منابع

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. (۱۳۷۹). آزمون اندازه گیری اسیدیته کل، شماره ۵۳۲۲، چاپ اول.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. (۱۳۷۰). اندازه‌گیری نیتریت و نیترات در میوه‌ها و سبزیها به روش اسپکترومتری، شماره۶۹۶۳،چاپ اول.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. (۱۳۷۸). میکرو بیولوژی مواد غذایی و خوراک دام و روش جامع برای جستجو،

ifn.srbiau.ac.ir

شناسایی و شمارش آنتروباکتریاسه. قسمت اول، جستجو شناسایی و شمارش به شیوهٔ محتمل ترین تعداد(MPN)با پیش غنی سازی، شماره۲۴۶۱-۱، چاپ دوم.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. (۱۳۷۵). شمارش باکتری اسید لاکتیک به روش شمارش پرگنه در ۳۰ درجه سانتی گراد درمواد غذایی، شماره ۴۷۲۱،چاپ دوم.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. (۱۳۷۹). آزمون اندازه گیری pH، شماره ۱۰۲۸،چاپ دوم.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. (۱۳۷۸). میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام و آماده سازی آزمایه، سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمون های میکروبیولوژی. قسمت اول ،مقررات کلی برای آماده سازی سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری، شماره ۱-۸۹۲۳، چاپ اول.

راهنمای فعال سازی کشت های لیوفلیزه. (۱۳۷۸). انتشارات سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران.

بهتاش، ف. (۱۳۷۴). بررسی اثر کودهای شیمیایی از ته در تجمع نیترات در اندامهای قابل مصرف کلم پیچ و کرفس. پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته مهندسی کشاورزی- باغبانی. دانشکده کشاورزی ،دانشگاه تربیت مدرس تهران.

جیمز، ام.جی. (۱۳۷۶). میکروبیولوژی غذایی مدرن.جلد دوم. ترجمه. مرتضوی، ع.، معتمدزادگان، ع.، اعلمی، م.، نایب زاده، ک. دانشگاه مشهد. صفحات۲۴-۱۳، ۲۱۰-۲۰۴.

شجاعی آرانی، آ. (۱۳۷۸). میکروب شناسی کاربردی و مواد غذایی. انتشارات دستان، صفحات ۱۲۲-۱۵۵.

کشاورز دهنو، ع. (۱۳۶۶). خطرات ناشی از مصرف بی رویه نیتراتها و نیتریتها در فراورده های غذایی.کنگره ملی نگهداری مواد غذایی، دانشکده فنی دانشگاه تهران، چاپ دانشگاه تهران، صفحه ۴۶۶-۴۶۱.

لامع، ح. (۱۳۸۰). مقدمه‌ای برتخمیر های غذایی.انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی، صفحات۲۰ ـ۱، ۱۲۶ ـ ۱۰۳، ۲۶۵ ـ ۲۴۳ .

AOAC. (1990). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists Virginia, Association of Official Analytica Chemists, pp .780.

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

Chang, K. O., Myung, C. O. & Soo, K. H. (2004). The depletion of sodium nitrite by Lactic acid bacteria isolated from Kimchi. Journal of Medicinal Food, 71, 38-44.

Chang, K. O. & Hyon, J. S. (1997). Depletion of nitrit by Lactic acid bacteria isolated from Kimchi. Journal of the Korean society of food science and nutrition.71, 38-44.

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

Hunt, J. & Turner, M. K. (1994). A survey of nitrite concentrations in retail fresh vegetables. Food Additives and Contaminants, 11(3), 327 – 332.

Kohajdova, Z. & Karovicova, j. (2004). Optimisation of method of fermentation of cabbage juice. Czech, J. food Sci, 22, 39-48.

McFarland standards –Wikipedia .The free encyclopedia. (2009). Available from, http //Wikipedia.com.

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

Mark, A. D. & Henry, P. D. (1984). Selection of lactic acid bacteria for use in vegetable fermentations. International journal of food microbiology, 64, 261-275.

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

Park, K .Y.& Cheigh, H. S. (2002) . Kimchi and nitrosamines. Korean Journal of Food Nutrition, 21, 109-116.

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

Shahlaei, A., Alemzade ansari, N. & Sedighie dehkordie, F. (2006). Evaluation of nitrate and nitrite content of iran southern (Ahwaz) vegetables During winter and spring of 2006.Asian journal of plant sciences, 6 (8), 1197- 1203.

ifrn.srbiau.ac.ir

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

jftn.srbiau.ac.ir

The Effect of Inoculation of *Lactobacillus plantarum, Leuconostoc mesenteroides* on the Nitrite Concentration of Sauerkraut

J. Mohammad Hassani [a]*, Sh. Darvishi [b], S. E. Hosseni [c], F. Mirahmadi [d]

[a] M.Sc. Student of Food Science and Technology, College of Agriculture, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[b] Assistant Professor of Food Science and Technology, College of Agriculture, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Iran.

[c] Assistant Professor of Food Science and Technology, College of Agriculture & Natural Resource, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[d] M.Sc. of Food Science and Technology, Faculty Member Engineering Industry, Agriculture College, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Iran.

Received: 14 November 2010 Accepted: 21 December 2010

Abstract

Introduction: The use of nitrogen fertilizers and low enzyme activity of nitrite and nitrate reductase in leaves of plants, causes the accumulation of nitrite and nitrate in leafy plants such as white cabbage (B.o var .alba).Nitrite is a highly carcinogenic substance therefore in this study changes in nitrite concentration during fermentation of fermented cabbage and spontaneous fermentation by inoculation of culture were examined.

Materials and Methods: The strains used in fermented cabbage were Leu.meseneteriodes, subsp.mesenteroids PTCC 1563 and L. plantarum PTCC 1058 (Organization of Scientific and Industrial Research of Iran).The strains and their mixture as active culture, with equal numbers 5.6×10^6 cfu/gr were selected. Cabbage treatments consisted of inoculation with pure lactic starter (hemofermantative), inoculation with pure lactic starter (hetrofermantative), inoculation with a starter mix and cabbage not inoculated (control) were performed.

Results: Significant differences were recorded by the mean values of residual nitrites, pH, total number of lactic acid bacteria in the control samples (not inoculated) and inoculated samples ($P<0.05$).Residual nitrites in fermented cabbages by L. plantarum, Leu. mesentroides and mixed cultures were reduced up to 67.7%, 68.9%, 84.5% respectively, while it was 51.9% in the control treatment.

Conclusion: The best treatment concering residual nitrite was the fermented cabbage by mixed culture. The best treatment concering the pH and the acidity levels was the cabbage inoculated by Leu. mesentroides.

***Keywords**: Leuconostoc.mesenteroides, Lactobacillus.plantarum, Nitrite, Sauerkraut.*

* Corresponding Author: j.Mohammadhassani@yahoo.com

ifrn.srbiau.ac.ir