

اثر استفاده از فیلم‌های سدیم کازئینات حاوی باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی بر کنترل باکتری لیستریا منوسایتوژنز تلقیح شده در فیله ماهی فیتوفاگ

سید مهدی اجاق^{a*}، بهاره شعبانپور^b، معز کوردجری^c، اسماعیل عبدالله زاده^d، مریم قره‌ئی^e

^a دانشیار گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
^b استاد گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
^c استادیار گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
^d دانشجوی دکتری فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
^e کارشناسی ارشد فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۳/۲۴

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۱۰/۱۳

۱۰۳

چکیده

مقدمه: فیلم‌های خوراکی با پایه کازئین به دلیل کیفیت بالای تغذیه‌ای پتانسیل مناسب جهت محافظت از فرآورده‌های غذایی را دارند. هدف از این تحقیق، تهیه فیلم سدیم کازئینات حاوی باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی و سنجش فعالیت بازدارندگی علیه لیستریا منوسیتوژنز تلقیح شده به فیله ماهی فیتوفاگ می‌باشد.

مواد و روش‌ها: باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی درحالت محلول به فیلم سدیم کازئینات قبل از قالب‌گیری افزوده شدند و در انکوباتور ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک گردید. اثر فیلم حاوی باکتری‌ها در کنترل لیستریا منوسیتوژنز و میزان pH ماهی پوشش داده شده با فیلم حاوی باکتری‌ها، طی ۹ روز در فواصل زمانی ۹۶ ساعت و زنده‌مانی باکتری‌ها طی مدت ۱۲ روز در محیط کشت و فیله ماهی در فواصل زمانی ۹۶ ساعت بررسی شدند. همچنین اثر باکتری‌های تلقیح شده بر خصوصیات فیزیکی و مکانیکی فیلم نیز مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: زنده‌مانی باکتری‌های اسید لاکتیک در فیله طی زمان نگهداری افزایش یافت. هر دو باکتری سبب کاهش تعداد باکتری لیستریا نسبت به نمونه شاهد گردیدند. باکتری‌های اسید لاکتیک بر درصد حلالیت، رطوبت، شاخص L و اختلاف رنگی تاثیر معنی‌داری داشته، اما بر مقاومت کششی و درصد افزایش طول در لحظه پاره شدن، تاثیر معنی‌داری ایجاد نکردند.

نتیجه‌گیری: با توجه به فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های مذکور، نتایج آزمون نشان می‌دهد که تلقیح باکتری‌های LAB به فیلم می‌تواند به عنوان یک ابزار مفید جهت کنترل پاتوژن‌های غذایی مطرح باشد.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های اسید لاکتیک، فیلم خوراکی، لیستریا منوسایتوژنز

مقدمه

آلودگی مواد غذایی با پاتوژن‌ها یکی از مهمترین دلایل بروز مسمومیت غذایی می‌باشد (Gram & Dalgaard, 2002). یکی از روش‌های نوین نگهداری غذا که به محیط زیست آسیبی نمی‌رساند، استفاده از تکنولوژی نگهداری زیستی می‌باشد. در حال حاضر باکتری‌های اسید لاکتیک و باکتریوسین‌های آن‌ها نقش مهمی در نگهداری زیستی مواد غذایی ایفا می‌کنند (Bondi et al., 2009). استفاده از فیلم‌ها و پوشش‌های زیستی می‌تواند سدی در برابر رطوبت، بخار آب، گازها و مواد محلول باشد و علاوه بر این ابزار مناسبی جهت افزودن طیف گسترده‌ای از مواد نگهدارنده نظیر: ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، رنگ‌ها و سایر ترکیبات فعال باشند (Bourtoom & Chinnan, 2008).

باکتری‌های اسید لاکتیک به واسطه تولید متابولیت‌هایی با خاصیت آنتی‌آگونیستی، نظیر اسیدهای آلی (استیک اسید، اسید لاکتیک، بنزوئیک اسید)، پراکسید هیدروژن، دی استیل، دی اکسید کربن و باکتریوسین قابلیت بالایی جهت استفاده در فیلم‌های غذایی دارند (Crandall et al., 2012; Cizeikiene et al., 2013). باکتری لیستریا منوسایتوزنز مهمترین عامل بیماری‌زای مواد غذایی است. این باکتری در محیط‌های مختلف یافت شده و قدرت تحمل سطوح بالایی از نمک و رشد در دمای یخچال را دارد (Crandall et al., 2012).

بررسی باکتری‌های تولید کننده باکتریوسین برای محافظت مواد غذایی از آلودگی لیستریا منوسیتوزنز به عنوان کشت‌های محافظ زیستی، توسط Berjeaud (2007) صورت گرفت. لاکتوباسیلوس ساکی ۲۵۱۲ برای مهار رشد باکتری لیستریا در تکه‌های ژامبون پخته شده با استفاده از آزمون چالش مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش‌های کشت توسط لاکتوباسیلوس ساکی ۲۵۱۲ و همچنین لاکتوباسیلوس کورواتوس ۲۷۱۱، مانع رشد لیستریا شد.

Chen و همکاران (۲۰۱۰) پوشش‌های ضد میکروبی موثر با نمک‌های آلی در کنترل لیستریا منوسیتوزنز در فیله‌های سالمون دودی را مطالعه کردند. فرمولاسیون در مدل خانگی شامل سدیم لاکتات و سدیم دی استات و یکسری پوشش‌های خوراکی بود. آن‌ها گزارش کردند که

پوشش آلزینات حاوی اسیدهای آلی تاثیر بیشتری بر بازدارندگی از رشد لیستریا منوسیتوزنز داشت. تاکنون مطالعه‌ای در خصوص فعالیت ضد لیستریایی فیلم حاوی باکتری‌های LAB در محصولات شیلاتی گزارش نشده است. در پژوهش حاضر اثر باکتری‌های اسیدلاکتیک نوع لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی در فیلم سدیم کازئینات علیه باکتری لیستریا منوسایتوزنز در محیط کشت و فیله ماهی فیتوفاگ در دمای یخچال بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

- تهیه فیلم خوراکی سدیم کازئینات

در این بررسی ابتدا فیلم خوراکی سدیم کازئینات تهیه شد. بدین صورت که ۴ درصد نسبت وزنی/حجمی از پودر سدیم کازئینات در آب مقطر هموزن گردید سپس تا دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شد. در مرحله بعد در دستگاه هموزن‌نایزر به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۰۰۰ قرار گرفت. میزان گلیسرول اضافه شده به فیلم و نسبت پروتئین به نرم کننده ۰/۴٪ بود. برای تهیه فیلم زیست فعال در پایان مرحله هواگیری، باکتری را به محلول فیلم به میزان 10^5 cfu/ml تلقیح کردیم. برای این منظور ابتدا ۲۴ ساعت قبل از تهیه فیلم باکتری‌های اسید لاکتیک را به محیط BHI اتوکلاو شده تریق و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در داخل انکوباتور قرار داده شد. سپس با دور ۶۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ساتریفوژ شده و با دستگاه اسپکتوفوتومتر در طول موج ۶۰۰ نامومتر میزان جذب نوری (OD) بین ۰/۱-۰/۰۸ تنظیم شد. از این مایع جهت تلقیح به محلول فیلم استفاده شد در انتها محلول فیلم هموزن شده در قالب‌های مورد نظر ریخته و در انکوباتور ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک گردید (Arrieta et al., 2013).

- اندازه‌گیری pH

۵ گرم از هر نمونه بافت هموزن شده به ۴۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه به کمک یک هموزن‌نایزر مخلوط گردید، سپس pH نمونه‌ها با pH متر دیجیتالی اندازه‌گیری شد.

- اندازه گیری خصوصیات فیزیکی فیلم‌ها

سنجش میزان نفوذپذیری فیلم‌ها نسبت به بخار آب مطابق روش شماره E96 مصوب آ.اس.تی.ام صورت گرفت (ASTM, 2002). درون سلول‌های اندازه‌گیری نفوذپذیری آب ریخته و سپس سطح سلول بوسیله فیلم با استفاده از گریس پوشانده شد و سلول‌ها درون دسیکاتور حاوی سیلیکاژل قرار گرفتند. آب در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، رطوبت ۱۰۰٪ ایجاد می‌کند. اختلاف رطوبت در دو سمت روکش در دمای ۲۵ درجه پاسکال اختلاف فشار بخاری معادل $10^3 \times 2/337$ ایجاد می‌کند. تغییرات وزن سلول‌ها طی زمان با استفاده از یک ترازوی دیجیتال با دقت $0/0001$ گرم اندازه‌گیری شد. در تمام نمونه‌ها با رسم منحنی تغییرات وزن سلول نسبت به زمان، یک خط راست $R^2 < 0/99$ حاصل شد. نرخ انتقال بخار آب بر حسب (۲- متر^{-۱} ثانیه گرم) معادل با شیب خطوط حاصله تقسیم بر سطح سلول ($0/00287$ متر مربع) بود و از رابطه ۳ حاصل شد (ASTM, 2002).

رابطه ۳ سطح سلول/شیب خط = نرخ انتقال بخار آب

از ضرب نمودن نرخ انتقال بخار آب در ضخامت روکش‌ها و تقسیم آن بر اختلاف فشار موجود در دو سمت روکش میزان نفوذپذیری بخار آب به دست آمد و به صورت ۱- پاسکال^{-۱} متر^{-۱} ثانیه گرم ($g s^{-1} m^{-1} Pas^{-1}$) گزارش شد.

- اندازه گیری خواص مکانیکی فیلم‌ها

آزمایشات کشش با استفاده از دستگاه تست مکانیکال Instron universal (Model 200, HIWA, Iran) testing machine انجام گرفت. قبل از انجام آزمایش‌های کشش تمامی نمونه‌ها از نظر رطوبتی تعدیل گردیدند. فیلم‌ها به شکل مستطیل به ابعاد $10 \times 2/5$ سانتی‌متر مربع بریده شدند. فاصله بین دو فک دستگاه ۵ سانتی‌متر و سرعت حرکت فک‌ها ۵۰ میلی‌متر بر دقیقه انتخاب شد. فاکتورهایی شامل مقاومت کششی، درصد کرنش در نقطه شکست (تغییر طول نمونه تقسیم بر طول اولیه ضرب در ۱۰۰) مطابق روش شماره D882-01 مصوب از آ.اس.تی.ام روی منحنی‌های نیرو بر حسب تغییر شکل به دست آمدند (ASTM, 2002).

- سنجش میزان حلالیت در آب

وزن اولیه نمونه‌های فیلم (4×4) پس از خشک شدن در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد تعیین شد و سپس فیلم‌ها در ظروف حاوی ۵۰ سی‌سی آب مقطر قرار گرفتند. ظروف به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور شیکردار و در دمای ۲۸ درجه قرار داده شده و با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه تکان داده شدند. پس از این مدت نمونه‌ها بوسیله کاغذهای صافی که قبلاً خشک شده بود فیلتر و مجدداً در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد خشک گردیدند. میزان حلالیت فیلم‌ها به کمک رابطه ۴ محاسبه گردید (Hosseini et al., 2009).

رابطه ۴

$100 \times$ وزن ماده خشک اولیه موجود در فیلم / (وزن فیلم خشک پس از غوطه‌وری - وزن ماده خشک اولیه) = درصد حلالیت

- سنجش رنگ سطحی و شفافیت فیلم‌ها

نمونه‌های فیلم به منظور سنجش رنگ روی کاشی استاندارد سفید رنگ قرار داده شد و سه فاکتور a^* ، b^* و L^* نشان داده شده توسط دستگاه رنگ‌سنج یادداشت گردید. برای محاسبه اختلاف رنگ نمونه‌ها با پلیت سفید، داده‌های به دست آمده برای سه فاکتور فوق مربوط به مرجع و نیز سه فاکتور a^* ، b^* و L^* مربوط به هر نمونه در رابطه قرار داده شد (Ojagh et al., 2010).

رابطه ۵

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L)^2 + (a^* - a)^2 + (b^* - b)^2}$$
 اختلاف رنگ فیلم‌ها

به منظور سنجش میزان شفافیت فیلم‌ها و عبور نور نمونه‌های فیلم به ابعاد 9×4 میلی‌متر در درون سلول‌های اسپکتروفوتومتری قرار گرفت و در طول موج‌های ۸۰۰-۲۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسکن گردید. همچنین به منظور محاسبه میزان شفافیت فیلم‌ها از رابطه ۶ استفاده گردید.

رابطه ۶ ضخامت فیلم / میزان جذب در ۶۰۰ نانومتر = شفافیت فیلم

- سنجش میزان رطوبت فیلم‌ها

نمونه‌های فیلم با وزن مشخص درون پلیت‌های

اثر استفاده از فیلم‌های سدیم کازئینات بر کنترل باکتری لیستریا منوسایتوزنز

انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۶ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. تعداد باکتری‌های لیستریا نیز بر روی محیط اختصاصی پالکام مورد سنجش قرار گرفت. در آزمایش دیگر فیله‌ها در ابعاد ۱×۴×۳ سانتی‌متر برش داده شدند و روی سطح فیله باکتری لیستریا با کشت چمنی تلقیح گردید، سپس فیلم‌های حاوی باکتری لیستریا روی سطح فیله قرار داد شد و فیله داخل پلیت‌ها با کیسه‌های غیر قابل نفوذ به هوا در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹ روز قرار گرفته و هر ۳ روز میزان زنده مانی باکتری با تهیه رقت سریالی از گوشت، فیلم و کشت سطحی روی محیط کشت MRS agar و انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۶ ساعت آزمایش شد.

- تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS صورت گرفت. برای این منظور ابتدا از نرمال بودن یا نبودن داده‌ها به وسیله آزمون کولموگروف-اسمیرنوف اطمینان حاصل شد. جهت مقایسه ویژگی‌های فیلم و آزمون‌های میکروبی از تجزیه واریانس یکطرفه و آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ درصد استفاده گردید.

یافته‌ها

نتایج بررسی زنده مانی باکتری‌های اسید لاکتیک در فیله ماهی فیتوفاگ نگهداری شده در یخچال در جدول ۱ آمده است.

همانطور که در جدول بالا مشاهده می‌شود، جمعیت اولیه باکتری کازئی در فیله ماهی فیتوفاگ در روز صفر از $4/5 \text{ Logcfu/cm}^2$ به $13/04$ در روز سوم افزایش یافت و سپس در روز ششم افزایش معنی‌داری داشت و در روز نهم کاهش محسوسی پیدا کرد. در روز صفر در تیمار اسیدوفیلوس جمعیت اولیه باکتری از $5/7 \text{ Logcfu/cm}^2$ به $11/01$ افزایش داشته و در روز ششم و نهم نیز افزایش پیدا کرد.

نتایج بررسی آنتاگونیستی باکتری‌های اسید لاکتیک، علیه باکتری لیستریا منوسیتوزنز در محیط کشت نگهداری شده در دمای یخچال در جدول ۲ قرار گرفته است.

شیشه‌ای که از قبل به تعادل رطوبتی رسیده و توزین شده بودند قرار گرفت. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد خشک گردید. نمونه همراه با پلیت پس از این مدت خارج شده و پس از سرد شدن در دسیکاتور مجدداً توزین گردید. محتوای رطوبت روکش‌ها بر پایه وزن مرطوب از رابطه ۷ محاسبه گردید (Ojagh *et al.*, 2010).

$$\text{رابطه ۷} \quad \text{وزن نمونه مرطوب} / 100 \times \text{وزن آب} = \text{درصد رطوبت بر مبنای وزن مرطوب}$$

- آماده سازی مایع تلقیح

آمپول‌های لیوفیلیزه سویه‌های باکتریایی (لیستریا منوسیتوزنز ATCC19117، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس PTCC39392 و لاکتوباسیلوس کازئی DSM20079) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شد. پس از کشت باکتری در محیط برات (دمای ۳۷ درجه، BHI) به مدت زمان ۲۰ ساعت، شمارش تعداد باکتری‌ها با روش جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر پس از ۵ دقیقه سانتریفیوژ (۶۰۰۰ دور در دقیقه) و تایید نتایج، با کشت سطحی روی پلیت کانت آگار صورت گرفت (Fazlara *et al.*, 2012; Ghanbari *et al.*, 2011).

۱۰۶

- بررسی خصوصیات ضد لیستریایی فیلم‌های

تولیدی و زنده مانی باکتری‌های اسید لاکتیک

بررسی زنده مانی باکتری‌های اسید لاکتیک در فیلم‌های زیست فعال به روش کونچامیر و همکاران، ۲۰۱۱ انجام گرفت (Concha-Meyer *et al.*, 2011). جهت سنجش فعالیت ضد لیستریایی ابتدا باکتری لیستریا به صورت چمنی بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت شد (۱۰۰ میکرولیتر از استوک بر روی محیط کشت ترزریق گردید). به دنبال آن فیلم حاوی باکتری‌های اسیدوفیلوس و کازئی را هر کدام روی پلیت باکتری لیستریای کشت داده شده قرار داده و نمونه‌ها در دمای یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) برای مدت ۱۲ روز نگهداری شد. برای هر دوره زمانی ۳ روزه پلیت حاوی فیلم برداشته شده، و به همراه محیط کشت در سرم فیزیولوژی رقت‌های سریالی تهیه شد. تعداد باکتری‌های LAB با کشت سطحی ۰/۱ میلی متر و ۱ سی‌سی از رقت‌های مختلف در محیط کشت MRS agar و

باکتری لیستریا در روز سوم در تیمار کازئی به طور معنی داری کمتر از دو تیمار دیگر بود. همچنین در روز سوم نگهداری بین دو تیمار اسیدوفیلوس و شاهد اختلاف معنی داری وجود نداشت، هر چند تعداد باکتری ها در تیمار شاهد بیشتر از تیمار اسیدوفیلوس است اما این اختلاف از نظر آماری معنی دار نبود. در روز ششم و نهم نگهداری اختلاف معنی داری بین تیمارها وجود نداشت.

- تغییرات pH فیله ماهی

همانطور که در جدول ۴ مشاهده می شود pH فیله ماهی فیتوفاگ در روز صفر در تمام تیمارها برابر ۷ بود. از روز صفر تا روز ششم در همه تیمارها مقدار pH کاهش پیدا کرد ولی معنی دار نبود. سپس در روز نهم در هر سه تیمار نسبت به روز سوم و ششم افزایش پیدا کرد. خواص مکانیکی و فیزیکی فیلمها (درصد رطوبت، درصد حلالیت، نفوذپذیری به بخار آب) در جدول ۵ آمده است.

همانطور که در جدول ۲ مشاهده می شود در روز سوم تعداد باکتری لیستریا بین دو تیمار کازئی و اسیدوفیلوس با تیمار کنترل تفاوت داشت ولی معنی دار نبود. در روز ششم جمعیت لیستریا در هر سه تیمار به طور معنی داری با یکدیگر اختلاف معنی داری داشتند. در روز نهم جمعیت باکتری لیستریا در تیمار اسیدوفیلوس به طور معنی داری نسبت به جمعیت باکتری در تیمارهای کازئی و شاهد کمتر بود. جمعیت باکتری لیستریا در هر سه تیمار در روز ششم نگهداری در محیط کشت اختلاف معنی داری داشت (جدول ۲). در فیله ماهی فیتوفاگ در روز سوم در تیمار کازئی تعداد کمتری باکتری لیستریا نسبت به تیمارهای دیگر مشاهده شد.

نتایج بررسی آنتاگونیستی باکتری های اسید لاکتیک علیه باکتری لیستریا مونوسیتوزنز در فیله ماهی فیتوفاگ نگهداری شده در دمای یخچال در جدول ۳ می باشد. همانطور که در جدول ۳ مشاهده می شود جمعیت

جدول ۱- زنده مانی باکتری های لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در تیمارهای مختلف طی نگهداری در فیله ماهی فیتوفاگ

نوع فیلم/ زمان	۰	۳	۶	۹	۱۲
کازئی	۴/۵±۰/۱۰ ^c	۱۳/۰۴±۲/۰۶ ^b	۱۵/۶۵±۰/۱۷ ^a	۱۵/۱۵±۰/۹۴ ^a	۱۵/۳۵±۰/۵۴ ^a
اسیدوفیلوس	۵/۷±۰/۴۸ ^d	۱۱/۰۱±۱/۲ ^c	۱۴/۸۱±۱/۷۶ ^b	۱۶/۳۱±۰/۷۷ ^a	۱۶/۶۱±۰/۲۷ ^a

*حروف مختلف در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها است (p < ۰/۰۵)

جدول ۲- میانگین تغییرات لود باکتری لیستریا مونوسیتوزنز برای تیمارهای مختلف طی نگهداری در محیط کشت

نوع فیلم/ زمان	۰	۳	۶	۹
شاهد	۳/۳۸۵±۰/۶۵ ^a	۵/۲۵±۰/۴۵ ^a	۸/۱۹±۰/۱۱ ^a	۸/۹۵±۰/۷ ^a
کازئی	۳/۳۸۵±۰/۶۵ ^a	۴/۹۴±۰/۴۵ ^a	۶/۴۱±۰/۱۱ ^b	۸/۸۷±۰/۷ ^a
اسیدوفیلوس	۳/۳۸۵±۰/۶۵ ^a	۴/۴۷±۰/۴۵ ^a	۷/۴۸±۰/۱۲ ^c	۷/۸۶±۰/۷ ^b

*حروف مختلف در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها است (p < ۰/۰۵)

جدول ۳- میانگین تغییرات لود باکتری لیستریا مونوسیتوزنز برای تیمارهای مختلف در فیله ماهی فیتوفاگ

نوع فیلم	۰	۳	۶	۹
شاهد	۵/۵۶±۰/۰۴ ^a	۶/۲۱±۰/۲۸ ^a	۴/۷۱±۰/۸۱ ^a	۴/۴۸±۰/۷۵ ^a
کازئی	۵/۵۶±۰/۰۴ ^a	۴/۲۴±۱/۶۵ ^b	۵/۶۱±۰/۱۰ ^a	۵/۴۸±۰/۳۵ ^a
اسیدوفیلوس	۵/۲۹±۰/۰۴ ^a	۵/۸۴±۰/۱۳ ^{ab}	۵/۷۴±۰/۱۱ ^a	۵/۶۶±۰/۲۸ ^a

*حروف مختلف در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها است (p < ۰/۰۵)

جدول ۴- pH فیله ماهی فیتوفاگ تلقیح شده با باکتری لیستریا و پوشانده شده با فیلم های مختلف

نوع فیلم/زمان	۰	۳	۶	۹
شاهد	7±0.0 ^a	6/40±0.085 ^{ab}	6/285±0.246 ^a	6/965±0.259 ^a
کازئی	7±0.0 ^a	6/39±0.085 ^{ab}	6/18±0.246 ^a	7/06±0.259 ^a
اسیدوفیلوس	7±0.0 ^a	6/315±0.085 ^{ab}	6/135±0.246 ^a	6/43±0.259 ^a

* حروف مختلف در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (p < 0.05)

جدول ۵- خواص فیزیکی و مکانیکی فیلم سدیم کازئینات

نوع فیلم	ضخامت (میلی متر)	رطوبت (درصد)	حلالیت (درصد)	نفوذپذیری به بخار آب	مقاومت کششی (مگا پاسکال)	افزایش طول (درصد)
شاهد	0.107±0.0645 ^a	33/74±1/156 ^a	48/0612±1/305 ^a	2/059±0/11 ^a	2/57±0/49 ^a	20.1/44±22/42 ^a
کازئی	0.121±0.0645 ^{ab}	32/39±0/65 ^{ab}	29/58±4/83 ^b	2/076±0/483 ^a	2/12±0/05 ^{ab}	153/80±21/96 ^b
اسیدوفیلوس	0.126±0.0645 ^{ab}	31/063±1/152 ^b	34/025±4/74 ^b	1/65±0/162 ^a	1/96±0/18 ^a	129/75±16/39 ^b

* حروف مختلف در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (p < 0.05)

باکتری کازئی موجب افزایش نفوذپذیری فیلم سدیم کازئینات در طول موج‌های بین ۴۰۰-۳۰۰ نانومتر گردید. از لحاظ میزان شفافیت در بین فیلم‌های مختلف اختلاف معنی داری وجود ندارد.

بحث

لیستریوزیس بیماری است که بوسیله باکتری لیستریا منوسیتوزنز ایجاد می شود و موجب نرخ مرگ و میر بالایی در افرادی که دچار ضعف ایمنی هستند، می شود. همچنین این بیماری موجب سقط جنین و یا تولد زودرس در زنان باردار می شود (Crandall et al., 2012).

با توجه به فعالیت ضد میکروبی باکتری های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی در فیلم سدیم کازئینات، نتایج آزمون اشاره بر زنده ماندن باکتری‌ها در طی مدت نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد داشت و بازدارندگی قابل ملاحظه‌ی بر باکتری لیستریا در محیط کشت مشاهده شد. همچنین، باکتری‌های اسید لاکتیک بر پارامترهای a و b و نفوذ پذیری به بخار آب، شفافیت و مقاومت کششی تغییری ایجاد نکردند، ولی بر روی پارامترهای مثل *L، اختلاف رنگی، درصد حلالیت و درصد رطوبت تاثیر گذار بودند. جهت افزایش فعالیت ضد باکتریایی فیلم های زیست تخریب پذیر، ضروریست که شرایط را به نحوی تغییر داد که بیشترین تولید باکتریوسین در فیلم های تولیدی رخ دهد.

درصد رطوبت و درصد حلالیت فیلم شاهد از فیلم‌های زیستی بیشتر و اختلاف معنی‌داری داشتند، ولی بین فیلم‌های حاوی کازئی و اسیدوفیلوس اختلاف معنی‌داری دیده نشد. میزان نفوذپذیری به بخار آب در سه تیمار با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نداشتند و در فیلم اسیدوفیلوس میزان نفوذپذیری کمتر از دو تیمار بود. نتایج نشان می‌دهد که مقاومت کششی بین فیلم شاهد و فیلم حاوی باکتری کازئی اختلاف معنی‌داری داشت. درصد افزایش طول در لحظه پاره شدن بین دو فیلم حاوی باکتری اختلاف معنی‌داری نداشت ولی بین شاهد و دو فیلم حاوی باکتری اختلاف معنی‌داری وجود داشت. درصد رطوبت و حلالیت فیلم سدیم کازئینات با افزودن باکتری‌های اسیدلاکتیک تغییر کرد.

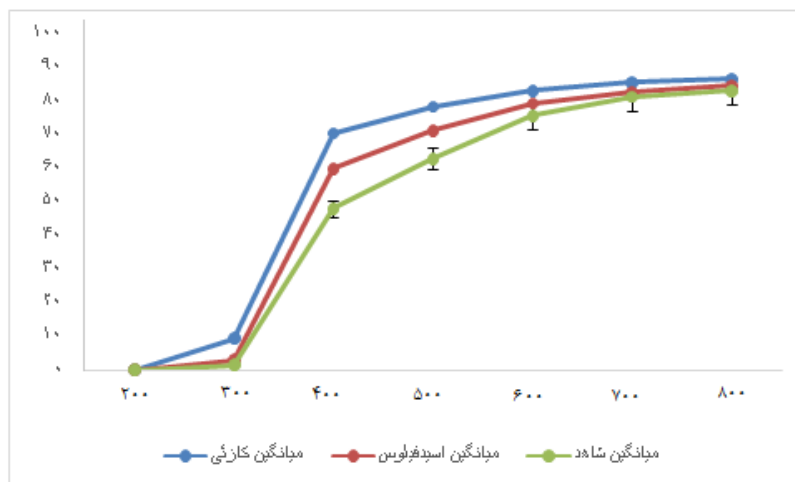
رنگ سطحی، نفوذپذیری نسبت به نور و شفافیت فیلم‌ها در جدول ۶ قرار گرفته است.

با توجه به جدول ۶، در حالت کلی فیلم‌های تولیدی ظاهری زرد رنگ و نیمه شفاف داشتند. شاخص *L یا روشنی فیلم سدیم کازئینات شاهد در مقایسه با فیلم‌های گنجانده شده با باکتری کازئی و اسیدوفیلوس اختلاف معنی‌داری داشت. افزودن باکتری‌های اسیدلاکتیک در پارامترهای *a و *b تغییری ایجاد نکرد. همچنین، اثر افزودن باکتری بر اختلاف رنگی فیلم معنی‌دار بود. نفوذپذیری فیلم‌های تولیدی نسبت به نور در طول موج‌های بین ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر در نمودار ۱ و همچنین شفافیت فیلم‌ها در جدول ۷ نشان داده شده است. افزودن

جدول ۶- ویژگی‌های رنگ سطحی فیلم‌ها

abc	ΔE	b*	a*	L*	نوع فیلم
0.786 ± 0.01^a	$16/92 \pm 2/35^a$	$2/06 \pm 0/68^a$	$4/38 \pm 0/73^a$	$78/36 \pm 2/21^b$	شاهد
$0.79 \pm 0/11^a$	$13/75 \pm 0/87^b$	$1/92 \pm 0/44^a$	$3/9 \pm 0/57^a$	$81/52 \pm 0/82^a$	کازئی
$0.76 \pm 0/38^a$	$15/38 \pm 1/26^{ab}$	$1/58 \pm 1/34^a$	$3/9 \pm 0/57^a$	$79/84 \pm 1/31^{ab}$	اسیدوفیلوس

حروف کوچک در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($p < 0/05$)



نمودار ۱- میزان عبور نور در فیلم‌های سدیم کازئینات حاوی باکتری‌های اسیدلاکتیک

۱۰۹

لاکتات/دی استات و باکتری‌های اسیدلاکتیک به همراه عصاره خارج سلولی تأثیر بیشتری در کاهش لیستریا در ۸ هفته نگهداری در دمای یخچال مشاهده شد (به ترتیب ۲ و ۳/۳ لوگ کاهش داشت). تفاوت آماری معنی‌داری بین نتایج لاکتات/دی استات برای باکتری‌های اسیدلاکتیک و عصاره خارج سلولی مشاهده نشد. در بررسی Berjeaud (۲۰۰۷)، در تکه‌های ژامبون پخته شده باکتری لاکتوباسیلوس ساکی ۲۵۱۲، توانست رشد باکتری لیستریا را مهار کند. در ادامه آزمایش، کشت در محیط BHI 5L200 نشان داد که رشد لیستریا توسط *L. sakei* 2512 و همچنین *L. curvatus* 2711 باز داشته شد و *L. innocua* 8811 توسط *L. sakei* 2512 از ۶ تا ۶۰ روز مهار شد. *L. sakei* 2512 نماینده خوبی به عنوان کشت محافظ زیستی در جلوگیری از لیستریا در آلودگی‌های گوشت پس از تولید می‌باشد. آلودگی‌های قارچی یکی از مهمترین ضررهای اقتصادی در سرتاسر جهان در صنعت غذا و کشاورزی است. در مطالعه Rollán و همکاران (۲۰۱۳)، ۹۱ سویه باکتری اسید لاکتیک از

مطابق با جدول ۱، زنده‌مانی باکتری‌های اسیدلاکتیک نسبت به روز اول افزایش پیدا کرد. در مطالعه Concha-Meyer و همکاران (۲۰۱۱)، در نمونه‌های گوشت، سطح اولیه باکتری‌های اسید لاکتیک در فیلم 10^6 log cfu/cm بود و در طول نگهداری به 10^7 افزایش یافت. López de Lacey و همکاران (۲۰۱۲) گزارش نمودند که زنده‌مانی باکتری بیفیدرو باکتریوم در فیلم ژلاتین با اعمال فشار بالا در ماهی هیک، در پایان نگهداری تا کمتر از ۲ سیکل لگاریتمی کاهش یافت.

در نتایج Crandall و همکاران (۲۰۱۲)، باکتری‌های اسید لاکتیک قادر بودند تعداد باکتری‌های لیستریا مونوسیتونژ تلقیح شده به سوسیس (فاقد لاکتات/دی استات) را بعد از ۸ هفته نگهداری در یخچال کاهش دهند (۰/۶ لوگ کاهش در مقایسه با شاهد که فقط لیستریا بود) و زمانی که عصاره خارج سلولی باکتری‌های اسید لاکتیک به باکتری‌های اسید لاکتیک اضافه شدند حتی بازدارندگی بیشتری مشاهده گردید (۱/۲ لوگ کاهش در مقایسه با شاهد که فقط لیستریا بود). در سوسیس‌های حاوی

Cizeikiene و همکاران (۲۰۱۳)، نشان دادند در محیط‌کشت آگار، باکتری‌های اسید لاکتیک از رشد باکتری‌های پاتوژن مثل باسیلوس، سودوموناس، لیستریا و اشرشیا جلوگیری کردند. سه سویه از این باکتری‌ها روی نان اسپری شده و در بسته‌های پلی اتیلن نگهداری گشتند، نتایج نشان داد این باکتری‌ها از رشد قارچ‌ها تا ۸ روز جلوگیری کردند.

pH می‌تواند تحت تأثیر عوامل مختلفی مانند گونه، ناحیه صید، تغذیه ماهی، دما و شرایط نگهداری باشد (Pacheco-Aguilar *et al.*, 2000). تغییرات مقادیر pH در تیمارها در مدت نگهداری در یخچال در جدول ۴ نشان داده شده است. در ابتدای دوره مقدار pH تیمارها ۷ بود که در میانه دوره کاهش و در انتهای دوره افزایش داشت که با مشاهدات Manju و همکاران (۲۰۰۷) و Fan و همکاران (۲۰۰۹) مشابه بود. کاهش اولیه ممکن است به این دلیل باشد که پس از مرگ ماهی گلیکوژن موجود در داخل سلول‌ها در شرایط بی‌هوای شکسته شده و اسید لاکتیک تولید می‌گردد که باعث کاهش اسیدیته عضلات می‌شود، دلیل افزایش آن می‌تواند تولید ترکیبات فرار ناشی از فعالیت باکتری‌ها مانند آمونیاک و تری متیل آمین باشد. البته این تغییرات می‌تواند باعث صدمه به ساختار پروتئینی محصول و کاهش میزان آب موجود در آن شود (Fan *et al.*, 2009). اما از آنجا که تغییرات pH معنی دار نبود، احتمال چنین صدمه‌ای در تحقیق حاضر خیلی ضعیف می‌باشد.

حلالیت یک ویژگی مهم در فیلم‌های زیست تخریب پذیر است زیرا می‌تواند میزان مقاومت فیلم نسبت به آب، مخصوصاً در محیط‌های حاوی رطوبت مثل مواد غذایی گوشتی (Siripatrawan *et al.*, 2010; Bourtoom & Chinnan, 2008) و همچنین سرعت آزاد شدن ترکیبات ضد اکسیداسیونی و ضد میکروبی فیلم را زمانی که در تماس با سطح ماده‌ی غذایی است، تعیین کند (Gómez-Estaca *et al.*, 2010).

نفوذپذیری فیلم‌های بیوپلیمری بستگی به فاکتورهای زیادی دارد، از جمله ضریب حلالیت، یکپارچگی ماتریس فیلم، آب‌گریزی، میزان انتشار، نسبت بین کریستال و مناطق بی‌شکل، ضخامت، تحرک زنجیره پلیمری و تعامل

منابع مختلف برای بررسی فعالیت ضد قارچی جدا شدند. از کل باکتری‌های اسید لاکتیک، ۱۰ سویه با اثر بازدارندگی بالا (۸۰٪) بر همه سویه‌های قارچ انتخاب شدند. این ۱۰ سویه فعالیت ضد قارچی علیه تمام قارچ‌های فاسد کننده را نشان دادند که فعالیت بازدارندگی آن‌ها مربوط به اسیدهای آلی و پپتیدهای ضد قارچی می‌باشد.

در مطالعه Tsakalidou و همکاران (۲۰۰۹)، ۶۳۵ سویه باکتری اسید لاکتیک با منشا غذایی برای کاربرد بالقوه به عنوان کشت محافظ در مرغ را بررسی کردند. دو سویه از آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی علیه باکتری‌های گرم مثبت شاخص، به طور عمده لیستریا و گونه بروکوتریکس مشهود بودند، در حالی که هیچ فعالیت ضد باکتری علیه باکتری‌های گرم منفی آزمایش شده مشاهده نگردید. سویه‌های انتروکوکوس فاسیتوم PCD71، لاکتوباسیلوس فرمنتوم ACA-DC179 انتخاب شده و در گوشت جوجه خام به عنوان کشت محافظ علیه لیستریا و سالمونلا به کار برده شدند. کاهش رشد معنی داری برای این باکتری‌های پاتوژن مشاهده شد که بیشتر روی سالمونلا مشهود بود.

در مطالعه Bondi و همکاران (۲۰۰۹)، توانایی بقا و تکثیر لیستریا منوسیتوزنز NCTC10888 در فیلم زیستی حاوی باکتری اسید لاکتیک حتی با تفاوت در بین سویه باکتری‌های اسید لاکتیک گزارش شد. لاکتوباسیل پلانترتوم d۳۵ بیشترین اثر در کاهش لیستریا در پایان مدت آزمایش (۱۰ روز) در مقایسه با شاهد نشان داد. توانایی کاهش لیستریا در طول دو روز اول انکوباسیون ۱/۳ لوگ بود. این واقعیت مرتبط با تولید باکتریوسین می‌باشد. اگرچه کاهش پاتوژن در سلول‌ها در پایان مدت آزمایش مشاهده شد و این نتیجه به کاهش pH (به مقدار ۵/۱) به دلیل تولید اسیدهای آلی توسط لاکتوباسیل‌ها و رقابت غذایی نسبت داده شد.

در مطالعه Chiralt و همکاران (۲۰۱۳)، فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی علیه لیستریا اینکوا در فیلم‌های پلی‌ساکاریدی مشاهده شد، در صورتی که در فیلم‌های پروتئینی مشاهده نگردید. فیلم آلزینات گنجانده شده با دو سویه از باکتری اسید لاکتیک و نایسین در بسته بندی سالمون دودی، اثر بازدارندگی طی مدت ۲۸ روز نشان داد.

starch-CMC-nanoclay biodegradable films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46, 1-5.

Arrieta, M. P., Peltzer, M. A., Garrigós, M. D. C. & Jiménez, A. (2013). Structure and mechanical properties of sodium and calcium caseinate edible active films with carvacrol. *Journal of Food Engineering*, 114, 486-494.

ASTM. (2002). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Annual book of ASTM Standards. Designation D882-02. Philadelphia: American Society for Testing Materials.

Berjeaud, J. M. (2007). Characterization of new bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated using a medium designed to simulate inhibition of *Listeria* by *Lactobacillus sakei* 2512 on meat. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 67-74.

Bondi, M., Anacarso, I., Iseppi, R., Sabia, C., Messi, P., Niederhäusern, S. D. & Guerrieri, E. (2009). Use of lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes* in a small-scale model. *Food Control*, 20, 861-865.

Bourtoom, T. & Chinnan, M. S. (2008). Preparation and properties of rice starch-chitosan blend biodegradable film. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 1633-1641.

Chen, H., Neetoo, H. & Juck, G. (2010). Application of an active alginate coating to control the growth of *Listeria monocytogenes* on poached and deli turkey products. *International Journal of Food Microbiology*, 142, 302-308.

Chiralt, A., Iván Quintero Saavedra, J. & Sánchez-González, L. (2013). Physical properties and antilisterial activity of bioactive edible films containing *Lactobacillus plantarum*. *Food Hydrocolloids*, 33, 92-98.

Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., Paskevicius, A. & Bartkiene, E. (2013). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. *Food Control*, 31, 539-545.

Concha-Meyer, A., Schöbitz, R., Brito, C. & Fuentes, R. (2011). Lactic acid bacteria in an alginate film inhibit *Listeria monocytogenes* growth on smoked salmon. *Food Control*, 22, 485-489.

Crandall, P. G., Ricke, S. C., O'Bryan, C. A., Eggleton, M. & Koo, O. K. (2012). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria

گروه‌های عملکردی از پلیمرها دارد. در تحقیق حاضر، باکتری‌های اسید لاکتیک تفاوت معنی داری بر نفوذپذیری فیلم سدیم کازئینات نداشتند که مطابق با نتایج Concha-Meyer و همکاران (۲۰۱۰) می‌باشد. در مطالعه Kanmani و Taik Lim (۲۰۱۳)، افزودن سلول‌های پروبیوتیک در فیلم‌های پולان منجر به کاهش نفوذپذیری به بخار آب گردید. سلول‌های پروبیوتیک در فیلم‌های حاوی نشاسته بر نفوذپذیری به بخار آب فیلم‌ها اثرگذار بودند. پروبیوتیک‌ها در ماتریس فیلم به عنوان ذرات ناپیوسته، مانع از حرکت زنجیرهای پلیمری می‌شوند. در مطالعه Rezvani و همکاران (۲۰۱۳)، افزودن گلیسرین در فیلم سدیم کازئینات، مقدار نفوذپذیری به بخار آب را افزایش داد که به دلیل افزایش فضای خالی برای حرکت زنجیره، کاهش انعطاف پذیری و افزایش حرکت مولکول‌ها در فیلم می‌باشد. در این تحقیق، افزودن باکتری بر مقاومت کششی تغییری ایجاد نکرد ولی بر درصد افزایش طول تاثیر داشت. در مطالعه Kanmani و Taik Lim (۲۰۱۳)، افزودن سلول‌های پروبیوتیک در فیلم‌های پولان خالص منجر به کاهش معنی‌داری در مقاومت کششی شد. این نتایج مغایر است با نتایج Gialamas و همکاران (۲۰۱۰) که در آن افزودن سلول‌های باکتریایی به فیلم‌های سدیم کازئینات با نرم‌کنندگی سوربیتول، هیچ تاثیری بر خصوصیات مکانیکی فیلم نداشت.

نتیجه‌گیری

یکی از عوامل مهم اثرگذار بر ظاهر کلی محصول و پذیرش مصرف‌کنندگان، رنگ بسته‌بندی می‌باشد (Bourtoom & Chinnan, 2008). رنگ فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر اهمیت زیادی در کاربرد آن‌ها در صنعت بسته‌بندی دارد و یکی از عوامل مهم در تعیین کیفیت فیلم تهیه شده به شمار می‌آید (Almasi et al, 2010). در این تحقیق، باکتری‌های اسید لاکتیک، شاخص L^* و اختلاف رنگی را تحت تاثیر قرار دادند، ولی افزودن باکتری تغییری در پارامترهای a و b نداشت. افزودن باکتری بر شفافیت فیلم سدیم کازئینات تاثیری نداشت.

منابع

Almasi, H., Ghanbarzadeh, B. & Entezami, A. A. (2010). Physicochemical properties of

against *Listeria monocytogenes* on frankfurters formulated with and without lactate/diacetate. *Meat Science*, 92: 533–537.

Fan, W., Sun, J., Chen, Y., Qiu, J., Zhang, Y & Chi, Y. (2009). Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. *Food Chemistry*, 115, 66-70.

Fazlara, A., Sadeghi, A. & Rostami Soleimani, P. (2012). Study of antimicrobial effect of cumin oil on the *Listeria monocytogenes* bacteria in Iranian white cheese. *Journal of Food Science*, 35, 35-44.

Ghanbari, M., Rezaei, M., Soltani, M. & Shahhosseini, Gh. (2011). Effect of *Lactobacillus casei* inoculation, as a biological preservatives on chemical and biological quality of smoked Rutilus frisiikutum product. *Journal of Food Science*, 33, 27-34.

Gialamas, H., Zinoviadou, K. G., Biliaderis, C. G. & Koutsoumanis, K. P. (2010). Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of *Lactobacillus sakei* into sodium-caseinate films for controlling *Listeria monocytogenes* in foods. *Food Research International*, 43, 2402-2408.

Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., López-Caballero, M., Gómez-Guillén, M. & Montero, P. (2010). Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food microbiology*, 27, 889-896.

Gram, L. & Dalgaard, P. (2002). Fish spoilage bacteria- problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 262-266.

Hosseini, M. H., Razavi, S. H. & Mousavi, M. A. (2009). Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils. *Journal of Food Processing and Preservation*, 33, 727-743.

Kanmani, P. & Taik Lim, S. (2013). Development and characterization of novel probiotic-residing pullulan/starch edible films. *Food Chemistry*, 141, 1041-1049.

López de Lacey, A., López Caballero, M. E., Gómez Estaca, J., Gómez Guillén, M. C. & Montero García, P. (2012). Functionality of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* incorporated to edible coatings and films. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, 277-282.

Manju, S., Leema, J., Srinivasa Gopal, T. K., Ravishankar, C. N. & Jose, L. (2007). Effects of sodium acetate dip treatment and vacuum-packaging on chemical, microbiological, textural and sensory changes of Pearlsport (*Etroplus suratensis*) during chill storage. *Food Chem*, 102, 27- 32.

Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H. & Hosseini, S. M. H. (2010). Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry*, 122, 161-166.

Pacheco-Aguilar, R., Lugo-Sanchez, M. E. & Robles-Burgueno, M. R. (2000). Postmortem biochemical and functional characteristic of Monterey sardine muscle stored at 0 °C. *Journal of Food Science*, 65, 40–47.

Rezvani, E., Schleining, G., Sümen, G. & Taherian, A. R. (2013). Assessment of physical and mechanical properties of sodium caseinate and stearic acid based film-forming emulsions and edible films. *Journal of Food Engineering*, 116, 598–605.

Rollán, G., Fontde Valdez, G., Torres, M. J. & Gerez, C. L. (2013). Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. *Biological Control*, 64, 231-237.

Siripatrawan, U. & Harte, B. R. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 24, 770-775.

Tsakalidou, E. (2009). Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology*, 130, 219-226.