افزایش ماندگاری گوشت چرخ‌کرده مرغ با استفاده از دو گونه لاکتوباسیلوس و EDTA

ندا علی‌عباسی[۱]، فریبا زینالی[۲*]، جواد علی‌اکبرلو[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲. دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۳. دانشیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات: F.zeynali@urmia.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹۵/٤/۸ پذیرش نهایی: ۹۵/٦/۲٤)

چکیده

باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌عنوان عوامل ضدمیکروبی قادر به جلوگیری از رشد محدوده وسیعی از میکروارگانیسم‌های عامل فساد و پاتوژن‌های غذازاد می‌باشند. مطالعه حاضر جهت ارزیابی اثر ترکیبی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس پلانتارم* (10^5 CFU/g) و اثر توأم لاکتوباسیلوس‌ها و EDTA (50 mM) بر ماندگاری گوشت سینه مرغ انجام گرفت. گروه‌های مورد آزمایش شامل نمونه شاهد (بدون لاکتوباسیلوس‌ها و EDTA)، با لاکتوباسیلوس‌ها و بدون EDTA، با لاکتوباسیلوس‌ها و EDTA بودند. تیمارها در دمای ۱±٤ °C نگهداری شدند و هر ۳ روز یک‌بار جهت انجام آزمایش‌های میکروبیولوژیکی (شمارش باکتری‌های مزوفیل هوازی، کلی‌فرم و سرمادوست) در طول ٦ روز نگهداری مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که استفاده از لاکتوباسیلوس‌ها و هم‌چنین استفاده از لاکتوباسیلوس‌ها +EDTA اثر معنی‌داری ($p<0/05$) در کاهش شمارش باکتری‌های مزوفیل و سرمادوست و کلی‌فرم با حداقل یک روز افزایش ماندگاری داشتند. میزان pH تیمارهای حاوی لاکتوباسیلوس‌ها و لاکتوباسیلوس‌ها +EDTA، کمتر از تیمارهای کنترل بود. به‌طورکلی نتایج نشان داد که تیمار حاوی لاکتوباسیلوس‌ها +EDTA در مقایسه با تیمار فقط لاکتوباسیلوس‌ها تأثیر بیشتری در کاهش رشد باکتریایی در طول مدت نگهداری در شرایط سرما دارد.

واژه‌های کلیدی: لاکتوباسیلوس، گوشت مرغ، اتیلن دی‌امین تترااستیک اسید

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

گوشت مرغ و تخم‌مرغ ارزش غذایی بالایی دارند به‌طوری که حاوی پروتئین بالا بوده و منبع خوبی از لحاظ فسفر، سایر مواد معدنی و ویتامین‌های گروه ب هستند (Givens, 2005) و در مقایسه با گوشت گاو و خوک دارای مقدر چربی کم‌تری می‌باشند (Ivanovic, 2005). از طرفی گوشت مرغ به‌دلیل ترکیب غنی مواد مغذی، pH بالا (۶/۵-۵/۵) و aw بالا (۰/۹۹-۰/۹۸) بسیار فسادپذیر است، به‌طوری‌که رشد و بقا بسیاری از میکروارگانیسم‌ها را فراهم می‌کند (Buncic *et al.*, 2014). فساد گوشت اغلب توسط باکتری‌های گرم منفی هم‌چون باکتری‌های سرمادوست و چندین گونه از باکتری‌های گرم مثبت رخ می‌دهد که هر کدام از این باکتری‌ها تحت شرایط مختلف محیطی بر باکتری‌های دیگر چیره شده و باعث فساد می‌شوند (Casaburi *et al.*, 2015). در سال‌های اخیر تقاضا برای استفاده از محافظت‌کننده‌های شیمیایی- به‌دلیل افزایش سطح آگاهی و نگرانی مصرف‌کنندگان از مخاطرات احتمالی آن‌ها بر سلامتی انسان- کاهش می‌یابد. دلیل این ادعا استقبال و گرایش در استفاده از جایگزین‌های طبیعی به‌جای محافظت‌کننده‌های شیمیایی است (Castro *et al.*, 2011).

باکتری‌های اسیدلاکتیک مناسب‌ترین گزینه برای استفاده به‌عنوان کشت‌های محافظت کننده می‌باشند زیرا که به‌عنوان ارگانیسم‌های با منشأ غذایی مطرح هستند و از طرفی اداره غذا و داروی آمریکا (FDA) این باکتری‌ها را برای مصارف انسانی ایمن شناخته است (Castellano, *et al.*, 2008). باکتری‌های اسیدلاکتیک طیف وسیعی از مواد ضدمیکروبی مانند اسیدهای آلی، هیدروژن پراکسیدها و باکتریوسین‌ها را تولید می‌کنند (Martinez *et al.*, 2013). در بحث حفاظت از مواد غذایی باکتری‌های عامل فساد و پاتوژن‌های گرم منفی، به‌دلیل مقاومت ذاتی آن‌ها نسبت به تعدادی از عوامل ضدمیکروبی از جمله باکتریوسین‌ها بسیار مورد توجه هستند (Deegan *et al.*, 2006; Zendo, 2013). این مقاومت به‌دلیل غشای لیپوپلی‌ساکاریدی باکتری‌های گرم منفی است که هم‌چون سدی از نفوذ باکتریوسین‌ها و تأثیر ترکیبات ضدمیکروبی دیگر بر باکتری‌های گرم منفی جلوگیری می‌کنند (Naidu, 2002; Atef Yekta *et al.*, 2010). بنابراین به‌منظور تأثیر عوامل ضدمیکروبی بر باکتری‌های گرم منفی نیاز به تغییر در ساختار غشای بیرونی این باکتری‌ها با روش‌های مختلفی نظیر استفاده از گرما، منجمد کردن، فرایند فشار بالا و یا استفاده از مواد شلاته کننده (اتیلن دی‌آمین تتراستیک اسید) می‌باشد (Yethon and Whitfield, 2001). EDTA به‌عنوان شلاته کننده با منشأ غذایی با شلاته کردن کاتیون‌های دو ظرفیتی از جمله Ca^{2+} و Mg^{2+} سبب ناپایداری و تغییر نفوذپذیری غشای باکتری‌های گرم منفی می‌شود (Alakomi *et al.*, 2003؛ Hancock and Rozek, 2002). تاکنون در چندین تحقیق تأثیر بازدارندگی لاکتوباسیلوس‌ها علیه میکروارگانیسم‌های عامل فساد و پاتوژن در شرایط آزمایشگاهی بررسی‌شده است (Brashears, 1998; Maragkoudakis *et al.*, 2009). اما مطالعات کمی در ارتباط با تأثیر بازدارندگی لاکتوباسیلوس‌ها بر رشد میکروبی در گوشت تازه انجام یافته است (Muthukumarasamy, 2003) که این امر به‌دلیل پیچیدگی استفاده از بیوکنترل‌ها در گوشت تازه می‌باشد (Koch, 2004). از جمله این پیچیدگی‌ها

www.SID.ir
Archive of SID

می‌توان به حضور آنزیم‌های پروتئولیتیک به‌مقدار زیاد در گوشت تازه اشاره کرد که سبب تجزیه باکتریوسین‌ها و کاهش فعالیت ضد میکروبی کشت‌های محافظت کننده می‌شوند. هم‌چنین گوشت تازه اغلب توسط باکتری‌های گرم منفی آلوده می‌شود که در حالت کلی باکتریوسین‌های تولیدی بر آن‌ها تأثیری ندارند و این‌که گوشت تازه شامل انواع مختلفی از باکتری‌ها در تعداد زیاد می‌باشد که باکتری‌های لاکتیک به‌منظور تأثیرگذاری باید قادر به رقابت و غلبه بر این باکتری‌ها در طول دوره نگهداری گوشت باشند (Gonzalez, 2006; Anang, 2007). در تحقیقی سرعت فساد فراورده گوشتی سنتی برزیلی (charqui) با استفاده از *لاکتوکوکوس لاکتیس* کاهش داده شد (Biscola *et al.*, 2014). طبق گزارش‌ها کیفیت و ایمنی سوسیس تخمیری با استفاده از *لاکتوباسیلوس کورواتوس* به‌عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک افزایش پیدا کرد (Casaburi *et al.*, 2016). هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر *لاکتوباسیلوس پلانتارم* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به‌صورت ترکیبی باهم و نیز همراه با EDTA بر ماندگاری گوشت چرخ‌کرده مرغ در دمای یخچال می‌باشد.

مواد و روش‌ها

- سویه‌های لاکتوباسیلوس با مشخصات

لاکتوباسیلوس پلانتارم (PTCC 1745) و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (PTCC 1643) به‌صورت لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های سازمان علمی – پژوهشی ایران خریداری شد و در MRS براث به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه و در شرایط بی‌هوازی فعال شد. به‌منظور فعال‌سازی بیشتر و تهیه کشت تازه و جوان از سلول‌های باکتری‌ها نیز، کشت دومی در همان محیط با حجم تلقیح ۱ درصد تهیه نموده و در شرایط قبل گرمخانه‌گذاری شدند. سپس از کشت دوم، باکتری‌ها به روش کشت خطی به محیط MRS آگار انتقال داده شد و بعد از رشد در شرایط بی‌هوازی تا روز آزمایش در یخچال نگه‌داری گردیدند. برای به دست آوردن کشت تازه لاکتوباسیلوس‌ها به‌منظور تلقیح به گوشت از کلنی تک هر کدام از لاکتوباسیلوس‌ها در محیط MRS آگار به ۱۰ میلی‌لیتر MRS براث تازه انتقال و در دمای ۳۷ درجه به‌مدت ۱۸ ساعت (به‌منظور تلقیح باکتری در فاز لگاریتمی) در شرایط بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری شدند. به‌منظور تهیه باکتری خالص نیز، محیط کشت‌های حاوی سلول‌های باکتری در ۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ٦ درجه و به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ (SIGMA, Germany) گردیدند و بعد از دور ریختن مایع شناور رویی و جایگزین کردن آن با سرم فیزیولوژی (۰/۸۵ درصد) نمک طعام به‌منظور تهیه باکتری خالص ته رسوب حاصل بار دیگر در شرایط قبلی سانتریفیوژ گردید و مایع رویی دور ریخته شد و در انتها تعداد هرکدام از لاکتوباسیلوس‌ها توسط اسپکتروفتومتر (6315 JENWAY, England) در OD_{600} nm=0.1 نانومتر در سرم فیزیولوژی در مقدار تقریبی $۱۰^{۷}$ CFU/ml تنظیم شد. (Neetoo *et al.*, 2007) به‌منظور اطمینان از غلظت تعیین شده از سوسپانسیون حاصل تا رقت $۱۰^{-٦}$ رقت‌سازی و در محیط MRS آگار کشت داده شد که پس از شمارش غلظت باکتری‌ها در حدود $۱۰^{۷}$– $۱۰^{٦}$ بود.

Archive of SID
www.SID.ir

- آماده‌سازی محلول EDTA

محلول استوک EDTA ۵۰۰ mM با حل کردن ۱/۸۶گرم از پودر نمک سدیم اتیلن دی‌امین تترااستیک‌اسید در ۱۰ سی‌سی آب مقطر دیونیزه قبل از اضافه کردن به نمونه‌ها و به‌صورت تازه تهیه شد و سپس تا غلظت ۵۰ mM رقیق گردید. محلول حاصل با عبور از فیلتر ۰/۲ میکرومتر استریل شد و در نهایت از محلول ۵۰ mM آن ۵۰۰ میکرولیتر به ازای ۱۰۰ گرم نمونه اضافه گردید (Hasapidou and Savvaidis, 2011).

- آماده‌سازی نمونه‌ها

مرغ خانگی (بدون آنتی‌بیوتیک) خریداری و در روز آزمایش کشتار شد. سینه مرغ همراه با پوست آن جداسازی و در کنار شعله و در شرایط استریل پوست‌کنی و چرخ شد. سپس به‌صورت ۳ نمونه ۱۰۰ گرمی دربسته‌های زیپ‌پک بسته‌بندی گردید. لازم به‌ذکر است که خود بسته‌ها چند ساعت قبل توسط اشعه UV استریل شده بودند. گروه‌های تحت مطالعه شامل:

۱- C: (کنترل) حاوی گوشت چرخ شده مرغ

۲- AP: گوشت چرخ‌کرده مرغ +*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس + لاکتوباسیلوس پلانتارم*

۳- APE گوشت چرخ‌کرده مرغ +*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس + لاکتوباسیلوس پلانتارم* + EDTA

غلظت نهایی لاکتوباسیلوس‌ها بعد از اضافه کردن به نمونه‌های ۱۰۰ گرمی گوشت به ازای هر گرم گوشت 10^5 cfu/g بود.

- روش انجام آزمایش میکروبی

۱۰ گرم نمونه گوشت در یک کیسه استومیکر (Circulator 400 Seward England) قرار داده شد. سپس ۹۰ میلی‌لیتر محلول نمکی استریل ۰/۸۵ گرم در صد به آن اضافه و در استومیکر با شدت ۲۰۰ بار در دقیقه به‌مدت یک دقیقه هموژن گردید (رقت ۱/۱۰). مرحله بعد رقت‌های متوالی در لوله‌های حاوی سرم فیزیولوژی (۰/۸۵ درصد) تهیه و در پلیت‌های حاوی محیط کشت تلقیح داده شدند.

۱- کشت و شمارش باکتری‌های مزوفیل هوازی به روش کشت صفحه‌ای استاندارد در محیط PCA به‌مدت ۲٤ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انجام گرفت (FDA, 2001).

۲- کشت و شمارش کلی‌فرم‌ها به روش کشت صفحه‌ای استاندارد در محیط (VRBA) به‌مدت ۲٤ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انجام گرفت (ISO, 2004).

۳- کشت و شمارش باکتری‌های سرمادوست به روش کشت صفحه‌ای استاندارد در محیط PCA به‌مدت یک هفته و در دمای ۷ درجه سلسیوس انجام گرفت (Rashisar *et al*., 2004; Kilinc *et al*., 2007) و بعد از شمارش تعداد باکتری به‌صورت log cfu/g گزارش شد.

- اندازه‌گیری pH

برای اندازه‌گیری pH مقدار ۱۰ گرم نمونه در ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر توسط دستگاه هموژنیزاتور (Ultra-turrax T25 IKa) با دور ۱۰۰۰ در دقیقه هموژنیزه شد و با واردکردن الکترود pH متر (HANNA, Portugal) در مخلوط، pH اندازه‌گیری شد (Masniyom *et al*., 2005).

www.SID.ir
Archive of SID

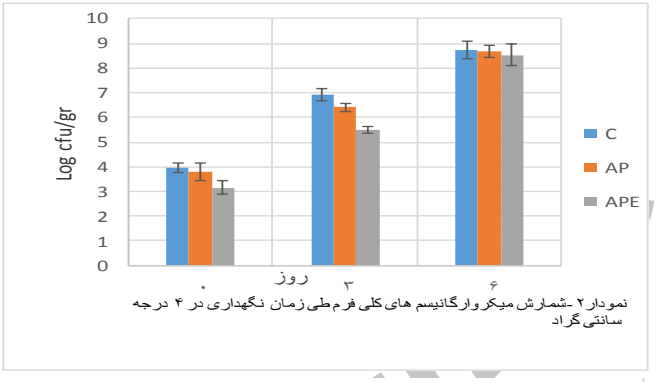
- تحلیل آماری

آزمایش‌های در کلیه مراحل با ۳ تکرار انجام گرفت و آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (Version 16) و مقایسه میانگین با آزمون دانکن انجام شد و مقادیر ($p< ۰/۰۵$)، معنی‌دار در نظر گرفته شد.

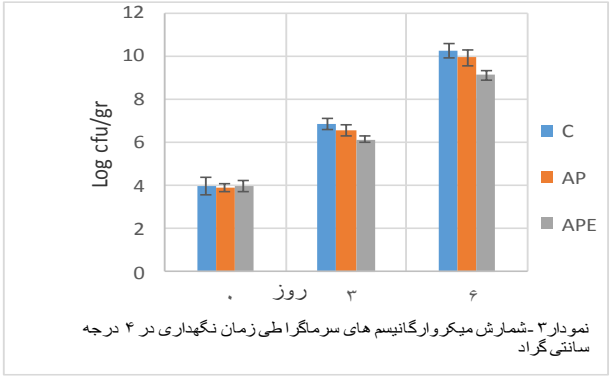
یافته‌ها

میانگین لگاریتمی شمارش باکتری‌های مزوفیل هوازی، کلی‌فرم و سرمادوست در گروه‌های کنترل (C)، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس + لاکتوباسیلوس پلانتارم* (AP) و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس + لاکتوباسیلوس پلانتارم*+EDTA (APE) طی سه روز آزمایش در مدت ٦ روز نگهداری در دمای یخچال به‌ترتیب در نمودارهای (۱)، (۲) و (۳) نشان داده شده است و تغییرات pH سه نمونه نیز در نمودار (٤) نشان داده شده است.

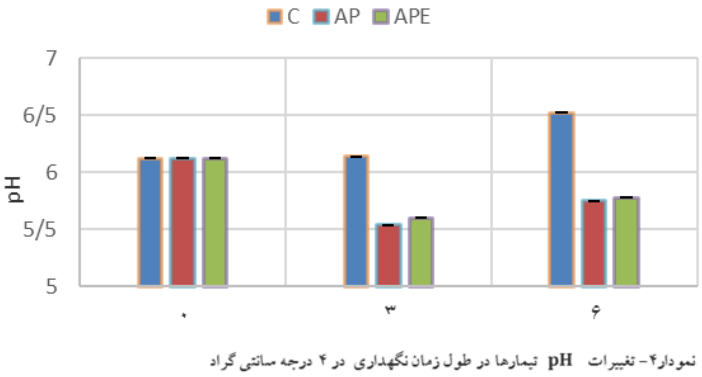
نمودار۱- شمارش میکروارگانیسم های مزوفیل هوازی طی زمان نگهداری در ۴ درجه سانتی گراد



نمودار۲-شمارش میکروارگانیسم های کلی فرم طی زمان نگهداری در ۴ درجه سانتی گراد



نمودار۳-شمارش میکروارگانیسم های سرمادوست طی زمان نگهداری در ۴ درجه سانتی گراد



نمودار۴- تغییرات pH تیمارها در طول زمان نگهداری در ۴ درجه سانتی گراد

www.SID.ir

بحث و نتیجه‌گیری

به‌طور کلی در طول مدت نگهداری نمونه‌ها در دمای یخچال، فلورمیکروبی به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$)، در تمام نمونه‌ها افزایش یافت که سرعت این افزایش در نمونه‌های کنترل بیشتر بود. در روز اول، لگاریتم تعداد باکتری‌های مزوفیل هوازی در گرم در نمونه‌های APE, AP, C به‌ترتیب ۵/۱۵، ۵/۲۰ و ۵/۳۰ بود که با نتایج کارهای پیشین برای شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در گوشت چرخ‌کرده مرغ و گاو مطابقت داشت (Ismail *et al.*, 2000; Amani, 2012). ولی از طرفی اختلاف با مقادیر گزارش شده برای کارهای مشابه نیز مشاهده شد که بر طبق گزارش آن‌ها شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها بعد از ۳ روز نگهداری گوشت چرخ‌کرده مرغ در حدود ٤ واحد لگاریتمی در گرم بود (Keokamnerd *et al.*, 2008). علت این اختلاف می‌تواند به‌دلیل افزایش بار میکروبی گوشت به‌هنگام کشتار، پوست‌کنی و چرخ کردن باشد (Mead and Griffin,1998). شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در نمونه کنترل در روز سوم به‌میزان ۷ log cfu/g رسید که به‌عنوان بالاترین حد مجاز میکروبی برای مواد غذایی توسط ICMFS بوده و (ICMFS, 1986) با نتایج سایر محققین مطابقت داشت (Hasapidou and Savvaidi, 2011; Mexis *et al.*, 2012). در روز سوم شمارش میکروارگانیسم‌های مزوفیل هوازی در سه نمونه اختلاف معنی‌داری داشتند ($p<۰/۰۵$) به‌طوری که تعداد باکتری‌ها در نمونه AP و APE به‌ترتیب ۰/۲۵ و ۰/۹٦ سیکل لگاریتمی کمتر از نمونه C بود. هم‌چنین شمارش باکتری‌ها در نمونه APE به مقدار ۰/۷۱ سیکل لگاریتمی از نمونه AP کمتر بود. در روز ششم نیز شاهد اختلاف معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) بین نمونه‌های AP و APE در مقایسه با نمونه کنترل بودیم به‌طوری‌که تعداد باکتری‌ها در نمونه‌های AP و APE به‌ترتیب ۰/۸۲ و ۰/۹۷ سیکل لگاریتمی کمتر از نمونه C بود. ولی در روز ششم دو نمونه AP و APE از نظر آماری اختلاف معنی‌داری باهم نداشتند ($p<۰/۰۵$). علت اختلاف در تعداد باکتری‌های مزوفیل هوازی در روز سوم در نمونه‌های APو APE در مقایسه با نمونه C می‌تواند به دلیل کاهش pH و تولید ترکیبات ضدمیکروبی توسط لاکتوباسیلوس‌ها باشد (Caplice and Fizgernald, 1999) و هم‌چنین تعداد کم باکتری‌ها در نمونه APE نسبت به نمونه AP (۰/۷۱ واحد لگاریتمی) در روز سوم نیز می‌تواند به علت اثر سینرژیستی EDTA و لاکتوباسیلوس‌ها باشد؛ به‌طوری که EDTA با تخریب غشای باکتری‌های گرم منفی سبب نفوذپذیر شدن آن‌ها نسبت به ترکیبات ضدمیکروبی تولیدشده توسط لاکتوباسیلوس‌ها گردیده است. بر طبق نتایج سایر محققین، تیمار ترکیبی Nisin (500 IU/g) و EDTA (50 mM) بیشترین تأثیر را در افزایش ماندگاری گوشت مرغ در شرایط اتمسفر تغییر یافته داشت (Economou *et al.*, 2009). کاهش بیشتر pH در نمونه AP و نمونه APE نسبت به نمونه C در روز سوم می‌تواند به‌علت تولید اسیدهای آلی توسط لاکتوباسیلوس‌ها باشد که مسئول فعالیت ضدمیکروبی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌باشد (Makras *et al.*, 2006). نتایج آزمایش با نتایج سایر محققین نیز مطابقت داشت به‌گونه‌ای که سرعت رشد میکروارگانیسم‌های مزوفیل هوازی به‌دلیل استفاده از باکتری‌های لاکتیک در نمونه‌های گوشت کاهش پیدا

www.SID.ir
Archive of SID

کـرد (Leroi, 2010; Amani, 2012). در روز اول، لگاریتم تعداد باکتری‌های کلی‌فرم در گرم در تیمارهـای C، AP و APE به‌ترتیب ۳/۹۵، ۳/۸۱ و ۳/۱۵ بود که بـا نتایج تحقیقات پیشین مطابقت داشت (Patricia *et al*., 2011). در روز اول تعـداد بـاکتری‌هـای کلـی‌فـرم در ۳ نمونه اختلاف معنی‌داری داشـتند (p<۰/۰۵). بـه‌طـوری که تعداد کلی‌فرم‌هـا در نمونـه C بیشـترین و در نمونـه APE کمترین مقدار بود. از آن‌جایی‌که باکتری‌های کلـی فـرم بـه‌عنـوان شـاخص آلـودگی مـواد غـذایی شـناخته شده‌اند، تعداد بـالای ایـن بـاکتری‌هـا در نمونـه کنتـرل احتمالاً به‌دلیل افزایش آلودگی نمونه‌ها به هنگام کشـتار و چرخ کردن می‌باشد. تعداد کم باکتری‌های کلـی فـرم در نمونه AP و APE نسبت به نمونه C احتمالاً به‌دلیل تولیـد ترکیبـات ضـدمیکروبی و تـأثیر تـوأم EDTA و ترکیبات ضدمیکروبی بر این باکتری‌ها می‌باشـد. در روز سوم تعداد باکتری‌های کلـی‌فـرم در نمونـه AP و APE به‌ترتیب حـدود ۰/۵ و۱/۴۲ سـیکل لگـاریتمی کمتـر از نمونه C بود و تعداد باکتری‌ها در نمونه APE نیز حدود ۰/۹ سیکل لگاریتمی کمتـر از نمونـه AP بـود کـه ایـن اخـتلاف بـه‌دلیـل تـأثیر سینرژیسـتی EDTA و لاکتوباسیلوس‌ها بـر بـاکتری‌هـای گـرم منفـی از جملـه کلی‌فرم‌ها می‌باشد. در روز ششم تعداد باکتری‌های کلی فرم در دو نمونه C و AP اختلاف معنـی‌داری نداشـتند در حالی‌که تعداد باکتری‌های کلـی‌فـرم در نمونـه APE حدود ۰/۱۹ سیکل لگاریتمی کم‌تر از نمونه C و حـدود ۰/۱۶ سـیکل لگـاریتمی کمتـر از نمونـه AP بـود (p<۰/۰۵). نتـایج آزمـایش بـا نتـایج کارهـای مشـابه مطابقـت داشـت بـه‌طـوری کـه در هـر دو تحقیـق لاکتوباسیلوس‌ها به‌تنهایی قادر بـه تـأثیر چشـم‌گیـر بـر جمعیـت بـاکتری‌هـای کلـی‌فـرم نبودنـد و بـه‌منظـور تأثیرگـذاری بیشـتر، اسـتفاده ترکیبـی از لاکتیـک اسـید بـاکتری‌هـا بـا سـایر عوامـل حفـاظتی پیشـنهاد شـد (Bomdespacho *et al*., 2014; Patricia *et al*., 2011). هم‌چنین نتیجه آزمـایش کلـی‌فـرم‌هـا بـا نتـایج پیشـین به‌دست آمده از استفاده ترکیبـی EDTA و باکتریوسـین تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس کورواتـوس* کـه سـبب افزایش تأثیر بازدارندگی علیه بـاکتری *اشرشـیاکولای* در محیط آزمایشگاهی شد، مطابقت داشـت (Belfiore *et al*., 2007). میانگین لگاریتمی شمارش اولیه باکتری‌های سرما گرا برای ۳ نمونه C، AP و APE به‌ترتیب برابر با ۳/۹۳، ۳/۹۰ و۳/۹۵ واحد لگـاریتمی بـود کـه بـا نتـایج کارهای پیشین مطابقت داشت (Murthy *et al*., 1997). تعداد باکتری‌های سرمادوست در روز اول بین ۳ نمونـه اخـتلاف معنـی‌داری نداشـتند (p<۰/۰۵). در روز سـوم تعـداد بـاکتری‌هـای سرمادوسـت در ۳ نمونـه اخـتلاف معنـی‌داری داشـتند (p<۰/۰۵). بـه‌طـوری کـه تعـداد باکتری‌ها در نمونه‌هـای AP و APE بـه‌ترتیـب ۰/۳۴ و ۰/۷۶ نسبت به نمونه C کمتر بود و تعداد بـاکتری‌هـای سرمادوسـت در نمونـه APE حـدود ۰/۴۲ سـیکل لگاریتمی کمتر از نمونه AP بود. در روز ششم نیز تعداد بـاکتری‌هـای سـرماگرا در ۳ نمونـه اخـتلاف معنـی‌دار داشتند (p<۰/۰۵) بـه‌طـوری کـه تعـداد بـاکتری‌هـا در نمونـه AP و APE بـه‌ترتیـب ۰/۳۴ و ۱/۱۵ سـیکل لگاریتمی نسبت به نمونه C کمتر بود و دو نمونه APE و AP نیـز بـه میـزان ۰/۸۱ سـیکل لگـاریتمی اخـتلاف داشتند. نتایج شمارش باکتری‌هـای سـرماگرا مشـابه بـا نتیجه به‌دست آمده برای بـاکتری‌هـای مزوفیـل هـوازی بود. نتایج آزمـایش بـا نتـایج کارهـای پیشـین مطابقـت

Archive of SID
www.SID.ir

داشت که بر طبق نتایج پیشین استفاده از باکتری‌های لاکتیکی به‌منظور کنترل فساد و جلوگیری از رشد باکتری‌های پاتوژن در شرایط هوازی و دمای یخچالی، زمانی مؤثر است که آلودگی اولیه گوشت با باکتری‌های سرماگرا کم باشد. زیرا به‌دلیل نگه‌داری نمونه‌ها در یخچال شرایط بهینه رشد این باکتری‌ها فراهم می‌باشد به‌طوری که در مدت نگهداری نمونه‌ها در شرایط سرما این گروه از باکتری‌ها به سرعت رشد کرده و به‌دلیل پروتئولیز بودن با تجزیه پروتئین‌ها سبب افزایش pH و کاهش اثرگذاری لاکتوباسیلوس‌ها می‌شوند که طبق نتایج پیشین در این خصوص نیز تعداد اولیه باکتری‌های سرمادوست ۲/۸ واحد لگاریتمی در گرم بود (Murthy *et al.*, 1997; Dorn *et al.*, 1989).

میزان pH نمونه کنترل در روز سوم از ٦/١٢±٠/٠٥ به ٦/١٤±٠/٠٥ رسید و در روز ششم افزایش معنی‌داری نشان داد ($p<0/05$) که علت آن می‌تواند به‌این دلیل باشد که چون در ابتدا باکتری‌های موجود در گوشت برای تغذیه از کربوهیدرات‌ها خصوصاً گلوکز استفاده کرده‌اند و در نتیجه تولید اسید، pH گوشت تقریباً ثابت مانده است. ولی با اتمام ذخایر کربوهیدراتی و از طرفی رشد سریع باکتری‌ها موجود در آن خصوصاً باکتری‌های سرمادوست، سبب شده است که باکتری‌ها از پروتئین‌ها برای تأمین غذای خود استفاده کنند که در نتیجه آن تولید ترکیباتی هم‌چون آمونیاک و آمین‌ها باعث افزایش بیشتر pH شده است که با نتایج تحقیقات قبلی در این خصوص مطابقت داشت (Etemadian *et al.*, 2011; Latou *et al.*, 2013). مقدار pH نمونه AP و APE در روز سوم به‌ترتیب از ٦/١٢±٠/٠٥ به ٥/٥٤±٠/٠٣ و ٥/٦٠±٠/١ کاهش یافت و در روز ششم به ٥/٧٥±٠/٠٥ و ٥/٧٨±٠/٠٧ رسید که کاهش pH به‌دلیل تولید اسید توسط لاکتوباسیلوس‌ها می‌باشد و با نتایج تحقیقات پیشین مطابقت دارد (Amani, 2012). هم‌چنین در کارهای مشابه قبلی تیمارهای حاوی لاکتوباسیلوس‌ها کاهش PH (۰/۹۵ تا ۰/۷۰ واحدی) نسبت به نمونه کنترل نشان دادند (Fadda *et al.*, 2008). عدم افزایش قابل‌ملاحظه pH در نمونه‌های AP و APE در مقایسه با نمونه C از روز سوم به بعد احتمالاً به‌دلیل حضور باکتری‌های لاکتیکی می‌باشد، به‌طوری که از طرفی به‌دلیل حضور لاکتوباسیلوس‌ها در گوشت اسید تولید می‌شود و از طرف دیگر به‌دلیل تجزیه پروتئین‌ها ترکیبات تولیدی اجازه کاهش pH را نمی‌داد این در حالی است که نمونه C چون فاقد باکتری‌های لاکتیکی با جمعیت بالابود، تجزیه پروتئین‌ها باعث افزایش بیشتر pH شده است.

طبق نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر، لاکتوباسیلوس‌ها (*اسیدوفیلوس و پلانتارم*) با جمعیت ۵ واحد لگاریتمی همراه با محلول EDTA قادر به افزایش ماندگاری گوشت چرخ‌کرده مرغ در دمای یخچال حداقل به‌مدت یک روز بیشتر از نمونه کنترل بودند و به‌منظور تأثیرگذاری بیشتر استفاده از گوشت با بار میکروبی اولیه کم‌تر توصیه می‌شود.

www.SID.ir
Archive of SID

منابع

- Alakomi, H., Saarela, M. and Helander, J. (2003). Effect of EDTA on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium involves a component not assignable to lipopolysaccharide release. Microbiology, 149: 2015–2021.
- Amani, M.S. (2012). Bio-Preservation challenge for shelf-life and safety improvement of minced beef .Global Journal of Biotechnology and Biochemistry 7 (2): 50-60.
- Anang, D., Rusul, G., Bakar, J. and Ling, F. (2007). Effects of lactic acid and lauricidin on the survival of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157: H7 in chicken breast stored at 4±1 °C. Food Control, 18: 961-969.
- Arashisar, S., Hisar, O., Kaya, M. and Yanik, T. (2004). Effects of modified atmosphere and vacuum packaging on microbiological and chemical properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. Journal of Food Microbiology, 97: 209-214.
- Atefyekta, M., Verdonck, F., Van Den Broeck, W., Goddeeris, B.M., Cox, E. and Vanrompay, D. (2010). Lactoferrin inhibits *E. coli* O157:H7 growth and attachment to intestinal epithelial cells. Veterinární Medicína, 55: 359–368.
- Belfiore, C., Castellano, P. and Vignolo, G. (2007). Reduction of *Escherichia coli* population following treatment with bacteriocins from lactic acid bacteria and chelators. Food Microbiology, 24: 223–229.
- Biscola, V., Abriouel, H., Todorov, S.D., Capuano, V.S.C., Gálvez, A. and de Melo Franco, B.D.G. (2014). Effect of autochthonous bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* on bacterial population dynamics and growth of halotolerant bacteria in Brazilian charqui. Food Microbiology, 44: 296–301.
- Bomdespacho, L.Q., Cavallini, D.C.U., Zavarizi, A.C.M., Pinto, R.A. and Rossi, E.A. (2014). Evaluation of the use of probiotic acid lactic bacteria in the development of chicken hamburger. International Food Research Journal, 21(3): 965–972.
- Brashears, M.M., Reilly, S.S. and Gilliland, S.E. (1998) Antagonistic action of cells of *Lactobacillus lactis* toward *Escherichia coli* O157:H7 on refrigerated raw chicken meat. Journal of Food Protection, 61: 166–170.
- Buncic, S., Nychas, G.J., Lee, M.R.F., Koutsoumanis, K., Hébraud, M., Desvaux, M. and Antic D. (2014). Microbial pathogen control in the beef chain: recent research advances. Meat Science, 97(3): 288–297.
- Caplice, E. and Fizgernald, G.F. (1999). Food fermentation: role of microorganisms in food production and preservation. International Journal of Food Microbiology, 50: 131–194.
- Casaburi, A., Piombino, P., Nychas, G.J., Villani, F. and Ercolini, D. (2015). Bacterial population and the voatilome associated to meat spoilage. Food Microbiology, 45, 85–103.
- Casaburi, A., Di Martino, V., Ferranti, P., Picariello, L. and Villani, F. (2016). Technologic properties and bacteriocins production by *Lactobacillus curvatus* 54M16 and its use as starter culture for fermented sausage manufacture. Food Control, 59: 31–45.
- Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S. and Vignolo, G. (2008). A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. Meat Science, 79: 483–499.
- Castro, M.P., Palavecino, N.Z., Herman, C., Garro, O.A. and Campo, C.A. (2011). Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. Meat Science, 87: 321–329.
- Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, P. (2006). Bacteriocin: biological tools for biopreservation and shelf-life extension. International Dairy Journal, 16: 1058–1071.
- Dorn, P., Krabisch, P. and Gehra, H. (1989). Investigations on *Salmonella* decontamination of broiler carcasses. Archiv fur Geflugelkunde, 53: 123–134.

Archive of SID
www.SID.ir

- Economou, T.N., Pournis, A. and Ntzimani, I.N.S. (2009). Nisin–EDTA treatments and modified atmosphere packaging to increase fresh chicken meat shelf-life. Food Chemistry, 114: 1470–1476.
- Etemadian, Y., Shabanpour, B., Mahonak, A. and Yahyai, A. (2011). Effect of vacuum packaging on chemical, microbial and sensorial properties of white fish lion. Iranian Journal of Food Science and Technology, 7(4): 298–304. [In Persian]
- Fadda, S., Chambon, M.C., Champomier-Verge`s, R., Talon, C. and Vignolo, G. (2008). Lactobacillus role during conditioning of refrigerated and vacuum-packaged Argentinean meat. Meat Science, 79: 603–610.
- FDA (Food and Drug Administration), (2001). Bacteriological Analytical Manual. Online.
- Givens, D.I. (2005). The role of animal nutrition in improving the nutritive value of animal-derived foods value of animal-derived foods in relation to chronic disease. Proceedings of the Nutrition Society, 64: 395–402.
- Gonzalez-Fandos, E. and Dominguez, J.L. (2006). Efficacy of lactic acid against *Listeria monocytogenes* attached to poultry skin during refrigerated storage. Journal of Applied Microbiology, 101: 1331–1339.
- Hancock, R. and Rozek, A. (2002). Role of membranes in the activities of antibacterial cationic peptides. FEMS Microbiology Letters, 206: 143–149.
- Hasapidou, A. and Savvaidis, I.N. (2011). The effects of modified atmosphere packaging, EDTA and oregano oil on the quality of chicken liver meat. Food Research International, 44: 2751–2756.
- ICMFS (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), (1986). 2nd ed., Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Scientific Applications, Vol. 2, University of Toronto Press.
- Ismail, S.A.S., Deak, T., Abd El-Rahman, H.A., Yassien, M.A.M. and Beuchat, L.R. (2000). Presence and changes in populations of yeasts on raw and processed poultry products stored at refrigeration temperature. International Journal of Food Microbiology, 62(12): 113–121.
- International Organization for Standardization (ISO), (2004). No. 11291-1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs-Horizontal Methods for Detection and Enumeration of Enterobacteriaceae part (2): colony count method.
- Ivanović S., Baltić M., Sinovec Z. and Stojanović, Z. (2005). Probiotic influence on acid number, acid degree and fatty acid content in chicken abdominal fatty tissue. Biotechnology and Animal Husbandry, 21(5-6): 129-133.
- Jeevaratnam, K., Jamuna, M. and Bawa, A.S. (2005). Biological preservation of foods-bacteriocins of lactic acid bacteria. Indian Journal of Biotechnology, 4: 446–454.
- Keokamnerd, T., Acton, J. C., Han, I. Y., & Dawson, P. L. (2008). Effect of commercial rosemary oleoresin preparations on ground chicken thigh meat quality packaged in a high-oxygen atmosphere. Poultry Science, 87, 170–179.
- Kilinc, B., Cakli, S., Dincer, T. and Cadun, A. (2007). Effects of phosphates treatment on the quality of frozen-thawed fish species. Journal of Muscle Foods, 20, 377–391.
- Koch, A.G. (2004). Biopreservation, In: Jensen W.K., editor. Encyclopedia of Meat Sciences. Elsevier Ltd.; 2004. p. 68–74.
- Lambert, A.D., Smith, J.P., and Dodds, K.L. (1991). Shelf life extension and microbiological safety of fresh meat. A review. Food Microbiology, 9: 267-297.
- Latou, E., Mexis, S.F., Badeka, A.V., Kontakos, S. and Kontominas, M.G. (2014). Combined effect of chitosan and modified atmosphere packaging for shelf life extension of chicken breast fillets, LWT - Food Science and Technology, 55(1): 263-268.
- Leroi, F., (2010). Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. Food Microbiology, 27: 698-709.

www.SID.ir

- Makras, L., Triantafyllou, V., Fayol-Messaoudi, D., Adriany, T., Zoumpopoulou, G., Tsakalidou, E. *et al*. (2006). Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. Research in Microbiology, 157: 241-247.
- Maragkoudakis, P.E., Mountzouris, K.C., Psyrras, D., Cremonese, S., Fischer, J., Cantor, MD, *et al*. (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.
- Martinez, F.A.C., Balciunas, E.M., Converti, A., Cotter, P.D. and Oliveira, R.P.S. (2013). Bacteriocin production by Bifidobacterium spp.: A review. Biotechnology Advances, 31: 482–488.
- Masniyom, P., Soottawat, B. and Visessanguan, W. (2005). Combination effect of phosphate and modified atmosphere on quality and shelf-life extension of refrigerated seabass slices. Journal of Food Science and Technology, 38: 745-756.
- Mead, P.S. and Griffin, P.G. (1998). *Escherichia coli* O: H. The Lancet, pp: 352.
- Mexis, S. F; Chouliara, E., Kontominas, M.G. (2012). Shelf life extension of ground chicken meat using an oxygen absorber and a citrus extract. Food Science and Technology, 49(2012): 21-27.
- Murthy, T.R.K., Rao, V.K. and Natarajan, C. (1997). Effect of *Lactococcus lactis* var *lactis* bivar, *diacetylactis* on bacterial counts, pH and total acidity of minced goat meat during refrigerated storage. Meat Science, 47: 231-236.
- Muthukumarasamy, P., Han, J.H. and Holley, R.A. (2003). Bactericidal effects of *Lactobacillus reuteri* and allyl isothiocyanate on *Escherichia coli* O157:H7 in refrigerated ground beef. Journal of Food Protection, 66(11): 2038-2044.
- Naidu, A.S. (2002). Activated lactoferrin-a new approach to meat safety. Food Technology, 56: 40–45.
- Neetoo, H., Ye, M., Chen, H., Joerger, R.D., Hicksand D.T. and Hoover, D.G. (2007). Use of nisin-coated plasticfilms to control *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged cold-smoked salmon. International Journal Food Microbiology, 29(122): 8-15.
- Patricia, C., Belfiore, C. and Vignolo, G. (2011).Combination of bioprotective cultures with EDTA to reduce *Escherichia coli* O157:H7 in frozen ground-beef patties. Food Control, 22: 1461-1465.
- Yethon, J. and Whitfield, C. (2001). Lipopolysaccharide as a target for the development of novel therapeutics in Gram-negative bacteria. Current Drug Targets Infections Disorders, 1: 91–106.
- Zendo, T. (2013). Screening and characterization of novel bacteriocins from lactic acid bacteria. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 77: 893-899.

Archive of SID

www.SID.ir

Increasing the shelf life of minced chicken using two Lactobacillus species and EDTA

Aliabbasi, N.[1], Zeynali, F.[2*], Aliakbarlu, J.[3]

1. MS Student of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
3. Associate professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

[*]Corresponding author's email: F.zeynali@urmia.ac.ir

(Received: 2016/6/28 Accepted: 2016/9/14)

Abstract

Lactobacilli are known to have an inhibitory effect on the growth of a wide range of food spoilage and foodborne pathogens. The present study was conducted to evaluate the combined effect of *Lactobacillus acidophilus* + *Lactobacillus plantarum* (5 logs cfu/g) and also the combined effect of Lactobacillus plus EDTA (50 mM) on the shelf life of chicken breast meat. Treatments were grouped into the following: 1. without Lactobacillus and EDTA (C); 2. with Lactobacillus without EDTA (AP); 3. with Lactobacillus and EDTA (APE). Samples were stored at 4 ± 1°C and evaluated periodically for microbial counts (aerobic mesophilic count, coliform count and psychrotrophic count). Microbial analysis indicated that using of Lactobacillus species and Lactobacillus + EDTA had significant effects ($p<0.05$) in reducing the mesophilic, coliform and psychrotrophic counts, with the at least 1day extension of shelf life. Treatments with Lactobacillus species and Lactobacillus + EDTA showed lower pH values than the control sample. The results showed that application of Lactobacillus + EDTA in compared with the combined Lactobacillus species had more effect in reducing the growth of spoilage bacteria during refrigerated storage.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Lactobacillus, chicken meat, EDTA

Archive of SID

www.SID.ir