

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

ندا علی عباسی^۱، فریبا زینالی^{۲*}، جواد علی اکبرلو^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: ۹۵/۴/۸ پذیرش نهایی: ۹۵/۶/۲۴)

چکیده

باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌عنوان عوامل ضد میکروبی 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 پلاتنارم (10^6 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 $4 \pm 1^\circ\text{C}$ نگهداری شدند و هر ۳ روز یک‌بار جهت انجام آزمایش‌های میکروبیولوژیکی (شمارش باکتری‌های مزوفیل هوازی، کلی‌فرم و سرمادوست) در طول ۶ 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. 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 تتراستیک اسید

مقدمه

گوشت مرغ و تخم مرغ ارزش غذایی بالایی دارند به طوری که حاوی پروتئین بالا بوده و منبع خوبی از لحاظ فسفر، سایر مواد معدنی و ویتامین های گروه ب هستند (Givens, 2005) و در مقایسه با گوشت گاو و خوک دارای مقدر چربی کمتری می باشند (Ivanovic, 2005). از طرفی گوشت مرغ به دلیل ترکیب غنی مواد مغذی، pH بالا (6/5-5/5) و aw بالا (0/98-0/99) بسیار فسادپذیر است، به طوری که رشد و بقا بسیاری از میکروارگانیسم ها را فراهم می کند (Buncic et al., 2014). فساد گوشت اغلب توسط باکتری های گرم منفی هم چون باکتری های سرمادوست و چندین گونه از باکتری های گرم مثبت رخ می دهد که هر کدام از این باکتری ها تحت شرایط مختلف محیطی بر باکتری های دیگر چیره شده و باعث فساد می شوند (Casaburi et al., 2015). در سال های اخیر تقاضا برای استفاده از محافظت کننده های شیمیایی - به دلیل افزایش سطح آگاهی و نگرانی مصرف کنندگان از مخاطرات احتمالی آن ها بر سلامتی انسان - کاهش می یابد. دلیل این ادعا استقبال و گرایش در استفاده از جایگزین های طبیعی به جای محافظت کننده های شیمیایی است (Castro et al., 2011).

باکتری های اسیدلاکتیک مناسب ترین گزینه برای استفاده به عنوان کشت های محافظت کننده می باشند زیرا که به عنوان ارگانیسم های با منشأ غذایی مطرح هستند و از طرفی اداره غذا و داروی آمریکا (FDA) این باکتری ها را برای مصارف انسانی ایمن شناخته است (Castellano, et al., 2008). باکتری های اسیدلاکتیک طیف وسیعی از مواد ضد میکروبی مانند اسیدهای آلی،

هیدروژن پراکسیدها و باکتریوسین ها را تولید می کنند (Martinez et al., 2013). در بحث حفاظت از مواد غذایی باکتری های عامل فساد و پاتوژن های گرم منفی، به دلیل مقاومت ذاتی آن ها نسبت به تعدادی از عوامل ضد میکروبی از جمله باکتریوسین ها بسیار مورد توجه هستند (Deegan et al., 2006; Zendo, 2013). این مقاومت به دلیل غشای لیپوپلی ساکاریدی باکتری های گرم منفی است که هم چون سد از نفوذ باکتریوسین ها و تأثیر ترکیبات ضد میکروبی دیگر بر باکتری های گرم منفی جلوگیری می کنند (Naidu, 2002; Atef Yekta et al., 2010). بنابراین به منظور تأثیر عوامل ضد میکروبی بر باکتری های گرم منفی نیاز به تغییر در ساختار غشای بیرونی این باکتری ها با روش های مختلفی نظیر استفاده از گرما، منجمد کردن، فرایند فشار بالا و یا استفاده از مواد شلاته کننده (اتیلن دی آمین تتراستیک اسید) می باشد (Yethon and Whitfield, 2001). EDTA به عنوان شلاته کننده با منشأ غذایی با شلاته کردن کاتیون های دو ظرفیتی از جمله Ca^{2+} و Mg^{2+} سبب ناپایداری و تغییر نفوذپذیری غشای باکتری های گرم منفی می شود (Hancock and Alakomi et al., 2003). Rozek, 2002). تاکنون در چندین تحقیق تأثیر بازدارندگی لاکتوباسیلوس ها علیه میکروارگانیسم های عامل فساد و پاتوژن در شرایط آزمایشگاهی بررسی شده است (Brashears, 1998; Maragkoudakis et al., 2009). اما مطالعات کمی در ارتباط با تأثیر بازدارندگی لاکتوباسیلوس ها بر رشد میکروبی در گوشت تازه انجام یافته است (Muthukumarasamy, 2003) که این امر به دلیل پیچیدگی استفاده از بیوکترول ها در گوشت تازه می باشد (Koch, 2004). از جمله این پیچیدگی ها

به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه و در شرایط بی‌هوازی فعال شد. به منظور 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 انکوبه 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 به منظور تلقیح به گوشت از کلنی تک هر کدام از لاکتوباسیلوس‌ها در محیط MRS آگار به ۱۰ میلی‌لیتر MRS برات تازه انتقال و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۱۸ ساعت (به منظور تلقیح باکتری در فاز لگاریتمی) در شرایط بی‌هوازی انکوبه شدند. به منظور تهیه باکتری خالص نیز، محیط کشت‌های حاوی سلول‌های باکتری در ۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۶ درجه و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (SIGMA, Germany) گردیدند و بعد از دور ریختن مایع شناور رویی و جایگزین کردن آن با سرم فیزیولوژی (۰/۸۵٪) نمک طعام به منظور 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 $0/1 = OD_{600 \text{ nm}}$ نانومتر در سرم فیزیولوژی در مقدار تقریبی 10^7 CFU/ml تنظیم شد. (Neetoo et al., 2007) به منظور اطمینان از غلظت تعیین شده از سوسپانسیون حاصل تا رقت 10^{-6} رقت‌سازی و در محیط MRS آگار کشت داده شد که پس از شمارش غلظت باکتری‌ها در حدود $10^7 - 10^6$ بود.

می‌توان به حضور آنزیم‌های پروتئولیتیک به مقدار 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 به منظور تأثیرگذاری باید قادر به رقابت و غلبه بر این باکتری‌ها در طول دوره نگهداری گوشت باشند (Gonzalez, 2006; Anang, 2007). در تحقیقی سرعت فساد فرآورده گوشتی سنتی برزیلی (charqui) با استفاده از لاکتوکوکوس لاکتیس کاهش داده شد (Biscola et al., 2014). طبق گزارش‌ها کیفیت و ایمنی سوسیسم تخمیری با استفاده از لاکتوباسیلوس کورواتوس به عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک افزایش پیدا کرد (Casaburi et al., 2016). هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر لاکتوباسیلوس پلاننارم و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به صورت ترکیبی باهم و نیز همراه با EDTA بر ماندگاری گوشت چرخ‌کرده مرغ در دمای یخچال می‌باشد.

مواد و روش‌ها

- سویه‌های لاکتوباسیلوس با مشخصات

لاکتوباسیلوس پلاننارم (PTCC 1745) و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (PTCC 1643) به صورت لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون میکروارگانسیم‌های سازمان علمی - پژوهشی ایران خریداری شد و در MRS برات

- آماده سازی محلول EDTA

محلول استوک 500 mM EDTA با حل کردن 1/86 گرم از پودر نمک سدیم اتیلن دی آمین تترااستیک اسید در 10 سی سی آب مقطر دیونیزه قبل از اضافه کردن به نمونه ها و به صورت تازه تهیه شد و سپس تا غلظت 50 mM رقیق گردید. محلول حاصل با عبور از فیلتر 0/2 میکرومتر استریل شد و در نهایت از محلول 50 mM آن 500 میکرولیتر به ازای 100 گرم نمونه اضافه گردید (Hasapidou and Savvaidis, 2011).

- آماده سازی نمونه ها

مرغ خانگی (بدون آنتی بیوتیک) خریداری و در روز آزمایش کشتار شد. سینه مرغ همراه با پوست آن جداسازی و در کنار شعله و در شرایط استریل پوست کنی و چرخ شد. سپس به صورت 3 نمونه 100 گرمی در بسته های زیپ پک بسته بندی گردید. لازم به ذکر است که خود بسته ها چند ساعت قبل توسط اشعه UV استریل شده بودند. گروه های تحت مطالعه شامل:

1-C: (کنترل) حاوی گوشت چرخ شده مرغ

2-AP: گوشت چرخ کرده مرغ + لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس + لاکتوباسیلوس پلاننارم

3-APE: گوشت چرخ کرده مرغ + لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس + EDTA

غلظت نهایی لاکتوباسیلوس ها بعد از اضافه کردن به نمونه های 100 گرمی گوشت به ازای هر گرم گوشت 10⁵ cfu/g بود.

- روش انجام آزمایش میکروبی

10 گرم نمونه گوشت در یک کیسه استومیکر (Circulator 400 Seward England) قرار داده شد.

سپس 90 میلی لیتر محلول نمکی استریل 0/85 گرم در صد به آن اضافه و در استومیکر با شدت 200 بار در دقیقه به مدت یک دقیقه هموزن گردید (رقت 1/10). مرحله بعد رقت های متوالی در لوله های حاوی سرم فیزیولوژی (0/85 درصد) تهیه و در پلیت های حاوی محیط کشت تلقیح داده شدند.

1- کشت و شمارش باکتری های مزوفیل هوازی به روش کشت صفحه ای استاندارد در محیط PCA به مدت 24 ساعت و در دمای 37 درجه سلسیوس انجام گرفت (FDA, 2001).

2- کشت و شمارش کلی فرم ها به روش کشت صفحه ای استاندارد در محیط (VRBA) به مدت 24 ساعت و در دمای 37 درجه سلسیوس انجام گرفت (ISO, 2004).

3- کشت و شمارش باکتری های سرمادوست به روش کشت صفحه ای استاندارد در محیط PCA به مدت یک هفته و در دمای 7 درجه سلسیوس انجام گرفت (Rashisar et al., 2004; Kilinc et al., 2007) و بعد از شمارش تعداد باکتری به صورت log cfu/g گزارش شد.

- اندازه گیری pH

برای اندازه گیری pH مقدار 10 گرم نمونه در 90 میلی لیتر آب مقطر توسط دستگاه هموزنیزاتور (Ultra-turrax T25 IKa) با دور 1000 در دقیقه هموزنیزه شد و با وارد کردن الکتروود pH متر (HANNA, Portugal) در مخلوط، pH اندازه گیری شد (Masniyom et al., 2005).

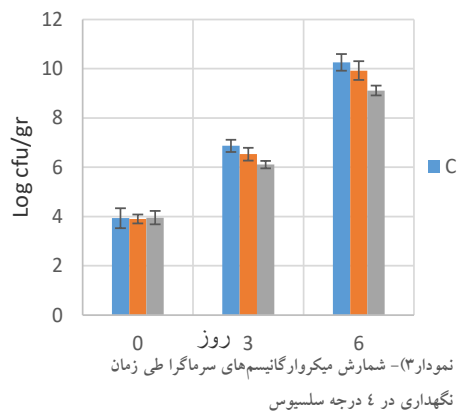
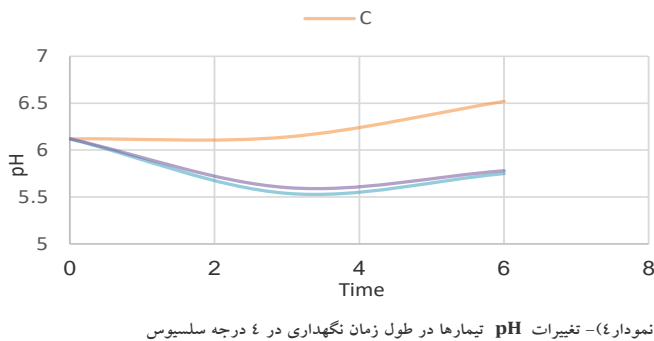
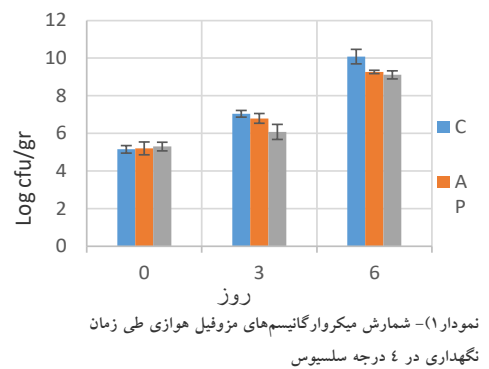
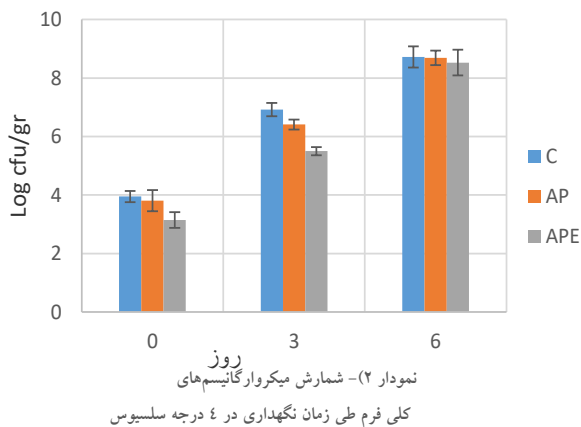
- تحلیل آماری

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 $(p < 0/05)$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میانگین لگاریتمی شمارش باکتری‌های مزوفیل هوازی، کلی‌فرم و سرمادوست در گروه‌های کنترل (C)،

لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس + لاکتوباسیلوس پلانترم (AP) و لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس + لاکتوباسیلوس پلانترم+EDTA (APE) طی سه روز آزمایش در مدت ۶ روز نگهداری در دمای یخچال به ترتیب در نمودارهای (۱)، (۲) و (۳) نشان داده شده است و تغییرات pH سه نمونه نیز در نمودار (۴) نشان داده شده است.



بحث و نتیجه‌گیری

به‌طور کلی در طول مدت نگهداری نمونه‌ها در دمای یخچال، فلورمیکروبی به‌طور معنی‌داری ($p < 0/05$)، 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 میکروارگانیزم‌ها 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 میکروارگانیزم‌ها بعد از ۳ روز نگهداری گوشت چرخ‌کرده مرغ در حدود ۴ 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 میکروارگانیزم‌ها در نمونه کنترل در روز سوم به‌میزان $10^6 \log \text{cfu/gr}$ رسید که به‌عنوان بالاترین حد مجاز میکروبی برای مواد غذایی توسط ICMFS در سال ۱۹۸۶ تعریف شده است (ICMFS, 1986). که با نتایج سایر محققین مطابقت داشت (Hasapidou and Savvaiddi, 2011; Mexis *et al.*, 2012). در روز سوم شمارش میکروارگانیزم‌های مزوفیل هوازی در سه نمونه اختلاف معنی‌داری داشتند ($p < 0/05$) به‌طوری که تعداد باکتری‌ها در نمونه AP و APE به‌ترتیب ۰/۲۵ و ۰/۹۶ 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 ($p < 0/05$) بین نمونه‌های AP و APE در مقایسه با نمونه کنترل بودیم به‌طوری که 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 ($p < 0/05$). علت اختلاف در تعداد باکتری‌های مزوفیل هوازی در روز سوم در نمونه‌های AP و APE در مقایسه با نمونه C می‌تواند به دلیل کاهش pH و تولید ترکیبات ضد میکروبی توسط لاکتوباسیلوس‌ها باشد (Caplice and Fitzgerald, 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 ضد میکروبی تولیدشده توسط لاکتوباسیلوس‌ها شده است. بر طبق نتایج سایر محققین نیز تیمار ترکیبی (500 IU/g Nisin و 50 EDTA 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 به علت تولید اسیدهای ارگانیک توسط لاکتوباسیلوس‌ها باشد که مسئول فعالیت ضد میکروبی 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 میکروارگانیزم‌های مزوفیل هوازی به‌دلیل استفاده از باکتری‌های لاکتیک در نمونه‌های گوشت کاهش پیدا کرد (Leroi, 2010);

جمعیت باکتری‌های کلی‌فرم نبودند و به‌منظور تأثیرگذاری بیشتر، استفاده ترکیبی از لاکتیک اسید باکتری‌ها با سایر عوامل حفاظتی پیشنهاد شد (Bomdespacho *et al.*, 2014; Patricia *et al.*, 2011). هم‌چنین نتیجه آزمایش کلی‌فرم‌ها با نتایج پیشین به‌دست آمده از استفاده ترکیبی EDTA و باکتریوسین تولید شده توسط لاکتوباسیلوس کورواتوس که سبب افزایش تأثیر بازدارندگی علیه باکتری اشرشیاکلی در محیط آزمایشگاهی شد مطابقت داشت (Belfiore *et al.*, 2007). میانگین لگاریتمی شمارش اولیه باکتری‌های سرما‌گرا برای ۳ نمونه AP، C و APE به‌ترتیب برابر با ۳/۹۳، ۳/۹۰، ۳/۹۵ واحد لگاریتمی بود که با نتایج کارهای پیشین مطابقت داشت (Murthy *et al.*, 1997). تعداد باکتری‌های سرما‌دوست در روز اول بین ۳ نمونه اختلاف معنی‌داری نداشتند ($p < 0/05$). در روز سوم تعداد باکتری‌های سرما‌دوست در ۳ نمونه اختلاف معنی‌داری نداشتند ($p < 0/05$). به‌طوری‌که تعداد باکتری‌ها در نمونه‌های AP و APE به‌ترتیب ۰/۳۴ و ۰/۷۶ نسبت به نمونه C کمتر بود و تعداد باکتری‌های سرما‌دوست در نمونه APE حدود ۰/۴۲ سیکل لگاریتمی کمتر از نمونه AP بود. در روز ششم نیز تعداد باکتری‌های سرما‌گرا در ۳ نمونه اختلاف معنی‌دار نداشتند ($p < 0/05$) به‌طوری‌که تعداد باکتری‌ها در نمونه AP و APE به‌ترتیب ۰/۳۴ و ۱/۱۵ سیکل لگاریتمی نسبت به نمونه C کمتر بود و دو نمونه APE و AP نیز به میزان ۰/۸۱ سیکل لگاریتمی اختلاف داشتند. نتایج شمارش باکتری‌های سرما‌گرا مشابه با نتیجه به‌دست آمده برای باکتری‌های مزوفیل‌هوازی بود. نتایج آزمایش با نتایج کارهای پیشین مطابقت

(Amani, 2012). در روز اول، لگاریتم تعداد باکتری‌های کلی‌فرم در گرم در تیمارهای AP، C و APE به‌ترتیب ۳/۹۵، ۳/۸۱، ۳/۱۵ بود که با نتایج تحقیقات پیشین مطابقت داشت (Patricia *et al.*, 2011). در روز اول تعداد باکتری‌های کلی‌فرم در ۳ نمونه اختلاف معنی‌داری نداشتند ($p < 0/05$). به‌طوری‌که تعداد کلی‌فرم‌ها در نمونه C بیشترین و در نمونه APE کمترین مقدار بود. از آنجایی‌که باکتری‌های کلی‌فرم به‌عنوان شاخص آلودگی مواد غذایی شناخته شده‌اند، تعداد بالای این باکتری‌ها در نمونه کنترل احتمالاً به‌دلیل افزایش آلودگی نمونه‌ها به هنگام کشتار و چرخ کردن می‌باشد. تعداد کم باکتری‌های کلی‌فرم در نمونه AP و APE نسبت به نمونه C احتمالاً به‌دلیل تولید ترکیبات ضد میکروبی و تأثیر توأم EDTA و ترکیبات ضد میکروبی بر این باکتری‌ها می‌باشد. در روز سوم تعداد باکتری‌های کلی‌فرم در نمونه AP و APE به‌ترتیب حدود ۰/۵ و ۱/۴۲ سیکل لگاریتمی کمتر از نمونه C بود و تعداد باکتری‌ها در نمونه APE نیز حدود ۰/۹ سیکل لگاریتمی کمتر از نمونه AP بود که این اختلاف به دلیل تأثیر سینرژیستی EDTA و لاکتوباسیلوس‌ها بر باکتری‌های گرم منفی از جمله کلی‌فرم‌ها می‌باشد. در روز ششم تعداد باکتری‌های کلی‌فرم در دو نمونه C و AP اختلاف معنی‌داری نداشتند در حالی‌که تعداد باکتری‌های کلی‌فرم در نمونه APE حدود ۰/۱۹ سیکل لگاریتمی کمتر از نمونه C و حدود ۰/۱۶ سیکل لگاریتمی کمتر از نمونه AP بود ($p < 0/05$). نتایج آزمایش با نتایج کارهای مشابه مطابقت داشت به‌طوری‌که در هر دو تحقیق لاکتوباسیلوس‌ها به‌تنهایی قادر به تأثیر چشمگیر بر

سرما دوست منجر به افزایش pH شده بود (Etemadian *et al.*, 2011; Latou *et al.*, 2013) pH نمونه AP و APE در روز سوم به ترتیب از $6/12 \pm 0/05$ به $5/60 \pm 0/1$ و $5/54 \pm 0/03$ کاهش یافت و در روز ششم به $5/78 \pm 0/07$ و $5/75 \pm 0/05$ رسید که کاهش pH به دلیل تولید اسید توسط لاکتوباسیلوس‌ها می‌باشد و با نتایج تحقیقات پیشین مطابقت دارد (Amani, 2012). هم‌چنین در کارهای مشابه قبلی تیمارهای حاوی لاکتوباسیلوس‌ها کاهش PH (0/95 تا 0/70 واحدی) نسبت به نمونه کنترل نشان دادند (Fadda *et al.*, 2008). عدم افزایش قابل ملاحظه pH در نمونه‌های AP و APE در مقایسه با نمونه C از روز سوم به بعد احتمالاً به دلیل حضور لاکتیک اسید باکتری‌ها می‌باشد به طوری که از طرفی به دلیل حضور لاکتوباسیلوس‌ها در گوشت اسید تولید می‌شود و از طرف دیگر به دلیل تجزیه پروتئین‌ها ترکیبات تولیدی اجازه کاهش pH را نمی‌داد این در حالی است که نمونه C چون فاقد لاکتیک اسید باکتری‌ها در دز بالا بود، تجزیه پروتئین‌ها باعث افزایش بیشتر pH شده است.

طبق نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر، لاکتوباسیلوس‌ها (سیدوفیلوس و پلانٹارم) با جمعیت ۵ واحد لگاریتمی همراه با محلول EDTA قادر به افزایش ماندگاری گوشت چرخ کرده مرغ در دمای یخچال حداقل به مدت یک روز بیشتر از نمونه کنترل بودند و به منظور تأثیرگذاری بیشتر استفاده از گوشت با بار میکروبی اولیه کم‌تر توصیه می‌شود.

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

میزان pH نمونه کنترل در روز سوم از $6/12 \pm 0/05$ به $6/14 \pm 0/05$ رسید و در روز ششم افزایش معنی‌داری نشان داد ($p < 0/05$) که علت آن می‌تواند به این دلیل باشد که چون در ابتدا باکتری‌های موجود در گوشت برای تغذیه از کربوهیدرات‌ها خصوصاً گلوکز استفاده کرده‌اند به دلیل تولید اسید pH گوشت تقریباً ثابت مانده است ولی با اتمام ذخایر کربوهیدراتی و از طرفی رشد سریع باکتری‌ها موجود در آن خصوصاً باکتری‌های سرما دوست، 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 که طبق نتایج آن‌ها افزایش تعداد میکروفلور طبیعی نمونه‌ها، خصوصاً باکتری‌های

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.
- Atefeyekta, 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. *Veterinárni 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 Fizgerald, 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 volatile 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.

- 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.
- 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.
- ISO (International Organization for Standardization), (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.
- Keokammerd, 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.

- 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.

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

*Eqttgurqpfkpi"cwvjqtøu"g o ckn<H0|g {pcnk B wt o kclcelkt
(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 $4 \pm 1^\circ\text{C}$ 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 1 day 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