افزایش زمان ماندگاری گوشت چرخ‌کرده مرغ با استفاده از لاکتوباسیلوس‌ها و اتیلن دی آمین تترااستیک‌اسید (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
(دریافت مقاله: ۹۵/٤/۸ پذیرش نهایی: ۹۵/٦/۲٤)

چکیده

باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌عنوان عوامل ضد میکروبی قادر به جلوگیری از رشد محدوده وسیعی از میکروارگانیسم های عامل فساد و پاتوژن‌های غذازاد می‌باشند. مطالعه حاضر جهت ارزیابی اثر ترکیبی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس پلانتارم* (10^6CFU/gr) و اثر توأم لاکتوباسیلوس‌ها و EDTA (50 mM) بر ماندگاری گوشت سینه مرغ انجام‌گرفته است. تیمارهای گوشت به سه گروه تقسیم شدند. بدون لاکتوباسیلوس‌ها و بدون EDTA، بالاکتوباسیلوس‌ها و بدون EDTA، با لاکتوباسیلوس‌ها و با EDTA. سپس تیمارها در دمای 4 ± 1 C° نگهداری شدند و هر ۳ روز یک‌بار جهت انجام آزمایش‌های میکروبیولوژیکی (مارش باکتری‌های مزوفیل هوازی، کلی فرم 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 ۱ 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 تترااستیک اسید

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 ضمن نسبت به گوشت گاو و خوک دارای مقادیر کم چربی می‌باشند (Ivanovic, 2005). از طرفی گوشت مرغ به دلیل ترکیب غنی مواد مغذی، pH بالا (۶/۵-۵/۵) و aw بالا (۰/۹۹-۰/۹۸) بسیار فسادپذیر است که این شرایط رشد و بقا تقریباً هرگونه میکروارگانیسمی 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 محافظت کننده‌های شیمیایی به دلیل ارتقاء بی‌سابقه سطح آگاهی و نگرانی مصرف‌کنندگان از مخاطرات احتمالی آن‌ها بر سلامتی انسان روزبه‌روز کاهش می‌یابد . دلیل این مدعا به خاطر 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 میکروارگانیسم‌های با منشأ غذایی مطرح هستند و از طرفی اداره غذا – دارو (FDA) آن‌ها را به‌عنوان ترکیبات ایمن برای مصارف انسانی به رسمیت 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 به دلیل مقاومت ذاتی آن‌ها نسبت به تعدادی از عوامل ضد میکروبی از جمله باکتریوسین‌ها بسیار مورد توجه هستند (Deegan *et al*., 2006؛Zendo, 2013). این مقاومت به دلیل غشای بیرونی لیپوپلی‌ساکاریدی باکتری‌های گرم منفی می‌باشد که همچون سدی از نفوذ باکتریوسین‌ها و تأثیر ترکیبات ضدمیکروبی دیگر بر باکتری‌های گرم منفی جلوگیری می‌کنند (Atef Yekta *et al*., 2010؛Naidu, 2002). بنابراین به‌منظور تأثیر عوامل ضدمیکروبی بر این باکتری‌ها نیاز به تغییر در ساختار غشای بیرونی این باکتری‌ها با روش‌های مختلفی همچون، استفاده از گرما، منجمد کردن، فرایند فشار بالا و یا استفاده از مواد شلاته کننده همچون اتیلن دی‌آمین تترااستیک اسید می‌باشد (Yethon and Whitfield, 2001).EDTA به عنوان شلاته کننده با منشأ غذایی با شلاته کردن کاتیون‌های دو ظرفیتی همچون ca^{2+} و Mg^{2+} سبب ناپایداری و تغییر نفوذپذیری غشای باکتری‌های گرم منفی می‌شود (Hancock and Rozek, 2002؛Alakomi *et al*., 2003). تاکنون در چندین تحقیق تأثیر بازدارندگی لاکتوباسیلوس‌ها علیه میکروارگانیسم‌های عامل فساد و پاتوژن در شرایط آزمایشگاهی بررسی‌شده است (Maragkoudakis *et al* ., 2009؛Brashears, 1998). ولی 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 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 به‌منظور تأثیرگذاری باید قادر به رقابت و غلبه بر این باکتری‌ها در طول دوره نگهداری گوشت باشند (Anang, 2007؛ Gonzalez, 2006). 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

Lactobacillus (*لاکتوباسیلوس پلانتارم*) *plantarum subs. plantarum* (PTCC 1745 DSM 20174) *Lactobacillus* (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*) *acidophilus*(PTCC 1643 DSM 20079) 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 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 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 انکوبه شدند. به‌منظور تهیه باکتری خالص نیز، محیط کشت‌های حاوی سلول‌های باکتری در ۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای $٦^{0}C$ و به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ (SIGMA 3K30Laboratory centrifuges-Germany) گردیدند و بعد از دور ریختن مایع شناور رویی و جایگزین کردن آن با سرم فیزیولوژی (۰/۸۵٪) 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 (6315JENWAY England) در $OD_{600}nm=0/1$ نانومتر در سرم فیزیولوژی در مقدار تقریبی $١٠^{٧}CFU/ml$ تنظیم شد. (Neetoo *et al*., 2007) به‌منظور 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 CFU/gr (10^6–10^7) بود.

- آماده‌سازی محلول EDTA

محلول استوک EDTA ۵۰۰mM با حل کردن ۱/۸۶گرم از پودر نمک سدیم اتیلن دی‌امین تترااستیک‌اسید در ۱۰ سی‌سی آب مقطر دیونیزه قبل از اضافه کردن به نمونه ها و به‌صورت تازه تهیه شد و سپس تا غلظت ۵۰mM رقیق گردید. محلول حاصل با عبور از فیلتر ۰/۲ میکرومتر استریل شد و درنهایت از محلول ۵۰mM آن ۵۰۰ میکرولیتر به ازاء 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 شد و در کنار شعله و در شرایط استریل پوست‌کنی و چرخ شد. سپس به‌صورت ۳ نمونه ۱۰۰ گرمی دربسته‌های زیپ پک 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

لازم به‌ذکر است که غلظت نهایی لاکتوباسیلوس‌ها بعد از اضافه کردن به نمونه‌های ۱۰۰ گرمی گوشت به ازاء هر گرم گوشت (10^5cfu/gr) 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 (0/85 gr/100 ml) به آن اضافه و در استومیکر در دور 200rpm 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 سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد انجام گرفت (rashisar *et al*., 2004 **;** Kilinc *et al*., 2007).

و بعد از شمارش تعداد باکتری به‌صورت log cfu/gr 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 HANA Instruments H 9023) Microcomputer pH Meter Made In

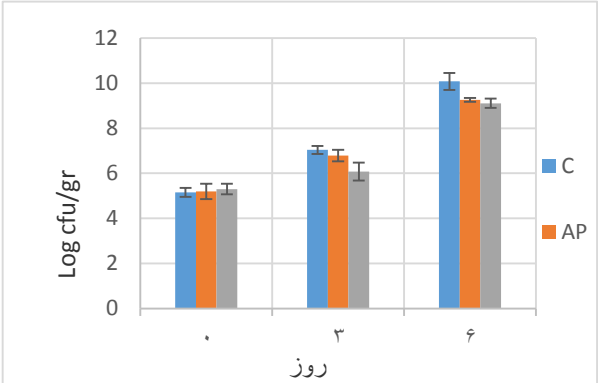
Portugal) در مخلوط، pH اندازه‌گیری شد (Masniyom *et al*., 2005).

- تحلیل آماری

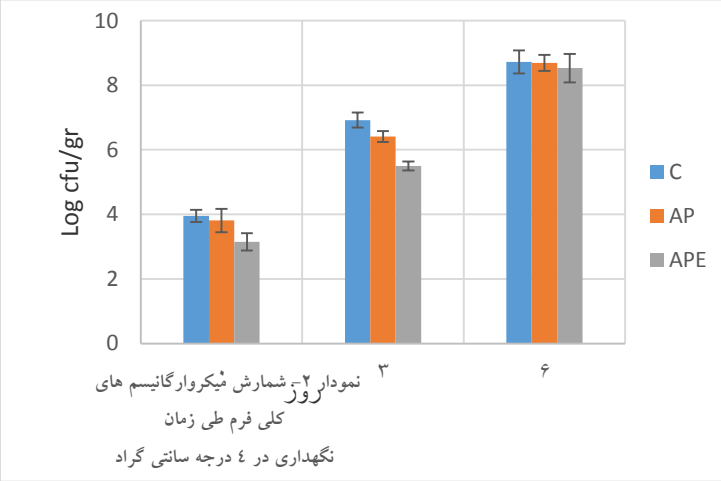
آزمایش‌های در کلیه مراحل با ۳ تکرار انجام گرفت و آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (version 16) و مقایسه میانگین با آزمون دانکن انجام شد و مقادیر ($p< ۰/۰۵$)، معنی‌دار در نظر گرفته شد. ضمناً داده‌ها در جدول و نمودار به‌صورت میانگین ± انحراف استاندارد ارائه شده است.

نتایج

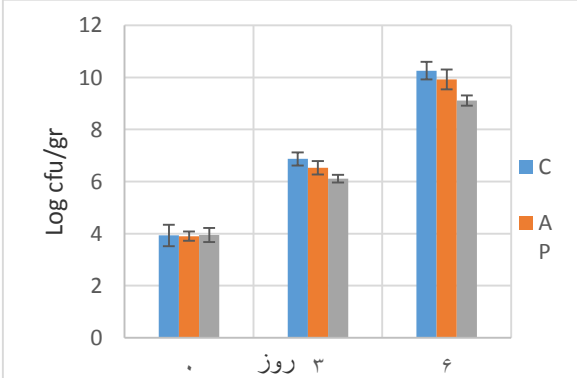
میانگین لگاریتمی شمارش باکتری‌های مزوفیل هوازی، کلی‌فرم و سرمادوست در گروه‌های کنترل (C)، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس + لاکتوباسیلوس پلانتارم* (AP) و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس + لاکتوباسیلوس پلانتارم*+EDTA (APE) طی سه روز آزمایش در مدت ٦ روز نگهداری در دمای یخچال $4\pm1^{0}C$ در نمودارهای (۱)، (۲) و (۳) نشان داده شده است و تغییرات pH سه نمونه نیز در نمودار (٤) نشان داده شده است.



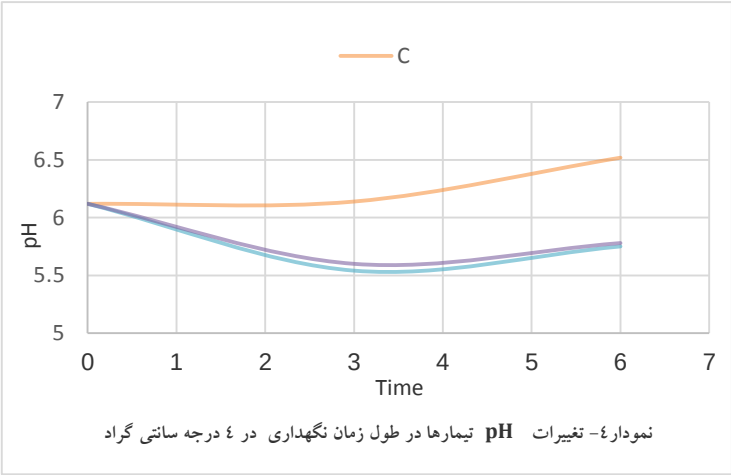
نمودار۱- شمارش میکروارگانیسم های مزوفیل هوازی طی زمان نگهداری در ٤ درجه سانتی گراد



نمودار۲- شمارش میکروارگانیسم های کلی فرم طی زمان نگهداری در ٤ درجه سانتی گراد



نمودار۳- شمارش میکروارگانیسم های سرماگرا طی زمان نگهداری در ٤ درجه سانتی گراد



نمودار٤- تغییرات pH تیمارها در طول زمان نگهداری در ٤ درجه سانتی گراد

بحث و نتیجه‌گیری

بـه‌طورکلی در طول مدت نگهداری نمونه‌ها در دمای یخچال، فلورمیکروبی به‌طور معنی‌داری (p<۰/۰۵)، در تمـام نمونه‌ها افزایش یافت که ســرعت این افزایش در نمونه‌های کنترل بیشــتر بود. در روز اول، لگاریتم تعداد بـاکتری‌هـای مزوفیـل هوازی در گرم (logcfu/gr) در نمونـه‌هـای APE,AP,C به‌ترتیب ۵/۱۵، ۵/۲۰ و ۵/۳۰ بود کـه بـا نتایج کارهای پیشــین برای شــمارش کلی میکروارگـانیســم‌ها در گوشــت چرخ‌کرده مرغ و گاو مطابقت داشــت (Amani, 2012؛Ismail *et al*., 2000). ولی از طرفی اختلاف با مقادیر گزارش شــده برای کارهای مشابه نیز مشاهده شد که بر طبق گزارش آن‌ها شمارش کلی میکروارگانیسـم‌ها بعد از ۳ روز نگهداری گوشت چرخ‌کرده مرغ در حدود 4 log cfu/gr بود (Keokamnerd *et al*., 2008). علـت این اختلاف می‌توانـد به دلیل افزایش بار میکروبی گوشـت به هنگام کشـتار، پوسـت‌کنی و چرخ کردن باشـد (Mead and Griffin,1998). شمارش کلی میکروارگانیسـم‌ها در نمونه کنترل در روز سوم به میزان ۷logcfu/gr رسید که به‌عنوان بالاترین حد مجاز میکروبی برای مواد غـذایی توســط ICMFS در ســال ۱۹۸٦ تعریف‌شــده اســت (ICMFS, 1986). که با نتایج ســایر محققین مطـابقـت داشــت (Mexis *et al*., 2012؛ Hasapidou and Savvaidi, 2011). در روز ســوم شــمارش میکروارگانیســم‌های مزوفیل هوازی در ســه نمونه اختلاف معنی‌داری داشـتند (p<۰/۰۵) به‌طوری که تعـداد باکتری‌ها در نمونه AP و APE به‌ترتیب ۰/۲۵ و ۰/۹٦ ســیکل لگاریتمی کمتر از نمونه C بود. هم‌چنین شـمارش 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 مقـایســه بـا نمونـه کنترل بودیم بـه‌طوری‌که تعداد بـاکتری‌هـا در نمونـه‌های AP و APE به‌ترتیب ۰/۸۲ و ۰/۹۷ سیکل لگاریتمی کمتر از نمونه C بود. ولی در روز شــشــم دو نمونـه AP و APE ازنظر آماری اختلاف معنی‌داری باهم نداشــتند (p<۰/۰۵). علت اختلاف در تعـداد بـاکتری‌هـای مزوفیـل هوازی در روز ســوم در نمونه‌های AP و APE در مقایسه با نمونه C می‌تواند به دلیل کاهش pH و تولید ترکیبات ضـد میکروبی توسـط لاکـتـوبـاســیـلـوس‌هـا بـاشــد (Caplice and Fizgernald,1999) و هم‌چنین تعـداد کم باکتری‌ها در نمونه APE نسبت به نمونه AP (۰,۷۱ سیکل لگاریتمی) در روز سوم نیز می‌تواند به علت اثر سینرژیستی EDTA و لاکتوباسـیلوس‌ها باشد به‌طوری که EDTA با تخریب غشـای باکتری‌های گرم منفی سبب نفوذپذیر شدن آن‌ها نسـبت به ترکیبات ضـد میکروبی تولیدشــده توسـط لاکتوباسـیلوس‌ها شده است. بر طبق نتایج سایر محققین نـیـز تـیـمـار تـرکـیـبـی Nisin (500IU/gr) و EDTA(50mM) بیشـترین تأثیر را در افزایش ماندگاری گوشــت مرغ در شــرایط اتمســفر تغییر یافته داشــت (Economou *et al*., 2009). کاهش بیشــتر pH در نمونه AP و نمونه APE نسبت به نمونه C در روز سوم می‌توانـد بـه علت تولید اسـیدهای ارگانیک توسـط لاکتوباسـیلوس‌ها باشـد که مسـئول فعالیت ضدمیکروبی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌باشـد (Makras *et al*., 2006). نتـایج آزمـایش با نتایج ســایر محققین نیز مطابقت داشت بگونه‌ای که سرعت رشد میکروارگانیسم‌های مزوفیـل هوازی بـه‌دلیـل اســتفاده از باکتری‌های لاکتیک در نمونه‌های گوشت کاهش پیدا کرد (Amani, 2012؛ Leroi, 2010). در روز اول، لگـاریتم تعداد باکتری‌های کلی‌فرم

در گرم (logcfu/gr) در تیمارهای C، AP 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 داشتند (p<۰/۰۵). به‌طوری که تعداد کلی‌فرم‌ها در نمونه C بیشترین و در نمونه APE کمترین مقدار بود. از آنجایی‌که باکتری‌های کلی فرم 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 کلی فرم در نمونه AP و APE نسبت به نمونه C احتمالاً به‌دلیل تولید ترکیبات ضدمیکروبی و تأثیر توأم EDTA و ترکیبات ضدمیکروبی بر این باکتری‌ها می‌باشد. در روز سوم تعداد باکتری‌های کلی فرم در نمونه AP و APE به‌ترتیب حدود ۰/۵ و۱/۴۲ 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 کلی فرم در دو نمونه C و AP اختلاف معنی‌داری نداشتند در حالی‌که تعداد باکتری‌های کلی فرم در نمونه APE حدود ۰/۱۹ سیکل لگاریتمی کم‌تر از نمونه C و حدود ۰/۱۶ سیکل لگاریتمی کمتر از نمونه AP بود (p<۰/۰۵). نتایج آزمایش با نتایج کارهای مشابه مطابقت داشت به‌طوری که در هر دو تحقیق لاکتوباسیلوس‌ها به‌تنهایی قادر به تأثیر چشمگیر بر جمعیت باکتری‌های کلی‌فرم نبودند و به‌منظور تأثیرگذاری بیشتر، استفاده ترکیبی از لاکتیک اسید باکتری‌ها با سایر عوامل حفاظتی پیشنهاد شد (Patricia *et al*., 2011؛ Bomdespacho *et al*., 2014). هم چنین 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 سرما گرا برای ۳ نمونه AP،C وAPE به‌ترتیب برابر با ۳/۹۳، ۳/۹۰، ۳/۹۵ 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<۰/۰۵). در روز سوم تعداد باکتری‌های سرمادوست در ۳ نمونه اختلاف معنی‌داری داشتند (p<۰/۰۵). به‌طوری که تعداد باکتری‌ها در نمونه‌های AP و APE به‌ترتیب ۰/۳٤ و ۰/۷٦ نسبت به نمونه C کمتر بود و تعداد باکتری‌های سرمادوست در نمونه APE حدود ۰/٤۲ سیکل لگاریتمی کمتر از نمونه AP بود. در روز ششم نیز تعداد باکتری‌های سرماگرا در ۳ نمونه اختلاف معنی‌دار داشتند (p<۰/۰۵) به‌طوری که تعداد باکتری‌ها در نمونه AP و APE به‌ترتیب ۰/۳٤ 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 مزوفیل هوازی بود. نتایج آزمایش با نتایج کارهای پیشین مطابقت داشت که بر طبق نتایج پیشین استفاده از لاکتیک اسید باکتری‌ها 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 نیزتعداد اولیه باکتری‌های سرمادوست حدود 2/8 log cfu/gr بود (Murthy *et al*., 1997؛ Dorn *et al*., 1989). pH نمونه کنترل در روز سوم از ۰/۰۵±۶/۱۲ به ۰/۰۵±۶/۱۴ رسید و در روز ششم افزایش معنی‌داری ($p<0/05$) ۰/۱±۶/۵۲ نشان داد که علت آن می‌تواند به این دلیل باشد که چون در ابتدا باکتری‌های موجود در گوشت برای تغذیه از کربوهیدرات‌ها خصوصاً گلوکز استفاده کرده‌اند به‌دلیل 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 که طبق نتایج آن‌ها افزایش تعداد میکروفلور طبیعی نمونه‌ها، خصوصاً باکتری‌های سرما دوست منجر به افزایش pH شده بود (Latou *et al*., 2013؛Etemadian *et al*). pH نمونه AP و APE در روز سوم به‌ترتیب از ۰/۰۵±۶/۱۲ به ۰/۰۳±۵/۵۴ و ۰/۱±۵/۶۰ کاهش یافت و در روز ششم به ۰/۰۵±۵/۷۵ و ۰/۰۷±۵/۷۸ رسید که کاهش pH به‌دلیل تولید اسید توسط لاکتوباسیلوس‌ها می‌باشد و با نتایج تحقیقات پیشین مطابقت دارد (Amani,2012). هم چنین 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 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 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 لاکتیک اسید باکتری‌ها در دز بالابود، تجزیه پروتئین‌ها باعث افزایش بیشتر pH شده است.

طبق نتایج به‌دست‌آمده از تحقیق حاضر، لاکتوباسیلوس‌ها (*اسیدوفیلوس و پلانتارم*) در دز ($10^5 \frac{cfu}{gr}$) 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 به‌منظور تأثیرگذاری بیشتر استفاده از گوشت با بار میکروبی اولیه کم‌تر توصیه می‌شود.

منابع

- Alakomi, H., Saarela, M., 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, Salem.(2012). Bio-Preservation Challenge for Shelf-Life and Safety Improvement of Minced Beef .Global Journal of Biotechnology & Biochemistry 7 (2): 50-60 .
- Anang ,D .,Rusul ,G., Bakar, J., 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 $4\pm1c^0$. Food Control ,18:961-9.
- Arashisar, S., Hisar, O., Kaya, M., 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., & 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., 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., & 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., 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 ,61:166-70.
- Buncic, S., Nychas, G. -J., Lee, M.R.F., Koutsoumanis, K., Hébraud, M., Desvaux, M., & Antic D. (2014).Microbial pathogen control in the beef chain: recent research advances. Meat Science,97(3), 288–297.
- Caplice, E. and G.F. Fizgernald.(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., & 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., & Villani, F. (2016). Technologic properties and bacteriocins production by Lactobacillus curvatus 54M16 and its us as starter culture for fermented sausage manufacture. Food Control, 59, 31-45.
- Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S., & Vignolo, G. (2008). A review of bacteriocinogenic lacti
- 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., & 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., & Ross, P. (2006). Bacteriocin: biological tools for biopreservation and shelf-life extension. International Dairy Journal, 16, 1058–1071.

- Dorn, P., P. Krabisch and H. Gehra, (1989). Investigations on *Salmonella* decontamination of broiler carcasses. Archiv fur Geflugelkunde, 53: 123-134.
- Economou ,T. N., Pournis, A., Ntzimani, I.N., Savvaidis.(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.,Yahyai,A.(1390) Effect of vacuum packaging on chemical,microbial and sensorial properties of white fish lion .Iranian Journal of Food Science and Thecnology,7(4)298-304.
- Fadda,s., Chambon,c. M., Champomier-Verge`s, R.,Talon,c.,Vignolo,G.(2008).Lactobacillus role during conditioning of refrigerated and vacuum-packaged Argentinean meat..Meat Science 79 , 603–610.
- FDA (U.S 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 Nutr. Soc., 64: 395-402.
- Gonzalez-Fandos, E., Dominguez, J.L.(2006). Efficacy of lactic acid against Listeria monocytogenes attached to poultry skin during refrigerated storage. J Appl Microbiol ,101:1331-9.
- Hancock, R., Rozek, A.(2002). Role of membranes in the activities of antibacterial cationic peptides. FEMS Microbiol. Lett. 206, 143–149.
- Hasapidou,A., Savvaidis,I.N.(2011).The effects of modified atmosphere packaging, EDTA and oregano oil on the quality of chicken liver. meatFood Research International 44 ,2751–2756 .
- ICMFS. (1986) (2nd ed.). International Commission on Microbiological Specifications for Foods, sampling for microbiological analysis: Principles and scientific applications,Vol. 2 Toronto: University of Toronto Press.
- Ismail, S. A. S., Deak, T., Abd El-Rahman, H. A., Yassien, M. A. M., & Beuchat, L. R.(2000). Presenceand changes in populations of yeasts on raw and processed poultry products stored at refrigerationtemperature. 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): colonycount method.
- Ivanović S, Baltić M, Sinovec Z, Stojanović Z (2005). Probiotic influence on acid number, acid degree and fatty acid content in chicke abdominal fatty tissue. Biotehnolo. Anim. Husbandry 21(5-6): 129-133.
- Jeevaratnam, K., M. Jamuna and A.S. Bawa.(2005). Biological preservation of foods-Bacteriocins of lactic acid bacteria. Indian J. of Biotechnol., 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., Cadun, A.(2007). Effects of phosphates treatment on the quality of frozen-thawed fish species. Journal of Muscle Foods, 20, 377-391.
- Koch A Granly.(2004). Biopreservation. In: Jensen WK, editor. Encyclopedia of meat sciences. Elsevier Ltd.; 2004. p. 68-74.
- Lambert, A.D., J.P. Smith and K.L. Dodds.(1991). Shelf life extension and microbiological safety of fresh meat. A review. Food Microbiology, 9: 267-297.
- Latou,E., S.F. Mexis, A.V. Badeka, S. Kontakos, M.G. Kontominas.(2013). Combined effect of chitosan and modified atmosphere packaging for shelf life extension of chicken breast fillets, Food Science and Technology ,doi: 10.1016/j.lwt.2013.09.010.
- Leroi, F., (2010). Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. Food Microbiol., 27: 698-709.

- Makras,L.,Triantafyllou,V.,Fayol-Messaoudi, D., Adriany, T.,Zoumpopoulou,G.,Tsakalidou,E.,Servin, A.,De Vuyst,L., (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 PE, Mountzouris KC, 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. Int J Food Microbiol;130:219-26.
- Martinez, F. A. C., Balciunas, E. M., Converti, A., Cotter, P. D., & Oliveira, R. P. S. (2013).Bacteriocin production by Bifidobacterium spp.: A review. Biotechnology Advances,31, 482–488.
- Masniyom, P., Soottawat, B., Visessanguan, W., (2005), Combination effect of phosphate and modified atmosphere on quality an.d shelf-life extension of refrigerated seabass slices. Journal of Food Science and Technology, 38, 745-756.
- Mead, P.S. and P.G. Griffin, (1998). *Escherichia coli* O: H. The Lancet, pp: 352.
- Mexis,S.F؛ E. Chouliara, M.G. Kontominas .(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. Kesava and C. Natarajan 1997. Effect of Lactococcus lactis var lactis bivar, diacetylactis on bacterial counts, pH and total acidity of minced goat meat during refrigerated storage. Meat Sci., 47: 231-236.
- Muthukumarasamy, P., J.H. Han and R.A. Holley, (2003). Bactericidal effects of *Lactobacillus reuteri* and allyl isothiocyanate on *Escherichia coli* O157:H7 in refrigerated ground beef. J. Food Prot., 66(11): 2038-44.
- Naidu, A. S. (2002). Activated lactoferrin-a new approach to meat safety. Food Technology,56, 40–45.
- Neetoo, H., M. Ye, H. Chen, R.D. Joerger, D.T. Hicksand D.G. Hoover, (2007). Use of nisin-coated plasticfilms to control Listeria monocytogenenes onvacuum-packaged cold-smoked salmon. Int. J. FoodMicrociol., 29(122): 8-15.
- Patricia, C., C, Belfiore., G,Vignolo.(2011).Combination of bioprotective cultures with EDTA to reduce Escherichia coli O157:H7 in frozen ground-beef pattiesFood Control 22 ,1461-1465.
- Yethon, J., Whitfield, C. (2001). Lipopolysaccharide as a target for the development of novel therapeutics in Gram-negative bacteria. Curr.Drug Targets Infect. Disord. 1, 91–106.
- Zendo, T. (2013). Screening and characterization of novel bacteriocins from lactic acid bacteria
- Bioscience,Biotechnology, and Biochemistry, 77,893-899.

Increasing shelf life of minced chicken breast using lactobacilluses and EDTA

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

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

*Corresponding author: E-mail:F.zeynali@urmia.ac.ir
(Received: 2016/6/28 Accepted: 2016/9/14)

Abstract

Lactobacilli are known to have an inhibitory effect against the growth of a wide range of food spoilage and food borne pathogens. The present study was conducted to evaluate the combined effect of *lactobacillusAcidophilus+lactobacillus Plantarum* $\left(10^5 \frac{cfu}{gr}\right)$ Also, the combined effect of lactobacillus plus EDTA (50mM) on the shelf life of chicken breast. Treatments were separated into three groups :1-without lactobacillus and EDTA(C).2- with lactobacillus without EDTA (AP).3-with lactobacillus and EDTA (APE). Samples were stored at $4 \pm 1°c$ and evaluated periodically for microbiological counts (aero(c mesophilic , coliforms and psychrotrophic). Microbial analysis indicated that the use of lactobacilluses and lactobacilluses with EDTA had significant effects ($p< 0/05$) in reducing the mesophilic, coliform and psychrotrophic counts, with at least 1day extension of shelf life. Treatments with lactobacilluses and lactobacilluses + EDTA showed lower PH values than control sample. The results showed that application of lactobacilluses with EDTA in compared with combined lactobacilluses had more effect in reducing the growth of spoilage bacteria during refrigerated storage.

Conflict of interest: None declared.

Key words: lactobacillus, chicken meat, EDTA