

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 پلاتتارم (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. 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 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 (۶/۵-۵/۵) و aw بالا (۰/۹۸-۰/۹۹) 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 آنها 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 آنها 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

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 برات 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 ۶ درجه و به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (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 $OD_{600\text{ nm}}=0.1$ نانومتر در سرم فیزیولوژی در مقدار تقریبی 10^7 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 10^7 - 10^6 بود.

می‌توان به حضور آنزیم‌های پروتئولیتیک به‌مقدار زیاد در گوشت تازه اشاره کرد که سبب تجزیه باکتریوسین‌ها و کاهش فعالیت ضد میکروبی کشت‌های محافظت‌کننده 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 فرآورده 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 پلاننارم 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 پلاننارم (PTCC 1745) و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (PTCC 1643) به‌صورت لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون میکروارگانسیم‌های سازمان علمی - پژوهشی ایران خریداری شد و در MRS برات به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه و در شرایط

- آماده سازی محلول EDTA

محلول استوک ۵۰۰ mM EDTA با حل کردن ۱/۸۶ گرم از پودر نمک سدیم اتیلن دی‌امین تترااستیک‌اسید در ۱۰ سی‌سی آب مقطر دیونیزه قبل از اضافه کردن به نمونه‌ها و به صورت 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).

- آماده سازی 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 به صورت ۳ نمونه ۱۰۰ گرمی در بسته‌های زیپ‌پک بسته‌بندی گردید. لازم به ذکر 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 چرخ کرده مرغ + لاکتوباسیلوس / اسیدوفیلوس + لاکتوباسیلوس پلانترام

۳- APE: گوشت چرخ کرده مرغ + لاکتوباسیلوس / اسیدوفیلوس + 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 به مدت 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 به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انجام گرفت (FDA, 2001).

۲- کشت و شمارش کلی‌فرم‌ها به روش کشت صفحه‌ای استاندارد در محیط (VRBA) به مدت ۲۴ 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 به مدت یک هفته و در دمای ۷ 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 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 وارد کردن الکتروود pH متر (HANNA, Portugal) در مخلوط، pH اندازه‌گیری شد (Masniyom et al., 2005).

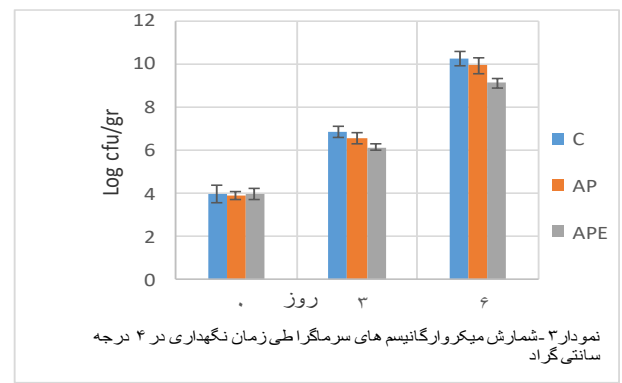
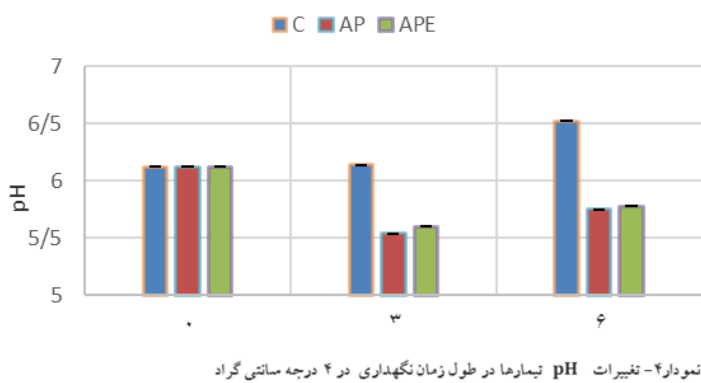
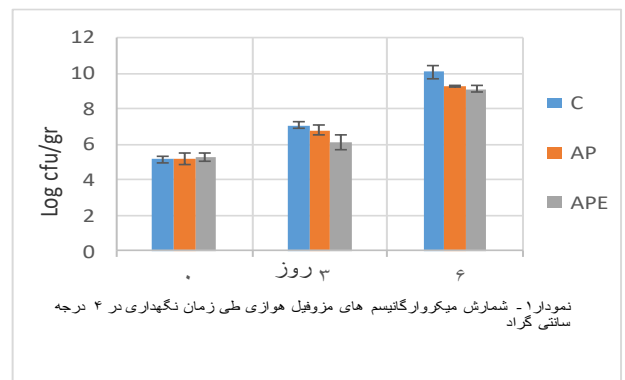
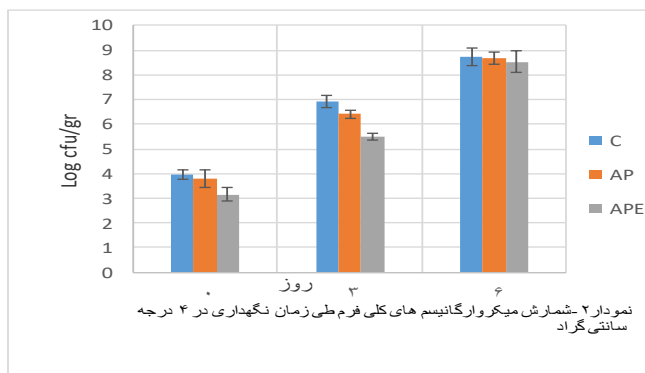
- تحلیل آماری

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 ($p < 0/05$)، 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 به ترتیب 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 ۴ واحد لگاریتمی در گرم بود (Keokammerd et al., 2008). علت این اختلاف می‌تواند به دلیل افزایش بار میکروبی گوشت به‌هنگام کشتار، پوست‌کنی و چرخ کردن باشد (Mead and Griffin, 1998). شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در نمونه کنترل در روز سوم به میزان $7 \log \text{ cfu/g}$ رسید که به‌عنوان بالاترین حد مجاز میکروبی برای مواد غذایی توسط ICMFS بوده و (ICMFS, 1986) با نتایج سایر محققین مطابقت داشت (Hasapidou and Savvaïdi, 2011; Mexis et al., 2012). در روز سوم شمارش میکروارگانیسم‌های مزوفیل هوازی در سه نمونه اختلاف معنی‌داری داشتند ($p < 0.05$) به‌طوری که تعداد باکتری‌ها در نمونه AP و APE به ترتیب 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 به‌طوری‌که تعداد باکتری‌ها در نمونه‌های AP و APE به ترتیب 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 Fizgerald, 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 گردیده است. بر طبق نتایج سایر محققین، تیمار ترکیبی (500 IU/g) Nisin 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 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 میکروارگانیسم‌های مزوفیل هوازی به دلیل استفاده از باکتری‌های لاکتیک در نمونه‌های گوشت کاهش پیدا

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/شرشیاکولای 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 و 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

کرد (Leroi, 2010; Amani, 2012). در روز اول، لگاریتم تعداد باکتری‌های کلی‌فرم در گرم در تیمارهای AP، C، و APE به‌ترتیب ۳/۹۵، ۳/۸۱ و 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 ($p < 0.05$). 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 به‌دلیل 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

داشت که بر طبق نتایج پیشین استفاده از باکتری‌های لاکتیکی به‌منظور 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 به‌دلیل نگره‌داری 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 پروتولیز 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 $6/12 \pm 0/05$ به $6/14 \pm 0/05$ رسید و در روز ششم افزایش معنی‌داری نشان داد ($p < 0/05$) که علت آن می‌تواند 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).

مقدار pH نمونه AP و APE در روز سوم به‌ترتیب از $6/12 \pm 0/05$ به $5/54 \pm 0/03$ و $5/60 \pm 0/01$ کاهش یافت و در روز ششم به $5/75 \pm 0/05$ و $5/78 \pm 0/07$ 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 ($0/95$ تا $0/70$ 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 بالا بود، تجزیه پروتئین‌ها باعث افزایش بیشتر pH شده است.

طبق نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر، لاکتوباسیلوس‌ها (سیدوفیلوس و پلاتنارم) با جمعیت ۵ واحد لگاریتمی همراه با محلول EDTA قادر به افزایش ماندگاری گوشت چرخ‌کرده مرغ در دمایی یخچال حداقل به‌مدت 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. 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. *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. [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 Savvaiddis, 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.
- 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. M.Sc Student of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

2. Associate Professor of Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

3. Associate professor of Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

*Corresponding Author's E.mail: 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 $4 \pm 1^\circ\text{C}$ 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 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