Archive of SID

بررسی و تعیین حداقل غلظت بازدارندگی(*MIC*) دی استات سدیم بر برخی از میکروارگانیسم های عامل فساد در نوشابه های گازدار در محیط کشت

ماندانا پهلوانی[1]، سید محمدعلی موسوی[2]، زهره حمیدی اصفهانی[3*]، ناصرصداقت[4]، فخری شهیدی[5]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
2- دانشیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی،دانشگاه تهران
3- دانشیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس
4- استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
5- استاد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(تاریخ دریافت: 88/2/26 **تاریخ پذیرش**:88/10/13)

چکیده

دی استات سدیم از گروه مواد نگهدارنده شیمیایی و ایمن بوده و به عنوان بازدارنده کپک و مخمر و برخی باکتری‌هامعرفی شده است. .در این تحقیق اثر ضد میکروبی دی استات سدیم در جلوگیری از رشد برخی از میکروارگانیسم های عامل فساد نوشابه های گاز دار در محیط کشت با استفاده از روش حساسیت رقت های مایع مورد بررسی قرار گرفته است. در مورد مخمر ***Saccharomycess cerevisiae*** در تعداد 10، 10^2، 10^3،10^5 مخمر در هر میلی لیتربه ترتیب غلظت های ppm 156،313،1250،5000 دی استات سدیم به عنوانMIC شناخته شد.در مورد مخمر ***Candida krusei*** در تعداد10، 10^2، 10^3،10^5 مخمردر هر میلی لیتر به ترتیب غلظت های ppm 625،1250،2500،5000 دی استات سدیم به عنوانMIC شناخته شد. در مورد باکتری ***Leuconostoc mesenteroides*** در تعداد 10^2 ،10^4 باکتری در هر میلی لیتربه ترتیب غلظت های ppm 2500،5000 دی استات سدیم به عنوان MIC شناخته شد. در مورد باکتری ***Lactobacillus delbrukii***درتعداد10^2باکتری در هر میلی لیتر غلظت 2500ppm دی استات سدیم به عنوانMIC شناخته شد. در مورد کپک ***Aspergillus niger*** در کلیه رقت های تهیه شده از سوسپانسیون هاگ کپک ودر حضورغلظت های مختلف از دی‌استات سدیم رشد مشاهده شد. در نتیجه هیچ غلظتی به عنوانMIC انتخاب نشد. نتایج نشان داد که دی استات سدیم دارای خواص بازدارندگی برروی مخمرها و باکتری های مورد بررسی بوده و فاقد تاثیر بازدارندگی بر روی کپک ***Aspergillus niger*** است.

کلید واژگان: دی استات سدیم، حداقل غلظت بازدارندگی، نگهدارنده، نوشابه های گاز دار.

* مسئول مکاتبات: hamidy_z@modares.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

1- مقدمه

یکی از روش های نگهداری مواد غذایی که معمولا به صورت افزودنی مورد استفاده قرار می‌گیرد استفاده از مواد شیمیایی است. طی سال های اخیر نگرانی مصرف کنندگان در مورد مواد غذایی حاوی نگهدارنده های شیمیایی و تمایل آن ها به خرید و مصرف مواد غذایی با کیفیت بالا و سالم افزایش پیدا کرده است [1،2].

یکی از دغدغه های مصرف کنندگان نوشابه های گاز دار وجود بنزوات سدیم به عنوان نگهدارنده در این محصولات می باشد. تحقیقات نشان داده اند که مواد با منشا طبیعی و ایمن نیز می توانند از نظر قدرت نگهدارندگی معادل با بنزوات سدیم باشند[3]. در نوشیدنی‌های حاوی ویتامین C بنزوات سدیم با اسید اسکوربیک ترکیب شده و تولید ترکیبات بنزنی می‌نماید. بنزوات سدیم باعث آسیب سلولی، تراوش مواد از سلولها، سیروز کبد، پانکرسیون بیماریهای دژنره می‌شود و می‌تواند به DNA موجود در میتوکندریها آسیب برساند[4،5].

گزارش های موجود نشان می دهد که با توجه به شباهت ساختاری بنزوات سدیم و دی استات سدیم، دی استات سدیم می‌تواند جایگزینی مناسب برای بنزوات سدیم باشد. چون فقط با تعویض حلقه بنزنی با گروه متیل نه تنها خاصیت نگهدارندگی از بین نرفته بلکه خاصیت سرطان زایی بنزوات نیز حذف گردیده است[6].

دی‌استات‌سدیم (SDA) با نام تجاری آلویتا جزء مواد"GRAS"[1] طبقه بندی شده و تا کنون اثر منفی برای آن گزارش نگردیده است. این ماده آمیخته‌ای از استات سدیم واسید استیک است که حاوی 42/25 درصد استیک اسید قابل دسترس می‌باشد. میزان حداکثر مصرف دی استات سدیم برابر با 4960 میلی گرم در کیلو گرم وزن بدن است [7،8]. حد مجاز این نگهدارنده برای غذاهای مختلف شامل :محصولات نانوایی و کیک ها1000-4000 ppm، چربی ها و روغن ها1000 ppm، محصولات گوشتی 1000- 3000 ppm، سس ها و آبمیوه ها 600-2500 ppm، غذا های حجیم شده و سوپ‌ها 500 ppm پیشنهاد شده است[7،8].

دی استات سدیم در بدن انسان و حیوانات به آب ، سدیم و CO_2 تجزیه می شود و از طریق کانالهای طبیعی بدن دفع می‌شود و هیچ ماده ای ناشی از متابولیسم آن در بدن باقی نمی‌ماند. از این ترکیب بعنوان بازدارنده کپک و مخمر و بعضی از باکتری ها (به خصوص باکتری های گرم مثبت)، بافر، اسیدی کننده، نگهدارنده، کمپلکس دهنده و تثبیت کننده استفاده می شود[8-10].

بر طبق گزارش های موجود دی استات سدیم جهت جلوگیری از رشد لیستریا مونوسیتوژنز[2] درسطح 2000 ppm درمحصول های گوشتی، طیروماهی بررسی شده است. هم چنین جهت جلوگیری از رشد اشرشیا کلی[3]، کلستریدیوم پرفنجنس4 وتعدادی از باکتری های گرم منفی و بیماری‌زا در سطح 1000 ppmمحصول های گوشتی بررسی شده است [11-17].

در ایران تاثیر نگهدارندگی و بازدارندگی این ماده تا کنون در نان، خاویار، ذرت و پنیر بررسی شده است[18-21]. در این تحقیق کمترین حد بازدارندگی دی استات سدیم (MIC)[5] در برابر برخی از میکروارگانیسم های عامل فساد در نوشابه های گاز داربررسی شدند[28،29]. با این روش، می‌توان در شرایط آزمایشگاهی، حداقل غلظت بازدارنده یک نگهدارنده یا مخلوطی از چند نگهدارنده را در شرایطی که هنوز به فرآورده اضافه نشده است در مقابل میکروارگانیسم های موردنظر تعیین کرد[22-25].

تا کنون تحقیقی در مورد تاثیر دی استات سدیم به عنوان نگهدارنده در نوشابه ها و نیز کمترین حد بازدارندگی این ماده (MIC) در محیط کشت بر روی میکروارگانیسم های مورد بررسی گزارش نشده است. بنابراین با توجه به مضرات بنزوات سدیم انجام این تحقیق می تواند گامی در جهت تولید نوشیدنی های سالم باشد.

1. Generally Recognized as Safe

2 *Listeria monocytogenes*
3. *Eshershia coli*
4. Clostridium perfringens
5. *Minimum Inhibitory Concentration*

www.SID.ir

Archive of SID

2ـ مواد و روش ها

2ـ1ـ تهیه رقت های دی استات سدیم

پودر دی استات سدیم از نمایندگی شرکت (Niacetکانادا) حاوی 60٪ استات سدیم و40% اسید استیک تهیه گردید. جهت تهیه رقت های دی استات سدیم از محیط کشت مایع تریپتون سوی براث1 (Merck آلمان) استفاده گردید. اولین رقت تهیه شده حاوی 5000 ppm دی استات سدیم بود که توسط صافی 0/2 میکرون Whathman سترون گردید و 1 میلی لیتر از آن در لوله آزمایش ریخته شد. سپس توسط محیط کشت تریپتون سوی براث رقیق‌سازی متوالی صورت گرفت به گونه ای که در هر سری آزمایش 6 لوله حاوی 1 میلی لیتررقت های متوالی 5000، 2500، 1250 ، 625، 313، 156 ppm تهیه گردید. 2 لوله جهت شاهد + و - که فقط حاوی محیط کشت بودند در نظر گرفته شد(مجموعا 8 لوله). کلیه آزمایشات در سه تکرار انجام گردید[23،22].

لازم به ذکر است که در این آزمایش شاهد مثبت، نمونه بدون دی‌استات سدیم و حاوی میکروارگانیسم مربوطه است و بیانگر این است که میکروارگانیسم مورد نظر در محیط کشت موردنظر قادر به رشد می‌باشد و شاهد منفی که نمونه بدون دی‌استات سدیم و فاقد میکروارگانیسم است، بیانگر این است که در حین کار، میکروارگانیسم آلوده‌کننده حضور نداشته است[23].

2-2- میکروارگانیسمهای مورد استفاده وروش نگهداری آن‌ها

Colony forming unit per mililiter

میکروارگانیسم های مورد آزمایش از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران (مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های ایران) تهیه گردید که شامل: *Saccharomyces cerevisiae PTCC5269*، *Candida krusei PTCC5295*، *Leuconostoc mesenteroides subs. mesenteroides PTCC1591*، *Lactobacillus delbrukii PTCC1333* و *Aspergillus niger PTCC5010* می‌باشند.

مخمرو کپک روی محیط یست مالت آگار[2] شیب دار(Merck آلمان) کشت داده شده و در دمای 4 درجه سانتی گراد نگهداری شدند. به منظور حفظ قابلیت زیستی مخمر و کپک، هر بیست روز کشت مجدد آن ها صورت گرفت. باکتری ها روی محیط ام آر اس آگار[3] (Merck آلمان) به صورت شیب دار کشت داده شده و هردو هفته کشت مجدد آن ها صورت گرفت[24] .

2-3-تهیه سوسپانسیون باکتری ها و مخمرها و هاگ قارچ

جهت تهیه سوسپانسیون مخمر و باکتری با استفاده از حلقه کشت سترون، از کشت تازه (24 ساعت) مخمرها ی رشد کرده روی محیط یست مالت آگارو باکتری های رشد کرده روی محیط ام آر اس آگار به لوله حاوی آب پپتونه[4] سترون انتقال داده شد و به خوبی مخلوط گردید. کدورت سوسپانسیون حاصل باید به میزانی باشد که جذب نوری آن در طول موج 625 نانومتر 0/08-0/1شود و این کدورت معادل تقریبا 1×10^7 مخمر و1×10^8باکتری در هر میلی لیتر (Cfu/ml)[5] است[26،23،22].

جهت تهیه سوسپانسیون هاگ قارچ از محلول نمکی پلی سوربات[6] استفاده گردید. سوسپانسیون حاصل را با استفاده از صافی غشایی غیر جاذب سترون(Whathman) صاف نموده و تعداد هاگ های آن را با استفاده از لام شمارش سلول های خونی شمارش گردید تعداد هاگ ها باید 1×107 هاگ در هر میلی لیتر باشد[23،22].

سپس رقیق سازی متوالی سوسپانسیون مخمروباکتری توسط آب پپتونه و رقیق سازی هاگ قارچ توسط محلول نمکی پلی سوربات صورت گرفت. از هر کدام از رقت ها مربوط به هر میکروارگانیسم به اندازه 1 میلی لیتربه 8 لوله (حاوی1 میلی لیترمحیط کشت و نگهدارنده) اضافه گردید. بدین صورت در

1. YMA
2. MRS Agar
3. Pepton Water
4. Colony forming unit per mililiter
5. Salin and Polysorbate
6. Trypton Soy Broth

www.SID.ir

Archive of SID

نهایت هر لوله حاوی 2 میلی لیتر محیط کشت و نگهدارنده و سوسپانسیون میکروارگانیسم است[25،22].

سپس لوله های حاوی مخمر در دمای 25-22 درجه سانتی گراد به مدت 48 تا 72 ساعت و لوله های حاوی باکتری در دمای 32ـ35درجه سانتی گراد به مدت 24ـ48 ساعت و لوله های حاوی هاگ قارچ در دمای 25-22 درجه سانتی گراد به مدت72-120 روز گرمخانه گذاری شد[24].

پس از گذشت مدت زمان گرمخانه گذاری لوله ها از نظر کدورت حاصل از رشد میکروارگانیسمها بررسی شدند.کدورت حاصل از رشد با لوله های کنترل مقایسه گردید.در هر سری از لوله ها بالاترین رقتی از نگهدارنده (یعنی حاوی کمترین غلظت از نگهدارنده) که در آن رشد مشاهده نشود، حداقل غلظت بازدارنده (MIC) محسوب می شود. سپس کشت از اولین لوله شفاف (عدم رشد میکروارگانیسم) و لوله‌های آزمایش بعد از آن در محیط‌های کشت مناسب صورت گرفت. رشد میکروارگانیسم مربوطه بیانگر این است که غلظت ماده موردنظر مانع از رشد شده است (MIC) ولی نتوانسته است میکروارگانیزم‌ها را از بین ببرد[27،25،22].

3-نتایج و بحث

3-1- تاثیر بازد ارندگی دی استات سدیم بر مخمر *Saccharomycess cerevisiae*

در تعداد107 از مخمر Saccharomycess cerevisiae مورد استفاده، در حضور غلظت‌های به کار گرفته شده از دی‌استات سدیم تمام مخمرها رشد کردند. در نتیجه در حضور این تعداد مخمر هیچ غلظتی به عنوان MIC شناخته نشد. در نتیجه سوسپانسیون مخمر به نسبت 1 به 100 رقیق شد تا به تعداد 105 مخمر در هر میلی‌لیتر رسید در این تعداد از مخمر غلظت‌های 156 ppm ، 313، 625، 1250، 2500 دی استات سدیم قادر به پیشگیری از رشد مخمر نبوده‌اند در نتیجه اولین لوله شفاف، یعنی غلظت 5000ppm به عنوان MIC انتخاب شد[23،22]. با کاهش تعداد مخمرها به 103 غلظت 1250ppm و 2500 بازدارنده شدند (MIC). با رساندن تعداد به 10^2 غلظت 313ppm نیز خاصیت بازدارندگی نشان داد (MIC). با رساندن غلظت سوسپانسیون مخمر به 10^1 حتی غلظت156 ppm دی‌استات سدیم نیز خاصیت بازدارندگی را نشان داد (MIC).

جدول 1 نتایج MIC رقت های مختلف دی استات سدیم(ppm)و سطح های مختلف تلقیح (Cfu/ml) مخمر *Saccharomycess cerevisiae*

Yeast / SDA[1]	1×10^1	1×10^2	1×10^3	1×10^5	1×10^7
156	−	+	+	+	+
313	−	−	+	+	+
625	−	−	+	+	+
1250	−	−	−	+	+
2500	−	−	−	+	+
5000	−	−	−	−	+

این نتیجه با نتایج سایر تحقیقات در مورد خاصیت بازدارندگی و نگهدارندگی دی استات سدیم در برابر سایر میکروب های عامل فساد در محیط کشت مطابقت داشت [17،11] .هم چنین نشان داد که با پایین آمدن تعداد مخمر به مقدار کمتری از ماده نگهدارنده نیازاست[17،16،14،13].

3-2- تاثیر بازد ارندگی دی استا ت سدیم بر مخمر *Candida krusei*

در تعداد10^7 از مخمر *Candida krusei* مورد استفاده ، در حضور غلظت‌های به کار گرفته شده از دی‌استات سدیم تمام مخمرها رشد کردند. در نتیجه در حضور این تعداد از مخمر هیچ غلظتی به عنوان MIC انتخاب نشد. در تعداد 10^5 مخمر در هر میلی‌لیتر به جز غلظت 5000ppm از دی‌استات سدیم بقیه غلظت‌ها قادر به پیشگیری از رشد مخمر نبوده‌اند در نتیجه اولین لوله شفاف، یعنی غلظت 5000ppm به عنوان MIC انتخاب شد. با کاهش تعداد مخمر به 10^3 غلظت 2500ppm بازدارنده شد (MIC). با رساندن به تعداد 10^2 غلظت 1250 نیز بازدارنده شد. در تعداد 10^1 مخمر در هر

1. Sodium Diacetate

www.SID.ir

Archive of SID

میلی‌لیتر غلظت 625ppm اولین لوله شفاف و به عنوان MIC انتخاب شد.

جدول 2 نتایج MIC رقت های مختلف دی استات سدیم (ppm) و سطح های مختلف تلقیح (Cfu/ml) مخمر *Candida krusei*

Yeast / SDA	1×10^{1}	1×10^{2}	1×10^{3}	1×10^{5}	1×10^{7}
156	+	+	+	+	+
313	+	+	+	+	+
625	−	+	+	+	+
1250	−	−	+	+	+
2500	−	−	−	+	+
5000	−	−	−	−	+

3-3- تاثیر بازد ارندگی دی استا ت سدیم در حضور باکتری *Leuconostoc mesenteroides*

در تعداد 10^{6} و 10^{8} از باکتری Leuconostoc mesenteroides مورد استفاده، در حضور غلظت های به کار گرفته شده از دی استات سدیم، تمام باکتری ها رشد کردند. در نتیجه در حضور این تعداد از باکتری ها هیچ غلظتی به عنوان MIC انتخاب نشد. در تعداد 10^{4} باکتری در هر میلی لیتربه جز غلظت5000 ppm دی استات سدیم بقیه غلظت ها قادر به پیشگیری از رشد باکتری نبوده اند در نتیجه اولین لوله شفاف یعنی 5000 ppm به عنوان MIC انتخاب شد. با کاهش تعداد باکتری به 10^{2} در هر میلی لیتر غلظت2500 ppm نیز بازدارنده شد (MIC). این نتیجه با نتایج سایر تحقیقات در مورد تاثیر بازدارندگی دی استات سدیم بر سایر گونه های لاکتوباسیلوس مطابقت دارد [19،17].

جدول 3 نتایج MIC رقت های مختلف دی استات سدیم (ppm) و سطح های مختلف تلقیح(Cfu/ml) باکتری *Leuconostoc mesentroides*

Bacteria / SDA	1×10^{2}	1×10^{4}	1×10^{6}	1×10^{8}
156	+	+	+	+
313	+	+	+	+
625	+	+	+	+
1250	+	+	+	+
2500	−	+	+	+
5000	−	−	+	+

3-4- تاثیر بازد ارندگی دی استا ت سدیم در حضور باکتری *Lactobacillus delbrukii*

در تعداد10^{4}و 10^{6}و10^{8} از باکتری *Lactobacillus delbrukii* مورد استفاده، در حضور غلظت های به کار گرفته شده از دی استات سدیم تمام باکتری ها رشد کردند.در نتیجه در حضور این تعداد از باکتری ها، هیچ غلظتی به عنوان MIC انتخاب نشد. با کاهش تعداد باکتری به 10^{2} در هر میلی لیتر لوله حاوی غلظت 1250ppm دی استات سدیم اولین لوله شفاف و به عنوان MIC انتخاب شد.

جدول 4 نتایج MIC رقت های مختلف دی استات سدیم(ppm) و سطح های مختلف تلقیح (fu/ml) باکتری *Lactobacillus delbrukii*

Bacteria / SDA	1×10^{2}	1×10^{4}	1×10^{6}	1×10^{8}
156	+	+	+	+
313	+	+	+	+
625	+	+	+	+
1250	−	+	+	+
2500	−	+	+	+
5000	−	+	+	+

www.SID.ir

Archive of SID

3-5- تاثیر بازد ارندگی دی استا ت سدیم در حضور کپک *Aspergillus niger*

در کلیه رقت های تهیه شده از سوسپانسیون کپک *Aspergillus niger* در حضورغلظت های مختلف از دی استات سدیم رشد مشاهده شد در نتیجه هیچ غلظتی به عنوانMIC انتخاب نشد.

4- نتیجه گیری

نتایج پژوهش گویای این است کـه خـواص نگهدارنـدگی و بازدارندگی دی استات سدیم بـر روی مخمرهـا مـوثر تـر از باکتری ها می باشد.در مقایسه بین دو مخمر بررسی شده تاثیر بـــاز دارنـــدگی بـــر روی مخمـــر *Saccharomycess cerevisiae* بیـــشتر اســـت. در بـــین دو بـــاکتری تحقیـــق شـده تـاثیر بازدارنـدگی بـر روی بـاکتری Leuconostoc mesenteroides چشمگیر تر است. دی اسـتات سـدیم در برابر کپک Aspergillus niger فاقد اثر نگهدارندگی است. با افزایش غلظـت دی اسـتات سـدیم رشـد مخمـر و باکتری به میزان چشمگیری کاهش می‌یابد.

در روش MICحداقل ماده نگهدارنده در محیط کشت، یعنی مناسب ترین محیط برای رشد میکروارگانیسم بررسی می‌شود.پر واضح است که در مواد غذایی اسیدی مانند: سوپ، سس، ترشی، آبمیوه‌ها و به خصوص نوشابه های گاز دار که به علت وجود شکر فشار اسمزی ایجاد می شود، شرایط برای رشد میکروارگانیسم بسیار محدود تر است وغلظت کمتری از دی استات سدیم مورد نیاز است.

با توجه به نتایج به دست آمده مشخص است که آلودگی اولیه از اهمیت خاصی برخوردار است. اگر میزان اولیه مخمر و باکتری بسیار بالا باشد مواد نگهدارنده و روش های نگهداری موثر واقع نمی شوند. امروزه با اجرای طرح HACCP در بعضی کارخانه های مواد غذایی این مشکل به مقدار زیادی حل شده است.

جدول 5 نتایج MIC رقت های مختلف دی استات سدیم(ppm) و سطح های مختلف تلقیح(Cfu/ml)کپک *Aspergillus niger*

Fungi / SDA	1×10^2	1×10^3	1×10^5	1×10^7
156	+	+	+	+
313	+	+	+	+
625	+	+	+	+
1250	+	+	+	+
2500	+	+	+	+
5000	+	+	+	+

6- تشکر و قدردانی

از شرکت زمزم ایران به خـاطر حمایـت هـای مـالی، فنـی و علمی در زمینه اجرای پروژه صمیمانه تـشکر و قـدردانی بـه عمل می آید.

7- منابع

[1] Brul, S., and Coote, P. 1999. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. International Journal of Food microbiology, 50, 1-17.

[2] Davidson, P. M. 1997. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, and T. J. Montville (Eds.) Food microbiology. Fundamentals and frontiers (pp. 520 526). Washington DC: ASM Press.

[3] Hou, L., and Shi, Y. 2006. Inhibition of foodborn pathogens by Hf-1,a novel antibacterial peptide from the larrae of housefly(Musca domestica) in medium and orange juice. Food control. 18, 1350-1357.

[4] CSTE. 2003. Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Enviroment (CSTEE) opinion in the results of the Risk Assessment of: BENZENE, Human Health Part. Carried out in the framework of Council Regulation (EEC) 793/93 on the evalution and control of the risks of existing substances. Adopted by the CSTEE during

www.SID.ir

Archive of SID

the 49nd plenary meeting of 12-13 November 2003.

[5] European Commission. 2005. SCCP/0891/05 Scientific Committee on consumer products, opinion on Benzoic acid and Sodium benzoate, Healt consumer protection directorate –general. Directorate –public Healt and Risk Assessment. During the 4nd plenary of 21 June 2005.

[6] Fathi, I., and Bahmani, A. R. 1377. Produce and optimizing new presevative(Alvita) in Food. National Congress of Food Industry. Razi University of Kermanshsh.

[7] Furio, T. E. 1972. Handbook of Food Additives . 2nd ed. Chemical Rubber Co. U.S.A p: 147-1502.

[8] European Union. 2004. 2003/114/EC of the European Parliament and the Council of 22 December amending Directive 95/2/EC on food additives other than colours and sweeteners. Official Journal of the European Union, 47: 58.

[9] Bruemmer, J. M., Stephan, H., morgenstern, G. 1982. Measure for prevention of mould growth. V, Use of sodium diacetate getreide, Mehl-Und-Brot, 39;237-239.

[10] Glabe, E.F., and Maryanski, J. K. 1981. sodium dieacetate: an effective mould inhibitor. 26: 285-289 .

[11] Geornaras, I., and Skandamis, P. 2006 . post-processing application of chemical solutions for control of listeria monocytogenes, cultured under different, on commerical smoked sausage formulated with and without potassium lactate-sodium diacetate . Food Microbiology, 23: 762-771.

[12] Glass, K.A., Glass, D.A., Granberg, A.L., Smith, A. M., McNamara, M., Hardin, J., Mattias, K., Ladwing and E. A. Johnson. 2002. Inhibition of Listeria monocytogens by sodium diacetate and sodium lactate on wieners and cooked bratwurst, journal of Food Protection. 65: 116-123.

[13] Juneja, V.K., and Tipparedd, H. 2004. Inhibitory effects of organic acid salts on growth of *Clostridium perfringens* from spore inocula during chilling of marinated ground turkey breast. International Journal of food Microbiology, 93: 155-163.

[14] Mbandi, E., and Shelef, L. A. 2002. Enhanced inhibition of listeria monocytogenes and Salmonella Enteritidis in meat by combinations of sodium lactate and diacetate, Journal of Food Prot. 64 :640-644.

[15] peirson, M. D., and Guan, T. 2003. Thermal resistances and lactate and diacetate sensitivities of bacteria causing bologna discolouration. International Journal of Food Microbiology. 86: 223-230.

[16] Stekelenburg, F. K. 2002. Enhanced inhibition of *Listera monocytogenes* in frankfurter sausage by the addition of potassium lactate and sodium diacetate mixtures. Food Microbiology, 20: 133-137.

[17] Shelef, L.A., and Lakshmi, A. 1994. Inhibition of Listeria monocytogenes and other Becteria by sodium diacetate. Journal of Food Safetly, 14, 103-115.

[18] Sadeghi, M. A. R. 1377. Investigation of the Effect anti fungal sodium diacetate in bread.MSC Thesis, Ferdowsi University Of Mashad.

[19] Mehrabian, S., and Emtiazjo, M. 1380. Effect of antimicrobial sodium diacetate on some bacteria in tranditional chess in conditional "in vitro "and "in vivo". 4th microbiological congress. University of Shahed.

[20] Fahim, D. y., and Emadi, H. 1384, The effect of sodium diacetate (Alvita) on shelf life Ghareboron kaviar.15 th National Congress Food Industry.

[21] Farbod, F .1384. The effect of sodium diacetate on increasing the shelf life of corn during storage. 15th National Congress Food Industry.

[22] ISIRI, Standard 5875. 1386. Preservaties, Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Test method microbiology.

[23] Baron, E. J., and Finegold, S. M. 1990. Methods for testing of antimicrobial effectiveness, Diagnostic Microbiology .Eighth edition, pp. 859.

[24] Batchelor, V. 1984. Further microbiology of soft drinks. In H. W. Houghton (Ed.), Developments in soft drinks technology-3. Essex, UK: Elsevier Applied Science Publishers Ltd.

www.SID.ir

Archive of SID

[25] Davidson, P. M., and Parish, M. E. 1989. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. Food Technology, 43; 148-155.

[26] Aurelio, L. M. 2006. *Aspergillus* flavus growth response to cinnamon extract and sodium benzoate mixture. Food Control,18: 1358-1362.

[27] Furio , T.E. 1972. Handbook of Food Additives . 2nd ed . Chemical Rubber Co . U.S.A, p: 147-150.

cyclohexanicum in fruit juice. Food Control, 19 : 974-981.

[28] Woodroof, J. G., and Philips, G. F. 1996. Beverages: Carbonated and non Carbonated. AVI publisher Westport. PP: 343-347.

[29] Michelle,W., and Carol, A. 2008 . The effect of preservative on Alicyclobacillu acidoterrestris and Propionibacterium

www.SID.ir

Archive of SID

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of sodium diacetate on spoilage microorganisms in carbonated beverages by culture media

Pahlavani, M.[1], Ebrahimzadeh-Mousavi, M. A. [2], Hamidi-Esfahani, Z.[3*], Sedaghat, N.[4] , Shahidi, F.[5]

1-M. Sc. Graduate of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), Iran.
2- Associate Prof. of Food Technology, Tehran University, Karaj, Iran.
3- Associate Prof. of Food Technology,Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
4- Assistant Prof. of Food Technology, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), Iran.
5-Professor of Food Technology, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), Iran.
(Received:88/2/26 Accept:88/10/13)

Sodium diacetate is a safe chemical presevative which is used as an inhibitor against mould, yeast and some bacteria. In this study anti-microbial effect of sodium diacetate on preventing the growth of some spoilage microorganisms in carbonated beverages was investigated by broth diulation suceptibility test in medium. At the concentrations of 10^1, 10^2, 10^3 and 10^5 cells of *Saccharomycess cerevisiae* per ml 156, 313, 1250 and 5000 ppm of sodium diacetate were respectively determined as the minimum inhibitory concentrations (MIC) preventing growth of the yeast. As for *Candida krusei*, 625, 1250, 2500 and 5000 ppm of sodium diacetate were MIC inhibiting the growth of the yeast at concentrations of respectively 10^1, 10^2, 10^3 and 10^5 cells/ml. 2500 and 5000 ppm of sodium diacetate were determined as MIC inhibiting the growth of *Leuconostac mesenteroides* at the concentrations of respectively 10^2, 10^4 bacteria/ml, and for 10^2 bacteria/ml of *Lactobacillus delbrukii* was prevented by adding 2500 ppm sodium diacetate. No inhibitory effects of different concentrations of sodium diacetate observed at none of the prepared spore suspension of *Aspergilus niger*, so no concentrations of sodium diacetate were determined as MIC for this species of mould.The results show that sodium diacetate has inhibitory effects on the above selected yeast and bacteria but no inhibitory effects on the mould of *Aspergilus niger*.

Key woeds: Carbonated beverages, Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Preservative, Sodium diacetate.

*Corresponding Author E-Mail address: hamidy_z@modares.ac.ir

www.SID.ir