

## 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<sup>1</sup>، سید محمدعلی موسوی<sup>2</sup>، زهره حمیدی اصفهانی<sup>3\*</sup>،  
ناصر صداقت<sup>4</sup>، فخری شهیدی<sup>5</sup>

- 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 باکتری‌ها معرفی شده است. در این تحقیق اثر ضد میکروبی دی استات سدیم در جلوگیری از رشد برخی از میکروارگانیسم های عامل فساد نوشابه های گازدار در محیط کشت با استفاده از روش حساسیت رقت های مایع مورد بررسی قرار گرفته است. در مورد مخمر *Saccharomyces cerevisiae* در تعداد 10، 10<sup>2</sup>، 10<sup>3</sup>، 10<sup>5</sup> مخمر در هر میلی لیتر به ترتیب غلظت های 5000، 1250، 313، 156 ppm دی استات سدیم به عنوان MIC شناخته شد. در مورد مخمر *Candida krusei* در تعداد 10، 10<sup>2</sup>، 10<sup>3</sup>، 10<sup>5</sup> مخمر در هر میلی لیتر به ترتیب غلظت های 5000، 2500، 1250، 625 ppm دی استات سدیم به عنوان MIC شناخته شد. در مورد باکتری *Leuconostoc mesenteroides* در تعداد 10<sup>2</sup>، 10<sup>4</sup> باکتری در هر میلی لیتر به ترتیب غلظت های 5000، 2500 ppm دی استات سدیم به عنوان MIC شناخته شد. در مورد باکتری *Lactobacillus delbrukii* در هر میلی لیتر غلظت 2500 ppm دی استات سدیم به عنوان MIC شناخته شد. در مورد کپک *Aspergillus niger* در کلیه رقت های تهیه شده از سوسپانسیون هاگ کپک و در حضور غلظت های مختلف از دی استات سدیم رشد مشاهده شد. در نتیجه هیچ غلظتی به عنوان MIC انتخاب نشد. نتایج نشان داد که دی استات سدیم دارای خواص بازدارندگی بر روی 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 گازدار.

\* مسئول مکاتبات: [hamidy\\_z@modares.ac.ir](mailto:hamidy_z@modares.ac.ir)

## 1- مقدمه

یکی از روش های نگهداری مواد غذایی که معمولا به صورت افزودنی مورد استفاده قرار می گیرد 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 [2,1].

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 نوشیدنی های حاوی ویتامین C بنزوات سدیم با اسید اسکوربیک ترکیب شده و تولید ترکیبات بنزنی می نماید. بنزوات سدیم باعث آسیب سلولی، تراوش مواد از سلولها، سیروز کبد، پانکراسیون بیماریهای دژنره می شود و می تواند به DNA موجود در میتوکندریها آسیب برساند [5,4].

گزارش های موجود نشان می دهد که با توجه به شباهت ساختاری بنزوات سدیم و دی استات سدیم، دی استات سدیم می تواند 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].

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

دی استات سدیم در بدن انسان و حیوانات به آب، سدیم و CO<sub>2</sub> تجزیه می شود و از طریق کانالهای طبیعی بدن دفع می شود و هیچ ماده ای ناشی از متابولیسم آن در بدن باقی نمی ماند. 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 مونوسیژنوز<sup>2</sup> در سطح 2000 ppm در محصول های گوشتی، طیوروماهی بررسی شده است. هم چنین جهت جلوگیری از رشد اشرشیا کلی<sup>3</sup>، کلاستریدیوم پرفرنس<sup>4</sup> و تعدادی از باکتری های گرم منفی و بیماری زا در سطح 1000 ppm محصول 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)<sup>5</sup> در برابر برخی از میکروارگانیسم های عامل فساد در نوشابه های گاز دار بررسی شدند [28,29]. با این روش، می توان 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 مورد نظر 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.

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

1. Generally Recognized as Safe

## 2- مواد و روش ها

## 2-1- تهیه رقت های دی استات سدیم

پودر دی استات سدیم از نمایندگی شرکت (Niacet کانادا) حاوی 60٪ استات سدیم و 40٪ اسید استیک تهیه گردید. جهت تهیه رقت های دی استات سدیم از محیط کشت مایع تریپتون سوی براث 1 (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 رقیق سازی متوالی صورت گرفت به گونه ای که در هر سری آزمایش 6 لوله حاوی 1 میلی لیتر رقت های متوالی 313، 625، 1250، 2500، 5000 ppm تهیه گردید. 2 لوله جهت شاهد + و - که فقط حاوی محیط کشت بودند در نظر گرفته شد (مجموعاً 8 لوله). کلیه آزمایشات در سه تکرار انجام گردید [23،22].

لازم به ذکر است که در این آزمایش شاهد مثبت، نمونه بدون دی استات سدیم و حاوی میکروارگانیسم مربوطه است و بیانگر این است که میکروارگانیسم مورد نظر در محیط کشت مورد نظر قادر به رشد می باشد و شاهد منفی که نمونه بدون دی استات سدیم و فاقد میکروارگانیسم است، بیانگر این است که در حین کار، میکروارگانیسم آلوده کننده 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: *cerevisiae* PTCC5269، *Candida krusei* PTCC5295، *saccharomyces Leuconostoc mesenteroides* subs. *Lactobacillus mesenteroides* PTCC1591، *Aspergillus niger* و PTCC1333 delbrukii PTCC5010 می باشند.

مخمرو کپک روی محیط یست مالت آگار<sup>2</sup> 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<sup>3</sup> (Merck آلمان) به صورت شیب دار کشت داده شده و هر دو 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 آگار و باکتری های رشد کرده روی محیط ام آر اس آگار به لوله حاوی آب پیتونه<sup>4</sup> 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 0/1-0/08 شود و این کدورت معادل تقریباً  $1 \times 10^7$  مخمر و  $1 \times 10^8$  باکتری در هر میلی لیتر (Cfu/ml)<sup>5</sup> است [26،23،22].

جهت تهیه سوسپانسیون هاگ قارچ از محلول نمکی پلی سوربات<sup>6</sup> 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  $1 \times 10^7$  هاگ در هر میلی لیتر باشد [23،22].

سپس رقیق سازی متوالی سوسپانسیون مخمر و باکتری توسط آب پیتونه 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 لیتر به 8 لوله (حاوی 1 میلی لیتر محیط 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

بازدارندگی نشان داد (MIC). با رساندن غلظت سوسپانسیون مخمر به  $10^1$  حتی غلظت 156 ppm دی استات 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 *Saccharomyces cerevisiae*

Yeast	SDA <sup>1</sup>				
	$1 \times 10^1$	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^7$
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 نیاز است [17,16,14,13].

### 3-2- تاثیر بازدارندگی دی استات سدیم بر

#### مخمر *Candida krusei*

در تعداد  $10^7$  از مخمر *Candida krusei* مورد استفاده، در حضور غلظت های به کار گرفته شده از دی استات 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 میلی لیتر به جز غلظت 5000ppm از دی استات سدیم بقیه غلظت ها قادر به پیشگیری از رشد مخمر نبوده اند 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

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 32-35 درجه سانتی گراد به مدت 24-48 ساعت و لوله های حاوی هاگ قارچ در دمای 25-22 درجه سانتی گراد به مدت 72-120 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 لوله های آزمایش بعد از آن در محیط های کشت مناسب صورت گرفت. رشد میکروارگانیسم مربوطه بیانگر این است که غلظت ماده مورد نظر مانع از رشد شده است (MIC) ولی نتوانسته است میکروارگانیسمها را از بین ببرد [27,25,22].

### 3- نتایج و بحث

#### 3-1- تاثیر بازدارندگی دی استات سدیم بر

#### مخمر *Saccharomyces cerevisiae*

در تعداد 107 از مخمر *Saccharomyces cerevisiae* مورد استفاده، در حضور غلظت های به کار گرفته شده از دی استات 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 میلی لیتر رسید در این تعداد از مخمر غلظت های 156 ppm، 313، 625، 1250، 2500 دی استات سدیم قادر به پیشگیری از رشد مخمر نبوده اند 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

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

*Leuconostoc mesentroides*

Bacteria SDA	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^8$
156	+	+	+	+
313	+	+	+	+
625	+	+	+	+
1250	+	+	+	+
2500	-	+	+	+
5000	-	-	+	+

3-4- تاثیر بازدارندگی دی استات سدیم در

حضور باکتری *Lactobacillus delbrukii*

در تعداد  $10^4$  و  $10^6$  و  $10^8$  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	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^8$
156	+	+	+	+
313	+	+	+	+
625	+	+	+	+
1250	-	+	+	+
2500	-	+	+	+
5000	-	+	+	+

میلی لیتر 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	$1 \times 10^1$	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^7$
156	+	+	+	+	+
313	+	+	+	+	+
625	-	+	+	+	+
1250	-	-	+	+	+
2500	-	-	-	+	+
5000	-	-	-	-	+

3-3- تاثیر بازدارندگی دی استات سدیم در

حضور باکتری *mesenteroides Leuconostoc*

در تعداد  $10^6$  و  $10^8$  از باکتری *mesenteroides Leuconostoc* 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 لیتر به جز غلظت 5000 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 غلظت 2500 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].

### 3-5- تاثیر بازدارندگی دی استات سدیم در حضور کپک *Aspergillus niger*

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

### 4- نتیجه گیری

نتایج پژوهش گویای این است که خواص نگهدارندگی و بازدارندگی دی استات سدیم بر روی مخمرها موثر تر از باکتری ها می باشد. در مقایسه بین دو مخمر بررسی شده تاثیر بازدارندگی بر روی مخمر *Saccharomyces cerevisiae* بیشتر است. در بین دو باکتری تحقیق شده تاثیر بازدارندگی بر روی باکتری *Leuconostoc mesenteroides* چشمگیر تر است. دی استات سدیم در برابر کپک *Aspergillus niger* فاقد اثر نگهدارندگی است. با افزایش غلظت دی استات سدیم رشد مخمر و باکتری به میزان چشمگیری کاهش می یابد.

در روش MIC حداقل ماده نگهدارنده در محیط کشت، یعنی مناسب ترین محیط برای رشد میکروارگانیسم بررسی می شود. پر واضح است که در مواد غذایی اسیدی مانند: سوپ، سس، ترشی، آبمیوه ها 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 و غلظت 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*

SDA	Fungi			
	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^7$
156	+	+	+	+
313	+	+	+	+
625	+	+	+	+
1250	+	+	+	+
2500	+	+	+	+
5000	+	+	+	+

### 6- تشکر و قدردانی

از شرکت زمزم ایران به خاطر حمایت های مالی، فنی و علمی در زمینه اجرای پروژه صمیمانه تشکر و قدردانی به 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 foodborne pathogens by Hf-1, a novel antibacterial peptide from the larvae of housefly (*Musca domestica*) in medium and orange juice. Food control. 18, 1350-1357.
- [4] CSTE. 2003. Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment (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 evaluation and control of the risks of existing substances. Adopted by the CSTEE during

- [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] Pearson, M. D., and Guan, T. 2003. Thermal resistances and lactate and diacetate sensitivities of bacteria causing bologna discoloration. International Journal of Food Microbiology. 86: 223-230.
- [16] Stekelenburg, F. K. 2002. Enhanced inhibition of *Listeria 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 Bacteria by sodium diacetate. Journal of Food Safety, 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 traditional 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. Preservatives, 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.
- 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, Health consumer protection directorate –general. Directorate –public Health 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 monocytogenes* 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.

- 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 Alicyclobacillus acidoterrestris and Propionibacterium
- [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.



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

Pahlavani, M.<sup>1</sup>, Ebrahimzadeh-Mousavi, M. A.<sup>2</sup>, Hamidi-Esfahani, Z.<sup>3\*</sup>, Sedaghat, N.<sup>4</sup>, Shahidi, F.<sup>5</sup>

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 preservative 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 dilution susceptibility test in medium. At the concentrations of  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$  and  $10^5$  cells of *Saccharomyces 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 *Leuconostoc 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 *Aspergillus 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 *Aspergillus niger*.

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

---

\*Corresponding Author E-Mail address: [hamidy\\_z@modares.ac.ir](mailto:hamidy_z@modares.ac.ir)