

ارزیابی اثر ضدباکتریایی رنگ آناتو بر سالمونلا اتریتیدیس موجود در سس مایونز

محمود یلمه^{a*}، محمدباقر حبیبی نجفی^b، فرشته حسینی^c، رضا فرهوش^b

^a دانشجوی دکتری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گروه علوم و صنایع غذایی، گرگان، ایران

^b استاد دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

^c مربی پژوهشی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی مشهد، گروه افزودنی‌های غذایی، مشهد، ایران

چکیده

مقدمه: امروزه مضرات نگهدارنده‌های سنتزی بر سلامتی انسان مشخص شده است و محققین به دنبال جایگزین‌هایی با منشأ طبیعی و ایمن هستند. رنگ آناتو از جمله رنگ‌های پرمصرف در صنعت غذا می‌باشد. رنگ آناتو دارای خصوصیات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. هدف از این تحقیق بررسی اثر ضدباکتریایی رنگ آناتو در فرمولاسیون سس مایونز بر سالمونلا اتریتیدیس بود.

مواد و روش‌ها: رنگ آناتو به روش خیساندن استخراج و پس از فیلتراسیون و تغلیظ، با آن تحت خلا به شکل پودر درآورده شد. به نمونه‌های سس حاوی ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ درصد رنگ آناتو، ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی ۱/۵ مک فارلند (معادل $10^8 \times 1/5$) اضافه و در دو دمای ۴ و ۲۵ °C نگهداری شد. برای بررسی بقای باکتری در سس، ۱ میلی‌لیتر از هر رقت بصورت پورپلیت کشت شد. پس از شمارش، تعداد کلنی‌ها به صورت log CFU/g گزارش شد. شمارش کلنی‌ها به مدت ۲۰ روز و در ۳ تکرار انجام شد.

یافته‌ها: در هر دو دمای نگهداری، با افزایش غلظت رنگ آناتو بقای سالمونلا اتریتیدیس کاهش بیشتری را نشان داد و اختلاف معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد داشت ($P < 0/05$). جمعیت سالمونلا اتریتیدیس در دمای ۲۵ °C نسبت به ۴ °C کاهش بیشتری نشان داد بطوری‌که جمعیت آن در دمای ۲۵ °C پس از ۱۷ روز به حداقل خود رسید.

نتیجه‌گیری: رنگ آناتو بقای سالمونلا اتریتیدیس را در سس کاهش دهد. دمای ۲۵ °C اثر کشندگی بیشتری را بر سالمونلا اتریتیدیس در سس نشان داد. با توجه به نتایج می‌توان از رنگ آناتو به عنوان یک ممانعت‌کننده از رشد باکتری در سس استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: آناتو، سالمونلا اتریتیدیس، ضدباکتریایی، مایونز

مقدمه

مایونز از جمله قدیمی‌ترین سس‌ها می‌باشد که به طور وسیعی در کل جهان مصرف می‌شود. مطابق استاندارد ایران، مایونز نوعی امولسیون روغن در آب می‌باشد که حاصل امولسیون شدن روغن‌های خوراکی گیاهی (حداقل ۶۶ درصد) در یک فاز مایع حاوی سرکه بوده و زرده تخم مرغ به عنوان امولسیون‌کننده آن می‌باشد. رنگ آن کرم تا زرد کم رنگ است و pH آن نباید بیش از ۴/۱ می‌باشد (استاندارد صنعتی ایران، شماره ۲۴۵۴). علاوه بر این در فرمولاسیون مایونز، ترکیبات دیگری مثل نمک و شکر و نگهدارنده‌ها افزوده می‌شود (Liu et al., 2007). با توجه به عدم وجود فرآیند حرارتی طی تولید این فرآورده، نیاز به نگهدارنده‌های شیمیایی مثل بنزوئیک اسید و نمک‌های آن، جهت ممانعت از رشد میکروارگانیسم‌ها طی نگهداری سس، وجود دارد. اما این نگهدارنده‌های سنتزی اثرات زیانباری بر سلامتی انسان دارند (Zhang et al., 2009).

سالمونلا/انتریتیدیس یک باکتری انروپاتوژنیک است که بویژه توسط مواد غذایی مثل مایونز، که طی تولید آن فرآیند حرارتی نمی‌بینند، شیوع پیدا می‌کند (Boonmar et al., 2000). مایونز متداول‌ترین عامل شیوع بیماری سالمونلوزیس در سراسر دنیا می‌باشد (Smittle, 2000). بزرگ‌ترین شیوع سالمونلوزیس با ده هزار بیمار در دانمارک و سال ۱۹۵۵ گزارش شده است (ICMSF, 1980). مقدار pH سس، نوع اسید بکار رفته در فرمولاسیون سس، دما و مدت زمان نگهداری سس از عوامل موثر در رشد میکروارگانیسم در سس می‌باشد (Smittle, 2000).

عصاره آناتو یک رنگ طبیعی کاروتنوئیدی بوده و از دانه‌های درخت بیکسا اورلانا^۱ که در مناطق گرم و مرطوب می‌روید، بدست می‌آید. ۹-سیس - بیکسین جزء رنگی عمده (حدود ۸۰ درصد) در عصاره استخراج شده بود که محلول در روغن است، ۹-سیس - نوربیکسین که محلول در آب می‌باشد، جزء بعدی را تشکیل می‌دهد (Preston & Rickard, 1980). بر اساس تحقیقات انجام شده رنگ آناتو دارای ویژگی آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی می-

باشد (Kurniawati et al., 2007; Galindo-). آناتو به عنوان رنگ طبیعی و سالم که رنگ نارنجی تا قرمز ایجاد می‌کند در فرآورده‌های غذایی مختلف مثل فرآورده‌های قنادی و نانوائی، فرآورده‌های لبنی، فرآورده‌های گوشتی، برنج و انواع مرباها استفاده می‌شود (Chowdhury et al., 2006).

به علت استفاده زیاد از رنگ آناتو در صنعت غذا، بررسی‌های زیادی جهت ایمن بودن رنگ آناتو انجام شده است که نتایج این تحقیقات هیچ گونه اثر منفی ناشی از مصرف رنگ آناتو نشان ندادند (Alves et al., 2003; Satyarayana et al., 2003).

عصاره‌های طبیعی می‌توانند در بخش‌های مختلف سلول از جمله دیواره سلولی، غشای سیتوپلاسمی، پروتئین‌های غشای سیتوپلاسمی ایجاد اختلال کنند و یا می‌توانند باعث منعقد و کواگوله شدن محتویات سیتوپلاسم و نشت اجزای سیتوپلاسمی شوند و بدین ترتیب از رشد باکتری‌ها ممانعت کنند (Burt, 2004).

پرالس و گارسیا (۱۹۹۰) گزارش کردند که بقای سالمونلا/انتریتیدیس در مایونز خانگی تحت اثر نوع اسید بکار رفته در فرمولاسیون و دمای نگهداری سس دارد (Perales & Garcia, 1990). ضابطیان حسینی و همکاران (۱۳۸۹) اثر ضد میکروبی عصاره آویشن باغی را بر سالمونلا/انتریتیدیس در فرمولاسیون مایونز در دو دمای ۴ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد بررسی نمودند و مشاهده کردند که اثر ضد میکروبی عصاره آویشن باغی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بیشتر است (ضابطیان حسینی و همکاران، ۱۳۸۹). استفاده از رنگ آناتو در سس علاوه بر خصوصیات ضد میکروبی رنگ آناتو می‌تواند با ایجاد رنگی مطلوب به تنوع محصول نیز کمک کند.

هدف از این پژوهش، ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی عصاره رنگی آناتو بر سالمونلا/انتریتیدیس در محیط مایونز که در دو دمای ۴ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بود که در صورت امکان این عصاره طبیعی را در فرمولاسیون مایونز جایگزین نگهدارنده‌های سنتزی کنیم.

¹ Bixa Orellana L.

مواد و روش‌ها

- مواد

دانه آناتو از شهر حیدرآباد کشور هند، حلال‌های آلی استون و هگزان و نیز محیط کشت اختصاصی SSA^۱ از شرکت مرک آلمان خریداری شد. سوش خالص سالمونلا/انتریتیدیس از دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی تهیه شد.

- استخراج رنگ آناتو

به منظور استخراج رنگ آناتو از روش کاستلو و همکاران (۲۰۰۴) استفاده شد و طبق آن مقداری دانه آناتو در هگزان به مدت ۶ ساعت به منظور روغن‌زدایی^۲ خیسانده شد سپس دانه‌های روغن‌زدایی شده به منظور استخراج رنگ در حلال آلی استون خیسانده شد (2004 Castello *et al.*). عصاره‌های رنگی پس از فیلتراسیون، بوسیله روتاری اوپراتور (هیدولف^۳ مدل ۴۰۰۳ ساخت آلمان) تغلیظ شد و عصاره تغلیظ شده بوسیله آن تحت خلا (شل لب^۴ مدل 1410D-2E ساخت آمریکا) به پودر تبدیل شد. جهت جلوگیری از آسیب حرارتی باندهای دوگانه کنژوگه، طی خشک کردن از دمای پائین (۴۰ درجه سانتی‌گراد) استفاده شد. از دستگاه اسپکتروفوتومتر شیمادزو^۵ مدل UV-160A ساخت ژاپن استفاده شد.

- تهیه سوسپانسیون میکروبی

جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی از کشت ۲۴ ساعته در محیط کشت نوترینت آگار شیب‌دار استفاده شد. بعد از کشت و ۲۴ ساعت انکوباتور گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، سوسپانسیون میکروبی معادل با نیم مک‌فارلند^۶ به روش مک‌فارلند تهیه شد.

- تهیه تیمارها

سس مایونز در شرایط آزمایشگاهی بصورت استریل تهیه شد. سپس به هر ظرف حاوی سس وزن مشخصی از رنگ آناتو و نیز ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی نیم مک‌فارلند (معادل $10^4 \times 1/5$) اضافه شد. نمونه‌های سس حاوی ۰/۱، ۰/۲، و ۰/۴ درصد رنگ آناتو تهیه شد. نمونه‌های سس در دو دمای ۴ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد

نگهداری شدند. نمونه سس فاقد میکروارگانیسم و عصاره نیز بعنوان شاهد در این دو دما نگهداری شد. بلافاصله پس از تهیه تیمارها و نیز بصورت روزانه تا ۲۰ روز، کشت میکروبی انجام شد.

ارزیابی بقای باکتری در سس مطابق استاندارد ملی ایران شماره ۳۵۶ انجام شد و طی آن ۱ میلی‌لیتر از هر رقت به پلیت افزوده شده و با افزودن محیط کشت، کشت بصورت پورپلیت انجام گرفت. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس تعداد کلنی‌ها شمارش گردید و نتایج به صورت log CFU/g گزارش شد (استاندارد صنعتی ایران، شماره ۳۵۶).

- تجزیه و تحلیل آماری

این پژوهش در قالب فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گرفت. آنالیز داده‌ها توسط نرم افزار Minitab و مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون توکی انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل سس حاوی رنگ آناتو در چهار سطح و در دو دمای ۴ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود.

یافته‌ها

روند تغییر تعداد سالمونلا/انتریتیدیس در سس حاوی درصد‌های مختلف رنگ آناتو در شکل ۱ نشان داده شده است. آنالیز داده‌ها نشان می‌دهد تعداد باکتری سالمونلا/انتریتیدیس در نمونه‌های سس حاوی درصد‌های مختلف رنگ آناتو با نمونه شاهد از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P < 0.05$).

در هر دو دمای نگهداری ۴ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد متناسب با افزایش غلظت رنگ آناتو، تعداد باکتری سالمونلا/انتریتیدیس در سس کاهش یافت (شکل ۲). کاهش جمعیت سالمونلا/انتریتیدیس در دو دمای ۴ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد نسبت به یکدیگر اختلاف معنی‌داری را داشتند ($P < 0.05$). بر اساس جدول ۱ اثر متقابل غلظت رنگ آناتو، دما و زمان (روز) بر کاهش تعداد باکتری‌ها معنی‌دار بود ($P < 0.05$).

¹ Salmonella Shigella Agar

² Defatting

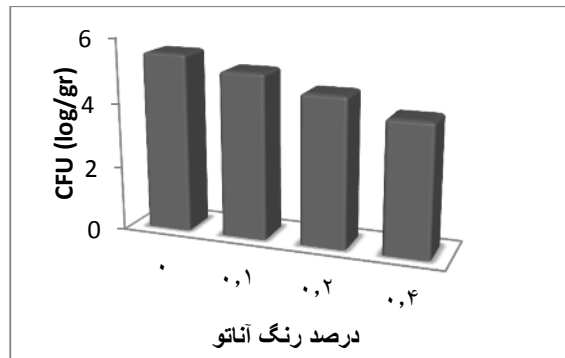
³ Heidolph

⁴ Shel Lab

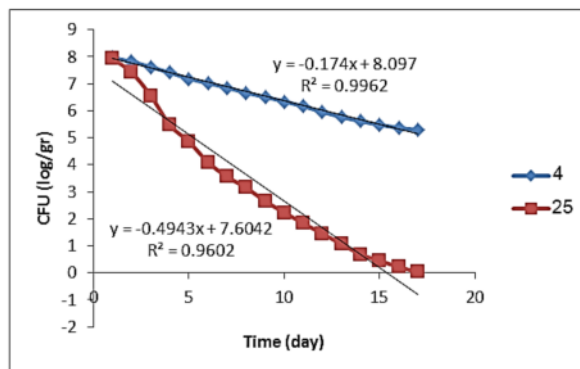
⁵ Shimadzu

⁶ Mac farland

ارزیابی اثر ضدباکتریایی رنگ آناتو بر سالمونلا انتریتیدیس



شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف رنگ آناتو بر سالمونلا انتریتیدیس در محیط سس



شکل ۲- اثر دمای نگهداری بر جمعیت سالمونلا انتریتیدیس در سس حاوی رنگ آناتو طی زمان‌های نگهداری

جدول ۱- آنالیز واریانس *S. enteritidis* log cfu/g

| P | F | میانگین مربعات | درجه آزادی | ردیف |
|--------|-----------|----------------|------------|-------------------|
| ./0.03 | 4047.097 | 774/9 | 1 | دما |
| ./0.00 | 24434/0.2 | 46/784 | 16 | روز |
| ./0.09 | 14046/7 | 26/895 | 3 | آناتو |
| ./0.05 | 5921/55 | 11/338 | 16 | دما * روز |
| ./0.14 | 144/25 | 0/276 | 48 | روز * آناتو |
| ./0.20 | 826/0.8 | 1/582 | 3 | دما * آناتو |
| ./0.30 | 133/74 | 0/276 | 48 | دما * روز * آناتو |

۲۰

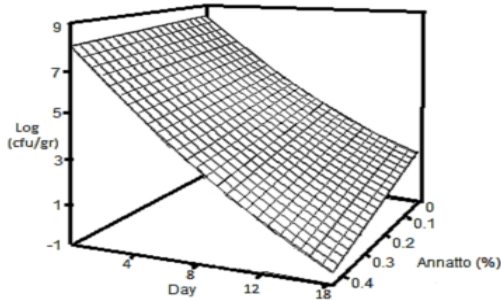
بحث

حسینی و همکاران، ۱۳۸۹؛ برزگر و همکاران، ۱۳۸۷). پراس و گارسیا (۱۹۹۰)، در بررسی اثر pH و دما بر بقای سالمونلا انتریتیدیس در سس مایونز، مشاهده کردند که در دمای ۴ °C، سس پس از ۱۲۰ روز حاوی ۱۰^۶ CFU/g سالمونلا انتریتیدیس بوده اما در دمای ۲۴ °C و ۳۵ °C بترتیب پس از ۷۲ و ۲ روز به حداقل مقدار خود رسیدند (Perales & Garcia, 1990). لاک و بورد نیز بقای سالمونلا انتریتیدیس را در انواع مختلف سس از نظر چربی بررسی کردند و مشاهده کردند که دمای ۴ °C نسبت به دمای ۲۴ °C اثر کمتری بر کاهش بقای سالمونلا انتریتیدیس دارد

مطابق نتایج، بقای سالمونلا انتریتیدیس در دمای محیط (۲۵ °C) نسبت به دمای یخچال (۴ °C) کمتر بود بطوری که باکتری‌ها در دمای محیط در روز هفدهم بعد از تلقیح، به حداقل مقدار خود رسیدند در حالی که در دمای یخچال، باکتری‌ها پس از ۲۰ روز نیز رشد کردند (شکل ۲). ضابطیان و همکاران (۱۳۸۹) که اثر ضد میکروبی عصاره تیموس ولگاریس^۱ را در سس مایونز و برزگر و همکاران (۱۳۷۸) که اثر ضد میکروبی کیتوزان را در سس مایونز بررسی کردند نیز به نتایج مشابهی رسیدند (ضابطیان

¹ Thymus vulgaris

همان گونه که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، در روز اول تغییر چندانی در تعداد باکتری‌ها با افزایش درصد عصاره مشاهده نمی‌شود، اما پس از گذشت ۱۳ روز، نمونه حاوی ۰/۰۴ درصد عصاره رنگی آناتو به حداقل مقدار خود می‌رسد و در روز سیزدهم تفاوت چشم‌گیری میان نمونه‌های حاوی درصد‌های مختلف عصاره و نمونه شاهد وجود دارد. این تفاوت در روزهای پایانی مشهودتر است.



شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف رنگ آناتو بر جمعیت *S. enteritidis* در سس مایونز و دمای 25°C ، طی زمان نگهداری

نتیجه‌گیری

مطابق نتایج، افزایش درصد رنگ آناتو از صفر تا ۰/۴ درصد در سس منجر به کاهش معنی‌دار در تعداد باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* در طی زمان نگهداری شد. کاهش جمعیت *سالمونلا انتریتیدیس* در دمای 25°C نسبت به دمای 4°C اختلاف معنی‌داری داشت بطوری که جمعیت باکتری‌ها در دمای 25°C پس از ۱۷ روز به مقدار حداقل خود رسیدند در حالی که در دمای 4°C پس از ۲۰ روز نیز به رشد خود ادامه دادند. تعداد باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* در نمونه‌ی سس حاوی ۰/۴ درصد آناتو و دمای 25°C پس از ۱۷ روز به صفر رسید.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد و نیز قسمتی از طرح پژوهشی می‌باشد که زیر نظر جهاد دانشگاهی مشهد به انجام رسید. از همکاری و حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی جهاد دانشگاهی مشهد در انجام این طرح پژوهشی کمال تشکر را داریم.

منابع

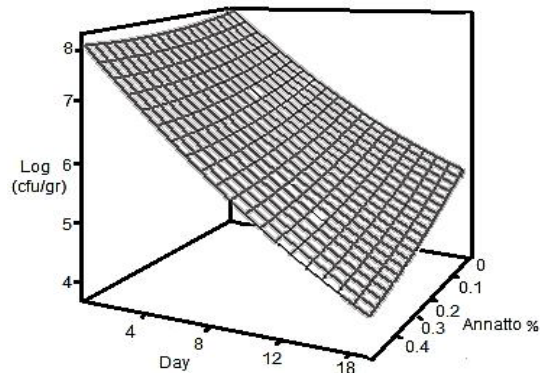
برزگر، ح. ا.، جمالیان، و. م. و لاری، م. ا. (۱۳۸۷).

(Board & Lock, 1994). هاتکوس و همکاران (۱۹۹۵) در بررسی بقای *اشریشیاکلی O157:H7* در سس مایونز نیز مشاهده کردند که با افزایش دمای نگهداری از ۵ به ۲۲ و ۳۰ جمعیت باکتری بیشتر کاهش می‌یابد (Hathcox et al., 1995).

اثر کشندگی دمای 24°C نسبت به دمای 4°C بیشتر بود که احتمالاً به علت افزایش نفوذپذیری غشا پلاسمایی باکتری نسبت به مواد ضدباکتریایی در دمای بالاتر و یا تغییر در جایگاه فعال مواد ضدباکتریایی عصاره باشد (Smith-Palmer et al., 1998).

بر اساس نتایج آنالیز واریانس مربوط به جمعیت *سالمونلا انتریتیدیس* (جدول ۱)، اثر کلیه عبارت‌ها (دما، زمان و غلظت آناتو) و نیز برهم‌کنش‌های آن بر بقای باکتری معنی‌دار بودند ($P < 0.05$).

شکل ۳ اثر غلظت‌های مختلف رنگ آناتو را بر جمعیت *S. enteritidis* در سس مایونز و دمای 4°C درجه سانتی‌گراد، طی زمان نگهداری نشان می‌دهد. در ابتدا افزایش درصد عصاره رنگی تاثیری بر کاهش باکتری *S. enteritidis* با افزایش درصد عصاره کاهش یافت و در روز پایانی بین تعداد باکتری *S. enteritidis* در نمونه شاهد و سایر نمونه‌های حاوی عصاره رنگی به ویژه نمونه حاوی ۰/۰۴ درصد عصاره اختلاف معنی‌داری مشاهده شد و این اتفاق احتمالاً به علت افزایش غلظت ترکیبات بازدارنده از رشد باکتری عصاره رنگی آناتو طی افزایش غلظت آناتو می‌باشد و این موضوع باعث تاثیر بیشتر عصاره‌ی رنگی آناتو در غلظت‌های بالاتر می‌شود.



شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف رنگ آناتو بر جمعیت *S. enteritidis* در سس مایونز و دمای 4°C ، طی زمان نگهداری

Hathcox, A. K., Beuchat, L. R. & Doyle, M. P. (1995). Death of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Real Mayonnaise and Reduced-Calorie Mayonnaise Dressing as Influenced by Initial Population and Storage Temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (12): 4172-4177.

International commission on microbiological specifications for foods [ICMSF]. (1980). Mayonnaise and salad dressing. In microbial ecology of foods. Vol 2. Food commodities, Academic press, London, 753-760.

Kurniawati, P. T., Soetjipto, H. & Limantara, L. (2007). Antioxidant and antibacterial activities of Bixin pigment from Annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. *Indo. J. Chem.*, 7 (1): 88-92.

Liu, H., Xu, X. M. & Guo, Sh. D. (2007). Rheological, texture and sensory properties of low-fat mayonnaise with different fat mimetics. *Journal of Food Science and Technology*, 40: 946-954.

Lock, J. L. & Board, R. G. (1994). The fate of *Salmonella enteritidis* PT4 in deliberately infected commercial mayonnaise. *Food Microbiology*, 11: 499-504.

Perales, I. & Garc, M. I. (1990). The influence of pH and temperature on the behavior of *Salmonella enteritidis* phage type 4 in home-made mayonnaise. *Letters in Applied Microbiology*, 10: 19-22.

Preston, H. D. & Rickard, M. D. (1980). Extraction and chemistry of Annatto. *Food Chemistry*, 5: 47-56.

Satyarayana, A., Prabhakara, P. G. & Rao, D. G. (2003). Chemistry, processing and toxicology of annatto (*Bixa orellana* L.). *Journal of Food Science*, 40 (2): 131-141.

Smith-Palmer, A., Stewart, J. & Fyfe, L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Food Microbiology*, 26: 118-122.

Smittle, R. B. (2000). Microbiological safety of mayonnaise, salad dressing and sauces produced in the United States. *Journal food protection*, 63 (8): 1144-1153.

Zhang, H., Kong, Y. & Xiong, X. (2009). Antimicrobial activity of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4°C. *Journal of Meat science*, 81: 686-692.

بررسی امکان استفاده از کیتوزان به عنوان یک نگهدارنده طبیعی در سس مایونز. *مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی*، سال ۱۲، شماره ۴۳، صفحات ۳۶۱-۳۷۰.

بی نام. (۱۳۶۰). موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، تهیه نمونه‌ها از مواد غذایی و شمارش میکروارگانیسم‌های مختلف، شماره استاندارد ۳۵۶، تجدید نظر دوم

ضابطیان حسینی، ف.، مرتضوی، س. ع.، فضل‌بزاز، ب. ص.، کوچکی، آ. و بلوریان، ش. (۱۳۸۹). بررسی اثر ضد میکروبی عصاره آویشن باغی بر موجود در *Salmonella enteritidis* PT4 سس مایونز. *نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران*، جلد ۶ شماره ۲، صفحات ۸۴-۹۰.

Alves de Lima, R. O., Azevedo, L., Ribeiro, L. R. & Salvadori, D. M. F. (2003). Study on the mutagenicity and antimutagenicity of a natural food colour (annatto) in mouse bone marrow cells. *Food and Chemical Toxicology*, 41: 189-192.

Boonmar, S., Bangtrakulnonth, A., Pornrunangwong, S., Terajima, J., Watanabe, H., Kaneko, K. & Ogawa, M. (1998). Epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* isolates from humans and broiler chickens in Thailand by phages typing and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 36 (4): 971-974.

Burt, S. (2004). Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods, a Review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.

Castello, M., Chandra, N., Phatak, A. & Madhuri, S. (2004). Estimation of bixin in seeds of *Bixa orellana* L. from different locations in Western Maharashtra. *Indian J. Plant Physiol.* 9 (2): 185-188.

Chowdhury, A. I., Molla, A. I., Sarker, M., Rana. A. A., Ray, S. K., Nur. H. P. & Karim, M. M. (2006). Preparation of edible grade dye and pigments from natural source *Bixa Orellana* Linn. *International Journal of Basic & Applied Sciences*, 10 (4): 7-22.

Galindo-Cuspinera, V., Westhoff, D. C. & Rankin, S. A. (2003). Antimicrobial properties of commercial annatto extracts against selected pathogenic lactic acid and spoilage microorganisms. *Journal of Food Protection*, 66: 1074-1078.