جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقاله پژوهشی
(Original Article)

دوره هشتم، شماره چهارم، مهر ـ آبان ۹۳
صفحه ۵۳ الی ۵۷

اثر ضدباکتریایی رنگ آناتو بر چند باکتری بیماری‌زا

محمود یلمه[1*]، محمدباقر حبیبی نجفی[2]، رضا فرهوش[2]، فرشته حسینی[3]

[1]کارشناس ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

[2]استاد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

[3]مربی علوم صنایع غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی، مشهد، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: امروزه، مضرات آنتی‌بیوتیک‌ها و نگهدارنده‌های سنتزی مشخص شده است و محققین در پی جایگزین‌هایی با منشأ طبیعی و ایمن هستند. رنگ آناتو از جمله رنگهای پرمصرف در صنعت غذا بوده که دارای خصوصیات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. این مطالعه با هدف تعیین اثر ضدمیکروبی رنگ آناتو بر چند باکتری پاتوژن انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه، رنگ آناتو از دانه‌های آناتو به روش خیساندن استخراج و پس از فیلتراسیون، با آون تحت خلأ به شکل پودر درآورده شد. ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی به روش انتشار دیسک صورت گرفت و میزان حداقل غلظت بازدارنده از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشنده باکتری (MBC) به کمک روش رقت آگار بر روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا اینوکوا*، *باسیلوس سرئوس* و *سالمونلا اینتریتیدیس* محاسبه شد.

یافته‌ها: در این مطالعه، *باسیلوس سرئوس* و *سالمونلا انتریتیدیس* به ترتیب بیشترین و کمترین حساسیت را به رنگ آناتو نشان دادند. *سالمونلا انتریتیدیس* بین باکتری‌های مورد آزمون، بیشترین MIC را داشت و در غلظت‌های مورد آزمون رنگ آناتو تنها برای *سالمونلا انتریتیدیس*، MBC مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج این مطالعه، رنگ آناتو بر رشد تمام باکتری‌های مورد آزمون مؤثر است. همچنین اثر ضدمیکروبی رنگ آناتو بر باکتری‌های گرم مثبت مورد آزمون نسبت به باکتری‌های گرم منفی به کار رفته بیشتر است. لذا با توجه به نتایج آزمایش می‌توان از رنگ آناتو به‌عنوان یک ممانعت‌کننده از رشد باکتری استفاده نمود.

کلید واژه‌ها: مواد رنگی؛ آناتو؛ مواد ضدعفونی‌کننده؛ بیماری‌زا.

*نویسنده مسئول مکاتبات:
محمود یلمه، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
mahmud.yolmeh@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۲/۵/۲۸

تاریخ پذیرش: ۹۲/۷/۱۷

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Yolmeh M, Habibi Najafi MB, Farhoosh R, Hosseini F. Evaluation of the antibacterial activity of annatto dye on some pathogenic bacteria. Qom Univ Med Sci J 2014;8(4):53-57. [Full Text in Persian]

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

امروزه، آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند که متأسفانه امکان ایجاد سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک وجود دارد (۱). بنابراین، تلاش‌های بسیاری جهت جایگزین کردن داروهایی با منشاء گیاهی انجام گرفته است؛ زیرا ترکیبات ضدمیکروبی گیاهی با ساختارهای متفاوت از آنتی‌بیوتیک‌ها، موجب از بین رفتن باکتری شده که از نظر بالینی، این موضوع در درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های مقاوم میکروبی حایز اهمیت است (۲). استفاده از افزودنی‌های طبیعی به‌عنوان ترکیبات ضدمیکروبی، راه حلی مناسب جهت کنترل باکتری‌های بیماری‌زا و افزایش مدت ماندگاری مواد غذایی فرآوری‌شده می‌باشد که می‌تواند باعث کاهش خطرات بهداشتی و ضررهای اقتصادی ناشی از رشد میکروب‌هایی با منشاء غذایی گردد (۳). عصاره‌های طبیعی می‌توانند در بخش‌های مختلف سلول از جمله دیواره سلولی، غشای سیتوپلاسمی، پروتئین‌های غشای سیتوپلاسمی ایجاد اختلال کنند و یا باعث منعقد و کواگوله شدن محتویات سیتوپلاسم و نشت اجزای سیتوپلاسمی‌شده و بدین ترتیب از رشد باکتری‌ها ممانعت کنند (۴). عصاره آناتو یک رنگ طبیعی کاروتنوئیدی است و از دانه‌های درخت *بیکسا اورلانا* که در مناطق گرم و مرطوب می‌روید به‌دست می‌آید. '۹- سیس - بیکسین جزء رنگی عمده (حدود ۸۰٪) در عصاره استخراج‌شده بوده که محلول در روغن است، '۹- سیس - نوربیکسین نیز محلول در آب بوده و جزء بعدی را تشکیل می‌دهد (۵). عصاره قسمت‌های مختلف گیاه آناتو علاوه بر درمان بیماری‌ها، برای درمان تومور و سرطان‌های مختلف نیز استفاده می‌شود (۶). براساس تحقیقات انجام‌شده رنگ آناتو دارای ویژگی آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی است (۷). آناتو به‌عنوان رنگ طبیعی و سالم که رنگ نارنجی تا قرمز ایجاد می‌کند در فرآورده‌های غذایی مختلف مانند فرآورده‌های قنادی و نانوایی، لبنی، گوشتی، برنج و انواع مرباها استفاده می‌شود (۸). بنابراین به‌علت استفاده زیاد از رنگ آناتو در صنعت غذا، بررسی‌های زیادی جهت ایمن بودن رنگ آناتو انجام شده است که نتایج این تحقیقات هیچ‌گونه اثر منفی ناشی از مصرف رنگ آناتو را نشان نداده‌اند (۹،۱۰).

این مطالعه با هدف تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد باکتری و حداقل غلظت باکتری‌کشی عصاره رنگی آناتو برای *باسیلوس سرئوس*، *لیستریا اینوکوا*، *سالمونلا انتریتیدیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام شد.

روش بررسی

باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923) و *لیستریا اینوکوا* (ATCC 33090) از گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی، *باسیلوس سرئوس* (ATCC 70876) و *سالمونلا انتریتیدیس* از گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی تهیه شد. از محیط‌های کشت نوترینت براث، تریپتون سوی براث، تریپتون سوی آگار و مولر هینتون آگار (محصول شرکت آلمان) استفاده شد. دانه آناتو از شهر حیدرآباد کشور هند تهیه گردید. به‌منظور استخراج رنگ آناتو، روش Castello و همکاران (سال ۲۰۰۴) به کار برده شد که طبق آن، مقداری دانه آناتو به مدت ۶ ساعت در هگزان جهت روغن‌زدایی (defatting) خیسانده شد، سپس دانه‌های روغن‌زدایی‌شده به‌منظور استخراج رنگ در حلال آلی استون خیسانده شدند (۱۱). عصاره‌های رنگی پس از فیلتراسیون، به‌وسیله روتاری اواپراتور تغلیظ و این عصاره به‌وسیله آون تحت خلأ به پودر تبدیل شد. جهت جلوگیری از آسیب حرارتی باندهای دوگانه کونژوگه، طی خشک کردن از دمای پایین (۴۰ درجه سانتیگراد) استفاده گردید. درصد بازده استخراج رنگ با استفاده از فرمول:

(تقسیم وزن رنگ حاصله بر وزن دانه آناتو)×۱۰۰=درصد بازده استخراج رنگ

محاسبه شد.

همچنین جهت بررسی اثر ضدمیکروبی رنگ آناتو، از روش انتشار دیسک در محیط کشت مولر هینتون آگار استفاده گردید بدین ترتیب‌که از باکتری‌های فعال‌شده (۲۴ ساعت رشد کرده)، سوسپانسیونی معادل با کدورت لوله ۰/۵ مک‌فارلند استاندارد تهیه شد، سپس توسط سواپ استریل از لوله حاوی سوسپانسیون باکتری مقداری برداشت شده و در محیط کشت مولر هینتون آگار به شکل سطحی کشت داده شد.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

دیسک‌های استریل با قطر ۶ میلی‌متر در محلول رنگی آناتو با غلظت‌های تعیین‌شده (۰/۵، ۱/۵، ۲/۵، ۳/۵، ۵ میلی‌گرم بر لیتر) خیسانده شدند و از آنها در سطح پتری‌دیش‌ها استفاده گردید، در ادامه، پتری‌دیش‌های تلقیح‌شده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و بعد از ۲۴ ساعت قطر هاله‌های عدم رشد اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شدند (۱۲). همچنین یک پلیت فاقد باکتری به‌عنوان شاهد منفی و یک پلیت نیز بدون رنگ آناتو به‌عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد. جهت مقایسه قطر هاله عدم رشد آنها با قطر هاله عدم رشد دیسک‌های آغشته به رنگ آناتو نیز از دیسک‌های حاوی آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و جنتامایسین استفاده گردید.

برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده از رشد رنگ آناتو، روش رقت آگار به کار برده شد؛ بدین ترتیب‌که محلول رنگی آناتو با محیط کشت مولر هینتون آگار مخلوط شده و باکتری‌ها به‌صورت پورپلیت کشت داده شدند، پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد، رشد باکتری‌ها بررسی گردید و اولین پتری‌دیشی که باکتری در آن نتوانست رشد کند، به‌عنوان کمترین غلظت بازدارنده از رشد در نظر گرفته شد (۱۳). در این آزمایش از غلظت‌های ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲ و ۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره رنگی آناتو، همچنین ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری با کدورتی برابر استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند استفاده گردید.

یک پتری‌دیش حاوی محیط کشت و فاقد باکتری به‌عنوان شاهد منفی (بیانگر عدم وجود آلودگی) و یک پتری‌دیش حاوی محیط کشت و باکتری مورد نظر به‌عنوان شاهد مثبت (بیانگر قدرت رشد باکتری) نیز در نظر گرفته شد (۱۳).

برای تعیین کمترین غلظت کشنده، روش رقت آگار به کار برده شد، با این تفاوت که در پتری‌دیشی که به‌عنوان MIC در نظر گرفته شده بود، در محیط نوترینت براث، کشت فرعی انجام شد که در صورت عدم مشاهده رشد در محیط مغذی، غلظت MBC با غلظت MIC برابر بود، لذا با مشاهده رشد باکتری در محیط کشت مغذی، از باکتری‌های رشدکرده در این محیط به محیط کشت مولر هینتون آگار حاوی عصاره آناتو با غلظت‌های بیشتر، کشت فرعی داده شد که در نتیجه غلظتی از رنگ آناتو که در آن رشد باکتری مشاهده نگردید به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد. از غلظت‌های ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴ و ۱۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از رنگ آناتو نیز برای تعیین MBC استفاده شد.

یافته‌ها

راندمان استخراج رنگ از دانه آناتو، با توجه به فرمول ارائه‌شده، ۳/۹۵٪ بود. رنگ دانه آناتو بر رشد باکتری‌های مورد نظر اثر داشت و هاله عدم رشد در آنها تشکیل شد، هرچند قطر هاله در باکتری‌های مختلف، متفاوت بود (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: قطر هاله عدم رشد باکتری توسط رنگ آناتو برحسب میلی‌متر

غلظت محلول رنگی / باکتری	۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۳/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	دیسک آنتی‌بیوتیک
باسیلوس سرئوس	۸/۸	۹/۵	۱۱/۵	۱۲/۵	۱۲/۷	۱۳ پ
لیستریا اینوکوا	۸/۲	۹	۹/۸	۱۱/۲	۱۲/۲	۲۲ پ
سالمونلا انتریتیدیس	۶/۸	۸/۱	۸/۹	۱۰/۸	۱۱/۲	۱۰ ج
استافیلوکوکوس اورئوس	۸	۸/۵	۱۰	۱۱	۱۱/۴	۳۲ پ

* پ: دیسک آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین، ج: دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین.

رنگ آناتو، اثر بازدارندگی بر رشد باکتری‌های مورد آزمون داشت، همچنین *باسیلوس سرئوس* و *سالمونلا انتریتیدیس* به ترتیب کمترین و بیشترین غلظت بازدارنده از رشد را نشان دادند (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: حداقل غلظت بازدارنده از رشد باکتری توسط رنگ آناتو

غلظت محلول رنگی / باکتری	۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	١٦ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	٦٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	شاهد منفی	شاهد مثبت
باسیلوس سرئوس	+	+	+	–	–	–	–	+
لیستریا اینوکوا	+	+	+	+	–	–	–	+
سالمونلا انتریتیدیس	+	+	+	+	+	–	–	+
استافیلوکوکوس اورئوس	+	+	+	+	–	–	–	+

کمترین میزان MBC برای باکتری *باسیلوس سرئوس* (معادل غلظت MIC) و بیشترین میزان MBC (۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) برای باکتری‌های *لیستریا اینوکوا* و *استافیلوکوکوس* مشاهده گردید، اما برای *سالمونلا انتریتیدیس* MBC مشاهده نشد (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۳: حداقل غلظت کشنده باکتری توسط رنگ آناتو

غلظت محلول رنگی / باکتری	۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	٦٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۱۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر
باسیلوس سرئوس	+	–	–	–	–
لیستریا اینوکوا	+	+	+	–	–
سالمونلا انتریتیدیس	+	+	+	+	+
استافیلوکوکوس اورئوس	+	+	+	–	–

بحث

نتایج حاصل از قطر هاله عدم رشد باکتری نشان داد رنگ آناتو بر رشد همه باکتری‌های مورد آزمون مؤثر است، بدین صورت‌که بیشترین قطر هاله برای *باسیلوس سرئوس* و پس از آن *لیستریا اینوکوا* و کمترین قطر هاله مربوط به *سالمونلا انتریتیدیس* بود. نتایج حاصل از رقت آگار جهت تعیین MIC نشان داد رنگ آناتو بر رشد باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی تأثیر بیشتری دارد، به‌نحوی‌که غلظت‌هایی که از رشد *باسیلوس سرئوس* ممانعت می‌کنند بجز غلظت ۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، از رشد *سالمونلا انتریتیدیس* ممانعت نمی‌کند. Galindo-Cuspinera و همکاران (سال ۲۰۰۳)، در مورد عصاره آناتو (۲/۸٪ نوربیکسین)، محمدی سیچانی و همکاران (سال ۱۳۸۹)، در مورد اسانس گلهای بومادران و Smith-Palmer و همکاران (سال ۱۹۹۸) نیز به نتیجه‌ای مشابه دست یافتند (۱۶-۱۴)، که دلیل احتمالی آن می‌تواند حضور لیپوپلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی باشد. لیپو پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی می‌توانند مانع از رسیدن ترکیبات فعال اسانس به غشای سیتوپلاسمی باکتری‌های گرم منفی شوند (۱۷). در مطالعه حاضر، بین باکتری‌های گرم مثبت؛ *باسیلوس سرئوس* بیشترین حساسیت را به رنگ آناتو نشان داد و کمترین میزان MIC و MBC را بین باکتری‌ها داشت که این موضوع در نتایج Galindo-Cuspinera و همکاران (سال ۲۰۰۳)، در مورد اثر عصاره ۲/۸٪ نوربیکسین بر باکتری‌های پاتوژن نیز مشاهده گردید. غلظت‌های به کار رفته از رنگ آناتو (۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اثر ممانعت‌کنندگی بر *سالمونلا انتریتیدیس* داشت، اما اثر کشندگی مشاهده نشد.

Galindo-Cuspinera و همکاران نیز اثر کشندگی از عصاره ۲/۸٪ نوربیکسین بر *سالمونلا تایفی‌موریوم* را مشاهده نکردند (۱۸). برخلاف نتایج سحری و همکاران (سال ۱۳۹۱)، که طی بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره نوربیکسین ۱٪، اعلام کردند نوربیکسین ۱٪ اثر ممانعت‌کننده‌ای بر باکتری‌های گرم منفی ندارد (۱۹)، در این پژوهش عصاره رنگی آناتو بر رشد *سالمونلا انتریتیدیس* اثر بازدارندگی داشت.

نتیجه‌گیری

رنگ آناتو، رنگی با منشأ طبیعی و ایمن است و طبق نتایج، آزمایشها دارای ویژگی ضدمیکروبی هستند. بنابراین، رنگ آناتو علاوه بر ایجاد ظاهری مطلوب در مواد غذایی می‌تواند به‌عنوان یک جایگزین نگهدارنده‌های شیمیایی استفاده شود. همچنین اثر ضدمیکروبی رنگ آناتو بر باکتری‌های گرم مثبت مورد آزمون نسبت به باکتری‌های گرم منفی به کار رفته بیشتر است.

References:

1. Hojjati Bonab Z, Nikkhah E. Evaluation of antioxidant and antibacterial effect of methanolic extract from thyme (Thymus vulgar), senna (Cassia angustifolia) and licorice (Glycyrrhiza glabra). J Shahed Univ 2012;19(100):1-11. [Full Text in Persian]

2. Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E-coli O157: H7, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes. Food Control 2007 May; 18(5):414-20.

3. Azizkhani M, Misaghi A, Akhondzade Basti A, Gandomi Nasrabadi H, Hosseini H. Effects of Zataria multiflora Boiss. Essential oil on growth and gene expression of enterotoxins A, C and E in Staphylococcus aureus ATCC 29213. Int J Food Microbiol 2013 May 15;163(2-3):159-65.

4. Burt S. Essential Oils: Their antibacterial properties and potentional applications in foods, a review. Int J Food Microbiol 2004 Aug; 94(3):223-53.

5. Preston HD, Rickard MD. Extraction and chemistry of annatto. Food Chem 1980 Jan; 5(1):47-56.

6. Tibodeau JD, Isham, CR, Bible KC. Annatto constituent cis-bixin has selective antimyeloma effects mediated by oxidative stress and associated with inhibition of thioredoxin and thioredoxin reductase. Antioxid Redox Signal 2010 Oct 1;13(7):987-97.

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

8. Chowdhury AI, Molla AI, Sarker M, Rana AA, Ray SK, Nur HP, et al. Preparation of edible grade dye and pigments from natural source bixa orellenae linn. Int J Basic Appl Sci 2006;10(4):7-22.

9. Satyarayana A, Prabhakara Rao PG, Rao DG. Chemistry, processing and toxicology of annatto (Bixa orellana L.). J Food Sci Technol 40(2):131-141.

10. Alves de Lima RO, Azevedo L, Ribeiro LR, Salvadori DMF. Study on the mutagenicity and antimutagenicity of a natural food colour (annatto) in mouse bone marrow cells. Food Chem Toxicol 2003 Feb; 41(2):189-92.

11. Castello M, Chandra N, Phatak A, Madhuri S. Estimation of bixin in seeds of Bixa orellana L. From different locations in Western Maharashtra. Indian J Plant Physiology 2004;9(2):185-8.

12. Skaltsa HD, Demetoz C, Lazari D, Sokovic M. Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight Stachys species from Greece. Phytochemistry 2003 Oct; 64(3):743-52.

13. Manenzhe NJ, Potgieter N, Ree TV. Compostion and antimicrobial activities of volatile components of lippia javanica. Phytochemistry 2004 Aug; 65(16):2333-6.

14. Galindo-Cuspinera V, Westhoff DC, Rankin SA. Antimicrobial properties of commercial annatto extracts against selected pathogenic lactic acid and spoilage microorganisms. J Food Prot 2003 Jun; 66(6):1074-8.

15. Mohammadi-Sichani M, Amjad L, Mohammadi-Kamalabadi M. Antibacterial activity of methanol extract and essential oil of Achillea wilhelmsii against pathogenic bacteria. Zahedan J Res Med Sci 2011;13(3):9-14. [Full Text in Persian]

16. Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. Antimicrobial properties of plant ssential oils and essences against five important food-borne pathogens. Lett Appl Microbiol 1998 Feb; 26(2):118-22.

17. Mckeegan KS, Borges-Walmsley MI, Walmsley AR. Microbial and viral drug resistance mechanisms. Trends Microbiol 2002;10(10 Suppl):S8-14.

18. Galindo-Cuspinera V. Volatile composition and antimicrobial properties of commercial annatto (Bixa orellana l.) extracts, a natural food colorant (UMI number: 3112464). University of Maryland; 2003.

19. Sahari MA, Zarringhalami S, Sattari M. Evaluation of antibacterial effect of annatto (norbixin) against several pathogenic bacteria. J Food Sci Technol 2012;35(9):17-23.