Food Hygiene, Vol. 11, No. 41, Spring 2021

"Research article" **DOI: 10.30495/JFH.2021.1910502.1287**

The Effect of Marinating Camel Meat with Ginger Aqueous Extract and Citric Acid on Microbial and Chemical Characteristics

Dayani Araghi, V.[1], Zamindar, N.[2*], Golabadi, M.[3]

1. M.Sc Graduate of Food Industry, Isfahan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
3. Associate Professor, Department of Plant Breeding, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

[*]Corresponding Author: n.zamindar@khuisf.ac.ir

(Received: 2020/9/25 Accepted: 2021/2/24)

Abstract

Marinating meat in solutions containing organic acids and plant extracts reduces the microbial load and increases its shelf life. In the present study, the effect of marinating camel meat with an aqueous extract of ginger and citric acid was investigated on the growth rate of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria and changes in pH and total volatile nitrogen (TVN). For this purpose, camel thigh meat samples were divided into 8 groups, including the control group (marinated in distilled water) and groups marinated with citric acid (0.5, 1.5, and 1.5%) and groups marinated with a combination of aqueous extract of 30% ginger and citric acid (0.5, 1.5 and 1.5%). The samples were stored at 4 °C and after 24 and 48 hours, microbiological and chemical tests were performed. The results showed that there was a statistically significant difference between the control and other groups ($P< 0.05$). The Control group showed the highest microbial growth in both time intervals. The lowest pH was observed in 1.5% citric acid marinade, while the highest pH was related to the control group and ginger extract solution. The Control group showed the highest TVN after 48 h ($P< 0.05$). Based on the results, it can be concluded that changes in the concentration of citric acid and ginger extract affected the growth of *S. aureus* and *E. coli* inoculated on camel meat and increased its shelf life in refrigerated temperatures.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Marinating, Camel meat, Ginger aqueous extract, Citric acid

«مقاله پژوهشی» DOI: 10.30495/JFH.2021.1910502.1287

بررسی اثر ماریناد کردن با عصاره‌ی آبی زنجبیل و اسیدسیتریک روی برخی از ویژگی‌های میکروبی و شیمیایی گوشت شتر

وجیهه دیانی‌عراقی[۱]، نفیسه زمین‌دار[۲*]، مریم گل‌آبادی[۳]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران
۲. دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران
۳. دانشیار، گروه اصلاح نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات: n.zamindar@khuisf.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۹/۷/٤ پذیرش نهایی: ۹۹/۱۲/٦)

چکیده

ماریناد کردن گوشت در محلول‌های حاوی اسیدهای آلی و عصاره گیاهان سبب کاهش بار میکروبی و افزایش زمان ماندگاری آن می‌شود. در مطالعه حاضر اثر ماریناد کردن گوشت شتر در عصاره آبی زنجبیل و اسیدسیتریک بر میزان رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کولای* و تغییرات pH و کل مواد ازته فرار (TVN) مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور نمونه‌های گوشت ران شتر به گروه کنترل (آب مقطر) و گروه‌های ماریناد شده با اسیدسیتریک (۰/۵ و ۱ و ۱/۵ درصد) و ترکیب عصاره آبی زنجبیل ۳۰ درصد و اسیدسیتریک (۰/۵ و ۱ و ۱/۵درصد)، دسته‌بندی شدند. نمونه‌ها در دمای ٤ درجه سلسیوس نگهداری شده و پس از زمان‌های ٢٤ و ٤٨ ساعت، آزمون‌های میکروبی و شیمیایی انجام پذیرفت. نتایج نشان داد که بین گروه کنترل با سایر گروه‌ها، اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت ($P<۰/۰۵$). بیشترین رشد میکروبی در زمان ٢٤ و ٤٨ ساعت مربوط به گروه کنترل بود. کمترین میزان pH مربوط به اسیدسیتریک ۱/۵ درصد و بیشترین آن در گروه کنترل و عصاره زنجبیل ۳۰ درصد مشاهده شد. مقدار TVN در نمونه کنترل در زمان ٤٨ ساعت نسبت به سایر گروه‌های ماریناد به شکل چشم‌گیری بالاتر بود ($P<۰/۰۵$). با توجه به نتایج به‌دست‌آمده مشخص شد که تغییرات غلظت اسیدسیتریک بر میزان رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کولای* تلقیح شده بر گوشت شتر مؤثر بوده است.

واژگان کلیدی: ماریناد، گوشت شتر، عصاره آبی زنجبیل، اسیدسیتریک

مقدمه

یکی از مسائل مورد توجه محققین مواد غذایی کنترل میکروارگانیسم‌ها می‌باشد و این کنترل به‌منظور جلوگیری و یا کاهش فساد، کاهش یا حذف عوامل بیماری‌زا ضروری است. هدف از نگهداری مواد غذایی، ممانعت از بروز فساد توسط عوامل خارجی و یا داخلی است که به‌دنبال آن بتوان مواد غذایی را برای مدت معینی قابل‌مصرف نگه‌داشت. در نگهداری مواد غذایی روش‌های مختلفی وجود دارد که بیشتر برای از بین بردن میکروارگانیسم به‌کار می‌روند (Razavi Rohani, 2001).

در حال حاضر مسئله فساد گوشت و خطرات ناشی از آن باعث شده‌است که محققان با دقت بیشتری فلور میکروبی گوشت را مورد آنالیز قرار دهند. باکتری‌های موجود در گوشت و فرآورده‌های آن، معمولاً شامل باکتری‌های داخلی هستند که توسط بعضی از جریانات به بافت‌های عضلانی نفوذ کرده و از آن‌جا به بخش‌های عمقی نیز سرایت می‌کنند (Rencen, 2000). مطابق استاندارد ملی ایران در ارتباط با گوشت خام دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکولای* به‌عنوان شاخص آلودگی گوشت خام مطرح‌شده‌اند (INSO, 2394/ 2007).در این میان، گوشت شتر به دلیل داشتن چربی کم و ظرفیت نگهداری آب بالا، به‌عنوان یک منبع غذایی سالم توصیه شده‌است. با افزایش تقاضا برای مصرف گوشت شتر توجه به کیفیت و ترکیبات شیمیایی آن اهمیت بیشتری پیداکرده است. یکی از روش‌های مؤثر در روند آماده‌سازی و نگهداری گوشت خام ماریناد کردن می‌باشد. ماریناد کردن قبل از پختن سبب ایجاد تردی و افزایش عطروطعم در مواد غذایی، به‌ویژه در گوشت می‌شود (Friedman *et al*., 2016).

اسیدهای آلی به‌عنوان یکی از مواد مورد مصرف در ترکیب مارینادها می‌توانند رشد میکروارگانیسم‌هایی مانند سالمونلا، اشریشیاکولای و کمپیلوباکتر را در محیط آزمایشگاهی متوقف سازند. در میان اسیدهای مورد مصرف در صنایع غذایی، اسیدسیتریک بیشترین کاربرد را داشته و ۶۰ درصد از مصرف اسیدهای خوراکی را در صنایع غذایی به خود اختصاص داده است (Fatemi, 2014).

علاوه بر استفاده از اسیدهای آلی در ماریناد کردن گوشت، به‌کارگیری موادی که دارای فعالیت پروتئولیتیکی و خاصیت ضدمیکروبی هستند نیز رایج است. عصاره‌ی آبی حاصل از ریزوم زنجبیل تازه یکی از موادی است که به دلیل خصوصیات ذکرشده، در صنعت گوشت کاربرد دارد (Ali *et al*., 2014). زنجبیل گیاهی است که هزاران سال در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری به‌عنوان داروی گیاهی کشت می‌شود. ترکیبات این گیاه شامل: ۵۰ درصد نشاسته، ۹ درصد پروتئین، ۸-۶ درصد لیپید (گلیسریدها، فسفات‌ها، لیسیتین و اسیدهای‌چرب)، ۶-۲ درصد پروتئازها، ۳-۱ درصد روغن‌های فرار نظیر جینجرول، زینجیبریاسه، زینجیبرول، شاگول، ویتامین A و B_3 یا نیاسین است. این گیاه همچنین دارای خاصیت ضد باکتریایی است (Asadi *et al*., 2014). فعالیت ضد باکتریایی زنجبیل ممکن است به دلیل وجود ترکیباتی

مـانند جرانیول، ۸، ۱- سـپتئول، لینالل، آلفا ترپینئول، آلفا پینن باشد (Vagionas *et al*., 2007; Giles *et al*., 2010).

بـا توجه به اثرات مضـر اسـتفاده از مواد نگه‌دارنده شـیمیایی، مصـرف‌کنندگان و تولیدکنندگان مواد غذایی خواهان به‌کارگیری نگه‌دارنده‌های طبیعی نظیر اسانس‌ها و عصـاره‌هـای گیـاهی هسـتند، که علاوه برافزایش زمان مـاندگاری غذا از اثرات مضـر نگهدارنده‌های شـیمیایی درامان باشند (Moradi *et al*., 2015). هدف از این مطالعه، تعیین اثر ماریناد کردن گوشـت شـتر توسط عصاره‌ی آبی زنجبیل و اسـیدسـیتریک در میزان رشـد دو باکتری مهم شـاخص آلودگی گوشـت (*استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشـریشیا کولای*) و همچنین تأثیر آن بر تغییرات میزان pH و کل مواد ازته فرار (TVN) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

- فعال‌سازی باکتری‌ها

باکتری‌های *اسـتافیلوکوکوس اورئوس* ATTC 25923 و *اشـریشیا کولای* ATTC 5922 از مؤسسه انستیتو پاستور ایران به‌صورت ویال‌های لیوفیلیزه خریداری شد.

بـه‌منظور تعیین میزان تلقیح میکروبی، بـاکتری‌هـای لیوفیلیزه به محیط کشـت آبگوشـت BHI(Biolife, Italy) منتقـل گردیـده و ۲ مرتبـه متوالی در دمـای ۳۷ درجـه سـلسـیوس به مدت ۱۸ سـاعت گرمخانه‌گذاری شـدند. جذب نوری سـوسـپانسـیون میکروبی را توسـط دسـتگاه اسـپکـتـروفـتـومـتر (Unico UV/V 2100,USA) در طول‌موج ۶۰۰ نـانومتر بـه ۰/۰۸ تـا ۰/۱ رسـانـده و لولـه اسـتاندارد نیم مک‌فارلند تهیه شـد. از لوله نیم مک‌فارلند، رقت‌های ۱۰تایی تهیه و جهت به‌دسـت آوردن دوز تلقیح 10^3، در این آزمایش اسـتفاده گردید (Wiegand *et al*., 2008; Kumar *et al*., 2011).

- آماده‌سازی عصاره زنجبیل

برای تهیه عصـاره سـترون، ریزوم تازه زنجبیل از یک بازار محلی در استان همدان خریداری شد. ریزوم‌ها توسط آب گرم و شـوینده (صابون مایع) پاک‌سازی‌شده و توسط دسـتمال تمیز کاملاً خشـک شدند. سپس به مدت ۳۰ ثانیه در الکـل اتانول ۷۰ درجه (Merck, Germany) غوطه‌ور گردیـد، آنگاه از الکل خارج و پس از تبخیر شـدن الکل موجود در سـطح گیاه، به‌وسـیله چاقوی سترون در شرایط اسپتیک پوست‌گیری شد (INSO, 6806-1/ 2005). پس از پوسـت‌گیری و تکـه‌تکـه نمودن زنجبیـل‌ها با آب مقطر اسـتریل سرد (دمای ٤ درجه‌ی سلسیوس) به‌مقدار مساوی وزن زنجبیـل در مخلوط‌کن (Panasonic MJ-W176P, Japan) اسـتریل، به‌مدت ۲-۱ دقیقه مخلوط شـد. مخلوط هموژن حاصـل توسط پارچه‌ی چیت ٤ لایه استریل، فیلتر شـده و برای تهیه عصـاره ۳۰ درصد آبی مورداستفاده قرار گرفت (Kim *et al*., 2015).

جهت کنترل سـترون‌سازی عصاره تهیه شده، از محیط کشـت پلیت کانت آگار (Biolife, Italy) و روش کشـت سـطحی اسـتفاده شـد و کشـت‌ها را در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری نموده و پس از این مدت پلیت‌ها ازنظر رشـد پرگنه مورد بررسـی قرار گرفتند (INSOI, 5272/ 2014).

- بررسی اثر ضد میکروبی عصاره

به‌منظور بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره‌ی زنجبیل ۳۰ درصد از روش چاهک پلیت استفاده شد. برای این کار با استفاده از سواپ استریل در دو پلیت به قطر ۱۰ سانتی‌متر که حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار (Biolife, Italy) بودند کشت از استاندارد نیم مک‌فارلند دو باکتری مذکور داده شد. روی هرکدام از پلیت‌ها به‌وسیله پیپت پاستور استریل ۳ چاهک به قطر ۵ میلی‌متر و ضخامت ٤ میلی‌متر زده شد. از عصاره زنجبیل ۳۰ درصد (حجمی/حجمی) به میزان ۱۰۰ میکرو لیتر به چاهک‌ها در دو پلیت کشت داده‌شده از دو باکتری منتقل شد و از آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی و آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (برای *اشریشیاکولای*) و آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین (برای *استافیلوکوکوس‌اورئوس*) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. به‌منظور جذب شدن مواد توسط محیط کشت، پلیت‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای محیط قرار گرفتند و سپس وارونه در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ٢٤ تا ٤٨ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. پس‌ازاین مدت قطر هاله عدم رشد در هر پلیت توسط کولیس اندازه‌گیری و گزارش شد (Amiri, 2006; Moghtader *et al*., 2009; Khosravinia, 2013).

- شناسایی مواد مؤثره عصاره آبی زنجبیل

شناسایی ترکیبات عصاره‌ی زنجبیل توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) انجام شد. دستگاه گاز کروماتوگرافی طیف‌سنج جرمی (Agilent, USA) مجهز به تزریق کننده و دتکتور MS بود. نوع ستون دستگاه HP-5-MS، طول ستون ٦٠ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر، ضخامت ۲۵ میکرومتر، افزایش دما ٤٠ درجه سلسیوس در دقیقه بود و با سرعت ۵ درجه به ۲۹۰ درجه رسید، گاز حامل هلیم و نوع تزریق مایع، سرعت جریان گاز ۱/۳ میلی‌متر بر دقیقه و دمای محفظه تزریق ۲۸۰ درجه سلسیوس بود. یک میکرو لیتر از عصاره آماده‌شده به دستگاه تزریق‌شده و درصد نسبی اجزای عصاره با استفاده از مواد استاندارد و مقایسه زمان بازداری برحسب دقیقه شناسایی شد (Roessner *et al*., 2017).

- آماده‌سازی گوشت شتر

گوشت ران شتر پس از کشتار، در یخچال با دمای ٤ درجه سلسیوس به مدت ٢٤ ساعت قرار گرفت وجهت انجام آزمون‌ها به آزمایشگاه منتقل شد. تا حد امکان لایه‌های چربی از نمونه‌ها حذف گردید. جهت سترون‌سازی گوشت، ابتدا در الکل اتیلیک ۷۰ درصد غوطه‌ور و سپس آتش زده‌شده تا زمانی که کلیه الکل‌های موجود در سطح سوخته و تبخیر شوند. آنگاه لایه سوخته‌ی سطح جدا گردید و از قسمت‌های داخلی، تکه‌هایی با ابعاد ۳×۳×۳ سانتی‌متر مکعب برش داده شد (Ali, 2014; Mahasti *et al*., 2015). برای اطمینان از سترون بودن تکه‌های گوشت آزمون کنترلی شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها انجام شد (INSO, 5272/ 2014).

- نحوه ماریناد کردن گوشت و تلقیح باکتری‌ها به آن

گوشت‌های آماده‌شده را درون کیسه‌های زیپ‌دار استریل قرار داده و محلول‌های ماریناد شامل اسید سیتریک با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵ درصد و عصاره آبی ریزوم

زنجبیل ۳۰ درصد هرکدام به‌تنهایی و در ترکیب باهم به کیسه‌ای حاوی تکه‌های گوشت اضافه شد. برای نمونه شاهد نیز از آب مقطر استفاده شد. نسبت محلول مارینادبه گوشت ۳ به ۱ وزنی در نظر گرفته شد، به‌طوری‌که نمونه‌ها کاملاً در محلول‌های مارینادغوطه‌ور شده و بعد از گذشت زمان‌های ۲٤ و ٤۸ ساعت نمونه‌های گوشت از داخل محلول‌ها خارج شد و مورد آزمون قرار گرفت (Irajifar *et al*., 2018).

به کیسه‌ها مقدار ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی حاوی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با غلظتی معادل محلول استاندارد ۰/۵ مک فارلند تلقیح شد. به‌منظور افزایش بازدهی و یکنواختی توزیع محلول‌های مارینادد در سطح و عمق گوشت، نمونه‌ها در دمای ٤ درجه *سلسیوس* نگهداری شدند و در زمان‌های ۲٤ و ٤۸ ساعت بعد از تلقیح آزمایش شدند. کلیه این مراحل برای باکتری *اشریشیا کولای* نیز به همین ترتیب انجام گردید.

جهت اطمینان از تعداد باکتری‌های موجود در محلول استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند، پس‌ازاینکه جذب نوری سوسپانسیون میکروبی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ٦۰۰ نانومتر به ۰/۰۸ تا ۰/۱ رسید، از لوله استاندارد نیم مک‌فارلند تهیه‌شده، کشت عمقی در محیط نوترینت آگار (Biolife, Italy) داده شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲٤ تا ٤۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. پس‌ازاین مدت تعداد پرگنه‌های موجود شمارش و گزارش شدند (Chobkar *et al*., 2010).

-آزمون‌های میکروبی و شیمیایی

برای این منظور ۱۰ گرم نمونه گوشت همگن‌شده به ۹۰ میلی‌لیتر محلول رینگر استریل اضافه شد. لوله‌های سریالی رقت با استفاده از رینگر استریل با حجم ۹ میلی‌لیتر و تا رقت 10^{-7} تهیه شد. جهت شمارش باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از محیط کشت برد پارکر آگار (Biolife, Italy) و جهت شمارش باکتری *اشریشیاکولای* از محیط کشت ائوزین متیلن‌بلو آگار (Biolife, Italy) استفاده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ٤۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. برای هر تیمار ۳ تکرار انجام شد. شکل کلنی‌ها در محیط کشت برد پارکر آگار سیاه‌رنگ، براق، برجسته و با هاله رسوبی شفاف است (ISO, 6888-1/2003). شکل کلنی‌ها در محیط کشت ائوزین متیلن‌بلو آگار سبزرنگ با جلای فلزی است (Karim, 2008).

برای اندازه‌گیری pH از دستگاه pHمتر که توسط بافر ٤ و ۷ تنظیم‌شده بود، استفاده شد. مقدار۵ گرم نمونه با ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر برای ٦۰ ثانیه در یک مخلوط‌کن همگن شد. سپس الکترود را در نمونه همگن‌شده فروبرده و pH آن اندازه‌گیری شد (Kim *et al*., 2015). همچنین برای انجام آزمون مواد ازته فرار (TVN) به‌روش کلدال، ۱۰ گرم نمونه گوشت، ۲ گرم اکسیدمنیزیم و ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به بالن تقطیر کلدال منتقل شد. در یک ارلن مایر۵۰۰ میلی‌لیتری که به‌عنوان ظرف گیرنده زیر قسمت سردکننده دستگاه تقطیر قرار گرفت، ۲۵ میلی‌لیتر محلول اسید بوریک ۲درصد و چند قطره معرف متیل‌رد اضافه

شـد. دسـتگاه تقطیر وصـل و محتوی بالن تقطیر حرارت داده‌شـد، به‌طوری‌که در مدت ۱۰ دقیقه به جوش آمد و با همین میزان حرارت ۲۵ دقیقه عمل تقطیر ادامه داده‌شـد. سـپس محلول تقطیرشـده به‌وسـیله اسـیدسـولفوریک ۰/۱ نرمال تیتر شد. برای محاسبه مواد ازته فرار، مقدار مصرفی اسـیدسـولفوریک ۰/۱ نرمال در عدد ١٤ ضـرب و میزان TVN برحسب میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم ماده گوشتی گزارش داده‌شد (Parvaneh, 2013).

-طرح مطالعه و تجزیه‌وتحلیل آماری

پژوهش در قـالـب طرح کـاملـاً تصـــادفی بـا آرایش فاکتوریل و در ســه تکرار انجام پذیرفت. برای مقایســات میانگین از آزمون LSD در سـطح احتمال ۵ درصد استفاده شـد. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد و آنـالیز واریـانس بـا بهره‌گیری از نرم‌افزارSAS و رســم نمودار با نرم‌افزار Excel انجام شد.

یافته‌ها

در بررسـی خاصـیت ضـد باکتریایی عصـاره‌ی ریزوم زنجبیل قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌های *اشریشیاکولای* و *اســتافیلوکوکوس‌اورئوس* به ترتیب ٤ و۵ میلی‌متر بود. هـمچنین قطر هـالـه مهـار رشـــد برای آنتی‌بیوتیـک ســیپروفلوکســاســین ۲۵ میلی‌متر و برای آنتی‌بیوتیـک تتراسایکلین ۲۹ میلی‌متر به دست آمد.

آنالیز ترکیبات عصـــاره زنجبیل مورداســتفاده در این مطالعه با استفاده از GC/MS در جدول (۱)، نشان داده‌شده اسـت. همان‌گونه که در جدول (۱) آمده، ترکیبات اصـلی عصـاره عبارت‌اند از: متیل‌سـیکل‌وپنتان (۳۸/۸۷ درصـد)، ۲و٤ دی‌متیـل‌ان‌دکتان (٢٤/٨٤ درصـــد)، ایزواکتان (٨/٥٦ درصـــد)، پنتـان ۲ متیـل (٥/٦٢ درصـــد)، دودکـامتیـل هگزاسـیکلوکسان (٤/٣٩ درصد)، ان دکان (۳/۸۵ درصد)، زینجیبرن (۳/۵۵ درصد).

جدول (۱)-ترکیبات شناسایی‌شده در عصاره زنجبیل

مقدار (درصد)	ترکیبات	زمان بازداری (دقیقه)
۵/۶۲	Pentane, 2-methyl	۱/۴۰۶
۳۸/۸۷	Methylcyclopentane	۱/۹۵۲
۸/۵۶	n-Octane	۲/۴۹۲
۲۴/۸۴	Undecane, 2,4-dimethyl	۲/۵۹۲
۳/۸۵	Isodecane	۵/۱۹۲
۱/۰۸	n-Dodecane	۸/۲۶۴
۰/۸۳	Geranyl alcohol (2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-,)	۹/۳۶۰
۴/۳۹	Spiro[cyclopropane-1,2'(1'H)-phenanthrene]-1',4'(3'H)-dione, 3',7',9',10'-tetrakis(acetyloxy)-4'b,5',6',7',8',8'a,9',10'-octahydro	۱۲/۲۲۵
۱/۱۳	1-Pentene, 4,4-dimethyl-1,3-diphenyl-1-(trimethylsilyloxy)-	۱۲/۲۸۸
۳/۵۵	(Zingiberene) 1,3-Cyclohexadiene, 5-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-2-methyl	۱۲/۴۰۵
۰/۸۳	alpha.-Farnesene	۱۲/۴۸۹
۰/۹۴	Cyclohexene, 1-methyl-4-(5-methyl-1-methylene-4-hexenyl)-,	۱۲/۵۵۳
۱/۵۶	beta.-Sesquiphellandrene	۱۲/۷۵۹
۲/۸۱	Aza-5,7,12,14-tetrathiapentacene	۱۴/۲۷۴
۱/۱۶	.beta.-D-Glucopyranosiduronic acid, (5.alpha.,6.alpha) -7,8-didehydro-4,5-epoxy-17-methyl-6-[(trimethylsilyl)oxy] morphinan	۱۶/۲۰۱

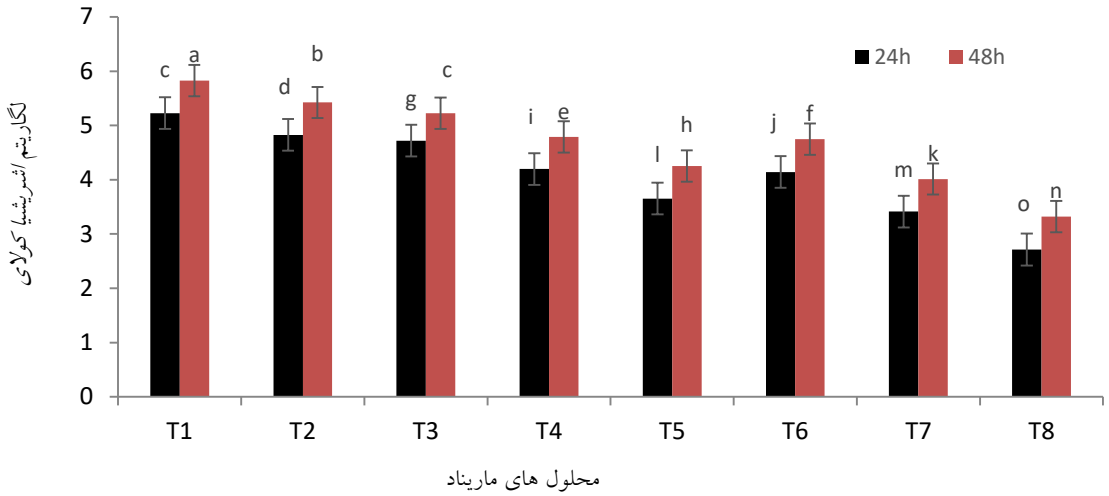
بررسی نتایج آزمون کنترل بار میکروبی تکه‌های گوشت سترون‌شده از طریق غوطه‌وری در الکل اتانل ۷۰ درصد، نشان داد که هیچ‌گونه میکروارگانیسمی در پلیت‌های کشت داده‌شده مشاهده نشد.

بررسی نتایج ویژگی‌های موردبررسی در نمودارهای (۱و۲)، نشان داد که دامنه گسترده‌ای از اختلاف در بین تیمارها دیده می‌شود، به‌طوری‌که بیشترین میزان رشد برای دو باکتری موردمطالعه مربوط به تیمار شاهد و کمترین میزان برای محلول اسید سیتریک ۱/۵ درصد بود.

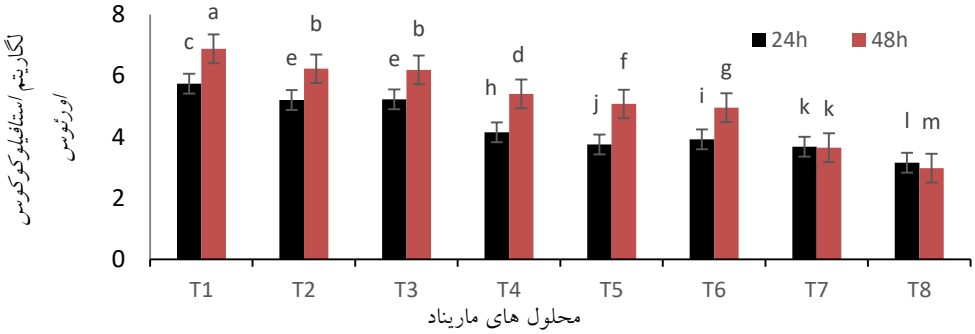
کمترین میزان pH با اختلاف معنی‌داری مربوط به اسید سیتریک ۱/۵ درصد با عدد میانگین ۴/۷۸ بود. درحالی‌که نمونه شاهد و عصاره زنجبیل ۳۰ درصد به ترتیب با مقادیر ۵/۷۴ و ۵/۷۲ نسبت به سایر محلول‌ها از بیشترین میزان برخوردار بودند. اما این دو محلول نسبت به هم اختلاف معنی‌داری نداشتند.

محلول‌های عصاره زنجبیل با اسید سیتریک ۰/۵ درصد و عصاره زنجبیل با اسید سیتریک ۱/۵ درصد و همچنین اسید سیتریک ۰/۵ درصد در مورد آزمون کل مواد ازته فرار کمترین میزان را داشتند. بیشترین میزان آزمون کل مواد ازته فرار با اختلاف معنی‌داری نسبت به بقیه محلول‌ها، به نمونه شاهد تعلق داشت.

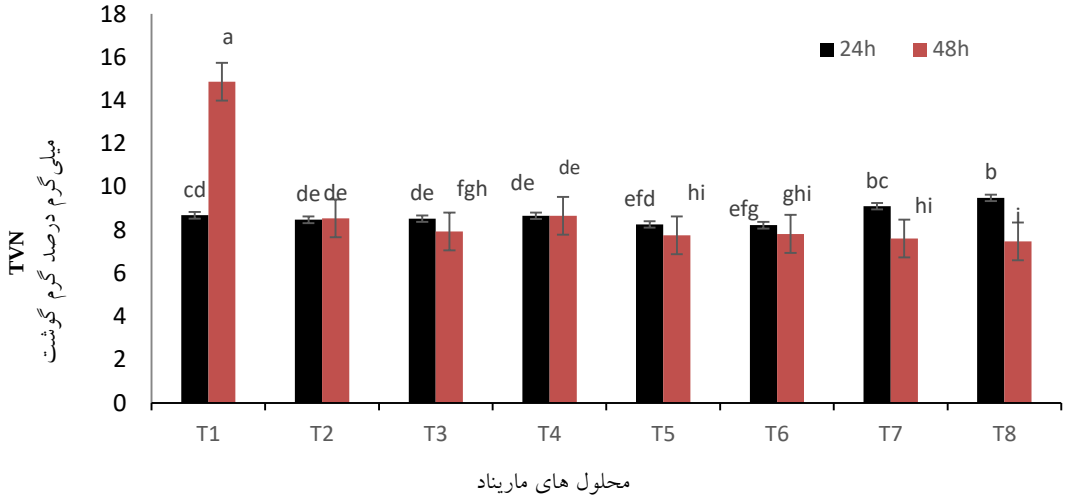
نتایج تجزیه‌وتحلیل آماری انجام‌شده بر فاکتورهای مورد آزمون در این پژوهش در نمودارهای (۱)، (۲)، (۳)، (۴)، نشان داده‌شده است.



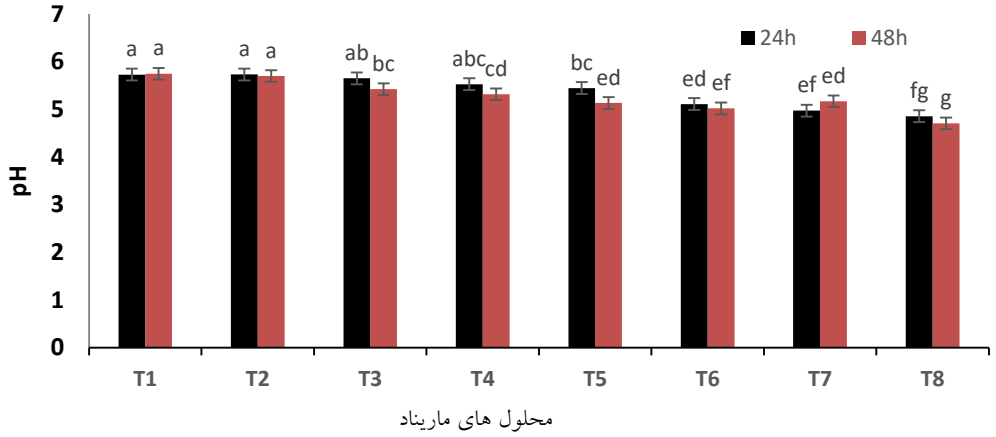
نمودار (۱)- میزان لگاریتم باکتری *اشریشیا کولای* در محلول‌های ماریناد مختلف طی ۲٤ ساعت و ٤٨ ساعت پس از تلقیح؛ T1: شاهد، T2: زنجبیل ۳۰ درصد، T3: زنجبیل ۳۰ درصد و اسیدسیتریک ۰/۵درصد، T4: زنجبیل ۳۰ درصد و اسید سیتریک ۱درصد،T5: زنجبیل ۳۰ درصد و اسید سیتریک ۱/۵ درصد، T6: اسید سیتریک ۰/۵ درصد، T7: اسید سیتریک ۱ درصد، T8: اسید سیتریک ۱/۵ درصد؛ a-o: حروف لاتین متفاوت در هر ستون نمودار نشانه تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.



نمودار (۲)- میزان لگاریتم باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در محلول‌های ماریناد مختلف طی ۲٤ ساعت و ٤٨ ساعت پس از تلقیح؛ T1: شاهد، T2: زنجبیل ۳۰ درصد، T3: زنجبیل ۳۰ درصد و اسیدسیتریک ۰/۵درصد، T4: زنجبیل ۳۰ درصد و اسید سیتریک ۱درصد،T5: زنجبیل ۳۰ درصد و اسید سیتریک ۱/۵ درصد، T6: اسید سیتریک ۰/۵ درصد، T7: اسید سیتریک ۱ درصد، T8: اسید سیتریک ۱/۵ درصد؛ a-m: حروف لاتین متفاوت در هر ستون نمودار نشانه تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.



نمودار (۳)- میزان TVNدر محلول‌های ماریناد مختلف طی ۲٤ ساعت و ٤۸ ساعت پس از تلقیح؛ T1: شاهد، T2: زنجبیل ۳۰ درصد، T3: زنجبیل ۳۰ درصد و اسیدسیتریک ۰/۵درصد، T4: زنجبیل ۳۰ درصد و اسید سیتریک ۱درصد،T5: زنجبیل ۳۰ درصد و اسید سیتریک ۱/۵ درصد، T6: اسید سیتریک ۰/۵ درصد، T7: اسید سیتریک ۱ درصد، T8: اسید سیتریک ۱/۵ درصد؛ a- i: حروف لاتین متفاوت در هر ستون نمودار نشانه تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.



نمودار (٤)- میزان pHدر محلول‌های ماریناد مختلف طی ۲٤ ساعت و ٤۸ ساعت پس از تلقیح؛ T1: شاهد، T2: زنجبیل ۳۰ درصد، T3: زنجبیل ۳۰ درصد و اسیدسیتریک ۰/۵درصد، T4: زنجبیل ۳۰ درصد و اسید سیتریک ۱درصد،T5: زنجبیل ۳۰ درصد و اسید سیتریک ۱/۵ درصد، T6: اسید سیتریک ۰/۵ درصد، T7: اسید سیتریک ۱ درصد، T8: اسید سیتریک ۱/۵ درصد؛ a-g: حروف لاتین متفاوت در هر ستون نمودار نشانه تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر نوع و میزان ترکیبات شناسایی‌شده در عصاره‌ی زنجبیل توسط دستگاه (GC/MS) بررسی شد و مشخص گردید که حدود ۹۰ درصد از ترکیبات عصاره‌ی آبی زنجبیل از ۷ ترکیب عمده تشکیل شده‌است که از جمله آن‌ها زینجیبرن بود که داری اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی بالایی است (Vagionas *et al*., 2007; Giles *et al*., 2010).

یافته‌های مطالعه‌ای نشان داد که وجود اسیدهای آلی نظیر اسید سیتریک در محلول ماریناد به‌تنهایی سبب بیشترین کاهش در پاتوژن‌های غذایی می‌شود (Hanifian and Jalilnia, 2011). این اسید با کاهش موقت pH، بر میکروارگانیسم‌های موجود در سطح ماده غذایی تأثیر می‌گذارد. به‌علاوه افزودن اسیدهای خوراکی سبب ایجاد طعم و رنگ مناسب در گوشت می‌شود (Fatemi, 2014). در این پژوهش نیز اثر ضد باکتریایی اسید سیتریک بر رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کولای*، مشاهده شد. به‌طوری‌که برای تمامی غلظت‌های اسید سیتریک (۰/۵، ۱، ۱/۵ درصد) در زمان‌های ۲٤ و ٤۸ ساعت پس از تلقیح باکتری‌ها نسبت به نمونه شاهد ازنظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵). استفاده از اسید سیتریک با غلظت ۰/۵ درصد ضعیف‌ترین و غلظت اسید سیتریک ۱/۵ درصد قوی‌ترین اثر مهارکنندگی در کنترل رشد باکتری‌ها داشتند. اثرات ضد باکتریایی اسیدها به‌طور عمده به نوع میکروب و غلظت اسید و مدت‌زمان قرار گرفتن ماده غذایی در تماس با آن وابسته است (Mortazavi, 2005).

در مطالعه حاضر با توجه به آنالیز میکروبی انجام‌شده، محلول ماریناد حاوی عصاره‌ی زنجبیل ۳۰ درصد بر کاهش رشد باکتری‌های *اشریشیا کولای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به تیمار شاهد در هر دو بازه زمانی مؤثر بود. این یافته‌ها با نتایج تحقیقی مبنی بر بررسی اثر عصاره زنجبیل در بهبود بافت گوشت شتر هماهنگی داشت به‌طوری‌که نشان داده‌شد عصاره زنجبیل ۳۰ درصد به‌عنوان بهترین غلظت، در کاهش میزان بار میکروبی گوشت شتر شامل باکتری‌های مزوفیل هوازی، باکتری‌های اسیدلاکتیک، باکتری‌های سرماگرا، *انتروباکتریاسه*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* اثر داشته و سبب افزایش ماندگاری گوشت خام شتر در دمای نگهداری ٤ درجه سلسیوس به مدت ٦ روز شده و همچنین به دلیل وجود آنزیم‌های پروتئولیتیکی زنجبیل، بافت گوشت در مدت‌زمان مورد مطالعه بهبود یافت (Ali *et al*., 2014). از سوی دیگر، محلول ماریناد حاوی عصاره‌ی زنجبیل ۳۰ درصد در ترکیب با غلظت‌های مختلف اسید سیتریک نیز بر کاهش رشد باکتری‌های *اشریشیا کولای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به تیمار شاهد مؤثر بود.

فعالیت ضد باکتریایی زنجبیل ممکن است به‌دلیل وجود ترکیباتی مانند جرانیول، ۸، ۱- سپتئول، لینالول، آلفا ترپینئول، آلفا پینن باشد (Vagionas *et al*., 2007; Giles *et al*., 2010).

در بررسی اثر متقابل اسید سیتریک و عصاره زنجبیل ترکیب باهم بر رشد باکتری‌های موردمطالعه نسبت به نمونه شاهد (آب مقطر) اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت ($P<۰/۰۵$). به‌طوری‌که استفاده ترکیب عصاره و اسید ۰/۵ درصد ضعیف‌ترین و عصاره و اسید ۱/۵ درصد قوی‌ترین اثر مهارکنندگی را در رشد باکتری‌ها داشتند. بنابراین با افزایش غلظت اسید سیتریک در محلول مارینادِ، میزان مهارکنندگی در تیمارهای ترکیبی عصاره‌ی زنجبیل و اسید سیتریک افزایش داشته است. می‌توان گفت که حساسیت باکتری‌ها به اثر ضد میکروبی عصاره‌ها با کاهش pH، اکسیژن و درجه حرارت افزایش می‌یابد و عصاره‌ها را قادر می‌سازد به‌راحتی از غشاء سلولی رد شوند (Chobkar *et al*., 2010).

نتایج نشان داد که اثر متقابل اسید سیتریک و عصاره زنجبیل باهم بر رشد باکتری‌های موردمطالعه نسبت به استفاده از عصاره زنجبیل به‌تنهایی، تفاوت آماری معنی داری داشت ($P<۰/۰۵$). این در حالی است که استفاده از غلظت‌های مختلف اسید سیتریک (۰/۵، ۱، ۱/۵ درصد) نتایج بهتری نسبت به استفاده هم‌زمان اسید سیتریک و عصاره زنجبیل بر میزان کاهش شمارش دو باکتری مورد مطالعه نشان‌داد ($P<۰/۰۵$). در حقیقت خاصیت ضد میکروبی اسیدهای آلی مربوط به آنیون‌های موجود در آن‌ها است. اسیدهای آلی به‌صورت غیر یونیزه جذب باکتری‌ها شده و بعد از یونیزاسیون در داخل باکتری، pH درونی آن را کاهش می‌دهند درنتیجه باکتری برای مقابله با این پدیده فعالیت خود را زیاد می‌کند که این امر سبب تخلیه متابولیکی میکروب و مصرف اکسیژن بیشتر و ایجاد شرایط بی‌هوازی شده و روند کاهش pH تسریع می‌گردد و درنهایت باکتری از بین می‌رود. بخش آنیونی اسید درون باکتری به دام افتاده و چون نمی‌تواند از دیواره باکتری عبور کند سبب به هم خوردن تعادل آنیونی و به وجود آمدن مشکلات اسمزی برای باکتری می‌شود (Roy *et al*., 2002; Salari *et al*., 2013).

در رابطه با تغییرات pH دیده شد که با افزایش غلظت اسید سیتریک، در محلول‌های مارینادی که از اسید به‌تنهایی و یا در ترکیب با عصاره‌ی زنجبیل استفاده‌شده، روند تغییرات pH افزایش داشته است به‌طوری‌که کمترین میزان pH در محلول مارینادِ اسید سیتریک ۱/۵ درصد و بیشترین میزان آن مربوط به نمونه شاهد بود. دلیل این پدیده را می‌توان چنین توضیح داد که با گذر زمان و افزایش میزان جذب محلول مارینادِ حاوی اسید سیتریک توسط گوشت، pH کاهش‌یافته و سبب اسیدی شدن گوشت شده‌است. بدیهی است که در مارینادهایی که از اسید با غلظت بیشتری استفاده‌شده، میزان کاهش pH نیز بیشتر بوده‌است. نتایج پژوهش حاضر با تحقیقی که در آن، اثر اسید سیتریک و عصاره‌ی زنجبیل در گوشت تازه اردک بررسی‌شده بود، هماهنگی خوبی داشت (Kim *et al*., 2015).

آزمون کل مواد ازته فرار نشان‌دهنده میزان فساد گوشت می‌باشد. گوشت در طول نگهداری دچار تغییرات مختلفی شده و حضور میکروارگانیسم‌ها و شرایط نامناسب نگهداری گوشت، سبب ایجاد فساد می‌شود. در

عین‌حال در اثر فعالیت میکروب‌ها و آنزیم‌های طبیعی گوشت و یا آنزیم‌های مترشحه از پیکر باکتری‌ها تغییرات مختلفی در گوشت به وجود می‌آید. اثر این آنزیم‌ها سبب تجزیه و شکسته شدن ساختمان پروتئینی گوشت شده و در اثر این فعل‌وانفعالات مواد فرار و آمونیاک آزاد در گوشت تولید می‌شود (Parvaneh, 2013).

در مطالعه حاضر تیمار شاهد بیشترین میزان (TVN) را نسبت به بقیه تیمارها داشت ($P<0/05$). به نظر می‌رسد اختلاف تیمار شاهد با سایر تیمارهای موردبررسی به دلیل تأثیر اسید سیتریک و عصاره زنجبیل در کاهش رشد باکتری‌های مورد آزمون و متعاقب آن جلوگیری از افزایش میزان مواد ازته فرار نسبت به نمونه شاهد در طول پژوهش بوده‌است. در تحقیقی، اثر سه اسید آلی شامل اسید سیتریک، اسید استیک و اسید پروپیونیک در برخی ویژگی‌های میکروبی و شیمیایی و ظاهری گوشت مرغ و گوشت گاو در دمای ٤ درجه سلسیوس بررسی شد و مشخص گردید، میزان TVN در نمونه‌های شاهد در پایان ۸ روز نگه‌داری تقریباً دو برابر شده‌است. استفاده از اسیدهای آلی اثر معنی‌داری در مهار افزایش TVN نسبت به تیمار شاهد داشته‌است (Hanifiyan and Galilnia, 2011). این یافته‌ها هم‌راستا با نتایج حاصل از تحقیق حاضر می‌باشد. در مدل‌های مختلف غذایی به دلیل واکنش ترکیبات نگه‌دارنده با اجزای غذا تأثیر مهارکنندگی این ترکیبات کاهش می‌یابد (Singh *et al*., 2003).

بر اساسی یافته‌های پژوهش‌های پیشین، عصاره ریزوم زنجبیل تازه به دلیل داشتن ترکیبات پروتئولیتیک سبب ایجاد بافت ترد و بهتر در گوشت شتر شده و از سوی دیگر با داشتن ترکیبات ضد میکروبی نیز باعث کاهش بار میکروبی گوشت خام شتر شده‌است (Ali *et al*., 2014). به‌کارگیری این عصاره به‌تنهایی و در ترکیب با اسید سیتریک به‌عنوان یک اسید آلی نیز سبب کاهش باکتری‌های شاخص آلودگی گوشت قرمز شده به‌طوری‌که این اثر در ترکیب با اسید سیتریک تشدید شده و با افزایش غلظت اسید سیتریک نیز اثر مهارکنندگی میکروبی عصاره هم بیشتر شده‌است. براین اساس می‌توان گفت که استفاده از عصاره زنجبیل در کنار اسید سیتریک می‌تواند روشی مناسب جهت حفظ برخی ویژگی‌های میکروبی و شیمیایی در گوشت شتر باشد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از آزمایشگاه پیشگامان کیفیت پارت که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند صمیمانه تشکر می‌نماییم.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Ali, G.M., Hoda, G.M. (2014). Tenderization of camel meat by using fresh ginger (*Zingiberofficinale*) extract. Journal of Food Science and Quality Management, 23(1): 25-38.
- Amiri, H. (2006). Antimicrobial effects of essential oil and various extracts of *Herbaceum marium Cordifolium* bovis on bacterial pathogens. Pharmacy Quarterly, 12(4): 15-19. [In Persian]
- Asadi, T., Zengoyi, n., Mosavi, m., Zakeri, M. and Bovandi, Z. (2014). Antimicrobial effects of ginger alcohol extract on some aquatic disease bacteria. Journal of Applied Fisheries Research, 3(2): 59-68. [In Persian]
- Chobkar, N., Akhondzadeh, B., Soltani, M., Sari, A. and Partovi, R. (2010). Study of Staphylococcus aureus bacterial growth in fillets of silver-processed silver carp with salt and nisin. Journal of Veterinary Research, 65(3): 198-193. [In Persian]
- Fatemi, H. (2014). Principles of food preservation technology. (7th Edition). Tehran Public Joint Stock Company, pp. 379-381. [In Persian]
- Friedman, M., Levin, C.E. and Henika, P.R. (2016). Addition of phytochemical-rich plant extracts mitigate the antimicrobial activity of essential oil/wine mixtures against *Escherichia coli* O157:H7 but not against *Salmonella enterica*. Journal of Food Control, 73(2): 562-565.
- Giles, M., Zhao, J. and Agboola, S. (2010). Chemical composition and antimicrobial properties of essential oil of three Australian Eucalyptus species. Journal of Food Chemistry, 119(2): 731-737.
- Hanifian, Sh. and Jalil Nia, M. (2011). Effect of citric, acetic and propionic acids' spray on some microbial, chemical parameters and the appearance of packaged beef. Food Hygiene, 1(1): 49-58. [In Persian].
- Iranian National Standardization Organization. (INSO), (2015). Microbiology of the food chain Horizontal method for the enumeration of microorganisms Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique. 1st revision, INSO No. 5272. [In Persian]
- Iranian National Standardization Organization. (INSO), (2005). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Enumeration of coagulase – Positive staphylococci (*staphylococcus aureus* and other species) – Test method, Part 1: Technique using baird-parker agar medium, INSO No. 6806-1. [In Persian]
- Iranian National Standardization Organization. (INSO), (2007). Microbiology red meat - Carcasses, minced red meat - Specifications and test methods. 1st revision, INSO No. 2394. [In Persian]
- International Organization for Standardization (ISO), (2003). Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of coagulase- positive Staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) -Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium. ISO No. 6888-1.
- Irajifar, M., Varidi, M.G., Varidi, M. and Zahedi, Y. (2018). Evaluation of the effect of marinade acetic acid and sodium chloride on some qualitative characteristics of camel meat. Journal of Food Industry Research, 28(1): 145-160. [In Persian]
- Karim, G. (2008). Food Microbial Tests. (5th Edition), University of Tehran Publication, pp. 65-67. [In Persian]
- Khosravinia, S., Ziaratnia, M., Bagheri, A. and Marashi, H. (2013). Study of the antibacterial effect of cell extract from Insole on cumin seed and comparison with extracts of seed and essential oil. Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology, 1(2): 92-79. [In Persian]
- Kim, C.J., Jung, T.J., Yeo, I.J., Kim, S.Y., Ham, Y.K., Kim, Y.J., *et al*. (2015). Effect of ginger extract and citric acid on the tenderness of duck breast muscles. Korean Society for Food Science of Animal Recources, 35(6): 721-730.
- Kumar, S., Joseph, L., George, M. (2011). Phytochemicalanalysis of leaf extracts of Rumex nepalensis. International Journal of Pharmaceutical Medical Innovations, 1(1):16-21.

- Mahasti, P., Ghasemi, G. and Nourisaeidlu, S. (2015). Antimicrobial effects of rosemary extract in combination with nisin on *Staphylococcus aureus* bacteria in cow's minced meat during storage in a refrigerator. Food Microbiology, 2(6): 37-49. [In Persian]
- Moghtader, M., Mansouri, A., Salari A., Farahmand A. (2009). Identification of chemical compositions and study on the microbial effect of cumin oil. Quarterly Journal of Medicinal Plants and Aromatic Herbs of Iran, 25(1): 20-28. [In Persian]
- Moradi, A., Ebrahimipour, Gh., Karkhaneh, M., Marzban, A. (2015). Study of antioxidant and antimicrobial effects of aqueous and ethanolic extracts of saline plant on indigenous microorganisms in laboratory conditions. Journal of Fasa University of Medical Sciences, 4(4): 418-426. [In Persian]
- Mortazavi, A., Ziaolhagh, H. (2005). Modern food microbiology. (Translation). Authors: Jay, M. G., Larens, M.G., Golden, D.A. 2nd Reprint, Ferdowsi University of Mashhad Publication, pp. 39-45. [In Persian].
- Parvaneh, V. (2013). Quality Control and the Chemical Analysis of Food. (7th Edition), University of Tehran Publication, pp. 250-251. [In Persian]
- Razavi Rohani, M. (2001). Food Microbiology: Urmia Veterinary Publication, p. 174. [In Persian]
- Rencen, M. (2000). Guide to the production of meat products. (Translation). Authors: Radtar, R. Dbagaran Art and Cultural Institute, p. 234. [In Persian]
- Roessner, U., Inutan, E.D., Natera, A.H., Jayasinghe, N.S., Barbosa, G.B. and Peteros, N.P. (2017). From common to are Zingiberaceac plant metabolomics study using GC-MS. Journal of Phytochemistry, 140(August): 141-150.
- Roy, R.D., Edens, F.W., Parkhurst, C.R., Qureshi, M.A., Havenstein, G.B. (2002). Influence of a propionic acid feed additive on performance of Turkey poults with experimentally induced poult enteritis and mortality syndrome. Poultry Science, 81(7): 951-957.
- Salari, G., Sahebiala, F. (2014). Effect of citric acid and two medicinal plants of fennel and fenugreek on growth performance, humoral immunity, serum proteins and microbial population of the intestine of broiler chicks. Journal of Veterinary Medicine, 10(3): 43-48. [In Persian]
- Singh, A., Singh, R.K., Bhunia, A.K. and Singh, N. (2003). Efficacy of plant essential oil as antimicrobial agents *Listeria monocytogenes* in hotdogs. Journal of Lebensm Wissenschaft Und Technologie, 36(8): 787-794.
- Vagionas, K., Graikou, K., Ngassapa, O., Runtoro, K., Chinou, I. (2007). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of three species growing in Tanzania. Journal of Food Chemistry, 103(2): 319-324.
- Wiegand, I., Hilpert, K., Hancock, R.E.W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Natural Protocols, 3(2):163-75.
- Xiong, Y.L. (2012). Nonmeat ingredient and additives. Handbook of Meat and Meat Processing, pp. 573-588.