



DOI: 10.22034/fr.2021.29807.1607

## ارزیابی فعالیت ضد میکروبی و ترکیبات فنولی عصاره اتانولی لایه داخلی پوست بالنگ در نوشابه گازدار لیمویی

مریم فیلبانزاده<sup>۱</sup> و اکرم شریفی<sup>۲\*</sup>

تاریخ دریافت: ۹۷/۷/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۱/۵

<sup>۱</sup> دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده مهندسی صنایع و مکانیک، واحد قزوین، دانشگاه آزاد اسلامی، قزوین، ایران

<sup>۲</sup> استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده مهندسی صنایع و مکانیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قزوین

\*مسئول مکاتبه: Email: asharifi@qiau.ac.ir

### چکیده

**زمینه مطالعاتی:** یکی از دغدغه‌های مصرف کنندگان نوشابه‌های گازدار، وجود بنزوات سدیم به عنوان نگهدارنده در این محصولات است. **هدف:** عصاره لایه داخلی پوست بالنگ (*Citrus medica l.*) دارای ترکیبات ضد میکروبی، فنولی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. **روش کار:** در این پژوهش از عصاره اتانولی پوست بالنگ با غلظت‌های ۰/۸، ۱، ۱/۵، ۲، ۳ mg/ml و به عنوان یک ترکیب نگهدارنده در فرمولاسیون نوشابه گازدار لیمویی استفاده و فعالیت ضد میکروبی آن در برابر میکروارگانیسم‌های آلوده کننده نوشابه گازدار شامل باکتری لاکتوباسیلوس دلبروکی، باکتری لوکونوستوک مزنتروئیدس، مخمر ساکارومایسس سروزیه و مخمر کاندیدا کروزوئی مورد بررسی قرار گرفت. **نتایج:** نتایج به دست آمده نشان داد، مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) باکتری لاکتوباسیلوس دلبروکی در برابر عصاره اتانولی پوست بالنگ به ترتیب ۰/۶ mg/ml و ۰/۸ mg/ml، برای باکتری لوکونوستوک مزنتروئیدس به مقدار یکسان ۱ mg/ml و برای مخمر ساکارومایسس سروزیه و کاندیدا کروزوئی به مقدار یکسان ۰/۸ mg/ml تعیین شد. میزان شمارش کلی باکتری‌های هوازی مزوفیل، شمارش باکتری مقاوم به اسید، کپک و مخمر، در نوشابه حاوی ۲ mg/ml عصاره پوست بالنگ، نسبت به نمونه شاهد کمتر بود. نتایج اندازه‌گیری ترکیبات فنولی نشان داد، میزان ترکیبات فنولی نوشابه‌های گازدار لیمویی تولید شده حاوی عصاره پوست بالنگ در تمامی تیمارهای حاوی عصاره نسبت به نمونه شاهد به صورت معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) بالاتر بود و در طی دوره نگهداری کاهش معنی‌دار نشان نداد. **نتیجه‌گیری کلی:** با افزودن عصاره پوست بالنگ به میزان ۲ mg/ml می‌توان نوشابه گازدار لیمویی با کیفیت مطلوب و از نظر خصوصیات حسی قابل رقابت با نوشابه لیمویی گازدار حاوی بنزوات سدیم تولید نمود.

**واژگان کلیدی:** فعالیت ضد میکروبی، پوست بالنگ، عصاره، نوشابه لیمویی، ترکیبات فنولی

مقدمه  
فیبرها هستند. در سال‌های اخیر توجه بیشتری به  
خاصیت ضدباکتریایی بخش‌های غیر خوراکی میوه‌ها

مرکبات منابع غنی از ویتامین‌های مختلف، عناصر و

مقاوم به اسید در همه غلظت‌ها بعد از رسیدن به حداکثر خود با شیب نسبتاً تندی شروع به کاهش کرد. حتی نمونه های حاوی اسانس رزماری بهتر از نمونه شاهد حاوی نگهدارنده توانستند باعث از بین رفتن میکروب های مقاوم به اسید شوند. پرومپانا و همکاران (۲۰۱۲) به بررسی کاهش استفاده از رنگ های مصنوعی در نوشیدنی های الکلی با استفاده از گیاه بالنگ و تاثیر آن بر سلامت انسان پرداخته اند. تمامی محصولات بدست آمده حاوی مقدار قابل توجهی از ترپن ها بعنوان آنتی اکسیدان های موثر و عوامل ضد سرطان بودند. ادهام (۲۰۱۵) ترکیبات شیمیایی و خاصیت ضد میکروبی عصاره پوست میوه بالنگ کردستان عراق را مورد بررسی قرار داد. عصاره پوست بالنگ حاوی پلی فنل ها، مقدار زیادی تانن، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و استروئید بود و خاصیت ضد میکروبی بخصوص بر علیه باکتری های گرم منفی داشت. مانوار و همکاران (۲۰۱۵) فعالیت آنتی اکسیدانی و رادیکال گیرندگی عصاره های ریشه، پوست و گوشت میوه بالنگ را بررسی کردند. نتایج نشان داد بیشترین مقدار ترکیبات فنلی در ریشه وجود داشت ولی عصاره پوست بالنگ بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی را نشان داد. وحیدی و همکاران (۲۰۱۹) خصوصیات ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی اسانس پوست بالنگ را مورد مطالعه قرار دادند. MIC و MBC برای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *شرشیاکلی* به ترتیب ۶۲/۵، ۲۵۰، ۱۲۵ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود. اسانس قدرت آنتی اکسیدانی قابل توجهی داشت. حبشی و همکاران (۱۳۸۷) ترکیبات موجود در اسانس پوست میوه بالنگ را با دو روش استخراج تقطیر با آب و پرس سرد شناسایی کردند. در اسانس تقطیری ۲۵ و در اسانس پرس سرد ۲۳ ترکیب شناسایی شد. عمده ترین ترکیبات شناسایی شده لیمونن، گاما ترپینن و ژرانیال بود. نتایج محمودی و همکاران (۱۳۹۵) اثرات آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی اسانس پوست بالنگ بر افزایش ماندگاری شیمیایی و میکروبی ماهی قزل آلائی رنگین کمان در طول دوره نگهداری را نشان داد. با توجه به اثرات سودمند میوه بالنگ، در این پژوهش از عصاره اتانولی پوست این

شده است (توسلی و همکاران ۱۳۸۸). میوه بالنگ با نام علمی *Citrus medica l.* گونه ای از انواع مرکبات است (دالیا ۲۰۱۴). روغن های طعم دار ضروری از این میوه (که در خارجی ترین لایه یعنی لایه ی رنگدانه ی پوسته واقع شده اند) نیز بعنوان یک آنتی بیوتیک در نظر گرفته می شوند. علاوه بر این، آب میوه ی بالنگ به همراه عسل، پادزهری موثر برای سموم شناخته شده است. پوست میوه بالنگ حاوی سیترونال، ترپنها، آلدئیدها، کتون ها، استرها، الکل ها و اسیدهای آلی می باشد، لیمونن موجب خنثی شدن اثر میکروبهای بیماری زا می شود و همچنین ژرانیول و سایر مونوترپن های موجود در عصاره پوست میوه بالنگ دارای خاصیت ضد سرطانی هستند (مینا و همکاران ۲۰۱۱).

نوشابه گازدار فرآورده ای است که از اختلاط آب، گازکربنیک، مواد افزودنی مجاز خوراکی، قند و یا سایر شیرین کننده های مجاز به دست می آید (الهامی راد و محمدی ۱۳۸۵). مضرات ناشی از مصرف نوشابه های صنعتی از دیدگاه های مختلفی قابل بررسی می باشد (باوا ۲۰۰۵). گزارش هایی وجود دارد مبنی بر اینکه در اثر واکنش میان بنزوات موجود در نوشابه ها با اسید اسکوربیک، بنزن تشکیل می شود که جزو ترکیبات مولد سرطان می باشد. به دلیل مضراتی که از دیدگاه سلامتی مصرف کننده به نوشابه های صنعتی نسبت داده می شود، بسیاری از محققین به دنبال یافتن راهکارهایی جهت بهینه سازی مصرف نوشیدنی های طبیعی می باشند چرا که بسیاری از ترکیبات مورد استفاده در نوشابه های صنعتی را مواد سنتزی تشکیل می دهند (هانتر ۲۰۰۳).

کریمی و همکاران (۱۳۹۱) در بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی ریشه شیرین بیان در نوشابه پرتقالی (بعنوان جایگزین کامل بنزوات سدیم) گزارش کردند که استفاده از عصاره ریشه شیرین بیان در نوشابه پرتقالی باعث ماندگاری نوشابه طی مدت ۹۰ روز می شود. توسلی و همکاران (۱۳۸۸) نیز به بررسی اثر آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی اسانس رزماری در غلظت های مختلف در نوشابه لیمویی پرداختند. نتایج به دست آمده نشان داد منحنی رشد میکروارگانیسم های

زمان مصرف در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد در فریزر قرار داده شد (پور امیر و گلی ۱۳۸۷).

#### ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره پوست بالنگ

میکروارگانیزم‌های مورد بررسی در این مطالعه عبارت بودند از: *Lactobacillus delbrueckii* (1333 PTCC) *Lukonostock Mesentroids* (1591 PTCC), *Saccharomyces cerevisiae* (5269 PTCC), *Candida cruzei* (5295 PTCC) که عمده‌ترین میکروارگانیزم‌های جدا شده از نوشابه‌های غیر الکلی گازدار می‌باشند. سویه‌های خالص این میکروارگانیزم‌ها از مرکز کلکسیون میکروارگانیزم‌های صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه شدند.

#### روش تهیه محیط کشت‌ها

جهت تهیه محیط کشت مایع (مولر هینتون براث و عصاره مخمر گلوکز پپتون مالت براث) مورد استفاده در آزمون‌های میکروبی از روش غلظت مضاعف استفاده شد (تورنسبری و مک دوگال ۱۹۸۳).

تهیه کشت تازه (در فاز لگاریتمی) از میکروارگانیزم‌ها هر یک از سویه‌های باکتریایی یک روز قبل از انجام تست حداقل غلظت بازدارندگی (*Minimum inhibitory concentration: MIC*) و حداقل غلظت کشندگی (*Minimum bactericidal concentration: MBC*) در مورد مخمرها دو روز قبل از انجام تست بر روی محیط کشت نوترینت آگار، کشت سطحی داده شدند تا میکروارگانیزم‌ها پس از یک روز (باکتری‌ها) یا دو روز (مخمرها) گرمخانه‌گذاری در هنگام تهیه سوسپانسیون میکروبی در فاز لگاریتمی قرار داشته باشند (تورنسبری و مک دوگال ۱۹۸۳).

#### تهیه سوسپانسیون با مک فارلند شماره یک

سوسپانسیون استاندارد ۱ مک فارلند با استفاده از اضافه کردن ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول آبی ۱/۱۷۵ درصد کلرید باریم به طور آهسته و همراه با همزنی مداوم به ۹/۹۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۱ درصد، تهیه گردیدند و جذب آن در طول موج ۶۲۰ نانومتر خوانده شد (تورنسبری و مک دوگال ۱۹۸۳).

#### تهیه سوسپانسیون میکروبی

یک لوپ کامل از کشت‌های تازه برداشته و به ۱۵ میلی-

میوه به عنوان یک ترکیب نگهدارنده در فرمولاسیون نوشابه لیمویی استفاده و فعالیت ضد میکروبی آن در برابر میکروارگانیزم‌های آلوده کننده نوشابه در محیط کشت و در نوشابه گازدار لیمویی مورد بررسی گرفت.

#### مواد و روش‌ها

میوه بالنگ (*Citrus medica l.*) در اواخر پاییز و در مرحله رسیدگی از بازار محلی دزفول تهیه شد. میوه‌های تازه چیده شده از یک باغ، سالم، یکنواخت و عاری از هر گونه ضایعات انتخاب شدند. مواد شیمیایی مورد نظر در این تحقیق شامل آگار، عصاره مخمر، پپتون، گلوکز، اتانول، مولر هینتون براث، محیط کشت عصاره مخمر گلوکز کلرا مفنیکل آگار (YGC: Yeast Glucose) *chloramphenicol agar* و عصاره مخمر گلوکز پپتون مالت براث (*Yeast Malt*)، محیط کشت شمارش پلیتی (*PCA: Plate Count Agar*)، محیط کشت حاوی عصاره پرتقال (*OSA: Orange Serum Agar*) بودند. تمامی مواد مورد استفاده در این تحقیق دارای خلوص بالا بوده و از شرکت مرک تهیه شدند.

#### تهیه عصاره پوست بالنگ

لایه داخلی پوست بالنگ<sup>۱</sup> با رطوبت اولیه ۶۷ درصد، جدا شده و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در آون (Memert) مدل ۸۰۰، ساخت کشور آلمان) تا رطوبت ۵ درصد خشک و توسط آسیاب برقی Ika ساخت کشور آلمان به پودر تبدیل شد. پودر کردن در حد عبور ذرات از الک (Mesh-80) انجام شد. ۴۰ گرم پودر به همراه ۴۰۰ میلی‌لیتر از اتانول ۸۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر قرار داده شد و سپس با کاغذ صافی واتمن ۴۲ فیلتر شد. باقیمانده تحت شرایط یکسان مجدداً عصاره‌گیری شد. مواد حاصل از فیلتراسیون تحت خلاء در دستگاه روتاری (Ika، ساخت کشور آلمان) با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تا بریکس ۶۰ تبخیر شد. عصاره حاصل درون پلیت ریخته شد و پس از جداسازی حلال در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد، پودر حاصل تا

<sup>۱</sup> Albedo

### روش ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره پوست بالنگ در برابر مخمرها (کاندیداکروزی و ساکارومایسس سروزیه)

عصاره پوست میوه بالنگ با فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرواستریل و غلظت‌های مورد نظر (۲۰۰، ۵۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰، ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی-لیتر) به چاهک‌های پلیت الیزا اضافه گردید. کلیه غلظت‌ها در ۳ تکرار و همراه کنترل منفی بودند. به هر میکروتیوب استریل ۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره و ۱ میلی‌لیتر محیط کشت عصاره مخمر گلوکز پیتون مالت برات که به صورت مضاعف تهیه شده بود اضافه شد. به هر میکروتیوب نیز ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده اضافه شد. در ضمن یک کنترل مثبت شامل ۱ میلی‌لیتر محیط و ۰/۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون تهیه گردید. نمونه‌ها به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه نگهداری شدند. پس از طی زمان لازم، اولین غلظتی که کدورت در آنها مشاهده نگردید به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی تعیین گردید. سپس از غلظت‌هایی که در آنها کدورت مشاهده نشد، کشت سطحی بر روی محیط کشت جامد انجام گرفت. پلیت‌ها جهت مشاهده رشد یا عدم رشد به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند و نتایج به دست آمده گزارش شد (تورنسبری و مک دوگال ۱۹۸۳).

### آماده سازی نوشابه حاوی عصاره پوست بالنگ

نوشابه‌های حاوی عصاره پوست بالنگ در غلظت‌های متفاوت تهیه گردیدند. در مرحله بعدی، ارزیابی حسی نمونه‌ها توسط گروه ارزیاب صورت گرفت. با پذیرش نمونه‌های نوشابه‌هایی با غلظت مشخص از عصاره پوست بالنگ توسط گروه ارزیاب و تطبیق نتایج حاصل از ارزیابی حسی و با تست حداقل غلظت بازدارندگی، غلظت‌های عصاره پوست بالنگ ۰/۸، ۱، ۱/۵ و ۲ در نوشابه لیمویی استفاده شد و نمونه شاهد بدون عصاره پوست بالنگ و حاوی ۰/۱ گرم در لیتر نگهدارنده بنزوات سدیم بود. برای تهیه نوشابه شکر، سیتریک اسید، سدیم بنزوات و عصاره لیمویی را به

لیتر محیط دارای غلظت مضاعف استریل اضافه کرده و جذب آن با استاندارد مک فارلند شماره یک برابر گردید. در مرحله بعد برای به دست آوردن مقدار  $10^6$  cfu/ml تحت شرایط استریل به نسبت ۱:۳۰۰ با محیط کشت مایع مضاعف مخلوط گردید (تورنسبری و مک دوگال ۱۹۸۳).

### روش ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره پوست بالنگ در برابر باکتری‌های مورد بررسی

حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره‌های اتانولی با استفاده از روش رقت‌سازی در چاهک مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور از پلیت‌های استریل ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. عصاره پوست میوه بالنگ با فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرواستریل و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مورد نظر (۲۰۰، ۵۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به چاهک‌های پلیت الیزا اضافه گردید. کلیه رقت‌ها در ۳ تکرار همراه کنترل منفی بودند. برای هر میکروارگانیزم نیز یک کنترل مثبت شامل محیط و سوسپانسیون و یک کنترل منفی عدم رشد و از محلول ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کلرامفنیکل استفاده شد. جذب چاهک‌ها در ۶۲۰ نانومتر توسط دستگاه خوانش‌گر الیزا خوانده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه نگهداری شدند. پس از ۲۴ ساعت جذب پلیت الیزا در طول موج ۶۲۰ نانومتر خوانده که در نهایت حداقل غلظتی از عصاره که تغییر دانسته نوری در آن مشاهده نمی‌شود به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی در نظر گرفته شد. پس از ۲۴ ساعت از هر یک از غلظت‌هایی که در آنها تغییر جذب دیده نشده بر روی محیط کشت جامد نوترینت آگار، کشت سطحی انجام گرفت و سپس پلیت‌ها جهت مشاهده رشد یا عدم رشد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند و نتایج MBC گزارش گردیدند (کولیسیک و همکاران ۲۰۰۴).

رعایت شرایط سترونی انجام شد (موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران ۱۳۸۷).

#### کشت نمونه‌ها

پس از خروج گاز از نمونه‌ها جهت بررسی هر یک از میکروارگانیسم‌های ذکر شده (لاکتوباسیلوس دلبروکی (PTCC 1333)، باکتری لوکونوستوک مزترئوئیدس (PTCC 1591)، ساکارومایسس سرویزیه (PTCC 5269)، مخمر کاندیدا کروزوئی (PTCC 5295) مقدار ۱ میلی لیتر از نمونه را به پلیت منتقل و به آن حدود ۱۵ میلی لیتر محیط کشت آماده استریل افزوده و پلیت را به شکل ۸ انگلیسی به خوبی هم زده و بعد از بستن محیط کشت، پلیت‌ها (مطابق جدول ۱) گرمخانه گذاری شد بعد از این مدت کلنی های میکروارگانیسم‌های رشد یافته در پلیت‌ها شمارش و محاسبه شد، لازم به ذکر است که زمان بین افزودن نمونه به پلیت و محیط به پلیت نباید ۱۵ دقیقه بیشتر باشد (موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران ۱۳۸۷).

نسبت مشخصی با هم مخلوط کرده و با استفاده از دستگاه نوشابه ساز مجهز به کربوکولر ساخت شرکت هوک (Hook) سوئیس در فشار ۱/۵ psi و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد آب گازدار به نوشابه اضافه گردید (سلامی و همکاران ۱۳۸۵). نمونه‌ها پس از تهیه در بطری‌های PET به حجم ۳۰۰ میلی لیتر بسته‌بندی شده و سپس در دمای محیط نگهداری شدند. در یک دوره نگهداری ۳ ماهه و در ۳ مرحله زمانی سینتیک رشد میکروارگانیسم‌ها بررسی گردید.

#### بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره پوست بالنگ در

#### نوشابه لیمویی

ابتدا بطری نوشابه در یک بشر حاوی الکل ۷۰ درصد به گونه‌ای غوطه ور شد که الکل ۲۵ میلی لیتر از قسمت بالای بطری را بپوشاند. بطری را از الکل بیرون آورده و صبر کرده تا الکل تبخیر شود. با استفاده از یک دربازکن سترون در بطری‌ها را باز کرده و پس از شعله دادن سر بطری‌ها محتویات آن را به یک ظرف سترون منتقل کرده و با تکان دادن مداوم ظرف، گاز آن خارج شد. کلیه مراحل روش کار در مجاورت شعله و با

جدول ۱- محیط کشت اختصاصی و شرایط گرمخانه گذاری میکروارگانیسم‌های مورد بررسی (موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران ۱۳۸۷)

Table 1- Specific culture medium and incubation conditions of investigated microorganisms (Iranian Institute of Standards and Industrial Research 2008)

Type of microorganism	Specific culture medium	Incubation time	Incubation temperature (°C)	Method
mesophilic aerobic bacteria	PCA	48 (hours)	37	Mixed culture
acid resistant microorganisms	OSA	5 (day)	30	Mixed culture
yeast and mold	YGC	5(day)	25	Mixed culture

## اندازه گیری ترکیبات فنولی کل

میزان ترکیبات فنولی کل بر اساس روش فولین-سیوکالتو (Folin-Ciocalteu) اندازه گیری گردید. مطابق با این روش ابتدا فنول‌ها را استخراج نموده و سپس ۱ میلی‌لیتر از نمونه ی استخراج شده را در بالن ته گرد ریخته و به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس به تعیین میزان پلی فنول‌ها بر اساس اسید گالیک پرداخته شد و با رسم منحنی اسید گالیک معادله خط ارتباط بین اسید گالیک و جذب نمونه‌ها محاسبه گردید (لین و تانگ ۲۰۰۷).

## ارزیابی حسی

پس از آموزش‌های مقدماتی ۱۰ نفر از دانشجویان کارشناسی ارشد به عنوان ارزیاب انتخاب شدند و ویژگی‌های رنگ، عطر و طعم و پذیرش کلی نمونه‌های تولید شده به روش هدونیک با تکمیل پرسشنامه ارزیابی، مورد بررسی قرار گرفت. در پرسشنامه عدد ۱ نشان‌دهند (خیلی ضعیف)، عدد ۲ (ضعیف)، عدد ۳ (متوسط)، عدد ۴ (خوب)، عدد ۵ (خیلی خوب) بود (کریمی و همکاران، ۱۳۹۱).

## آنالیز آماری

داده‌ها براساس طرح کاملاً تصادفی به کمک آنالیز واریانس Anova، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (نسخه ۱۹) و رسم نمودارها با کمک نرم افزار Excel انجام شد. مقایسه آماری نتایج نیز در سطح اطمینان ۹۵٪ صورت پذیرفت.

## نتایج و بحث

## نتایج ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ی پوست

## بالنگ در برابر میکروارگانیسم‌های مورد بررسی

نتایج انجام تست حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) و در مورد میکروارگانیسم‌های مورد بررسی (لاکتوباسیلوس دلبروکی، لوکونوستوک مزنتروئیدس، ساکارومایسس سروزیه، مخمر کاندیدا کروزوئی) در جدول ۲ نشان داده شده است. عصاره اتانولی پوست بالنگ روی

میکروارگانیسم‌های مورد بررسی اثر مهار کنندگی نشان داد. مقادیر غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) باکتری لاکتوباسیلوس دلبروکی در برابر عصاره پوست بالنگ به ترتیب (mg/ml) ۰/۶ و ۰/۸ ارزیابی شد، در حالیکه مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل کشندگی (MBC) باکتری لوکونوستوک مزنتروئیدس یکسان و (mg/ml) ۱ به دست آمد. همچنین نتایج حاصل از مقادیر غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) مخمر ساکارومایسس سروزیه و کاندیدا کروزوئی به مقدار یکسان ۰/۸ ارزیابی گردید. عصاره اتانولی پوست بالنگ روی میکروارگانیسم‌های لاکتوباسیلوس دلبروکی، باکتری لوکونوستوک مزنتروئیدس، ساکارومایسس سروزیه، مخمر کاندیدا کروزوئی اثر مهار کنندگی نشان داد.

شجاعی مهر و ناظری در سال ۱۳۹۲ به نتایج مشابهی دست یافتند، آنها در بررسی اثر ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی عصاره اندام‌های مختلف بالنگ و شناسایی فیتوشیمیایی برخی متابولیت‌های ثانویه بالنگ و دارایی بیان کردند، عصاره متانولی بر طیف گسترده‌ای از باکتری‌ها تاثیر داشت. ساه و همکاران در سال ۲۰۱۱ به بررسی فعالیت ضد میکروبی آب میوه بالنگ، عصاره‌ی ریشه، برگ، پوست درخت آن، پوست و پالپ بالنگ در برابر ۷ نوع باکتری و ۲ گونه قارچ و یک مخمر پرداختند. نتایج به دست آمده نشان داد تمامی عصاره‌ها و آب میوه سطوح متفاوتی از فعالیت ضد میکروبی در برابر یک یا چند گونه از باکتری مورد آزمایش را نشان داد.

جدول ۲- نتایج MIC (mg/ml) و MBC (mg/ml) عصاره‌های اتانولی پوست بالنگ در برابر میکروارگانیسم‌های آلوده

کننده نوشابه

Table 2- Results of citron peel extracts MIC (mg/ml) and (mg/ml) MBC against contaminant microorganisms of lemon drinks

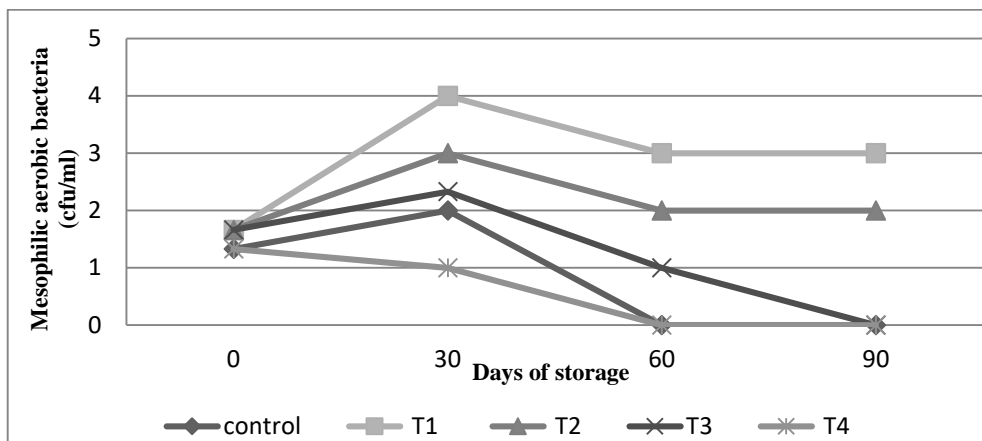
Microorganism	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0.6	0.8
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.8	0.8
<i>Candida krusei</i>	0.8	0.8

۱) که در محدوده اعلام شده قرار نداشتند. عصاره پوست بالنگ با خاصیت ضد باکتریایی خود توانست بار میکروبی نمونه‌های حاوی عصاره را تقریباً به اندازه نمونه حاوی بنزوات سدیم کاهش دهد.

نتایج شمارش کلی باکتری‌های هوازی مزوفیل (cfu/ml) نیز حاکی از فعالیت ضد میکروبی عصاره پوست بالنگ در نوشابه لیمویی بود. به نظر می‌رسد عصاره پوست بالنگ با خاصیت ضد باکتریایی خود توانست بار میکروبی نمونه‌های حاوی عصاره را تقریباً به اندازه نمونه حاوی بنزوات سدیم کاهش دهد. آبینو و همکاران در سال ۲۰۰۷، در تایید نتایج تحقیق فوق تاثیر ضد باکتریایی عصاره اتانولی پوست پرتقال بر نوشیدنی چای قرمز را بررسی کردند و به شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها پرداختند و مشاهده شد که نمونه‌های دارای عصاره پوست پرتقال در مقایسه با نمونه شاهد دارای شمارش کلی باکتری‌های هوازی مزوفیل (cfu/ml) کمتری به صورت معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) بودند (آبینو و همکاران ۲۰۰۷). توسلی و همکاران در سال ۱۳۸۸ به بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی اسانس رزماری در نوشابه لیمویی پرداختند نتایج به دست آمده نشان داد، در روز سی‌ام تعداد میکروارگانیسم‌های مزوفیل به حد مجاز در نوشابه رسید که با نتایج تحقیق فوق مطابقت داشت.

نتایج شمارش کلی باکتری‌های هوازی مزوفیل (cfu/ml)

شمارش کلی در برابر باکتری‌های هوازی مزوفیل (cfu/ml) نشان داد (شکل ۱)، بین تیمارهای تولیدی در روز ۰ با نمونه شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $P > 0.05$ )، تیمارهای T<sub>1</sub> (۰/۸mg/ml) و تیمار T<sub>2</sub> (۱mg/ml) که دارای مقادیر عصاره پایین‌تر بودند در روز ۳۰ و ۶۰ آزمایش در مقایسه با سایر تیمارها دارای شمارش کلی باکتری‌های هوازی مزوفیل (cfu/ml) بالاتری به صورت معنی‌داری بودند ( $P < 0.05$ )، همچنین در روز ۳۰ آزمون، تیمار T<sub>4</sub> (۲mg/ml) عصاره پوست بالنگ قادر به کاهش معنی‌دار شمارش کلی باکتری‌های هوازی نسبت به سایر نمونه‌ها حتی نمونه شاهد گردید ( $P < 0.05$ ). در تمامی تیمارهای مورد بررسی به جز تیمار T<sub>4</sub> از روز ۰ تا ۳۰ یک روند افزایشی در میزان باکتری‌های هوازی مشاهده شد که پس از آن با گذشت زمان میزان باکتری‌های هوازی مزوفیل به صفر کاهش یافت و هیچ رشدی مشاهده نشد (به غیر از تیمارهای T<sub>1</sub> (۰/۸mg/ml) و تیمار T<sub>2</sub> (۱mg/ml)، به‌طوریکه در روز ۹۰ آزمون میزان شمارش باکتری‌های هوازی در محدوده اعلام شده توسط سازمان ملی استاندارد (منفی) قرار گرفت به جز تیمارهای T<sub>1</sub> (۰/۸mg/ml) و تیمار T<sub>2</sub> (۱mg/ml)



شکل ۱- فعالیت ضد میکروبی عصاره پوست بالنگ در نوشابه لیمویی در برابر باکتری های هوازی مزوفیل (cfu/ml) تیمارها بر اساس غلظت عصاره پوست بالنگ T<sub>1</sub> (0.8 mg/ml)، T<sub>2</sub> (1 mg/ml)، T<sub>3</sub> (1.5 mg/ml) و T<sub>4</sub> (2 mg/ml)

Figure 1- Antimicrobial activity of citron peel extract in lemon carbonated drinks against mesophilic aerobic bacteria (cfu/ml) (Treatments base on concentration of citron peel extract: T<sub>1</sub> (0.8 mg/ml), T<sub>2</sub> (1 mg/ml), T<sub>3</sub> (1.5 mg/ml) and T<sub>4</sub> (2 mg/ml))

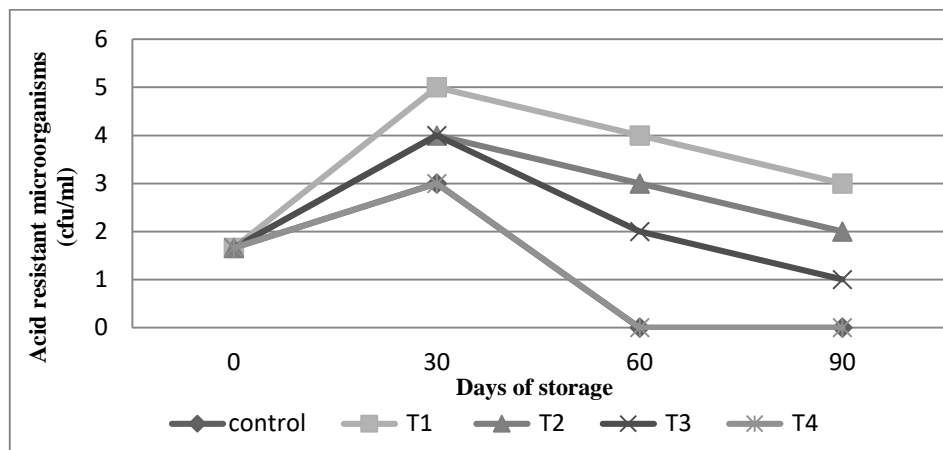
نشند، به طوری که در روز ۹۰ آزمون میزان شمارش باکتری‌های هوازی برای این تیمارها در محدوده اعلام شده توسط سازمان ملی استاندارد (منفی) قرار گرفت که نشان دهنده خاصیت ضدباکتریایی عصاره پوست بالنگ می‌باشد. اما در مورد سایر تیمارها افزودن عصاره قادر به کاهش باکتری‌های مقاوم به اسید و رساندن آن در محدوده اعلام شده توسط سازمان استاندارد نبود که بیانگر کافی نبودن غلظت عصاره افزوده شده می‌باشد.

شمارش میکروارگانیزم های مقاوم به اسید و همچنین کپک و مخمر نشان داد، عصاره پوست بالنگ در نوشابه لیمویی فعالیت ضد میکروبی دارد. در نمونه شاهد و تیمار T<sub>4</sub> (2 mg/ml) که غلظت بالای عصاره پوست بالنگ وجود داشت شمارش باکتری‌های مقاوم به اسید و کپک و مخمر با گذشت زمان نگهداری به صفر کاهش یافت و هیچ رشدی در آنها مشاهده نشد. آبینو و همکاران در سال ۲۰۰۷، گزارش کردند، نمونه‌های نوشیدنی چای قرمز دارای عصاره پوست پرتقال در مقایسه با نمونه شاهد دارای باکتری‌های مقاوم به اسید کمتری به صورت معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) بودند (آبینو و همکاران ۲۰۰۷).

#### نتایج شمارش میکروارگانیزم های مقاوم به اسید (cfu/ml)

نتایج به دست آمده از فعالیت ضد میکروبی عصاره پوست بالنگ در نوشابه لیمویی (شمارش میکروارگانیزم های مقاوم به اسید (cfu/ml) نشان داد (شکل ۲) بین تیمارهای تولیدی با نمونه شاهد در روز ۰ آزمون با نمونه شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $P > 0.05$ )، تیمارهای T<sub>1</sub> (0.8 mg/ml)، تیمار T<sub>2</sub> (1 mg/ml) و تیمار T<sub>3</sub> (1.5 mg/ml) که دارای مقادیر عصاره پایین‌تر بودند در روز ۳۰، ۶۰ و ۹۰ آزمایش با سایر نمونه‌ها اختلاف معنی‌داری داشتند و دارای شمار کلنی بالاتری نسبت به نمونه شاهد و تیمار T<sub>4</sub> (2 mg/ml) بودند به طور کلی، تیمار T<sub>4</sub> (2 mg/ml) حاوی عصاره پوست بالنگ و نمونه شاهد قادر به کاهش معنی‌دار شمارش باکتری‌های مقاوم به اسید نسبت به سایر نمونه‌ها بودند ( $P < 0.05$ ). در تمامی تیمارهای مورد بررسی از روز ۰ تا ۳۰ یک روند افزایشی در میزان باکتری‌های مقاوم به اسید مشاهده شد که پس از آن با گذشت زمان میزان باکتری‌های مقاوم به اسید در نمونه شاهد و تیمار T<sub>4</sub> (2 mg/ml) به صفر کاهش یافت و هیچ رشدی در آنها مشاهده



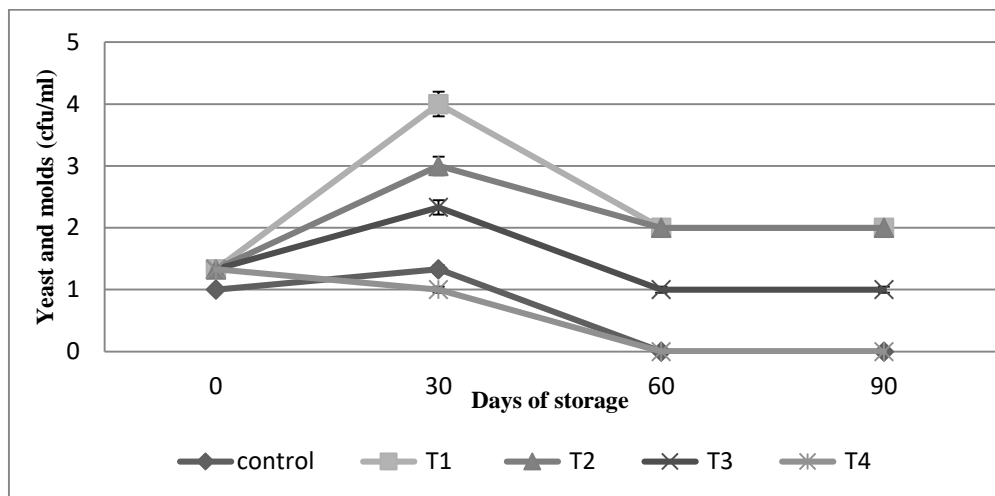


شکل ۲- فعالیت ضد میکروبی عصاره پوست بالنگ در نوشابه لیمویی در برابر شمارش باکتری های مقاوم به اسید (cfu/ml)  
Figure 2- Antimicrobial activity of citron peel extract in lemon carbonated drinks against acid resistant microorganisms (cfu/ml)

نتایج شمارش کپک و مخمر (cfu/ml) در نوشابه لیمویی (شمارش کپک و مخمر (cfu/ml) نشان داد (شکل ۳). بین تیمارهای تولیدی با نمونه شاهد در روز صفر اختلاف معنی داری مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ), تیمارهای T<sub>1</sub>، T<sub>2</sub>، T<sub>3</sub> که دارای مقادیر عصاره پایین-تر بودند در روز ۳۰، ۶۰، و ۹۰ آزمایش با سایر نمونه‌ها اختلاف معنی داری داشتند و دارای شمار کلنی بالاتری نسبت به نمونه شاهد و تیمار T<sub>4</sub> (۲ mg/ml) بودند ( $P < 0.05$ ). در تمامی تیمارهای مورد بررسی به جز تیمار T<sub>4</sub> از روز ۰ تا ۳۰ یک روند افزایشی در میزان کپک و مخمر مشاهده شد که پس از آن با گذشت زمان میزان کپک و مخمر در نمونه شاهد و تیمار T<sub>4</sub> (۲ mg/ml) به صفر کاهش یافت به طوری که در روز ۹۰ آزمون میزان شمارش کپک و مخمر برای این تیمارها در رنج اعلام شده توسط سازمان ملی استاندارد (منفی) قرار گرفت که نشان دهنده خاصیت ضد باکتریایی عصاره پوست بالنگ می باشد.

عصاره پوست بالنگ با داشتن ترکیبات آنتی اکسیدانی و فنول‌ها و لیمونن موجب خنثی شدن اثر میکروبیهای مولد بیماری می شود و همچنین (توسلی و همکاران

۱۳۸۸) می تواند به طور کامل مانع از فعالیت میکروارگانیسمها در نوشابه های تولیدی گردد. البته در روز ۳۰ بررسی حضور و رشد میکروارگانیسمها هم در نمونه های حاوی عصاره و هم در نمونه های حاوی بنزوات (شاهد) مشاهده گردید. دلیل وجود میکروارگانیسمها در نمونه ها، آلودگی مواد اولیه مصرفی است که یکی از مواد اولیه شکر است که منبع شناخته شده ای از اسپورهای باسیلوس هست که بالطبع در محصول نهایی نیز دیده می شوند. در بررسی اثر ضد میکروبی سایر گیاهان در نوشابه محققان نتایجی گزارش کردند که نتایج تحقیق حاضر با آنها همخوانی دارد. در تأیید نتایج تحقیق فوق، موسوی زربینی و همکاران در سال ۱۳۹۴ در بررسی تأثیر ضد میکروبی عصاره متانولی و اتانولی پوست میوه بالنگ و نارنج علیه ۲ گونه قارچ بیماری زای گیاهی (*Digitatum Penicillium* و *Alternaria citri*) گزارش کردند که عصاره متانولی گیاه بالنگ و نارنج در غلظت ۱۵۰ ppm و ۲۰۰ بر روی قارچ *Digitatum Penicillium* موثر بوده و عصاره اتانولی بالنگ با غلظت ۲۰۰ ppm روی پاتوژن *Alternaria citri* تأثیر داشت.



شکل ۳- فعالیت ضد میکروبی عصاره پوست بالنگ در نوشابه لیمویی در برابر کپک و مخمر (cfu/ml)

Figure 3- Antimicrobial activity of citron peel extract in lemon carbonated drinks against yeast and mold (cfu/ml)

نعنا را به آب آناناس اضافه کردند و حالیت و پایداری آنها را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که عصاره‌های مذکور به خوبی پایداری خود را طی نگهداری حفظ کردند (عربشاهی و اعلمی ۲۰۰۷). شهابی و همکاران (۱۳۸۷) در بررسی پایداری ترکیبات فنولی در آب سیب در طی دوره نگهداری، افزایش ترکیبات فنولی را گزارش کردند که با نتایج تحقیق فوق مطابقت داشت.

کریمی و همکاران در سال ۱۳۹۱ به ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی ریشه شیرین بیان در نوشابه پرتقالی پرداخته‌اند، نتایج نشان داد میزان ترکیبات فنولی در طی این مدت نیز نشانگر پایداری خوب عصاره اتانولی ریشه شیرین بیان در pH اسیدی نوشابه پرتقالی بود که با نتایج تحقیق فوق مطابقت داشت.

در اثر ایجاد تنش‌های اکسیداتیو در بدن انسان، عدم تعادل میان سامانه آنتی‌اکسیدانی و مواد ناشی از اکسیداسیون ایجاد می‌گردد که این مقوله به علت برهم‌کنش میان رادیکال‌های آزاد و گونه‌های اکسیژنی فعال با بیومولکول‌ها می‌باشد. این امر منجر به ایجاد بیماری‌هایی نظیر سرطان بیماری‌های قلبی-عروقی آسیب و یا مرگ سلولی و بی‌نظمی‌های التهابی (کاوآنی‌شی ۲۰۰۲) می‌گردد. برای غلبه بر این آسیب‌ها نیاز به استفاده از آنتی‌اکسیدان‌هایی که از طریق مواد غذایی وارد بدن

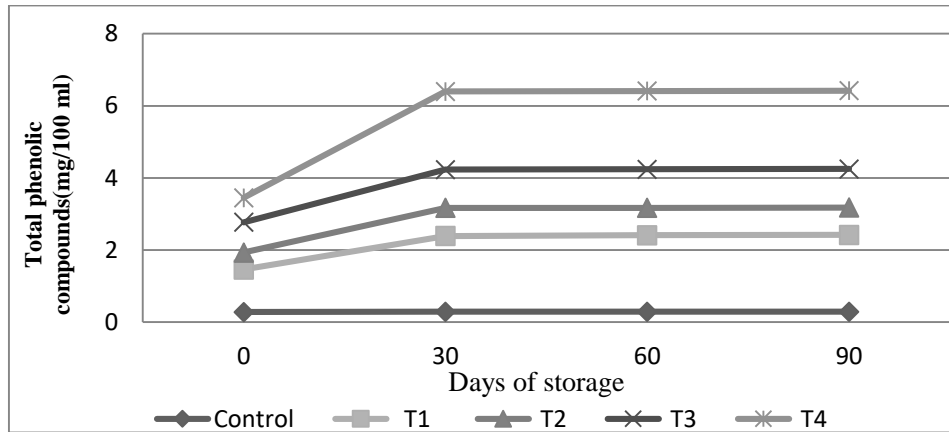
#### نتایج اندازه‌گیری ترکیبات فنولی کل

نتایج تاثیر عصاره پوست بالنگ بر ترکیبات فنولی کل در نوشابه لیمویی در شکل ۴ نشان داده شده است، میزان ترکیبات فنولی نوشابه‌های لیمویی تولید شده حاوی عصاره پوست بالنگ با توجه به pH اسیدی در طی دوره نگهداری حفظ گردید و پس از گذشت ۳۰ روز به میزان قابل توجهی افزایش یافت و سپس مقدار آن ثابت ماند و بین تیمارهای تولیدی با نمونه شاهد در روز صفر و سایر زمان‌های بررسی اختلاف معنی‌داری مشاهده شد و تمامی تیمارهای حاوی عصاره پوست بالنگ میزان ترکیبات فنولی به صورت معنی‌دار بالاتر از نمونه شاهد ارزیابی شد ( $P < 0.05$ ) و با افزایش میزان عصاره پوست بالنگ میزان ترکیبات فنولی نیز افزایش یافت.

با افزایش میزان عصاره پوست بالنگ در نوشابه تولیدی میزان ترکیبات فنولی نیز افزایش یافت که می‌تواند در اثر غنی بودن عصاره پوست بالنگ از ترکیبات فنولی باشد. نتایج تحقیق ادهام (۲۰۱۵) بیان گر وجود مقدار قابل توجه ترکیبات فنولی در عصاره پوست بالنگ بود. مانوار و همکاران (۲۰۱۵) نیز وجود مقدار بالای ترکیبات فنولی در پوست بالنگ را گزارش دادند. در بررسی پایداری ترکیبات فنولی در محیط اسیدی، عربشاهی و اعلمی (۲۰۰۷)، عصاره فنولی شاه‌توت و

اینگونه ترکیبات می‌تواند از طریق اعمال خاصیت آنتی-اکسیدانی، به حفظ سلامت بدن کمک نمایند.

می‌شوند، وجود دارد (لاگور ۲۰۰۷). با توجه به اینکه عامل اصلی تعیین‌کننده پتانسیل آنتی‌اکسیدان غذاها ترکیبات فنولی می‌باشند، مصرف مواد غذایی حاوی



شکل ۴- تاثیر عصاره پوست بالنگ بر ترکیبات فنولی کل (mg/100ml)

Figure 4- Effect of citron peel extract on phenolic compounds (mg/100ml)

بررسی تاثیر ضد باکتریایی عصاره پوست انار بر آب سیب گزارش کردند، تمامی عصاره‌های پوست انار موجب ایجاد طعم و مزه نامطلوب در آب سیب نگردید و هیچ تغییری در طعم و مزه نمونه‌های حاوی عصاره پوست انار با نمونه شاهد مشاهده نشد. کرمی و همکاران (۱۳۹۱) به ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی ریشه شیرین بیان در نوشابه پرتقالی پرداخته‌اند، نتایج نشان داد میزان ارزیابی حسی (پذیرش کلی) تیمارهای حاوی عصاره ریشه شیرین بیان نسبت به نمونه شاهد تغییر معنی‌داری نداشتند.

نتایج ارزیابی حسی

همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، بین تمامی تیمارهای حاوی عصاره پوست بالنگ با نمونه شاهد از نظر میزان طعم و مزه، رنگ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). میزان طعم و مزه و پذیرش کلی با افزایش میزان عصاره پوست بالنگ نسبت به نمونه شاهد کاهش یافت اما این میزان کاهش توسط ارزیاب‌ها معنی‌دار ارزیابی نگردید ( $P > 0.05$ ). ارزیاب‌ها از نظر رنگ با نمونه شاهد قادر به تشخیص اختلاف نبودند و این پارامتر با نمونه شاهد اختلاف معنی‌دار نداشت ( $P > 0.05$ ). شهابی قهفرخی و همکاران (۱۳۹۰)، در

جدول ۳- مقایسه میانگین ارزیابی حسی در نوشابه لیمویی

Table 3- Mean comparison of lemon carbonated drinks sensory evaluation

Treatments	Taste	Color	Overall acceptability
Control Treatment (C)	4.337±0.557 <sup>a</sup>	4±0.557 <sup>a</sup>	4.667±0.557 <sup>a</sup>
T <sub>1</sub> Treatment (0.8)	4.337±0.557 <sup>a</sup>	4±0.00 <sup>a</sup>	4.667±0.557 <sup>a</sup>
T <sub>2</sub> Treatment (1)	4±0.00 <sup>a</sup>	4±0.00 <sup>a</sup>	4.337±0.557 <sup>a</sup>
T <sub>3</sub> Treatment (1.5)	3.667±1 <sup>a</sup>	4±0.00 <sup>a</sup>	4.337±0.557 <sup>a</sup>
T <sub>4</sub> Treatment (2)	3.667±1 <sup>a</sup>	4±0.00 <sup>a</sup>	4.337±0.557 <sup>a</sup>

Each value in the table represents the mean ± standard deviation of triplicate analysis. Different superscripts within the same line represent significant difference at  $P \leq 0.05$ .

**نتیجه گیری کلی**

به دست آمده نشان داد، افزودن عصاره پوست بالنگ به میزان ۲mg/ml می‌تواند نوشابه لیمویی گازدار با کیفیت میکروبی و ویژگی‌های شیمیایی مطلوب‌تر و از نظر ارزیابی حسی قابل رقابت با نوشابه لیمویی گازدار حاوی بنزوات سدیم تولید نمود.

نتایج این پژوهش حاکی از آن بود که عصاره پوست بالنگ با داشتن ترکیبات ضد میکروبی، فنولی و آنتی‌اکسیدانی دارای فعالیت ضد میکروبی در برابر میکروارگانیسم‌های آلوده کننده نوشابه می‌باشد. نتایج

**منابع مورد استفاده**

- الهامی راد ا ح و محمدی ع، ۱۳۸۵. بررسی فرمولاسیون نوشابه گازدار با استفاده از عرق بیدمشک و ارزیابی تغییرات فیزیکی شیمیایی و میکروبی آن در طی نگهداری. مجله پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، دوره ۲ شماره ۱. صفحات ۳۹-۲۷.
- پورامیر م و گلی ز، ۱۳۸۷. بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره پوست نارنج و اثر بازدارنده آن بر اکسیداسیون لیپیدی در مدل بیولوژیک، هجدهمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی.
- توسلی ص، ابراهیم زاده موسوی م ع، امام جمعه ز و رضوی ه، ۱۳۸۸. بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی اسانس رزماری در نوشابه لیمویی، پایان نامه، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه تهران.
- حبشی م، میرزا م، مستوفی ی و جایمندی ک، ۱۳۸۷. شناسایی و مقایسه ترکیب‌های موجود در اسانس پوست میوه بالنگ ( *Citrus medica l* ) با دو روش استخراج ( تقطیر با آب و پرس سرد). فصلنامه تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، جلد ۲۴، شماره ۴. صفحات ۴۳۶-۴۲۸.
- محمودی ر، پاک بین ب، وحیدی ر، ۱۳۹۵. تاثیر اسانس روغنی پوست بالنگ بر تغییرات کیفیت شیمیایی و میکروبی فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ذخیره شده در سرما. نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی، دوره ۲۶، شماره ۳، صفحات ۳۷۹-۳۶۹.
- سلامی م، امام جمعه ز، ابراهیم زاده موسوی م، و رضایی ک، ۱۳۸۵. اندازه گیری جذب عطر و طعم نوشابه گازدار پرتقالی در ظروف ترفتالات پلی اتیلن با استفاده از میکرواستخراج با فاز جامد - گاز کروماتوگرافی. نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، دوره ۲۵، شماره ۳. صفحات ۶۹-۷۵.
- شجاعی مهر م و ناظری س، ۱۳۹۲. بررسی اثر ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی عصاره اندام‌های مختلف و شناسایی فیتو شیمیایی برخی متابولیت‌های ثانویه بالنگ و دارابی، پایان نامه دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده علوم کشاورزی.
- شهبابی ا، احمدی ع و حجازی م، ۱۳۸۷. بررسی خواص آنتی‌باکتریال ترکیبات فنولی هسته انگور و پوست انار در آب سیب بر باکتری *Alicyclobacillus acidoterrestris*، پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه تهران. صفحات ۱-۱۰.
- شهبابی قهرخی ا، حجازی م ا، احمدی زوزع، قنبرزاده ب، ۱۳۹۰. کنترل باکتری *Alicyclobacillus acidoterrestris* در آب سیب به وسیله وسیله عصاره‌های پوست انار. فصلنامه علوم و صنایع غذایی، شماره ۲ دوره ۸.
- کرمی ز، میرزائی ح، امام جمعه ز، صادقی ماهونک ع و خمیری م، ۱۳۹۱. ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی ریشه شیرین بیان در نوشابه پرتقالی، نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، دوره ۲ شماره ۸، صفحات ۲۶۱-۲۵۱.
- موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۸۷. ویژگی‌ها و روش‌های آزمون میکروبیولوژی نوشابه‌های گازدار، چاپ اول، شماره استاندارد ایران ۳۸۴۶.
- موسوی زرینی س، نجفی زرینی م و علوی م، ۱۳۹۴. بررسی اثرات ضد قارچی عصاره متانولی و اتانولی اندام‌های هوایی بالنگ و نارنج بر علیه ۲ قارچ بیماری‌زای گیاهی. همایش ملی گیاهان دارویی و کشاورزی پایدار، شماره ۳. صفحات ۲۵-۳۲.
- Abinu I, Adenopekun T, Adelowntan T, Ogunsanya T and Odugbemi T, 2007. Evaluation of the antimicrobial properties of different parts of *Citrus Aurantifolia* (Lime Fruit) as used locally. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines 4(2): 185-190.

- Adham AN, 2015. Phytochemical analysis and evaluation antibacterial activity of *Citrus medica* peel and juice growing in Kurdistan/Iraq. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 5(10): 136-141.
- Arabshahi-Delouee S and Aalami M, 2007. Production of functional pineapple juice by incorporation of phenolic extracts from selected plants. *International journal of food properties* 10: 479-488.
- Bawa S, 2005. The role of the consumption of beverages in the obesity epidemic. *Journal of Royal Society for the promotion of Health* 125(3), 124-128.
- Dalia A A, 2014. preparation and characterize of pectin from peel of kabad (*Citrus medica*) Fruit in sulaimani city, Iraqi Kurdistan Region. *International journal of current Research in chemistry and pharma ceutical Sciences* 142-146.
- Meena AK, Kandale Ajit, Rao MM, Panda P and Govind R, 2011. A review on citron-pharmacognosy, phytochemistry and medicinal uses. *International Research Journal of Pharmacy* 2(1):14.
- Hunter ML, 2003. Development of low erosive carbonated fruit drinks, 2-Evaluation of an experimental orange drinks in vitro and situ. *Journal of Dentistry* (31), 253-260.
- Kulisic T, Radonic A and Katalinic V, 2004. Use of different methods for testing antioxidative of oregano essential oil. *Food chemistry* (85), 633-640.
- Kawanishi S, Hiraku Y, Murata M, and Oilawa S, 2002. The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis. *Free Radical Biology Method* 32, 822-832.
- Laguerre M, Lecomte J and Villeneuve P, 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research* 46(5):244-82.
- Lin JY and Tang CY, 2007. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry* (101), 140-147.
- Munwar S, Roy H, Rahaman SA, 2015. Antioxidant and Free Radical Scavenging Activity of *Citrus Medica*. *International Journal of Pharma Research and Health Sciences* 3 (4), 810-816.
- Prompana K, Kandylis P, Tsakiris A, Kanellaki M and Kourkoutas Y, 2012. Application of alternative technologies for Elimination of artificial coloring in alcoholic beverages produced by *Citrus medica* and potential impact in human health. *Journal of Food and Nutrition Sciences* 03(07):959-969.
- Sah A, Vijay J and melkani A B, 2011. Antimicrobial Activity of six different parts of the plant *Citrus medica*. *Food Chemistry* (123), 250-267.
- Thronsberry C and McDougal, LK, 1983. Successful use of broth microdilution in susceptibility tests for methicillin-resistant (heteroresistant) staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology* (18), 1084-91.
- Vahidi R, Pourahmad R, Mahmoudi R, Hosseini SS, 2019. Chemical compounds and antibacterial and antioxidant properties of citron (*Citrus medica* L.) peel essential oil. *Journal of Food and Bioprocess Engineering* 3(1): 83-88.

Journal of Food Researches/vol.31 No.1 2021/pp 1-15  
<https://foodresearch.tabrizu.ac.ir>  
DOI: 10.22034/fr.2021.29807.1607

## Evaluation of antimicrobial activity and phenolic compounds of ethanolic extract of inner layer of citron peel in lemon carbonated drinks

M Filban zadeh<sup>1</sup> and A Sharifi<sup>2\*</sup>

Received: October 15, 2018

Accepted: January 25, 2020

<sup>1</sup>Master's graduate, Department of Food Science and Technology, Faculty of Industrial and Mechanical Engineering, Qazvin Branch, Islamic Azad University, Qazvin, Iran

<sup>2</sup>Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Industrial and Mechanical Engineering, Qazvin Branch, Islamic Azad University, Qazvin, Iran

\*Corresponding Author: [asharifi@qiau.ac.ir](mailto:asharifi@qiau.ac.ir)

**Introduction:** Citron (*Citrus medica L.*), belonging to citrus genus and native to southeast Asia (Dalia, 2014). Citrus fruits are rich sources of different vitamins, minerals, and fibers. In recent years, more attention has been paid to the antibacterial properties of non-edible parts of fruits (Tavasoli et al., 2009). Essential oil of the fruit peel (located in the inner layer of citron peel) have repetitively demonstrated antibacterial bioactivities. The citron juice along with honey is also known as an effective antidote to poisons. Citron peel contains citronellal, terpenes, aldehydes, ketones, esters, alcohols, and organic acids. Limonene, most abundant cyclic monoterpene of the fruit, has demonstrated considerable antimicrobial activity in many studies. Moreover, geraniol and other monoterpenes found in the extract of citron peel have exhibited anti-cancer properties (Mina et al., 2011). In recent decades, many are studying the ways of converting low-value products (by-products) to value-added products. Carbonated beverages are products made of water, sugar, carbon dioxide, additives, and, other sweeteners (Elhami Rad & Mohammadi, 2006). The harmful effect of consuming industrial soft drinks can be examined from different perspectives (Bawa, 2005). There are some reports that show benzene forms by a reaction between benzoate in soft drinks and ascorbic acid, which is a cancer-causing compound. Due to the health risks attributed to consumption of industrial soft drinks, many researchers are looking for ways to optimize the consumption of natural drinks, as synthetic materials make up most of the compounds used in industrial soft drinks (hunter, 2003). In this study, given the beneficial effects of citron, we used the ethanolic extract of citron peel as a natural preservative in the formulation of lemon soft drinks. Furthermore, we studied the antimicrobial activity of extract against soft drink contaminating microorganisms in a culture medium and lemon carbonated beverages.

**Materials and methods:** In this study, we added ethanolic extract of citron peel with increasing concentrations of 0, 0.8, 1, 1.5, and 2 mg/ml to the formulation of lemon soft drinks, as a natural preservative. Furthermore, antimicrobial activity of the additive was investigated against a series of soft drink contaminating microorganisms (*Lactobacillus delbrueckii*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Candida krusei*). The total phenolics of the lemon soft drink was measured based on the Folin-Ciocalteu method (Lin & Tang, 2007). The characteristics of color, taste, and flavor as well as the overall acceptability of final products were evaluated by ten evaluators using the hedonic method and an assessment questionnaire (Karami et al., 2012). Data were analyzed based on a completely randomized design, one-way ANOVA, using SPSS (version 19). The charts were plotted using Excel software. The statistical comparison of results was conducted at a 95% confidence level.

**Results and discussion:** Ethanolic extract of citron peel exhibited an inhibitory effect on the growth of our test microorganisms. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the extract against *Lactobacillus delbrueckii* were 0.6 mg/ml and 0.8 mg/ml, respectively. Moreover, the extract had inhibitory and bactericidal effect against *Leuconostoc mesenteroides* at the concentration of 1 mg/ml. Per our results, *saccharomyces cerevisiae* and *candida krusei* were killed and inhibited at the concentration of 0.8 mg/mL.

Overall, the ethanolic extract of citron peel exhibited significant inhibitory activity against *Lactobacillus delbrueckii*, *Leuconostoc mesenteroides*, *saccharomyces cerevisiae*, and *candida krusei*. The results of the total count of mesophilic aerobic bacteria (colony forming unit per mL (CFU/mL)) indicated the antimicrobial activity of citron peel extract in lemon soft drinks. The citron peel extract, with its antibacterial properties, was able to reduce the microbial load of samples. Comparable results were obtained by sodium benzoate. The count of acid-resistant microorganisms showed the antimicrobial activity of citron peel extract in the lemon soft drink. The count of acid-resistant bacteria dropped to zero over the time of storage in the control and  $T_4$  (2 mg/ml) treatment samples. Our results indicated the antimicrobial activity of citron peel extract in the lemon soft drink (based on yeast and molds count (CFU/ml)). There was no significant difference between the treatments and the control at day 0 ( $P>0.05$ ). Treatments  $T_1$ ,  $T_2$ , and  $T_3$  were significantly different from other samples at day 30, 60, and 90 of the experiment. Furthermore,  $T_1$ ,  $T_2$ , and  $T_3$  treatments had higher colony counts than the control and  $T_4$  (2 mg/ml) group ( $P<0.05$ ). The antimicrobial effect of extract was concentration and time dependent. There was an increasing trend in the amount of yeast and molds in  $T_1$ ,  $T_2$ , and  $T_3$  treatments yet growth of the microorganisms in  $T_4$  and control group was completely inhibited over the storage time. At day 90, yeast and mold count reached the standard set by Institute of Standards and Industrial Research of Iran (negative). As expected, increasing concentrations of the extract lead to higher total phenolics in the produced soft drink. Considering the acidic pH, total phenolics in the produced lemon soft drinks containing citron peel extract significantly increased after 30 days, and then remained constant throughout the storage period was. There was a significant difference between the total phenolics of treatments and the control at day 0 and other time points. Phenolics were significantly higher in all the treatments containing the citron peel extract compared with the control ( $P<0.05$ ). The results of sensory evaluation showed that there was no significant difference between all the treatments containing the citron peel extract and the control sample in terms of taste, flavor, and color ( $P>0.05$ ). By increasing the amount of citron peel extract, the rates of taste, flavor, and overall acceptability decreased compared with the control. However, rate was not evaluated as significant by the evaluators ( $P>0.05$ ). No significant difference was detected between treatments and the control in terms of color by the evaluators ( $P>0.05$ ).

**Conclusion:** The results of current study indicated that phenolics-rich citron peel extract has notable antimicrobial activity against soft drink contaminating microorganisms. The results showed that we can produce a quality product, in terms of microbial quality and chemical properties, by adding 2 mg citron peel extract per mL of soft drink. In terms of sensory properties, the final product could compete with sodium benzoate containing lemon soft drinks.

**Keywords:** Antimicrobial Activity, Citron Peel, Fruit Extract, Lemon Soft Drink, Phenolic Compounds