

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی ریشه شیرین بیان در نوشابه پرتقالی

زهرا کرمی^۱ - حبیب الله میرزائی^۲ - زهرا امام جمعه^۳ - علیرضا صادقی ماهونک^{۴*} - مرتضی خمیری^۵

تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۲۸

تاریخ پذیرش: ۹۱/۳/۲۱

چکیده

در این پژوهش فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی ریشه شیرین بیان بر میکروارگانیسم‌های آلوده کننده نوشابه (لاکتوباسیلوس دلبروکی، لوکونوستوک منتروئیدس، ساکارومایسس سرویزیه و کاندیدا کروزی) بررسی گردید. مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی بر روی باکتری لاکتوباسیلوس دلبروکی به ترتیب ۰/۸ میلی گرم در میلی لیتر، ۰/۷ میلی گرم در میلی لیتر و بر روی لوکونوستوک منتروئیدس ۰/۹ میلی گرم در میلی لیتر مشاهده شد. همچنین نتایج حاصل از حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی بر روی ساکارومایسس سرویزیه و کاندیدا کروزی با روش رقت‌سازی در چاهک، ۰/۸ میلی گرم در میلی لیتر به دست آمد. در این بررسی برای کنترل رشد میکروارگانیسم‌های عامل فساد نوشابه پرتقالی، از عصاره ریشه شیرین بیان در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر شیرین بیان (به عنوان جایگزین کامل بنزوات سدیم) و غلظت‌های ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر شیرین بیان به همراه ۵۰ درصد بنزوات سدیم معمول در فرمولاسیون صنعتی نوشابه پرتقالی استفاده شد. نمونه‌های نوشابه حاوی عصاره به همراه نمونه شاهد در دمای محیط قرار گرفته و روند رشد میکروبی در فواصل زمانی ۱، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰ و ۹۰ روز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمون میکروبی نشان داد که استفاده از عصاره ریشه شیرین بیان در نوشابه پرتقالی باعث ماندگاری نوشابه طی ۹۰ روز می‌شود. بررسی میزان ترکیبات فنولی در طی دوره نگهداری نشان داد که عصاره اتانولی ریشه شیرین بیان در pH اسیدی نوشابه پرتقالی به خوبی پایداری خود را به مدت ۳ ماه حفظ نموده است.

واژه‌های کلیدی: ریشه شیرین بیان، عصاره اتانولی، بنزوات سدیم، فعالیت ضد میکروبی، نوشابه گازدار

مقدمه

است که از لحاظ بیولوژیکی و پزشکی ترکیبی فعال است و از دیرباز در اختلالات تنفسی، زخم‌های معده و روده و نارسایه‌های کبدی استفاده می‌شده است. همچنین دارای اثرات مناسب در درمان ضایعات پوستی مانند درماتیت، اگزما و خارش می‌باشد. هم اکنون عصاره‌های شیرین بیان و گلیسیریزین کاربردهای گسترده‌ای در صنایع غذایی، داروسازی و دخانیات دارند. در آمریکا میزان بالایی از شیرین بیان و گلیسیریزین با مصرف تقریبی ۳/۶ - ۰/۲۷ میلی گرم گلیسیریزین به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در هر روز توسط مردم مصرف می‌شود (Fenwick et al., 1990). امروزه با افزایش آگاهی مصرف کنندگان نسبت به سالم بودن افزودنی‌های غذایی خصوصاً ترکیبات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدان‌ها سعی بر این است که از افزودنی‌های طبیعی که دارای خاصیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی هستند، به جای مواد شیمیایی ترکیبی در مواد غذایی استفاده شود. نوشابه‌ها از جمله مواد غذایی هستند که در آن‌ها هم از مواد ضد میکروبی

شیرین بیان^۶ و فراورده‌های آن از زمان‌های بسیار دور توسط پزشکان و گیاه‌شناسان مورد توجه قرار داشته است. شیرین بیان یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی از لحاظ اقتصادی است که به صورت گسترده مورد پژوهش قرار گرفته است و اثرات ضد میکروبی آن شناخته شده است (Gupta et al., 2006). گیاه شیرین بیان متعلق به تیره اصلی بقولات^۷ و تیره فرعی پروانه واران^۸ و از راسته گل سرخیان^۹ است. گلیسیریزین^{۱۰} یکی از اجزای اصلی ریشه شیرین بیان

۱، ۲، ۴ و ۵- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار، استادیار و دانشیار دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
* نویسنده مسئول: (Email : sadeghiaz@yahoo.com)
۳- دانشیار دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه تهران

6- Licorice
7- Leguminosaeae
8- Fabaceae
9- Rosales

10- Glycyrrhizine

محیط کشت عصاره مخمر گلوکز کلرامفنیکل آگار^۲ و عصاره مخمر گلوکز پیتون مالت برات^۳، محیط کشت شمارش پلیتی^۴، محیط کشت حاوی عصاره پرتقال^۵ بودند. تمامی مواد مورد استفاده در این تحقیق دارای خلوص بالا بوده و از شرکت مرک خریداری شدند.

تهیه عصاره

ریشه‌های مرطوب شیرین بیان پس از تمیز شدن و گرفتن گل و لای آن، با قیچی باغبانی به قطعات کوچک تری بریده و در آون معمولی با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ هفته خشک شدند. ریشه‌های خشک شده توسط آسیاب چکشی (ایران خود ساز) به صورت آرد (مش ۲۰) درآمدند. جهت تهیه عصاره اتانولی از حلال اتانول ۸۰ درصد (حجمی:حجمی) استفاده شد. سپس به منظور تهیه عصاره از مایکروویو خانگی (CE3260FJUNE-2008) طبق روش میرزاپور و همکاران (۲۰۱۰) استفاده گردید. در این روش ۵ گرم نمونه باحلال اتانول ۸۰ درصد و با نسبت نمونه به حلال (۱:۱۵) مخلوط گردید. مخلوط سپس با امواج مایکروویو (توان ۱۰۰ وات) در ۵ دقیقه اشعه‌دهی شد. برای کنترل دما، زمان به صورت متناوب اعمال شد به این ترتیب که بعد از هر دقیقه تابش امواج مایکروویو نمونه تا رسیدن به دمای کمتر از ۳۰ درجه سانتی‌گراد در یخچال قرار داده شد. همچنین در این روش برای استخراج بهتر توسط امواج مایکروویو نمونه به مدت ۹۰ دقیقه در اتانول ۸۰ درصد بدون همزدن خیسانده شد. عصاره‌های حاصله با استفاده از کاغذ صافی از مواد گیاهی جدا گردیدند و به وسیله تبخیرکننده چرخان (مدل laborata 4000، ساخت کمپانی هایدولف) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شدند. در نهایت عصاره‌ها توسط خشک‌کن انجمادی (-) Operun FDB550 ساخت کره جنوبی) در دمای ۵۰- درجه سانتی‌گراد به پودر تبدیل و تا زمان استفاده در ظروف غیر قابل نفوذ به هوا در فریزر ۱۸- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (Pan et al., 2010; Mirzapour et al., 2010).

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها

تهیه سویه‌های میکروبی

میکروارگانیزم‌های مورد بررسی در این مطالعه عبارت بودند از: باکتری‌های لاکتوباسیلوس دلبروکی^۶ (PTCC 1333)،

شیمیایی و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی استفاده می‌شود (توسلی و همکاران، ۱۳۸۸).

نوشابه گازدار فراورده‌ای است که از اختلاط آب، گاز کربنیک، مواد افزودنی مجاز خوراکی، شکر و یا سایر شیرین‌کننده‌ها تهیه می‌شود. مضرات ناشی از مصرف نوشابه‌های صنعتی از دیدگاه‌های مختلفی قابل بررسی می‌باشد. نوشابه‌های صنعتی ارزش تغذیه‌ای کمی داشته اما حدود ۱۲ درصد ساکارز دارند. بنابراین مصرف مداوم آن‌ها در بروز چاقی موثر خواهد بود (Bawa, 2005). گزارش‌هایی وجود دارد مبنی بر این که در اثر واکنش میان بنزوات موجود در نوشابه‌ها با اسید آسکوربیک، بنزن تشکیل می‌شود که جزو ترکیبات مولد سرطان می‌باشد. رنگ مصنوعی مورد استفاده در نوشابه‌های زرد به نام سانست یلو^۱ از نوع رنگ‌های آزو می‌باشد. بنیان شیمیایی آزو از جمله گروه‌هایی است که به عنوان یک عامل تحریک‌کننده رشد سلول‌های سرطانی شناخته شده است. مشخص شده است که رنگ‌های سنتزی حاوی دو عامل آزو که ساختمان قطبی دارند سرطان‌زا می‌باشند. رنگ مورد استفاده در نوشابه‌های سیاه نیز از نوع کارامل تجاری است که بر اساس آبیگری از قندها در دماهای بالا (حدود ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد) در محیط اسیدی و در حضور کاتالیست آمونیاک حاصل می‌شود و ممکن است دارای آلودگی به بنزوپیرن‌ها باشد (Varnam et al., 1997).

با توجه به مضراتی که از دیدگاه سلامتی مصرف‌کننده به نوشابه‌های صنعتی نسبت داده می‌شود، بسیاری از محققین به دنبال یافتن راهکارهایی جهت بهینه‌سازی مصرف نوشیدنی‌های سنتی و طبیعی می‌باشند چرا که بسیاری از ترکیبات مورد استفاده در نوشابه‌های نوع کولا را مواد سنتزی تشکیل می‌دهند. به همین دلیل در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی جهت بهینه‌سازی فرمولاسیون آن‌ها انجام گرفته است (Hunter, 2003).

با توجه به اثرات سودمند شیرین بیان (ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد ویروسی، ضد التهاب، ضد زخم معده، ضد سرطانی)، در این تحقیق از عصاره شیرین بیان به عنوان یک ترکیب نگهدارنده در فرمولاسیون نوشابه پرتقالی استفاده و فعالیت ضد میکروبی آن در برابر میکروارگانیزم‌های آلوده‌کننده نوشابه در محیط کشت و در نوشابه پرتقالی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ریشه شیرین بیان در فصل پاییز ۱۳۸۹ (۲۰ مهر) از ایستگاه تحقیقات کشاورزی گرگان تهیه شد. مواد شیمیایی مورد نظر در این تحقیق آگار، عصاره مخمر، پیتون، گلوکز، اتانول، مولر هینتون برات،

2- Yeast Glucose chloramphenicol agar
3- Yeast Malt
4- Plate Count Agar
5- Orange Serum Agar
6- *Lactobacillus delbrueckii* PTCC1333

1- Sunset Yellow

مک‌فارلند شماره یک برابر گردید. در مرحله بعد برای به‌دست آوردن مقدار 10^6 cfu/ml تحت شرایط استریل به نسبت ۱:۳۰۰ با محیط کشت مایع مضاعف مخلوط گردید (Thornsberry and McDougal, 1983).

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی ریشه شیرین بیان در برابر باکتری‌ها (لاکتوباسیلوس دلبروکی و لوکونوستوک منترئیدیس)

حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره‌های اتانولی با استفاده از روش رقت‌سازی در چاهک (میکروبراث دایلوشن) مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور از پلیت‌های استریل ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. عصاره ریشه شیرین بیان بافیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتر استریل و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مورد نظر (۴۰۰-۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به چاهک‌های پلیت الایزا اضافه گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی به آن اضافه گردید. کلیه رقت‌ها در ۲ تکرار همراه با کنترل منفی بودند. برای هر میکروارگانیسم نیز یک کنترل مثبت شامل محیط و سوسپانسیون و یک کنترل مثبت عدم رشد و از محلول ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کلرامفنیکل استفاده شد. جذب چاهک‌ها در ۶۲۰ نانومتر توسط دستگاه خوانش‌گر الایزاخوانده شد و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه نگهداری شدند. پس از ۲۴ ساعت جذب پلیت الایزا در ۶۲۰ نانومتر خوانده که در نهایت حداقل غلظتی از عصاره که تغییر دانسیته 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 کشت سطحی انجام گرفت و سپس پلیت‌ها جهت مشاهده رشد یا عدم رشد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند و نتایج MBC گزارش گردیدند (Kulisic et al., 2008).

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی ریشه شیرین بیان در برابر مخمرها (کاندیدا کروزی و ساکارومایسس سرویزیه)

ابتدا عصاره ریشه شیرین بیان با فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتر استریل و غلظت‌های مورد نظر (۳۰۰، ۵۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰، ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) از آن تهیه شد. هر غلظت در ۳ تکرار و با یک کنترل منفی در نظر گرفته شد. به هر میکروتیوب استریل ۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره و ۱ میلی‌لیتر محیط کشت عصاره مخمر گلوکز پیتون مالت براث که به صورت مضاعف تهیه شده بود اضافه شد. به هر میکروتیوب نیز ۰/۱ میلی‌لیتر از

لوکونوستوک منترئیدیس^۱ (PTCC 1591) و مخمرهای ساکارومایسس سرویزیه^۲ (PTCC 5269)، کاندیدا کروزی^۳ (PTCC 5295) که عمده‌ترین میکروارگانیسم‌های جداسازی شده از نوشابه‌های غیر الکلی گازدار می‌باشند (Woodroof and Philips, 1996). سوبیه‌های خالص این میکروارگانیسم‌ها از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی خریداری شدند.

روش تهیه محیط کشت‌ها

جهت تهیه محیط کشت مایع (مولر هینتون براث و عصاره مخمر گلوکز پیتون مالت براث) مورد استفاده در آزمون‌های میکروبی از روش غلظت مضاعف^۴ استفاده شد. در واقع میزان وزنی محیط کشت در محلول دو برابر میزان توصیه شده توسط شرکت تولید کننده در نظر گرفته شد تا از رقیق شدن محیط کشت در هنگام اضافه شدن بخش حاوی عصاره در طی آزمون جلوگیری به عمل آید (Thornsberry and McDougal, 1983).

تهیه کشت تازه (در فاز لگاریتمی) از میکروارگانیسم‌ها

هر یک از سوبیه‌های باکتریایی یک روز قبل از انجام تست حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)^۵ و حداقل غلظت کشندگی (MBC)^۶ و در مورد مخمرها دو روز قبل از انجام تست بر روی محیط کشت ذکر شده، کشت سطحی داده شدند تا میکروارگانیسم‌ها پس از یک شب (باکتری‌ها) یا دو شب (مخمرها) گرمخانه‌گذاری در هنگام تهیه سوسپانسیون میکروبی در فاز لگاریتمی قرار داشته باشند.

تهیه سوسپانسیون با مک‌فارلند شماره یک

سوسپانسیون استاندارد ۱ مک‌فارلند 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 گردید و جذب آن در طول موج ۶۲۰ نانومتر خوانده شد (Thornsberry and McDougal, 1983).

تهیه سوسپانسیون میکروبی

یک لوپ کامل از کشت‌های تازه برداشته و به ۱۵ میلی‌لیتر محیط دارای غلظت مضاعف استریل اضافه کرده و جذب آن با استاندارد

- 1- *Leuconostoc mesenteroides* PTCC1591
- 2- *Saccharomyces cerevisiae* PTCC5269
- 3- *Candida krusei* PTCC5295
- 4- Double strength
- 5- Minimum Inhibitory concentration
- 6- Minimum bactericidal concentration

شسته شد. سپس بطری را در یک بشرحاوی الکل ۷۰ درجه به گونه‌ای غوطه‌ور ساخته که الکل ۲۵ میلی‌متر از قسمت بالایی بطری را بپوشاند. بطری را از الکل بیرون آورده و صبر کرده تا الکل آن تبخیر شود. با استفاده از یک دریاکن 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 رعایت شرایط سترونی انجام شد (موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی، استاندارد شماره ۳۸۴۶).

کشت نمونه‌ها

پس از خروج گاز از نمونه جهت انجام هریک از فاکتورهای مورد آزمایش (جدول ۱) مقدار ۲ میلی‌لیتر برداشت نموده و به دو پلیت سترون منتقل شد (به هرکدام یک میلی‌لیتر) سپس حدود ۱۵ میلی‌لیتر از محیط مورد نظر که دمای آن حدود ۴۵ درجه سانتی‌گراد باشد، به آن اضافه شد. محیط و نمونه به خوبی مخلوط شده و تا جامد شدن محیط، بر روی سطح صاف و خنک قرار داده شد. پس از جامد شدن محیط کشت، پلیت‌ها در دما و زمان مناسب (طبق جدول ۱) گرمخانه‌گذاری شدند. پس از پایان زمان تعیین شده پلیت‌ها را بررسی نموده و میکروارگانیسم‌ها شمارش شدند. کشت نمونه‌ها به صورت دو تکرار (دوپلیتی) می‌باشد. لازم به ذکر است که زمان بین افزودن نمونه به پلیت و محیط به پلیت نباید از ۱۵ دقیقه بیشتر باشد (موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی، استاندارد شماره ۳۸۴۶).

آنالیز آماری

در این پژوهش از روش آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال $(P < 0.05)$ صورت گرفت. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS.9.1 و رسم نمودارها با نرم افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره ریشه شیرین بیان در محیط کشت

در این مطالعه اثر ضد باکتریایی مقادیر مختلف عصاره اتانولی ریشه شیرین بیان در برابر میکروارگانیسم‌های آلوده کننده نوشابه مورد بررسی قرار گرفت و نتایج در جدول ۲ آورده شده است. عصاره اتانولی ریشه شیرین بیان روی میکروارگانیسم‌های مورد بررسی اثر مهارکنندگی نشان داد.

سوسپانسیون میکروبی تهیه شده اضافه شد. در ضمن یک کنترل مثبت نیز حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط و ۰/۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون تهیه گردید. نمونه‌ها به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شدند. بعد از طی زمان لازم، اولین غلظتی که کدورت در آن‌ها مشاهده نگردید به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی تعیین گردید. سپس از غلظت‌هایی که کدورت در آن‌ها مشاهده نشده کشت سطحی بر روی محیط کشت جامد انجام گرفت. پلیت‌ها جهت مشاهده رشد یا عدم رشد به مدت ۷۲-۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند و نتایج حداقل غلظت کشندگی گزارش شد (Thornsberry and McDougal, 1983).

آماده‌سازی نوشابه‌های حاوی عصاره ریشه شیرین بیان

نوشابه‌های حاوی عصاره ریشه شیرین بیان در غلظت‌های متفاوت تهیه گردیدند. در مرحله بعدی، ارزیابی حسی نمونه‌ها توسط گروه ارزیاب صورت گرفت. با پذیرش نمونه نوشابه‌های با غلظت مشخص از عصاره ریشه شیرین بیان، توسط گروه ارزیاب و تطابق نتایج تست پائل با تست حداقل غلظت بازدارندگی، غلظت‌های عصاره ریشه شیرین بیان ۲۰۰۰، ۱۵۰۰، ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و ۵۰+۲۰۰۰ درصد میکروگرم در میلی‌لیتر بنزوات سدیم، ۵۰+۱۵۰۰ درصد میکروگرم در میلی‌لیتر بنزوات سدیم، ۵۰+۱۰۰۰ درصد میکروگرم در میلی‌لیتر بنزوات سدیم در نوشابه‌های پرتقالی استفاده شد. لازم به ذکر است که منظور از ۵۰ درصد بنزوات سدیم حذف نیمی از میزان معمول این ترکیب (۰/۱ گرم در لیتر) در فرمولاسیون نوشابه است و سپس بر طبق فرمولاسیون پرتقالی، شربت اولیه نوشابه آماده‌سازی شد. در مرحله بعد توسط دستگاه فیلر، آب گازدار به شربت اولیه اضافه گردید و درب‌بندی صورت گرفت. نمونه‌ها پس از تهیه در دمای محیط نگهداری شدند. در یک دوره نگهداری ۳ ماهه و در ۱۰ مرحله زمانی سینتیک رشد میکروارگانیسم‌ها بررسی گردید. جهت نمونه شاهد از نمونه عادی نوشابه پرتقالی زمزم استفاده شد.

اندازه‌گیری ترکیبات فنلی کل

مقدار کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره ریشه شیرین بیان توسط رنگ سنجی به روش فولین-سیوکالته^۱ مورد بررسی قرار گرفت (Lin and tang, 2007).

بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی ریشه

شیرین بیان در نوشابه پرتقالی

باز کردن در نمونه‌ها

ابتدا سطح خارجی بطری نوشابه بایستی با آب و شوینده مناسب

1- Folin-Ciocalteu

جدول ۱- شرایط کشت نوشابه‌های گازدار

نوع میکروارگانیسم	محیط کشت اختصاصی	زمان گرمخانه‌گذاری	دمای گرمخانه‌گذاری	روش
شمارش کلی باکتری های هوای مزوفیل	PCA	۴۸ ساعت	۳۷ درجه سلسیوس	کشت آمیخته
میکروارگانیسم‌های مقاوم به اسید	OSA	۵ روز	۳۰ درجه سلسیوس	کشت آمیخته
کپک و مخمر	YGC	۵ روز	۲۵ درجه سلسیوس	کشت آمیخته

ایزولیکوفلاونول^۴ مرتبط دانست (Sultana et al., 2010). در یک بررسی β گلیسریتینیک^۵ جدا شده از شیرین بیان، MIC در مقادیر ۷/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر و ۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر را در برابر باسیلوس سوبتلیس و استافیلوکوکوس اپیدرمیس نشان داد در حالی که چنین اثری را بر *اشرشیا کلی*، پروتئوس و لگاریس و انواع قارچ‌ها نداشت. بررسی‌ها با میکروسکوپ هم کانون (کانفوکال^۶) نشان داد که گلیسریتینیک اسید بدون شکستن غشای سلولی، درون باکتری قرار می‌گیرد و سبب جلوگیری از سنتز DNA، RNA و پروتئین می‌شود (Kim et al., 2002).

جدول ۲- نتایج MIC و MBC عصاره‌های اتانولی ریشه شیرین بیان در برابر میکروارگانیسم‌های آلوده‌کننده نوشابه

میکروارگانیسم	MIC _s (mg/ml)	MBC _s (mg/ml)
لاکتوباسیلوس دلبروکی	۰/۷	۰/۸
لوکونوستوک منتروئیدس	۰/۹	۰/۹
کاندیدای کروژنی	۰/۸	۰/۸
ساکارومایسس سرویزیه	۰/۸	۰/۸

خواص ضد میکروبی عصاره ریشه شیرین بیان در نوشابه

پرتقالی

بررسی سینتیک رشد میکروبی نمونه‌های نوشابه

برای بررسی سینتیک رشد میکروارگانیسم‌ها در نوشابه حاوی عصاره ریشه شیرین بیان، ابتدا غلظت‌های مورد نظر از عصاره ریشه شیرین بیان در عصاره پرتقالی تهیه و در مرحله بعد طبق فرمولاسیون شرکت زمزم، نوشابه‌ها آماده شدند. نمونه عادی زمزم نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. ویژگی‌های شیمیایی نوشابه‌های تهیه شده در جدول ۳ آمده است.

قابل ذکر است که در این طرح با توجه به ارزیابی چشایی، ۳۰

مقادیر MIC و MBC لاکتوباسیلوس دلبروکی در برابر عصاره اتانولی شیرین بیان به ترتیب ۰/۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و ۰/۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود، در حالی که MIC و MBC لوکونوستوک منتروئیدس یکسان بوده و معادل ۰/۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد. همچنین نتایج حاصل از MIC و MBC ساکارومایسس سرویزیه و کاندیدا کروژنی با روش رقت‌سازی با مقادیر یکسان معادل ۰/۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود (جدول ۲). فعالیت ضد میکروبی عصاره ریشه شیرین بیان می‌تواند به علت حضور آلکالوئید، ساپونین‌ها، فلاونوئیدها، تانن، گلیکوزیدها و فنول‌ها در عصاره خام و اجزای ریشه شیرین بیان باشد. این گروه‌های فیتوشیمیایی به عنوان ترکیبات ضد میکروبی شناخته شده‌اند (Lettinga and Scalbert, 1991; Field, 1992). در رابطه با فعالیت ضد میکروبی ریشه شیرین بیان می‌توان به گزارش‌های متعددی از جمله موارد زیر اشاره کرد.

فعالیت ضد میکروبی گلابریدین^۱ که از اجزای ریشه شیرین بیان می‌باشد ۲۰ برابر بیشتر از عصاره خام یافت شده است (Gupta et al., 2006). در بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی شیرین بیان بر علیه مایکوباکتریوم تویرکلوسیزیه^۳ H₃₇R_v و مقدار MIC، ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شده است و همچنین فعالیت ضد میکروبی گلابریدین در غلظت ۲۹/۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر (MIC) در برابر گونه‌های مایکوباکتریوم یافت شد. جزء گلابریدین نسبت به گرم مثبت‌ها فعال‌تر از گرم منفی‌ها می‌باشد (Gupta et al., 2006).

در بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره متانولی ریشه شیرین بیان مشخص شد که این عصاره فعالیت ضد میکروبی معنی‌داری (۵۰۰-۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در برابر استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی و باسیلوس سوبتلیس داشت اما در برابر سودوموناس آئروجنس اثر ضد میکروبی نداشت. فعالیت ضد میکروبی عصاره ریشه شیرین بیان را می‌توان حضور ترکیباتی چون گلابرن^۲، لیکوایزوفلاون^۳ B،

4-isolicoflavonol
5-β-glycyrrheticin
6-Confocal

1-Glabridin
2-Glabrene
3-Licoisoflavone B

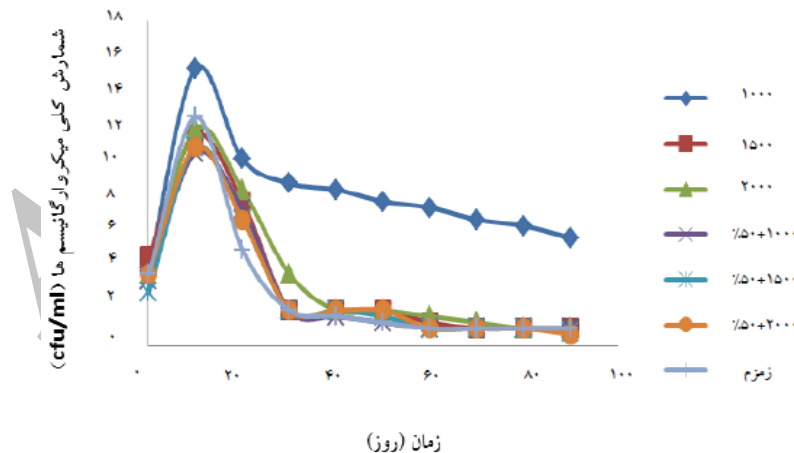
همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود در مورد همه غلظت‌ها به جز غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، همانند نمونه شاهد منحنی‌های رشد بعد از رسیدن به حداکثر، در هر سه غلظت فوق تقریباً با یک شیب تندی کاهش یافت و در روز بیستم تعداد میکروارگانیسم‌های مزوفیل به حد مجاز در نوشابه رسید، که حد مجاز میکروارگانیسم‌های مزوفیل در نوشابه وجود حداکثر ۱۰ کلونی میکروب (cfu/ml) در نمونه می‌باشد. در مورد غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره ریشه شیرین بیان بعد از رسیدن به حداکثر رشد در روز پانزدهم، منحنی رشد با شیب ملایمی شروع به کاهش کرد تا در روز چهارم، تعداد میکروب‌ها به حد مجاز رسید. در همه نمونه‌ها همانند نمونه شاهد، بعد از این که رشد میکروبی به حداکثر خود رسید، روند رشد میکروب‌ها با سرعت نسبتاً زیادی سیر نزولی پیدا می‌کند. به نظر می‌رسد که عصاره ریشه شیرین بیان با خاصیت میکروبی خود توانسته بار میکروبی نمونه‌های حاوی عصاره را تقریباً به اندازه نمونه حاوی بنزوات (نمونه شاهد) کاهش دهد.

درصد کل شکر مصرفی در فرمولاسیون نوشابه پرتقالی زمزم در حین استفاده در نوشابه‌های پرتقالی حاوی عصاره ریشه شیرین بیان حذف گردید تا میزان شیرینی عصاره ریشه شیرین بیان در نوشابه به عنوان جایگزینی از شکر نیز سنجیده شود. به همین دلیل بریکس نمونه شاهد (زمزم) نسبت به نمونه‌های حاوی عصاره ریشه شیرین بیان بیشتر می‌باشد. ترکیبات فنولی از جمله تانن‌ها، ترکیبات پکتیکی، پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها مثل سلولز و نشاسته از مهمترین عوامل ایجادکننده کدورت هستند که هر یک به تنهایی یا توأم با یکدیگر (به صورت تشکیل کمپلکس‌هایی بین مواد فنلی و پروتئین‌ها، مواد فنولی و پکتین، مواد فنولی با یکدیگر و...) در ایجاد کدورت نقش دارند که با گذشت زمان بر میزان کدورت می‌افزایند (Varnam and Sutherland, 1997)، به همین دلیل میزان کدورت نمونه‌های حاوی عصاره ریشه شیرین بیان نسبت به نمونه‌های شاهد بیشتر بود. سینتیک رشد میکروارگانیسم‌های هوازی در شکل ۱ نشان داده شده است.

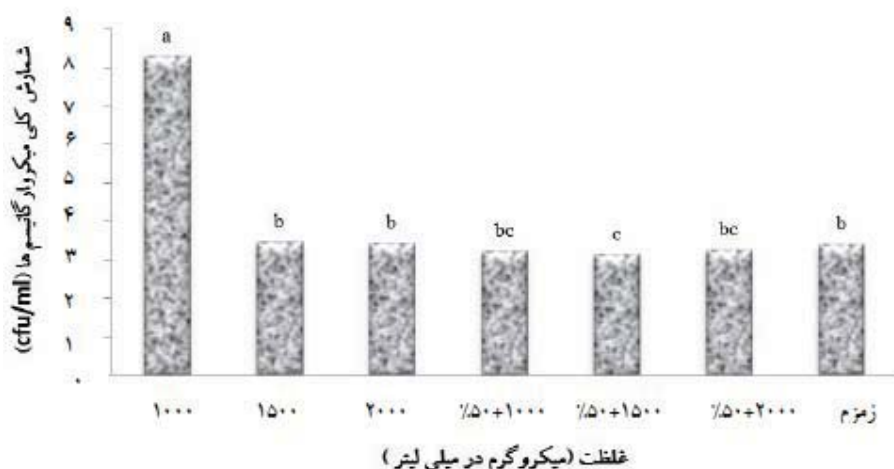
جدول ۳- ویژگی‌های شیمیایی نوشابه‌های پرتقالی حاوی عصاره ریشه شیرین بیان

زمزم	۲۰۰۰+۵۰%	۱۵۰۰+۵۰%	۱۰۰۰+۵۰%	۲۰۰۰	۱۵۰۰	۱۰۰۰
بریکس	۸	۸/۳	۸/۷	۸	۸/۳	۸/۷
pH	۲/۸۷	۲/۹۲	۳	۲/۹	۲/۹۶	۳/۰۹
کدورت	۵۱۳	۵۴۲	۵۶۱	۵۱۳	۵۴۲	۵۶۱

غلظت‌ها بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر و کدورت بر حسب واحد کدورت نفولومتری^۱ (NTU) می‌باشد. منظور از ۵۰ درصد، استفاده از بنزوات به میزان نصف مقدار معمول آن در فرمولاسیون نوشابه است.



شکل ۱- منحنی رشد میکروارگانیسم‌های هوازی در محیط کشت PCA در نمونه‌های نگهداری شده در دمای محیط



شکل ۲- مقایسه میانگین شمارش کلی میکروارگانیسم‌های هوازی در غلظت‌های مختلف نوشابه‌های حاوی عصاره ریشه شیرین بیان در طی دوره نگهداری سه ماهه، حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

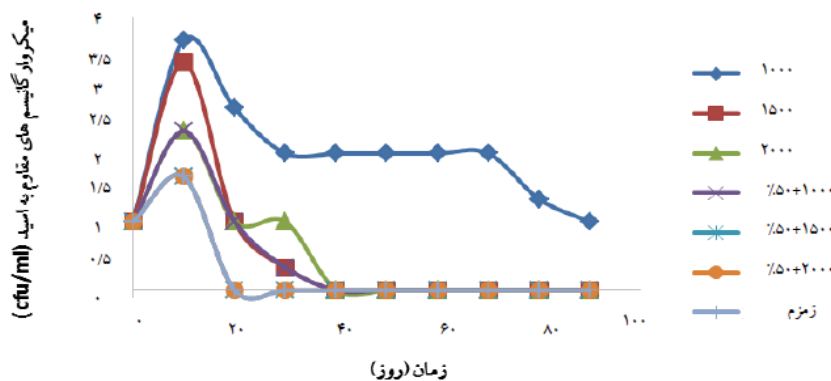
عصاره ریشه شیرین بیان در غلظت‌های ۵۰+۱۵۰۰ و ۵۰+۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر با نمونه شاهد تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ($P < 0.05$). بنابراین غلظت‌های ۵۰+۱۵۰۰ درصد و ۵۰+۲۰۰۰ درصد مانند نمونه شاهد توانستند رشد میکروارگانیسم‌های مقاوم به اسید را مهار کنند، اما سایر غلظت‌ها مانند نمونه شاهد نتوانستند رشد میکروارگانیسم‌های مقاوم به اسید را مهار کنند.

همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود به غیر از نمونه حاوی غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره، منحنی رشد کپک و مخمر بقیه نمونه‌های حاوی عصاره ریشه شیرین بیان شبیه به نمونه شاهد بوده و منطبق بر یکدیگر می‌باشند. همانند نمودار قبلی، منحنی رشد بعد از رسیدن به حداکثر خود با شیب تندی به صفر رسید، ولی نمونه حاوی ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره به طور کامل نتوانست کپک و مخمر را از بین ببرد.

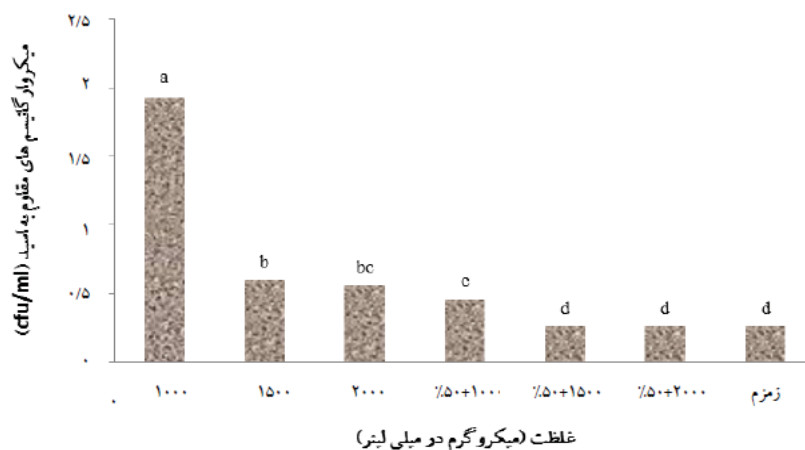
همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود بین نمونه‌های حاوی عصاره ریشه شیرین بیان در غلظت‌های ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر با نمونه شاهد از نظر شمارش کلی میکروارگانیسم‌های هوازی تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ($P < 0.05$)، اما بین نمونه‌های حاوی عصاره ریشه شیرین بیان و بنزوات سدیم با نمونه‌های شاهد تفاوت معنی‌داری وجود دارد به طوری که می‌توان گفت این نمونه‌ها بهتر از نمونه شاهد توانستند بار میکروبی نوشابه را کاهش دهند.

در مورد میکروارگانیسم‌های مقاوم به اسید همان‌طور که در شکل ۳، مشاهده می‌شود منحنی رشد در همه غلظت‌ها به جزء غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بعد از رسیدن به حداکثر رشد خود با شیب نسبتاً تندی شروع به کاهش کرد. از روز بیستم به بعد بار میکروبی نمونه‌های ۵۰+۲۰۰۰ درصد و ۵۰+۱۵۰۰ درصد همانند نمونه شاهد به صفر رسید و در نمونه ۵۰+۱۰۰۰ درصد بار میکروبی در روز چهارم به صفر رسید.

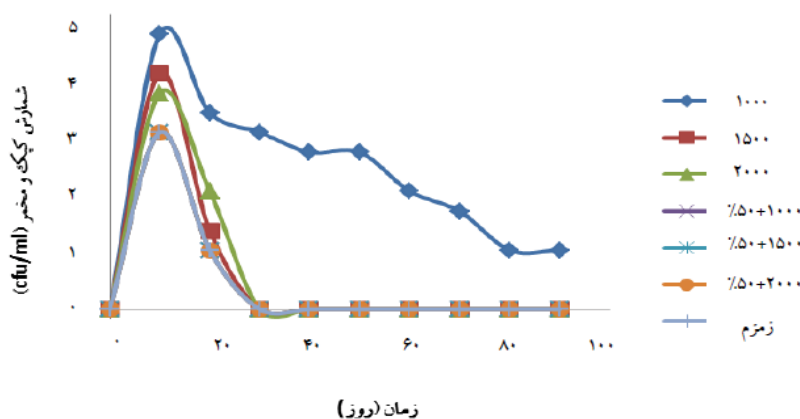
همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود بین نمونه‌های حاوی



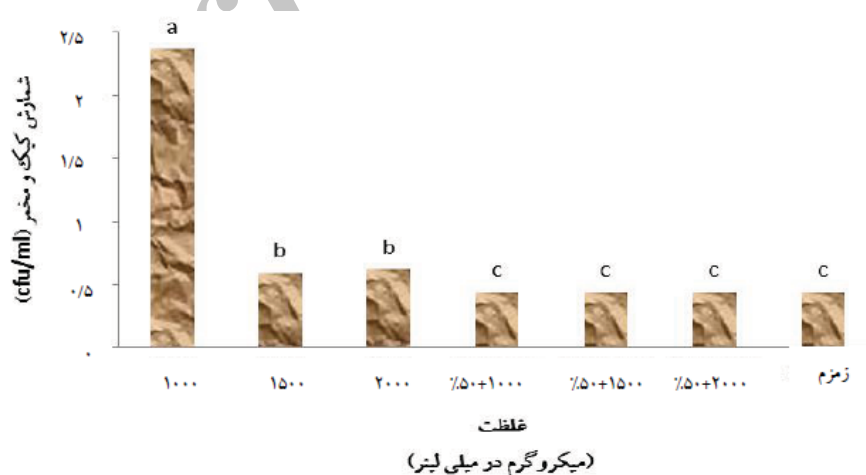
شکل ۳- منحنی رشد میکروارگانیسم‌های مقاوم به اسید نمونه‌های نگهداری شده در دمای محیط



شکل ۴- مقایسه میانگین شمارش میکروارگانیزم‌های مقاوم به اسید (OSA) در غلظت‌های مختلف نوشابه‌های حاوی عصاره ریشه شیرین بیان در طی دوره نگهداری سه ماهه. حروف غیر مشابه در هر غلظت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است



شکل ۵- منحنی رشد کپک و مخمر نمونه‌های نگهداری شده در دمای محیط



شکل ۶- مقایسه میانگین شمارش کپک و مخمر در غلظت‌های مختلف نوشابه‌های حاوی عصاره ریشه شیرین بیان در طی دوره نگهداری سه ماهه. حروف غیر مشابه در هر غلظت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

ترکیبات ضد میکروبی همچون ۸۱ سینئول، کامفور، آلفاپینن، بتاپینن، بورنتول، کامفن و آلفاترپینئول توانست به طور کامل مانع از رشد و فعالیت میکروب‌ها در نوشابه لیمویی شود. الهامی راد و محمدی (۱۳۸۵) از گیاه دارویی بیدمشک جهت تولید نوشابه گازدار استفاده کردند. بررسی روند تغییرات میکروبی و فیزیکوشیمیایی نشان داد که نوشابه بیدمشک از پایداری مناسبی برخوردار است. به طوری که برآیند عوامل موثر بر کیفیت محصول شامل ترکیبات و اجزاء تشکیل دهنده، نوع بسته‌بندی، شرایط پاستوریزاسیون و pH، به گونه‌ای بود که طی دوره نگهداری پارامترهای کیفی محصول شامل pH، اسیدیته، میزان مواد جامد محلول و سطح میکروبی تغییر قابل توجهی نکرد اما روند افزایش کدورت نمونه‌ها، تحت دمای محیط و حضور نور به طور قابل توجهی شدیدتر بود.

ترکیبات فنولی نمونه نوشابه‌های حاوی عصاره ریشه شیرین بیان نگهداری شده در دمای محیط

در اثر ایجاد تنش‌های اکسیداتیو^۱ در بدن انسان، عدم تعادلی میان سامانه‌ی آنتی‌اکسیدانی و مواد ناشی از اکسیداسیون ایجاد می‌گردد که این مقوله به علت برهم‌کنش میان رادیکال‌های آزاد و گونه‌های اکسیژنی فعال با بیومولکول‌ها نظیر پروتئین‌ها، آمینواسیدها، لیپیدها، کربوهیدرات‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌باشد. این امر منجر به ایجاد بیماری‌های نظیر سرطان (Kawanishi et al., 2002)، بیماری‌های قلبی-عروقی (Sachidanandame et al., 2005)، آسیب و یا مرگ سلولی و بی‌نظمی‌های التهابی (Bodamyali et al., 2000) می‌گردد. با توجه به سامانه‌های دفاعی بدن در برابر تنش‌های اکسیداتیو، برای مثال سامانه‌های آنزیمی نظیر سوپراکسیددسموتاز، کاتالاز و گلووتاتیون پراکسیداز و حضور آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در بدن نظیر گلووتاتیون، هورمون‌های جنسی استروژنی، اسید اوریک، کوآنزیم Q، ملانین، ملاتونین، همچنان نیاز به استفاده از آنتی‌اکسیدان‌هایی که از طریق مواد غذایی وارد بدن می‌شود، وجود دارد (Laguette et al., 2007). با توجه به این که عامل اصلی تعیین‌کننده پتانسیل آنتی‌اکسیدان غذاها ترکیبات فنولیک می‌باشند، مصرف مواد غذایی حاوی این گونه ترکیبات می‌تواند از طریق اعمال خاصیت آنتی‌اکسیدانی، به حفظ سلامت بدن کمک نماید. به همین دلیل پایداری عصاره اتانولی ریشه شیرین بیان در نوشابه پرتقالی در دوره نگهداری ۳ ماهه نیز مورد بررسی قرار گرفت. اندازه‌گیری ترکیبات فنولیک با استفاده از روش فولین انجام گرفت.

همان طور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود عصاره اتانولی ریشه شیرین بیان در pH اسیدی نوشابه پرتقالی نه تنها پایداری خود را در

همان طور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود بین نمونه‌های حاوی عصاره ریشه شیرین بیان در غلظت‌های ۵۰٪+، ۱۰۰۰٪+، ۱۵۰۰٪+ و ۲۰۰۰٪+ میکروگرم در میلی‌لیتر با نمونه شاهد تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ($P < 0.05$). بنابراین غلظت‌های مذکور مانند نمونه شاهد توانستند رشد کپک و مخمر را مهار کنند، اما سایر غلظت‌ها مانند نمونه شاهد نتوانستند رشد کپک و مخمر را مهار کنند.

به طور کلی از نتایج سینتیک رشد نمونه‌های نگهداری شده در دمای محیط به نظر می‌رسد که عصاره ریشه شیرین بیان با داشتن ترکیبات ضد میکروبی مانند آلکالوئیدها، ساپونین‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، گلیکوزیدها و فنول‌ها می‌تواند به طور کامل مانع از فعالیت میکروب‌ها در نوشابه پرتقالی شود. البته در روزهای اول بررسی سینتیک رشد، حضور و رشد میکروب‌ها هم در نمونه‌های حاوی عصاره و هم در نمونه حاوی بنزوات (نمونه شاهد) مشاهده گردید. دلیل وجود میکروب در نمونه‌ها، آلودگی در مواد اولیه مصرفی است که یکی از این مواد اولیه شکر است که منبع شناخته شده‌ای از اندوسپورهای باسیلوس هست که بالطبع در محصول نهایی نیز دیده می‌شوند. آب نیز منبع دیگری از باکتری‌هاست که وجود آن‌ها به عنوان شاخص بهداشت ضعیف در کارخانه می‌باشد (Varnam and Jane, 1994). یکی دیگر از دلایل آلودگی نمونه‌ها، آلودگی ثانویه در حین کار است به ویژه در زمان کشت میکروبی که لازم است گاز نمونه‌ها به طور کامل خارج شود.

در بررسی اثر ضد میکروبی سایر گیاهان در نوشابه، محققان نتایجی را گزارش کردند که نتایج تحقیق حاضر با آن‌ها همخوانی دارد. توسلی و همکاران (۱۳۸۸) اثر آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی اسانس رزماری را در نوشابه لیمویی بررسی کردند. بدین منظور نوشابه‌هایی در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسانس رزماری و ۲۰۰۰+۵۰٪ بنزوات تهیه شد و نتایج آزمون میکروبی نوشابه‌ها در طی ۹۰ روز بررسی گردید. طبق نتایج حاصله، در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰+۵۰٪ اسانس رزماری همانند نمونه شاهد بعد از رسیدن به حداکثر رشد، منحنی‌های رشد هر ۳ غلظت فوق، تقریباً با یک شیب تندی کاهش یافت و در روز سی‌ام تعداد میکروارگانیسم‌های مزوفیل به حد مجاز در نوشابه رسید. در مورد میکروارگانیسم‌های مقاوم به اسید نیز منحنی رشد در همه غلظت‌ها بعد از رسیدن به حداکثر خود با شیب نسبتاً تندی شروع به کاهش کرد. حتی نمونه‌های حاوی اسانس رزماری بهتر از نمونه شاهد توانستند باعث از بین رفتن میکروب‌های مقاوم به اسید شوند و از روز سی‌ام به بعد بار میکروبی این نمونه‌ها به صفر رسید. همچنین در رابطه با کپک و مخمر به غیر از نمونه حاوی غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسانس، منحنی رشد بعد از رسیدن به حداکثر خود با شیب تندی به صفر رسید. اسانس رزماری نیز به دلیل داشتن

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش حاکی از آن بود که عصاره ریشه شیرین بیان با داشتن ترکیبات ضد میکروبی مانند آلکالوئیدها، ساپونین‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، گلیکوزیدها و فنل‌ها دارای فعالیت ضد میکروبی بر روی میکروارگانیسم‌های آلوده کننده نوشابه می‌باشد و در غلظت ۱۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به همراه ۵۰ درصد بنزوات سدیم معمول در فرمولاسیون نوشابه مانع از رشد و فعالیت میکروب‌ها در نوشابه پرتقالی در طی نگهداری شد. با توجه به اثرات نامطلوب نگهدارنده‌های سنتزی بر سلامت انسان و نیز مقاومت سویه‌های باکتریایی به آنتی‌بیوتیک‌ها، مطالعات بیشتر در زمینه کاربرد این عصاره‌ها در سیستم‌های غذایی فساد پذیر پیشنهاد می‌گردد.

طی نگهداری به مدت ۳ ماه حفظ نمود، بلکه بعد از گذشت ۳۰ روز میزان ترکیبات فنولی نوشابه پرتقالی حاوی عصاره ریشه شیرین بیان به میزان ۶۰ درصد افزایش نشان داد و سپس مقدار آن ثابت ماند. این افزایش احتمالاً می‌تواند ناشی از هیدرولیز پیوندهای بین ترکیبات فنولیک با سایر ترکیبات به ویژه پروتئین‌ها باشد (شهبابی و همکاران، ۱۳۸۷).

در بررسی پایداری ترکیبات فنولیک در محیط اسیدی، عربشاهی و اعلمی (۲۰۰۸)، عصاره فنلی شاه توت و نعنای را به آب آناناس اضافه کردند و حلالیت و پایداری آن‌ها را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که عصاره‌های مذکور به خوبی پایداری خود را طی نگهداری به مدت ۴ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد حفظ کردند (Arabshahi-Delouee and Aalami, 2008). شهبابی و همکاران (۱۳۸۷) در بررسی پایداری ترکیبات فنولی در آب سیب در طی دوره نگهداری، افزایش ترکیبات فنولی را گزارش کردند.

جدول ۴- بررسی پایداری ترکیبات فنولیک (mg/100mL) عصاره ریشه شیرین بیان در محیط اسیدی نوشابه پرتقالی در طی دوره نگهداری سه ماهه

زمان (روز)/غلظت (پی‌پی‌ام)	۱۰۰۰	۱۵۰۰	۲۰۰۰	۱۰۰۰±۵۰٪	۱۵۰۰±۵۰٪	۲۰۰۰±۵۰٪
۰	۱/۲۸±۰/۰۰۶ ^b	۱/۸۷۷±۰/۰۱۲۳ ^c	۲/۳۳±۰/۰۳۳ ^c	۱/۲۸±۰/۰۰۵۲ ^c	۱/۸۹±۰/۰۰۲۹ ^b	۲/۳۷±۰/۰۰۴۹ ^b
۱۰	۱/۲۸±۰/۰۰۵ ^b	۱/۸۷۳±۰/۰۰۳ ^c	۲/۳۷±۰/۰۰۱۹ ^c	۱/۲۹±۰/۰۰۷۶ ^c	۱/۸۷±۰/۰۰۶ ^b	۲/۳۸±۰/۰۰۳۷ ^b
۲۰	۱/۲۷±۰/۰۰۴۳ ^b	۱/۸۸±۰/۰۰۴۱ ^c	۲/۳۸±۰/۰۰۴۶ ^c	۱/۲۷±۰/۰۰۲۳ ^c	۱/۸۸±۰/۰۰۷ ^b	۲/۳۹±۰/۰۰۳۵ ^b
۳۰	۱/۲۸±۰/۰۰۱۷ ^b	۱/۸۸±۰/۰۰۱۴ ^c	۲/۳۵±۰/۰۰۱۳ ^c	۱/۳±۰/۰۰۳۸ ^c	۱/۹۴±۰/۰۰۸ ^b	۲/۴±۰/۰۰۳۶ ^b
۴۰	۲/۰۶۳±۰/۰۰۱۱ ^a	۲/۷۱±۰/۰۰۲۰۸ ^b	۳/۰۷±۰/۰۰۵۸۸ ^b	۲/۰۰۸±۰/۰۰۱ ^b	۲/۸۴±۰/۰۰۵۵ ^a	۳/۴۲±۰/۰۰۱۵۸ ^a
۵۰	۲/۰۹±۰/۰۰۱ ^a	۲/۷۵±۰/۰۰۳ ^b	۳/۴۲±۰/۰۰۱ ^a	۲/۱۶±۰/۰۰۵۷ ^a	۲/۹±۰/۰۰۲۴ ^a	۳/۴۳±۰/۰۰۱۸ ^a
۶۰	۲/۰۵۶±۰/۰۰۴۹ ^a	۲/۸۵±۰/۰۰۱۳ ^a	۳/۴۹±۰/۰۰۲۹ ^a	۲/۱۵±۰/۰۰۲۳ ^a	۲/۸۴±۰/۰۰۲۵ ^a	۳/۴۲±۰/۰۰۱۷ ^a
۷۰	۲/۰۹۳±۰/۰۰۵۷ ^a	۲/۸۳±۰/۰۰۱۷ ^a	۳/۴۸±۰/۰۰۲۰۳ ^a	۲/۱۳±۰/۰۰۴ ^a	۲/۹۳±۰/۰۰۸۵ ^a	۳/۴۲±۰/۰۰۶۳ ^a
۸۰	۲/۰۶۶±۰/۰۰۱۵۷ ^a	۲/۸۲±۰/۰۰۱۸ ^a	۳/۴۹±۰/۰۰۰۱ ^a	۲/۱۲±۰/۰۰۲ ^a	۲/۹۱±۰/۰۰۱ ^a	۳/۴۲±۰/۰۰۱۱ ^a
۹۰	۲/۰۷±۰/۰۰۳۴ ^a	۲/۸۳±۰/۰۰۵ ^a	۳/۵۳±۰/۰۰۳۴ ^a	۲/۱۲±۰/۰۰۱ ^a	۲/۹۱±۰/۰۰۲۴ ^a	۳/۴۱±۰/۰۰۱۲ ^a

حروف غیر مشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

منابع

الهامی راد، ا. ح. و محمدی، ع. ا.، ۱۳۸۵، فرمولاسیون نوشابه گازدار با استفاده از عرق بیدمشک و ارزیابی تغییرات فیزیکی و شیمیایی و میکروبی آن در طی نگهداری، مجله پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، جلد دوم، شماره ۱، صفحه ۲۷-۳۹.

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، پایان‌نامه، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه تهران.

شهبابی، ا.، احمدی، ع. و حجازی، م.، ۱۳۸۷، بررسی خواص آنتی‌باکتریال ترکیبات فنلی هسته انگور و پوست انار در آب سیب بر باکتری *Alicyclobacillus acidoterrestris*، پایان‌نامه، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه تهران.

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۷۵، ویژگی‌ها و روش‌های آزمون میکروبیولوژی نوشابه‌های گازدار، چاپ اول، شماره استاندارد ایران ۳۸۴۶.

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 the Royal

- Society for the Promotion of Health, Vol. 125, No. 3, 124-128.
- Bodamyali, T., Stevens, C. R. and Blake, D. R., 2000, Reactive oxygen/nitrogen species and acute inflammation: a physiological process. In: Winyard, P.G., Blake, D. R. and Evans, C. H. editors. Free Radical and inflammation. Basel, Switzerland: Birkhauser. 9-11.
- Fenwick, G. R., Lutomski, J. and Nieman, C., 1990, Liquorice, composition, uses and analysis. Food Chemistry, 38, 119-143.
- Field J.A., and Lettinga., G.,1992, Toxicity of tannic compounds to microorganisms. Plants Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance. Basic Life Science, 59, 673-692.
- Hunter, M. L., 2003, Development of low erosive carbonated fruit drinks, 2- Evaluation of an experimental orange drinks in vitro and in situ. Journal of Dentistry, 31, 253-260.
- Kawanishi, S., Hiraku, Y., Murata, M., and Oilawa, S., 2002, The role of metals in site-specific DNA damage with refrence to carcinogenesis. Free Radical Biology Method, 32, 822-832.
- Kim, H.K., Park, Y., Kim, H.N., B.H., Jeong, H.G., Lee, D.G., and Hahm, k., 2002, Antimicrobial mechanism of β -glycyrrhetic acid isolated from licorice (*Glycyrrhiza glabra*). Biotechnology Letters, 24, 1899-1902.
- Kulisc, T., Radonic, A., and Katalinic, V., 2004, Use of different methods for testing antioxidative of oregano essential oil. Food Chemistry, 85, 633-640.
- 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, 244-282.
- Lin, J.Y., and Tang, C.Y., 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.
- Mirzapour, M., Hamed, M. and Rahimipناه, M., 2010, Sunflower oil stabilization by persian walnut leaves extract during oven storage test. Food Science and Technology Resaerch, 16,443-446.
- Pan, X., Liu, H., Jia, G., and Shu, Y., 2000, Microwave-assisted extraction of glycyrrhizic acid from licorice root. Journal of Biochemical Engineering, 5, 173-177.
- Scalbert, A., 1991, Antimicrobial properties of tannins. Phytochemis try, 30, 3875-3883.
- Sultana, S., Haque, A., Hamid, K., Urm, K.F. and Roy, S., 2010, Antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activity of methanolic extract of *Glycyrrhiza Glabra*. Agriculture and Biology Journal of northAmerica.
- Thornsberry C. and McDougal L.K., 1983, Successful use of broth microdilution in susceptibility tests for methicillin-resistant (heteroresistant) staphylococci. Journal Clin Microbiol;18,1084-91.
- Varnam, A. H. and Sutherland, J. P., 1997, Beverages (Technology, Chemistry, Microbiology), ChapmanandHall.
- Varnam, A. H. and Jane P, 1994, Beverage: Technology, Chemistry and Microbiology. Champan and Hall. London. PP, 120-243.