Archive of SID

# تعیین حداقل غلظت باز دارنده برخی از اسانسها و اسید سیتریک در غیر فعال کردن میکروارگانیسمهای مولد فسادآب پرتقال

ویدا مقصودی*[1] ، زهرا قبادی نژاد[2]، مرجان سلطانزاده[3]

۱- استادیار، مرکز مهندسی بیوشیمی دانشگاه صنعتی شریف
۲-کارشناس مرکز مهندسی بیوشیمی دانشگاه صنعتی شریف
۳- دانشجوی، مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی دانشگاه صنعتی شریف

## چکیده

در این مقاله حداقل غلظت باز دارنده Minimum Inhibitory Concentration (MIC) اسانسهای لیمونن،لینالول و اسانس پوست پرتقال و یک اسید آلی(اسید سیتریک )علیه سه میکرو ارگانیسم مربوط به فساد آب پرتقال (ساکارومایسس سرویزیه ، گلوکونو باکتر اکسیدانس و لوکونوستوک مزنتروئیدیس ) ، دو باکتری جدا شده از آب پرتقال فاسد شده و دو باکتری جدا شده از سطح پوست پرتقال شسته شده ،تعیین گردید. منحنی بقا برای تمام میکرو ارگانیسمها رسم گردید.اسانس لیمونن با غلظت کمتراز ٪۵ رشد مخمر ساکارومایسیس سرویزیه وISO-2 را مهار نمود. لینالول با غلظت کمتراز ٪۵ بر روی لکو نوستوک مزنتروئیدیس مو˚ ثر بوده است؛ ولی، لیمونن، لینالول ، پوست پرتقال و اسید سیتریک با غلظت بیش از ۵ درصد مانع رشد باکتریهایISO- , ISO-2 , ISO-3 ISO-4 1 ، ساکارومایسیس سرویزیه و لکو نوستوک مزنتروئیدیس شده است . آزمایش منحنی بقاSurvivor Curve نیز برای این شش باکتری انجام گردید.

**کلید واژگان:** حداقل غلظت بازدارنده ، لیمونن ، لینالول ، اسانس پوست پرتقال ، اسید سیتریک

## ۱- مقدمه

فرایند سنتی پاستوریزاسیون آب پرتقال برای غیر فعال نمودن آنزیم پکتین متیل آستراز (PME) و از بین بردن میکروارگانیسمهای رشد یافته در آب پرتقال می‌باشد [1] . این فرایند گرمایی بر طعم تازه و طبیعی آب پرتقال اثر نامطلوبی دارا می‌باشد؛ اگر چه آب میوهٔ غیر پاستوریزه دارای طعم مطبوع بوده ولی زمان نگهداری آن در اثر فساد میکروبی و آنزیمی، کوتاه می‌باشد.برای تولید آب میوهٔ غیر پاستوریزه، می‌بایستی از پرتقال سالم و غیر معیوب آب‌گیری شده و آن را در وضعیت بسیار عالی بهداشتی و درجه حرارت پائین نگهداری نمود. ایجاد وضعیت بهداشتی در سطح بسیار بالا برای آبگیری میوه، سبب پائین آمدن بار میکروبی محصول شده و سلامت آب میوه خام را تا مدت زمانی کوتاه تضمین می‌نماید. مهمترین میکروارگانیسمهایی که در فساد آب پرتقال مؤثر هستند، عبارتند از، مخمرها، قارچها و باکتریهای مقاوم به اسید [2]. مخمرها اغلب از جنس ساکارومایسس و قارچها متعلق به جنسهای آسپرژیلوس، پنسیلیوم، فوزاریوم [3] می‌باشند. باکتریهای مقاوم به اسید شامل باکتریهای اسید لاکتیک (لاکتوباسیلیوس و لکونوستوک) و باکتریهای مولد اسید استیک (استوباکتروگلوکونوباکتر) هستند [4].

*مسوول مکاتبات:maghsodi@sharif.edu



www.SID.ir

Archive of SID

شستشوی مؤثر و استفاده از مواد شیمیایی بهداشتی موجب بالارفتن سطح کیفیت آب پرتقال غیر پاستوریزه می‌شود. انتخاب این موادباید بر ا سا س تاثیر آنها در حداقل غلظت مصرفی، حداقل قیمت و حداقل فعالیتهای محیط زیستی (سلامت و ایمنی انسان ومحیطزیست) با شد. آزما یش برای انتخاب مادهٔ شیمیایی بهداشتی، بر اساس تعیین غلظت مؤثره، مؤثر بودن بر علیه میکروارگانیسمهای خاص ، اجرا و عملی می‌گردد و امتیاز اجرای این آزمایشها برای تعیین مقدار مؤثر مادهٔ شیمیایی، ایمنی و اقتصادی بودن آن می‌باشد.

آزمایش مادهٔ شیمیایی برای گروه‌های خاص میکروارگانیسمها مهم می‌باشد زیرا تعداد زیادی از این میکروارگانیسمها دارای گروه‌ها و گونه‌های مقاوم می‌باشند [5]. تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC) ، در مورد ترکیباتی که خاصیت ضد میکروبی دارند، اطلاعات مفیدی را فراهم می‌آورند و قبل از اجرای هر گونه آزمایش دیگر، این اطلاعات بسیار کمک کننده می‌باشند [6]. این آزمایش، حداقل غلظت بازدارنده هر ماده را علیه میکروب خاصی، تحت وضعیت خاص، تعیین می‌کند. آزمایش MIC به وسیله انتشار آگار، محیط کشت آبگوشت مغذی، و یا به وسیله روش منحنی بقا[1] قابل اجرا می‌باشد [7]. هدف از اجرای این طرح، بررسی اثر سه نوع اسانس (لینالول، لیمونن، اسانس پوست پرتقال) و یک اسید آلی(اسید سیتریک) برای تعیین MIC آنها بر علیه میکروارگانیسمهایی که از سطح پرتقال و آب میوهٔ آن جداسازی گردیده‌اند، می‌باشد.

## ۲- مواد و روشها

### ۲-۱- آماده‌سازی محیطهای کشت

کشتهای منجمد از *ساکرومایسس سروزیه و لکونوستوک مزنتروئیدیس* را که قبلا از آب میوهٔ فاسد جداسازی گردیده، ذوب نموده بهم زده و به اندازهٔ یک لوپ به محیط Yeast) (Medium YMاز شرکت Merck برای مخمرها و باکتریها را در آبگوشت TS(Tryptic Soy)تلقیح کردیم؛ سپس، آنها را در ۳۰ $^{o}$ C به مدت ۲٤ ساعت نگهداری کردیم [8]. بعد از رشد آنها را در پلیتهای حاویPCA [2] از شرکت Merck تلقیح کرده و به مدت ٤٨ ساعت در ۳۰$^{o}$C قراردادیم . از محیطهای رشد یافته در پلیتها به عنوان کشت مورد کار[3] برای آزمایش MIC وآزمایش منحنی مرگ[4] استفاده گردید. این کشتها باید هر هفته تازه تهیه و در ٤$^{o}$ C نگهداری شوند.

### ۲-۲- جداسازی میکروارگانیسمها از آب پرتقال فاسد شده

آب پرتقال تازه را برای مدتی طولانی در دمای ۳۰$^{o}$ C نگهداشته تا عوامل فساد در آن مشاهده شود. سپس میکروبهایی که داخل آن رشد کرده‌اند را بعد از رقت‌سازی مناسب[9] در دو سری پلیت حاوی محیط OSA [5] از شرکت Merck و YM[6] پخش نمودیم. از سطح پرتقال شسته شده نیز دو نوع باکتری جدا گردید. محیط Orange Serum Agar به صورت آماده از شرکت Hi Media PVT Limited Bombay, 40008G, India , Laboratories و محیط YM[7] با ترکیبات زیر تهیه گردید:

کلوگز= ۱۰ گرم/لیتر ، آگار= ۲۰ گرم / لیتر ، پپتون = ۱۰ گرم / لیتر، عصارهٔمخمر= ۱۰ گرم/ لیتر و آب = ۱ لیتر . بعد از ۲٤ ساعت رشد را در پلیتها بررسی کردیم و از کلنیهای تک، کشت خطی تهیه گردید و خالص‌سازی نمودیم. در این مرحله چهارباکتری جدا شدند که مشخصات فیزیولوژیک آنها از نظر رنگ آمیزی ومورفولوژی سلولی در جدول ۱ مشخص شده است.این٤ میکروارگانیسم را نیز به طریق فوق به صورت کشت مورد کار آماده می‌کنیم.

### ۲-۳- آماده‌سازی مایه تلقیح

برای تعیین MIC ، کشتهای مورد کار را برروی YM و TS تلقیح کرده و در دمای ۳۰ - ۲۵ $^{o}$ C به مدت ۱۹ تا ۲٤ ساعت کشت داده شدند. سپس آنها را با آبگوشت مغذی مناسب رقیق کرده تا تعداد باکتریها۱۰$^{۷}$ CFU /ml در یک

1. Survivor Curve

2. Plate Count Agar
3. Working Culture
4. Kill-Curve
5. Orange Serum Agar
6. Yeast Medium
7. Yeast Medium


www.SID.ir

Archive of SID

میلی‌لیتر و تعداد مخمرها $10^6$CFU /ml در یک میلی‌لیتر بدست آید [5]. تعداد باکتری و مخمرها با بدست آوردن جذب آنها در $600^{nm}$ تخمین زده شدند. جذب مورد هدف برای باسیل گرم مثبت ۰/۲، برای کوکسی گرم مثبت ۰/۱۸، باسیل گرم منفی ۰/۰۵ و برای مخمرها ۰/۵ به عنوان آزمایش مقدماتی، می‌باشند. از سوسپانسیون‌های میکروبی به دست آمده برای تعیین MIC به عنوان مایه تلقیح استفاده گردید.

**۲-٤- آماده‌سازی موادنگهدارنده**

این محلولهای نگهدارنده شامل اسید سیتریک (از کمپانی Merck) به غلظت ٪۲۰ ، اسانسها (اسانس لینالول و لیمونن با خلوص ۹۷ درصد از کارخانه Merck) با غلظت ٪۱۵ ، (اسانس پرتقال از شرکت کندلوس - ایران - چالوس) با غلظت ٪۱۵ و از محلول Tween 80 ۵ درصد (به عنوان عامل پخش) استفاده شد.

**۲-۵- تعیین MIC مواد نگهدارنده**

در این بخش حداقل غلظت باز دارنده چهار نگهدارنده لیمونن، لینالول،اسانس پوست پرتقال و اسید سیتریک برای باکتریهای و مخمر تعیین گردید.ابتدا از باکتری مورد نظر به اندازه یک لوپ در محیط TS کشت داده و به مدت ٢٤ ساعت در انکوباتور قرارداده و باتنظیم OD سوسپانسیونی با تعداد $10^6$ مخمر و $10^7$ باکتری آماده کردیم. غلظتهای ۰/۲، ۰/۵، ۱ و۵ درصد از لیمونن، لینالول ،اسانس پوست پرتقال و اسید سیتریک را آماده کرده و به میزان ۱۵میلی لیترPCA به غلظتهای باالا اضافه گردید . نمونه‌های آماده شده را اتو کلاو کرده و در پلیتهای استریل به میزان مساوی و با قطر یکسان پخش گردید . در مورد اسید سیتریک نحوه عمل فرق می‌کند زیرا اگر اسید سیتریک را با آگار مخلوط کنیم با پایین آوردن pH سبب می‌شود که آگار ژله ای نشود؛ بنابراین، ابتدا محیط PCA را در پلیتها پخش کرده و بعد به میزان ۱میلی لیتر از غلظتهای تهیه شده اسید سیتریک را روی آن ریخته تا خشک گردید و سپس بر روی تمام پلیتهای آماده شده برای تمام نگهدارنده‌ها به میزان مساوی از سوسپانسیون میکروبی اضافه و پخش کردیم و برای ٢٤ تا ٤٨ ساعت در انکو باتور $30^0$C - ٢٥ قرار داده ، رشد و یا عدم رشد را در غلظتهای مختلف بررسی کردیم.

**جدول ۱** مشخصات میکروارگانیسمهای جدا شده از آب پرتقال

| منبع | میکروارگانیسم/شرح | شماره |
|---|---|---|
| آب پرتقال فاسد شده | ساکروماسیس سرویزیه | YM-1 |
| آب پرتقال فاسد شده | لکونوستوک مزنتروئیدیس | LAS-1 |
| آب پرتقال فاسد شده | باسیل گرم منفی | ISO-1 |
| آب پرتقال فاسد شده | استرپتوکوک | ISO-2 |
| سطح پرتقال شسته شده | باسیل گرم مثبت | ISO-3 |
| سطح پرتقال شسته شده | کوکسی | ISO-4 |

ISO = Isolate


www.SID.ir

Archive of SID

**جدول ۲** میزان MIC ٤- نگهدارنده برای میکروارگانیسمهای مورد بررسی

| میکروارگانیسم* / نگهدارنده | YM-1 | LAS-1 | ISO-1 | ISO-2 | ISO-3 | ISO-4 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| لیمونن | کمتر از ۵درصد | بیشتر از۵ درصد | بیشتر از۵ درصد | کمتر از۵ درصد | بیشتر از۵ درصد | بیشتر از درصد ۵ |
| لینالول | بیشتر از۵ درصد | کمتر از درصد ۵ | بیشتر از۵ درصد | بیشتر از۵ درصد | بیشتر از۵ درصد | بیشتر از۵ درصد |
| اسانس پوست پرتقال | بیشتر از۵ درصد | بیشتر از۵ درصد | بیشتر از۵ درصد | بیشتر از۵ درصد | بیشتر از۵ درصد | بیشتر از۵ درصد |
| اسید سیتریک | بیشتر از۵ درصد | بیشتر از۵ درصد | بیشتر از۵ درصد | بیشتر از۵ درصد | بیشتر از۵ درصد | بیشتر از۵ درصد |

* حاصل از جدول ۱

**۲-٦- منحنی بقا (Survivor Curve)**

به ۱۸ میلی‌لیتر ازاسانسها واسید سیتریک تهیه شده ۲ میلی‌لیتر از مایه تلقیح اضافه کردیم و آنها را به‌وسیله یک بهمزن مغناطیسی با سرعت کم، مخلوط کردیم، به‌طوریکه جمعیت میکروبی $10^6$ CFU/ml باکتری و $10^5$ CFU/m l مخمر به دست آمد. غلظت محلولها نیز قبلا تعیین شده است. یک میلی‌لیتر از هر نمونه را در تناوب ۱۵ ثانیه تا ۲ و ۳ و ۵ دقیقه برداشته و هر یک را بلافاصله با ۹ میلی‌لیتر محلول استریل ۰/۱ درصد پپتون رقیق کرده تا غلظتهای لازم برای شمارش میکروارگانیسمها در پلیتها فراهم آید. در بعضی از موارد یک نمونه تا پایان ۱۰ دقیقه نیز برداشت گردید . سپس سریال رقتهای ساخته شده را برروی پلیتهای OSA[1] و PCA[2] به صورت مضاعف کشت داده وبه صورت وارونه درگرمخانه ۳۰-۳۰°C ۲۵ به مدت ٤۸ - ۲٤ ساعت قرار داده شد . تعداد کلنیهای ظاهر شده با دستگاه (Colony Counter) شمارش گردید [10].

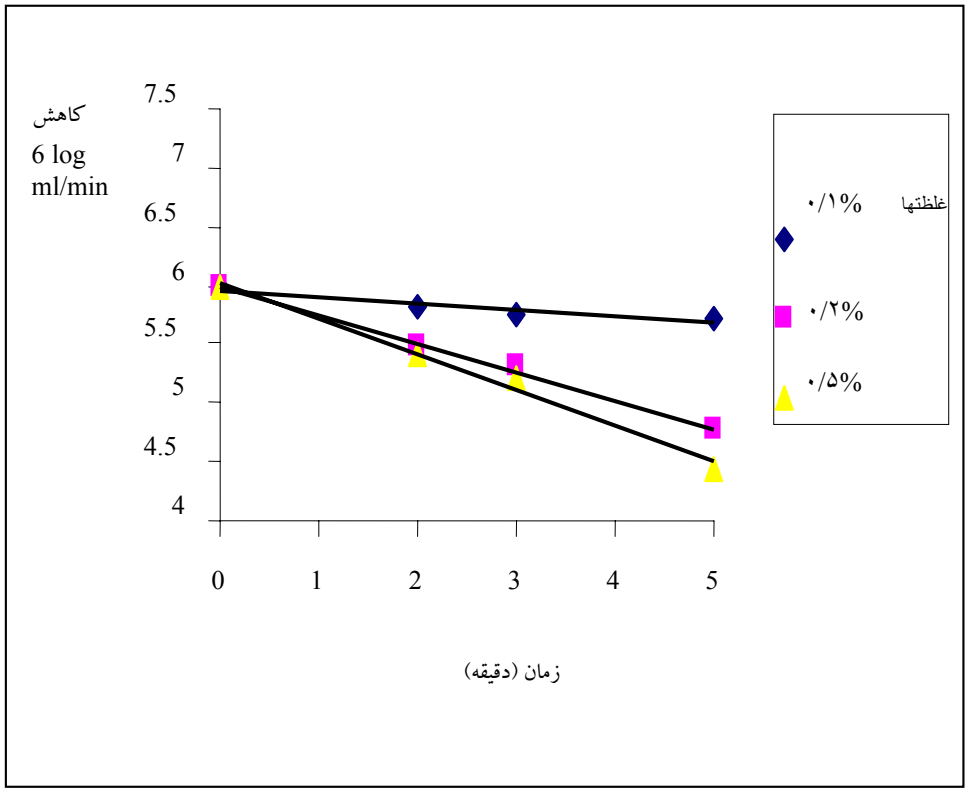
## ۳- نتایج و بحث

از آب پرتقال فاسد شده و ار سطح پوست پرتقال چهار نوع باکتری جدا شد که مشخصات فیزیولوژیک آنها از نظر رنگ‌آمیزی و مورفولوژی سلولی در جدول ۱ مشخص شده است.در جدول ۲ نیز میزان MIC اسید سیتریک واسانسها مشخص شده است. حداقل غلظت باز دارنده اسانس لیمونن برای ساکروماسیس سروزیه و ISO- 2 کمترا ز ۵ درصد ، غلظت لینا لول برای LAS-1 نیز کمتر از ۵ درصد و غلظت اسانس لینالول، لیمونن ، اسانس پوست پرتقال واسیدسیتریک بیشتر از ۵درصد برای سایر میکروارگانیسمها به دست آمد. تعداد میکرو ارگانیسمهای زنده برای ٦ میکروارگانیسم در غلظتهای ۰/۲،۰/۵ و ۱ در صد روغنهای اسانسی رسم گردید و منحنی بقا به‌دست آمد.

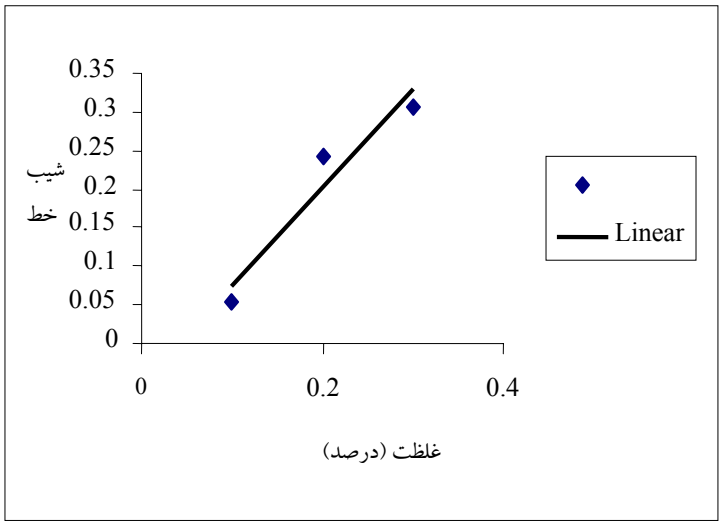
1. Orange Serum Agar
2. Plate Count Agar


www.SID.ir

Archive of SID




**شکل ۱** منحنی بقا برای مخمر *ساکروماسیس سرویزیه* با استفاده ازاسانس لیمونن در غلظتها ی ۰/۱، ۰/۲ و۰/۵ درصد




**شکل ۲** غلظت مناسب لیمو نن برای کاهش ٦log ml/minبرای مخمر *ساکارومیسس سروزیه*

شکل ۱ منحنی بقا را برای مخمر ساکروماسیس سرویزیه در تناوب زمانی ۵ دقیقه و اسانس لیمونن نشان می‌دهد. غلظت لازم برای کاهش٦log بر میلی لیتردر دقیقه این باکتری با رسم شیبهای خطوط رگرسیون منحنی بقا برحسب غلظتهای مختلف اسانس لیمونن ۷/۰۳ درصد بدست آمد( شکل ۲).

جدول ۳ غلظت روغنهای اسانسی را برای سایر میکروارگانیسمها نشان می‌دهد. غلظت اسانس لیمونن برای ٦ لگارتیم کاهش در میلی لیتر در دقیقه برای میکروارگانیسمهای مورد آزمایش ٤/٧٦ ، ٨/٩ ، ٧/٥ ، ٤/٤٢ وبیش از ۱۰ درصد می‌باشد. همچنین غلظت اسانس لینالول ۹/۹ ، ۳/۵ و بیش از


www.SID.ir

Archive of SID

۱۰ درصد ، غلظت اسانس پوست پرتقال ٦/٧ ، ٧/٦ و بیش از ۱۰ درصد وغلظت اسید سیتریک بیش از ۱۰ درصد بهدست آمده است. با مقایسه این نتایج با نتایج بهدست آمد ه از کار تحقیقاتی Winniczuk و همکارا ن [10] غلظت ا سا نس لیمونن برای غیر فعال کردن مخمر *ساکارومیسس سروزیه* ٤/٥ درصد و برای سایر میکروارگا نیسمها بیش از ده درصد بدست آمده است. غلظت اسید سیتر یک نیز در این تجربه بیش از ده درصد گزارش شده است . با توجه به نتایج فوق کارآیی این نوع اسانسها برای غیر فعال کردن میکروارگانیسمهای مربوط به آب پرتقال از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نمیباشد و همچنین از نقطه نظر ارگا نو لیپتیکی نیز طعم ایجاد شده در آ ب پرتقال با این غلظت بالای اسانس مورد خوشایند مصرف کننده نمیباشد. اسیدسیتریک نیز بطور طبیعی در آب پرتقال یافت میشود؛ بنابراین، افزایش بیش از ده درصد آن بهعنوان نگهدارنده سبب ترش شدن این مادهٔ غذایی میگردد.

## ٤- نتیجه گیری

از نتایج بدست آمده از تجربه فوق میتوان این طور استنباط کرد؛ اگر چه، اسانسها دارای خاصیت ضد میکروبی خوبی هستند و در بسیاری از مواد غذایی ممکن است مورد استفاده قرار بگیرند و بی ضرر بودن آ نها نیز نسبت به نگهدارندههای شیمیایی در سلامت انسان ثا بت شده است، معذالک غلظت کم آنها مناسب می باشد؛ چون اسانس حالت روغنی داشته و در فاز مایع مانند آب پرتقال بر سطح آن قرار میگیرد وغلظت بیش ۱ تا ۲ درصد مناسب نمیباشد. اسید سستریک بهعنوان پایین آورنده پ- هاش مناسب بوده وغلظت زیاد آن در افزایش به مواد غذایی سبب ترش شدن بیش از حد آن ماده بخصوص آب پر تقال میگر دد..

**جدول ۳** غلظت لازم(درصد حجمی) اسانسها و اسید سیتریک برای ٦ لگارتیم کاهش در میلی لیتر در دقیقه میکروارگانیسمهای مورد آزمایش

| نوع اسانس | ساکارومیسس سروزیه YM-1 | لکونوستوک مزنتروئیدیس LAS-1 | Iso-1 | Iso-2 | Iso-3 | Iso-4 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| لیمو نن | ٤/٧٦ | ٨/٩ | ٧/٥ | ٤/٤٢ | >۱۰ | >۱۰ |
| لینالول | ٩/٩ | ٣/٥ | >۱۰ | >۱۰ | >۱۰ | >۱۰ |
| اسانس پوست پرتقال | ٦/٧ | ٧/٦ | >۱۰ | >۱۰ | >۱۰ | >۱۰ |
| اسید سیتریک | >۱۰ | >۱۰ | >۱۰ | >۱۰ | >۱۰ | >۱۰ |

## ٥- منابع


[1] Berry, R. E. and Veldhuis, M. K. 1977. Processing of oranges, grapefruits and tangerines.In Citrus Science andTechnology, Vol. 2, (Eds. Nagy, S., Shaw, P. E. and Veldhuis, M. K.), Westport, CT, AVI Publishing.

[2] Parish, M. E. 1988. Microbiological aspects of fresh squeezed Citrus juice. In Ready to serve Citrus Juices and Juice Added Beverges, Proceeding of the Food Industry Short Course,, pp79-87 GainesVille University of Florida.

[3] Parish. M. E. and Higgins, D. P. 1989. Yeast and molds isolated from spoilage citrus products and by- products. J Food Protect.Vol.52, pp261-263.

[4]Murdock,D.I. 1977. Microbiology of citrus products. In Citrus Science and Technology, vol. 2 (Eds. Nagy, S., Shaw,P.E. and



www.SID.ir

Archive of SID

Veldhuis, M.K.) pp. 445-481, Westport, CT, AVI Publishing.

[5] Parish. M. E. and Davidson, P. M. 1993. Methods for evaluation. In Antimicrobiol in Foods, (Eds.Davidson, P. M. and Branen, A.L.), New York, Marcel Dekker, Inc

[6] Cremieux, A. and Fleurette, J. 1991. Methods of testing disinfectants. Disinfectants, Sterilization, and Preservation, 4th edn. (Ed. Block, S. S.) Philadelphia Lea and Febiger.

[7] Davidson, P. M. and Parish, M. E. 1989. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials.Food Technol.Vol. 43, No.1, pp148-155.

[8] Atlas M. R. 1996. Handbook Microbiologiical Media.

[9] Cappuccino J., Sherman N. 1996. Microbiology : A Laboratory Manual.

[10] Winniczuk,P.P. and Parish M.E. 1997. Minimum inhibitory. concentration of antimicrobials against micro-organisms related to citrus juice. Food Microbiology, Vol.14, pp 373-381.


www.SID.ir