Archive of SID

تحقیقی

اثر ضدمیکروبی عصاره آبی پوست پرتقال و اثر آن بر مدت زمان ماندگاری شیرطعم‌دار

مریم رزمجو[۱]، دکتر پژواک خاکی*[۲]، وجیهه فدائی نوغانی[۳]

۱- کارشناس ارشد تکنولوژی مواد غذایی، گروه علوم تغذیه و صنایع غذایی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. ۲- دکتری میکروب‌شناسی، دانشیار، بخش میکروب‌شناسی، مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی، کرج. ۳- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف : *به‌کارگیری روش‌هایی برای افزایش مدت زمان ماندگاری محصولات لبنی با استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی ضروری است. این مطالعه به منظور تعیین اثر ضدمیکروبی عصاره آبی پوست پرتقال و اثر آن بر مدت زمان ماندگاری شیرطعم‌دار انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه توصیفی - تحلیلی فعالیت ضدمیکروبی عصاره آبی پوست پرتقال به روش انتشار دیسک و تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) به روش رقیق کردن متوالی محیط کشت مایع بر روی میکروارگانیسم‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی و کاندیداآلبیکانس انجام شد. سپس اثر آن بر مدت زمان ماندگاری شیرطعم‌دار ارزیابی گردید.*

یافته‌ها : *عصاره آبی پوست پرتقال با استفاده از هر دو روش انتشار دیسک و MIC ، بیشترین اثر را بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و کاندیداآلبیکانس به ترتیب با قطر هاله ۲۹/۰۶ میلی‌متر و ۵۰ میلی‌متر و حداقل غلظت مهارکنندگی ۲mg/ml برای هر دو میکروارگانیسم نشان داد. کمترین اثر بر روی اشریشیاکلی با قطر هاله ۷/۱۱ میلی‌متر و حداقل غلظت مهارکنندگی ۱۵ mg/ml مشاهده شد. همچنین در شیر نیز ۰/۱۷g/ml عصاره آبی پوست پرتقال باعث کاهش رشد میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه در زمان‌های ٦، ۱۲، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت گردید. دما بر روی رشد کاندیدا آلبیکانس در شیر اثرگذار بود. به طوری که با کاهش دما رشد میکروارگانیسم کاهش نشان داد (P<۰/۰۵). اثر معنی‌دار مهاری عصاره بر روی استافیلوکوکوس اورئوس بیشتر از اشریشیاکلی بود (P<۰/۰۵).*

نتیجه‌گیری : *عصاره آبی پوست پرتقال بر روی رشد استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی و کاندیدا آلبیکانس در شرایط آزمایشگاهی و نیز در شیر اثر مهاری داشت.*

کلید واژه‌ها : *عصاره آبی پوست پرتقال ، استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی، کاندیدا آلبیکانس ، شیر*

* نویسنده مسؤول : دکتر پژواک خاکی ، پست الکترونیکی khakipejvak@yahoo.com

نشانی : کرج، حصارک، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کدپستی ۳۱۹۷٦۱۹۷۵۱، تلفن ۳٤٥۷۰۰۳۸-۰۲٦، نمابر ۳٤٥٥۲۱۹٤

وصول مقاله : ۱۳۹٤/۲/۱٦ ، اصلاح نهایی : ۱۳۹٤/٤/۲٤ ، پذیرش مقاله : ۱۳۹٤/٥/۱۷

مقدمه

علی‌رغم پیشرفت چشمگیر در عرصه تولید، نگهداری و عرضه موادغذایی، موضوع سلامت مواد غذایی اهمیت روزافزونی در بهداشت عمومی دارد. حفظ ایمنی ماده غذایی و کیفیت آن در دوره ماندگاری امری بسیار مهم است. بیماری‌های ناشی از مصرف غذاهای آلوده در همه جای دنیا یک مشکل اساسی به‌شمار می‌رود. لذا نیاز به کاهش یا حذف عوامل بیماری‌زای مواد غذایی با استفاده از روش‌های جدید کاملاً محسوس است (۱). خواص درمانی گیاهان از دیرباز مورد توجه بشر بوده است. به طوری که طب سنتی یکی از پایه‌های درمان و کنترل درد و گاهی پیشگیری از بیماری‌ها است (۳-۱). زمان زیادی از اثبات فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی سپری شده است؛ اما در سال‌های اخیر افزایش علاقه‌مندی‌ها به توسعه فرآیند سبزگرایی سبب از سرگیری مطالعات و بررسی‌های علمی در ارتباط با این مواد شده است (۱و۳و۶-۴). آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی یکی از راه‌های مهم کنترل عفونت‌های میکروبی است (۱). شیر فرآورده‌ای دامی است که از دیرباز به عنوان یک غذای کامل و با ارزش مورد استفاده بشر قرار گرفته است و با توجه به دارا بودن کلیه ترکیبات اصلی و بیولوژیکی مورد نیاز رشد و نگهداری اندام‌های انسانی کامل‌ترین غذا است. یکی از محصولات لبنی بسیار پر طرفدار که اخیراً مورد توجه قرار گرفته است؛ شیرهای طعم دار هستند. از جمله این طعم دهنده‌ها، میوه‌ها و عصاره آنها است که علاوه بر ایجاد طعم باعث افزایش مدت زمان ماندگاری شیر به‌علت ترکیبات ضدمیکروبی آنها می‌شود. شیرهای طعم‌دار، نوشیدنی سالمی برای تمام گروه‌های سنی هستند. زیرا در عین حال که نیاز فرد به خوردن غذاهای شیرین را برآورده می‌کند؛ دریافت کلسیم و سایر مواد مغذی دیگر را افزایش می‌دهند (۷). این

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعه به منظور تعیین اثر ضدمیکروبی عصاره آبی پوست پرتقال و اثر آن بر مدت زمان ماندگاری شیرطعم‌دار انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی – تحلیلی در آزمایشگاه میکروب‌شناسی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی درسال ۱۳۹۲ انجام شد.

پرتقال گونه سانگینلا از مرکز مرکبات رامسر در فصل زمستان تهیه و با نرمال سالین شسته شد. سپس پوست آن جداسازی و در سایه خشک گردید. عصاره آبی پوست پرتقال با روش ماسراسیون در مرکز پژوهشکده گیاهان دارویی تهیه شد. از ۳۵ گرم پودر پوست پرتقال و ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۶ ساعت به روش ماسراسیون عصاره‌گیری انجام گردید. پس از گذشت مدت زمان لازم ۱۰۰میلی‌لیتر محلول به‌دست آمد. پس از آن pH نمونه با pH متر (ساخت سوئیس) اندازه‌گیری شد و در سردخانه با دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد.

کشت لیوفیلیزه *استافیلوکوکوس اورئوس* (RTCC=۱۸۸۹)، *اشریشیاکلی* (RTCC=۲۳۲۵) و *کاندیدا آلبیکانس* (RTCC =۱۴۲) از کلکسیون میکروبی بخش میکروب‌شناسی مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی کرج تهیه گردید.

۱۰۰ میلی‌لیتر محلول به‌دست آمده از مرحله عصاره‌گیری به نسبت ۱:۱۰ رقیق شد. سپس یک میلی لیتر از محلول فوق در پلیت استریل ریخته شد و دیسک‌های بلانک استریل درون آن قرار گرفت. پس از گذشت ۲۴ ساعت و جذب شدن عصاره در دیسک، از آنها برای تعیین فعالیت ضدمیکروبی استفاده گردید. میزان ماده موثر موجود در دیسک‌ها ۳۵ mg/ml بود. از آنجا که قطر هاله حاصل از غلظت مورد استفاده کوچک بود؛ در نتیجه استفاده از غلظت‌های پائین‌تر منطقی به‌نظر نمی‌رسید.

ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی با روش انتشار دیسک در محیط BHI (مرک آلمان) و با استفاده از دیسک‌های کاغذی ۶ میلی‌متری و حداقل غلظت بازدارنده در محیط کشت مایع مولر هینتون انجام شد. در روش انتشار دیسک پس از تهیه سوسپانسیون میکروبی با غلظت معادل 10^6، پلیت‌ها با سوآپ استریل آغشته به سوسپانسیون میکروبی تلقیح و سپس دیسکی که حاوی ۰/۰۳۵ g/ml عصاره آبی پوست پرتقال بود توسط پنس استریل و در کنار شعله روی محیط کشت قرار گرفت. پلیت BHI به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای باکتری و پلیت SDA به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد برای قارچ نگهداری شد. پس از سپری شدن زمان لازم، قطر هاله‌های عدم رشد با کولیس اندازه‌گیری شد. برای سنجش MIC از روش لوله استفاده گردید و نیم میلی‌لیتر از عصاره که حاوی ۰/۱۷ گرم بر میلی‌لیتر ماده موثره بود؛ در ۴/۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع مولر هینتون ترکیب و سپس ۵۰ میکرون سوسپانسیون میکروبی اعم از *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به آن اضافه شد. بعد از آن برای رقیق‌سازی ۲/۵ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون برداشته شد و به ۲/۵ میلی‌لیتر محیط کشت که در لوله شماره ۲ قرار داشت؛ افزوده شد و این روند تا لوله شماره ۱۰ ادامه یافت. سپس لوله‌ها برای بررسی و ایجاد محیط مناسب برای رشد میکروارگانیسم در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. تمام این مراحل به ترتیب ذکر شده در مورد قارچ *کاندیدا آلبیکانس* نیز انجام گردید. با این تفاوت که محیط کشت مورد استفاده SDB بود و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. نتایج بر حسب کدورت لوله‌ها مشخص و MIC تعیین شد.

آزمون میکروبیولوژی در شیر حاوی عصاره: ۱۰ میلی‌لیتر از شیر حاوی عصاره را در شرایط کاملاً استریل درون لوله آزمایش ریخته و سپس تعداد سلول‌های باکتری شمارش شد. برای این منظور ابتدا از نمونه به ترتیب زیر رقت‌سازی شد.

الف) ۱۰ عدد لوله آزمایش دربسته حاوی ۹ میلی‌لیتر آب مقطر یا سرم فیزیولوژی را استریل نمودیم و لوله‌ها از یک تا ۱۰ شماره‌گذاری و به ترتیب درون جالوله‌ای قرار داده شد. ب) از نمونه اولیه یک میلی‌لیتر در شرایط استریل به لوله شماره یک منتقل شد. ج) محتوی لوله اول کاملاً مخلوط شد تا رقت 10^{-1} کاملاً یکنواخت گردد. سپس یک میلی‌لیتر از آن در شرایط استریل به لوله بعدی منتقل شد. د) مرحله قبل به ترتیب برای لوله‌های بعدی تکرار شد تا رقت 10^{-10} به‌دست آمد. ه) از تمام رقت‌ها هر کدام حجم معینی (۰/۵ میلی‌لیتر) را به دو پلیت محیط کشت جامد منتقل کردیم. برای انجام آزمون *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* از لوله‌ای که حاوی ۱۰ میلی‌لیتر مخلوط شیر و عصاره و نیم میلی‌لیتر میکروارگانیسم (به روش سنجش جذب نوری با دستگاه اسپکتروفوتومتر، میزان میکروارگانیسم *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* 10^6 CFU/ml) بود؛ ۰/۵ میلی‌لیتر در لوله آزمایش شماره یک (محتوی ۴/۵میلی‌لیتر آب مقطر استریل) ریخته و کاملاً مخلوط شد. سپس از لوله شماره یک، ۰/۵ میلی لیتر برداشته و در لوله دوم که حاوی ۴/۵میلی‌لیتر آب مقطر استریل بود؛ ریخته شد و به این ترتیب رقت آن به 10^{-2} رسید. به همین ترتیب رقت‌سازی ادامه یافت و تا لوله شماره ۱۰ به رقت 10^{-10} رسانده شد. در پایان این مراحل از هر لوله ۰/۵ میلی‌لیترمحلول را در محیط کشت TSA ریخته و میکروارگانیسم‌ها شمارش گردید. آزمون‌ها در زمان صفر، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و یک هفته پس از تلقیح میکروارگانیسم‌ها انجام شد. در مورد قارچ *کاندیدا آلبیکانس* آزمون همانند مراحل ذکر شده در آزمون باکتریایی انجام گردید؛ با این تفاوت که محیط کشت مورد استفاده، SDA و پلیت‌ها در

www.SID.ir

Archive of SID

دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت تا یک هفته گرمخانه‌گذاری شدند. نتایج به صورت تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی در گرم یا میلی‌لیتر فرآورده بیان شد.

آزمون‌های شیمیایی مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ۱۵۲۷ انجام شد. علاوه بر این برخی ویژگی‌های حسی نمونه‌ها شامل طعم و مزه، بو، رنگ و پذیرش کلی مطابق با استاندارد ۲۴۴۲ با روش هدونیک پنج نقطه‌ای و مطابق با فرم ارزشیابی حسی ارزیابی شد. نمونه‌ها پس از آماده‌سازی در اختیار ارزیابان قرار گرفت. در فواصل بررسی نمونه‌ها، ارزیابان پرسشنامه‌ای را که در اختیارشان قرار داده شده بود؛ تکمیل کردند. در این آزمون عدد یک نشان‌دهنده پایین‌ترین امتیاز داده شده توسط ارزیاب و عدد ۵ نشان‌دهنده بالاترین امتیاز بود.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS-9.1 و رویه GLM تجزیه و تحلیل شدند. مقایسه میانگین‌ها با روش تحلیل واریانس و مقایسه زوجی توسط آزمون دانکن در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ و آنالیز داده‌های حسی با روش کروسیکال والیس انجام شد.

یافته‌ها

با روش آزمون دیسک دیفیوژن، عصاره آبی بر روی میکروارگانیسم‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی* و *کاندیدا آلبیکانس* اثرگذار بود. بیشترین اثر بر روی *کاندیدا آلبیکانس* (۵۰ mm) و کمترین اثر بر روی *اشریشیاکلی* (۷/۱۱ mm) مشاهده شد (جدول یک)

با روش حداقل غلظت بازدارندگی به روش رقت سازی، نیز بیشترین اثر بر روی *کاندیدا آلبیکانس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* (۰/۰۰۲ g/ml) و کمترین اثر بر روی *اشریشیاکلی* (۰/۰۱۵g/ml) تعیین شد (جدول یک). اثر ضدمیکروبی عصاره آبی پوست پرتقال بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر از *اشریشیاکلی* بود ($P<0/01$).

در تیمار حاوی شیر، عصاره آبی و *اشریشیاکلی*، تعداد اولیه میکروارگانیسم تلقیحی به تدریج در طول زمان یک هفته از 10^6 به 10^3 CFU/ml کاهش یافت. در نمونه کنترل نیز *اشریشیاکلی* تلقیحی از 10^6 CFU/ml طی مدت ۲۴ ساعت تا 10^{10} CFU/ml افزایش و سپس طی مدت یک هفته و در دمای انکوباسیون (۳۷ درجه سانتی‌گراد) تعداد آن 10^{10} CFU/ml ثابت باقی ماند. میانگین تعداد میکروارگانیسم‌ها در گروه کنترل بیشتر از عصاره آبی پوست پرتقال بود (نمودار یک). در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نیز نمونه کنترل (بدون عصاره) روند افزایشی و تیمارهای حاوی عصاره روند کاهشی را نشان دادند (نمودار ۲).

در تیمار حاوی شیر، عصاره آبی و *استافیلوکوکوس اورئوس* در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تعداد میکروارگانیسم از 10^6 CFU/ml به 10^4 CFU/ml پس از ۱۲ساعت و سپس به 10^2 CFU/ml در ۲۴ ساعت و سپس ثبات آن تا ۷۲ ساعت و پس از آن طی یک هفته به ۱۰ CFU/ml کاهش یافت. در نمونه کنترل (بدون عصاره) نیز از 10^6 CFU/ml در مدت ۲۴ساعت به 10^{10} CFU/ml رسید و پس

جدول ۱ : میانگین قطر هاله عدم رشد و میانگین حداقل غلظت بازدارندگی

باکتری	عصاره آبی پوست پرتقال (۰/۰۳۵ g/ml)	
	* میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)	** میانگین حداقل غلظت بازدارندگی (mg/ml)
اشریشیاکلی	۷/۱۱	۱۵
استافیلوکوکوس اورئوس	۲۹/۰۶	۲
کاندیدا آلبیکانس	۵۰	۲

** مقدار فعالیت ضدباکتریایی هر عصاره متناسب با بزرگی عدد مندرج در جدول است.*
*** عدد کوچک‌تر نشان‌دهنده اثر ضدمیکروبی بهتر بر میکروارگانیسم است.*

جدول ۲ : درصد فراوانی باکتری‌ها و مخمر (CFU/ml) در پایان یک هفته

تیمار	درصد فراوانی باکتری‌ها و مخمر (CFU/ml)			
	٤ درجه سانتی‌گراد	۲۵ درجه سانتی‌گراد	۳۷ درجه سانتی‌گراد	کنترل
شیر + عصاره آبی + اشریشیاکلی	1×10^3	–	1×10^3	1×10^{10}
شیر + عصاره آبی + استافیلوکوکوس اورئوس	1×10^3	–	1×10^1	1×10^{10}
شیر + عصاره آبی + کاندیدا آلبیکانس	1×10^4	1×10^3	–	1×10^{10}

جدول ۳ : مقایسه میانگین و انحراف معیار تعداد اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و کاندیدا آلبیکانس (CFU/ml) در تیمارهای مختلف شیر

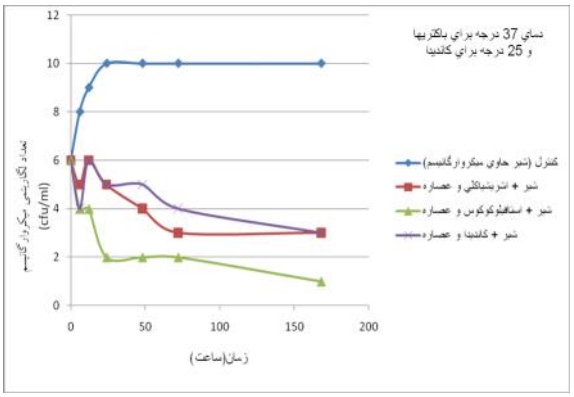
تیمار	میانگین و انحراف معیار		
	اشریشیاکلی	*استافیلوکوکوس اورئوس*	*کاندیدا آلبیکانس*
عصاره آبی	* $2/85\times10^8\pm9/05\times10^8$	* $8/90\times10^5\pm2/35\times10^6$	* $8/45\times10^8\pm3/85\times10^9$
کنترل	$7/05\times10^{11}\pm1/35\times10^{11}$	$7/05\times10^{11}\pm1/35\times10^{11}$	$7/05\times10^{11}\pm1/35\times10^{11}$

** $P<0/05$ گروه عصاره آبی نسبت به گروه کنترل؛ اعداد ذکر شده در جدول معرف دو مرتبه تکرار آزمایش در زمان‌های ۰، ٦، ۱۲، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت در دو دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و ۳۷ درجه سانتی‌گراد است.*

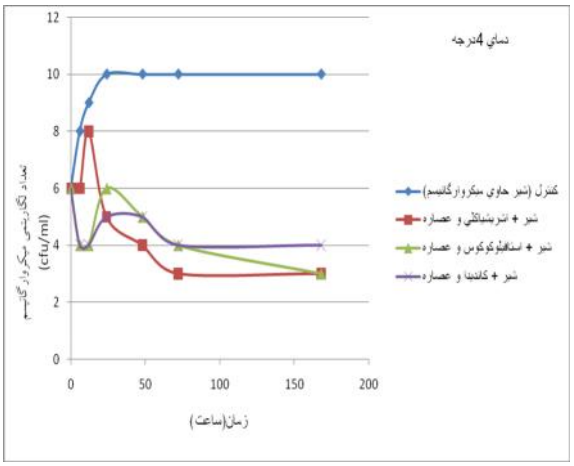
www.SID.ir

Archive of SID

ازآن تا یک هفته این تعداد ثابت ماند (نمودار یک).



نمودار ۱ : تعداد لگاریتمی اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و کاندیدا آلبیکانس بر حسب زمان در دو دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد



نمودار ۲ : تعداد لگاریتمی اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و کاندیدا آلبیکانس بر حسب زمان در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد

تعداد اولیه *استافیلوکوکوس اورئوس* در دمای ۴درجه سانتی‌گراد در تیمار حاوی عصاره آبی به این ترتیب بود که در مدت ۱۲ ساعت به 10^4 CFU/ml کاهش، سپس در ۲۴ ساعت به 10^6 CFU/ml، در ۴۸ ساعت به 10^5 CFU/ml افزایش و سپس طی ۷۲ ساعت تا یک هفته دوباره سیرنزولی داشت و به 10^3 CFU/ml کاهش یافت. در نمونه کنترل نیز همچون تیمارهای قبلی روند صعودی را در تعداد میکروارگانیسم تلقیحی اولیه شاهد بودیم (نمودار ۲). تعداد میکروارگانیسم‌ها در عصاره آبی با گروه کنترل تفاوت داشت ($P<0/05$). همچنین در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تعداد *استافیلوکوکوس اورئوس* کمتر از دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد بود (جدول ۲).

در تیمار حاوی عصاره آبی 10^6 CFU/ml *کاندیدا آلبیکانس* تلقیحی اولیه تا ۱۲ ساعت به 10^5 CFU/ml کاهش و سپس طی ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت به 10^6 CFU/ml افزایش و سپس مجدداً سیر نزولی داشت. به طوری که طی یک هفته به 10^3 CFU/ml کاهش یافت. در نمونه کنترل سیر صعودی مشاهده شد (نمودار یک).

کاندیدا آلبیکانس در ۱۲ ساعت اولیه مقداری کاهش داشت و این به علت سازگار شدن میکروارگانیسم با محیط بود. پس از آن رشد جزیی داشت و بعد از یک هفته سیر نزولی مشاهده شد. در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، در تیمار حاوی عصاره آبی تا ۱۲ ساعت کاهش *کاندیدا آلبیکانس* از 10^6 CFU/ml به 10^4 CFU/ml را شاهد بودیم. سپس تا ۴۸ ساعت تا 10^5 CFU/ml سیر صعودی داشت و سپس مجدداً سیر نزولی داشت و به 10^4 CFU/ml پس از یک هفته رسید. در نمونه کنترل همچون نمونه‌های قبلی با گذشت زمان بر تعداد میکروارگانیسم‌ها افزوده شد (نمودار ۲). میانگین تعداد میکروارگانیسم ها در گروه کنترل بیشتر از گروه تیمار (عصاره آبی) بود. عصاره آبی پوست پرتقال در کاهش تعداد *کاندیدا آلبیکانس* نسبت به گروه کنترل موثر بود (جدول ۳).

اسیدیته تیمار حاوی عصاره آبی ۰/۱۶ و pH=۶/۵ بود که در محدوده تعریف شده استاندارد است. برای تمامی ویژگی‌های حسی بو، طعم، رنگ و پذیرش کلی، اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت ($P<0/01$). به طوری که شیر حاوی عصاره آبی پوست پرتقال توسط افراد ارزیاب در مقایسه با شیر بدون عصاره مورد پذیرش واقع نشد.

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه در شرایط آزمایشگاهی با روش انتشار دیسک، عصاره آبی پوست پرتقال دارای بیشترین اثر بر روی قارچ *کاندیدا آلبیکانس* و کمترین اثر بر روی *اشریشیاکلی* بود. در روش MIC نیز بیشترین اثر عصاره آبی بر روی قارچ *کاندیدا آلبیکانس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* و کمترین اثر بر روی *اشریشیاکلی* مشاهده شد. عصاره آبی در روش‌های مختلف دارای اثرات مشابهی بر روی میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه بوده است که نشان می‌دهد قطر هاله عدم رشد باکتری‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*) بزرگ‌تر از باکتری‌های گرم منفی (*اشریشیاکلی*) است که می‌تواند به‌علت وجود دیواره سلولی ضخیم‌تر در باکتری‌های گرم منفی باشد. این نتایج با یافته‌های Kivance و Akgul که اثر ضدمیکروبی عصاره پوست پرتقال را بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* بررسی کردند (۸) و نیز مطالعه Kirbaslari و همکاران (۹) که به بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره چندین میوه از جمله پرتقال پرداختند؛ همخوانی دارد.

در مطالعه حاضر میانگین تعداد میکروارگانیسم‌های شیر در گروه کنترل بیشتر از گروه تیمار (عصاره آبی) بود. عصاره آبی در کاهش تعداد *اشریشیاکلی* نسبت به گروه کنترل موثر بود. همچنین تعداد *کاندیدا آلبیکانس* در دمای ۴ درجه سانتی گراد کمتر از دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و تعداد *استافیلوکوکوس اورئوس* در دمای

www.SID.ir

Archive of SID

۴ درجه سانتی‌گراد کمتر از دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بود.

در مطالعه Bahk و همکاران نیز دمای پایین باعث تسهیل خاصیت نگهداری توسط عصاره گیاهان گردید (۱۰). در مطالعه Beuchat و همکاران نیز استفاده از دمای پایین توانست خاصیت ضدمیکروبی عصاره گیاهان را تسهیل نماید (۱۱). هر دو نتیجه این مطالعات با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد. در واقع کاهش دما باعث افزایش خاصیت ضدمیکروبی عصاره می‌شود که این نتایج در مورد *کاندیدا آلبیکانس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در مطالعه ما مشاهده شد. در واقع کاهش دما باعث می‌شود چربی غشا سلولی بیشتر به صورت غیراشباع بوده و باعث اغتشاش دیواره سلولی و در نتیجه افزایش فعالیت ضدمیکروبی عصاره می‌شود (۱۲و۱۳).

در مطالعه حاضر اثر عصاره‌ها بر میکروارگانیسم‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*) معنی‌دارتر از میکروارگانیسم‌های گرم منفی (*اشریشیاکلی*) بود. نتایج مطالعه Biswas و همکاران (۲) نیز نشان داد عصاره زغال اخته بر روی میکروارگانیسم‌های گرم مثبت در شیر بیشتر از میکروارگانیسم‌های گرم منفی است که با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد.

در مطالعه حاضر pH شیر حاوی عصاره در محدوده تعریف شده استاندارد برای شیرهای طعم‌دار بود؛ اما از pH شیر معمولی پایین‌تر بود. در مطالعه مشیدی اثر آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی اسانس‌های آویشن شیرازی، مرزنجوش و خالواش و برخی عوامل موثر بر رشد باکتری انتروکوکوس فکالیس بررسی شد و اثر اسانس‌های مذکور بر نفوذپذیری غشاء و سطح سلولی انتروکوکوس فکالیس نیز ارزیابی شد. دو روش دیسک دیفیوژن و میکرودیلوشن به منظور ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌ها استفاده شدند و pH در اکثر موارد بر نرخ رشد و فاز تاخیر باکتری اثرگذار بود (۵) که با نتایج مطالعه ما مطابقت داشت. همچنین مطالعه مشیدی نشان داد اسانس‌های آویشن شیرازی، مرزنجوش و خالواش می‌توانند به عنوان یک نگهدارنده طبیعی علیه انتروکوکوس فکالیس مورد استفاده قرار گرفته و به عنوان یک ماده ضدمیکروبی مؤثر در برابر این باکتری عمل نمایند (۵).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره آبی پوست پرتقال بر روی رشد *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی* و *کاندیداآلبیکانس* در شرایط آزمایشگاهی و نیز در شیر اثر مهاری دارد؛ اما شیر حاوی عصاره از نظر بو و طعم و رنگ مورد پذیرش نبود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه خانم مریم رزمجو برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته مهندسی کشاورزی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس بود. بدین‌وسیله از آقای دکتر مازیار فقیه نصیر از مرکز مرکبات رامسر، آقای دکتر کرامت‌اله رضایی از دانشگاه تهران، آقای علی کاوه از دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرقدس، کارکنان بخش میکروب‌شناسی مؤسسه سرم و واکسن‌سازی رازی کرج به‌خصوص آقای فرج اله اسفندیاری نهایت سپاس خود را اعلام می‌داریم. همچنین از آقای وحید زارع سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. Int J Food Microbiol. 2004 Aug; 94(3):223-53.

2. Biswas D, Wineman NE, O'bryan CA, Muthalyan A, Lingbeck JM, Crandall PG, et al. Pasterized Blueberry (Vaccinium Corymbosum) juice inhibits growth of bacterial pathogens in milk but allows survival of probiotic bacteria. J Food Safety. 2012 May; 32(2): 204-9. doi: 10.1111/j.1745-4565.2012.00369.x

3. Tajkarimi MM, Ibrahim SA, Cliver DO. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control. 2010; 21(9): 1199-1218.

4. Akhondzadeh Basti A, Misaghi A, Khaschabi D. Growth response and modelling of the effects of Zataria multiflora Boiss. essential oil, pH and temperature on Salmonella Typhimurium and Staphylococcus aureus. LWT - Food Science and Technology. 2007 Aug; 40(6): 973-81. doi:10.1016/j.lwt.2006.07.007

5. Moshaedi Sh. [Antioxidant and antimicrobial activities of essential oils from Zataria multiflora bois, Origanum vulgare and Mentha pulegium and some growth factor on anterococos fekalis] Dissertation. Shahid Beheshti University, Tehran. 2012. [Persian]

6. Mozafarian V. [A textbook of Iran's plants name]. 5th ed. Tehran: Farhang Moaser Publication. 2007; p: 345. [Persian]

7. Guler S, Seker M. The effect of cinnamon and guar gum on bacillus cereus population in milk. J Food Process Preserv. 2009; 33(3): 415-26. doi: 10.1111/j.1745-4549. 2009.00417.x

8. Kivance M, Akgul A. Antibacterial activities of Essential oils from Turkish Spices and Citrus. Flavour Frag J. 1986; 1(4-5): 175-79. doi: 10.1002/ffj.2730010409

9. Kirbaslari FG, Tavman A, Dulger B, Turker G. Antimicrobial activity of Turkish Citrus peel oils. Pak J Bot. 2009; 41(6): 3207-12.

10. Bahk J, Yousef AE, Marth EH. Behavior of Listeria monocytogenes in the presence of selected spices. Lebesnsm Wiss Technol. 1990; 23(1): 66-69.

11. Beuchat LR, Brackett R, Doyle M. Lethality of carrot juice to Listeria monocytogenes as affected by pH, sodium chloride and temperature. J Food Prot. 1994; 57(6): 470-74.

12. Fitzpatrick JJ, Iqbal T, Delaney C, Twomey T, Keogh MK. Effect of powder properties and storage conditions on the flowability of milk powders with different fat contents. J Food Eng.2004 Oct; 64(4): 435-44. doi:10.1016/j. jfoodeng.2003.11.011

13. Cava-Roda R, Taboada-Rodríguez A. Antimicrobial activity of vanillin and mixtures with cinnamon and clove essential oils in controlling Listeria monocytogenes and Escherichia coli O157:H7 in milk. Food Bioprocess Technol. 2012; 5: 2120-31. doi 10.1007/ s11947-010-0484-4

www.SID.ir

Archive of SID

Original Paper

Antimicrobial effect of aqueous extract of orange peel and its effect on the shelf-life of flavored milk

Razmjoo M (M.Sc)*[1], Khaki P (Ph.D)[2], Fadaee Noughani V (Ph.D)[3]

[1]M.Sc in Food Science and Technology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. [2]Microboilogist, Associate Professor, Department of of Razi Vaccine and Serum Research Institute (RVSRI), Karaj, Iran. [3]Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objective: The adoption of methods for increasing the shelf life of dairy products by using natural preservatives is necessary. This study was done to determine the antimicrobial activity of aqueous extract of orange peel and its effect on the shelf life of flavored milks.

Methods: In this descriptive –analytical studty the antimicrobial activity of aqueous extract of orange peel was investigated by using disk diffusion method and minimum inhibitory concentration (MIC) by successive dilution of culture broth and then its impact on the shelf life of milk.

Results: In disk diffusion method and MIC the antimicrobial effect of aqueous extract of orange peel was more effective against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* and less effective on *Escherichia coli*. The growth diameter of disk diffusion method in aqueous extract of orange peel was 7.11, 29.06 and 50 mm for *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* and *Candida albicans*, respectively. The inhibitory concentration in the aqueous extract of orange peel was 15, 2 and 2 mg/ml, respectively. Also 0.17 g/ml of aqueous extract of orange peel in milk reduced the growth of microorganisms at the time of 6, 12, 24, 48 and 72 hours. Temperature affected the growth of *Candida albicans* in the milk, so that the growth of microorganisms reduced with decreasing temperature ($P<0.05$). The growth inhibitory activity of the aqueous extract of orange peel on *Staphylococcus aureus* was significantly more than on *Escherichia coli* ($P<0.05$).

Conclusion: This study showed that the antimicrobial activity of aqueous extract of orange peel on *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* and *Candida albicans* in vitro and in the milk.

Keywords: Aqueous extract of orange peel, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, Milk

*** Corresponding Author: Khaki P (Ph.D), E-mail: khakipejvak@yahoo.com**

Received 6 May 2015 **Revised** 15 Jul 2015 **Accepted** 8 Aug 2015

Cite this article as: Razmjoo M, Khaki P, Fadaee Noughani V. [Antimicrobial effect of aqueous extract of orange peel and its effect on the shelf-life of flavored milk]. J Gorgan Uni Med Sci. Autumn 2016; 18(3): 97-102. [Article in Persian]

www.SID.ir