Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 15:07 IRDT on Wednesday July 27th 2016

مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال یازدهم، شماره 1، بهار 1395، صفحات 66-59

بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره متانولی پوست پرتقال و تأثیر آن بر ماندگاری شیرطعم دار

مریم رزمجو[1]، پژواک خاکی[2]، مازیار فقیه نصیر[3]، کرامت اله رضایی[4]

1- کارشناس ارشد علوم و صنایع غذایی، بخش میکروب‌شناسی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران
2- نویسنده مسئول: دکترای میکروب‌شناسی، بخش میکروب‌شناسی، مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران، پست الکترونیکی: khakipejvak@yahoo.com
3- دکترای علوم باغبانی، مرکز مرکبات رامسر، ایران
4- استاد گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

تاریخ دریافت: 94/2/30 تاریخ پذیرش: 94/6/11

چکیده

سابقه و هدف: استفاده از عصاره پوست پرتقال در طب سنتی ایران، از گذشته مرسوم بوده است. هدف از این مطالعه بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره متانولی پوست پرتقال گونه سانگینلا بر روی میکروارگانیسم‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی* و *کاندیدا آلبیکانس* به‌عنوان جایگزینی مناسب به جای نگهدارنده‌های شیمیایی مرسوم می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تأثیر 31 mg/ml عصاره پوست پرتقال در محیط آزمایشگاهی با استفاده از دیسک‌های کاغذی و تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC) بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* و قارچ *کاندیدا آلبیکانس* بررسی و سپس تأثیر این عصاره بر ویژگی‌های میکروبیولوژیک، شیمیایی و حسی شیر طی مدت 7 روز نگهداری در دمای 4، 25 و 37 درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفته و شیر فاقد عصاره به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: عصاره متانولی پوست پرتقال دارای اثرات ضدمیکروبی بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی* و *کاندیدا آلبیکانس* بود به‌گونه‌ای که در روش MIC بیشترین اثر را روی *کاندیدا* و کمترین اثر را بر *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* داشت. همچنین 0/15 g/ml عصاره متانولی پوست پرتقال باعث کاهش رشد میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه در زمان‌های 6، 12، 24، 48، 72 ساعت در شیر شد. در شیر نیز نتایج نشان داد که دما روی رشد *کاندیدا آلبیکانس* تأثیرگذار بوده به‌گونه‌ای که با کاهش دما رشد میکروارگانیسم مذکور کاهش یافت. از سوی دیگر تأثیر عصاره بر *استافیلوکوکوس اورئوس* معنی‌دارتر از *اشریشیاکلی* بود.

نتیجه گیری: در این بررسی اثر مهاری عصاره متانولی پوست پرتقال بر رشد *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی* و *کاندیدا آلبیکانس* در شرایط آزمایشگاهی و نیز در شیر ثابت شد. بنابراین می‌توان از آن به‌عنوان ترکیبی گیاهی در جهت بازدارندگی از رشد باکتری‌های بیماریزا استفاده کرد. مطابق نتایج به دست آمده استفاده از عصاره‌های پوست پرتقال در کنار فاکتور pH و دما تأثیر بیشتری بر مهارکنندگی رشد باکتری‌های مذکور، در مقایسه با استفاده از تنها یک فاکتور(استفاده از نگهدارنده ها) خواهد داشت.

واژگان کلیدی: عصاره پوست پرتقال، اثر ضد میکروبی، شیر، اثر بازدارندگی

• مقدمه

محصولات لبنی همچون شیر برای حفظ زندگی بهتر در طولانی مدت باید مورد استفاده قرار گرفته و دارای اثرات مفید برای حفظ سلامتی و فرآیندهای فیزیولوژیکی در تغذیه کودکان و افراد مسن می‌باشد. از آنجایی که شیر مایع بسیار فسادپذیری است نیاز به تیمار برای ماندگاری بیشتری دارد. تیمارهای حرارتی تنها باعث کاهش بار میکروبی نمی‌شوند بلکه باعث تغییراتی در کیفیت و تغییر طعم و مزه نیز می‌شود. در نتیجه عوامل غیر حرارتی در کنار استفاده از درجات حرارت با شدت و دمای پایین‌تر که به مواد مغذی موجود در شیر آسیب نزند برای تولید غذاهای با کیفیت به کار گرفته شده است (1).

امروزه تحقیقات بسیاری در مورد جایگزین کردن مواد شیمیایی و سنتزی با مواد طبیعی به‌منظور حذف یا کاهش این ترکیبات در مواد غذایی انجام شده است. عصاره‌های گیاهی و ترکیبات آنها به‌عنوان متابولیک‌های ثانویه گیاهان می‌باشند و خاصیت ضد باکتریایی آنها مدت‌هاست که شناخته شده و

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 15:07 IRDT on Wednesday July 27th 2016

کاربردهای زیادی به‌عنوان طعم دهنده و نگهدارنده در صنایع غذایی و دارویی دارند (2). این مسئله به همراه عوارض جانبی بعضی از آنتی‌بیوتیک‌ها موجب گردیده است که محققین و دانشمندان همواره به دنبال آنتی‌بیوتیک‌های جدید با اثرات جانبی کمتر باشند. به همین دلیل منابع طبیعی به‌خصوص گیاهان دارویی دارای اسرار بی‌شماری است و کشف هریک از اسرار، گامی در جهت درمان و ریشه‌کن کردن بیماری‌هاست و از جایگاه خاصی برخوردار است (3) زمان زیادی از اثبات فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی سپری شده است اما در سال‌های اخیر افزایش علاقه مندی‌ها به توسعه‌ی فرآیند سبز گرایی سبب از سر گیری مطالعات و بررسی‌های علمی در ارتباط با این مواد گشته است (6-4، 2، 1) مرکبات یکی از میوه‌های تجاری است و شامل چندین میوه مهم از جمله پرتقال، لیمو، گریپ فروت و نارنگی می‌باشد از آنجا که پوست این میوه غنی از فلاوون‌ها و پلی‌متوکسیلات‌ها و فیتوکمیکال‌ها می‌باشد که در گیاهان دیگر بسیار نادر است در نتیجه در سال‌های اخیر توجه ویژه به استفاده از پوست مرکبات شده است. پرتقال از خانواده Rutaceae بوده و به انگلیسی Orange نامیده می‌شود. منشأ آن را چین و آسیای جنوب شرقی می‌دانند. این میوه در طب سنتی چینی کاربردهای فراوانی داشته است. هم اکنون به طور وسیعی در سراسر دنیا پرورش داده می‌شود و مشهورترین نوع از خانواده مرکبات می‌باشد. پرتقال سرشار از ماده مغذی گیاهی هسپریدین (hesperidin) هستند. در تحقیقات آزمایشگاهی، عصاره هسپریدین سبب مهار رشد سلول‌های سرطانی سینه و تشکیل تومور شده است. پوست پرتقال دارای مواد مغذی گیاهی به نام نوبیلتین و تنجرتین است که سبب متوقف کردن حملات سلول‌های سرطانی می‌شود (7).

بنابراین در این پروژه بر آن شدیم تا با استفاده از عصاره پوست پرتقال بومی ایران و با توجه به این که تاکنون تحقیق مشابهی روی این گونه گیاهی در ایران صورت نگرفته به بررسی تأثیرات ضدباکتریایی و هم‌چنین اثر آن بر ماندگاری شیر طعم‌دار، بپردازیم.

• مواد و روش‌ها

تهیه گیاه: پرتقال مورد نیاز از مرکز مرکبات رامسر در فصل زمستان تهیه و پس از شستشوی پوست آن با نرمال سالین، پوست آن جداسازی و در سایه خشک گردید.

تهیه عصاره: عصاره پوست پرتقال با دستگاه سوکسله در مرکز پژوهشکده گیاهان دارویی تهیه شد: 70 گرم پودر پوست پرتقال با 500 سی‌سی از متانول ترکیب و به مدت 6 ساعت در دستگاه سوکسله قرار گرفت. سپس pH نمونه با pH متر (ساخت سوئیس) اندازه‌گیری شده جهت خروج حلال آنها، در دستگاه روتاری قرار گرفت.

سویه‌های باکتری: کشت لیوفیلیزه استافیلوکوکوس اورئوس (RTCC=1889)، کشت لیوفیلیزه باکتری‌های اشریشیاکلی (RTCC=2325) و قارچ کاندیدا آلبیکانس (RTCC=142) از کلکسیون میکروبی بخش میکروب‌شناسی مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه شده و جهت بررسی مورد استفاده قرار گرفتند.

افزودن عصاره به شیر: ابتدا شیر خام دریافتی پس از عبور از صافی تا 40°C گرم و با سپراتور خامه آن جدا شد. سپس شیر کم‌چرب (2/5%) را با شکر، پایدارکننده و عصاره مورد نظر (0/15 گرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی و 0/17 گرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی) مخلوط نموده، سپس در دستگاه هموژنیزاتور، هموژن کرده و پس از پاستوریزاسیون در دمای 72°C به مدت 15 ثانیه، خنک نموده و در ظروف مناسب ذخیره و درب بندی شده و تا زمان انجام آزمایشات در دمای 4°C نگهداری شد. تمامی مراحل ذکر شده در کارخانه شیر پاک، بخش R&D صورت گرفت.

ارزیابی خواص حسی نمونه‌های شیر: برخی ویژگی‌های حسی نمونه‌ها (شامل طعم و مزه، بو، رنگ و پذیرش کلی) مطابق با استاندارد 2442 با روش هدونیک پنج نقطه‌ای (5-Point Hedonic) و مطابق با فرم ارزشیابی حسی ارزیابی شد. نمونه‌ها پس از آماده‌سازی توسط 8 نفر از ارزیابان آموزش دیده مورد ارزیابی قرار گرفت. در فواصل بررسی نمونه‌ها، ارزیابان پرسش‌نامه‌ای را که در اختیارشان قرار داده شده بود را تکمیل کردند. در این آزمون عدد 1 نشان دهنده پایین‌ترین امتیاز داده شده توسط ارزیاب و عدد 5 بالاترین امتیاز بوده است.

روش‌های میکروبی و شیمیایی: اندازه‌گیری اسیدیته با استفاده از استاندارد ملی ایران به شماره 2450 و pH شیر با استفاده از استاندارد ملی ایران به شماره 2852 صورت گرفت (8). جهت اندازه‌گیری pH ، از دستگاه pH متر ساخت کشور سوئیس استفاده شد. بار میکروبی کل با استفاده از روش پورپلیت و محیط کشت پلیت کانت آگار و دمای گرمخانه‌گذاری 37°C برای باکتری و 25°C برای قارچ انجام پذیرفت. آنالیزها در چند مرحله (در شیر فاقد عصاره، بعد از افزودن عصاره و در نهایت بعد از طی زمان ذخیره‌سازی) روی شیر صورت گرفت. با توجه به این که استاندارد عمر نگهداری

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 15:07 IRDT on Wednesday July 27th 2016

شیر پاستوریزه 2 تا 4 روز تعیین شده، جهت بررسی بهتر تأثیر عصاره بر شیر پاستوریزه، زمان ذخیره‌سازی 7 روز در نظر گرفته شد.

بررسی فعالیت ضدمیکروبی با روش انتشار دیسک در محیط BHI (Brain Heart Infusion مرک آلمان) و با استفاده از دیسک‌های کاغذی 6 میلی‌متری و حداقل غلظت بازدارنده در محیط کشت مایع مولر هینتون صورت گرفت.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 0/031 g/ml عصاره متانولی پوست پرتقال بود توسط پنس استریل و در کنار شعله روی محیط کشت قرار گرفت. پلیت BHI به مدت 18 تا 24 ساعت در 37 درجه سانتی‌گراد برای باکتری و پلیت SDA (Saborad Dextrose agar مرک آلمان) به مدت 48 تا 72 ساعت در 25 درجه سانتی‌گراد برای قارچ نگهداری شد. پس از سپری شدن زمان لازم، قطر هاله‌های عدم رشد با کولیس اندازه‌گیری شد در این تحقیق برای سنجش MIC از روش لوله استفاده گردید و نیم سی‌سی از عصاره که حاوی 0/15 گرم بر میلی‌لیتر ماده مؤثره بود در 4/5 سی‌سی محیط کشت مایع مولر هینتون ترکیب و سپس 50 میکرون سوسپانسیون میکروبی (اعم از اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس) به آن اضافه شد. بعد از آن جهت رقیق‌سازی 2/5 سی‌سی از این سوسپانسیون برداشته و به 2/5 سی‌سی محیط کشت که در لوله شماره 2 قرار داشت افزوده شد و این روند تا لوله شماره 10 ادامه یافت. سپس لوله‌ها برای بررسی و ایجاد محیط مناسب برای رشد میکروارگانیسم در انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت گرم‌خانه گذاری شد. تمام این مراحل به ترتیب ذکر شده در مورد قارچ کاندیدا نیز صورت پذیرفت با این تفاوت که محیط کشت مورد استفاده SDB (Broth Saborad Dextrose) بوده و به مدت 72 ساعت در دمای 25 درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه گذاری صورت پذیرفت. نتایج بر حسب کدورت لوله‌ها مشخص و MIC تعیین شد (9).

آزمون میکروبیولوژی در شیر حاوی عصاره: 10 میلی‌لیتر از شیر (شیر کم‌چرب (2/5%))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 رقت سازی شد:

الف)10 عدد لوله آزمایش دربسته حاوی 9 میلی‌لیتر آب مقطر یا سرم فیزیولوژی را استریل نموده، لوله‌ها را از 1 تا 10 شماره‌گذاری کرده و به ترتیب درون جا لوله‌ای قرار دادیم.

ب) از نمونه اولیه یک میلی‌لیتر در شرایط استریل (کنار شعله یا زیر هود)به لوله شماره 1 منتقل کردیم.

ج) محتوای لوله اول را کاملاً مخلوط کرده تا رقت 10^{-1} کاملاً یکنواخت گردد.سپس 1 میلی‌لیتر از آن را در شرایط استریل به لوله بعدی منتقل نمودیم.

د) مرحله قبل را به ترتیب برای لوله‌های بعدی تکرار نموده تا رقت 10^{-10} به دست آمد.

ه) از تمام رقت‌ها هر کدام حجم معینی (0/5 میلی‌لیتر)را به دو پلیت محیط کشت جامد منتقل و پس از سپری شدن زمان رشد، تعداد کلنی‌ها را شمارش نموده و بر رقت تقسیم کردیم تا تعداد باکتری در حجم اولیه به دست آید.برای انجام آزمون استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی از لوله‌ای که حاوی 10 میلی‌لیتر مخلوط شیر- عصاره و نیم میلی‌لیتر میکروارگانیسم (که به روش سنجش جذب نوری با دستگاه اسپکتروفوتومتر، میزان میکروارگانیسم "اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس" آن 10^6 CFU/ml) بود، 0/5 میلی‌لیتر در لوله آزمایش شماره یک که محتوی 4/5 میلی‌لیتر آب مقطر استریل است ریخته و کاملاً مخلوط گردید. سپس از لوله شماره یک، 0/5 میلی‌لیتر برداشته و در لوله دوم که حاوی 4/5 میلی‌لیتر آب مقطر استریل است ریخته که به این ترتیب رقت آن به 10^{-2} می‌رسد به همین ترتیب رقت سازی ادامه یافته و تا لوله شماره 10 به رقت 10^{-10} رسانده شد. در پایان این مراحل از هر لوله 0/5 میلی‌لیتر محلول را در محیط کشت TSA (tripticase soy agar) ریخته و میکروارگانیسم‌ها شمارش گردید. آزمون‌ها در زمان صفر، 6، 12، 24، 48، 72 ساعت و یک هفته پس از تلقیح میکروارگانیسم‌ها انجام گرفت. در مورد قارچ کاندیدا آزمون همانند مراحل ذکر شده در آزمون باکتریایی صورت گرفت با این تفاوت که محیط کشت مورد استفاده، SDA بوده، پلیت‌ها در دمای 25 درجه 48 ساعت تا یک هفته گرمخانه‌گذاری شد. نتایج به‌صورت تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی در گرم یا میلی‌لیتر فرآورده بیان شد.

تجزیه و تحلیل آماری: در این مطالعه برای تجزیه داده‌ها از نرم‌افزار SAS 9.1 و رویه GLM استفاده شد.مقایسه میانگین‌ها با روش تحلیل واریانس و مقایسه زوجی توسط

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 15:07 IRDT on Wednesday July 27th 2016

آزمون دانکن در سطح 0/05 انجام شد. نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم‌افزار Excel 2007 رسم شدند.

• یافته‌ها

نتایج آزمون دیسک دیفیوژن در شرایط آزمایشگاهی: فعالیت ضد میکروبی عصاره علیه میکروارگانیسم‌های مذکور در محیط آزمایشگاه به‌صورت کمی و کیفی توسط مشاهده هاله رشد یا قطر هاله عدم رشد تعیین گردید. نتایج این آزمایش‌ها به طور کامل در جدول 1 آمده است. همان‌طور که در جدول ملاحظه می‌شود عصاره دارای بیشترین اثر بر روی کاندیدا آلبیکانس (46 mm) می‌باشد (جدول 1).

نتایج حداقل غلظت بازدارندگی به روش رقت سازی(MIC): همان‌طور که در جدول دیده می‌شود در این روش نیز بیشترین اثر بر روی کاندیدا آلبیکانس و استافیلوکوکوس اورئوس (MIC= 0/004g/ml) و کمترین اثر بر روی اشریشیاکلی (MIC=0/03g/ml) بوده است (جدول 1).

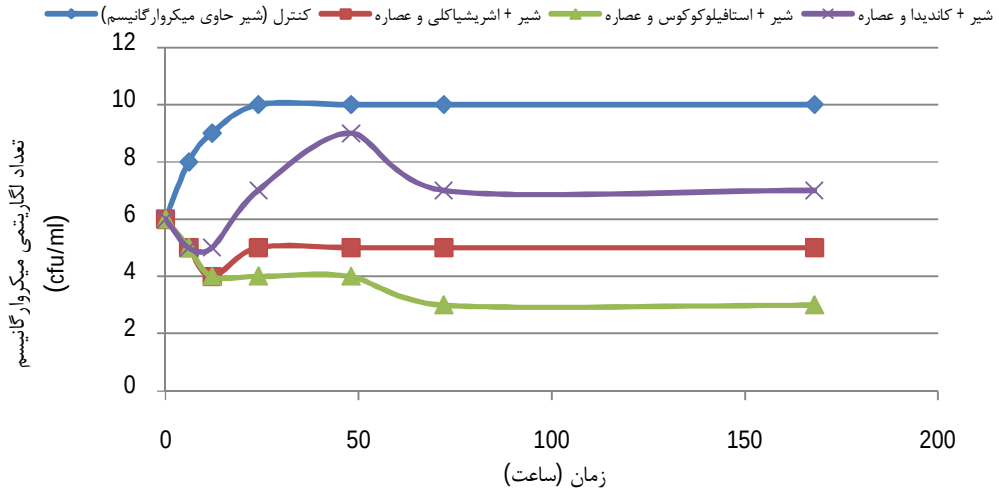
نتایج آزمون میکروبی در شیر: تغییرات میزان بار میکروبی شیرهای حاوی عصاره، طی دوره هفت روزه نشان داد که تعداد کلنی نمونه‌های حاوی عصاره در روز هفتم بسیار کمتر از کنترل بود. مقایسه نمونه کنترل نشان داد که تعداد کلنی باکتری‌ها در روز هفتم به‌شدت افزایش یافته و شیر به سمت فساد باکتریایی پیش رفته است. در نهایت نتایج حاصل از آزمون دانکن برای تیمارهای مختلف نشان داد میانگین تعداد میکروارگانیسم‌ها در گروه کنترل بیشتر از عصاره متانولی بوده و تفاوت بین تیمارها با کنترل معنی‌دار است. مقایسه تعداد کلنی نمونه‌های کنترل نشان داد که تعداد کلنی‌ها در نمونه‌های شیر شاهد (روز هفتم) بسیار بالاتر از شیرهای حاوی عصاره بود. بنابراین تفاوت بین آنها معنی‌دار بود. نتایج آنالیزها نشان داد که عصاره پوست پرتقال سبب کاهش تعداد کل باکتریایی موجود در شیر نسبت به شیر فاقد عصاره گردید که این موضوع بیانگر خاصیت ضد باکتریایی این عصاره می‌باشد (نمودارهای 1 و 2).

جدول 1. میانگین قطر هاله عدم رشد و میانگین حداقل غلظت بازدارندگی

	عصاره (g/ml 0/031)	
باکتری، قارچ	میانگین قطر هاله عدم رشد(میلی متر)*	میانگین حداقل غلظت بازدارندگی**(g/ml)
اشریشیاکلی	0	0/03
استافیلوکوکوس اورئوس	0	0/004
کاندیدا آلبیکانس(قارچ)	46	0/004

* اعداد داخل جدول نشان دهنده قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها به میلی متر می‌باشد و مقدار فعالیت ضدباکتریایی هر عصاره متناسب با بزرگی عدد مندرج در جدول است.

** اعداد داخل جدول نشان دهنده حداقل غلظت ممانعت از رشد باکتری توسط عصاره پوست پرتقال در اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و کاندیدا آلبیکانس بر حسب گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. عدد کوچک‌تر در این جدول نشان دهنده تأثیرگذاری بیشتر (اثر ضد میکروبی بهتر) بر میکروارگانیسم مورد نظر می‌باشد.

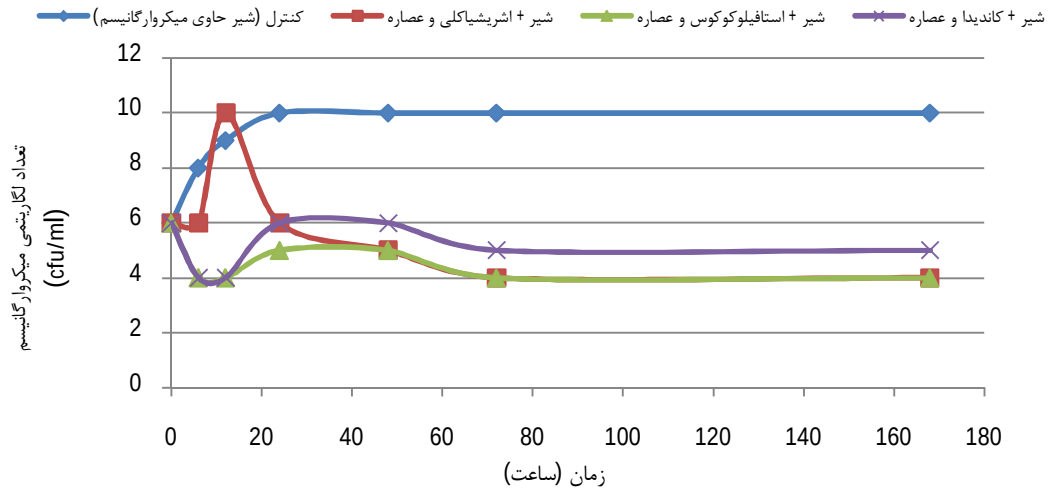


نمودار1. تعداد لگاریتمی اشریشیاکلی، استاف و کاندیدا بر حسب زمان در دمای 37°C برای باکتری‌ها و 25°C برای قارچ

Archive of SID

www.SID.ir

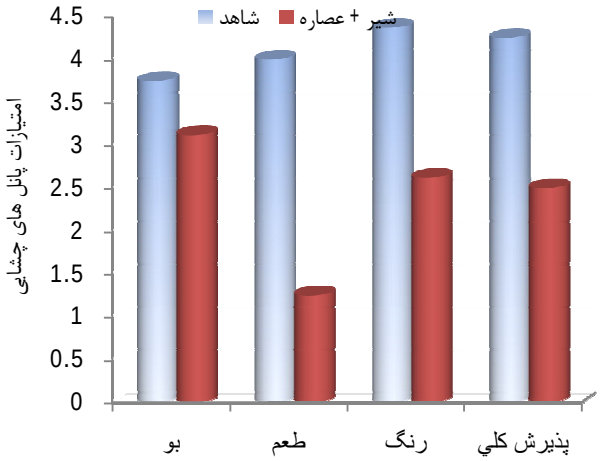
Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 15:07 IRDT on Wednesday July 27th 2016



نمودار2 . تعداد لگاریتمی اشریشیاکلی، استاف و کاندیدا بر حسب زمان در دمای 4°C

نتایج آزمون شیمیایی و ارزیابی‌های حسی شیر مصرفی:
اسیدیته تیمار حاوی عصاره آبی 0/16 و pH، 6/5 بوده که در محدوده تعریف شده در استاندارد می‌باشد. براساس نتایج آماری برای تمامی ویژگی‌های حسی (بو، طعم، رنگ و پذیرش کلی) اختلاف آماری معنی‌داری بود ($p<0/01$). به عبارتی شیر حاوی عصاره مورد بررسی در مقایسه با شیر بدون عصاره از نظر ویژگی‌های حسی اختلاف معنی‌داری داشته و در مجموع مورد پذیرش واقع نشد.

اثرات ارگانولپتیکی: نتایج نشان داد که بو ($p<0/01$)، طعم ($p<0/0001$)، رنگ ($P<0/01$) و پذیرش کلی ($P<0/0001$) نمونه‌ها در تیمارهای مختلف، با نمونه شیر بدون عصاره، اختلاف آماری داشته و در مجموع مورد پذیرش نبود.



نمودار3. مقایسه امتیازات پانل ها در مورد بو، طعم ، رنگ و پذیرش کلی در شاهد (شیر بدون عصاره) و شیر حاوی عصاره

• بحث

خاصیت ضد میکروبی عصاره در شرایط آزمایشگاهی:
نتایج این بررسی در شرایط آزمایشگاهی با روش انتشار دیسک نشان داد که عصاره متانولی پوست پرتقال دارای بیشترین تأثیر بر روی قارچ کاندیدا آلبیکانس با قطر هاله عدم رشد 46mm می‌باشد. در روش MIC نیز بیشترین تأثیر عصاره بر روی قارچ کاندیدا آلبیکانس و استافیلوکوکوس اورئوس (با MIC=4mg/ml) و کمترین تأثیر بر روی اشریشیاکلی (با MIC=30mg/ml) بوده است. در این بررسی تأثیر عصاره بر میکروارگانیسم‌های گرم مثبت و قارچ (استافیلوکوکوس اورئوس و کاندیدا البیکانس) معنی‌دارتر از میکروارگانیسم‌های گرم منفی (اشریشیاکلی) بود که می‌تواند به علت وجود دیواره سلولی ضخیم‌تر در باکتری‌های گرم منفی باشد که این نتایج با یافته‌های کیوانس و آگگول که در سال 1986 اثر ضدمیکروبی عصاره پوست پرتقال را بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی مورد بررسی قرار داده بودند و همچنین Kirbaslari و همکاران نیز که به بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره چندین میوه از جمله پرتقال پرداختند، همسو می‌باشد (11، 10) به علاوه Ashok kumar و همکاران در سال 2011 فعالیت ضدمیکروبی عصاره استخراجی از پوست پرتقال و لیمو با پنج حلال مختلف را بر پنج باکتری بیماریزا (ایکلای، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس، سالمونلا و کلبسیلا) مورد بررسی قرار دادند و به نتایج مشابه‌ای دست یافتند.

خاصیت ضد میکروبی عصاره در شیر: نتایج این بررسی در شیر نشان داد میانگین تعداد میکروارگانیسم‌ها در گروه

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 15:07 IRDT on Wednesday July 27th 2016

کنترل، بیشتر از گروه تیمار (عصاره متانولی) می‌باشد. در واقع نتایج نشان می‌دهد که عصاره متانولی در کاهش تعداد اشریشیاکلی نسبت به گروه کنترل مؤثر بوده است. همچنین نتایج نشان داد که تعداد کاندیدا البیکانس در دمای 4°C کمتر از دمای 25°C بوده است. نتایج تحقیقات Bahk و همکاران نیز حاکی از آن بود که دمای پایین باعث تسهیل خاصیت نگهدارندگی توسط عصاره گیاهان می‌گردد (13). Beuchat و همکاران نیز در مطالعه‌ای نشان دادند که استفاده از دمای پایین می‌تواند خاصیت ضد میکروبی عصاره گیاهان را تسهیل نماید. هر دو نتیجه این مطالعات با نتایج بررسی ما هم‌خوانی دارد، در واقع کاهش دما باعث افزایش خاصیت ضدمیکروبی عصاره می‌شود که این نتایج در مورد کاندیدا البیکانس در مطالعه ما مشاهده شد (14). در واقع کاهش دما باعث می‌شود چربی غشا سلولی بیشتر به‌صورت غیراشباع بوده و باعث اغتشاش دیواره سلولی و در نتیجه افزایش فعالیت ضدمیکروبی عصاره می‌شود (16، 15).

در این بررسی تأثیر عصاره بر میکروارگانیسم‌های گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس) معنی‌دارتر از میکروارگانیسم‌های گرم منفی (اشریشیاکلی) بود. نتایج مطالعه Biswas و همکاران نیز نشان داد عصاره زغال‌اختر بر میکروارگانیسم‌های گرم مثبت در شیر بیشتر از میکروارگانیسم‌های گرم منفی بود که با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد.

تأثیر عصاره بر خواص شیمیایی شیر و ارگانولپتیکی: در مورد pH نیز شیر حاوی عصاره در محدوده تعریف شده در استاندارد برای شیرهای طعم دار بود اما از pH شیر معمولی پایین‌تر بود. این یافته با نتایج مطالعه مشیدی که به بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی اسانس‌های آویشن شیرازی، مرزنجوش و خالواش و برخی فاکتورهای مؤثر بر رشد باکتری انتروکوکوس فکالیس پرداخته بود، همسو می‌باشد. در این مطالعه تأثیر اسانس‌های مذکور بر نفوذپذیری غشاء و سطح سلولی این باکتری نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. دو روش دیسک دیفیوژن و میکرو دیلوشن به‌منظور ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها مورد استفاده قرارگرفتند و مشاهده شد pH در اکثر موارد بر نرخ رشد و فاز تأخیر باکتری تأثیرگذار است. بدین صورت که با افزایش pH به سمت pH ایتیمم که اغلب pH خنثی می‌باشد نرخ رشد افزایش می‌یابد و با کاهش pH، فاز تأخیر افزایش و در نتیجه موجب کاهش نرخ رشد میکروارگانیسم‌ها می‌شود که با نتایج بررسی ما مطابقت دارد. به علاوه نتایج این تحقیق نشان داد اسانس‌های آویشن شیرازی، مرزنجوش و خالواش می‌توانند به‌عنوان یک نگهدارنده طبیعی علیه انتروکوکوس فکالیس مورد استفاده قرار گرفته و به‌عنوان یک ماده ضد میکروبی مؤثر در برابر این باکتری عمل نمایند (17). در بررسی Cava-Roda و همکاران 2012 که به بررسی اثر ضدمیکروبی وانیل در شیر پرداخت، دو رنج pH ، 6 و 7 تفاوت معنی‌داری روی MIC نداشت (16). انحلال بهتر عصاره‌ها در فاز لیپیدی غشا سلولی باکتری‌های هدف در pH پایین، باعث بهبود فعالیت ضدمیکروبی عصاره می‌شود. در واقع فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ها در مواد غذایی دارای pH خنثی ،مثل شیر، کمتر از غذاهای اسیدی می‌باشد (16) در pH پایین مولکول‌های دارای فعالیت ضدمیکروبی آسان‌تر به مناطق هیدروفوب غشا سلولی باند شده و در نتیجه اثر ضدمیکروبی بالاتری نشان می‌دهند (16) که در تمام بررسی‌های ذکر شده نتایج مشاهده شده با نتایج حاصل از بررسی ما همسویی دارد.

از نظر ویژگی‌های ارگانولپتیکی، این عصاره به تنهایی در شیر پذیرش ندارد ولی می‌تواند در کنار سایر طعم دهنده‌ها و شیرین‌کننده‌ها مورد استفاده قرار گیرد، با توجه به این که تاکنون تحقیقی روی پوست پرتقال گونه سانگینلا در ایران صورت نگرفته نتایجی برای مقایسه در دسترس نمی‌باشد. اما تحقیقات مشابه روی پوست پرتقال حاکی از آن است که استفاده از عصاره‌های گیاهی بخاطر مسائل ارگانولپتیکی دارای محدودیت‌هایی می‌باشد (19). همچنین مشاهده شده که شرایط نامناسب ارگانولپتیکی عصاره پرتقال، مربوط به مقادیر بالای MIC آن می‌باشد (20).

نتایج تحقیق نشان داد که عصاره آبی پوست پرتقال رشد اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و کاندیدا آلبیکانس را در شرایط آزمایشگاهی و در شیر مهار می‌کند، در نتیجه می‌تواند در کنترل فساد میکروبی شیر و افزایش مدت زمان ماندگاری شیر مؤثر باشد . با توجه به خواص دیگری که برای پوست پرتقال گزارش شده است، مصرف آن به‌عنوان یک فراورده طبیعی به‌عنوان افزودنی و نگهدارنده در تهیه مواد غذایی توصیه می‌شود. لازم به ذکر است از آنجایی که استفاده از عصاره از نظر ارگانولپتیکی مناسب نبوده، بنابراین استفاده از آن به همراه شیرین کننده‌های مناسب ضروری به نظر می‌رسد.

Archive of SID

www.SID.ir

سپاسگزاری

از همه عزیزانی که در به نتیجه رساندن این کار تحقیقاتی نقش داشته اند از جمله جناب آقای کاوه از دانشگاه شهر قدس و پرسنل زحمتکش بخش میکروب‌شناسی مؤسسه سرم و واکسن سازی رازی خصوصاً آقای اسفندیاری کمال تشکر و قدردانی را دارم.

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 15:07 IRDT on Wednesday July 27th 2016

• References

1. Guler S, Seker M. The effect of cinnamon and guar gum on bacillus cereus population in milk. J Food Proc and Preser. 2009; 33 : 415–426.

2. Palmer AS, Stewart J, Fyfe F. The Potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. J Food Microbiology. 2002; 1:463-470.

3. Golab ghale N. Effect of garlic Essential Oils in Salmonella Typhimurium.[Research project]. Razi vaccine &serum institute.1997. [in Persian].

4. Mozafarian V. A textbook of Iran 's plants name. 5th ed.Farhang moaser publication. 2007; p.345 [in Persian].

5. **A**khondzadeh 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*. J. LWT.2007; 40: 973-981.

6. 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]. Tehran: Shahid Beheshti University; 2012. [in Persian].

7. Anonymous A. 2008. Available on the:7 Thttp://www.salamatnew.com/viewNews.aspx

8. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. ISIRI no 1527. Karaj: ISIRI; 1999 [in Persian].

9. Mackie & Mc cartney. Practical medical microbiology;1989.

10. Kivanc M, Akgul A .Antimicrobial activities of essential oils from Turkish spices and citrus. J Flavour and fragrance .1986;1:175-179.

11. Kirbaslari FG, Tavman A, Dulger B, Turker G. Antimicrobial Activity of Turkish Citrus peel. Pok J Bot. 2009;41:3207-12.

12. Ashok kumar K. Narayani M. Subanthini A. Jayakumar M. Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of Citrus Fruit Peels - Utilization Fruit Waste. IJEST. 2011; 3: 5414-21.

13. Bahk J, Yousef E, Marth E. Behavior of *Listeria monocytogenes* in the presence of selected spices. Lebensm.-Wiss. Technol 1990; 23:66–69.

14. Beuchat L , Brackett R, Doyle M. Lethality of carrot juice to Listeria monocytogenes as affected by pH, sodium chloride and temperature. J Food Prot. 1994; 57:470–474.

15. 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; 64,435-444.

16. 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;5,2120–2131.

17. Biswas D, Wideman N, Corliss A. Pasterized Blueberry (Vaccinium Corymbosum) Juice Inhibits Growth of Bacterial Pathogens In Milk But Allows Survival of Probiotic Bacteria, J Food Safety. 2012;32: 204–209.

18. 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]. Tehran: Shahid Beheshti University.2012. [in Persian].

19. Palakawong C, Sophanodora P, Pisuchpen S, Phongpaichit S. Antioxidant and antimicrobial activities of crude extracts from mangosteen (Garcinia mangostana L.) parts and some essential oils. Int Food Res J. 2010; 17: 583-589.

20. Fisher K, Phillips C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food:is citrus the answer? Trends Food Sci Technol. 2008; 19:156-164.

Archive of SID

www.SID.ir

Possibility Study of Multilayer Encapsulation by External Gelation Procedure on the Survival of Probiotic Bacteria Undergoing Orange Juice Pasteurization

*Razmjoo M[1], Khaki P[*2], Faghih Nasiri M[3], Rezaei K[4]*

1- MSc in Agriculture - Food Science and Technology, Dept. of Microbiology ,Razi Vaccine $serum Research Institute.

*2- *Corresponding author: PhD in Microbiology, Dept. of Microbiology ,Razi Vaccine $serum Research Institute. Email: khakipejvak@yahoo.com*

3- PhD in Horticultural Science,Citrus Center of Ramsar, Karaj, Iran.

4- Prof, Dept. of Food Science and Engineering, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, University of Tehran, Karaj, Iran

Received 20 May, 2015 **Accepted 2 Sept, 2015**

Background and Objectives: Orange peel extract has been used in Iranian traditional medicine since the long past. The aim of this study was to investigate the antimicrobial activity of methanol extract of orange peel, Sangynla species, on the microorganisms of Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Candida albicans as an alternative for conventional chemical preservatives.

Materials and Methods: In this study, the effect of 31 mg/ml orange peel extracts was investigated by using disk diffusion method and minimum inhibitory concentration (MIC) on Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Candida albicans. Also the effect of orange peel extract on the biochemical, microbiological and sensory characteristics of milk was studied during 7 days in 4 ,25 & 37°C. The controls were milk samples without extract.

Results: The research showed that orange peel extract has an antimicrobial effect on Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Candida albicans. In MIC method, the growth inhibitory activity of the extract on Staphylococcus aureus and Escherichia coli was more than on Candida albicans. At 0/15 g/ml concentration of orange peel extract, the growth of all microorganisms in the milk was reduced at 6, 12, 24, 48 and 72 hours. There was a significant correlation between temperature and growth of Candida albicans. In comparison, the orange peel extract is more effective on the growth of Staphylococcus aureus than on Escherichia coli.

Results and Conclusion: In this research, the inhibitory effect of orange peel extract on Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Candida albicans has been proven; therefore, it can be used as a herbal combination to inhibit the growth of pathogens in milk. According to the research results, in addition to the orange peel extract, pH and temperature have more bacterial inhibitory activity simultaneously.

Keywords: Orange peel, Extract, Antimicrobial activity, Milk

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 15:07 IRDT on Wednesday July 27th 2016

Archive of SID

www.SID.ir