

بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره متانولی پوست پرتقال و تأثیر آن بر ماندگاری شیرطعم دار مریم رزمجو¹، پژواک خاکی²، مازیار فقیه نصیر³، کرامت اله رضایی⁴

- 1- کارشناس ارشد علوم و صنایع غذایی، بخش میکروبی شناسی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
- 2- نویسنده مسئول: دکترای میکروبی شناسی، بخش میکروبی شناسی، مؤسسه واکسن و سرم سازی 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 میکروارگانیسم های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی* و *کاندیدا آلبیکانس* به عنوان جایگزینی مناسب به جای نگهدارنده های شیمیایی مرسوم می باشد.

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

یافته ها: عصاره متانولی پوست پرتقال دارای اثرات ضد میکروبی بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی* و *کاندیدا آلبیکانس* بود به گونه ای 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 میکروارگانیسم های مورد مطالعه در زمان های 6، 12، 24، 48، 72 ساعت در شیر شد. در شیر نیز نتایج نشان داد که دما روی رشد *کاندیدا آلبیکانس* تأثیرگذار بوده به گونه ای که با کاهش دما رشد میکروارگانیسم مذکور کاهش یافت. از سوی دیگر تأثیر عصاره بر *استافیلوکوکوس اورئوس* معنی دارتر از *اشریشیاکلی* بود.

نتیجه گیری: در این بررسی اثر مهار عصاره متانولی پوست پرتقال بر رشد *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی* و *کاندیدا آلبیکانس* در شرایط آزمایشگاهی و نیز در شیر ثابت شد. بنابراین می توان از آن به عنوان ترکیبی گیاهی در جهت بازدارندگی از رشد باکتری های بیماریزا استفاده کرد. مطابق نتایج به دست آمده استفاده از عصاره های پوست پرتقال در کنار فاکتور pH و دما تأثیر بیشتری بر مهارکنندگی رشد باکتری های 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

حرارت با شدت و دمای پایین تر که به مواد مغذی موجود در شیر آسیب نرزد 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 به منظور حذف یا کاهش این ترکیبات در مواد غذایی انجام شده است. عصاره های گیاهی و ترکیبات آنها به عنوان متابولیک های ثانویه گیاهان می باشند و خاصیت ضد باکتریایی آنها مدت ها است که شناخته شده و

محصولات لبنی همچون شیر برای حفظ زندگی بهتر در طولانی مدت باید مورد استفاده قرار گرفته و دارای اثرات مفید برای حفظ سلامتی و فرآورده های فیزیولوژیکی در تغذیه کودکان و افراد مسن می باشد. از آنجایی که شیر مایع بسیار فسادپذیری است نیاز به تیمار برای ماندگاری بیشتری دارد. تیمارهای حرارتی تنها باعث کاهش بار میکروبی نمی شوند بلکه باعث تغییراتی در کیفیت و تغییر طعم و مزه نیز می شود. در نتیجه عوامل غیر حرارتی در کنار استفاده از درجات

پرتقال با 500 سی سی از متانول ترکیب و به مدت 6 ساعت در دستگاه سوکسله قرار گرفت. سپس pH نمونه با pH متر (ساخت سوئیس) اندازه گیری شده جهت خروج حلال آنها، در دستگاه روتاری قرار گرفت.

سویه های باکتری: کشت لیوفیلیزه استافیلوکوکوس اورئوس (RTCC=1889)، کشت لیوفیلیزه باکتری های اشریشیاکلی (RTCC=2325) و قارچ کاندیدا آلبیکانس (RTCC=142) از کلکسیون میکروبی بخش میکروبی شناسی مؤسسه واکسن و سرم سازی 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 کم چرب (2/5%) را با شکر، پایدارکننده و عصاره مورد نظر (0/15 گرم بر میلی لیتر عصاره متانولی و 0/17 گرم بر میلی لیتر 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 نمونه های شیر: برخی ویژگی های حسی نمونه ها (شامل طعم و مزه، بو، رنگ و پذیرش کلی) مطابق با استاندارد 2442 با روش هدونیک پنج نقطه ای (-5 Point Hedonic) و مطابق با فرم ارزشیابی حسی ارزیابی شد. نمونه ها پس از آماده سازی توسط 8 نفر از ارزیابان آموزش دیده مورد ارزیابی قرار گرفت. در فواصل بررسی نمونه ها، ارزیابان پرسش نامه ای را که در اختیارشان قرار داده شده بود را تکمیل کردند. در این آزمون عدد 1 نشان دهنده پایین ترین امتیاز داده شده توسط ارزیاب و عدد 5 بالاترین امتیاز بوده است.

روش های میکروبی و شیمیایی: اندازه گیری 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 اندازه گیری 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 گرمخانه گذاری 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 ذخیره سازی) روی شیر صورت گرفت. با توجه به این که استاندارد عمر نگهداری

کاربردهای زیادی به عنوان طعم دهنده و نگهدارنده در صنایع غذایی و دارویی دارند (2). این مسئله به همراه عوارض جانبی بعضی از آنتی بیوتیک ها موجب گردیده است که محققین و دانشمندان همواره به دنبال آنتی بیوتیک های جدید با اثرات جانبی کمتر باشند. به همین دلیل منابع طبیعی به خصوص گیاهان دارویی دارای اسرار بی شماری است و کشف هریک از اسرار، گامی در جهت درمان و ریشه کن کردن بیماری هاست و از جایگاه خاصی برخوردار است (3). زمان زیادی از اثبات فعالیت ضد میکروبی اسانس ها و عصاره های گیاهی سپری شده است اما در سال های اخیر افزایش علاقه مندی ها به توسعه ی فرآیند سبز گرایی سبب از سرگیری مطالعات و بررسی های علمی در ارتباط با این مواد گشته است (1، 2، 4-6). مرکبات یکی از میوه های تجاری است و شامل چندین میوه مهم از جمله پرتقال، لیمو، گریپ فروت و نارنگی می باشد از آنجا که پوست این میوه غنی از فلاوون ها و پلی متوکسیلات ها و فیتوکمیکال ها می باشد که در گیاهان دیگر بسیار نادر است در نتیجه در سال های اخیر توجه ویژه به استفاده از پوست مرکبات شده است. پرتقال از خانواده Rutaceae بوده و به انگلیسی Orange نامیده می شود. منشأ آن را چین و آسیای جنوب شرقی می دانند. این میوه در طب سنتی چینی کاربردهای فراوانی داشته است. هم اکنون به طور وسیعی در سراسر دنیا پرورش داده می شود و مشهورترین نوع از خانواده مرکبات می باشد. پرتقال سرشار از ماده مغذی گیاهی هسپریدین (hesperidin) هستند. در تحقیقات آزمایشگاهی، عصاره هسپریدین سبب مهار رشد سلول های سرطانی سینه و تشکیل تومور شده است. پوست پرتقال دارای مواد مغذی گیاهی به نام نوبیلین و تنجرتین است که سبب متوقف کردن حملات سلول های سرطانی می شود (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 طعم دار، بپردازیم.

• مواد و روش ها

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

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

بررسی فعالیت ضد میکروبی با روش انتشار دیسک در محیط BHI (Brain Heart Infusion) مرک آلمان) و با استفاده از دیسک های کاغذی 6 میلی متری 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 ، پلیت ها 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 سانتی گراد برای باکتری و پلیت SDA (Saborad Dextrose agar) مرک آلمان) به مدت 48 تا 72 ساعت در 25 درجه سانتی گراد برای قارچ نگهداری شد. پس از سپری شدن زمان لازم، قطر هاله های عدم رشد با کولیس اندازه گیری شد در این تحقیق برای سنجش MIC از روش لوله استفاده گردید و نیم سی سی از عصاره که حاوی 0/15 گرم بر میلی لیتر ماده مؤثره بود در 4/5 سی سی 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 رقیق سازی 2/5 سی سی از این سوسپانسیون برداشته و به 2/5 سی سی محیط کشت که در لوله شماره 2 قرار داشت افزوده شد و این روند تا لوله شماره 10 ادامه یافت. سپس لوله ها برای بررسی و ایجاد محیط مناسب برای رشد میکروارگانیسم در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد به مدت 24 ساعت گرم خانه 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 سانتی گراد گرم خانه گذاری صورت پذیرفت. نتایج بر حسب کدورت لوله ها مشخص و MIC تعیین شد (9).

آزمون میکروبیولوژی در شیر حاوی عصاره: 10 میلی لیتر از شیر (شیر کم چرب (2/5%)) حاوی عصاره را در شرایط کاملاً استریل درون لوله آزمایش ریخته و سپس تعداد سلول های باکتری شمارش شد. برای این منظور ابتدا از نمونه به ترتیب زیر رقت سازی شد:

(الف) 10 عدد لوله آزمایش در بسته حاوی 9 میلی لیتر آب مقطر یا سرم فیزیولوژی را استریل نموده، لوله ها را از 1 تا 10 شماره گذاری کرده و به ترتیب درون جا لوله ای قرار دادیم.

(ب) از نمونه اولیه یک میلی لیتر 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 میلی لیتر از آن را در شرایط استریل به لوله بعدی منتقل نمودیم.

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

(ه) از تمام رقت ها هر کدام حجم معینی (0/5 میلی لیتر) را به دو پلیت محیط کشت جامد منتقل و پس از سپری شدن زمان رشد، تعداد کلنی ها 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 لوله ای که حاوی 10 میلی لیتر مخلوط شیر - عصاره و نیم میلی لیتر میکروارگانیسم (که به روش سنجش جذب نوری با دستگاه اسپکتروفتومتر، میزان میکروارگانیسم "اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس" آن 10^6 CFU/ml) بود، 0/5 میلی لیتر در لوله آزمایش شماره یک که محتوی 4/5 میلی لیتر آب مقطر استریل است ریخته و کاملاً مخلوط گردید. سپس از لوله شماره یک، 0/5 میلی لیتر برداشته و در لوله دوم که حاوی 4/5 میلی لیتر آب مقطر استریل است ریخته که به این ترتیب رقت آن به 10^{-2} می رسد 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 میلی لیتر محلول را در محیط کشت TSA (trypticase soy agar) ریخته و میکروارگانیسم ها شمارش گردید. آزمون ها در زمان صفر، 6، 12، 24، 48، 72 ساعت و یک هفته پس از تلقیح میکروارگانیسم ها 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، پلیت ها در دمای 25 درجه 48 ساعت تا یک هفته گرم خانه گذاری شد. نتایج به صورت تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی در گرم یا میلی لیتر فرآورده بیان شد.

تجزیه و تحلیل آماری: در این مطالعه برای تجزیه داده ها از نرم افزار SAS 9.1 و رویه GLM استفاده شد. مقایسه میانگین ها با روش تحلیل واریانس و مقایسه زوجی توسط

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

• یافته‌ها

نتایج آزمون دیسک دیفیوژن در شرایط آزمایشگاهی:

فعالیت ضد میکروبی عصاره علیه میکروارگانیسم‌های مذکور در محیط آزمایشگاه به صورت 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).

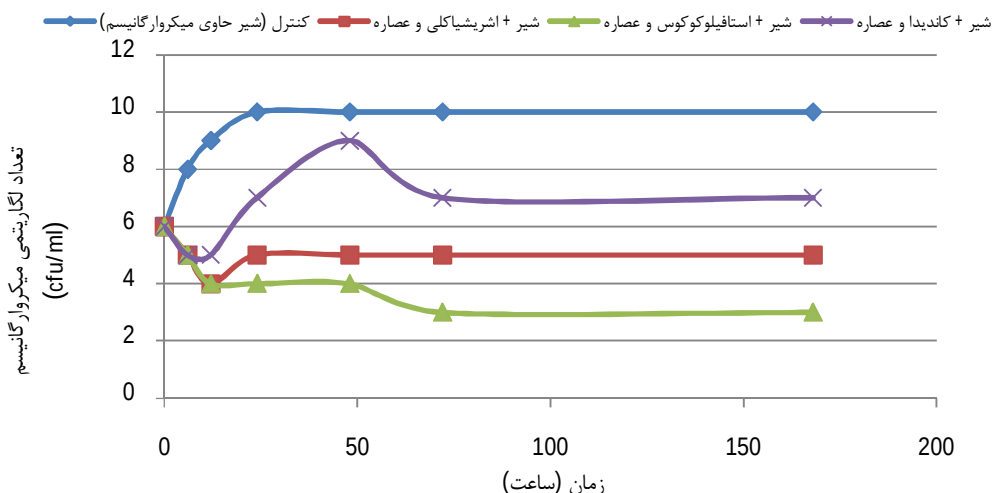
نتایج حداقل غلظت بازدارندگی به روش رقت

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 اشیریشیاکلی ($MIC = 0/03g/ml$) بوده است (جدول 1).

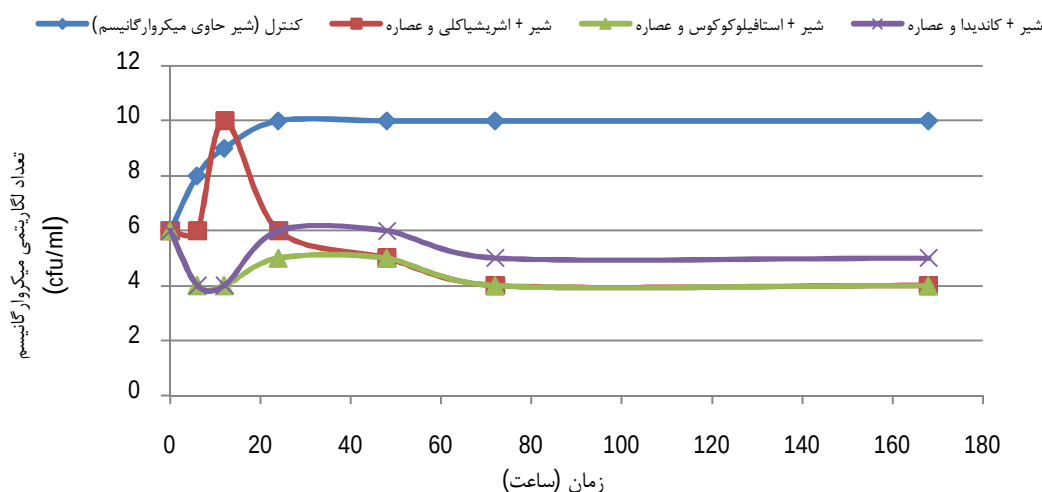
جدول 1. میانگین قطر هاله عدم رشد و میانگین حداقل غلظت بازدارندگی

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

* 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 اشیریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و کاندیدا آلبیکانس بر حسب گرم بر میلی لیتر می‌باشد. عدد کوچک‌تر در این جدول نشان دهنده تأثیرگذاری بیشتر (اثر ضد میکروبی بهتر) بر میکروارگانیسم مورد نظر می‌باشد.



نمودار 1. تعداد لگاریتمی اشیریشیاکلی، استاف و کاندیدا بر حسب زمان در دمای 37°C برای باکتری‌ها و 25°C برای قارچ



نمودار 2. تعداد لگاریتمی اشیرشیاکلی، استاف و کاندیدا بر حسب زمان در دمای 4°C

• بحث

خاصیت ضد میکروبی عصاره در شرایط آزمایشگاهی:

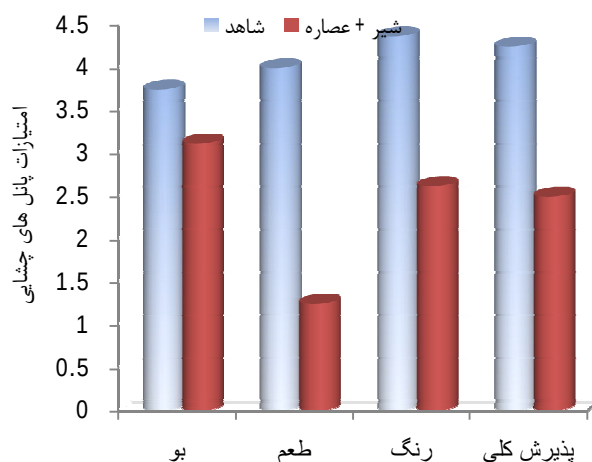
نتایج این بررسی در شرایط آزمایشگاهی با روش انتشار دیسک نشان داد که عصاره متانولی پوست پرتقال دارای بیشترین تأثیر بر روی قارچ کاندیدا آلبیکانس با قطر هاله عدم رشد 46mm می باشد. در روش MIC نیز بیشترین تأثیر عصاره بر روی قارچ کاندیدا آلبیکانس و استافیلوکوکوس اورئوس (با MIC=4mg/ml) و کمترین تأثیر بر روی اشیرشیاکلی (با MIC=30mg/ml) بوده است. در این بررسی تأثیر عصاره بر میکروارگانیسم های گرم مثبت و قارچ (استافیلوکوکوس اورئوس و کاندیدا آلبیکانس) معنی دارتر از میکروارگانیسم های گرم منفی (اشیرشیاکلی) بود که می تواند به علت وجود دیواره سلولی ضخیم تر در باکتری های گرم منفی باشد که این نتایج با یافته های کیوانس و آکگول که در سال 1986 اثر ضد میکروبی عصاره پوست پرتقال را بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و اشیرشیاکلی مورد بررسی قرار داده بودند و همچنین Kirbaslari و همکاران نیز که به بررسی اثر ضد میکروبی عصاره چندین میوه از جمله پرتقال پرداختند، همسو می باشد (10، 11) به علاوه Ashok kumar و همکاران در سال 2011 فعالیت ضد میکروبی 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 مشابه ای دست یافتند.

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

نتایج آزمون شیمیایی و ارزیابی های حسی شیر مصرفی:

اسیدیته تیمار حاوی عصاره آبی 0/16 و pH، 6/5 بوده که در محدوده تعریف شده در استاندارد می باشد. براساس نتایج آماری برای تمامی ویژگی های حسی (بو، طعم، رنگ و پذیرش کلی) اختلاف آماری معنی داری بود ($p < 0/01$). به عبارتی شیر حاوی عصاره مورد بررسی در مقایسه با شیر بدون عصاره از نظر ویژگی های حسی اختلاف معنی داری 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 ($p < 0/0001$) نمونه ها در تیمارهای مختلف، با نمونه شیر بدون عصاره، اختلاف آماری داشته و در مجموع مورد پذیرش نبود.



نمودار 3. مقایسه امتیازات پانل ها در مورد بو، طعم، رنگ و پذیرش کلی در شاهد (شیر بدون عصاره) و شیر حاوی عصاره

میکروارگانیزم‌ها 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 فکالینس 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 ضد میکروبی 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 ضد میکروبی عصاره می‌شود. در واقع فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها در مواد غذایی دارای pH خنثی، مثل شیر، کمتر از غذاهای اسیدی می‌باشد (16) در pH پایین مولکول‌های دارای فعالیت ضد میکروبی آسان‌تر به مناطق هیدروفوب غشا سلولی باند شده و در نتیجه اثر ضد میکروبی 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 اشیریشیاکلی، 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 شیرین‌کننده‌های مناسب ضروری به نظر می‌رسد.

کنترل، بیشتر از گروه تیمار (عصاره متانولی) می‌باشد. در واقع نتایج نشان می‌دهد که عصاره متانولی در کاهش تعداد اشیریشیاکلی نسبت به گروه کنترل مؤثر بوده است. همچنین نتایج نشان داد که تعداد کاندیدا آلبیکانس 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 ضد میکروبی عصاره می‌شود که این نتایج در مورد کاندیدا آلبیکانس در مطالعه ما مشاهده شد (14). در واقع کاهش دما باعث چربی غشا سلولی بیشتر به‌صورت غیراشباع بوده و باعث اغتشاش دیواره سلولی و در نتیجه افزایش فعالیت ضد میکروبی عصاره می‌شود (15، 16).

در این بررسی تأثیر عصاره بر میکروارگانیزم‌های گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس) معنی‌دارتر از میکروارگانیزم‌های گرم منفی (اشیریشیاکلی) بود. نتایج مطالعه Biswas و همکاران نیز نشان داد عصاره زغال‌اخته بر میکروارگانیزم‌های گرم مثبت در شیر بیشتر از میکروارگانیزم‌های 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 فکالینس 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 دیلوژن به‌منظور ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها مورد استفاده قرار گرفتند 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 ایتیم که اغلب pH خنثی می‌باشد نرخ رشد افزایش می‌یابد و با کاهش pH فاز تأخیر افزایش و در نتیجه موجب کاهش نرخ رشد

سپاسگزاری

و واکسن سازی رازی خصوصاً آقای اسفندیاری کمال تشکر و قدردانی را دارم.

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 زحمتمکش بخش میکروبی شناسی مؤسسه سرم

• References

- 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.
- 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.
- Golab ghale N. Effect of garlic Essential Oils in Salmonella Typhimurium.[Research project]. Razi vaccine & serum institute.1997. [in Persian].
- Mozafarian V. A textbook of Iran 's plants name. 5th ed.Farhang moaser publication. 2007; p.345 [in Persian].
- 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*. J. LWT.2007; 40: 973-981.
- 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].
- Anonymous A. 2008. Available on the:7 Thttp://www.salamatnew.com/viewNews.aspx
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. ISIRI no 1527. Karaj: ISIRI; 1999 [in Persian].
- Mackie & Mc cartney. Practical medical microbiology;1989.
- Kivanc M, Akgul A .Antimicrobial activities of essential oils from Turkish spices and citrus. J Flavour and fragrance .1986;1:175-179.
- Kirbaslari FG, Tavman A, Dulger B, Turker G. Antimicrobial Activity of Turkish Citrus peel. Pok J Bot. 2009;41:3207-12.
- 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.
- Bahk J, Yousef E, Marth E. Behavior of *Listeria monocytogenes* in the presence of selected spices. Lebensm.-Wiss. Technol 1990; 23:66-69.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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].
- 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.
- Fisher K, Phillips C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food:is citrus the answer? Trends Food Sci Technol. 2008; 19:156-164.

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

Razmjoo M¹, Khaki P^{*2}, Faghih Nasiri M³, Rezaei K⁴

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, *Sanguinalis* 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