

## اثر ضد میکروبی عصاره آبی پوست پرتقال و اثر آن بر مدت زمان ماندگاری شیر طعم دار

مریم رزمجو<sup>۱</sup>، دکتر پژواک خاکی\*<sup>۲</sup>، وجیهه فدائی نوغانی<sup>۳</sup>

۱- کارشناس ارشد تکنولوژی مواد غذایی، گروه علوم تغذیه و صنایع غذایی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. ۲- دکتری میکروبی شناسی، دانشیار، بخش میکروبی شناسی، 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:** به کارگیری روش هایی برای افزایش مدت زمان ماندگاری محصولات لبنی با استفاده از نگهدارنده های طبیعی ضروری است. این مطالعه به منظور تعیین اثر ضد میکروبی عصاره آبی پوست پرتقال و اثر آن بر مدت زمان ماندگاری شیر طعم دار انجام شد. **روش بررسی:** در این مطالعه توصیفی - تحلیلی فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی پوست پرتقال به روش انتشار دیسک و تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) به روش رقیق کردن متوالی محیط کشت مایع بر روی میکروارگانسیم های استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلی و کاندیدا آلبیکانس انجام شد. سپس اثر آن بر مدت زمان ماندگاری شیر طعم دار ارزیابی گردید. **یافته ها:** عصاره آبی پوست پرتقال با استفاده از هر دو روش انتشار دیسک و MIC، بیشترین اثر را بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و کاندیدا آلبیکانس به ترتیب با قطر هاله ۲۹/۰۶ میلی متر و ۵۰ میلی متر و حداقل غلظت مهارکنندگی ۲mg/ml برای هر دو میکروارگانسیم نشان داد. کمترین اثر بر روی اشریشیا کلی با قطر هاله ۷/۱۱ میلی متر و حداقل غلظت مهارکنندگی ۱۵ mg/ml مشاهده شد. همچنین در شیر نیز ۰/۱۷g/ml عصاره آبی پوست پرتقال باعث کاهش رشد میکروارگانسیم های مورد مطالعه در زمان های ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت گردید. دما بر روی رشد کاندیدا آلبیکانس در شیر اثرگذار بود. به طوری که با کاهش دما رشد میکروارگانسیم کاهش نشان داد (P<۰/۰۵). اثر معنی دار مهار عصاره بر روی استافیلوکوکوس اورئوس بیشتر از اشریشیا کلی بود (P<۰/۰۵). **نتیجه گیری:** عصاره آبی پوست پرتقال بر روی رشد استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلی و کاندیدا آلبیکانس در شرایط آزمایشگاهی و نیز در شیر اثر مهاری داشت. **کلید واژه ها:** عصاره آبی پوست پرتقال، استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلی، کاندیدا آلبیکانس، شیر

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

نشانی: کرج، حصارک، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کد پستی ۳۱۹۷۶۱۹۷۵۱، تلفن ۰۲۶-۳۴۵۷۰۰۳۸، نمابر ۳۴۵۵۲۱۹۴  
وصول مقاله: ۱۳۹۴/۲/۱۶، اصلاح نهایی: ۱۳۹۴/۴/۲۴، پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۵/۱۷

### مقدمه

و بررسی های علمی در ارتباط با این مواد شده است (۱ و ۳-۴). آنتی بیوتیک های طبیعی یکی از راه های مهم کنترل عفونت های میکروبی است (۱). شیر فرآورده ای 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 اندام های انسانی کامل ترین غذا است. یکی از محصولات لبنی بسیار پر طرفدار که اخیراً مورد توجه قرار گرفته است؛ شیرهای طعم دار هستند. از جمله این طعم دهنده ها، میوه ها و عصاره آنها است که علاوه بر ایجاد طعم باعث افزایش مدت زمان ماندگاری شیر به علت ترکیبات ضد میکروبی آنها می شود. شیرهای طعم دار، نوشیدنی سالمی برای تمام گروه های سنی هستند. زیرا در عین حال که نیاز فرد به خوردن غذاهای شیرین را برآورده می کند؛ دریافت کلسیم و سایر مواد مغذی دیگر را افزایش می دهند (۷). این

علی رغم پیشرفت چشمگیر در عرصه تولید، نگهداری و عرضه مواد غذایی، موضوع سلامت مواد غذایی اهمیت روزافزونی در بهداشت عمومی دارد. حفظ ایمنی ماده غذایی و کیفیت آن در دوره ماندگاری امری بسیار مهم است. بیماری های ناشی از مصرف غذاهای آلوده در همه جای دنیا یک مشکل اساسی به شمار می رود. لذا نیاز به کاهش یا حذف عوامل بیماری زای مواد غذایی با استفاده از روش های جدید کاملاً محسوس است (۱). خواص درمانی گیاهان از دیرباز مورد توجه بشر بوده است. به طوری که طب سنتی یکی از پایه های درمان و کنترل درد و گاهی پیشگیری از بیماری ها است (۳-۱). 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 فرآیند سبزگرایی سبب از سرگیری مطالعات

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

### روش بررسی

این مطالعه توصیفی - تحلیلی در آزمایشگاه میکروبی‌شناسی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی در سال 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 میلی لیتر آب مقطر به مدت ۶ ساعت به روش ماسراسیون عصاره‌گیری انجام گردید. پس از گذشت مدت زمان لازم ۱۰۰ میلی لیتر محلول به دست 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 میکروبی‌شناسی مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی کرج تهیه گردید.

۱۰۰ میلی لیتر محلول به دست 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 ضد میکروبی 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 به نظر نمی‌رسید.

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی با روش انتشار دیسک در محیط BHI (مرک آلمان) و با استفاده از دیسک‌های کاغذی ۶ میلی متری 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 ۰/۳۵ 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 میلی لیتر از عصاره که حاوی ۰/۱۷ گرم بر میلی لیتر ماده موثره بود؛ در ۴/۵ میلی لیتر 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 رقیق سازی ۲/۵ میلی لیتر از این سوسپانسیون برداشته شد و به ۲/۵ میلی لیتر 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 میلی لیتر 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 در بسته حاوی ۹ میلی لیتر 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 میلی لیتر 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 میلی لیتر از آن در شرایط استریل به لوله بعدی منتقل شد. د) مرحله قبل به ترتیب برای لوله‌های بعدی تکرار شد تا رقت  $10^{-10}$  به دست آمد. ه) از تمام رقت‌ها هر کدام حجم معینی (۰/۵ میلی لیتر) را به دو پلیت محیط کشت جامد منتقل کردیم. برای انجام آزمون استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی از لوله‌ای که حاوی ۱۰ میلی لیتر مخلوط شیر و عصاره و نیم میلی لیتر میکروارگانیسم (به روش سنجش جذب نوری با دستگاه اسپکتروفوتومتر، میزان میکروارگانیسم اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس  $10^6$  CFU/ml) بود؛ ۰/۵ میلی لیتر در لوله آزمایش شماره یک (محتوی ۴/۵ میلی لیتر آب مقطر استریل) ریخته و کاملاً مخلوط شد. سپس از لوله شماره یک، ۰/۵ میلی لیتر برداشته و در لوله دوم که حاوی ۴/۵ میلی لیتر 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 میلی لیتر محلول 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

با روش حداقل غلظت بازدارندگی به روش رقت سازی، نیز بیشترین اثر بر روی *کاندیدا آلیکانس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* ( $0/0.02 \text{ g/ml}$ ) و کمترین اثر بر روی *اشریشیاکلی* ( $0/0.15 \text{ g/ml}$ ) تعیین شد (جدول یک). اثر ضد میکروبی 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 میکروارگانسیم 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  $10^{11}$  CFU/ml افزایش و سپس طی مدت یک هفته و در دمای انکوباسیون (۳۷) درجه سانتی گراد) تعداد آن  $10^{11}$  CFU/ml ثابت باقی ماند. میانگین تعداد میکروارگانسیم‌ها در گروه کنترل بیشتر از عصاره آبی پوست پرتقال بود (نمودار یک). در دمای ۴ درجه سانتی گراد نیز نمونه کنترل (بدون عصاره) روند افزایشی و تیمارهای حاوی عصاره روند کاهش را نشان دادند (نمودار ۲).

در تیمار حاوی شیر، عصاره آبی و *استافیلوکوکوس اورئوس* در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، تعداد میکروارگانسیم از  $10^6$  CFU/ml به  $10^4$  CFU/ml پس از ۱۲ ساعت 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  $10$  CFU/ml کاهش یافت. در نمونه کنترل (بدون عصاره) نیز از  $10^6$  CFU/ml در مدت ۲۴ ساعت به  $10^{11}$  CFU/ml رسید و پس

دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت تا یک هفته گرمخانه‌گذاری شدند. نتایج به صورت تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی در گرم یا میلی لیتر 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 کروسکیال والیس انجام شد.

#### یافته‌ها

با روش آزمون دیسک دیفیوژن، عصاره آبی بر روی میکروارگانسیم‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی* و *کاندیدا آلیکانس* اثر گذار بود. بیشترین اثر بر روی *کاندیدا آلیکانس* ( $50 \text{ mm}$ ) و کمترین اثر بر روی *اشریشیاکلی* ( $7/11 \text{ mm}$ ) مشاهده شد (جدول یک)

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

عصاره آبی پوست پرتقال ( $0/0.35 \text{ g/ml}$ )	میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی متر)	میانگین حداقل غلظت بازدارندگی ( $\text{mg/ml}$ )	باکتری
۱۵	۷/۱۱		<i>اشریشیاکلی</i>
۲	۲۹/۰۶		<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>
۲	۵۰		<i>کاندیدا آلیکانس</i>

\* مقدار فعالیت ضد باکتریایی هر عصاره متناسب با بزرگی عدد مندرج در جدول است.  
\*\* عدد کوچک‌تر نشان‌دهنده اثر ضد میکروبی بهتر بر میکروارگانسیم است.

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

تیمار	۴ درجه سانتی گراد	۲۵ درجه سانتی گراد	۳۷ درجه سانتی گراد	کنترل
شیر + عصاره آبی + <i>اشریشیاکلی</i>	$1 \times 10^3$	-	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^{10}$
شیر + عصاره آبی + <i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>	$1 \times 10^3$	-	$1 \times 10^1$	$1 \times 10^{10}$
شیر + عصاره آبی + <i>کاندیدا آلیکانس</i>	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^3$	-	$1 \times 10^{10}$

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

تیمار	<i>اشریشیاکلی</i>	<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>	<i>کاندیدا آلیکانس</i>
عصاره آبی	$2/11 \ 1.0^4 \pm 9/0.1 \ 1.0^4$ *	$8/91 \ 1.0^6 \pm 2/11 \ 1.0^7$ *	$8/41 \ 1.0^8 \pm 3/11 \ 1.0^9$ *
کنترل	$7/0.1 \ 1.0^{11} \pm 1/11 \ 1.0^{11}$	$7/0.1 \ 1.0^{11} \pm 1/11 \ 1.0^{11}$	$7/0.1 \ 1.0^{11} \pm 1/11 \ 1.0^{11}$

\*  $P < 0/05$  گروه عصاره آبی نسبت به گروه کنترل؛ اعداد ذکر شده در جدول معرف دو مرتبه تکرار آزمایش در زمان‌های ۰، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دو دمای ۴ درجه سانتی گراد و ۳۷ درجه سانتی گراد است.

از آن تا یک هفته این تعداد ثابت ماند (نمودار یک).

یافت. در نمونه کنترل سیر صعودی مشاهده شد (نمودار یک).

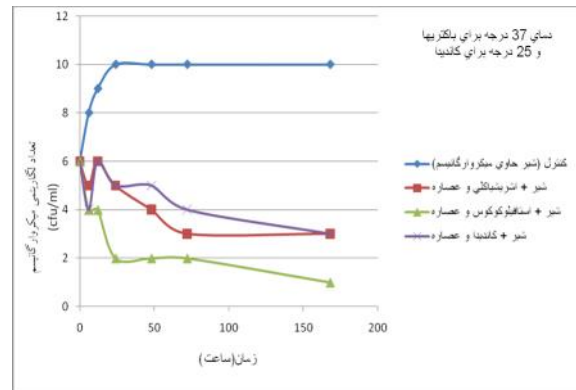
کاندیدا/آلبیکانوس در ۱۲ ساعت اولیه مقداری کاهش داشت و این به علت سازگار شدن میکروارگانیسم با محیط بود. پس از آن رشد جزئی داشت و بعد از یک هفته سیر نزولی مشاهده شد. در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، در تیمار حاوی عصاره آبی تا ۱۲ ساعت کاهش کاندیدا/آلبیکانوس از  $10^6$  CFU/ml به  $10^4$  CFU/ml را شاهد بودیم. 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 میکروارگانیسم‌ها در گروه کنترل بیشتر از گروه تیمار (عصاره آبی) بود. عصاره آبی پوست پرتقال در کاهش تعداد کاندیدا/آلبیکانوس نسبت به گروه کنترل موثر بود (جدول ۳).

اسیدیته تیمار حاوی عصاره آبی  $0.16$  /  $6.5$  pH 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.

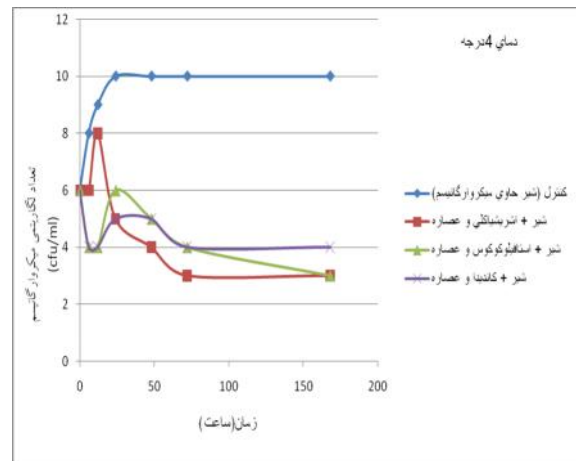
### بحث

با توجه به نتایج این مطالعه در شرایط آزمایشگاهی با روش انتشار دیسک، عصاره آبی پوست پرتقال دارای بیشترین اثر بر روی قارچ کاندیدا/آلبیکانوس و کمترین اثر بر روی اشریشیاکلی بود. روش MIC نیز بیشترین اثر عصاره آبی بر روی قارچ کاندیدا/آلبیکانوس 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 به علت وجود دیواره سلولی ضخیم‌تر در باکتری‌های گرم منفی باشد. این نتایج با یافته‌های Kivance و Akgul که اثر ضد میکروبی عصاره پوست پرتقال را بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی بررسی کردند (۸) و نیز مطالعه Kirbaslari و همکاران (۹) که به بررسی اثر ضد میکروبی 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/آلبیکانوس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد کمتر از دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تعداد استافیلوکوکوس اورئوس در دمای



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



نمودار ۲: تعداد لگاریتمی اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و کاندیدا/آلبیکانوس بر حسب زمان در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

تعداد اولیه استافیلوکوکوس اورئوس در دمای ۴ درجه 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 سیر نزولی 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 دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بود (جدول ۲).

در تیمار حاوی عصاره آبی  $10^6$  CFU/ml کاندیدا/آلبیکانوس 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

ارزیابی شد. دو روش دیسک دیفیوژن و میکرودیلوژن به منظور ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها استفاده شدند و pH در اکثر موارد بر نرخ رشد و فاز تأخیر 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 اتروکوکوس فکالیس مورد استفاده قرار گرفته و به عنوان یک ماده ضد میکروبی مؤثر در برابر این باکتری عمل نمایند (۵).

### نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره آبی پوست پرتقال بر روی رشد *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی* و *کاندیدا آلبیکانس* 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. بدین وسیله 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 شهر قدس، کارکنان بخش میکروبی‌شناسی مؤسسه سرم و واکنس‌سازی رازی کرج به‌خصوص آقای فرج اله اسفندیاری نهایت سپاس خود را اعلام می‌داریم. همچنین از آقای وحید زارع سپاسگزاری می‌گردد.

### References

- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int J Food Microbiol.* 2004 Aug; 94(3):223-53.
- 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
- Tajkarimi MM, Ibrahim SA, Cliver DO. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control.* 2010; 21(9): 1199-1218.
- 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
- 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]
- Mozafarian V. [A textbook of Iran's plants name]. 5<sup>th</sup> ed. Tehran: Farhang Moaser Publication. 2007; p: 345. [Persian]
- Guler S, Seker M. The effect of cinnamon and guar gum on *bacillus cereus* population in milk. *J Food Process Preserv.* 2009;

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 ضد میکروبی عصاره گیاهان را تسهیل نماید (۱۱). هر دو نتیجه این مطالعات با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد. در واقع کاهش دما باعث افزایش خاصیت ضد میکروبی 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 غیر اشباع بوده و باعث اغتشاش دیواره سلولی و در نتیجه افزایش فعالیت ضد میکروبی عصاره می‌شود (۱۲ و ۱۳).

در مطالعه حاضر اثر عصاره‌ها بر میکروارگانسیم‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*) معنی‌دارتر از میکروارگانسیم‌های گرم منفی (*اشریشیا کلی*) بود. نتایج مطالعه Biswas و همکاران (۲) نیز نشان داد عصاره زغال اخته بر روی میکروارگانسیم‌های گرم مثبت در شیر بیشتر از میکروارگانسیم‌های 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 مؤثر بر رشد باکتری اتروکوکوس فکالیس بررسی شد و اثر اسانس‌های مذکور بر نفوذپذیری غشاء و سطح سلولی اتروکوکوس فکالیس نیز

33(3): 415-26. doi: 10.1111/j.1745-4549.2009.00417.x

- 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
- Kirbaslari FG, Tavman A, Dulger B, Turker G. Antimicrobial activity of Turkish Citrus peel oils. *Pak J Bot.* 2009; 41(6): 3207-12.
- Bahk J, Yousef AE, Marth EH. Behavior of *Listeria monocytogenes* in the presence of selected spices. *Lebensm Wiss Technol.* 1990; 23(1): 66-69.
- 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.
- 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
- 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

Original Paper

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

Razmjoo M (M.Sc)\*<sup>1</sup>, Khaki P (Ph.D)<sup>2</sup>, Fadaee Noughani V (Ph.D)<sup>3</sup>

<sup>1</sup>M.Sc in Food Science and Technology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. <sup>2</sup>Microbiologist, Associate Professor, Department of of Razi Vaccine and Serum Research Institute (RVSRI), Karaj, Iran. <sup>3</sup>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 study 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