مقاله علمی پژوهشی/ نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۳۱ شماره ۱/ سال ۱۴۰۰/ صفحات ۱ تا ۱۵

DOI: 10.22034/fr.2021.29807.1607

ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی و ترکیبات فنولی عصاره اتانولی لایه داخلی پوست بالنگ در نوشابه گازدار لیمویی

مریم فیلبان‌زاده[۱] و اکرم شریفی[۲*]

تاریخ دریافت: ۹۷/۷/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۱/۵

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی ، دانشکده مهندسی صنایع و مکانیک، واحد قزوین، دانشگاه آزاد اسلامی، قزوین، ایران

[۲] استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده مهندسی صنایع و مکانیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قزوین

[*]مسئول مکاتبه: Email: asharifi@qiau.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: یکی از دغدغه‌های مصرف کنندگان نوشابه‌های گازدار، وجود بنزوات سدیم به عنوان نگهدارنده در این محصولات است. **هدف**: عصاره لایه داخلی پوست بالنگ (*Citrus medica l.*) دارای ترکیبات ضدمیکروبی، فنولی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. **روش کار**: در این پژوهش از عصاره اتانولی پوست بالنگ با غلظت‌های mg/ml ۲، ۱/۵، ۱، ۰/۸ و ۰ به عنوان یک ترکیب نگهدارنده در فرمولاسیون نوشابه گازدار لیمویی استفاده و فعالیت ضدمیکروبی آن در برابر میکروارگانیسم های آلوده کننده نوشابه گازدار شامل باکتری *لاکتوباسیلوس دلبروکی*، باکتری *لوکونوستوک مزنتروئیدس*، مخمر *ساکارومایسس سروزیه* و مخمر *کاندیدا کروزوئی* مورد بررسی قرار گرفت. **نتایج**: نتایج به دست آمده نشان داد، مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) باکتری *لاکتوباسیلوس دلبروکی* در برابر عصاره اتانولی پوست بالنگ به ترتیب mg/ml ۰/۶ و mg/ml ۰/۸، برای باکتری *لوکونوستوک مزنتروئیدس* به مقدار یکسان mg/ml ۱ و برای مخمر *ساکارومایسس سروزیه* و *کاندیدا کروزوئی* به مقدار یکسان mg/ml ۰/۸ تعیین شد. میزان شمارش کلی باکتری‌های هوازی مزوفیل، شمارش باکتری مقاوم به اسید، کپک و مخمر، در نوشابه حاوی mg/ml ۲ عصاره پوست بالنگ، نسبت به نمونه شاهد کمتر بود. نتایج اندازه‌گیری ترکیبات فنولی نشان داد، میزان ترکیبات فنولی نوشابه‌های گازدار لیمویی تولید شده حاوی عصاره پوست بالنگ در تمامی تیمارهای حاوی عصاره نسبت به نمونه شاهد به صورت معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) بالاتر بود و در طی دوره نگهداری کاهش معنی‌دار نشان نداد. **نتیجه‌گیری کلی**: با افزودن عصاره پوست بالنگ به میزان mg/ml ۲ می‌توان نوشابه گازدار لیمویی با کیفیت مطلوب و از نظر خصوصیات حسی قابل رقابت با نوشابه لیمویی گازدار حاوی بنزوات سدیم تولید نمود.

واژگان کلیدی: فعالیت ضدمیکروبی، پوست بالنگ، عصاره، نوشابه لیمویی، ترکیبات فنولی

مقدمه

مرکبات منابع غنی از ویتامین‌های مختلف، عناصر و فیبرها هستند. در سال‌های اخیر توجه بیشتری به خاصیت ضدباکتریایی بخش‌های غیر خوراکی میوه‌ها

شده است (توسلی و همکاران ۱۳۸۸). میوه بالنگ با نام علمی *Citrus medica l.* گونه ای از انواع مرکبات است (دالیا ۲۰۱۴). روغن‌های طعم دار ضروری از این میوه (که در خارجی‌ترین لایه یعنی لایه‌ی رنگدانه‌ی پوسته واقع شده اند) نیز بعنوان یک آنتی‌بیوتیک در نظر گرفته می‌شوند. علاوه بر این، آب میوه‌ی بالنگ به همراه عسل، پادزهری موثر برای سموم شناخته شده است. پوست میوه بالنگ حاوی سیترونلال، ترپنها، آلدئیدها، کتون‌ها، استرها، الکل ها و اسیدهای آلی می‌باشد، لیمونن موجب خنثی شدن اثر میکروبهای بیماری‌زا می-شود و همچنین ژرانیول و سایر مونوترپن های موجود در عصاره پوست میوه بالنگ دارای خاصیت ضد سرطانی هستند (مینا و همکاران ۲۰۱۱).

نوشابه گازدار فرآورده‌ای است که از اختلاط آب، گازکربنیک، مواد افزودنی مجاز خوراکی، قند و یا سایر شیرین‌کننده‌های مجاز به دست می‌آید (الهامی راد و محمدی ۱۳۸۵). مضرات ناشی از مصرف نوشابه های صنعتی از دیدگاه های مختلفی قابل بررسی می‌باشد (باوا ۲۰۰۵). گزارش هایی وجود دارد مبنی بر اینکه در اثر واکنش میان بنزوات موجود در نوشابه ها با اسید اسکوربیک، بنزن تشکیل می‌شود که جزو ترکیبات مولد سرطان می‌باشد. به دلیل مضراتی که از دیدگاه سلامتی مصرف‌کننده به نوشابه های صنعتی نسبت داده می شود، بسیاری از محققین به دنبال یافتن راهکارهایی جهت بهینه‌سازی مصرف نوشیدنی های طبیعی می‌باشند چرا که بسیاری از ترکیبات مورد استفاده در نوشابه‌های صنعتی را مواد سنتزی تشکیل می‌دهند (هانتر ۲۰۰۳).

کرمی و همکاران (۱۳۹۱) در بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی ریشه شیرین بیان در نوشابه پرتقالی (بعنوان جایگزین کامل بنزوات سدیم) گزارش کردند که استفاده از عصاره ریشه شیرین بیان در نوشابه پرتقالی باعث ماندگاری نوشابه طی مدت ۹۰ روز می شود. توسلی و همکاران (۱۳۸۸) نیز به بررسی اثر آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی اسانس رزماری در غلظت های مختلف در نوشابه لیمویی پرداختند. نتایج به دست آمده نشان داد منحنی رشد میکروارگانیسم های مقاوم به اسید در همه غلظت‌ها بعد از رسیدن به حداکثر خود با شیب نسبتا تندی شروع به کاهش کرد. حتی نمونه های حاوی اسانس رزماری بهتر از نمونه شاهد حاوی نگهدارنده توانستند باعث از بین رفتن میکروب های مقاوم به اسید شوند. پرومپانا و همکاران (۲۰۱۲) به بررسی کاهش استفاده از رنگ های مصنوعی در نوشیدنی های الکلی با استفاده از گیاه بالنگ و تاثیر آن بر سلامت انسان پرداخته اند. تمامی محصولات بدست آمده حاوی مقدار قابل توجهی از ترپن ها بعنوان آنتی اکسیدان‌های موثر و عوامل ضد سرطان بودند. ادهام (۲۰۱۵) ترکیبات شیمیایی و خاصیت ضدمیکروبی عصاره پوست میوه بالنگ کردستان عراق را مورد بررسی قرار داد. عصاره پوست بالنگ حاوی پلی فنل ها، مقدار زیادی تانن، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و استروئید بود و خاصیت ضدمیکروبی بخصوص بر علیه باکتری های گرم منفی داشت. مانوار و همکاران (۲۰۱۵) فعالیت آنتی اکسیدانی و رادیکال گیرندگی عصاره های ریشه، پوست و گوشت میوه بالنگ را بررسی کردند. نتایج نشان داد بیشترین مقدار ترکیبات فنلی در ریشه وجود داشت ولی عصاره پوست بالنگ بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نشان داد. وحیدی و همکاران (۲۰۱۹) خصوصیات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی اسانس پوست بالنگ را مورد مطالعه قرار دادند. MIC و MBC برای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* به ترتیب ۶۲/۵، ۲۵۰، ۱۲۵ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود. اسانس قدرت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی داشت. حبشی و همکاران (۱۳۸۷) ترکیبات موجود در اسانس پوست میوه بالنگ را با دو روش استخراج تقطیر با آب و پرس سرد شناسایی کردند. در اسانس تقطیری ۲۵ و در اسانس پرس سرد ۲۳ ترکیب شناسایی شد. عمده ترین ترکیبات شناسایی شده لیمونن، گاما ترپینن و ژرانیال بود. نتایج محمودی و همکاران (۱۳۹۵) اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی اسانس پوست بالنگ بر افزایش ماندگاری شیمیایی و میکروبی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در طول دوره نگهداری را نشان داد. با توجه به اثرات سودمند میوه بالنگ، در این پژوهش از عصاره اتانولی پوست این

میوه به عنوان یک ترکیب نگهدارنده در فرمولاسیون نوشابه لیمویی استفاده و فعالیت ضدمیکروبی آن در برابر میکروارگانیسم‌های آلوده کننده نوشابه در محیط کشت و در نوشابه گازدار لیمویی مورد بررسی گرفت.

مواد و روش‌ها

میوه بالنگ (*Citrus medica l.*) در اواخر پاییز و در مرحله رسیدگی از بازار محلی دزفول تهیه شد. میوه‌های تازه چیده شده از یک باغ، سالم، یکنواخت و عاری از هر گونه ضایعات انتخاب شدند. مواد شیمیایی مورد نظر در این تحقیق شامل آگار، عصاره مخمر، پپتون، گلوکز، اتانول، مولر هیلتون براث، محیط کشت عصاره مخمر گلوکز کلرا مفنیکل آگار (*YGC: Yeast Glucose chloramphenicol agar*) و عصاره مخمر گلوکز پپتون مالت براث (*Yeast Malt*)، محیط کشت شمارش پلیتی (*PCA: Plate Count Agar*)، محیط کشت حاوی عصاره پرتقال (*OSA:Orange Serum Agar*) بودند. تمامی مواد مورد استفاده در این تحقیق دارای خلوص بالا بوده و از شرکت مرک تهیه شدند.

تهیه عصاره پوست بالنگ

لایه داخلی پوست بالنگ[1] با رطوبت اولیه ۶۷ درصد، جدا شده و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در آون (Memert مدل ۸۰۰، ساخت کشور آلمان) تا رطوبت ۵ درصد خشک و توسط آسیاب برقی Ika ساخت کشور آلمان به پودر تبدیل شد. پودر کردن در حد عبور ذرات از الک (Mesh-80) انجام شد. ۴۰ گرم پودر به همراه ۴۰۰ میلی‌لیتر از اتانول ۸۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر قرار داده شد و سپس با کاغذ صافی واتمن ۴۲ فیلتر شد. باقیمانده تحت شرایط یکسان مجدداً عصاره‌گیری شد. مواد حاصل از فیلتراسیون تحت خلاء در دستگاه روتاری (Ika، ساخت کشور آلمان) با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تا بریکس ۶۰ تبخیر شد. عصاره حاصل درون پلیت ریخته شد و پس از جداسازی حلال در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی گراد، پودر حاصل تا زمان مصرف در دمای۲۰- درجه سانتیگراد در فریزر قرار داده شد (پور امیر و گلی ۱۳۸۷).

ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی عصاره پوست بالنگ

میکروارگانیسم‌های مورد بررسی در این مطالعه عبارت بودند از: *Lactobacillus delbrucki (1333 PTCC)*, *Lukonostock Mesentroids(1591 PTCC)*, *Saccharomyces cerevisiae (5269 PTCC)*, *Candida cruzei (5295 PTCC)* که عمده‌ترین میکروارگانیسم‌های جدا شده از نوشابه‌های غیر الکلی گازدار می‌باشند. سویه‌های خالص این میکروارگانیسم-ها از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه شدند.

روش تهیه محیط کشت‌ها

جهت تهیه محیط کشت مایع (مولر هینتون براث و عصاره مخمر گلوکز پپتون مالت براث) مورد استفاده در آزمون‌های میکروبی از روش غلظت مضاعف استفاده شد (تورنسبری و مک دوگال ۱۹۸۳).

تهیه کشت تازه (در فاز لگاریتمی) از میکروارگانیسم‌ها

هر یک از سویه‌های باکتریایی یک روز قبل از انجام تست حداقل غلظت بازدارندگی (*Minimum inhibitory concentration: MIC*) و حداقل غلظت کشندگی (*Minimum bactericibal concentration:MBC*) و در مورد مخمرها دو روز قبل از انجام تست بر روی محیط کشت نوترینت آگار، کشت سطحی داده شدند تا میکروارگانیسم‌ها پس از یک روز (باکتری‌ها) یا دو روز (مخمرها) گرمخانه گذاری در هنگام تهیه سوسپانسیون میکروبی در فاز لگاریتمی قرار داشته باشند (تورنسبری و مک دوگال ۱۹۸۳).

تهیه سوسپانسیون با مک فارلند شماره یک

سوسپانسیون استاندارد ۱ مک فارلند با استفاده از اضافه کردن ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول آبی ۱/۱۷۵ درصد کلرید باریم به طور آهسته و همراه با همزنی مداوم به ۹/۹۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۱ درصد، تهیه گردیدند و جذب آن در طول موج ۶۲۰ نانومتر خوانده شد(تورنسبری و مک دوگال ۱۹۸۳).

تهیه سوسپانسیون میکروبی

یک لوپ کامل از کشت‌های تازه برداشته و به ۱۵ میلی-

[1] Albedo

لیتر محیط دارای غلظت مضاعف استریل اضافه کرده و جذب آن با استاندارد مک فارلند شماره یک برابر گردید. در مرحله بعد برای به دست آوردن مقدار 10^6 cfu/ml تحت شرایط استریل به نسبت ۱:۳۰۰ با محیط کشت مایع مضاعف مخلوط گردید (تورنسبری و مک دوگال ۱۹۸۳).

روش ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی عصاره پوست بالنگ در برابر باکتری‌های مورد بررسی

حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره‌های اتانولی با استفاده از روش رقت‌سازی در چاهک[1] مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور از پلیت‌های استریل ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. عصاره پوست میوه بالنگ با فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرواستریل و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مورد نظر (۲۰۰، ۵۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰، ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به چاهک‌های پلیت الایزا اضافه گردید. کلیه رقت‌ها در ۳ تکرار همراه کنترل منفی بودند. برای هر میکروارگانیسم نیز یک کنترل مثبت شامل محیط و سوسپانسیون و یک کنترل منفی عدم رشد و از محلول ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کلرامفنیکل استفاده شد. جذب چاهک‌ها در ۶۲۰ نانومتر توسط دستگاه خوانش‌گر الایزا خوانده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه نگهداری شدند. پس از ۲۴ ساعت جذب پلیت الایزا در طول موج ۶۲۰ نانومتر خوانده که در نهایت حداقل غلظتی از عصاره که تغییر دانستیه نوری در آن مشاهده نمی‌شود به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی در نظر گرفته شد. پس از ۲۴ ساعت از هر یک از غلظت-هایی که در آنها تغییر جذب دیده نشده بر روی محیط کشت جامد نوترینت آگار، کشت سطحی انجام گرفت و سپس پلیت‌ها جهت مشاهده رشد یا عدم رشد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند و نتایج MBC گزارش گردیدند (کولیسیک و همکاران ۲۰۰۴).

روش ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی عصاره پوست بالنگ در برابر مخمرها (کاندیداکروزئی و ساکارومایسس سروزیه)

عصاره پوست میوه بالنگ با فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرواستریل و غلظت‌های مورد نظر (۲۰۰، ۵۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰، ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی-لیتر) به چاهک‌های پلیت الایزا اضافه گردید. کلیه غلظت-ها در ۳ تکرار و همراه کنترل منفی بودند. به هر میکروتیوب استریل ۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره و ۱ میلی‌لیتر محیط کشت عصاره مخمر گلوکز پپتون مالت براث که به صورت مضاعف تهیه شده بود اضافه شد. به هر میکروتیوب نیز ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده اضافه شد. در ضمن یک کنترل مثبت شامل ۱ میلی‌لیتر محیط و ۰/۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون تهیه گردید. نمونه‌ها به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه نگهداری شدند. پس از طی زمان لازم، اولین غلظتی که کدورت در آنها مشاهده نگردید به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی تعیین گردید. سپس از غلظت‌هایی که در آنها کدورت مشاهده نشد، کشت سطحی بر روی محیط کشت جامد انجام گرفت. پلیت‌ها جهت مشاهده رشد یا عدم رشد به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند و نتایج به دست آمده گزارش شد (تورنسبری و مک دوگال ۱۹۸۳).

آماده سازی نوشابه حاوی عصاره پوست بالنگ

نوشابه‌های حاوی عصاره پوست بالنگ در غلظت‌های متفاوت تهیه گردیدند. در مرحله بعدی، ارزیابی حسی نمونه‌ها توسط گروه ارزیاب صورت گرفت. با پذیرش نمونه‌های نوشابه‌هایی با غلظت مشخص از عصاره پوست بالنگ توسط گروه ارزیاب و تطبیق نتایج حاصل از ارزیابی حسی و با تست حداقل غلظت بازدارندگی، غلظت‌های عصاره پوست بالنگ mg/ml ۰/۸، ۱، ۱/۵ و ۲ در نوشابه لیمویی استفاده شد و نمونه شاهد بدون عصاره پوست بالنگ و حاوی ۰/۱ گرم در لیتر نگهدارنده بنزوات سدیم بود. برای تهیه نوشابه شکر، سیتریک اسید، سدیم بنزوات و عصاره لیمویی را به

[1] Microbroth dilution

نسبت مشخصی با هم مخلوط کرده و با استفاده از دستگاه نوشابه ساز مجهز به کربوکولر ساخت شرکت هوک (Hook) سوئیس در فشار ۱/۵ psi و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد آب گازدار به نوشابه اضافه گردید (سلامی و همکاران ۱۳۸۵). نمونه ها پس از تهیه در بطری‌های PET به حجم ۳۰۰ میلی‌لیتر بسته‌بندی شده و سپس در دمای محیط نگهداری شدند. در یک دوره نگهداری ۳ ماهه و در ۳ مرحله زمانی سینتیک رشد میکروارگانیسم ها بررسی گردید.

بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره پوست بالنگ در نوشابه لیمویی

ابتدا بطری نوشابه در یک بشر حاوی الکل ۷۰ درصد به گونه‌ای غوطه ور شد که الکل ۲۵ میلی‌لیتر از قسمت بالای بطری را بپوشاند. بطری را از الکل بیرون آورده و صبر کرده تا الکل تبخیر شود. با استفاده از یک دربازکن سترون در بطری‌ها را باز کرده و پس از شعله دادن سر بطری‌ها محتویات آن را به یک ظرف سترون منتقل کرده و با تکان دادن مداوم ظرف، گاز آن خارج شد. کلیه مراحل روش کار در مجاورت شعله و با رعایت شرایط سترونی انجام شد (موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران ۱۳۸۷).

کشت نمونه‌ها

پس از خروج گاز از نمونه‌ها جهت بررسی هر یک از میکروارگانیسم‌های ذکر شده *(لاکتوباسیلوس دلبروکی(PTCC 1333)، باکتری لوکونوستوک مزنتروئیدس (PTCC 1591)، ساکارومایسس سرویزیه (PTCC 5269)، مخمر کاندیدا کروزوئی (PTCC 5295)* مقدار ۱ میلی لیتر از نمونه را به پلیت منتقل و به آن حدود ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت آماده استریل افزوده و پلیت را به شکل 8 انگلیسی به خوبی هم زده و بعد از بستن محیط کشت، پلیت‌ها (مطابق جدول ۱) گرمخانه گذاری شد بعد از این مدت کلنی های میکروارگانیسم‌های رشد یافته در پلیت ها شمارش و محاسبه شد، لازم به ذکر است که زمان بین افزودن نمونه به پلیت و محیط به پلیت نباید ۱۵ دقیقه بیشتر باشد (موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران ۱۳۸۷).

جدول ۱- محیط کشت اختصاصی و شرایط گرمخانه گذاری میکروارگانیسم‌های مورد بررسی(موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران ۱۳۸۷)

Table 1- Specific culture medium and incubation conditions of investigated microorganisms (Iranian Institute of Standards and Industrial Research 2008)

Type of microorganism	Specific culture medium	Incubation time	Incubation temperature (°C)	Method
mesophilic aerobic bacteria	PCA	48 (hours)	37	Mixed culture
acid resistant microorganisms	OSA	5 (day)	30	Mixed culture
yeast and mold	YGC	5(day)	25	Mixed culture

اندازه گیری ترکیبات فنولی کل

میزان ترکیبات فنولی کل بر اساس روش فولین-سیوکالتو (Folin-Ciocalteu) اندازه گیری گردید. مطابق با این روش ابتدا فنول ها را استخراج نموده و سپس ۱ میلی‌لیتر از نمونه ی استخراج شده را در بالن ته گرد ریخته و به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس به تعیین میزان پلی فنول ها بر اساس اسید گالیک پرداخته شد و با رسم منحنی اسید گالیک معادله خط ارتباط بین اسید گالیک و جذب نمونه ها محاسبه گردید (لین و تانگ ۲۰۰۷).

ارزیابی حسی

پس از آموزش های مقدماتی ۱۰ نفر از دانشجویان کارشناسی ارشد به عنوان ارزیاب انتخاب شدند و ویژگی‌های رنگ، عطر و طعم و پذیرش کلی نمونه های تولید شده به روش هدونیک با تکمیل پرسشنامه ارزیابی، مورد بررسی قرار گرفت. در پرسشنامه عدد ۱ نشان‌دهند (خیلی ضعیف)، عدد ۲ (ضعیف)، عدد ۳ (متوسط)، عدد ۴ (خوب)، عدد ۵ (خیلی خوب) بود (کرمی و همکاران، ۱۳۹۱).

آنالیز آماری

داده‌ها براساس طرح کاملاً تصادفی به کمک آنالیزواریانس Anova، تجزیه وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزارآماری SPSS (نسخه ۱۹) و رسم نمودارها باکمک نرم افزار Excel انجام شد. مقایسه آماری نتایج نیزدرسطح اطمینان۹۵٪ صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

نتایج ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ی پوست بالنگ در برابر میکروارگانیسم‌های موردبررسی

نتایج انجام تست حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) و در مورد میکروارگانیسم‌های مورد بررسی (*لاکتوباسیلوس دلبروکی*، *لوکونوستوک مزنتروئیدس*، *ساکارومایسس سرویزیه*، مخمر *کاندیدا کروزوئی*) در جدول ۲ نشان داده شده است. عصاره اتانولی پوست بالنگ روی میکروارگانیسم‌های مورد بررسی اثر مهار کنندگی نشان داد. مقادیر غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) باکتری *لاکتوباسیلوس دلبروکی* در برابر عصاره پوست بالنگ به ترتیب (mg/ml) ۰/۶ و ۰/۸ ارزیابی شد، در حالیکه مقادیرحداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) باکتری *لوکونوستوک مزنتروئیدس* یکسان و (mg/ml) ۱ به دست آمد. همچنین نتایج حاصل از مقادیر غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) مخمر *ساکارومایسس سروزیه* و *کاندیدا کروزوئی* به مقدار یکسان ۰/۸ ارزیابی گردید. عصاره اتانولی پوست بالنگ روی میکروارگانیسم‌های *لاکتوباسیلوس دلبروکی*، باکتری *لوکونوستوک مزنتروئیدس*، *ساکارومایسس سرویزیه*، مخمر *کاندیدا کروزوئی* اثر مهار کنندگی نشان داد.

شجاعی مهر و ناظری در سال ۱۳۹۲ به نتایج مشابهی دست یافتند، آنها در بررسی اثر ضدمیکروبی و آنتی اکسیدانی عصاره اندام های مختلف بالنگ و شناسایی فیتوشیمیایی برخی متابولیت های ثانویه بالنگ و دارابی بیان کردند، عصاره متانولی بر طیف گسترده ای از باکتری ها تاثیر داشت. ساه و همکاران در سال ۲۰۱۱ به بررسی فعالیت ضدمیکروبی آب میوه بالنگ، عصاره‌ی ریشه، برگ، پوست درخت آن، پوست و پالپ بالنگ در برابر ۷ نوع باکتری و ۲ گونه قارچ و یک مخمر پرداختند. نتایج به دست آمده نشان داد تمامی عصاره‌ها و آب میوه سطوح متفاوتی از فعالیت ضدمیکروبی در برابر یک یا چند گونه از باکتری مورد آزمایش را نشان داد.

جدول ۲- نتایج MIC (mg/ml) و MBC (mg/ml) عصاره‌های اتانولی پوست بالنگ در برابر میکروارگانیسم‌های آلوده کننده نو شابه

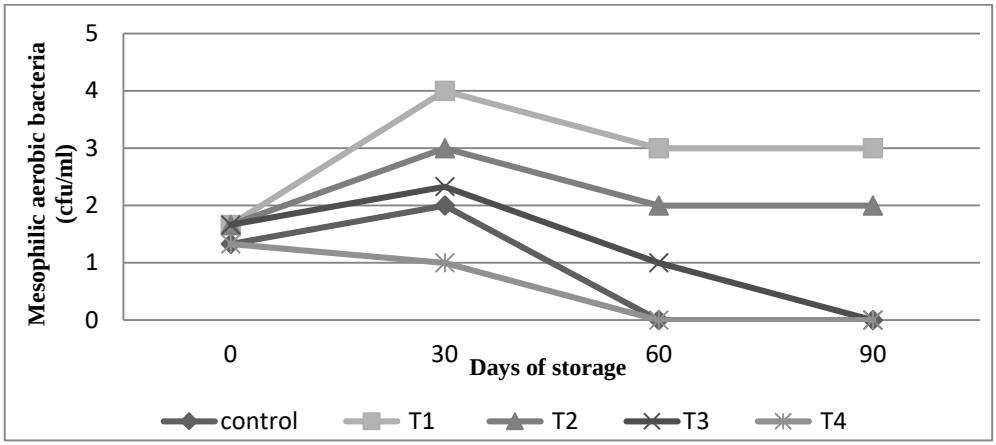
Table 2- Results of citron peel extracts MIC (mg/ml) and (mg/ml) MBC against contaminant microorganisms of lemon drinks

Microorganism	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
Lactobacillus delbrueckii	0.6	0.8
Leuconostoc mesenteroides	1	1
Saccharomyces cerevisiae	0.8	0.8
Candida krusei	0.8	0.8

نتایج شمارش کلی باکتری‌های هوازی مزوفیل (cfu/ml)

شمارش کلی در برابر باکتری های هوازی مزوفیل (cfu/ml) نشان داد (شکل ۱)، بین تیمارهای تولیدی در روز ۰ با نمونه شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵)، تیمارهای T_1 (۰/۸mg/ml) و تیمار T_2 (۱mg/ml) که دارای مقادیر عصاره پایین‌تر بودند در روز ۳۰ و ۶۰ آزمایش در مقایسه با سایر تیمارها دارای شمارش کلی باکتری های هوازی مزوفیل (cfu/ml) بالاتری به صورت معنی‌داری بودند (P<۰/۰۵)، همچنین در روز ۳۰ آزمون، تیمار T_4 (۲mg/ml) عصاره پوست بالنگ قادر به کاهش معنی-دار شمارش کلی باکتری های هوازی نسبت به سایر نمونه‌ها حتی نمونه شاهد گردید (P<۰/۰۵). در تمامی تیمارهای مورد بررسی به جز تیمار T_4 از روز ۰ تا ۳۰ یک روند افزایشی در میزان باکتری‌های هوازی مشاهده شد که پس از آن با گذشت زمان میزان باکتری‌های هوازی مزوفیل به صفر کاهش یافت و هیچ رشدی مشاهده نشد (به غیر از تیمارهای T_1 (۰/۸mg/ml) و تیمار T_2 (۱mg/ml)، به‌طوریکه در روز۹۰ آزمون میزان شمارش باکتری‌های هوازی در محدوده اعلام شده توسط سازمان ملی استاندارد (منفی) قرار گرفت به جز تیمارهای T_1 (۰/۸mg/ml) و تیمار T_2 (mg/ml ۱) که در محدوده اعلام شده قرار نداشتند. عصاره پوست بالنگ با خاصیت ضد باکتریایی خود توانست بار میکروبی نمونه‌های حاوی عصاره را تقریباً به اندازه نمونه حاوی بنزوات سدیم کاهش دهد.

نتایج شمارش کلی باکتری های هوازی مزوفیل (cfu/ml) نیز حاکی از فعالیت ضدمیکروبی عصاره پوست بالنگ در نوشابه لیمویی بود. به نظر می‌رسد عصاره پوست بالنگ با خاصیت ضد باکتریایی خود توانست بار میکروبی نمونه‌های حاوی عصاره را تقریباً به اندازه نمونه حاوی بنزوات سدیم کاهش دهد. آبینو و همکاران در سال ۲۰۰۷، در تایید نتایج تحقیق فوق تاثیر ضد باکتریایی عصاره اتانولی پوست پرتقال بر نوشیدنی چای قرمز را بررسی کردند و به شمارش کلی میکروارگانیسم ها پرداختند و مشاهده شد که نمونه‌های دارای عصاره پوست پرتقال در مقایسه با نمونه شاهد دارای شمارش کلی باکتری های هوازی مزوفیل (cfu/ml) کمتری به صورت معنی‌داری (P<۰/۰۵) بودند (آبینو و همکاران ۲۰۰۷). توسلی و همکاران در سال ۱۳۸۸ به بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی اسانس رزماری در نوشابه لیمویی پرداختند نتایج به دست آمده نشان داد، در روز سی‌ام تعداد میکروارگانیسم های مزوفیل به حد مجاز در نوشابه رسید که با نتایج تحقیق فوق مطابقت داشت.



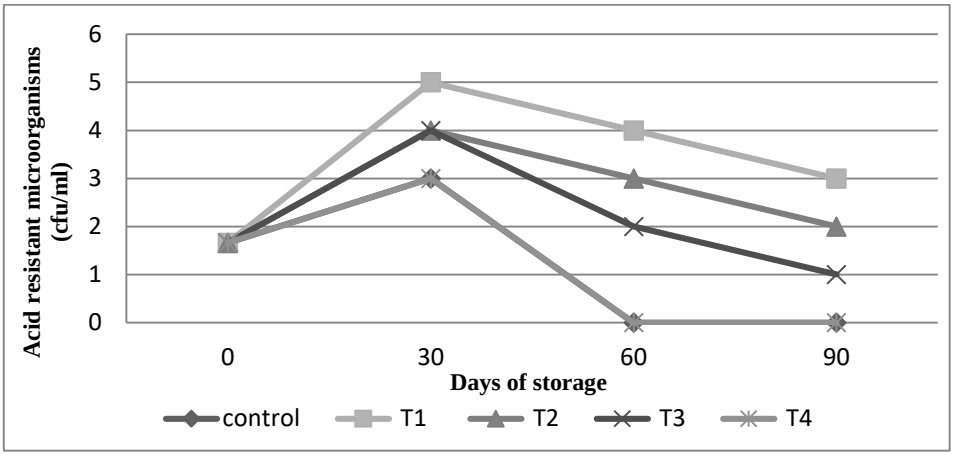
شکل ۱- فعالیت ضدمیکروبی عصاره پوست بالنگ در نوشابه لیمویی در برابر باکتری های هوازی مزوفیل (cfu/ml) (تیمارها بر اساس غلظت عصاره پوست بالنگ T_1 (۰/۸mg/ml)، T_2 (۱mg/ml)، T_3(۱/۵ mg/ml) و T_4 (۲ mg/ml))

Figure 1- Antimicrobial activity of citron peel extract in lemon carbonated drinks against mesophilic aerobic bacteria (cfu/ml) (Treatments base on concentration of citron peel extract: T_1 (0.8 mg/ml), T_2 (1 mg/ml), T_3 (1.5 mg/ml) and T_4(2 mg/ml))

نتایج شمارش میکروارگانیسم های مقاوم به اسید (cfu/ml)

نتایج به دست‌آمده از فعالیت ضدمیکروبی عصاره پوست بالنگ در نوشابه لیمویی (شمارش میکروارگانیسم های مقاوم به اسید (cfu/ml) نشان داد (شکل۲) بین تیمارهای تولیدی با نمونه شاهد در روز ۰ آزمون با نمونه شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵)، تیمارهای T_1 (۰/۸mg/ml)، تیمار T_2(۱mg/ml) و تیمار T_3(۱/۵ mg/ml) که دارای مقادیر عصاره پایین‌تر بودند در روز ۳۰، ۶۰ و ۹۰ آزمایش با سایر نمونه‌ها اختلاف معنی‌داری داشتند و دارای شمار کلنی بالاتری نسبت به نمونه شاهد و تیمار T_4(۲ mg/ml) بودند به‌طور کلی، تیمار T_4(۲mg/ml) حاوی عصاره پوست بالنگ و نمونه شاهد قادر به کاهش معنی‌دار شمارش باکتری‌های مقاوم به اسید نسبت به سایر نمونه‌ها بودند (P<۰/۰۵). در تمامی تیمارهای مورد بررسی از روز ۰ تا ۳۰ یک روند افزایشی در میزان باکتری‌های مقاوم به اسید مشاهده شد که پس از آن با گذشت زمان میزان باکتری‌های مقاوم به اسید در نمونه شاهد و تیمار T_4(۲ mg/ml) به صفر کاهش یافت و هیچ رشدی در آنها مشاهده نشد، به‌طوریکه در روز ۹۰ آزمون میزان شمارش باکتری‌های هوازی برای این تیمارها در محدوده اعلام شده توسط سازمان ملی استاندارد (منفی) قرار گرفت که نشان دهنده خاصیت ضدباکتریایی عصاره پوست بالنگ می‌باشد. اما در مورد سایر تیمارها افزودن عصاره قادر به کاهش باکتری‌های مقاوم به اسید و رساندن آن در محدوده اعلام شده توسط سازمان استاندارد نبود که بیانگر کافی نبودن غلظت عصاره افزوده شده می‌باشد.

شمارش میکروارگانیسم های مقاوم به اسید و همچنین کپک و مخمر نشان داد، عصاره پوست بالنگ در نوشابه لیمویی فعالیت ضدمیکروبی دارد. در نمونه شاهد و تیمار T_4(۲ mg/ml) که غلظت بالای عصاره پوست بالنگ وجود داشت شمارش باکتری‌های مقاوم به اسید و کپک و مخمر با گذشت زمان نگهداری به صفر کاهش یافت و هیچ رشدی در آنها مشاهده نشد. آبینو و همکاران در سال ۲۰۰۷، گزارش کردند، نمونه‌های نوشیدنی چای قرمز دارای عصاره پوست پرتقال در مقایسه با نمونه شاهد دارای باکتری‌های مقاوم به اسید کمتری به صورت معنی‌داری (P<۰/۰۵) بودند (آبینو و همکاران ۲۰۰۷).



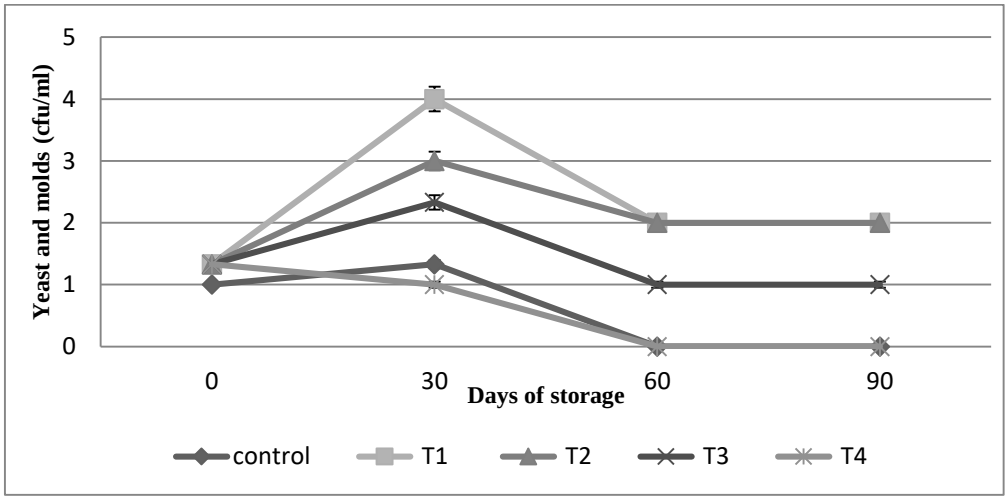
شکل ۲- فعالیت ضدمیکروبی عصاره پوست بالنگ در نوشابه لیمویی در برابر شمارش باکتری های مقاوم به اسید (cfu/ml)

Figure 2- Antimicrobial activity of citron peel extract in lemon carbonated drinks against acid resistant microorganisms (cfu/ml)

نتایج شمارش کپک و مخمر (cfu/ml)

نتایج فعالیت ضدمیکروبی عصاره پوست بالنگ در نوشابه لیمویی (شمارش کپک ومخمر (cfu/ml) نشان داد (شکل ۳). بین تیمارهای تولیدی با نمونه شاهد در روز صفر احتلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵)، تیمارهای T_1 ، T_2 و T_3 که دارای مقادیر عصاره پایین-تر بودند در روز ۳۰، ۶۰ و ۹۰ آزمایش با سایر نمونه‌ها اختلاف معنی‌داری داشتند و دارای شمار کلنی بالاتری نسبت به نمونه شاهد و تیمار T_4(۲ mg/ml) بودند (P<۰/۰۵). در تمامی تیمارهای مورد بررسی به جز تیمار T_4 از روز ۰ تا ۳۰ یک روند افزایشی در میزان کپک و مخمر مشاهده شد که پس از آن با گذشت زمان میزان کپک و مخمر در نمونه شاهد و تیمار T_4(mg/ml ۲) به صفر کاهش یافت به‌طوریکه در روز۹۰ آزمون میزان شمارش کپک و مخمر برای این تیمارها در رنج اعلام شده توسط سازمان ملی استاندارد (منفی) قرار گرفت که نشان دهنده خاصیت ضد باکتریایی عصاره پوست بالنگ می‌باشد.

عصاره پوست بالنگ با داشتن ترکیبات آنتی اکسیدانی و فنول‌ها و لیمونن موجب خنثی شدن اثر میکروبهای مولد بیماری می‌شود و همچنین (توسلی و همکاران ۱۳۸۸) می‌تواند به طور کامل مانع از فعایت میکروارگانیسم‌ها در نوشابه‌های تولیدی گردد. البته در روز ۳۰ بررسی حضور و رشد میکروارگانیسم‌ها هم در نمونه‌های حاوی عصاره و هم در نمونه‌های حاوی بنزوات (شاهد) مشاهده گردید. دلیل وجود میکروارگانیسم‌ها در نمونه‌ها، آلودگی مواد اولیه مصرفی است که یکی از مواد اولیه شکر است که منبع شناخته شده‌ای از اسپورهای باسیلوس هست که بالطبع در محصول نهایی نیز دیده می‌شوند. در بررسی اثر ضدمیکروبی سایر گیاهان در نوشابه محققان نتایجی گزارش کردند که نتایج تحقیق حاضر با آنها همخوانی دارد. در تائید نتایج تحقیق فوق، موسوی زرینی و همکاران در سال ۱۳۹۴ در بررسی تاثیر ضدمیکروبی عصاره متانولی و اتانولی پوست میوه بالنگ و نارنج علیه ۲ گونه قارچ بیماری زای گیاهی (*Digitatum Penicillium* و *Alternaria citri*) گزارش کردند که عصاره متانولی گیاه بالنگ و نارنج در غلظت ۱۵۰ppm و ۲۰۰ بر روی قارچ *Digitatum Penicillium* موثر بوده و عصاره اتانولی بالنگ با غلظت ۲۰۰ ppm روی پاتوژن *Alternaria citri* تاثیر داشت.



شکل ۳- فعالیت ضدمیکروبی عصاره پوست بالنگ در نوشابه لیمویی در برابر کپک و مخمر (cfu/ml)

Figure 3- Antimicrobial activity of citron peel extract in lemon carbonated drinks against yeast and mold (cfu/ml)

نتایج اندازه گیری ترکیبات فنولی کل

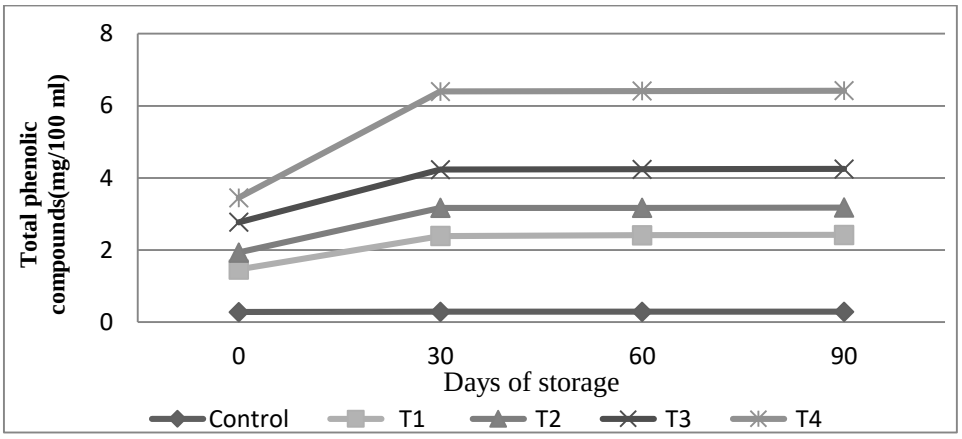
نتایج تاثیر عصاره پوست بالنگ بر ترکیبات فنولی کل در نوشابه لیمویی در شکل ۴ نشان داده شده است، میزان ترکیبات فنولی نوشابه‌های لیمویی تولید شده حاوی عصاره پوست بالنگ با توجه به pH اسیدی در طی دوره نگهداری حفظ گردید و پس از گذشت ۳۰ روز به میزان قابل توجهی افزایش یافت و سپس مقدار آن ثابت ماند و بین تیمارهای تولیدی با نمونه شاهد در روز صفر و سایر زمان‌های بررسی اختلاف معنی‌داری مشاهده شد و تمامی تیمارهای حاوی عصاره پوست بالنگ میزان ترکیبات فنولی به صورت معنی‌دار بالاتر از نمونه شاهد ارزیابی شد ($P<۰/۰۵$) و با افزایش میزان عصاره پوست بالنگ میزان ترکیبات فنولی نیز افزایش یافت.

با افزایش میزان عصاره پوست بالنگ در نوشابه تولیدی میزان ترکیبات فنولی نیز افزایش یافت که می‌تواند در اثر غنی بودن عصاره پوست بالنگ از ترکیبات فنولی باشد. نتایج تحقیق ادهام (۲۰۱۵) بیان گر وجود مقدار قابل توجه ترکیبات فنلی در عصاره پوست بالنگ بود. مانوار و همکاران (۲۰۱۵) نیز وجود مقدار بالای ترکیبات فنلی در پوست بالنگ را گزارش دادند. در بررسی پایداری ترکیبات فنولی در محیط اسیدی، عربشاهی و اعلمی (۲۰۰۷)، عصاره فنولی شاه‌توت و نعنا را به آب آناناس اضافه کردند و حلالیت و پایداری آنها را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که عصاره‌های مذکور به خوبی پایداری خود را طی نگهداری حفظ کردند (عربشاهی و اعلمی ۲۰۰۷). شهابی و همکاران (۱۳۸۷) در بررسی پایداری ترکیبات فنولی در آب سیب در طی دوره نگهداری، افزایش ترکیبات فنولی را گزارش کردند که با نتایج تحقیق فوق مطابقت داشت.

کرمی و همکاران در سال ۱۳۹۱ به ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی ریشه شیرین بیان در نوشابه پرتقالی پرداخته‌اند، نتایج نشان داد میزان ترکیبات فنولی در طی این مدت نیز نشانگر پایداری خوب عصاره اتانولی ریشه شیرین بیان در pH اسیدی نوشابه پرتقالی بود که با نتایج تحقیق فوق مطابقت داشت.

در اثر ایجاد تنش‌های اکسیداتیو در بدن انسان، عدم تعادل میان سامانه آنتی‌اکسیدانی و مواد ناشی از اکسیداسیون ایجاد می‌گردد که این مقوله به علت برهم‌کنش میان رادیکال‌های آزاد و گونه‌های اکسیژنی فعال با بیومولکول‌ها می‌باشد. این امر منجر به ایجاد بیماری‌هایی نظیر سرطان بیماری‌های قلبی- عروقی آسیب و یا مرگ سلولی و بی‌نظمی‌های التهابی (کاوانیشی ۲۰۰۲) می‌گردد. برای غلبه بر این آسیب ها نیاز به استفاده از آنتی‌اکسیدان‌هایی که از طریق مواد غذایی وارد بدن

می‌شوند، وجود دارد (لاگور ۲۰۰۷). با توجه به اینکه عامل اصلی تعیین‌کننده پتانسیل آنتی‌اکسیدان غذاها ترکیبات فنولی می‌باشند، مصرف مواد غذایی حاوی اینگونه ترکیبات می‌تواند از طریق اعمال خاصیت آنتی-اکسیدانی، به حفظ سلامت بدن کمک نمایند.



شکل ۴- تاثیر عصاره پوست بالنگ بر ترکیبات فنولی کل (mg/100ml)

Figure 4- Effect of citron peel extract on phenolic compounds (mg/100ml)

نتایج ارزیابی حسی

همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، بین تمامی تیمارهای حاوی عصاره پوست بالنگ با نمونه شاهد از نظر میزان طعم و مزه، رنگ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). میزان طعم و مزه و پذیرش کلی با افزایش میزان عصاره پوست بالنگ نسبت به نمونه شاهد کاهش یافت اما این میزان کاهش توسط ارزیاب‌ها معنی‌دار ارزیابی نگردید (P>۰/۰۵). ارزیاب‌ها از نظر رنگ با نمونه شاهد قادر به تشخیص اختلاف نبودند و این پارامتر با نمونه شاهد اختلاف معنی‌دار نداشت (P>۰/۰۵). شهابی قهفرخی و همکاران (۱۳۹۰)، در بررسی تاثیر ضد باکتریایی عصاره پوست انار بر آب سیب گزارش کردند، تمامی عصاره‌های پوست انار موجب ایجاد طعم و مزه نامطلوب در آب سیب نگردید و هیچ تغییری در طعم و مزه نمونه‌های حاوی عصاره پوست انار با نمونه شاهد مشاهده نشد. کرمی و همکاران (۱۳۹۱) به ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی ریشه شیرین بیان در نوشابه پرتقالی پرداخته‌اند، نتایج نشان داد میزان ارزیابی حسی (پذیرش کلی) تیمارهای حاوی عصاره ریشه شیرین بیان نسبت به نمونه شاهد تغییر معنی‌داری نداشتند.

جدول ۳- مقایسه میانگین ارزیابی حسی در نوشابه لیمویی

Table 3- Mean comparison of lemon carbonated drinks sensory evaluation

Treatments	Taste	Color	Overall acceptability
Control Treatment (C)	4.337±0.557[a]	4±0.557[a]	4.667±0.557[a]
T_1 Treatment (0.8)	4.337±0.557[a]	4±0.00[a]	4.667±0.557[a]
T_2 Treatment (1)	4±0.00[a]	4±0.00[a]	4.337±0.557[a]
T_3 Treatment (1.5)	3.667±1[a]	4±0.00[a]	4.337±0.557[a]
T_4 Treatment (2)	3.667±1[a]	4±0.00[a]	4.337±0.557[a]

Each value in the table represents the mean ±standard deviation of triplicate analysis. Different superscripts within the same line represent significant difference at P≤0.05.

نتیجه گیری کلی

نتایج این پژوهش حاکی از آن بود که عصاره پوست بالنگ با داشتن ترکیبات ضدمیکروبی، فنولی و آنتی‌اکسیدانی دارای فعالیت ضدمیکروبی در برابر میکروارگانیسم‌های آلوده کننده نوشابه می‌باشد. نتایج به دست آمده نشان داد، افزودن عصاره پوست بالنگ به میزان ۲mg/ml می‌توان نوشابه لیمویی گازدار با کیفیت میکروبی و ویژگی‌های شیمیایی مطلوب‌تر و از نظر ارزیابی حسی قابل رقابت با نوشابه لیمویی گازدار حاوی بنزوات سدیم تولید نمود.

منابع مورد استفاده

الهامی راد ا ح و محمدی ع، ۱۳۸۵. بررسی فرمولاسیون نوشابه گازدار با استفاده از عرق بیدمشک و ارزیابی تغییرات فیزیکو شیمیایی و میکروبی آن در طی نگهداری. مجله پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران، دوره ۲ شماره ۱ . صفحات ۳۹-۲۷.

پورامیر م و گلی ز، ۱۳۸۷. بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره پوست نارنج و اثر بازدارنده آن بر اکسیداسیون لیپیدی در مدل بیولوژیک، هجدهمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی.

توسلی ص، ابراهیم زاده موسوی م ع، امام جمعه ز و رضوی ه، ۱۳۸۸. بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی اسانس رزماری در نوشابه لیمویی، پایان نامه، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه تهران.

حبشی م، میرزا م، مستوفی ی و جایمند ک، ۱۳۸۷. شناسایی و مقایسه ترکیبهای موجود در اسانس پوست میوه بالنگ (*Citrus medica l*) با دو روش استخراج (تقطیر با آب و پرس سرد). فصلنامه تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، جلد ۲۴، شماره۴. صفحات ۴۳۶-۴۲۸.

محمودی ر، پاک بین ب، وحیدی ر، ۱۳۹۵. تاثیر اسانس روغنی پوست بالنگ بر تغییرات کیفیت شیمیایی و میکروبی فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ذخیره شده در سرما. نشریه پژوهش های صنایع غذایی، دوره ۲۶، شماره ۳، صفحات ۳۷۹-۳۶۹.

سلامی م، امام جمعه ز، ابراهیم زاده موسوی، م و رضایی ک، ۱۳۸۵. اندازه گیری جذب عطر و طعم نوشابه گازدار پرتقالی در ظروف ترفتالات پلی اتیلن با استفاده از میکرواستخراج با فاز جامد ـ گاز کروماتوگرافی. نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، دوره ۲۵. شماره ۳. صفحات ۶۹-۷۵.

شجاعی مهر م و ناظری س، ۱۳۹۲. بررسی اثر ضدمیکروبی و آنتی اکسیدانی عصاره اندام های مختلف و شناسایی فیتو شیمیایی برخی متابولیت های ثانویه بالنگ و دارابی، پایان نامه دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده علوم کشاورزی.

شهابی ا، احمدی ع و حجازی م، ۱۳۸۷. بررسی خواص آنتی باکتریال ترکیبات فنولی هسته انگور و پوست انار در آب سیب بر باکتری *Alicyclobacillus acidoterrestris*، پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه تهران. صفحات ۱-۱۰.

شهابی قهفرخی ا، حجازی م ا، احمدی زنوز ع، قنبرزاده ب، ۱۳۹۰. کنترل باکتری *Alicyclobacillus acidoterrestris* در آب سیب به وسیله وسیله عصاره‌های پوست انار. فصلنامه علوم و صنایع غذایی، شماره۲ دوره ۸.

کرمی ز، میرزائی ح، امام جمعه ز، صادقی ماهونک ع و خمیری م، ۱۳۹۱. ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی ریشه شیرین بیان در نوشابه پرتقالی، نشریه پژوهش های علوم و صنایع غذایی ایران، دوره ۲ شماره ۸، صفحات۲۶۱-۲۵۱.

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۸۷. ویژگی ها و روش های آزمون میکروبیولوژی نوشابه های گازدار، چاپ اول، شماره استاندارد ایران ۳۸۴۶.

موسوی زرینی س، نجفی زرینی م و علوی م، ۱۳۹۴. بررسی اثرات ضدقارچی عصاره متانولی و اتانولی اندام های هوایی بالنگ و نارنج برعلیه ۲ قارچ بیماریزای گیاهی. همایش ملی گیاهان دارویی و کشاورزی پایدار، شماره ۳. صفحات ۲۵-۳۲.

Abinu I, Adenopekun T, Adelowtan T, Ogunsanya T and Odugbemi T, 2007. Evaluation of the antimicrobial properties of different parts of *Citrus Aurantifolia* (Lime Fruit) as used locally. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines 4(2): 185–190.

Adham AN, 2015. Phytochemical analysis and evaluation antibacterial activity of Citrus medica peel and juice growing in Kurdistan/Iraq. Journal of Applied Pharmaceutical Science 5(10): 136-141.

Arabshahi-Delouee S and Aalami M, 2007. Production of functional pineapple juice by incorporation of phenolic extracts from selected plants. International journal of food properties 10: 479-488.

Bawa S, 2005. The role of the consumption of beverages in the obesity epidemic. Journal of Royal Society for the promotion of Health 125(3), 124-128.

Dalia A A, 2014.preparation and characterize of pectin from peel of kabad (*Citrus medica*) Fruit in sulaimani city, Iraqi Kurdistan Region. International journal of current Research in chemistry and pharma ceutical Sciences 142-146.

Meena AK, Kandale Ajit, Rao MM, Panda P and Govind R, 2011. A review on citron-pharmacognosy, phytochemistry and medicinal uses. International Research Journal of Pharmacy 2(1):14.

Hunter ML, 2003. Development of low erosive carbonated fruit drinks, 2-Evaluation of an experimental orange drinks in vitro and situ. Journal of Dentistry (31), 253-260.

Kulisic T, Radonic A and Katalinic V, 2004. Use of different methods for testing antioxidative of oregano essential oil. Food chemistry (85), 633-640.

Kawanishi S, Hiraku Y, Murata M, and Oilawa S, 2002. The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis. Free Radical Biology Method 32, 822-832.

Laguerre M, Lecomte J and Villeneuve P, 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. Progress in Lipid Research 46(5):244-82.

Lin JY and Tang CY, 2007. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. Food Chemistry (101), 140-147.

Munwar S, Roy H, Rahaman SA, 2015. Antioxidant and Free Radical Scavenging Activity of Citrus Medica. International Journal of Pharma Research and Health Sciences 3 (4), 810-816.

Prompana K, Kandylis P, Tsakiris A, Kanellaki M and Kourkoutas Y, 2012. Application of alternative technologies for Elimination of artificial coloring in alcoholic beverages produced by citrus medica and potential impact in human health. Journal of Food and Nutrition Sciences 03(07):959-969.

Sah A, Vijay J and melkani A B, 2011. Antimicrobial Activity of six different parts of the plant citrus medical inn. Food Chemistry (123), 250-267.

Thronsberry C and McDougal, LK, 1983. Successful use of broth microdilution in susceptibility tests for methicillin-resistant (heteroresistant) staphylococococci. Journal of Clinical Microbiology (18), 1084-91.

Vahidi R, Pourahmad R, Mahmoudi R, Hosseini SS, 2019. Chemical compounds and antibacterial and antioxidant properties of citron (*Citrus medica* L.) peel essential oil. Journal of Food and Bioprocess Engineering 3(1): 83-88.

Journal of Food Researches/vol.31 No.1 2021/pp 1-15
https://foodresearch.tabrizu.ac.ir
DOI: 10.22034/fr.2021.29807.1607

Evaluation of antimicrobial activity and phenolic compounds of ethanolic extract of inner layer of citron peel in lemon carbonated drinks

M Filban zadeh [1] and A Sharifi [2*]

Received: October 15, 2018 Accepted: January 25, 2020
[1]Master's graduate, Department of Food Science and Technology, Faculty of Industrial and Mechanical Engineering, Qazvin Branch, Islamic Azad University, Qazvin, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Industrial and Mechanical Engineering, Qazvin Branch, Islamic Azad University, Qazvin, Iran
[*]Corresponding Author: asharifi@qiau.ac.ir

Introduction: Citron (*Citrus medica L.*), belonging to citrus genus and native to southeast Asia (Dalia, 2014). Citrus fruits are rich sources of different vitamins, minerals, and fibers. In recent years, more attention has been paid to the antibacterial properties of non-edible parts of fruits (Tavasoli et al., 2009). Essential oil of the fruit peel (located in the inner layer of citron peel) have repetitively demonstrated antibacterial bioactivities. The citron juice along with honey is also known as an effective antidote to poisons. Citron peel contains citronellal, terpenes, aldehydes, ketones, esters, alcohols, and organic acids. Limonene, most abundant cyclic monoterpene of the fruit, has demonstrated considerable antimicrobial activity in many studies. Moreover, geraniol and other monoterpenes found in the extract of citron peel have exhibited anti-cancer properties (Mina et al., 2011). In recent decades, many are studying the ways of converting low-value products (by-products) to value-added products. Carbonated beverages are products made of water, sugar, carbon dioxide, additives, and, other sweeteners (Elhami Rad & Mohammadi, 2006). The harmful effect of consuming industrial soft drinks can be examined from different perspectives (Bawa, 2005). There are some reports that show benzene forms by a reaction between benzoate in soft drinks and ascorbic acid, which is a cancer-causing compound. Due to the health risks attributed to consumption of industrial soft drinks, many researchers are looking for ways to optimize the consumption of natural drinks, as synthetic materials make up most of the compounds used in industrial soft drinks (hunter, 2003). In this study, given the beneficial effects of citron, we used the ethanolic extract of citron peel as a natural preservative in the formulation of lemon soft drinks. Furthermore, we studied the antimicrobial activity of extract against soft drink contaminating microorganisms in a culture medium and lemon carbonated beverages.

Materials and methods: In this study, we added ethanolic extract of citron peel with increasing concentrations of 0, 0.8, 1, 1.5, and 2 mg/ml to the formulation of lemon soft drinks, as a natural preservative. Furthermore, antimicrobial activity of the additive was investigated against a series of soft drink contaminating microorganisms (*Lactobacillus delbrueckii*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Candida krusei*). The total phenolics of the lemon soft drink was measured based on the Folin-Ciocalteu method (Lin & Tang, 2007). The characteristics of color, taste, and flavor as well as the overall acceptability of final products were evaluated by ten evaluators using the hedonic method and an assessment questionnaire (Karami et al., 2012). Data were analyzed based on a completely randomized design, one-way ANOVA, using SPSS (version 19). The charts were plotted using Excel software. The statistical comparison of results was conducted at a 95% confidence level.

Results and discussion: Ethanolic extract of citron peel exhibited an inhibitory effect on the growth of our test microorganisms. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the extract against *Lactobacillus delbrueckii* were 0.6 mg/ml and 0.8 mg/ml, respectively. Moreover, the extract had inhibitory and bactericidal effect against *Leuconostoc mesenteroides* at the concentration of 1 mg/ml. Per our results, *saccharomyces cerevisiae* and *candida krusei* were killed and inhibited at the concentration of 0.8 mg/mL.
Overall, the ethanolic extract of citron peel exhibited significant inhibitory activity against *Lactobacillus delbrueckii, Leuconostoc mesenteroides*, *saccharomyces cerevisiae*, and *candida krusei*. The results of the total count of mesophilic aerobic bacteria (colony forming unit per mL (CFU/mL)) indicated the antimicrobial activity of citron peel extract in lemon soft drinks. The citron peel extract, with its antibacterial properties, was able to reduce the microbial load of samples. Comparable results were obtained by sodium benzoate. The count of acid-resistant microorganisms showed the antimicrobial activity of citron peel extract in the lemon soft drink. The count of acid-resistant bacteria dropped to zero over the time of storage in the control and T_4(2 mg/ml) treatment samples. Our results indicated the antimicrobial activity of citron peel extract in the lemon soft drink (based on yeast and molds count (CFU/ml). There was no significant difference between the treatments and the control at day 0 (P>0.05). Treatments T_1, T_2, and T_3 were significantly different from other samples at day 30, 60, and 90 of the experiment. Furthermore, T_1, T_2, and T_3 treatments had higher colony counts than the control and $T_4(2\ mg/ml)$ group (P<0.05). The antimicrobial effect of extract was concentration and time dependent. There was an increasing trend in the amount of yeast and molds in T_1, T_2, and T_3 treatments yet growth of the microorganisms in T_4 and control group was completely inhibited over the storage time. At day 90, yeast and mold count reached the standard set by Institute of Standards and Industrial Research of Iran (negative). As expected, increasing concentrations of the extract lead to higher total phenolics in the produced soft drink. Considering the acidic pH, total phenolics in the produced lemon soft drinks containing citron peel extract significantly increased after 30 days, and then remained constant throughout the storage period was. There was a significant difference between the total phenolics of treatments and the control at day 0 and other time points. Phenolics were significantly higher in all the treatments containing the citron peel extract compared with the control (P<0.05). The results of sensory evaluation showed that there was no significant difference between all the treatments containing the citron peel extract and the control sample in terms of taste, flavor, and color (P>0.05). By increasing the amount of citron peel extract, the rates of taste, flavor, and overall acceptability decreased compared with the control. However, rate was not evaluated as significant by the evaluators (P>0.05). No significant difference was detected between treatments and the control in terms of color by the evaluators(P>0.05).
Conclusion: The results of current study indicated that phenolics-rich citron peel extract has notable antimicrobial activity against soft drink contaminating microorganisms. The results showed that we can produce a quality product, in terms of microbial quality and chemical properties, by adding 2 mg citron peel extract per mL of soft drink. In terms of sensory properties, the final product could compete with sodium benzoate containing lemon soft drinks.

Keywords: Antimicrobial Activity, Citron Peel, Fruit Extract, Lemon Soft Drink, Phenolic Compounds