کنترل باکتری *Alicyclobacillus acidoterrestris* در آب سیب به وسیله عصاره های پوست انار

ایمان شهابی قهفرخی[۱]، محمد امین حجازی[۲*]، عادل احمدی زنوز[۳]، بابک قنبرزاده[۳]، علی ایاسه[۴]

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تبریز
۲-دکتری علوم و صنایع غذایی، استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی تبریز
۳-دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشیار، دانشگاه تبریز
٤-کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، مربی، دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی.
(تاریخ دریافت: ۸۸/٦/۲٤ تاریخ پذیرش: ۸۹/۲/۵)

چکیده

اخیراً باکتری *Alicyclobacillus acidoterrestris* به علت مقاومت بالای آن به پاستوریزاسیون رایج در صنایع آب میوه، مورد توجه قرار گرفته است. تاکنون روش های زیادی برای مقابله با این باکتری ارائه شده است. پوست انار به عنوان یکی از محصولات جانبی کارخانه های تولید آب میوه، دارای خواص ضدباکتری و فراسودمند (Functional)است. ترکیبات موثرۀ پوست انار به کمک متانول، اتانول، و استون استخراج شد. در مقایسه با سایر عصاره ها، عصاره استونی دارای بیشترین میزان فنول کل، فلاونوئید کل و فلاونول کل به ترتیب ۲۲٦، ۷۰ و ٦۱ mg/g بود. عصاره استونی در غلظت ۲۵۰µg/mlبدون آنکه اثر نامطلوبی روی کدورت آب سیب داشته باشد، روی محیط کشت جامد عصاره پرتقال (Orange Juice Agar) و آب سیب اثر شدید ضد- *Alicyclobacillus acidoterrestris* از خود نشان داد. عصاره متانولی طی مدت ۲٤ روز در هیچ یک از غلظت های مورد بررسی اثر نامطلوبی روی کدورت آب سیب نداشت، در حالی که در همین مدت عصاره های اتانولی و استونی در غلظت µg/mL ۱۰۰۰ باعث افزایش کدورت آب سیب شدند.

کلید واژگان: *Alicyclobacillus acidoterrestris*، آب سیب، خواص ضدمیکروبی، عصاره پوست انار، کدورت.

۱-مقدمه

Alicyclobacillus acidoterrestris، باکتریی گرم مثبت و اسپور دار است که قادر به رشد برروی محیط های اسیدی همانند آب میوه ها می باشد. در اثر رشد *A. acidoterrestris*، گویاکول و هالوفنول هایی مانند

*مسئول مکاتبات: Aminhejazi@abrii.ac.ir

۲و٦- دی بورموفنول و ۲و٦- دی کلروفنول تولید می شود که باعث بدبویی در آب میوه و کاهش مشتری پسندی آن می گردد [۳-۱]. از طرف دیگر ویژگی گرمادوستی و اسیددوستی آن منجر به مقاومت آن نسبت به پاستوریزاسیون رایج در صنایع آب میوه می شود این ویژگی ها باعث شده که این باکتری در سال های اخیر به عنوان یکی از مهمترین باکتری ها در صنایع آب میوه مطرح شود.

A.acidoterrestris به عنوان یکی از عوامل موثر در فساد آب سیب [۱،٤،٥] و به عنوان باکتری هدف رایج در کنترل کیفی میکروبی صنایع آب میوه مطرح شده است [٦].

روش های مقابله با *A.acidoterrestris* را می توان به دو دسته تقسیم کرد؛ روش های حرارتی و روش های غیر حرارتی. روش های غیر حرارتی شامل: ۱) افزودن ترکیبات طبیعی به آب میوه (مونولورین[1]، لیزوزیم[2]، نایسین[3]، روغن های اسانسی[4]، αوβ -تیونین[5] و انتروسین AS-48) [۱۳-۷]؛ ۲)نگهدارنده های رایج (بنزوات سدیم و سوربات پتاسیم) [۱٤] ۳)ضدعفونی کننده ها (دی اکسید کلر) [۱٥، ۱٦]. ٤) روش های جدید کاهش تعداد اسپور (اولترا فیلتر، فشار هیدرواستاتیک بالا، هموژنیزاسیون فشار بالا، پرتوافشانی) [۲۰-۱۷].

براساس بررسی های صورت گرفته ارزش $D_{۹۰\,^{\circ}C}$ باکتری *A.acidoterrestris* در آب میوه های مختلف در بازه ۱ تا ٥/۳ دقیقه و ارزش Z بین ۷/۲ تا ۱۲/۹ $^{\circ}C$ است[٦]، از این رو پاستوریزاسیون شدید قادر به از بین بردن این باکتری است اما این نوع فرآیند با تجزیه کردن مواد قندی موجود در آب میوه ها، ترکیبات نامطلوبی همچون هیدروکسی متیل فورفورال (HMF) تولید می کند [۲۱]. از سوی دیگر، فرآیند های جدید که چنین آثار سوئی ندارند باعث افزایش هزینه های تولید می گردند. این در حالی است که استفاده از نگهدارنده های شیمیایی علاوه براینکه براساس استاندارد ملی ایران شماره ۳٦٥ غیرمجاز است [۲۲] از لحاظ مصرف کننده نیز نامطلوب می باشد [۲۳] از این رو است که کارخانه های تولید آب میوه به دنبال فرآیندهای اقتصادی و بدون استفاده از نگهدارنده های شیمیایی هستند.

بررسی های صورت گرفته روی *A.acidoterrestris* در آب میوه های مختلف نشان داده است که این باکتری قادر به رشد در آب انگور سفید است. در حالی که قادر به رشد در آب انگور قرمز با همان درجه بریکس و pH نیست. این ویژگی می تواند به خاطر حضور ترکیبات فنولی خنثی باشد و از میان چنین ترکیباتی کاتکین-گالات[6] می تواند به طور موثری در غلظت ۱۰۰۰mg/L از رشد *A.acidoterrestris* جلوگیری کند [٤]. در دیگر تحقیقات مشخص شده است که ترکیبات فنولی موجود در انگور قرمز مانند رزوراترول[7]، اسید فرولیک[8]، اسید کوماریک[9]، اسید هیدروکسی بنزوئیک[10] و پروآنتوسیانیدین[11] می توانند *A.acidoterrestris* را غیرفعال کنند[۲٤]. علاوه براین رزوراترول و اسید هیدروکسی بنزوئیک خواص آنتی باکتریایی تیمارهای متشکل از کاتکین گالات و پروآنتوسیانیدین را افزایش می دهند[۲٤].

پوست انار (*punica granatum*) به عنوان یکی از محصولات جانبی صنایع آب میوه، منبع مهمی برای ترکیبات زیست فعال است و قرن ها است که در طب سنتی برای درمان اسهال و آکنه مورد استفاده قرار می گیرد. علاوه براین دارای خواص فراسودمند و ضدجهش زائی است [۲٥، ۲٦]. پوست انار دارای خواص آنتی باکتریایی بر روی باکتری های گرم مثبت مانند: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulanse* و *Bacillus cereuse* و گرم منفی مانند: *E.coli* و *pseudomonas aeroginosa* است [۲۷، ۲۸]. عصاره های پوست انار (PPE[12]) دارای خواص آنتی اکسیدانی [۲٦، ۲۷، ۳۰، ۲۹] و ضد جهش زائی [۲٦] هستند.

در سال ۱۳۸٦ اولین گزارش مبنی بر آلودگی کنسانتره سیب تولیدی در ایران به *A.acidoterrestris* منتشر شد [٥]. و در مطالعه حاضر در ادامه آن تحقیق به بررسی روشی جهت رفع این مشکل پرداخته ایم. هدف از این مطالعه، بررسی خواص آنتی باکتریایی عصاره های پوست انار روی *A.acidoterrestris* در آب سیب و اثرات جانبی آن روی کدورت محصول تولیدی است. علاوه براین، عواملی مانند

1. Monolaurin
2. Lysozyme
3. Nisin
4. Essential oils
5. α and β-thionins

6. Catechin-gallate
7. Resveratrol
8. Ferulic acid
9. Cumaric acid
10. Hydroxy benzoic acid
11. Proanthocyanidin
12. Pomegranate peel extract

مقدار کل خاکستر، فنول، فلاونوئید، فلاونول و مقدار نیتروژن نیز به عنوان عوامل موثر بر کیفیت در عصاره ها اندازه گیری شد.

۲-مواد و روش ها

۲-۱- مواد

پوست انار از کارخانه آب میوه تکدانه (ایران- مرند) تهیه شد. مواد شیمیایی شامل: متانول، اتانول، استون، کربنات سدیم، کلرید آلومینیم ، استات پتاسیم، هیدراکسید سدیم، فرمالدهید و واکنشگر فولین-سیوکالتیو[1] (Merck, Germany)؛ اسید گالیک، OSA (Orange Serum Agar) و PDA (Potato Dexterous agar) (Himedia, India) و روتین[2] (Roth, Germany) در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. سویه خالص *A.acidoterrestris* DSM3922 از کلکسیون DSMZ [3] تهیه شد

۲-۱- تهیه عصاره پوست انار

پوست انار در آفتاب تا رسیدن به رطوبت در حدود ۹٪ خشک و سپس پودر شد. پودر پوست انار (۲۵ g) به ۱۰۰ml از حلال ها (متانول، اتانول و استون) اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق به کمک همزن مغناطیسی به هم زده شد. آنگاه برای رفع ذرات نامحلول از کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ استفاده شد این فرآیند بار دیگر روی باقیمانده به کمک ۱۰۰ml حلال انجام شد. عصاره ها به کمک تغلیظ کننده چرخشی در دمای ۴۰°C تغلیظ شدند [۲۷].

۲-۲-تعیین مقدار کلی راندمان استخراج، خاکستر، فنول ها، فلاونوئید ها، فلاونول ها و نیتروژن

راندمان استخراج با استفاده از فرمول ۱ بدست آمد، که در این فرمول R، راندمان استخراج (٪)؛ m_1 و m_2 به ترتیب وزن عصاره و پوست انار خشک (g).

$$R = \frac{m_1}{m_2} \times 100 \qquad (1)$$

مقدار خاکستر در عصاره ها به کمک روش AOAC 930.05 تعیین شد.

مقدار فنول کل[4](TP) در PPE به کمک روش فولین-سیوکالتیو تعیین شد [۳۱]. ابتدا منحنی استاندارد به صورت زیر ترسیم شد: به ۰/۱ml از محلول های استاندارد (۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۶۲/۵، ۱۰۰، ۱۲۵۰µg/ml) اسید گالیک در متانول ۶۰٪ ، ml ۰/۵ واکنشگر فولین-سیوکالتیو ۱۰٪ اضافه و پس از ۳ دقیقه به آن ۰/۴ml محلول ۷/۵(w/v)٪ کربنات سدیم اضافه شد. میزان جذب پس از ۳۰ دقیقه در طول موج ۷۶۵nm به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر(Spectronic Genesys5, USA) اندازه گیری (۳ تکرار) و منحنی استاندارد(R^2=۰/۹۹۸, C=۰/۱۰۲A+۶/۶۷۹) رسم شد. برای اندازه گیری TP در PPE، ۰/۰۱ تا ۰/۰۲ g از PPE در ۱۰ml از متانول ۶۰٪ حل شد و به همان روش قبل عمل شد.

برای تعیین TP از فرمول (۲) استفاده و برمبنای اسید گالیک (mg/g GAE)[5] گزارش شد. در این فرمول، (C) غلظت TP در PPE (mg/g GAE)؛ ، A میزان جذب محلول؛ W،وزن (g) [۳۱].

$$C = \frac{(۰/۱۰۲A - ۶/۶۷۹)}{۱۰۰W} \qquad (2)$$

مقدار فلاونوئید کل[6](TFD) درPPE به کمک روش بهینه شده رنگ سنجی کلرید آلومینیم تعیین شد[۳۲]. ابتدا منحنی استاندارد به صورت زیر ترسیم شد: ۱ml از محلول استاندارد روتین در متانول ۶۰٪ (غلظت های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و۵۰۰µg/ml) با ۱ml از محلول کلرید آلومینیم ۲٪ و سپس ۶ml از محلول ۵٪ استات پتاسیم مخلوط شد و پس از ۴۰ دقیقه مقدار جذب در ۴۱۵nm اندازه گیری شد (۳ تکرار). و منحنی استاندارد(R^2=۱/۰۰۰, C=۰/۲۶۹A+۰/۲۱۹) رسم شد. برای اندازه گیری TFD در PPE، ۰/۱ تا ۰/۲g از PPE در ۱۰ml متانول ۶۰٪ حل شد و برای تعیین TFD ، ۱ml از این محلول به روش شرح داده شده مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان فلاونوئید کل (C) برمبنای روتین (mg/g RE) ، به کمک فرمول ۳ تعیین شد. در این فرمول، (C) غلظت

1. Folin–Ciocalteu
2. Rutin equivalents
3. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
4.Total amount of phenolic
5. Gallic acid equivalents
6. Total amount of flavonoid

TFDدر PPE برحسب (mg/g RE)، A میزان جذب محلول؛ W،وزن بر حسب (g) است[۳۲].

$$C=\frac{(۰/۲۶۹A+۰/۲۱۹)}{۱۰۰W} \qquad (۳)$$

مقدار فلاونول کل(TFL) در PPE به کمک روش رنگ سنجی کلرید آلومینیم تعیین شد[۳۳]. ابتدا منحنی استاندارد به صورت زیر ترسیم شد: ml ۱ از محلول استاندارد روتین در متانول ۶۰٪ (غلظت های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و۵۰۰µg/ml) با ml۱ از محلول کلرید آلومینیم ۲٪ و سپس ml۶ از محلول ۵٪ استات پتاسیم مخلوط شد و پس از ۲/۵ ساعت مقدار جذب در ٤٤۰nm تعیین شد. پس از سه تکرار به این روش منحنی استاندارد($y=۰/۳۵۵x+۲/٤۰۵$, $R^۲=۰/۹۹۹$) رسم شد. برای اندازه گیری TFL در PPE، ۰/۱ تا ۰/۲g از PPE در ml۱۰ متانول ۶۰٪ حل شد و برای تعیین TFD ، ml۱ از این محلول به روش شرح داده شده مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان فلاونول کل (C) برحسب روتین (mg/g RE)، به کمک فرمول ٤ تعیین شد. در این فرمول، (C) غلظت TFL در PPE (mg/g RE)؛ A میزان جذب محلول؛ W،وزن (g) [۳۳].

$$C=\frac{(۰/۳۵۵A+۲/٤۰۵)}{۱۰۰W} \qquad (٤)$$

میزان نیتروژن کل با استفاده از تلفیق روش فلیپ–ریبری و مندز–فایا[1] (۲۰۰۷) و استاندارد ملی ایران شماره ۲۶۸۵ اندازه گیری شد[۳٤، ۳۵]. در حدودg ۰/۱ از PPE در آب حل و به کمک آب به ml ۲۵ رسانیده شد، سپس به کمک هیدراکسید سدیم(۰/۱N) تا pH ۸/۱ خنثی شد. به این محلول ml۱۰ از محلول فرمالدهید ۳۵٪ که به کمک هیدراکسید سدیم(۰/۲۵N) تا pH ۸/۱ خنثی شده بود؛ اضافه گردید. محلول حاصل پس از یک دقیقه به کمک هیدراکسید سدیم(۰/۱N) تا pH ۸/۱ به صورت پتانسیومتری تیتر شد. میزان نیتروژن آزاد PPE به وسیله فرمول ۵ محاسبه شد. در اینجا $V_۱$ حجم هیدروکسید سدیم (ml)؛ $N_۱$ غلظت هیدروکسید سدیم؛ $V_۲$ حجم نمونه (ml)، m وزن نمونه (g) و F_n میزان نیتروژن نمونه (mg/g PPE).

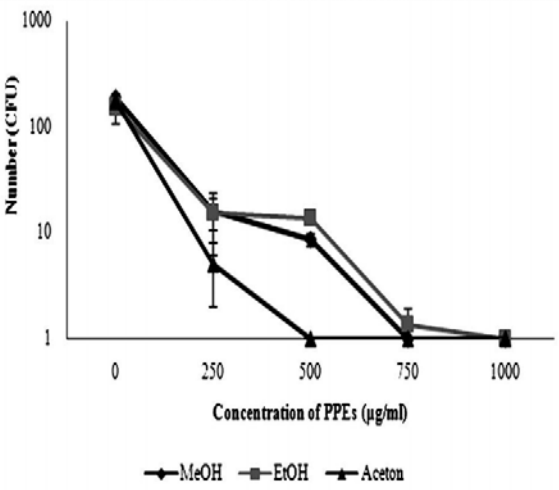
$$F_n=\frac{V_۱\times N_۱\times ۱٤}{V_۲\times m} \qquad (۵)$$

۲-۳- بررسی خواص آنتی باکتریایی PPE روی *Alicyclobacillus acidoterrestris*

آب سیب (۱۲°Brix، pH ۳/۷) از کنسانتره آب سیب (شرکت نوش ایران، عجب شیر) تهیه و سترون شد (۱۰۵°C به مدت ۲ دقیقه). آب سیب تولید شده از نظر حضور *A.acidoterrestris* مورد ارزیابی قرار گرفت [۳۶].

پس از هم زدن هر ظرف، آب سیب در ظرف مخصوص دستگاه کدورت سنج (Hach 2100P portable, USA) ریخته و براساس NTU [2] اندازه گیری شد.

A.acidoterrestris DSM3922 به مدت ۷ روز در دمای ٤۳°C روی محیط کشت OSA (pH ۳/۷) تلقیح شد؛ آنگاه برای تأیید تولید اسپور از میکروسکوپ اختلاف فازی



شکل ۱ تأثیر عصاره پوست انار (PPE) روی تعداد *A.acidoterrestris* روی محیط کشت OSA.

استفاده شد و مشخص گردید که بیش از ۸۰٪ باکتری ها تولید اسپور کرده اند. به کمک میله شیشه ای و آب مقطر سترون (ml۲ به ازای هر پلیت) کلنی ها از سطح محیط کشت جمع آوری شد و سوسپانسیون تهیه شد به مدت ۳۰ دقیقه در ٤۰۰۰×g سانتریفوژ شد. فاز رویی دور ریخته و فاز ته نشین شده به کمک آب مقطر سترون و شستشو داده شد و مجدداً به صورت سوسپانسیون در آمد. این فرآیند ۳ بار تکرار شد. پس از آخرین سانتریفوژ فاز ته نشین شده در آب مقطر سترون به

1. Filipe-Ribeiro and Mendes-Faia

2. Nephlometric Turbidity Unit

صورت سوسپانسیون در آورده شد و در ویال های ۱ ml توزیع و تا زمان مصرف در ۲۰°C- نگهداری شد [۳۷].

شمارش اسپور در استوک ها طبق استاندارد ملی ایران شماره ۹۷۹۹، روی محیط کشت PDA (pH ۳/۷) صورت گرفت و جمعیت اسپور[1] ۱۰^۵ CFU/ml بود [۳٦].

PPE در آب حل و به وسیله میکروفیلتر (۰/۲μm) سترون شد و به فلاسک های حاوی ٦۰ml محیط کشت OSA (۳/۷ pH) که دمایی در حدود ۷۰°C داشتند تا رسیدن به غلظت نهایی ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰μg/ml اضافه گردید. محیط های کشت در سه پتری تقسیم شد و به هر یک از پتری ها ۲۰۰CFU اسپور تلقیح و به مدت ۳ روز در ٤۳°C نگهداری شد. کلنی های تشکیل شده پس از این مدت شمارش گردید. میزان بازدارندگی به کمک فرمول ٦ محاسبه شد. در اینجا H درصد بازدارندگی؛ N_C و N_T به ترتیب میانگین جمعیت نمونه کنترل (بدون PPE) و نمونه آزمون بر مبنای (CFU) هستند [۳۸].

$$H = \frac{(N_C - N_T)}{N_C} \times ۱۰۰ \qquad (٦)$$

PPE در آب حل و به وسیله میکروفیلتر (۰/۲μm) سترون و به ظرف های حاوی ۱۲۰ml آب سیب (۳/۷ pH) اضافه شد تا غلظت های نهایی به ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰μg/ml رسید. به نمونه کنترل نیز ۱۰ml آب مقطر فیلتر شده اضافه گردید آنگاه به تمامی نمونه ها اسپور *A.acidoterrestris* اضافه شد تا جمعیت اولیه در تمامی آنها به ۱۰^۳CFU/ml رسید. نمونه ها در دمای ٤۳°C نگهداری شد و در زمان های مختلف (۸ ساعت، ۳، ۷، ۱۱ و ۲٤ روز) نمونه برداری و روی PDA کشت داده و به مدت ۳ روز در دمای ٤۳°C نگهداری شد. کلنی های تشکیل شده پس از این مدت شمارش گردیدند. میزان بازدارندگی به کمک فرمول ٦ محاسبه شد. در اینجا H درصد بازدارندگی؛ N_C و N_T به ترتیب میانگین جمعیت نمونه کنترل و میانگین جمعیت نمونه آزمون (CFU) در مدت ۲٤ روز هستند.

۲-٤- تجزیه تحلیل آماری

آزمون های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS 11.5 (SPSS Inc., chicago, IL, USA) انجام شد. مقایسه داده های مربوط به ویژگی های ضد *A.acidoterrestris* روی محیط کشت به کمک آزمون دانکن انجام شد؛ که حلال ها (متانول، اتانول و استون) و غلظت ها (۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰μg/ml) به عنوان متغیرها در نظر گرفته شدند. مقایسه داده های مربوط به ویژگی های ضد *A.acidoterrestris* در آب سیب و کدورت آنها به کمک آزمون دانکن و در غالب طرح اسپلیت پلات در زمان انجام شد که حلال ها و غلظت ها به عنوان متغیر مستقل و جمعیت باکتری به عنوان متغیر وابسته در نظر گرفته شدند.

۳-نتایج و بحث

۳-۱- تجزیه عصاره های پوست انار

بیشترین راندمان استخراج (۲۹/٥٤٪) مربوط به عصاره متانولی (PPEM) بود در حالی که عصاره استونی(PPEA) کمترین راندمان (۲/۲۸٪) و عصاره اتانول (PPEE) راندمانی بین این دو (۲٤/۳٪) را نشان دادند. این حالت را می توان مربوط به قطبیت حلال های مورد استفاده دانست. متانول با بیشترین قطبیت، بیشترین و استون با کمترین قطبیت، کمترین راندمان استخراج را داشتند. وایت هد[2] (۲۰۰۵) پیشنهاد داده که حلال های قطبی، مواد قطبی مانند نمک ها و قندها را در خود حل می کنند و به این ترتیب موجب افزایش راندمان عصاره ها می شوند[۳۹].

نتایج تجزیه شیمیایی مربوط به PPE در جدول ۱ ارائه شده است. هیچ رابطه ای بین میزان خاکستر و قطبیت حلال مشاهده نشد و PPEE کمترین خاکستر را داشت. نگی و جایاپراکاشا[3] (۲۰۰۳) نشان داده اند که TP در PPE استخراج شده به وسیله اتیل استات، استون، متانول و آب به ترتیب ۱۷۰، ٤۰۰، ٤٦۰، و ۱٤۰mg/g بوده است[۲۷]. در حالی که سینگ و همکارانش (۲۰۰۲) نشان دادند که TP در PPE استخراج شده به وسیله اتیل استات، متانول و آب به ترتیب، ۱۸/۰، ٤٤/۰ و(%, w/w) ۳/۰ بوده است[۲۹]. لیو همکارانش[4] (۲۰۰٦) نشان دادند که TP و TFD در PPE استخراج شده به ترتیب

1. Colony forming unit

2. Whitehead
3. Negi, and Jayaprakasha
4. Li et al

۲۴۹±۱۷/۲ و (mg/g) ۵۹/۱±٤/۸ بوده است[٤٠]. اختلاف های مشاهده شده بین تحقیقات مختلف ممکن است به خاطر تفاوت بین واریته های انار، روش های استخراج و روش های اندازه گیری باشند[٤٠].

جدول ۱ تجزیه شیمیایی عصاره های پوست انار (PPE)

تجزیه شیمیایی	عصاره استونی (mean±SD)	عصاره اتانولی (mean±SD)	عصاره متانولی (mean±SD)
فنول کل (mg/g GAE)	‡^{a}۲۳۶±۱٤	^{c}۱۰۹±۱	^{b}۱٤۹±۱۵
فلاونوئید کل (mg/g RE)	^{a}۷۰±۵	۹۳±۱	^{b}٤۳±٦
فلاونول کل (mg/g RE)	^{a}٦۱±۵	^{c}۲۷±۰	^{b}۳٦±۵
خاکستر (٪)	^{a}۰/۸۷۵±۰/۰۳	^{a}۰/٦۳±۰/۰٤	^{b}۲/۰۹±۰/۱۱
نیتروژن(mg/g PPE)	^{a}۰/۰۱۲±۰/۰۰۳	^{b}۰/۰٤۲±۰/۰۰۸	^{b}۰/۰۳۹±۰/۰۰۷

‡)مقادیری که در هر ردیف دارای حروف مشابه هستند فاقد اختلاف معنی دار هستند ($p \leq ۰/۰۵$)

۳-۲- اثر ضد- *A.acidoterrestris* ، PPE بر روی محیط کشت OSA

رشد *A.acidoterrestris* توسط PPEM ، PPEE و PPEA به ترتیب در غلظت های ۷۵۰، ۱۰۰۰ و ۵۰۰µg/ml مهار شد (شکل ۱).

خصوصیات ضد *A.acidoterrestris* ، PPE با افزایش TP عصاره ها و غلظت عصاره افزایش یافت ولی، به جز PPEM در ۲۵۰µg/ml و PPEE در ۲۵۰ و ۵۰۰µg/ml؛ هیچ اختلاف معنی داری ($P \leq ۰/۰۵$) بین PPE استخراج شده به وسیله حلال ها و غلظت های مختلف مشاهده نشد (جدول ۲).

جدول ۲ در صد بازدارندگی رشد *A.acidoterrestris* در غلظت های مختلف PPE روی محیط کشت OSA

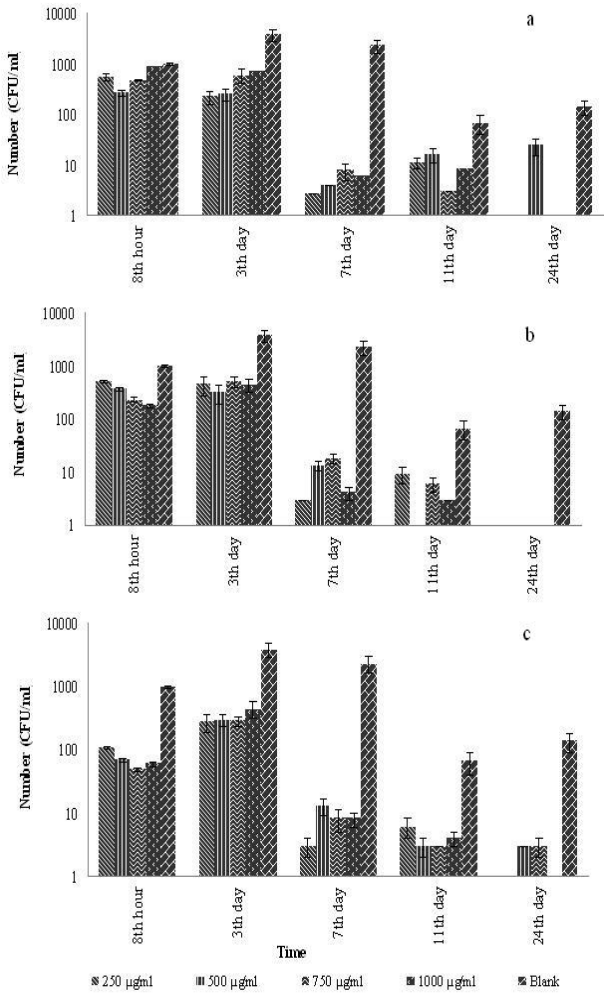
حلال استخراج	غلظت عصاره پوست انار (µg/ml)	بازدارندگی رشد* (٪)
متانول	۲۵۰	۹۲/۳^{b}‡
متانول	۵۰۰	۹٦/۰^{a}
متانول	۷۵۰	۱۰۰/۰^{a}
متانول	۱۰۰۰	۱۰۰/۰^{a}
اتانول	۲۵۰	۹۱/٤^{b}
اتانول	۵۰۰	۹۱/۲^{b}
اتانول	۷۵۰	۹۹/۸^{a}
اتانول	۱۰۰۰	۱۰۰/۰^{a}
استون	۲۵۰	۹۷/۲^{a}
استون	۵۰۰	۱۰۰/۰^{a}
استون	۷۵۰	۱۰۰/۰^{a}
استون	۱۰۰۰	۱۰۰/۰^{a}

*)بازدارندگی رشد (H)، $H = \frac{(N_C - N_T)}{N_C} \times ۱۰۰$

‡)مقادیری که دارای حروف مشابه هستند فاقد اختلاف معنی دار هستند ($p \leq ۰/۰۵$)

PPEA در دیگر تحقیقات نیز بیشترین خواص ضد میکروبی را نشان داده است. این عصاره رشد *B.subtilis* را به صورت ۱۰۰٪ متوقف کرده و رشد *B.cereus*، *S.aureus*، *E.coli* و *P.aeruginosa* را ۸۰٪ کاهش داده است و MIC[1]، PPEA بین ۲۰۰ppm یا کمتر بوده در حالی که MIC عصاره های آبی و متانولی به ترتیب از ٤۰۰ تا ۷۰۰ppm و ۲۵۰ تا ۵۰۰ppm تغییر کرده است [۲۷].

1. Minimum inhibitory concentration



شکل ۲ تأثیر PPE روی *A.acidoterrestris* در آب سیب طی ۲٤ روز، عصاره متانولی (a)، عصاره اتانولی (b) و عصاره استونی (c).

تحقیقات پیشین نیز نشان داده اند که خصوصیات ضد میکروبی عصاره های گیاهی با افزایش غلظت عصاره ها و میزانTP آنها افزایش می یابد [۲۷، ۳۸، ٤۱]. علاوه بر این نوع ترکیبات فنولی نیز بر روی خواص ضد میکروبی این ترکیبات موثر است به عنوان مثال، *A.acidoterrestris* به ترکیبات فنولی خنثی موجود در انگور قرمز حساس است در حالی که نسبت به ترکیبات فنولی اسیدی مانند رزوراترول، اسید فرولیک، اسید کوماریک، اسید هیدروکسی بنزوئیک و پروآنتوسیانیدین مقاوم است [٤، ۲٤].

۳- ۳- تأثیر PPE روی *A. acidoterrestris* در آب سیب

مطابق شکل ۲ در نمونه شاهد، تعداد سلول های زنده تا روز سوم افزایش می یابد، اما جمعیت نهایی به نسبت، کمتر از تحقیقات پیشین [٤۲] در روز سوم است. به نظر می رسد به خاطر مقدار فنول کل بالای آب سیب مورد استفاده در این مطالعه (GAE =۳۳۹±۲۳ µg/ml ،TP RE µg/ml ۹۹±۱۵=TFD و RE µg/ml ۸۹±۱۹=TFL) و سویه *A.acidoterrestris* مورد استفاده بوده است. توکودا (۲۰۰۷) پیشنهاد داده است که بالا بودن پلی فنول کل در انگور و سیب می تواند از رشد *Alicyclobacillus* ممانعت کند [٤۲].

فاز تأخیری *A.acidoterrestris* بین ۸ تا ۱۲ ساعت است[٦]؛ بنابراین جمعیت اولیه در ۸ ساعت اول در نمونه شاهد ثابت باقی مانده بود ولی جمعیت سلول های زنده در تمام غلظت های نمونه PPEA پس از ۸ ساعت در حدود یک سیکل لگاریتمی کاهش یافت این در حالی بود که در سایر نمونه ها چنین کاهشی مشاهده نشد (شکل ۲). همان طور که در جدول ۳ نشان داده شده است، گرچه بیشترین خصوصیات ضد *A.acidoterrestris* در آب سیب حاوی ۷۵۰µg/ml از PPEA مشاهده شده است ولی این نمونه هیچ اختلاف معنی داری($P \leq ۰/۰۵$) با دیگر نمونه ها ندارد، مگر با نمونه حاوی ۱۰۰۰µg/ml از PPEM.

عصاره های پوست انار دارای خواص آنتی اکسیدانی هستند [۲٦، ۲۷، ۳۰، ٤٤]، از سوی دیگر آنتی اکسیدان ها قادر به کاهش اکسیژن در دسترس می باشند [٤٥]. از آنجایی که برای رشد *A.acidoterrestris* در آب سیب و انگور حداقل ۰/۱٪ اکسیژن لازم است [٤٦]؛ بنابراین، احتمالاً کاهش نرخ رشد *A.acidoterrestris* به خاطر ترکیبات فنولی و خصوصیات آنتی اکسیدانیPPE و در نتیجه کاهش اکسیژن در دسترس در آب سیب بوده است. این در حالی است که تیم کوشنی و لمب (۲۰۰۵) پیشنهاد داده اند که خصوصیات ضدمیکروبی فلاونوئیدها مربوط به سه مکانیسم مقابل است: ۱) جلوگیری از سنتز اسیدهای نوکلئیک؛ ۲) جلوگیری از عملکرد غشاء سیتوپلاسمی؛ ۳)جلوگیری از متابولیسم انرژی [٤۳].

جدول ۳ بازدارندگی رشد *A.acidoterrestris* در غلظت های مختلف PPE در آب سیب.

حلال استخراج	غلظت عصاره پوست انار (µg/ml)	بازدارندگی رشد* (٪)
متانول	۲۵۰	۸۹/٤^{abc‡}
متانول	۵۰۰	۸۸/۵^{abc}
متانول	۷۵۰	۸۵/۱^{abcd}
متانول	۱۰۰۰	۷۸/۲^{d}
اتانول	۲۵۰	۸٦/۵^{abcd}
اتانول	۵۰۰	۹۰/۵^{ab}
اتانول	۷۵۰	۸۹/٤^{abc}
اتانول	۱۰۰۰	۹۱/٤^{ab}
استون	۲۵۰	۹٤/۷^{a}
استون	۵۰۰	۹٤/۸^{a}
استون	۷۵۰	۹۵/۳^{a}
استون	۱۰۰۰	۹۳/۰^{a}

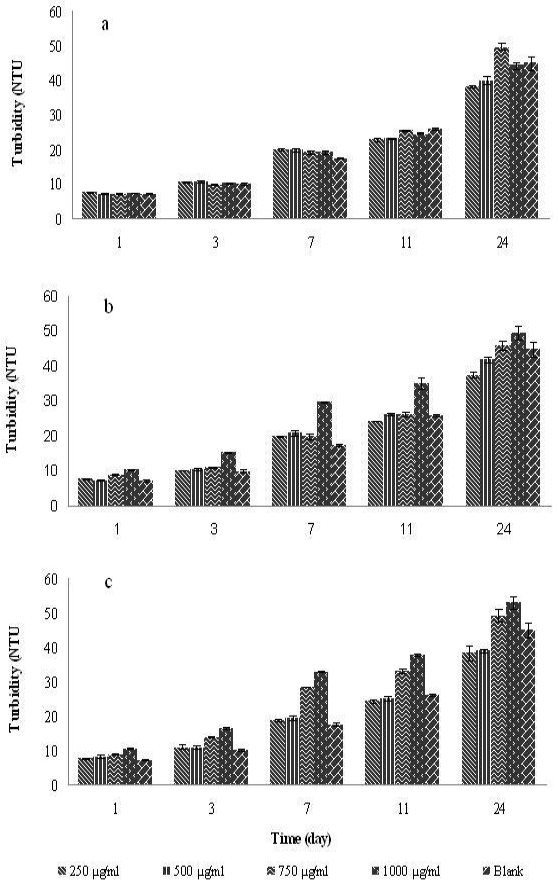
*)میانگین جمعیت *A.acidoterrestris* در طی ۲٤ روز در هر عصاره پوست انار و غلظت مربوط به آن به وسیله فرمول (٦)
‡)مقادیری که دارای حروف مشابه هستند فاقد اختلاف معنی دار هستند ($p \leq ۰/۰۵$)

۳-٤- کدورت آب سیب

خصوصیات ظاهری آب میوه نقش مهمی در خرید محصول توسط خریدار دارد [٤۷]. عصاره های گیاهی باعث ابری و کدر شدن آب میوه می شوند [۳۹] و این می تواند باعث کاهش مشتری پسندی آن شود.

کدورت آب سیب در تمام نمونه ها در طی مدت تحقیق افزایش یافته است (شکل ۳) و اختلاف معنی دار ($P \leq ۰/۰۵$) بین کدورت روز اول و روز های بعد وجود داشت (داده های مربوط به آن نشان داده نشده است).

عصاره استخراج شده به کمک قطبی ترین حلال (متانول) به نسبت عصاره استخراج شده با غیرقطبی ترین حلال (استون) بیشتر در آب حل شده است؛ از این رو احتمالا PPEA بیشترین اثر را روی کدورت نمونه های آب سیب داشته است (جدول ٤).



شکل ۳. تأثیر PPE بر کدورت آب سیب طی ۲٤ روز، عصاره متانولی (a)، عصاره اتانولی (b) و عصاره استونی (c).

اصلی ترین عامل تشکیل کدورت در آب میوه تشکیل برهم کنشهای پروتئین-پلی فنول است[٤۸]. براساس تجزیه شیمیایی PPE (جدول ۱)، PPEA

کمترین میزان نیتروژن را داشته است در حالی که بیشترین کدورت را نشان داده است؛ از سوی دیگر PPEAبیشترینTP، TFD و TFL را داشته است. در مقایسه با ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها (کاتکین ها و پروآنتوسیانیدین ها) بیشترین رابطه را با تشکیل کدورت در آب میوه دارند [٤۸].مقدار نیتروژن کل در PPEE و PPEM به طور چشمگیری بیشتر از نیتروژن کل PPEA است در حالی که کدورت آب سیب حاوی این دو عصاره بیشتر از PPEA است. بنابراین ممکن است تشکیل کمپلکس های پلی فنولی مهمترین عامل تشکیل کدورت در این نمونه ها باشند.

نتایج این تحقیق نشان داد که، در صورتی که استفاده از PPEA تأثیر نامطلوبی روی خصوصیات حسی آب سیب نداشته باشدو یا این اثرات ناچیز باشد؛ می تواند به عنوان یک عامل

ضد *A.acidoterrestris* در آب سیب مورد استفاده قرار گیرد. PPEA در مقایسه با سایرPPE، بیشترین خصوصیات ضد *A.acidoterrestris* را روی محیط کشت OSA و آب سیب از خود نشان داده است، ولی استفاده از آن در غلظت های بیش از ۱۰۰۰µg/ml می تواند منجر به افزایش کدورت آب سیب گردد (جدول ٤).

جدول ٤ کدورت آب سیب در غلظت های مختلف PPE.

حلال استخراج	غلظت عصاره پوست انار (µg/ml)	کدورت (NTU)*
متانول	۲۵۰	۱۹/۸۳^{a‡}
متانول	۵۰۰	۲۰/۱۵^{a}
متانول	۷۵۰	۲۲/۲۳^{abc}
متانول	۱۰۰۰	۲۱/۰٦^{ab}
اتانول	۲۵۰	۲۰/۰۳^{a}
اتانول	۵۰۰	۲۱/۳۸^{ab}
اتانول	۷۵۰	۲۲/٤۹^{abc}
اتانول	۱۰۰۰	۲۸/۱۱^{cd}
استون	۲۵۰	۱۹/۹۱^{a}
استون	۵۰۰	۲۰/٤٦^{ab}
استون	۷۵۰	۲٦/٦۵^{bcd}
استون	۱۰۰۰	۳۰/۰۵^{d}
شاهد		۲۱/۱۰^{ab}

*) میانگین کدورت آب سیب برمبنای NTU (Nephlometric Turbidity Unit) در طی ۲٤ روز در هر عصاره پوست انار و غلظت مربوط به آن

‡)مقادیری که دارای حروف مشابه هستند فاقد اختلاف معنی دار هستند ($p \leq ۰/۰۵$)

هر چند در تحقیقات زیادی به خصوصیات فراسودمند بسیار مفید PPE اشاره شده است[۲٦، ۲۷، ۲۸، ۲۹، ۳۰]؛ ولی تحقیقات جدید نشان داده است که PPE می تواند با غلظت موثر (ED_{50}) ٤/۷ و ٤٤/٤µg/ml به ترتیب باعث تحریک رشد سلول های Caco-2 و سلول های تک هسته ای پیرامونی خون[1] در محیط آزماشگاهی شود [٤٤]. از این رو پیشنهاد شده که استفاده از عصاره های پوست انار به عنوان یک آنتی اکیسدان طبیعی در غذا یا داروهای انسانی با احتیاط و با در نظر گرفتن مقدار مطلوب صورت بگیرد [٤٤]. به نظر می رسد در صورتی که تحقیقات درون پیکری بیانگر خواص سرطان زایی PPE نباشد؛ می توان از PPE به عنوان یک نگهدارنده طبیعی با خواص فراسودمند و خواص ضد *A.acidoterrestris* در آب سیب استفاده کرد. البته این منوط به نداشتن اثر نامطلوب عصاره برروی خواص حسی آب سیب است.

٤-تشکر و سپاس

نویسندگان این مقاله برخود وظیفه می دانند از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمالغرب و غرب ایران (تبریز) به خاطر حمایت فوق العاده از این پژوهش و از دانشگاه تبریز جهت اعطای کمک هزینه اجرای پایان نامه کارشناسی ارشد تشکر و قدردانی نمایند. وظیفه ما است از دکتر جایاپراکاشا از پژوهشکده مرکزی تحقیقات صنایع غذایی هند، دکتر تاری نژاد از دانشگاه تربیت معلم آدربایجان و مهندس پریسا جعفریان اصل برای پیشنهادات سازنده، تجزیه تحلیل های آماری و همکاری در اجرای این پژوهش کمال تشکر را داشته باشیم.

۵- منابع

[1]Pettipher, G L., Osmundson, M E. and Murphy, J M., 1997, Method for detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-concentrating drinks, Letters in Applied Microbiology, 24: 185-189.

[2]Jensen, N., and Whitfield, F. B., 2003, Role of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in the development of a disinfectant taint in shelf-stable fruit juice, Letters in Applied Microbiology, 36: 9–14.

[3]Chang, S., and Kang, D., 2004, *Alicyclobacillus spp.* in the Fruit Juice Industry: History, Characteristics, and Current Isolation/Detection Procedures, Critical Review in Microbiology, 30: 55-74.

[4]Splittstoesser, D.F., Churey, J.J., and Lee, C.Y., 1994, Growth characteristics of aciduric sporeforming bacilli isolated from fruit juice, Journal of Food Protection, 57: 1080-1083.

[5]Shahabi Ghahfarrokhi, I., Ghiasifar, S., 2007, Investigating *Alicyclobacillus acidoterrestris* population in produced apple juice in Iran. In 17th National Congress of Food Industrial in Iran, (140). Iran: Urmie University (Farsi).

1. Peripheral blood mononuclear cells

chlorine dioxide gas against *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores on apple surfaces, International journal of Food microbiology, 108: 364-368.

[17]Savas Bahceci, K., Gokmen, V., Serpen, A., and Acar, J., 2003, The effect of different technologies on *Alicyclobacillus acidoterrestris* during apple juice production, European Food Research Technology, 217: 249-252.

[18]Bevilacqua, A., Cibelli, F., Corbo, M.R., and Sinigaglia, M. 2007a, Effects of high pressure homogenization on the survival of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in a laboratory medium, Letters in Applied Microbiology, 45: 382–386.

[19]Alpas, H., Alma, L., and Bozoglue, F., 2003, Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* vegetative cells in model system, apple, orange and tomato juices by high hydrostatic pressure, World Journal of Microbiology and biotechnology, 19: 619-623.

[20]Nakauma, M., Saito, K., Katayama, T., Tada, M., and Todoriki, S, 2004, Radiation-heat synergism for inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in citrus juice, Journal of Food Protection, 67: 2538–2543.

[21]Ghanbarzadeh, B., 2000, Influence of Process temperature and storage temperature on produce of hydroxy methyl furfural in apple juice. MSc thesis of Food science and technology, Tehran University, Iran (Farsi).

[22]ISIRI, 1989, Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Standard 365 Apple juice – Specification (Farsi).

[23]Somogyi, L. P., 2005, Direct food additives in fruit processing: *Processing Fruits science and technology-2nd Ed*, D. M. Barrett, Somogyi, L and Ramaswamy, H. (eds) (USA: CRC press).

[24]Oita, S., and Kohyama, N., 2002, Antibacterial effect of grape polyphenols against thermoacidophilic bacteria *Alicyclobacillus acidoterrestris*, Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology, 49: 555-558.

[25]Shahabi Ghahfarrokhi, I., and Ghanbarzadeh, B., 2008, Review on pomegranate and its byproducts as functional food. In 2nd National Congress of Functional Food in Iran, (pp.49). Iran: Tarbiat Modaress University (Farsi).

[6]Silva, F.V. M., and Gibbs, P., 2001, *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit products and design of pasteurization processes, Trends in food science & Technology, 12: 68-74.

[7]Altieri, C., Bevilacqua, A., Cardillo, D., and Sinigaglia, M., 2006, Modeling *Alicyclobacillus acidoterrestris* under monolaurin action, Advances in Food Sciences, 28:94–99.

[8]Bevilacqua, A., Corbo, M.R., and Sinigaglia, M., 2007, Inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores by natural compounds, International Journal of Food Science & Technology, 1271-1275.

[9]Bevilacqua, A., Corbo, M.R., Buonocore, G.G., Del Nobile, M.A., and Sinigaglia, M., 2007, Antimicrobial effectiveness of lysozyme against *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Advances in Food Sciences, 29: 47–52.

[10]Komitopoulou, E., Boziaris, I. S., Davies, E. A., Delves-Broughton, J., and Adams, M. R., 1999, *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. International Journal of Food Science & Technology, 34: 81-85.

[11]Oita, S., 2002, Control of thermophilic *Alicyclobacillus acidoterrestris* by barley and wheat α- and β-thionins, Bull Nalt Agriculture Research center, 1: 49-59.

[12]Takahashi, T., Kokubo, R., and Sakaino, M., 2004, Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from Eucalyptus maculate, Letters in Applied Microbiology, 39: 60–64.

[13]Yamazaki, K., Murakami, M., Kawai, Y., Inoue, N., and Matsuda, T., 2000, Use of nisin for inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic drinks, Food Microbiology, 17: 315-320.

[14]Walker, M., and Phillips, C., 2007, The effect of Preservatives on *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Propionibacterium cyclohexanicum* in fruit juice, Food control, 19: 974-981.

[15]Lee, S.Y., Gray, P. M., Dougherty, R. H., and Kang, D.H., 2004, The use of chlorine dioxide to control *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in aqueous suspension and on apple, International journal of Food microbiology, 92: 121-127.

[16]Lee, S.Y., Dancer, G.I., Chang, S.S., Rhee, M.S., and Kang, D.H., 2006, Efficacy of

[26]Negi, P.S., Jayaprakasha, G. K, and Jena, B. S., 2003, Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts, Food chemistry, 80: 393-397.

[27]Negi, P.S., and Jayaprakasha, G.K., 2003, Antioxidant and antibacterial activities of *punica granatum* peel extract. Journal of food science, 68: 1473-1477.

[28]Bragaa, L.C., Shupp, J. W., Cummings, C., Jett, B., Takahashi, J. A., Carmod, L. S., Chartone-Souza. E., and Nascimento, A. M. A., 2005, Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production, Journal of Ethnopharmacology, 96: 335–339.

[29]Singh, R.P., Chidambara Murthy, K.N., and Jayaprakasha, G.K., 2002, Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models, Journal of agricultural and food chemistry, 50: 81-86.

[30]Li, Y., Gue, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., and Cheng, S., 2006, Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract, Food chemistry, 96: 254-260.

[31]Singleton, V. L., and Rossi, J. R., 1965, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungestic acid reagent, American Journal of Enology and viticulture, 16: 144-158.

[32]Pourmorad, F., Hosseinimehr, S. J, and Shahabimajd, N., 2006, Antioxidant activity phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants, African Journal Biotechnology, 5: 1142-1145.

[33]Loziene, K., Venskutonis, P.R., Sipailiene, A., and Labokas, J, 2006, Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes, Food chemistry, 103, 546-559.

[34]Filipe-Ribeiro, L., and Mendes-Faia, A., 2007, Validation and comparison of analytical methods used to evaluate the nitrogen status of grape juice, Food chemistry, 100: 1272-1277.

[35]ISIRI, 2008, Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Standard 2685 Fruit juices – Test methods (Farsi).

[36]ISIRI, 2008, Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Standard 9799 Microbiology of fruit juice and its products- The enumeration method of *Alicyclobacillus* sp (Farsi).

[37]Chang, S., and Kang, D-H., 2005, Development of novel *Alicyclobacillus spp.* isolation medium. Journal of applied microbiology, 99: 1051-1060.

[37]Jayaprakash, G.K., Tamil, S., and Sakariah, K. K., 2003, Antibacterial and antioxidant activities of grape *(Vitis vinifera)* seed extracts, Food research international, 36: 117-122.

[38]Whitehead, J., 2005, Functional drinks containing herbal extracts: *The chemistry and technology of soft drinks and fruit juices-2nd Ed*, Ashurst, P.R. (ed) (London: Blackwell publishing Ltd) (pp. 313-314).

[39]Li, Y., Gue, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., and Cheng, S., 2006, Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract, Food chemistry, 96: 254-260.

[40]Baydar, N. G., Ozkan, G., and Sagdic, O., 2004, Total phenolic content and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts, Food control, 15: 335-339.

[41]Tokuda, H., 2007, Growth profile of *Alicyclobacillus* in fruit juices*: Alicyclobacillus Thermophilic Acidophilic Bacilli*, Yokota, T., Fujii, K., and Goto, K. (eds) (Japan: Springer), (pp. 93-94).

[42]Tim Cushnie, T.P., and Lamb, A.J., 2005, Antimicrobial activity of flavonoids, International journal of antimicrobial agents, 26: 343-356.

[43]Okonogi, S., Duangrat, C., Anuchpreeda, S., Tachakittirungrod, S., and Chowwanapoonpohn, S., 2007, Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels, Food chemistry, 103: 839-846.

[44]Shahidi, F., and Naczk, M., 2004. Phenolics in food and nutraceuticals, CRC press.

[45]Cerny, G., Duong, H A., Hennlich, W., and Miller, S., 2000, *Alicyclobacillus acidoterrestris*: influence of oxygen content on growth in fruit juices, Food Australia, 52: 289-291.

[46]Lozano, J E., 2006, *Fruit manufacturing scientific basic, engineering properties and deteriorative reactions of technological importance*, (USA: Springer), pp.99.

[47]Siebert, K J, 2006, Haze formation in beverages, LWT, 39: 987-994.

Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice by pomegranate peel extracts

Shahabi Ghahfarrokhi, I. [1], Hejazi, M. A. [2 *], Ahmadi Zonooz, A. [3], Ghanbarzadeh, B. [3], Aiaseh, A. [4]

1-MSc Student of Food science and technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz.
2-Assistant Professor of Agriculture Biotechnology Research Institute of Tabriz.
3-Associate Professor of the Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz.
4-Instructor of the Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz.
(Received:88/6/24 Accepted:89/2/5)

Alicyclobacillus acidoterrestris has recently obtained great attention in fruit juice industry due to its high resistance to juice pasteurization. Several methods for inhibition of this bacterium have been proposed. Pomegranate peel, as a byproduct of fruit juice factories, has antibacterial and functional properties. Pomegranate peel extracts containing effective compounds were extracted by methanol (MeOH), ethanol (EtOH) and acetone. In comparison within different extracts, pomegranate peel extracted by acetone (PPEA) had the highest content of phenolic, flavonoid and flavonol contents, (i.e. 226, 70 and 61 mg/g, respectively). Furthermore, 250µg/ml PPEA showed strong anti-Alicyclobacillus acidoterrestris property on orange serum agar and apple juice without any side effects on apple juice turbidity. The extracts obtained by EtOH and acetone during 24 days showed side effects on apple juice turbidity in 1000 µg/ml but the extracts obtained by MeOH did not affect apple juice turbidity at the same time.

Keyword: *Alicyclobacillus acidoterrestris*; Antimicrobial properties; Apple juice; Pomegranate peel extract; Turbidity.

* Corresponding Author E-Mail address: Aminhejazi@abrii.ac.ir