اثر ضد میکروبی اسانس بهار نارنج بر تعدادی از ریزاندامگان بیماری‌زا با منشاء غذایی و تعیین ترکیبات شیمیایی، فنل کل، فلاونوئید و پتانسیل آنتی‌اکسیدانی آن

بهروز علیزاده بهبهانی[1]، فرشته فلاح[2]، علیرضا وسیعی[3]، فریده طباطبایی یزدی[4*]، سیدعلی مرتضوی[4]

1- استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

2- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

3- دانشجوی دکتری، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

4- استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

(تاریخ دریافت: 97/11/27 تاریخ پذیرش: 98/01/18)

چکیده

در این پژوهش،فعالیت ضدمیکروبی اسانس بهار نارنج بر ریزاندامگان بیماری‌زای *باسیلوس سرئوس*، *لیستریا اینوکوا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی*، *سودوموناسائروژینوزا*، *سالمونلا تیفی* و *کاندیدا آلبیکنس* بررسی شد. ترکیبات شیمیایی، فنل، فلاونوئید کل و پتانسیل آنتی‌اکسیدانیاسانس بهار نارنج نیز تعیین گردید. نتایج آزمون‌های فیتوشیمیایی Ferric chloride و Shinodaوجود ترکیبات فنلی، فلاونوئید و فلاونی در اسانس بهار نارنج را تایید نمود. براساس نتایج آنالیز کروماتوگرافی گازی 14 ترکیب در اسانس بهار نارنج شناسایی شد. Linalool با 21/29 درصد ترکیب اصلی اسانس بهار نارنج بود.میزان فنل وفلاونوئید کل در اسانس بهار نارنج به ترتیب برابر با 0/46± 41/35 میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک و 0/50± 2/98 میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک بود.فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس بهار نارنج با روش کاهش ظرفیت رادیکالی وبتاکاروتنلینوئیک اسید به ترتیب برابر با 0/60± 102/85 میکروگرم بر میلی‌لیتر و65/60%بود. بیشترین و کم‌ترین هاله عدم رشد در غلظت 45 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب برای باکتری‌های*لیستریا اینوکواو سالمونلا تیفی*با قطر 0/66± 16/50 و0/43± 9/80 میلی‌متر مشاهده شد. رنج غلظت بازدارندگی از رشد اسانس بهار نارنج برای ریزاندامگان بیماری‌زا 3/125 تا 100 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.رنج حداقل غلظت کشندگی اسانس بهار نارنج 3/125 تا 200 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. براساس نتایج این پژوهش مشخص گردید که اسانس بهار نارنج دارای فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی مناسبی در برابر ریزاندامگان بیماری‌زا بوده، لذا می‌توان از آن در محصولات غذایی بهره برد.

کلید واژگان: بهار نارنج، ریزاندامگان بیماری‌زا، میکرودایلوشن براث، آزمون‌های فیتوشیمیایی.

*مسئول مکاتبات: tabatabai@um.ac.ir

1- مقدمه

با وجود پیشرفت‌های اخیر در حوزه صنعت غذا و استفاده از روش‌های جدید و نوین جهت افزایش عمر ماندگاری محصولات غذایی، همچنان امنیت و بهداشتی بودن محصولات غذایی از نظر آلودگی‌های میکروبی (ریزاندامگان عامل عفونت و مسمومیت غذایی) مشکل مهم و حائز اهمیتی است که توجه سازمان‌های نظارتی و استاندارد، تولیدکنندگان و مصرف‌کنندگان مواد غذایی را به خود معطوف کرده است[1 و 2].

بیماری‌های ناشی از عفونت و مسمومیت غذایی در اثر مصرف غذاهای آلوده به ریزاندامگان بیماری‌زا چنان وسیع می‌باشد که طبق گزارش‌های سازمان بهداشت جهانی[1] (WHO) سالیانه حدود 30 درصد مردم را در کشورهای پیشرفته درگیر کرده است. علاوه بر پیامدهای نامطلوب حاصل از فساد میکروبی محصولات غذایی بر سلامت انسان‌ها، زیان‌های اقتصادی ناشی از آن را نیز نمی‌توان از نظر دور داشت. با افزایش آگاهی مصرف‌کنندگان مواد غذایی از عوارض استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی بر سلامت انسان‌ها (باقی ماندن برخی از مواد شیمیایی با به وجود آمدن سرطان ارتباط مستقیمی دارد)، علاقمندی مصرف‌کنندگان در استفاده از مواد نگهدارنده طبیعی به ویژه اسانس‌های گیاهی روز به روز در حال افزایش است[3 و 4].

از نظر تعداد، پوشش و تنوع گیاهی کشور ایران از محدود کشورهایی در سطح جهان می‌باشد که دارایمنابع گسترده و بی-نظیریاست. استفاده از گیاهان دارویی جهت پیشگیری و درمان بیماری‌ها قدمتی به اندازه طول عمر بشر دارد. استفاده از گیاهان دارویی در طب سنتی ایران نیز یکی از غنی‌ترین و پر سابقه‌ترین طب‌های سنتی در جهان به حساب می‌آید. با وجود تاریخی پر افتخار و درخشان در کشور ایران در زمینه طب سنتی وحضور دانشمندانی پرآوازو نام آشنایی هم چون ابن سینا، اسماعیل جرجانی و زکریای رازی که خدمات فراوانی به طب سنتی کرده-اند، امروزه توجه کمی در زمینه استفاده از گیاهان دارویی در طب سنتی وجود دارد. بنابراین مطالعه روی گیاهان دارویی که در مناطق مختلف جهت درمان بیماری‌ها استفاده می‌گردد و بررسی‌های مختلف در شرایط آزمایشگاهی و بالینی یکی از راه کارهای مناسبی استکه می‌توان در این راستا انجام داد [5 و 6].

پژوهش‌های متعددی نشان می‌دهد که استفاده از گیاهان و مشتقات آن‌ها با سازوکارهای مختلفی همانند توقف در سنتز پپتیدوگلیکان، آسیب به ساختمان غشایی و یا تغییر در هیدروفوبیسیته غشا سبب آسیب رساندن به ریزاندامگان بیماری‌زا و در نهایت از بین رفتن آن‌ها می‌گردند. از آنجایی که ریزاندامگان بیماری‌زا به دلیل استفاده بیش از حد و بدون تجویز پزشک روز به روز در برابر آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی مقاوم می‌گردند یافتن ترکیبات ضدمیکروبی جدید و طبیعی لازم و ضروری به نظر می‌رسد[7].

بهار نارنج با نام علمی*Citrus aurantium* از خانواده مرکبات و بومی ایران است. بهارنارنج از جمله گیاهان دارویی که در طب سنتی ایران به عنوان ضدعفونی کننده، ضدسرفه، ضدنفخ، التیام زخم، محرک سیستم ایمنی، تقویت کننده معده، درمان فراموشی، درمان اضطراب و ضدالتهاب استفاده می‌شود. این گیاه عمدتا در استان‌های گیلان، مازندران، گلستان، کرمان، فارس و خوزستان یافت می‌شود. گیاه نارنج حاوی اسانس روغنی است که سرشار از ترکیبات فنلی است[8 و 9].با توجه به معطر بودن گیاه بهار نارنج از بخش‌های مختلف گیاه می‌توان اسانس استخراج نمود.

به طور کلی اهداف این پژوهش شامل:

- ✓ شناسایی ترکیبات شمیایی اسانس بهار نارنج با دستگاه کروماتوگراف گازی متصل به طیف سنجی جرمی؛
- ✓ اندازه‌گیری پتانسیل آنتی‌اکسیدانی اسانس بهار نارنجبا روش‌های بتاکاروتنلینوئیک اسید و کاهش ظرفیت رادیکالی؛
- ✓ سنجش فنل کل و فلاونوئید اسانس بهار نارنج با روش‌های رنگ سنجی؛
- ✓ ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی اسانس بهار نارنج با روش‌های چاهک آگار، میکرودایلوشن براث (حداقل غلظت بازدارندگی از رشد) و حداقل غلظت کشندگی بر تعدادی از ریزاندامگان بیماری‌زا با منشاء غذایی (*باسیلوس سرئوس، لیستریا اینوکوا، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی، سودوموناسائروژینوزا، سالمونلا تیفی* و *کاندیدا آلبیکنس*) بود.

1. World Health Organization

2- مواد و روش‌ها

2-1- تهیه مواد شیمیایی و میکروبی

این پژوهش تجربی در 2 فاز، شامل آنالیزهای شیمیایی و میکروبیولوژیکی اسانس بهار نارنج در سال 1397 در دانشگاه فردوسی مشهد انجام پذیرفت. بخش مربوط به آنالیزهای شیمیایی شامل شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس بهار نارنج در آزمایشگاه بیوپالایش زیست محیطی (دانشکده علوم) و سایر آزمون‌های شیمیایی و میکروبیولوژی در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی صنعتی و فناوری‌های نوین (دانشکده کشاورزی)، انجام پذیرفت. مواد شیمیایی و محیط‌های کشت میکروبی شامل: استات پتاسیم، معرف فولین سیوکالتو، کلرید آلومینیوم، الکل 96 درصد، بتاکاروتن، سولفات سدیم، توئین 80، معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید،کلروفرم، 2 و 2 دی فنیل - 1- پیکریل هیدرازیل، دی متیل سولفوکساید، اسید سولفوریک، لینوئیک اسید، کلرید باریم، نوترینت براث، مولر هینتون براث، مولر هینتون آگار، پوتیتو دکستروز براث وپوتیتو دکستروز آگار با گرید آزمایشگاهی (مرک آلمان و سیگما آلدریچ آمریکا) از شرکت نوآوران زیستی پارسه مشهد خریداری شدند.

2-2- تهیه و مراحل استخراج اسانس از گیاه بهار نارنج

پس از تهیه گیاه و تایید اسم علمی، گیاه بهار نارنج با استفاده از کلونجر و روش تقطیر با آب اسانس‌گیری شد (3 ساعت عمل اسانس‌گیری). اسانس تهیه شده با سولفات سدیم آبگیری گردید. در نهایت اسانس بهار نارنج در شیشه تیره رنگ استریل به آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی منتقل گردید. اسانس بهار نارنج تا زمان انجام آزمون‌های میکروبیولوژی و شیمیایی، در یخچال (دمای 4 درجه سانتی‌گراد)نگهداری شد[10].

2-3- آنالیزهای شیمیایی

2-3-1- تعیین ترکیبات فیتوشیمیایی (فنل، فلاون و فلاونوئید) اسانس بهار نارنج با روش‌های کیفی

ترکیبات فیتوشیمیایی اسانس بهار نارنج با روش‌های کیفی Ferric chloride(فنل) و Shinoda (فلاون و فلاونوئید) تعیین گردید. به طور خلاصه در آزمون Ferric chloride، 2 میلی‌لیتر از محلول 5 درصد کلرید آهن به اسانس بهار نارنج اضافه شد. تشکیل رنگ آبی و سبز نشان دهنده حضور ترکیبات فنلی بود. جهت انجام آزمون Shinoda برای تایید حضور فلاون و فلاونوئید در اسانس بهار نارنج، 4 میلی‌لیتر متانول 50 درصد به همراه 2 قطره از اسید کلریدریک اسید به اسانس بهار نارنج اضافه شد. رنگ قرمز نشان دهنده ترکیبات فلاونوئیدی و رنگ نارنجی تایید کننده ترکیباتی فلاونی در اسانس می‌باشد[11].

2-3-2- تعیین فنل کل اسانس بهار نارنج

فنل کل اسانس بهار نارنج با استفاده از معرف فولین-سیوکالتو و مطابق با روش تاجیک و همکاران (1396)، با اندکی تغییر انجام شد. در این روش 0/5 از اسانس بهار نارنج با 2/5 میلی‌لیتر معرف 10 درصد فولین اضافه گردید و به مدت 10 دقیقه در دمای اتاق (25 درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد. 2 میلی‌لیتر کربنات سدیم به مخلوط اضافه شد و پس از طی زمان 90 دقیقه جذب نمونه اسانس در طول موج 765 نانومتر خوانده شد. مقدار فنل کل اسانس بهار نارنج براساس میلی‌گرم گالیک اسید در گرم گزارش گردید[12].

2-3-3- تعیین فلاونوئید اسانس بهار نارنج

تعیین فلاونوئید کل اسانس بهار نارنج از روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم مطابق با روش چانگ و همکاران (2002)، انجام گردید. به طور خلاصه در این روش 0/5 میلی‌لیتر از اسانس بهار نارنج با 100 میکرولیتر استات پتاسیم مخلوط شده و پس از گذشت 5 دقیقه به آن 100 میکرولیتر کلرید آلومینیوم 10 درصد اضافه شد. در انتها 1/5 میلی‌لیتر متانول 80 درصد و 2/8 میلی‌لیتر آب مقطر به محلول اضافه گردیده و پس از گذشت 30 دقیقه جذب آن در طول موج 415 نانومتر خوانده شد. مقدار فلاونوئید اسانس ترنج بر حسب میلی‌گرم روتین بر گرم وزن خشک گزارش گردید[13].

2-3-4- تعیین پتانسیل آنتی‌اکسیدانی اسانس بهار نارنج

برای اندازه‌گیری پتانسیل آنتی‌اکسیدانی اسانس بهار نارنج از 2 روش ارزیابی میزان مهار رادیکال آزاد با 2 و 2 دی فنیل - 1- پیکریل هیدرازیل و سنجش بتاکاروتنلینولئیک اسید استفاده شد. ارزیابی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی اسانس بهار نارنج به روش میزان

مهار رادیکال مطابق با روش کارتال و همکاران (2007)، انجام شد. در این روش 1 میلی‌لیتر از اسانس بهار نارنج با 1 میلی‌لیتر از محلول رادیکال دی فنیل پیکریل هیدرازیل 0/2 mM در اتانول 95 درصد مخلوط شد. پس از گذشت 30 دقیقه، جذب آن در 517 نانومتر اندازه‌گیریشد. برای تهیه نمونه کنترل، به جای اسانس بهار نارنج از آب مقطر استفاده شد. درصد مهارکنندگی رادیکال نمونه‌اسانس بهار نارنجبا توجه بهمعادله 1، محاسبه شد:

$$\text{DPPH-RS activity (\%)} = [1-A_s/A_c] \times 100 \quad \text{(معادله 1)}$$

در این فرمول A_s جذب نمونه و A_c جذب نمونه‌ی کنترل می‌باشد. از محلول اتانول 95 درصد به عنوان شاهد جهت صفر کردن دستگاه اسپکتروفوتومتر استفاده شد [14].

فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس بهار نارنج به روش بتاکاروتنلینولئیک اسید مطابق با مطالعه داپکیویکوس (1998)، انجام شد. در این روش فعالیت آنتی‌اکسیدانی با میزان مهار اکسیداسیون لینولئیک اسید و جلوگیری از ایجاد ترکیبات فرار و هیدروپراکسیدهای کونژوگه مورد ارزیابی قرار می‌گیرد [15].

2-3-5- شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس بهار نارنج

از دستگاه کروماتوگراف گازی متصل به طیف سنجی جرمی مدل Finnigant Trace Ms(شرکت سازنده: Thermo) موجود در آزمایشگاه بیوپالایش زیست محیطی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد برای شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس بهار نارنج استفاده شد. شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس بهار نارنج طبق روش الوزه و همکاران (2012)، انجام گردید[16].

2-4- آزمون‌های میکروبی

2-4-1- فعال‌سازی ریزاندامگان بیماری‌زا با منشاء غذایی و تهیه استاندارد مک فارلند

از 7 سویه میکروبی استاندارد شامل *باسیلوس سرئوس*، *لیستریا اینوکوا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی*، *سودوموناسائروژینوزا*، *سالمونلا تیفی* و *کاندیدا آلبیکنس* موجود در آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی (دانشکده کشاورزی) استفاده گردید. فعال‌سازی و تهیه سوسپانسیون میکروبی استاندارد از ریزاندامگان بیماری‌زا با منشاء غذایی، مطابق با روش طالبیورنوسفادرانی و همکاران (1396)، انجام پذیرفت[17]. سوسپانسون میکروبی مطابق با استاندارد نیم مک فارلند ($1/5 \times 10^8$Colony Forming Unit/mL) از ریزاندامگان بیماری‌زا با منشاء غذایی تهیه شد.

2-4-2-چاهک آگار

در روش چاهک آگار، چاهک‌هایی به قطر 6 میلی‌متر با فاصله 20 میلی‌متر توسط انتهای پی‌پیت پاستور بر سطح محیط‌های کشت مولر هینتون آگار و پوتیتو دکستروز آگار ایجاد شد. ته چاهک‌ها به وسیله محیط کشت آگار بسته شد. درون هر یک از چاهک میزان 20 میکرولیتر از غلظت‌های 15، 25، 35 و 45 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسانس بهار نارنج که توسط فیلتر سرسرنگی (0/22 میکرونی) استریل شده بود به آرامی ریخته شد. برای هر یک از ریزاندامگان بیماری‌زا با منشا غذایی مطابق با سوسپانسیون نیم مک‌فارلند کشت چمنی انجام پذیرفت. پلیت‌ها برای رشد به گرمخانه با دمای 37 (برای باکتری‌ها) و 25 (برای قارچ) درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از طی زمان 24 و 72 ساعت به ترتیب برای سویه‌های باکتریایی و قارچی، قطر هاله‌های عدم رشد بر حسب میلی‌متر توسط خط‌کش اندازه‌گیری و گزارش شد[18].

2-4-3- میکرودایلوشن براث (حداقل غلظت بازدارندگی از رشد)

در این روش ابتدا یک استوک مادر با غلظت 200 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (2 گرم اسانس بهار نارنج در 10 میلی‌لیتر) تهیه گردید. از استوک تهیه شده غلظت‌های متوالی 100، 50، 25، 12/5، 6/25، 3/125، 1/562 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه و به میزان 100 میکرولیتر از غلظت‌های اسانس به درون میکروپلیت 96 خانه‌ای ریخته شد. به هریک از چاهک‌های میکروپلیت 10 میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی استاندارد تلقیح شد.میکروپلیت‌های 96 خانه‌ای برای رشد به گرمخانه با دمای 37 (برای باکتری‌ها) و 25

(برای قارچ) درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از طی زمان 24 و 72 ساعت به ترتیب برای سویه‌های باکتریایی و قارچی، 20 میکرولیتر معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید 5 درصد، به چاهک‌های میکروپلیت 96 خانه‌ای اضافه شد. چناچه اسانس بهار نارنج توانسته باشد از رشد سویه میکروبی جلوگیری کند رنگ قرمز ارغوانی یا صورتی تشکیل نمی‌شود. اولین غلظتی که در آن تغییر رنگ مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد تعیین شد[10].

2-4-4-حداقل غلظت کشندگی

برای تعیین حداقل غلظت کشندگی اسانس بهار نارنجاز چاهک-های میکروپلیت 96 خانه‌ای که در آن تغییر رنگی مشاهده نشد، 10 میکرولیتر در شرایط استریل برداشته و بر سطح محیط کشت مولر هینتون آگار (برای باکتری‌ها) و پوتیتو دکستروز آگار (برای قارچ) کشت انجام گردید. پلیت‌ها برای رشد به گرمخانه با دمای 37 (برای باکتری‌ها) و 25 (برای قارچ) درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از طی زمان 24 و 72 ساعت به ترتیب برای سویه‌های باکتریایی و قارچی، پلیت‌های میکروبی از نظر رشد مورد بررسی قرار گرفت. اولین پلیتی از غلظت‌های کشت شده از اسانس بهار نارنج که در آن کلنی مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش شد[10].

2-5- طرح آماری

داده‌های حاصل، به روش آنالیز واریانس یک طرفه، با استفاده از SPSS (Version18.0, SPSS Inc., Chicago, USA)مورد آنالیز قرار گرفت. برای مقایسه میانگین‌ها از روش چند دامنه‌ای دانکندر سطح احتمال 5% استفاده شد. تمامی آزمون-ها در 3 مرتبه یا بیشتر تکرار گردید.

3- نتایج و بحث

نتایج استخراج اسانس روغنی از گیاه بهار نارنج نشان داد که پس از 3 ساعت تقطیر با آب در دستگاه کلونجر میزان اسانس استخراج شده برابر با 0/65 درصد وزنی/وزنی بود. نتایج آزمون شناسایی کیفی ترکیبات فیتوشیمیایی اسانس بهار نارنج در جدول 1، نشان داده شده است. نتایج آزمون‌های فیتوشیمیایی Ferric chlorideو Shinodaوجود ترکیبات فنلی، فلاونوئید و فلاونی در اسانس بهار نارنج را تایید کرد. نتایج اندازه‌گیری ترکیبات فنل کل و فلاوونوئید اسانس بهار نارنج در جدول 1، آورده شده است. نتایج نشان داد که، براساس آزمون فولین-سیوکالتو میزان فنل شناسایی شده در اسانس بهار نارنج برابر با 0/46± 41/35 میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشکبود. میزان فلاونوئید کل شناسایی شده اسانس بهار نارنج با روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم برابر با 0/50± 2/98 میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک بود. نتایج اندازه‌گیری پتانسیل آنتی‌اکسیدانی اسانس بهار نارنج به روش‌های بتاکاروتنلینوئیک اسید و کاهش ظرفیت رادیکالی در جدول 1، نشان داده شده است. نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس بهار نارنج با روشکاهش ظرفیت رادیکالیبر حسب IC_{50} برابر با 0/60± 102/85 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس بهار نارنج به روش بتاکاروتنلینوئیک اسید و بر حسب میزان درصد مهار اکسیداسیون برابر با 65/60% بود.نتایج آزمون شناسایی اجزای تشکیلاسانس بهار نارنج با دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی در جدول 2، آورده شده است. نتایج نشان داد که، 14 ترکیب در اسانس گیاه بهار نارنج وجود دارد و این ترکیبات در مجموع، 100 درصد کل اجزای اسانس را تشکیل داد. در شکل 1، کروماتوگرام شناسایی اجزای تشکیل دهنده اسانس بهار نارنج نشان داده شده است. نتایج نشان داد که، ترکیب اصلی اسانس بهار نارنج، Linalool با مقدار 21/29 درصد بود. سایر ترکیبات اصلیشامل Linalyl anthranilate(20 %)، D-limonene (12/48 %)، E-nerolidol (10/31 %)، Famesol (8/61 %)، Geranyl acetate(6/44 %) و β-pinene(5/35 %) بود.

Table 1 Phytochemical analysis, total phenolic content, total flavonoids content and antioxidant activity of the *Citrus aurantium*essential oil

Chemical	Verification method	Observation	Occurrence
Flavonols	Shinoda test	Orange color	+
Flavonoids	Shinoda test	Red solution	+
Phenolics	Ferric chloride	Green-bluish	++
IC_{50}	-	-	102.85 ±0.60 µg/ml
ß-CL	-	-	65.60%
TPC	-	-	41.35 ±0.46mg GAE/g DM
TFC	-	-	2.98 ±0.50mg QE/g DM
BHT	-	-	14.45 ±0.35 µg/ml
Control	-	-	0

+present in small concentrations; ++present in moderately high concentrations; IC_{50}, the half maximal inhibitory concentration; ß –CL, β-carotene linoleic acid; TPC, total phenolic content; TFC, total flavonoids content;BHT, butylated hydroxyl toluene;GAE, gallic acid equivalents; QE, Qercetin equivalents; DM, dry matter.

Table 2. Chemical compositions of the *Citrus aurantium* essential oil

NO	Compound	Retention time (min)	%
1	1R-α-pinene	6.74	0.55
2	Sabinen	7.62	1.11
3	β-pinene	7.87	5.35
4	D-limonene	9.26	12.48
5	β-ocimene	9.56	4.32
6	Linalool	11.55	21.29
7	α-terpineol	15.09	2.01
8	Linalyl anthranilate	17.22	20
9	Nerol acetate	21.54	3.66
10	Geranyl acetate	22.41	6.44
11	Caryophyllene	24.40	2.21
12	E-nerolidol	29.92	10.31
13	Famesol	35.71	8.61
14	Famesol acetate	39.67	1.66
	Total		100

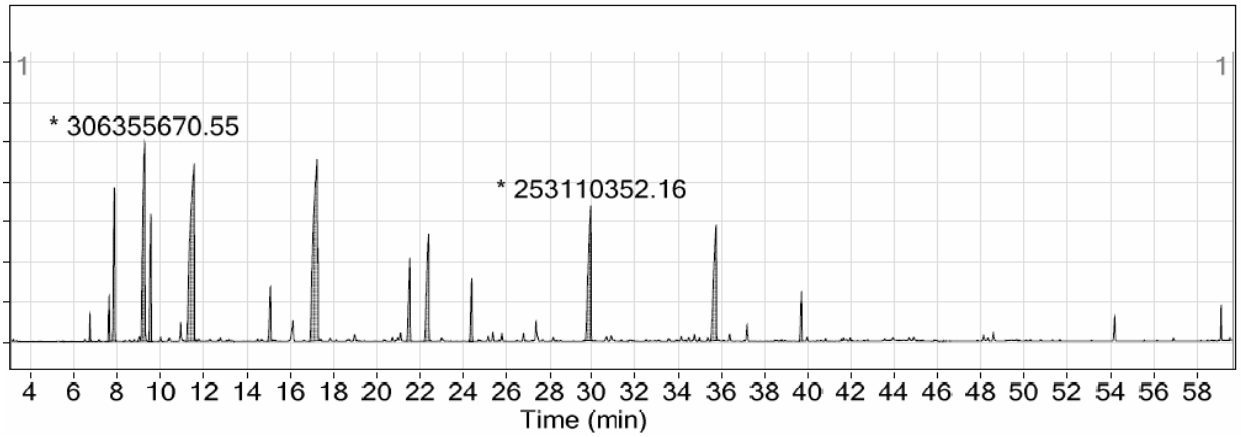

Fig 1 The chromatogram of the *Citrus aurantium* essential oil.

نتایج ارزیابی اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی اسانس بهار نارنج به روش چاهک آگار بر سویه‌های بیماری‌زا با منشاءغذایی در جدول 3، آورده شده است. همانگونه که در جدول 3، مشخص است اثر ضدمیکروبی اسانس بهار نارنج بر سویه‌های گرم مثبت *باسیلوس سرئوس*، *لیستریا اینوکوا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در مقایسه با سویه‌های گرم منفی *اشرشیا کلی*، *سودوموناسائروژینوزا* و *سالمونلا تیفی*بیشتر بود.نتایج نشان داد قطر هاله بازدارندگی اسانس بهار نارنج با افزایش غلظت از 15 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تا 45 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر افزایش یافت. بیشترین قطر عدم رشد در غلظت 45 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای باکتری *لیستریا اینوکوا* با قطر هاله0/66± 16/50 میلی‌متر مشاهده شد. کم‌ترین قطر هاله عدم رشد نیز در غلظت 45 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مربوط به باکتری *سالمونلا تیفی*0/43± 9/80 مشاهده گردید. در شکل 2، نمایی از قطر هاله بازدارندگی اسانس نارنج بر سویه‌های *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داده شده است. نتایج آماری آزمون چاهک آگار نشان داد که، میان تمامی غلظت‌های مورد بررسی برای سویه‌های *سودوموناس ائروژینوزا*، *سالمونلا تیفی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا اینوکوا* در سطح 5 درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد. نتایج نشان داد که میان غلظت-های 25 و 35 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، 15 و 25 میلی‌گرم بر میلی-لیتر و همچنین غلظت‌های 35 و 45 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای *اشرشیا کلی*، *باسیلوس سرئوس* و *کاندیدا آلبیکنس* اختلاف معنی‌داری در سطح 5 درصد مشاهده نشد. نتایج حداقل غلظت بازدارندگی از رشد اسانس بهار نارنج بر سویه‌های بیماری‌زا با منشاء غذایی در جدول 4، نشان داده شده است. نتایج نشان داد که حداقل غلظت بازدارندگی از رشد اسانس بهار نارنج برای سویه‌های *باسیلوس سرئوس*، *لیستریا اینوکوا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی*، *سودوموناسائروژینوزا*، *سالمونلا تیفی* و *کاندیدا آلبیکنس* به ترتیب 25، 3/125، 6/25، 50، 50، 100 و 25 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در شکل 3، نمایی از حداقل غلظت بازدارندگی از رشد اسانس بهار نارنج به روش میکرودایلوشن براث بر سویه‌های بیماری‌زا مورد بررسی در پژوهش حاضر نشان داده شده است. نتایج حداقل غلظت کشندگی اسانس بهار نارنج بر سویه‌های بیماری‌زا در جدول 4، آورده شده است. نتایج نشان داد که حداقل غلظت کشندگی اسانس بهار نارنج برابر یا بزرگتر از حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس بهار نارنج بود، به طوریکه حداقل غلظت کشندگی اسانس بهار نارنج برای سویه های *باسیلوس سرئوس*، *لیستریا اینوکوا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی*، *سودوموناسائروژینوزا*، *سالمونلا تیفی* و *کاندیدا آلبیکنس* به ترتیب 50، 3/125، 12/5، 100، 100، 200 و 50 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

Table 3 Mean inhibition zone diameters (mm) of *Citrus aurantium* essential oil on some food-borne pathogens by well diffusion agar (WDA)method

Concentration Microorganism	15 mg/ml	25 mg/ml	35 mg/ml	45 mg/ml
Pseudomonas aeruginosa	-	-	7.00 ±0.59[a]	10.20 ±0.25[b]
Escherichia coli	-	7.00 ±0.59[a]	8.10 ±0.43[a]	11.00 ±0.64[b]
Salmonella typhi	-	-	7.10 ±0.58[a]	9.80 ±0.43[b]
Bacillus cereus	7.60 ±0.70[a]	8.80 ±0.66[a]	12.00 ±0.50[b]	14.10 ±0.85[c]
Staphylococcus aureus	7.00 ±0.50[a]	8.90 ±0.50[b]	13.20 ±0.35[c]	15.90 ±0.50[d]
Listeria innocua	8.80 ±0.55[a]	11.50 ±0.50[b]	14.40 ±0.65[c]	16.80 ±0.85[d]
Candida albicans	7.00 ±0.50[a]	9.20 ±0.50[b]	11.60 ±0.50[c]	12.10 ±0.50[c]

Values are expressed as mean ±standard deviations, $n = 3$; different letters (a, b, c and d) in each row show significant difference at $P \leq 0.05$

Fig 2 Inhibition zone diameters of *Citrus aurantium* essential oil on*Escherichia coli* and*Staphylococcus aureus*at concentration of 25 mg/ml.

Table 4 Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal/fungicidal concentration (MBC/MFC) of the *Citrus aurantium* essential oilon some food-borne pathogens

Microorganism	MIC (mg/ml)	MBC/MFC (mg/ml)
Pseudomonas aeruginosa	50	100
Escherichia coli	50	100
Salmonella typhi	100	200
Bacillus cereus	25	50
Staphylococcus aureus	6.25	12.5
Listeria innocua	3.125	3.125
Candida albicans	25	50

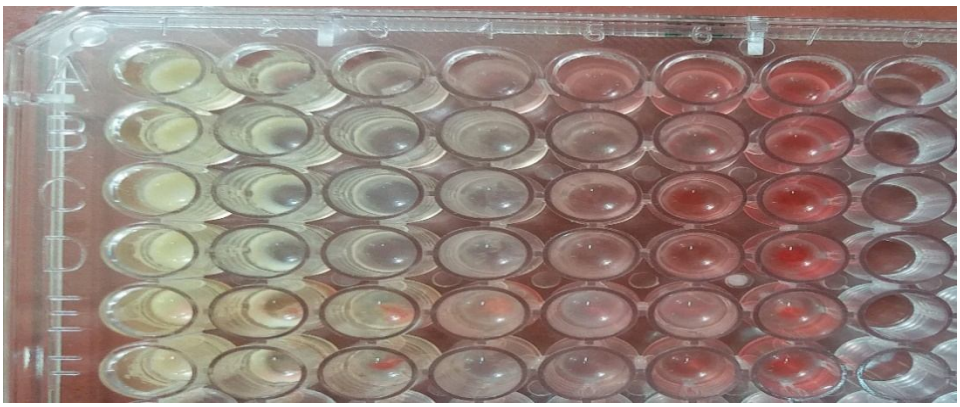

Fig 3 MIC of the *Citrus aurantium* essential by microdilution broth method.

هاشمی و همکاران (1393)، ترکیبات شیمیایی برگ گیاه بهار نارنج را شناسایی کردند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که ترکیب Linalool با مقدار 32/41 درصد بیشترین ترکیب اسانس بهار نارنج بود[19]. الوزه و همکاران (2012)، ترکیبات شیمیایی بهار نارنج را در فصل‌های مختلف مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران گزارش دادند که، 3 ترکیب Linalool (43/2 تا 65/97 %)، linalyl acetate(0/77 تا 24/77 %) و α-terpineol (9/29 تا 12/12 %) اجزای اصلی اسانس بهار نارنج می‌باشد. این محققین تفاوت میان میزان ترکیبات شناسایی شده در اسانس بهار نارنج را به تفاوت‌های اکولوژیکی، زمان برداشت، آب و هوا، دمای رشد و ... نسبت دادند[16].سارو و همکاران (2013)، ترکیبات شیمیایی اسانس بهار نارنج را مورد شناسایی

قرار دادند. این پژوهشگران ترکیب Linalool را جز اصلی اسانس بهار نارنج گزارش کردند. نتایج این محققان با یافته‌های پژوهش حاضر مطابقت داشت[20].اژدرزادهو حجتی (2016)، ترکیبات شیمیایی برگ، پوست رسیده و نارس بهار نارنج را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که به ترتیب 34، 39 و 21 ترکیب در اسانس برگ، پوست رسیده و نارس بهار نارنج وجود دارد. ترکیب اصلی در تمامی اسانس‌ها Linalool و Limonene بود[21].کاروی و مازوئیک (2013)، ترکیبات شیمیایی اسانس بهار نارنج را با دستگاه کروماتوگرافی گازی مورد شناسایی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که ترکیب Limonene جز اصلی تشکیل دهنده اسانس بود. این محققان وجود ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی را در اسانس بهار نارنج تایید کردند[22]. عمار و همکاران (2012)، ترکیبات شیمیایی بهار نارنج را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که Limonene با 27/5 % ترکیب اصلی اسانس بهار نارنج بود[23]. دهکوردی و همکاران (2016)، گزارش داد که ترکیب Limoneneجز اصلی اسانس بهار نارنج بود[24].مقایسه نتایج پژوهش حاضر با سایر پژوهش‌های مشابه تا حدود زیادی مشابه بود. در پژوهش حاضر ترکیبLinalool جز اصلی اسانس بهار نارنج بود. این ترکیب مونوترپن اکسیژن دار چه در حالت خالص و چه در زمانی که به صورت ترکیبی باشد دارای فعالیت ضدمیکروبی بالایی است. علاوه بر این ترکیباتی مانند α-pinene، Caryophyllene و β-pinene با وجود اینکه در اسانس بهار نارنج به میزان اندک وجود داشت، اما پژوهش‌های گوناگون نشان می‌دهد که این ترکیبات نیز نقش عمده‌ای در فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ها و اسانس‌های مختلف گیاهان دارد. علت این امر را پژوهشگران مختلف به گروه‌های هیدروکسیل و همچنین اثر سینرژیستی که این ترکیبات با سایر اجزای موجود در اسانس ایجاد می‌کند مرتبط دانسته‌اند [16].

هاشمی و همکاران (1393)، فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ گیاه بهار نارنج را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که میزان فنل کل اسانس بهار نارنج 7/1 میلی گرم بر مبنای اسید گالیک بر حسب وزن خشک بود. همچنین این پژوهشگران میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس نارنج را بر حسب EC_{50} برابر با 0/961 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند[19]. در مطالعه ای که کوپر و واشبورن (1998)، انجام دادند وجود فلاونوئید در عصاره تهیه شده از بهار نارنج تایید شد [25].الوزه و همکاران (2012)، فعالیت آنتی اکسیدانی بهار نارنج را در فصل‌های مختلف با روش‌های کاهش ظرفیت رادیکالی و رادیکال ABTS اندازه‌گیری کردند. این پژوهشگران گزارش کردند که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس بهار نارنج در تمام فصول سال به جز فصل تابستان ضعیف بود. این محققین مقدار پایین ترکیبات فنلی را دلیل اصلی کاهش فعالیت آنتی-اکسیدانی بهار نارنج ذکر نمودند[16].عمار و همکاران (2012)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهار نارنج را مورد بررسی قرار دادند. این محققان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهار نارنج را به روش رادیکال ABTS برحسب IC_{50} برابر با 672 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند. کریمی و همکاران (2012)، میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی عصاره متانولی بهار نارنج را به ترتیب 4/55 میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک و 3/83 میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک گزارش کردند[23].مجنونی و همکاران (2012)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس بهار نارنج را در مقایسه با بوتیل هیدروکسی آنیزول مورد پژوهش قرار دادند. این پژوهشگران گزارش کردند که قدرت آنتی‌اکسیدانی اسانس بهار نارنج کمتر از بوتیل هیدروکسی آنیزول بود. در پژوهش حاضر نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس بهار نارنج کمتر از بوتیل هیدروکسی تولوئن بود[26].بنامروچه و همکاران (2013)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس بهار نارنج به روش بتاکاروتنلینوئیک اسید را 77 % گزارش کردند. نتایج این پژوهشگران با مطالعه حاضر مطابقت داشت[27].مولهی و همکاران (2013)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی بهار نارنج را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران بهار نارنج منبع خوبی از ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی می‌باشد، و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن بر حسب IC_{50} برابر با 303/33 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.کاروی و مازوئیک (2013)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهار نارنج را در مقایسه با بوتیل هیدروکسی تولوئن، بوتیل هیدروکسی آنیزیدین و آسکوربیک اسید مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهار نارنج در مقایسه با آنتی-اکسیدانی‌های سنتزی مناسب بوده، در نتیجه این پژوهشگران بهار

نارنج را به عنوان یک منبع جدید آنتی‌اکسیدانی پیشنهاد دادند[28].

حیدرزاده و همکاران (1396)، فعالیت ضدمیکروبی نانو ذرات نقره عصاره بهار نارنج را بر باکتری‌های *اشرشیا کلی*، *سودوموناس ائروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* به روش‌های حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که حداقل غلظت کشندگی نانو ذرات نقره عصاره بهار نارنج بزرگتر از حداقل غلظت مهارکنندگی بود[8]. نتایج این مطالعه با پژوهش حاضر همخوانی داشت.الوزه و همکاران (2012)، فعالیت ضدمیکروبی اسانس بهار نارنج را با روش‌های دیسک دیفیوژن و میکرودایلوشن براث بر تعدادی از سویه‌های بیماری‌زا در شرایط برون‌تنی مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری-های گرم منفی حساس تر بوده و همچنین باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* کم‌ترین مقاومت را در برابر اسانس بهار نارنج از خود نشان داد. این محققین همچنین گزارش دادند که با توجه به فعالیت ضدمیکروبی مناسب بهار نارنج، می‌توان از این اسانس به عنوان نگهدارنده در صنعت غذا بهره جست[16]. گوپال (2012)، اثر ضدمیکروبی عصاره‌های بهار نارنج را بر تعدادی ریزاندامگان بیماری‌زا مورد تایید قرار داد[29].عمار و همکاران (2012)، فعالیت ضدمیکروبی اسانس بهار نارنج را به روش چاهک آگار بر تعدادی از ریزاندامگان بیماری‌زا در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران قطر هاله عدم رشد میکروبی اسانس بهار نارنج بر سویه گرم منفی *سودوموناس ائروژینوزا* را 19 میلی‌متر ذکر کردند[23]. در پژوهش حاضر قطر مشاهده شده برای باکتری *سودوموناس ائروژینوزا* 10/20 میلی‌متر بود.هاشمی و همکاران (2016)، فعالیت ضدمیکروبی عصاره بهار نارنج را بر سویه‌های *اشرشیا کلی*، *سودوموناس ائروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که باکتری‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس*) نسبت به باکتری‌های گرم منفی (*اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا*) حساس‌تر بودند و در غلظت یکسان از عصاره بهار نارنج دارای قطر هاله عدم رشد بزرگتری بودند[30].اژدرزادهو حجتی (2016)، فعالیت ضدمیکروبی برگ، پوست رسیده و نارس بهار نارنج را بر ریزاندامگان بیماری‌زای *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی*، *شیگلا دیسانتری*، *سالمونلا تیفی* و *ساکارومایسس سرویزیه* مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان دادکه تمامی اسانس‌های بهار نارنج دارای اثر ضد میکروبی بوده و فعالیت ضدمیکروبی بر سویه‌های گرم مثبت بیشتر از سویه‌های گرم منفی بود. این محققان استفاده از اسانس بهار نارنج را به عنوان نگهدارنده طبیعی در صنعت غذا پیشنهاد کردند[21]. اکثرا پژوهشگران دلیل حساس‌تر بودن باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکترهای گرم منفی را ناشی از اختلاف دیواره سلولی ذکر کرده‌اند. باکترهای گرم منفی دارای غشا دو لایه بوده، به طوری که لایه پپتیدوگلیکانی باکتری‌های گرم منفی در فضای پری پلاسمی واقع شده است (حدفاصل غشای داخلی و غشای خارجی فضایی وجود دارد که به آن فضای پری پلاسمی گفته می‌شود). آنزیم-های مختلفی از جمله فسفاتاز، پروتئازها، پنی‌سیلیناز و آنزیم‌های فسفوریله کننده آمینوگلیکوزید قادر هستند ترکیبات و مولکول-های وارده شده به فضای پری پلاسمی را تجزیه کنند. در حالی که در باکتری‌های گرم مثبت چنین فضایی وجود ندارد و مواد ضدمیکروبی به راحتی به راحتی می‌توانند وارد دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسمی شده و باعث از بین رفتن آن‌ها گردند. قسمت اعظم ساختمان دیواره سلولی در باکتری‌های گرم منفی بر خلاف باکتری‌های گرم مثبت از لیپوپروتئین و لیپوپلی‌ساکارید تشکیل شده است، در نتیجه می‌توان مقاومت بالاتر باکتری‌های گرم منفی نسبت به اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی به دلیل غشای فسفولیپیدی خارجی تقریبا غیر قابل نفوذ به ترکیبات چربی دوست نسبت داد[7 و 31].

4 - نتیجه گیری

در یک جمع بندی کلی می‌توان بیان کرد که اسانس بهار نارنج دارای فعالیت ضدمیکروبی به مراتب بالاتری بر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکترهای گرم منفی داشت. وجود ترکیبات فنلی، فلاون و فلاونوئیدی در اسانس بهار نارنج تایید شد. اسانس بهار نارنج دارای ترکیبات متعددی بود که جز اصلی اسانس

Linalool با مقدار 21/29 % بود. نتایج این پژوهش نشان داد که اسانس بهار نارنج دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی کم‌تری نسبت به بوتیل هیدروکسی تولوئنداشت. حساس‌ترین و مقاومت ریزاندامگان بیماری‌زا نسبت به اسانس بهار نارنج به ترتیب *لیستریا اینوکوا* و *سالمونلا تیفی* بود. پیشنهاد می‌گردد اثر اسانس بهار نارنج بر سایر ریزاندامگان بیماری‌زا و همچنین آزمون‌های بالینی به صورت گسترده‌تر انجام گیرد تا بتوان از پتانسیل بالقوه اسانس بهار نارنج در صنایع غذایی و داروسازی بهره‌مند شد.

5- تقدیر و تشکر

مقاله حاضر مستخرج از طرح پژوهشی مصوب با کد 2/47363 در دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد. نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به دلیل مساعدت‌های مالی جهت اجرای این طرح پژوهشی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

6- منابع

[1] Lattanzio, V., Kroon, P. A., Linsalata, V., and Cardinali, A. 2009. Globe artichoke: a functional food and source of nutraceutical ingredients. Journal of Functional Foods, 1(2):131-144.

[2] Negi, P. S. 2012. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. International Journal of Food Microbiology, 156(1): 7-17.

[3] Lacuna, M. L., Carmona, M. L., Amparado, B. B., Daclan, M. A., and Ranido, L. A. 2013. Antimicrobial activity of supercritical fluid extracts of two Philippine medicinal plants, Psidium guajava and Euphorbia hirta: Implications to community health. Advances in Agriculture and Botanics, 5(1): 1-13.

[4] TabatabaeiYazdi, F., Alizadeh Behbahani, B., Vasiee, A. R., Mortazavi, S. A., Shahidi, F. 2018. Evaluation antioxidant activity, phytochemical constituents and antimicrobial of Mentha Piperita essential oil on some infectious and poisonous microorganisms. Journal of Food Science and Technology, 15(76):67-76.

[5] Haghiroalsadat, B.F., Vahidi, A.R., Azimzadeh, M., Kalantar, S.M., Bernard, F., Hokmollahi, F. 2012. Chemical Assessment of Active Ingredients and Anti-oxidant Effects of TrachyspermumCopticum's Seeds harvested In Yazd Province. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences, 11(3): 197-206.

[6] TabatabaeiYazdi, F., Alizadeh Behbahani, B., HeidariSureshjani, M. 2014. The Comparison of Antimicrobial Effects of Chevil (FerulagoAngulata) Extract with a Variety of Common Therapeutic Antibiotics In Vitro. journal of Arak University of Medical Sciences, 17 (3): 35-46.

[7] Alizadeh Behbahani B. 2016. Production of an antimicrobial edible coating based on *Plantago major* seed mucilage in combination with dill and tarragon essential oils: its properties and application in beef.PhD Thesis, Ferdowsi University of Mashhad. 1-176.

[8] Heydarzadeh, S., and Yaghoubi, H. 2017. Green synthesis and antibacterial effect of silver nanoparticles by using extract of Citrus aurantium. Razi Journal of Medical Sciences, 24(4): 9-24.

[9] Kalani, Z., Emtiazy, M., Lotfi, M., and Dehghan, K. 2015. Comparison of citrus aurantium and oxazepam tablets efficacy on preoperative anxiety in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. The Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, 23(3): 1968-1975.

[10] Alizadeh Behbahani, B., and Shahidi, F. 2019. Melissa officinalis essential oil: Chemical compositions, antioxidant potential, total phenolic content and antimicrobial activity. Nutrition and Food Sciences Research, 6(1): 17-25.

[11] Vimalkumar, C., Hosagaudar, V., Suja, S., Vilash, V., Krishnakumar, N., and Latha, P. 2014. Comparative preliminary phytochemical analysis of ethanolic extracts of leaves of oleadioicaroxb., infected with the rust fungus zaghouaniaoleae (ej butler) cummins and non-infected plants. Journal of Pharmacognosy and phytochemistry, 3(4): 69-72.

[12] Tajik, S., and Zarinkamar, F. 2017. Evaluation of antioxidant activity and phenolic content from saffron organs (Crocus sativus

L.). Biotechnology TarbiatModares University, 8(3): 127-138.
[13] Chang C., Yang M., Wen H., Chern J. 2002. Estimation of total flavonoid content in Propolis by two complementary calorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis, 10: 178-182.
[14] Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., and Sokmen, A. 2007. Investigation of the antioxidant properties of Ferulaorientalis L. using a suitable extraction procedure. Food Chemistry, 100(2):584-589.
[15] Dapkevicius, A., Venskutonis, R., Van Beek, T. A, Linssen P. H. 1998. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. Journal of the Science of Food and Agriculture, 77: 146–140.
[16] Ellouze, I., Abderrabba, M., Sabaou, N., Mathieu, F., Lebrihi, A., and Bouajila, J. 2012. Season's variation impact on citrus aurantium leaves essential oil: Chemical composition and biological activities. Journal of Food Science, 77(9): T173-T180.
[17] TalebiVarnosfaderani, F., MohammadiSichani, M., and Amjad .2017. Antibacterial activity of essential oil and extracts of achillea tenuifolia against pathogenic bacteria. Qom University of Medical Sciences Journal, 11(7): 30-37.
[18] Attarpouryazdi, M., Kamalinejad, M., and Falvaeikouchak, N. S. 2010. Comparison of antimicrobial effects of cucuma longa extract and selective antibiotics against bacteria isolated from infected burn wounds. Daneshvar Medicine, 17(84): 1-10.
[19] Hashemi, Z., Hojjati, M., and Tahanejad, M. 2015. Evaluation of antioxidant activity of essential oil from citrus aurantium leaf compared with TBHQ in edible oil. Innovative Food Technologies, 2(2): 43-57.
[20] Sarrou, E., Chatzopoulou, P., Dimassi-Theriou, K., and Therios, I. 2013. Volatile constituents and antioxidant activity of peel, flowers and leaf oils of citrus aurantium l. Growing in greece. Molecules, 18(9): 10639-10647.
[21] Azhdarzadeh, F., and Hojjati, M. 2016. Chemical composition and antimicrobial activity of leaf, ripe and unripe peel of bitter orange (citrus aurantium) essential oils. Nutrition and Food Sciences Research, 3(1): 43-50.
[22] Karoui, I.J., and Marzouk, B. 2013. Characterization of bioactive compounds in tunisian bitter orange (citrus aurantium l.) peel and juice and determination of their antioxidant activities. BioMed Research International, 2013: 1-12.
[23] Ammar, A. H., Bouajila, J., Lebrihi, A., Mathieu, F., Romdhane, M., and Zagrouba, F. 2012. Chemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of citrus aurantium l. Flowers essential oil (neroli oil). Pakistan Journal of Biological Science, 15(21): 1034-1040.
[24] Dehkordi, A., Sedaghat, M. M., Vatandoost, H., and Abai, M. R. 2016. Chemical compositions of the peel essential oil of citrus aurantium and its natural larvicidal activity against the malaria vector anopheles stephensi (diptera: Culicidae) in comparison with citrus paradisi. Journal of Arthropod-Borne Diseases, 10(4): 577-585.
[25] Cooper, M., and Washburn, K. 1998. The relationships of body temperature to weight gain, feed consumption, and feed utilization in broilers under heat stress. Poultry Science, 77(2): 237-242.
[26] Majnooni, M.-B., Mansouri, K., Gholivand, M. B., Mostafaie, A., Mohammadi-Motlagh, H.-R., Afnanzade, N.-S., and Piriyaei, M. 2012. Chemical composition, cytotoxicity and antioxidant activities of the essential oil from the leaves of citrus aurantium. African Journal of Biotechnology, 11(2): 498-503.
[27] Benamrouche, S., and Madani, K. 2013. Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (citrus sinensis l. And citrus aurantium l.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. Industrial Crops and Products, 50: 723-730.
[28] Moulehi, I., Bourgou, S., Ourghemmi, I., and Tounsi, M. S. 2012. Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (citrus reticulate blanco) and bitter orange (Citrus aurantium l.) seeds extracts. Industrial Crops and Products, 39: 74-80.
[29] Gopal, P. V. 2012. Evaluation of anti-microbial activity of citrus aurantium against

some gram positive and negative bacterial strains. Pharmacia, 1(3):107-109.
[30] Hashemi, S. M. B., Amininezhad, R., Shirzadinezhad, E., Farahani, M., &Yousefabad, S. H. A. 2016. The antimicrobial and antioxidant effects of c itrusaurantium flowers extract in traditional yoghurt stew during refrigerated storage. Journal of Food Safety, 36(2):153-161.
[31] Duffy, C. F., and Power, R. F. 2001. Antioxidant and antimicrobial properties of some chinese plant extracts. International Journal of Antimicrobial Agents, 17(6): 527-529.

Antimicrobial effect of *Citrus aurantium* essential oil on some food-borne pathogens and determination of its chemical compounds, total phenolcontent, total flavonoids content and antioxidant potential

Alizadeh Behbahani, B.[1], Falah, F. [2], Vasiee, A. [3], Tabatabaei Yazdi, F. [4*], Mortazavi, S. A.[4]

1. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
2. M. Sc Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3. Ph. D Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
4. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

(Received: 2019/02/16 Accepted:2019/04/07)

In this study, the antimicrobial effect of *Citrus aurantium*essential oil was evaluated on *Bacillus cereus,Listeria innocua, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhi* and *Candida albicans*. The chemical compounds, total phenolcontent, total flavonoids content and antioxidant potential of the essential oil were determined. The results of the phytochemical analyses (Ferric chloride and Shinoda) showed that phenol, flavonoids and flavone existed in the essential oil. Based on gas chromatography–mass spectrometry results, 19 compounds were identified in *Citrus aurantium* essential oil and Linalool (21.29 %) was the major one.The total phenolic content and total flavonoids content of the essential oil were equal to 41.35 ± 0.46 mg GAE/g DM and 2.98 ±0.50 mg QE/g DM respectively. Based on *radical* Scavenging and β-carotene linoleic acid, the antioxidant potential of theessential oil was equal to 102.85 ± 0.60 µg/ml and 65.60% respectively. The longest and shortest diameters of the inhibition zone at a concentration of 45 mg/ml pertained to*Listeria innocua* (16.50 ±0.66 mm) and *Salmonella typhi* (9.80 ±0.43 mm) respectively.The minimum inhibitory concentration of the essential oil ranged from 3.125 mg/ml to 100 mg/ml, while its minimum bactericidal/fungicidal concentration ranged from 3.125 mg/ml to 200 mg/ml. Based on the present research, the antioxidant potential and antimicrobial activity of *Citrus aurantium* essential oil were tested on several food-borne pathogens; thus, it can be used in food products.

Keywords:*Citrus aurantium*, Pathogenic microorganisms, Microdilution broth, Phytochemical analysis.

[*] Corresponding Author E-Mail Address: tabatabai@um.ac.ir