بررسی ترکیبات شیمیایی، خواص ضداکسایشی و ضدمیکروبی اسانس پوست دو گونه از مرکبات

محمد حجتی[1*]، مرضیه امیدی‌میرزایی[2]، زهرا کیارسی[2]

۱- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان
(تاریخ دریافت: ۹۸/۱۰/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۱/۱۶)

چکیده

هدف از این پژوهش، استخراج و شناسایی ترکیبات فرار اسانس پوست دو گونه از مرکبات به‌نامهای کلمنتین و ماندارین و بررسی پتانسیل ضد-اکسایشی و ضدمیکروبی آنها بود. ترکیبات اسانس‌ها که به روش تقطیر با بخارآب تهیه شده بودند توسط گازکروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی شناسایی شدند. توانایی ضداکسایشی اسانس‌ها با رادیکال‌های DPPH وABTS بررسی گردید. فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌ها با روش انتشار در دیسک علیه سه باکتری گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوئوس و باسیلوس سابتیلیس*)، دو باکتری گرم منفی(*اشرشیا کلی و سالمونلا تیفی*)، یک مخمر (*کاندیدا آلبیکنس*)و یک *قارچ* (*آسپرژیلوس نایجر*) در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های مصنوعی بررسی شد. هر دو اسانس سرشار از مونوترپن‌های هیدروژنه بوده و لیمونن ترکیب عمده در هر دو اسانس بود. بیشترین درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH وABTS برای اسانس کلمنتین به ترتیب برابر ۳٤/۳۸ و ٤۸/٤٤ درصد و برای اسانس ماندارین به ترتیب ٦۷/۵۳ و۹٦/٤٤ درصد در غلظت ۹۰۰ppm مشاهده شد. نتایج نشان داد که هر دو اسانس مانع از رشد میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه شدند و با افزایش غلظت اسانس، هاله عدم رشد افزایش یافت. بیشترین قطر هاله عدم رشد در هر دو اسانس در *کاندیدا آلبیکنس* مشاهده گردید. هم‌چنین کمترین قطر هاله عدم رشد برای اسانس‌های کلمنتین و ماندارین به ترتیب در *اشرشیا کلی* و *آسپرژیلوس نایجر* مشاهده شد. به طور کلی اثر ضد قارچی هر دو اسانس بیشتر از اثر ضدباکتریایی آن‌ها بود. با توجه به یافته‌های این تحقیق، اسانس پوست مرکبات می‌تواند به عنوان یک ماده نگهدارنده طبیعی جهت استفاده در مواد غذایی پیشنهاد گردد.

کلید واژگان: لیمونن، گازکروماتوگرافی متصل به طیف نگارجرمی، باکتری‌های بیماری‌زاد، انتشار دیسک آگار

* ایمیل مسئول مکاتبات: hojjati@asnrukh.ac.ir

۱- مقدمه

بیماری‌های ناشی از غذا با مصرف مواد غذایی آلوده به باکتری‌های بیماری‌زا ایجاد می‌شوند که نگرانی قابل توجهی برای بهداشت عمومی به همراه داشته است. برطبق آماری که در سال‌های ۱۹۹۷ -۱۹۹۳ در آمریکا ارائه گردید، مشخص شد باکتری‌های بیماری‌زا عامل ایجاد تقریباً ۷۵ درصد از بیماری‌ها می‌باشند [۱]. افزایش آگاهی مصرف‌کنندگان در ارتباط با غذا و سلامتی باعث تحول در صنعت مواد غذایی شد به طوری که محققین و صنعت‌گران به دنبال مواد جدید برای بهبود سلامتی غذا هستند. این امر موجب کاهش استفاده از افزودنی‌های شیمیایی در طیف گسترده‌ای از مواد غذایی و جایگزین شدن آن‌ها با افزودنی‌های طبیعی، که کیفیت و ایمنی مواد غذایی را تأمین می‌کنند شد[۲-٤]. گیاهان و میوه‌ها غنی از ترکیبات ضداکسایشی و پلی‌فنلی هستند و به دلیل مفید بودن برای سلامتی و اثرات ضدمیکروبی کاربرد فراوانی در صنایع غذایی پیدا کرده‌اند[۵ و۱]. میوه‌ها از رنگ، شکل، طعم و بوی خاص، مواد معدنی غنی‌شده، ویتامین‌ها و سایر اجزاء سودمند برخودار بوده و از این رو مورد توجه عموم قرار گرفته اند[٦].

مرکبات از مهم‌ترین محصولات میوه‌ای جهان هستند وتاریخچه کشت آن توسط انسان به حداقل ۲۱۰۰ سال قبل از میلاد باز می‌گردد [۸و ۷]. اصطلاح مرکبات شامل انواع مختلف میوه و محصولات آن‌ها است. اگرچه پرتقال مهم‌ترین میوه در گروه مرکبات است و حدود ۷۰ درصد از محصول را تشکیل می‌دهد، اما این گروه شامل مرکبات کوچک (مانند تانگرینس، ماندارین، کلمنتین و ساتسوما)، لیمو، لیمو ترش و گریپ فروت نیز هست. مرکبات در بسیاری از کشورهای جهان تولید می‌شوند و نواحی مدیترانه‌ای از تولیدکنندگان انواع مرکبات در عرصه جهانی هستند[٦].

پوست، دانه و پالپ که تقریباً ۵۰ درصد از کل وزن میوه را شامل می‌شوند به عنوان فرآورده‌های جانبی در صنعت فرآوری مرکبات وجود دارند و باعث ایجاد مشکلات زیست محیطی می‌شوند[۹]. این فرآورده‌های جانبی منبع ارزشمندی از عناصر عملگرا یعنی فلاونوئیدها، فیبرهای رژیمی و اسانس‌ها هستند. مرکبات به دلیل ترکیبات معطری که دارند از نظر اقتصادی دارای ارزش قابل توجهی برای تولید اسانس (که معمولاً از پوست آن‌ها گرفته می‌شود) هستند[٤و ۸].

اسانس‌های مرکبات به طور گسترده‌ای به عنوان عامل طعم‌دهنده در نوشیدنی، بستنی، کیک، خوشبوکننده هوا، محصولات خانگی و عطرها استفاده می‌شوند [۸و ۱۰]. علاوه بر این، اسانس‌های مرکبات مخلوط‌های پیچیده‌ای از ترکیبات مختلف هستند که طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های بیولوژیکی مانند ضداکسایشی، ضدالتهابی، ضداضطراب، ضدمیکروبی و ضدقارچی را نشان داده‌اند. این فعالیت‌های بیولوژیکی ممکن است از اهمیت زیادی در چندین زمینه، از شیمی مواد غذایی گرفته تا داروشناسی و داروسازی برخوردار باشند[۱۱]. مهم‌ترین مزیت اسانس‌ها این است که می‌توان از آن‌ها در هر غذایی استفاده کرد و عموماً به عنوان ترکیبات بی‌خطر (GRAS[1]) شناخته می‌شوند [٤].

هدف از این پژوهش، شناسایی ترکیبات شیمیایی، پتانسیل ضداکسایشی و ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی و ضدقارچی اسانس‌های پوست دو گونه از مرکبات پرمصرف جنوب اروپا بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه اسانس و شناسایی ترکیبات شیمیایی آنها

اسانس دو گونه مرکبات شامل ماندارین[2] و کلمنتین[3] که به روش تقطیر با بخار آب حاصل شده بود از مرکبات منطقه جنوب ایتالیا (Agrumaria Reggina Company, Reggio Calabria, Italy) تهیه و تا زمان انجام آزمون در یخچال نگهداری شدند. شناسایی ترکیبات اسانس استخراج شده با تزریق ۰/۵ میکرولیتر اسانس استخراجی رقیق شده با

1. Generally Recognized as Safe
2. *Citrus reticulata*
3. *Citrus clementine*

سیکلوهگزان به دستگاه گاز کروماتوگرافی مدل Agilent 6890A حاوی ستون HP-5MS (طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت فاز ثابت ۰/۲۵ میکرومتر) متصل به طیف نگار جرمی مدل Agilent 5975 انجام پذیرفت. برنامه دمایی ستون به این طریق تنظیم گردید: دمای ابتدایی آن ٤٠ درجه سانتی‌گراد بود و دما با سرعت ۵ درجه در دقیقه تا رسیدن به دمای ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و در این دما یک دقیقه باقی ماند و سپس دما با سرعت ۱۰ درجه سانتی گراد در دقیقه تا رسیدن به دمای ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و پس از ۵ دقیقه توقف در این دما، در نهایت با سرعت ۲۵ درجه سانتی‌گراد در دقیقه به دمای ۳۰۰ درجه‌سانتی‌گراد رسانده شد. گاز هلیوم با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه به عنوان گاز حامل به کار گرفته شد. دمای محفظه تزریق و آشکار ساز به ترتیب ٢٤٠ و ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. طیف نگار جرمی با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت به کار گرفته شد. شناسایی نوع ترکیبات اسانس با کمک طیف نرمال آلکان‌ها (C_8-C_{24}) و به دست آوردن شاخص بازداری آن‌ها (شاخص کواتز) و مقایسه با شاخص کواتز (KI)[1] گزارش شده ترکیبات در نرم افزارNIST07 و مقایسه طیف جرمی هر یک از اجزای ترکیبات اسانس با طیف جرمی موجود در کتابخانه wiley7n.1 موجود در دستگاه GC/MS[2] صورت پذیرفت. میزان درصد ترکیبات موجود در اسانس موردبررسی با استفاده از دستگاه گازکروماتوگرافی مدل Agilent 6890A مجهز به آشکارسازFID با شرایط فوق و با استفاده از سطح زیر منحنی پیک‌ها محاسبه گردید [۱۲].

۲-۲- فعالیت ضداکسایشی اسانس

فعالیت ضداکسایشی اسانس‌های کلمنتین و ماندارین با دو روش ارزیابی درصد مهار رادیکال آزاد ۲،۲ - دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH)[3] و ۲،۲- آزینو بیس -۳- اتیل بنزو تیازولین -٦- سولفونیک اسید (ABTS)[4] اندازه‌گیری شد.

۲-۲-۱- رادیکال DPPH

فعالیت رادیکال آزاد اسانس‌های پوست کلمنتین و ماندارین با استفاده از روش تجزیه رادیکال آزاد DPPH به صورت کمی ارزیابی شد [۱۳]. به طور خلاصه ۱۰۰ میکرولیتر ازغلظت‌های مختلف اسانس‌ها (۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰، ۷۰۰ و ۹۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) در لوله‌های آزمایش ریخته و ۳/۹ میلی‌لیتر از محلول ۰/۱ میلی‌مولار DPPH در متانول به لوله‌ها اضافه و مخلوط شدند. لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در یک محل تاریک در دمای اتاق نگهداری شدند. نمونه‌ی کنترل به صورت محلول‌های فوق بدون اسانس تهیه شد. از متانول برای صفر کردن دستگاه استفاده شد. جذب نمونه با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری گردید.

۲-۲-۲- ABTS

فعالیت ضداکسایشی اسانس‌های پوست کلمنتین و ماندارین با روش ABTS مطابق با مطالعه شان و همکاران [١٤]، با اندکی اصلاحات انجام شد. برای انجام این آزمون محلول ۷ میلی مولار ABTS و محلول ۲/٤٥ میلی‌مولار پرسولفات پتاسیم در آب تهیه و به نسبت یکسان با هم مخلوط گردیدند. محلول حاصل به مدت ١٦ساعت درتاریکی و در دمای اتاق نگهداری شد. قبل از آزمون، محلول $ABTS^+$ با متانول تا جذب ۰/۲۰۰ ±۷۰۰/۰ در طول موج ۷۳٤ نانومتر رقیق شد. پس از آن ۰/۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های اسانس‌ها به ۳/۹ میلی‌لیتر از محلول ABTS رقیق شده افزوده و بعد از گذشت ٦ دقیقه جذب آن به وسیله دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۷۳٤ نانومتر قرائت شد. نمونه‌ی کنترل به صورت محلول‌های فوق بدون اسانس تهیه شد و متانول برای صفرکردن دستگاه مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۳- تهیه و آماده‌سازی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا

در این پژوهش از دو باکتری بیماری‌زا گرم منفی(*Escherichia coli* ATCC 25922 و *Salmonella typhi* ATCC14028)، سه باکتری گرم مثبت(*Bacillus cereus* PTCC 1242، *Bacillus subtilis* PTCC 1023

1. Kovats Index
2. Gas chromatography mass spectrometry
3. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
4. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid

و *Staphylococcus aureus* ATCC 25923)و دو قارچ (*Candida albicans* و*Aspergillus niger*) استفاده شد. تمامی سویه‌های میکروبی مورد استفاده در این مطالعه به صورت لیوفیلیزه در آزمایشگاه میکروبیولوژی گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان وجود داشت.

۱-۳-۲- تهیه‌کشت تازه از سویه‌های میکروبی

برای تهیه کشت تازه از میکروارگانیسم‌ها یک روز قبل از انجام آزمون‌های میکروبی از هر سویه‌ی میکروبی بر محیط کشت مولر هینتون آگار کشت سطحی انجام شد. سوسپانسیون سویه های میکروبی براساس کدورت نیم مک‌فارلند تنظیم شد.

٤-۲- بررسی فعالیت ضد میکروبی اسانس تخم گشنیز

۱-٤-۲- روش دیسک دیفیوژن

در این روش ابتدا یک سوسپانسیون استاندارد میکروبی بر محیط کشت مولر هینتون آگار برای باکتری‌ها و سابروز دکستروز آگار برای قارچ‌ها به روش سطحی کشت داده شد. دیسک‌های خالی (ساخت شرکت پادتن طب) با فاصله معین از یکدیگر و از دیواره پلیت روی محیط کشت‌ها قرار داده شد. برای این منظور، غلظت‌های ٤٠، ٦٠ و ٨٠ میکروگرم در میلی لیتر از اسانس‌های کلمنتین و ماندارین در حلال مناسب تهیه شد. غلظت‌های مختلف از اسانس‌ها به آرامی به دیسک‌ها اضافه گردید. برای استریل کردن اسانس‌ها قبل از اضافه کردن آن‌ها به دیسک، از فیلتر سرسرنگی با اندازه ذرات ۰/۲۲ میکرون عبور داده شدند. از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و کلرامفنیکل به عنوان کنترل استفاده شد. در انتها پلیت‌های حاوی باکتری‌ها و قارچ‌ها به ترتیب به مدت ٢٤ و ۷۲ ساعت در دماهای ۳۷ و ۲۵درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. بعد از گذشت مدت زمان گرمخانه‌گذاری قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها با خط‌کش اندازه‌گیری و برحسب میلی‌متر گزارش شد[۱۵و ١٦].

٥-۲- آنالیز آماری

از آنالیز واریانس یک‌طرفه برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد. جهت مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از نرم افزارSPSS (نسخه ۲۵) استفاده شد. تمامی آزمون‌ها ۳ بار تکرار گردید.

۳- نتایج و بحث

تغییر در ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها قطعاً فعالیت بیولوژیکی آن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. از این رو تعیین مشخصات شیمیایی اسانس‌ها قبل از توصیه کردن فعالیت‌های ضدمیکروبی و ضداکسایشی آن‌ها ضروری است. نتایج شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس کلمنتین و ماندارین با دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌نگارجرمی در جدول ۱آورده شده است. بر اساس نتایج مشخص گردید که اسانس کلمنتین دارای ۲۲ ماده فرار بوده که در مجموع ۹۱/۳۹ درصد از کل ترکیبات آن را تشکیل می‌دهد. بر اساس این نتایج و طبق شکل ۱، اسانس کلمنتین غنی از مونوترپن‌های هیدروکربن (۸۱/۱۵٪) می‌باشد. ترکیب عمده اسانس کلمنتین، لیمونن (۷۸/۹۹) است. علاوه بر آن کارون (۱/٤۳٪)، ترانس-کارول (۱/٤۲٪)، سیس-لیمونن‌اکسید (۱/٤۰٪)، پی-منتا-ترنس-۲-۸-دین-۱-اُل (۱/۲۰٪) و بتا-میرسن (۱/۰٦٪) دیگر ترکیبات غالب اسانس کلمنتین را تشکیل می‌دهند. هم‌چنین بر اساس نتایج مشخص گردید که اسانس ماندارین دارای ۲۸ ماده فرار بوده که در مجموع ۷٦/۸۵ درصد از کل ترکیبات آن را تشکیل می‌دهد. براساس این نتایج اسانس ماندارین غنی از مونوترپن‌های هیدروکربن (۵۵/٦۷٪) می‌باشد. ترکیب عمده اسانس ماندارین، لیمونن (۳۰/۱۸٪) است. علاوه بر آن به ترتیب گاما- ترپینن (۱٤/۳۲٪)،دی متیل آنترانیلات (۷/۸۳٪)، اُ-سیمین (۳/٤۱٪) و آلفا-فرانسن (۳/۰۷ ٪) دیگر ترکیبات غالب اسانس ماندارین را تشکیل می‌دهند.

بودریس و همکاران ترکیبات شیمیایی اسانس پوست ماندارین و کلمنتین منطقه شمال شرقی الجزایر را مورد بررسی قرار دادند و به ترتیب ۱۲ و ۵ ترکیب برای اسانس‌های پوست ماندارین و کلمنتین شناسایی کردند که ۵ ترکیب در هر دو رقم مشترک بود. مونوترپن هیدروکربن لیمونن با ۷۷/۸۰ درصد و

۹۶/۷۵ درصد به ترتیب جزء اصلی دو اسانس پوست ماندارین و کلمنتین را تشکیل دادند. به دنبال آن گاما-ترپینن (۱۴/۹۹٪)، آلفا-پینن (۱/۸۰٪)، بتا-میرسن (۱/۶۶٪)، بتا-پینن (۱/۲۴٪) و پی- سیمن (۰/۶۷٪) بیشترین ترکیبات اسانس پوست ماندارین و بتا-میرسن (۲/۰۷٪)، سابینن (۰/۶۱٪)، لینالول (۰/۳۲٪) و آلفا-پینن (۰/۱۲٪) بیشترین ترکیبات اسانس پوست کلمنتین را تشکیل دادند [٤]. حسنی و همکاران، دریافتند که حداقل ۳٤ ترکیب در اسانس پوست ماندارین تونس وجود دارد، این اسانس سرشار از هیدروکربن‌های مونوترپن (۹۸/۹٪) بود. اجزای اصلی این اسانس شامل لیمونن (۹۲/۶٪)، گاما-ترپینن (۳٪/۳۹)، بتا-پینن (۱/۵۵٪) و آلفا- پینن (۰/۶۱٪) بودند. مونوترپن‌های اکسیژن‌دار (۰/۶۵٪) از ترکیبات این اسانس را تشکیل دادند که تقریباً نیمی از آن مربوط لینالول (۰/۳۱٪) بود. شش هیدروکربن سسکویترپن در اسانس پوست ماندارین شناخته شد که آلفا-هومولن با (۰/۰۸٪) فراوان‌ترین ترکیب در این گروه بود [۸]. در پژوهشی که توسط بورگو و همکاران روی ترکیب اسانس پوست ماندارین تونسی در طول بلوغ انجام شد، مشاهده شد که اسانس در مرحله بلوغ غنی از هیدروکربن‌های مونوترن بود که در آن لیمونن با ٦۹/۰۰ درصد بیشترین ترکیب اسانس و پس از آن گاما-ترپینن (۱٤/۰٦٪)، اسپاتولنول (۲/۵ ٪)، آلفا-پینن (۱/۲۵٪)، آلفا-ترپینول (۱/۲۵٪)، ای- بتا- اُسیمن (۱/۰۵ ٪) و میرسن (۰/۹۸٪) اجزای اصلی این اسانس را تشکیل دادند [۱۷]. لوتا و همکاران، ترکیب شیمیایی ۱٦ نمونه کلمنتین کرزیکا در فرانسه را مورد بررسی قرار دادند. در همه نمونه‌ها۳۰ جزء شناسایی شد که ۹۷/۳ تا ۹۹/۵ درصد از کل ترکیبات اسانس را تشکیل می‌داد. اسانس‌ها تقریباً به طور انحصاری از هیدروکربن لیمونن (۹۵/۵-۸۹/۱ ٪) به عنوان ماده اصلی، سابینن (٤/۰- ۳/۰ ٪) و میرسن(۲/۰-۱/٤ ٪) تشکیل شده بودند. آلفا-پینن، بتا-فلاندرن، بتا-پینن، ای-بتا-اُسیمن، ۳-کارن و گاما-ترپینن تقریباً در همه نمونه‌ها در مقادیر کم (حدوداً ۰/٦ درصد) شناسایی شد. لینالول (۲/۳-۰/٦ ٪)، اوکتانال، دکانال، سیترونلال، آلفا-ترپنول، آلفا-سیننسال وبتا-سیننسال (۰/۷≤ برای هر یک) بخش ترکیبات اکسیژن‌دار این اسانس‌ها را تشکیل می‌دادند [۱۸]. ترکیبات اسانس با توجه به شرایط اکولوژیکی و جغرافیایی، سن گیاه و زمان برداشت متفاوت هستند [٤ و ۱۹].

فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH وABTS اسانس اسانس‌های کلمنتین و ماندارین در غلظت‌های مختلف (۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰، ۷۰۰ و۹۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تعیین گردید. همانطور که در شکل ۲و ۳ مشاهده می‌شود با افزایش غلظت اسانس میزان مهار رادیکال‌های آزاد نیز افزایش یافت، به طوری‌که بیشترین درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS برای اسانس کلمنتین، به ترتیب برابر ۳٤/۳۸ و ٤۸/٤٤ درصد و برای اسانس ماندارین به ترتیب ٦۷/۵۳ و۹٦/٤٤ درصد، در غلظت ppm ۹۰۰ و کمترین قدرت مهارکنندگی DPPH و ABTS برای اسانس کلمنتین، به ترتیب برابر ٤/۵۵ و ۲۷/۸۵ درصد و برای اسانس ماندارین به ترتیب ۵/۰۵ و۱٦/۷۳ درصد، در غلظتppm۱۰۰مشاهده شد. در مجموع عملکرد پایین‌تر رادیکال DPPH نسبت به رادیکال ABTS به دلیل سرعت بالاتر انتقال الکترون در روش [۲۰] ABTS برای هر دو اسانس مشاهده شد. به طور کلی اسانس ماندارین دارای فعالیت ضد اکسایشی بالاتری نسبت به اسانس کلمنتین بود. بودریس و همکاران، ترکیبات شیمیایی، خواص ضد اکسایشی و ضدمیکروبی اسانس‌های مرکبات رتیکولاتا و مرکبات کلمنتیا را مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش روند افزایش درصد مهار رادیکال آزاد با افزایش غلظت در هر ۳ نوع اسانس مشاهده شد. همچنین اسانس ماندارین قدرت ضد اکسایشی بالاتری نسبت به اسانس کلمنتین و اسانس نارنگی ژاپنی داشت که نتایج این پژوهشگران با نتایج ما کاملاً مطابقت داشت[٤]. کمال و همکاران، پتانسیل ضداکسایشی اسانس پوست سه گونه از مرکبات پاکستان (*C. reticulata,* *C. sinensis* و *C. paradisii*) را بررسی نمودند. نتایج این پژوهش نشان داد که اسانس *C. reticulate* بالاترین درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH (۲٤/۰۸) و اسانس *C. sinensis* کمترین درصد مهارکنندگی (۱٤/۰۵) را در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر داشتند[۲۱].

Table 1 Chemical compositions essential oil of peel of *C. clementine* and *C. reticulate* (%)

Component	Retention time (min)	Kovats Index	*C. clementine*	*C. reticulate*
α-Pinene	9.597	940	0.48	0.48
Sabinene	11.484	962	0.48	0.48
β-myrcene	12.407	975	1.06	0.14
Octanal	13.023	999	0.47	-
α-terpinene	13.587	1017	-	0.07
o-cymene	14.007	1025	-	3.41
Cymene	14.018	1026	0.14	-
Limonene	14.305	1031	78.99	30.18
γ-terpinene	15.751	1059	-	14.32
terpinolene	17.187	1084	-	1.86
Linalool	17.895	1098	0.48	-
p-Menta-*trans*-2,8-dien-1-ol	18.859	1106	1.20	-
Cis- Limonene oxide	19.443	1126	1.40	-
Trans-Limonene oxide	19.679	1136	0.74	-
Citronellal	20.479	1161	0.18	0.11
4-Terpineol	21.617	1177	-	0.22
α-terpineol	23.315	1193	0.18	1.18
n-Decanal	23.012	1199	1.02	0.43
Trans-carveol	23.689	1213	1.42	-
β-citronellol	24.161	1211	-	0.16
Cis-carveol	24.243	1219	0.74	-
4-vinylphenol	24.592	1220	-	3.2
Carvone	24.807	1226	1.43	-
L-Perillaldehyde	26.192	1236	-	0.89
Perilla alcohol	27.382	1294	0.27	-
thymol	27.515	1288	-	0.67
p-Vinylguaiacol	27.966	1291	-	1.77
α-Copaene	30.643	1349	0.17	0.26
β-Cubebene	31.269	1386	0.12	0.41
Vanillic aldehyde	31.751	1390	-	0.18
Dimethyl anthranilate	32.079	1405	-	7.83
Dobecanal	32.110	1408	0.15	-
trans-Caryophyllene	32.489	1415	-	1.44
α-Humulene	33.905	1429	-	0.39
α-selinene	35.638	1481	-	0.73
α-Farnesene	36.192	1498	-	3.07
δ-Cadiene	36.776	1503	-	0.31
Tetradecanal	40.212	1600	-	0.36
β-Sinensal	43.402	1690	0.10	-
Hexadecanoic acid	42.540	1955	-	2.39
Linolic acid	57.864	2129	0.17	-
total			***91.39***	***76.94***

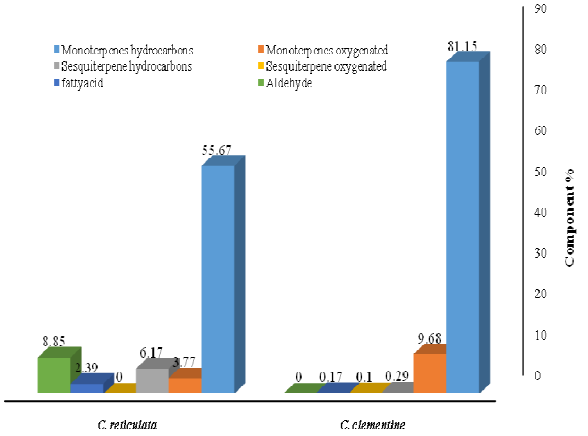

Fig 1 Classification of volatile compounds isolated and identified in essential oil of peel from *C. clementine* and *C. reticulate*

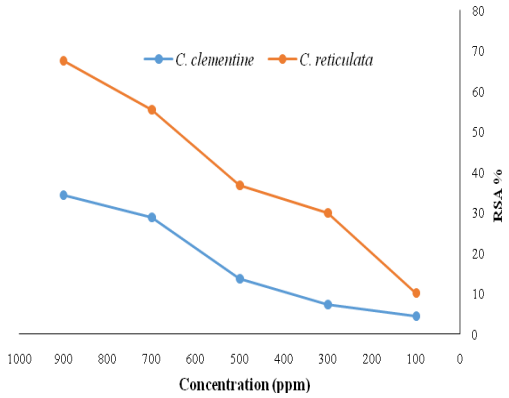

Fig 2 DPPH radical scavenging activity (%) of essential oil of peel from *C. clementine* and *C. reticulate*

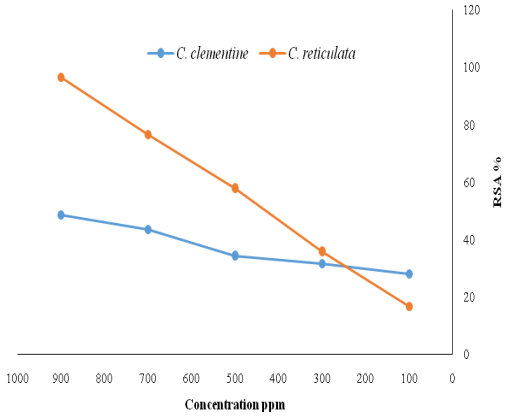

Fig 3 ABTS radical scavenging activity (%) of essential oil of peel from *C. clementine* and *C. reticulate*

قاسمی و همکاران، فعالیت ضداکسایشی، محتویات فنول و فلاونوئید پوست و بافت ۱۳ گونه از مرکبات ساری را بررسی نمودند. عصاره‌های مورد بررسی در آن مطالعه فعالیت ضداکسایشی ضعیفی را نشان دادند به طوری که عصاره پوست *C. reticulata* var. Ponkan با IC_{50} ۰/٦ میلی‌گرم بر میلی لیتر قوی‌ترین و عصاره بافت *C. aurantium* با IC_{50} ۳/۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ضعیف‌ترین فعالیت مهار رایکال آزاد DPPH را نشان دادند [۲۲]. نتایج آن مطالعه برای عصاره پوست *C. reticulata* var. Ponkan با نتایج ما برای اسانس پوست *C. reticulata* با IC_{50} بین ٦۰۰ تا ۷۰۰ ppm کاملاً مطابقت داشت. همچنین نتایج آن پژوهش برای عصاره پوست *C. reticulata* var. Clementine ضعیف‌تر از نتایج ما برای اسانس پوست *C. clementine* با IC_{50} ۱۲۰۰تا۱۳۰۰ ppm بود.

فعالیت ضداکسایشی یک اسانس عمدتاً به ترکیبات اصلی تشکیل دهنده آن نسبت داده می‌شود. بنابراین قدرت مهار رادیکال‌های آزاد اسانس مرکبات به دلیل فعالیت ضداکسایشی لیمونن که ماده اصلی تشکیل دهنده آن‌ها است نسبت داده می‌شود[۲۳]. با این وجود فعالیت ضد اکسایشی اسانس‌ها ممکن است بر اساس تغییر در ترکیبات شیمیایی متفاوت باشد[٤].

نتایج حاصل از ۲۰ میکرولیتر غلظت‌های مختلف اسانس پوست مرکبات کلمنتین و ماندارین بر قطر هاله‌های عدم رشد میکروارگانیسم‌های مورد بررسی در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین وکلرامفنیکل برای باکتری و آمفوتریسین B و نیستاتین برای قارچ در جداول ۲ و۳ نشان داده شده است.

نتایج نشان داد که با افزایش غلظت اسانس، هاله عدم رشد برای همه گونه‌های مورد بررسی افزایش یافت. به طوری که بیشترین هاله عدم رشد مربوط به قارچ *کاندیدا آلبیکنس*، برای اسانس‌های پوست کلمنتین و ماندارین به ترتیب برابر با ۲۸/۱±۵۰/۵۰ و ۳٤/۰۰±٤/۰۰ میلی‌متر در غلظت ۸۰ppm و کمترین قطر هاله عدم رشد برای اسانس کلمنتین مربوط به باکتری *اشرشیا کلی* (٦/۰۰±۰/۰۵ میلی‌متر) و برای اسانس ماندارین مربوط به قارچ *آسپرژیلوس نایجر* (۷/۵۰±۰/۵۰) در غلظت ٤۰ppm بود. قطر هاله عدم رشد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مورد بررسی برای هر دو اسانس نسبت به آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین و کلرامفنیکل کمتر بود. همچنین قطر هاله عدم رشد قارچ‌های مورد بررسی برای هر دو اسانس نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمفوتریسین B و نیستاتین بیشتر بود. نتایج نشان داد که به طور کلی اثر ضد قارچی اسانس‌های پوست کلمنتین و ماندارین بیشتر از اثر ضدباکتریایی آن‌ها بود،

هم‌چنین باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت مقاومت بیشتری را در برابر اسانس‌ها از خود نشان دادند. در نهایت اسانس پوست ماندارین فعالیت ضدمیکروبی بالاتری را نسبت به اسانس پوست کلمنتین از خود نشان داد.

Table 2 Antimicrobial activity of *C. clementine* peel essential oil against tested microorganisms using disc diffusion method (zone of inhibition in mm)[a,b]

Microorganisms	40 mg/ml	60 mg/ml	80 mg/ml	Gentamicin	Chloramphenicol	Amphotericin B	Nystatin
E. coli	6.00±0.05^{Ed*}	8.50±0.50^{Ec}	9.00±0.10^{Ec}	26.50±0.50^{Db}	31.33±1.04^{Ba}	-	-
S. typhi	14.00±0.50^{Bd}	18.00±0.05^{Bc}	20.00±1.00^{Bb}	30.50±0.50^{Ba}	32.00±2.00^{Ba}	-	-
B. cereus	8.50±0.50^{Dd}	11.66±1.52^{Dc}	13.00±1.00^{CDc}	28.00±1.00^{Cb}	32.00±2.00^{Ba}	-	-
B. subtilis	11.50±0.50^{Ce}	15.50±0.52^{Cd}	14.00±1.00^{Cc}	30.51±0.50^{Bb}	36.00±0.05^{Aa}	-	-
S. aureus	9.00±1.00^{Dc}	10.50±0.50^{DEb}	11.33±1.04^{Db}	33.50±0.50^{Aa}	33.33±1.04^{Ba}	-	-
C. albicans	20.50±1.50^{Ac}	23.00±1.00^{Ab}	28.50±1.50^{Aa}	-	-	20.10±0.10^{Ac}	18.00±1.00^{Ac}
A. niger	12.50±0.50^{Cd}	23.00±3.00^{Ab}	28.00±1.00^{Aa}	-	-	17.43±0.51^{Bc}	16.10±0.10^{Bc}

[a]values represent mean ± standard deviation of three replicates. [b]values followed by the same small and caps letter at the same row and column are not significantly different, respectively ($p > 0.05$).

Table 3 Antimicrobial activity of *C. reticulate* peel essential oil against tested microorganisms using disc diffusion method (zone of inhibition in mm)[a,b]

Microorganisms	40 mg/ml	60 mg/ml	80 mg/ml	Gentamicin	Chloramphenicol	Amphotericin B	Nystatin
E. coli	9.36±0.59^{CDc*}	10.00±0.50^{Cc}	10.33±0.10^{Cc}	26.50±0.50^{Db}	31.33±1.04^{Ba}	-	-
S. typhi	8.00±0.50^{DEd}	9.10±0.36^{Cd}	10.00±0.50^{Cc}	30.50±0.50^{Bb}	32.00±2.00^{Ba}	-	-
B. cereus	12.00±1.00^{Bd}	19.00±1.00^{Bc}	20.00±2.00^{Bc}	28.00±1.00^{Cb}	32.00±2.00^{Ba}	-	-
B. subtilis	9.00±1.00^{CDEe}	10.00±0.50^{Cd}	11.00±0.50^{Cc}	30.51±0.50^{Bb}	36.00±0.05^{Aa}	-	-
S. aureus	10.00±1.00^{Cc}	10.50±0.50^{Cc}	12.00±0.50^{Cb}	33.50±0.50^{Aa}	33.33±1.04^{Ba}	-	-
C. albicans	21.00±1.00^{Ac}	27.00±3.00^{Ab}	34.00±4.00^{Aa}	-	-	20.10±0.10^{Ac}	18.00±1.00^{Ac}
A. niger	7.50±0.50^{Ee}	10.50±0.50^{Cd}	11.50±0.50^{Cc}	-	-	17.43±0.51^{Ba}	16.10±0.10^{Bb}

[a]values represent mean ± standard deviation of three replicates. [b]values followed by the same small and caps letter at the same row and column are not significantly different, respectively ($p > 0.05$).

اسپینا و همکاران، ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌های مرکبات تجاری (پرتقال ، لیمو و ماندارین) شهر لیدا در کشور اسپانیا را بررسی نمودند. نتایج بررسی فعالیت ضدمیکروبی به روش دیسک دیفیوژن نشان داد که اسانس‌های لیمو و پرتقال هیچ گونه فعالیت مهاری نداشتند ولی اسانس ماندارین دارای فعالیت ضدمیکروبی متوسط و بسیار فعال به ترتیب برای ۳ سویه گرم مثبت و ۲ سویه گرم منفی بود به طوری که قطر هاله بازدارندگی برای *لیستریا مونوسیتوژنز*[1]، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *انتروکوکوس فاسیوم*[2] به ترتیب ۱٤/۱±۱٤/۰ ، ۱۸/۸±۱/۰ و ۱۳/۸±۱/۳ میلی‌متر و همچنین برای *اشرشیا کلی* و *سالمونلا اینتریدیس*[3] به ترتیب ۲/۲± ۲۰/۰ و ۰±/۵ ۲۱/۳ میلی‌متر بود [۲٤]. نتایج این پژوهش با نتایج مطالعه حاضر برای اسانس کلمنتین مطابقت داشت. بایگارو سالاک به تعیین فعالیت‌های بیولوژیکی اسانس کلمنتین، یکی از گونه‌های ماندارین، در کشور ترکیه پرداختند. در این پژوهش قطر هاله بازدارندگی برای قارچ *کاندیدا آلبیکنس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* به ترتیب حدود ۲۰، ۱٤/۱ و ۱۲/٦ میلی‌متر و کمتر از قطر هاله بازدارندگی آنتی بیوتیک‌های نیستاتین (۰/۵۸±۲۵/۳۳)، جنتامایسین (۱/۱۵± ۱۹/۳۳میلی‌متر) و آموکسی‌سیلین (۱/۰۰± ۲٦/۰۰میلی‌متر) بود [۲۵] که با نتایج مطالعه حاضر برای باکتری‌ها مطابقت و برای قارچ*کاندیدا آلبیکنس* مغایرت داشت. سلطانا و همکاران، تأثیر ترکیبات فرار پوست میوه *C. reticulata* Blanco را بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا تحت شرایط آزمایشگاهی بررسی نمودند. اسانس برای فعالیت ضدباکتریایی در برابر *اشرشیا کلی*

1. *Listeria monocytogenes*
2. *Enterococcus faecium*
3. *Salmonella Enteritidis*

و *استافیلوکوکوس اورئوس* و فعالیت ضد قارچ علیه *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس*[1]، *آسپرژیلوس فلاووس*[2] و *کاندیدا آلبیکنس* مورد بررسی قرار گرفت. اسانس در مقایسه با استاندارد، تتراسایکلین و فلوکونازول فعالیت ضدمیکروبی و ضدقارچ قابل توجهی در برابر سویه‌های میکروبی بیماری‌زا نشان داد[۲۶]. نتایج این پژوهش با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشت. ترکیبات شیمیایی خاص هر اسانس بر نحوه عملکرد و فعالیت ضدباکتریایی آن تأثیر می گذارد [۲۷]. علاوه بر این تعامل بین ترکیبات مختلف اسانس ها می‌تواند باعث افزایش اثرات ضدمیکروبی شود [۲۸]. نتایج حاصل از GC-MS در این مطالعه نشان داد که لیمونن بیشترین ترکیب اسانس‌های پوست کلمنتین و ماندارین را تشکیل می‌دهد. مطابق با نظر اسپینا و همکاران، درصد بالاتر لیمونن در کلمنتین (۷۸/۹۹) نسبت به ماندارین (۳۰/۱۸) نشان می‌دهد که لیمونن فعالیت ضدمیکروبی ضعیفی دارد [۲٤]. برخی از نویسندگان اثبات کرده‌اند که مونوترپن‌های اکسیژن‌دار نسبت به مونوترپن‌های هیدروکربن‌دار فعالیت ضدمیکروبی بالاتری دارند[۲۹و ۲۸]. در بین مونوترپن‌های اکسیژن‌دار کارون و اکسید لیمونن در برابر طیف گسترده‌ای از باکتری‌های بیماری‌زا فعال بودند [۳۰]. علاوه بر این، کارون باعث از بین رفتن شیبpH و پتانسیل غشای سلول‌ها می‌شود، که ممکن است وضعیت متابولیکی سلول‌ها را مختل کند[۲۸]. فعالیت بیشتر اسانس پوست ماندارین نسبت به اسانس پوست کلمنتین را می‌توان به حضور ترکیبات آلفا-هومولن (۰/۳۹٪) و آلفا-فارنسن (۳/۰۷٪) نسبت داد [۱۷]. گزارش شده است که لینالول، سیترال، کاریوفیلن اکسید ، آلفا-پینن وآلفا-ترپینول دارای فعالیت ضدقارچی و ضدباکتریایی هستند[۲۵].

٤- نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش ترکیبات شیمیایی اسانس‌های کلمنتین و ماندارین با دستگاه GC/MS شناسایی شد. ترکیبات شیمیایی اسانس‌های کلمنتین و ماندارین در مجموع ۹۱/۳۹ و ۷٦/۸۵ درصد بود که بخش عمده آن‌ها را مونوترپن‌های هیدروژن‌دار تشکیل می‌داد. نتایج وجود ترکیبات فنلی و پتانسیل ضداکسایشی اسانس‌های کلمنتین و ماندارین را تایید کرد، به طور کلی فعالیت ضداکسایشی اسانس ماندارین بیشتر از اسانس کلمنتین بود. قطر هاله عدم رشد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مورد بررسی برای هر دو اسانس نسبت به آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین و کلرامفنیکل کمتر بود. همچنین قطر هاله عدم رشد قارچ‌های مورد بررسی برای هر دو اسانس نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمفوتریسینB و نیستاتین بیشتر بود. نتایج نشان داد که به طور کلی اثر ضد قارچی اسانس‌های کلمنتین و ماندارین بیشتر از اثر ضدباکتریایی آن‌ها بود، همچنین باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت مقاومت بیشتری را در برابر اسانس‌ها از خود نشان دادند. در نهایت اسانس پوست ماندارین فعالیت ضدمیکروبی بالاتری را نسبت به اسانس پوست کلمنتین از خود نشان داد. یافته‌های این تحقیق نشان داد که اسانس پوست مرکبات توانایی ضداکسایشی و ضدمیکروبی خوبی داشته و به عنوان یک نگهدارنده طبیعی قابل استفاده در برخی فرآورده‌های غذایی هستند.

٥- سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به خاطر حمایت مالی انجام این تحقیق تشکر می‌نمایند.

٦- منابع

[1] Parseh, H., and Shahablavasani, A., 2019. Comparing total anthocyanins, total phenolics and antioxidant activities of extracts (aqueous, organic and anthocyanin) obtained from pomegranate (peel, juice, and seed) and antimicrobial activity of peel extracts on the four pathogenic bacteria. Journal of Food and Bioprocess Engineering, 3(1), 9-22.

[2] Chutia, M., Mahanta, J.J., Saikia, RC., Baruah, AKS., and Sarma, TC., 2006. Influence of leaf blight disease on yield of oil and its constituents of java citronella and in-vitro control of the pathogen using essential oils. World Journal of Agriculture Science, 2(3), 319-321.

[3] Soković, M., and van Griensven, LJ., 2006. Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. European Journal of Plant Pathology, 116(3), 211-224.

1. *Aspergillus fumigatus*
2. *Aspergillus flavus*

[4] Boudries, H., Loupassaki, S., Ladjal Ettoumi, Y., Souagui, S., Bachir Bey, M., Nabet, N., Chikhoune, A.,Madani, K., and Chibane, M., 2017. Chemical profile, antimicrobial and antioxidant activities of *Citrus reticulata* and *Citrus clementina* (L.) essential oils. International Food Research Journal, 24(4), 1782-1792.

[5] Wu, V.C.H., Qiu, X., Bushway, A., and Harper, L., 2008. Antibacterial effects of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) concentrate on foodborne pathogens. LWT-Food Science and Technology, 41(10), 1834-1841.

[6] Boudries, H., Madani, K., Touati, N., Souagui, S., Medouni, S., and Chibane, M., 2012. Pulp antioxidant activities, mineral contents and juice nutritional properties of Algerian Clementine cultivars and Mandarin. African Journal of Biotechnology, 11(18), 4285-4267.

[7] Moore, GA., 2001. Oranges and lemons: clues to the taxonomy of Citrus from molecular markers. Trends in Genetics, 17(9), 536-540.

[8] Hosni, K., Zahed, N., Chrif, R., Abid, I., Medfei, W., Kallel, M., Brahim, NB., and Sebei, H., 2010. Composition of peel essential oils from four selected Tunisian Citrus species: Evidence for the genotypic influence. Food Chemistry, 123(4), 1098-1104.

[9] Anwar, F., Naseer, R., Bhanger, MI., Ashraf, S., Talpur, FN., and Aladedunye, FA. 2008. Physico‐chemical characteristics of citrus seeds and seed oils from Pakistan. Journal of the American Oil Chemists' Society, 85(4), 321-330.

[10] Ferhat, MA., Meklati, BY., Smadja, J., and Chemat, F., 2006. An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. Journal of Chromatography A, 1112(1-2), 121-126.

[11] Cristani, M., D'Arrigo, M., Mandalari, G., Castelli, F., Sarpietro, M.G., Micieli, D., Venuti, V., Bisignano, G., Saija, A., and Trombetta, D., 2007. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(15), 6300-6308.

[12] Azhdarzadeh, F., Hojjati, M., and Tahmouzi Didehban, S., 2018. Chemical composition and antimicrobial activity of *Pelargonium roseum* essential oil from southwest of Iran. Journal of Food and Bioprocess Engineering, 1(1), 33-38.

[13] Wong PY., and Kitts DD., 2006. Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts. Food Chemistry, 97(3), 505-515.

[14] Shan B, Cai YZ, Sun M, and Corke H., 2005. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(20), 7749-7759.

[15] Behbahani, B.A., Shahidi, F., Yazdi, FT., Mortazavi, S.A., and Mohebbi, M., 2017. Use of Plantago major seed mucilage as a novel edible coating incorporated with *Anethum graveolens* essential oil on shelf life extension of beef in refrigerated storage. International Journal of Biological Macromolecules, 94, 515-526.

[16] Benkeblia, N., 2004. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). LWT-Food Science and Technology, 37(2), 263-268.

[17] Bourgou, S., Rahali, FZ., Ourghemmi, I., and Saïdani Tounsi, M., 2012. Changes of peel essential oil composition of four Tunisian citrus during fruit maturation. The Scientific World Journal, Article ID, 528593.

[18] Lota, M., de Rocca Serra, D., Tomi, F., and Casanova, J., 2001. Chemical variability of peel and leaf essential oils of 15 species of mandarins. Biochemical Systematics and Ecology, 29(1), 77-104.

[19] Huang, B., Ban, X., He, J., Tong, J., Tian, J., Wang, Y., 2009. Comparative analysis of essential oil components and antioxidant activity of extracts of Nelumbo nucifera from various areas of China. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(1), 441-448.

[20] 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(6), 43-57.

[21] Kamal, GM., Ashraf, MY., Hussain, AI., Shahzadi, A., and Chughtai, MI., 2013. Antioxidant potential of peel essential oils of three Pakistani citrus species: *Citrus reticulata*, *Citrus sinensis* and *Citrus paradisii*. Pakistan Journal of Botany, 45(4), 1449-1454.

[22] Ghasemi, K., Ghasemi, Y., and Ebrahimzadeh, M.A., 2009. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. Pakistan Journal of Pharmaceutical Science, 22(3), 277-281.

[23] Junior, M.R.M., e Silva, TAR., Franchi, G.C., Nowill, A., Pastore, G.M., and Hyslop, S., 2009. Antioxidant potential of aroma compounds obtained by limonene biotransformation of orange essential oil. Food Chemistry, 116(1), 8-12.

[24] Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P., García, D., and Pagán, R., 2011. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. Food Control, 22(6), 896-902.

[25] Baygar, T., and Saraç, N., 2018. Antimicrobial activity of clementine peel essential oil with its cytotoxic and in vitro wound healing potential on NIH-3T3 fibroblast cells. Mugla Journal of Science and Technology, 4(2), 143-147.

[26] Sultana, HS., Ali, M., and Panda, BP., 2012. Influence of volatile constituents of fruit peels of *Citrus reticulata* Blanco on clinically isolated pathogenic microorganisms under In–vitro. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2(3), 1299-1302.

[27] Dorman, HJD., and Deans, SG., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology, 88(2), 308-316.

[28] Burt, Sara. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. International Journal of Food Microbiology. 94(3), 223-253.

[29] Carson, CF., and Riley, TV., 1995. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. Journal of Applied Bacteriology, 78(3), 264-269.

[30] Aggarwal, KK., Khanuja, SPS., Ahmad, A., Kumar, TRS., Gupta, VK., and Kumar, S., 2002. Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. Flavour and Fragrance Journal, 17(1), 59-63.

Evaluation of chemical constituents, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of two citrus peel varieties

Hojjati, M. [1*], Omidi-Mirzaei, M. [2], Kiarsi, Z. [2]

1. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan
2. MS Student, Department of Food Science and Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan

(Received: 2020/01/15 Accepted: 2020/04/04)

The aim of this study was to extract and identify the volatile constituents of the essential oils of two species of citrus named Clementine and Mandarin and to investigate their antioxidant and antimicrobial potential. The compounds of the essential oils prepared by steam distillation were identified by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). The antioxidant abilities of the essential oils were evaluated by DPPH and ABTS assays. The antimicrobial activities of the essential oils were investigated using the disc diffusion method against three Gram-positive (*Staphylococcus aureus, Bacillus ceruse, and Bacillus subtilis*) and two Gram-negative (*Escherichia coli and Salmonella typhi*) bacteria, a yeast (*Candida albicans*) and a fungus (*Aspergillus niger*) in comparison with the synthetic antibiotics. The both essential oils were rich in hydrogenated monoterpens and limonene was the main compound in both essential oils. The highest percentage of DPPH and ABTS free radical scavenging was shown about 34.38% and 48.44%, respectively for Clementine essential oil and for Mandarin essential oil was 67.53% and 96.44%, respectively, at 900 ppm. The results showed that both essential oils inhibited the growth of the studied microorganisms and increasing the essential oil concentration, increased the zone of inhibition. The highest diameter of inhibition zone was observed in *Candida albicans* in both essential oils. The lowest inhibition zone for Clementine and Mandarin essential oils was also observed in *Escherichia coli* and *Aspergillus niger*, respectively. In general, the antifungal effect of both essential oils was more than their antibacterial effect. Based on these findings, citrus peel essential oil could be suggested as a natural preservative substance for use in food products.

Keywords: Limonene, GC/MS, Pathogenic bacteria, Disc diffusion agar

*Corresponding Author E-Mail Address: hojjati@asnrukh.ac.ir