

# تعیین حداقل غلظت باز دارنده برخی از اسانسها و اسید سیتریک در غیر فعال کردن میکروارگانیسمهای مولد فساد آب پرتقال

ویدا مقصودی<sup>۱\*</sup>، زهرا قبادی نژاد<sup>۲</sup>، مرجان سلطانزاده<sup>۳</sup>

۱- استادیار، مرکز مهندسی بیوشیمی دانشگاه صنعتی شریف

۲- کارشناس مرکز مهندسی بیوشیمی دانشگاه صنعتی شریف

۳- دانشجوی، مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی دانشگاه صنعتی شریف

## چکیده

در این مقاله حداقل غلظت باز دارنده (MIC) Minimum Inhibitory Concentration اسانسهای لیمون، لینالول و اسانس پوست پرتقال و یک اسید آلی (اسید سیتریک) علیه سه میکروارگانیسم مربوط به فساد آب پرتقال (ساکارومایسس سرویزیه، گلوکونوباکتر اکسیدانسان و لوکونوستوک مزنتروئیدیس) ، دو باکتری جدا شده از آب پرتقال فاسد شده و دو باکتری جدا شده از سطح پوست پرتقال شسته شده، تعیین گردید. منحنی بقا برای تمام میکروارگانیسمها رسم گردید. اسانس لیمون با غلظت کمتر از ۵٪ رشد مخمر ساکارومایسس سرویزیه و ISO-2 را مهار نمود. لینالول با غلظت کمتر از ۵٪ بر روی لکو نوستوک مزنتروئیدیس مؤثر بوده است؛ ولی، لیمون، لینالول، پوست پرتقال و اسید سیتریک با غلظت بیش از ۵ درصد مانع رشد باکتریهای ISO-2، ISO-3، ISO-4 1، ساکارومایسس سرویزیه و لکو نوستوک مزنتروئیدیس شده است. آزمایش منحنی بقا (Survivor Curve) نیز برای این شش باکتری انجام گردید.

**کلید واژگان:** حداقل غلظت بازدارنده، لیمون، لینالول، اسانس پوست پرتقال، اسید سیتریک

## ۱- مقدمه

فرایند سنتی پاستوریزاسیون آب پرتقال برای غیر فعال نمودن آنزیم پکتین متیل آستراز (PME) و از بین بردن میکروارگانیسمهای رشد یافته در آب پرتقال می باشد [1]. این فرایند گرمایی بر طعم تازه و طبیعی آب پرتقال اثر نامطلوبی دارا می باشد؛ اگر چه آب میوه غیر پاستوریزه دارای طعم مطبوع بوده ولی زمان نگهداری آن در اثر فساد میکروبی و آنزیمی، کوتاه می باشد. برای تولید آب میوه غیر پاستوریزه، می بایستی از پرتقال سالم و غیر معیوب آب گیری شده و آن را در وضعیت بسیار عالی بهداشتی و درجه حرارت پائین

نگهداری نمود. ایجاد وضعیت بهداشتی در سطح بسیار بالا برای آنگیری میوه، سبب پائین آمدن بار میکروبی محصول شده و سلامت آب میوه خام را تا مدت زمانی کوتاه تضمین می نماید. مهمترین میکروارگانیسمهایی که در فساد آب پرتقال مؤثر هستند، عبارتند از، مخمرها، قارچها و باکتریهای مقاوم به اسید [2]. مخمرها اغلب از جنس ساکارومایسس و قارچها متعلق به جنسهای آسپرژیلوس، پنسیلیوم، فوزاریوم [3] می باشند. باکتریهای مقاوم به اسید شامل باکتریهای اسید لاکتیک (لاکتوباسیلیوس و لکونوستوک) و باکتریهای مولد اسید استیک (استوباکتروگلوکونوباکتر) هستند [4].

\*مسئول مکاتبات: maghsodi@sharif.edu

کردیم [8]. بعد از رشد آنها را در پلیتهای حاوی PCA<sup>2</sup> از شرکت Merck تلقیح کرده و به مدت ۴۸ ساعت در ۳۰°C قرار دادیم. از محیطهای رشد یافته در پلیتها به عنوان کشت مورد کار<sup>۳</sup> برای آزمایش MIC و آزمایش منحنی مرگ<sup>۴</sup> استفاده گردید. این کشتها باید هر هفته تازه تهیه و در ۴°C نگهداری شوند.

## ۲-۲- جداسازی میکروارگانیسمها از آب پرتقال فاسد شده

آب پرتقال تازه را برای مدتی طولانی در دمای ۳۰°C نگهداشته تا عوامل فساد در آن مشاهده شود. سپس میکروبهایی که داخل آن رشد کرده‌اند را بعد از رقت‌سازی مناسب [9] در دو سری پلیت حاوی محیط OSA<sup>5</sup> از شرکت Merck و YM<sup>6</sup> پخش نمودیم. از سطح پرتقال شسته شده نیز دو نوع باکتری جدا گردید. محیط Orange Serum Agar به صورت آماده از شرکت Hi Media PVT Limited Bombay, 40008G, India, Laboratories و محیط YM<sup>۶</sup> با ترکیبات زیر تهیه گردید:

کلوگز = ۱۰ گرم/لیتر ، آگار = ۲۰ گرم / لیتر ، پیتون = ۱۰ گرم / لیتر، عصاره مخمر = ۱۰ گرم/ لیتر و آب = ۱ لیتر. بعد از ۲۴ ساعت رشد را در پلیتها بررسی کردیم و از کلنیهای تک، کشت خطی تهیه گردید و خالص‌سازی نمودیم. در این مرحله چهارباکتری جدا شدند که مشخصات فیزیولوژیک آنها از نظر رنگ آمیزی ومورفولوژی سلولی در جدول ۱ مشخص شده است. این ۴ میکروارگانیسم را نیز به طریق فوق به صورت کشت مورد کار آماده می‌کنیم.

## ۲-۳- آماده‌سازی مایه تلقیح

برای تعیین MIC، کشتهای مورد کار را بروی YM و TS تلقیح کرده و در دمای ۳۰°C - ۲۵°C به مدت ۱۹ تا ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس آنها را با آبگوشت مغذی مناسب رقیق کرده تا تعداد باکتریها  $10^7$  CFU/ml در یک

شستشوی مؤثر و استفاده از مواد شیمیایی بهداشتی موجب بالارفتن سطح کیفیت آب پرتقال غیر پاستوریزه می‌شود. انتخاب این مواد باید بر اساس تاثیر آنها در حداقل غلظت مصرفی، حداقل قیمت و حداقل فعالیتهای محیط زیستی (سلامت و ایمنی انسان ومحیطزیست) باشد. آزمایش برای انتخاب ماده شیمیایی بهداشتی، بر اساس تعیین غلظت مؤثره، مؤثر بودن بر علیه میکروارگانیسمهای خاص، اجرا و عملی می‌گردد و امتیاز اجرای این آزمایشها برای تعیین مقدار مؤثر ماده شیمیایی، ایمنی و اقتصادی بودن آن می‌باشد.

آزمایش ماده شیمیایی برای گروههای خاص میکروارگانیسمها مهم می‌باشد زیرا تعداد زیادی از این میکروارگانیسمها دارای گروهها و گونه‌های مقاوم می‌باشند [5]. تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC)، در مورد ترکیباتی که خاصیت ضد میکروبی دارند، اطلاعات مفیدی را فراهم می‌آورند و قبل از اجرای هر گونه آزمایش دیگر، این اطلاعات بسیار کمک کننده می‌باشند [6]. این آزمایش، حداقل غلظت بازدارنده هر ماده را علیه میکروب خاصی، تحت وضعیت خاص، تعیین می‌کند. آزمایش MIC به وسیله انتشار آگار، محیط کشت آبگوشت مغذی، و یا به وسیله روش منحنی بقا<sup>۱</sup> قابل اجرا می‌باشد [7]. هدف از اجرای این طرح، بررسی اثر سه نوع اسانس (لینالول، لیمونن، اسانس پوست پرتقال) و یک اسید آلی (اسید سیتریک) برای تعیین MIC آنها بر علیه میکروارگانیسمهایی که از سطح پرتقال و آب میوه آن جداسازی گردیده‌اند، می‌باشد.

## ۲- مواد و روشها

### ۲-۱- آماده‌سازی محیطهای کشت

کشتهای منجمد از ساکرومایسس سروریه و لکونوستوک مزترئوئیدیس را که قبلا از آب میوه فاسد جداسازی گردیده، ذوب نموده بهم زده و به اندازه یک لوپ به محیط (Medium YM) (Yeast) از شرکت Merck برای مخمرها و باکتریها را در آبگوشت (Tryptic Soy)TS تلقیح کردیم؛ سپس، آنها را در ۳۰°C به مدت ۲۴ ساعت نگهداری

1. Survivor Curve

2. Plate Count Agar  
3. Working Culture  
4. Kill-Curve  
5. Orange Serum Agar  
6. Yeast Medium  
7. Yeast Medium

باکتریهای و مخمر تعیین گردید. ابتدا از باکتری مورد نظر به اندازه یک لوپ در محیط TS کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرارداده و با تنظیم OD سوسپانسیون با تعداد  $10^7$  مخمر و  $10^7$  باکتری آماده کردیم. غلظتهای ۰/۲، ۰/۵ و ۱ درصد از لیمون، لینالول، اسانس پوست پرتقال و اسید سیتریک را آماده کرده و به میزان ۱۵ میلی لیتر PCA به غلظتهای بالا اضافه گردید. نمونه‌های آماده شده را اتو کلاو کرده و در پلیتهای استریل به میزان مساوی و با قطر یکسان پخش گردید. در مورد اسید سیتریک نحوه عمل فرق می‌کند زیرا اگر اسید سیتریک را با آگار مخلوط کنیم با پایین آوردن pH سبب می‌شود که آگار ژله ای نشود؛ بنابراین، ابتدا محیط PCA را در پلیتهای پخش کرده و بعد به میزان ۱ میلی لیتر از غلظتهای تهیه شده اسید سیتریک را روی آن ریخته تا خشک گردید و سپس بر روی تمام پلیتهای آماده شده برای تمام نگهدارنده‌ها به میزان مساوی از سوسپانسیون میکروبی اضافه و پخش کردیم و برای ۲۴ تا ۴۸ ساعت در انکوباتور  $30^{\circ}\text{C}$  قرار داده، رشد و یا عدم رشد را در غلظتهای مختلف بررسی کردیم.

میلی لیتر و تعداد مخمرها  $10^7\text{CFU/ml}$  در یک میلی لیتر بدست آید [5]. تعداد باکتری و مخمرها با بدست آوردن جذب آنها در  $600\text{nm}$  تخمین زده شدند. جذب مورد هدف برای باسیل گرم مثبت ۰/۲، برای کوکسی گرم مثبت ۰/۱۸، باسیل گرم منفی ۰/۰۵ و برای مخمرها ۰/۵ به عنوان آزمایش مقدماتی، می‌باشند. از سوسپانسیون‌های میکروبی به دست آمده برای تعیین MIC به عنوان مایه تلقیح استفاده گردید.

#### ۲-۴- آماده‌سازی مواد نگهدارنده

این محلولهای نگهدارنده شامل اسید سیتریک (از کمپانی Merck) به غلظت ۲۰٪، اسانسها (اسانس لینالول و لیمون با خلوص ۹۷ درصد از کارخانه Merck) با غلظت ۱۵٪، (اسانس پرتقال از شرکت کندلوس - ایران - چالوس) با غلظت ۱۵٪ و از محلول Tween 80 ۵ درصد (به عنوان عامل پخش) استفاده شد.

#### ۲-۵- تعیین MIC مواد نگهدارنده

در این بخش حداقل غلظت باز دارنده چهار نگهدارنده لیمون، لینالول، اسانس پوست پرتقال و اسید سیتریک برای

جدول ۱ مشخصات میکروارگانیسمهای جدا شده از آب پرتقال

شماره	میکروارگانیسم/شرح	منبع
YM-1	ساکرومایسیس سرویزیه	آب پرتقال فاسد شده
LAS-1	لکونوستوک مزنتروئیدیس	آب پرتقال فاسد شده
ISO-1	باسیل گرم منفی	آب پرتقال فاسد شده
ISO-2	استرپتوکوک	آب پرتقال فاسد شده
ISO-3	باسیل گرم مثبت	سطح پرتقال شسته شده
ISO-4	کوکسی	سطح پرتقال شسته شده

ISO = Isolate

جدول ۲ میزان MIC ۴- نگهدارنده برای میکروارگانیسمهای مورد بررسی

ISO-4	ISO-3	ISO-2	ISO-1	LAS-1	YM-1	میکروارگانیسم* نگهدارنده
بیشتر از درصد ۵	بیشتر از ۵ درصد	کمتر از ۵ درصد	بیشتر از ۵ درصد	بیشتر از ۵ درصد	کمتر از درصد ۵	لیمون
بیشتر از ۵ درصد	بیشتر از ۵ درصد	بیشتر از ۵ درصد	بیشتر از ۵ درصد	کمتر از درصد ۵	بیشتر از ۵ درصد	لینالول
بیشتر از ۵ درصد	بیشتر از ۵ درصد	بیشتر از ۵ درصد	بیشتر از ۵ درصد	بیشتر از ۵ درصد	بیشتر از ۵ درصد	اسانس پوست پرتقال
بیشتر از ۵ درصد	بیشتر از ۵ درصد	بیشتر از ۵ درصد	بیشتر از ۵ درصد	بیشتر از ۵ درصد	بیشتر از ۵ درصد	اسید سیتریک

\* حاصل از جدول ۱

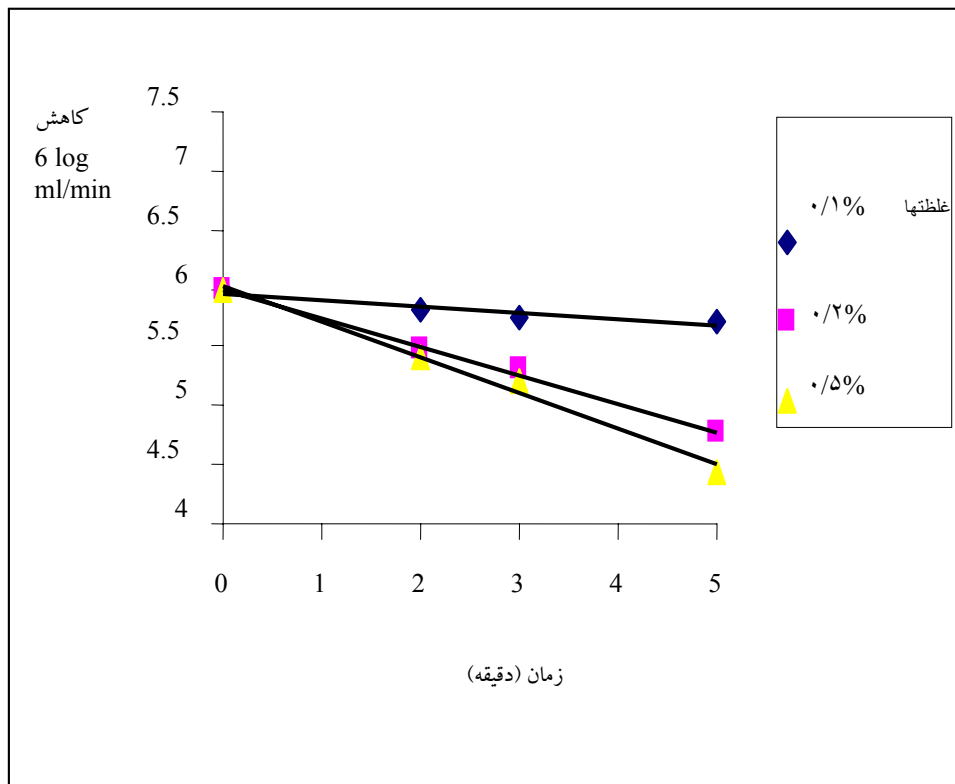
### ۶-۲- منحنی بقا (Survivor Curve)

به ۱۸ میلی لیتر از اسانسها و اسید سیتریک تهیه شده ۲ میلی لیتر از مایه تلقیح اضافه کردیم و آنها را به وسیله یک بهمنز مغناطیسی با سرعت کم، مخلوط کردیم، به طوریکه جمعیت میکروبی CFU/ml  $10^6$  باکتری و CFU/ml  $10^5$  مخمر به دست آمد. غلظت محلولها نیز قبلا تعیین شده است. یک میلی لیتر از هر نمونه را در تناوب ۱۵ ثانیه تا ۲ و ۳ و ۵ دقیقه برداشته و هر یک را بلافاصله با ۹ میلی لیتر محلول استریل ۰/۱ درصد پیتون رقیق کرده تا غلظتهای لازم برای شمارش میکروارگانیسمها در پلیتهای فراهم آید. در بعضی از موارد یک نمونه تا پایان ۱۰ دقیقه نیز برداشت گردید. سپس سریال رقتهای ساخته شده را بر روی پلیتهای OSA<sup>۱</sup> و PCA<sup>۲</sup> به صورت مضاعف کشت داده و به صورت وارونه در گرمخانه  $30^{\circ}\text{C}$  - ۲۵ به مدت ۴۸ - ۲۴ ساعت قرار داده شد. تعداد کلنیهای ظاهر شده با دستگاه (Colony Counter) شمارش گردید [10].

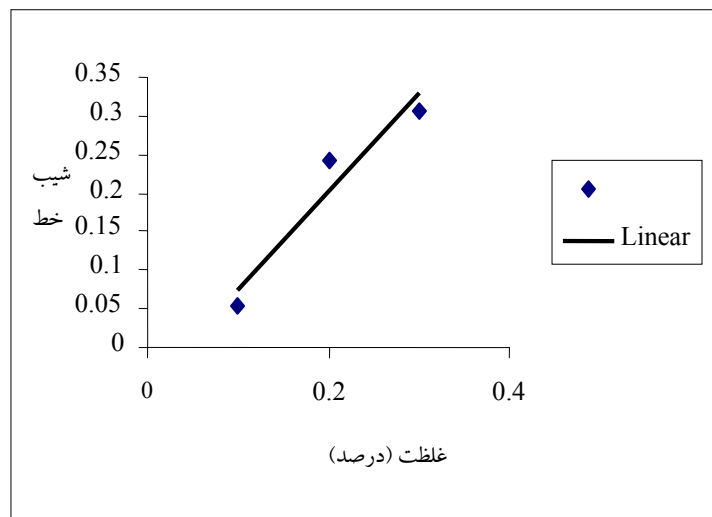
### ۳- نتایج و بحث

از آب پرتقال فاسد شده و از سطح پوست پرتقال چهار نوع باکتری جدا شد که مشخصات فیزیولوژیک آنها از نظر رنگ آمیزی و مورفولوژی سلولی در جدول ۱ مشخص شده است. در جدول ۲ نیز میزان MIC اسید سیتریک و اسانسها مشخص شده است. حداقل غلظت باز دارنده اسانس لیمون برای ساکرومایسیس سروزیه و ISO-2 کمتر از ۵ درصد، غلظت لینالول برای LAS-1 نیز کمتر از ۵ درصد و غلظت اسانس لینالول، لیمون، اسانس پوست پرتقال و اسید سیتریک بیشتر از ۵ درصد برای سایر میکروارگانیسمها به دست آمد. تعداد میکرو ارگانیسمهای زنده برای ۶ میکروارگانیسم در غلظتهای ۰/۲، ۰/۵ و ۱ در صد روغنیهای اسانسی رسم گردید و منحنی بقا به دست آمد.

1. Orange Serum Agar
2. Plate Count Agar



شکل ۱ منحنی بقا برای مخمر ساکرومسیس سرویزیه با استفاده از اسانس لیمون در غلظت‌های ۱/، ۲/ و ۵/ درصد



شکل ۲ غلظت مناسب لیمون برای کاهش 6 log ml/min برای مخمر ساکرومسیس سرویزیه

جدول ۳ غلظت روغنهای اسانسی را برای سایر میکروارگانیسمها نشان می‌دهد. غلظت اسانس لیمون برای ۶ لگارتیم کاهش در میلی لیتر در دقیقه برای میکروارگانیسمهای مورد آزمایش ۴/۷۶، ۸/۹، ۷/۵، ۴/۴۲ و بیش از ۱۰ درصد می‌باشد. همچنین غلظت اسانس لینالول ۹/۹، ۳/۵ و بیش از

شکل ۱ منحنی بقا را برای مخمر ساکرومسیس سرویزیه در تناوب زمانی ۵ دقیقه و اسانس لیمون نشان می‌دهد. غلظت لازم برای کاهش 6 log بر میلی لیتر در دقیقه این باکتری با رسم شیبهای خطوط رگرسیون منحنی بقا برحسب غلظت‌های مختلف اسانس لیمون ۷/۰۳ درصد به دست آمد (شکل ۲).

بنابراین، افزایش بیش از ده درصد آن به‌عنوان نگهدارنده سبب ترش شدن این ماده غذایی می‌گردد.

#### ۴- نتیجه گیری

از نتایج بدست آمده از تجربه فوق میتوان این طور استنباط کرد؛ اگر چه، اسانسها دارای خاصیت ضد میکروبی خوبی هستند و در بسیاری از مواد غذایی ممکن است مورد استفاده قرار بگیرند و بی ضرر بودن آنها نیز نسبت به نگهدارنده‌های شیمیایی در سلامت انسان تا بت شده است، معذالک غلظت کم آنها مناسب می باشد؛ چون اسانس حالت روغنی داشته و در فاز مایع مانند آب پرتقال بر سطح آن قرار می‌گیرد و غلظت بیش از ۱ تا ۲ درصد مناسب نمی‌باشد. اسید سستریک به‌عنوان پایین آورنده پ- هاش مناسب بوده و غلظت زیاد آن در افزایش به مواد غذایی سبب ترش شدن بیش از حد آن ماده بخصوص آب پرتقال می‌گردد.

۱۰ درصد ، غلظت اسانس پوست پرتقال ۶۷ ، ۷/۶ و بیش از ۱۰ درصد و غلظت اسید سستریک بیش از ۱۰ درصد به‌دست آمده است. با مقایسه این نتایج با نتایج به‌دست آمده از کار تحقیقاتی Winniczuk و همکاران [10] غلظت اسانس لیمون برای غیر فعال کردن مخمر ساکارومیسس سروزیه ۴/۵ درصد و برای سایر میکروارگانیسمها بیش از ده درصد بدست آمده است. غلظت اسید سستریک نیز در این تجربه بیش از ده درصد گزارش شده است . با توجه به نتایج فوق کارایی این نوع اسانسها برای غیر فعال کردن میکروارگانیسمهای مربوط به آب پرتقال از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نمی‌باشد و همچنین از نقطه نظر ارگانولپیتیکی نیز طعم ایجاد شده در آب پرتقال با این غلظت بالای اسانس مورد خوشایند مصرف کننده نمی‌باشد. اسیدسستریک نیز بطور طبیعی در آب پرتقال یافت می‌شود؛

جدول ۳ غلظت لازم(درصد حجمی) اسانسها و اسید سستریک برای ۶ لگارتیم کاهش در میلی لیتر در دقیقه میکروارگانیسمهای مورد آزمایش

نوع اسانس	ساکارومیسس		لکونوستوک	
	سروزیه	مزترئوئیدیس	Iso-1	Iso-2
	YM-1	LAS-1	Iso-3	Iso-4
لیمون	۴/۷۶	۸/۹	۷/۵	۴/۴۲
لینالول	۹/۹	۳/۵	>۱۰	>۱۰
اسانس پوست پرتقال	۶۷	۷/۶	>۱۰	>۱۰
اسید سستریک	>۱۰	>۱۰	>۱۰	>۱۰

#### ۵- منابع

- Short Course,, pp79-87 GainesVille University of Florida.
- [3] Parish. M. E. and Higgins, D. P. 1989. Yeast and molds isolated from spoilage citrus products and by- products. J Food Protect. Vol.52, pp261-263.
- [4] Murdock, D. I. 1977. Microbiology of citrus products. In Citrus Science and Technology, vol. 2 (Eds. Nagy, S., Shaw, P. E. and [1] Berry, R. E. and Veldhuis, M. K. 1977. Processing of oranges, grapefruits and tangerines. In Citrus Science and Technology, Vol. 2, (Eds. Nagy, S., Shaw, P. E. and Veldhuis, M. K.), Westport, CT, AVI Publishing.
- [2] Parish, M. E. 1988. Microbiological aspects of fresh squeezed Citrus juice. In Ready to serve Citrus Juices and Juice Added Beverges, Proceeding of the Food Industry

- antimicrobials. Food Technol. Vol. 43, No.1, pp148-155.
- [8] Atlas M. R. 1996. Handbook Microbiological Media.
- [9] Cappuccino J., Sherman N. 1996. Microbiology : A Laboratory Manual.
- [10] Winniczuk, P.P. and Parish M.E. 1997. Minimum inhibitory concentration of antimicrobials against micro-organisms related to citrus juice. Food Microbiology, Vol.14, pp 373-381.
- Veldhuis, M.K.) pp. 445-481, Westport, CT, AVI Publishing.
- [5] Parish. M. E. and Davidson, P. M. 1993. Methods for evaluation. In Antimicrobiol in Foods, (Eds. Davidson, P. M. and Branen, A.L.), New York, Marcel Dekker, Inc
- [6] Cremieux, A. and Fleurette, J. 1991. Methods of testing disinfectants. Disinfectants, Sterilization, and Preservation, 4<sup>th</sup> edn. (Ed. Block, S. S.) Philadelphia Lea and Febiger.
- [7] Davidson, P. M. and Parish, M. E. 1989. Methods for testing the efficacy of food

## Minimum Inhibitory Concentrations of Some Antimicrobials against Micro-organisms Related to Orange Juice

Magsoodi V. <sup>1\*</sup>, Ghobadi Nejad Z. <sup>2</sup>, Soltanzadeh M. <sup>3</sup>

1- Assistant Pro. in Biochemical and Bioenvironmental Research Center, Sharif Un. Of Tech., Tehran, Iran

2- Research Assistant in Biochemical and Bioenvironmental Research Center, Sharif Un. Of Tech., Tehran, Iran

3- B.Sc. Student, Chemical Engineering Dept., Sharif Un. Of Tech., Tehran, Iran

Minimum inhibitory concentrations (MIC) of some essential oils and citric acid were determined against two micro-organisms associated with spoilage of orange juice (*Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc mesenteroids*) and against four unidentified microorganisms isolated from citrus surface and spoiled orange juice. MIC for limonene were obtained less than 5% w/v aqueous against *Saccharomyces cerevisiae* and Iso-2.Linalool minimum inhibitory concentrations was less than 5% w/v aqueous for *Leuconostoc mesenteroids*. MIC for other microorganisms and essential oils and citric acid were determined more than 5 % w/v aqueous. Survivor Curve testing was conducted on 6 micro-organisms.

**Key words:** Minimum inhibitory concentration (MIC), Limonene, Linalool, Orange peel oil, Citric acid

---

\*Corresponding author E-mail address: maghsodi@sharif.edu