

فعالیت ضد باکتریایی عصاره لیموترش در بستنی تهیه شده در آزمایشگاه

سلطان محمد قاسمی^۱، هادی کوهساری^{۲*}، ابوالفضل فدوی^۳

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم صنایع غذایی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران

۲. گروه میکروبیولوژی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران.

۳. گروه علوم صنایع غذایی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران.

*نویسنده مسئول: hadikoohsari@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۰۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۱۱

چکیده:

در ایران تولید بستنی غیر پاستوریزه تحت عنوان بستنی سنتی بسیار رایج است. با توجه به استفاده روز افزون از ترکیبات گیاهی به عنوان بازدارنده رشد باکتری‌ها، این مطالعه به منظور بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره لیموترش علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* در بستنی تهیه شده در آزمایشگاه انجام شد. بدین منظور، بستنی‌های حاوی غلظت‌های ۱، ۲، ۵ و ۱۰ درصد عصاره لیموترش تهیه و سپس سوسپانسیون باکتریایی حاوی 10^5 CFU/gr به نمونه‌ها تلقیح شد. نمونه‌ها در کنار نمونه‌های شاهد در فریزر ۲۰- نگهداری شدند و در طی زمان‌های ۱، ۲، ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز با کشت در محیط‌های اختصاصی اثرات ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف آب‌لیمو مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که در تمامی غلظت‌ها، بین تعداد باکتری‌ها با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0.001$) و بیشترین اثرات ضدباکتریایی در غلظت ۱۰ درصد و در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ مشاهده شد. میانگین تعداد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در مقایسه با *اشریشیا کلی* به طور معنی‌داری کمتر بود ($P < 0.001$) که نشان از حساسیت بیشتر این باکتری می‌باشد. همچنین در مقایسه کاهش تعداد باکتری نسبت به گذشت زمان درصد کاهش باکتری‌ها بیشتر می‌شود و در هفته سوم بیشترین کاهش در میانگین تعداد باکتری‌ها رخ داد. به طور کلی نتایج حاکی از اثرات ضد باکتریایی عصاره لیموترش علیه باکتری‌های مورد آزمون در بافت بستنی سنتی است لذا استفاده از این ماده به عنوان یک نگهدارنده طبیعی را در جهت کاستن مسمومیت‌ها، مطرح می‌سازد.

واژگان کلیدی: آب لیمو ترش، بستنی، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی*.

مقدمه

رئولوژیکی خاص، طبع سرد و شیرینی دلپذیر، طرفداران کثیری را خصوصاً در فصول گرم سال به خود جلب نموده است. علیرغم پیشرفت تکنولوژی و استفاده از تجهیزات نوین در تهیه و تولید صنعتی این فرآورده، مصرف بستنی سنتی جایگاه خاص خود را در بین مردم حفظ نموده است. بستنی به دلیل دارا بودن شیر به عنوان یکی از ترکیبات اصلی، وجود ویتامین‌ها، املاح و مواد معدنی مورد نیاز به منظور رشد و تکثیر باکتری‌ها می‌باشد؛ بنابراین میکروبی‌ها در تمامی مراحل تهیه مواد اولیه، حین فرآیند آماده‌سازی، تولید و همچنین نگهداری و عرضه بستنی سنتی می‌توانند در آلودگی محصول نقش به‌سزایی را ایفا نمایند. از آنجایی که *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* توزیع بسیار

علیرغم پیشرفت‌های نوین در روش‌های تهیه و تولید مواد غذایی، سلامت و ایمنی مصرف‌کننده به‌طور روزافزون اهمیت می‌یابد. تخمین زده شده است که ۳۰ درصد از مردم در کشورهای صنعتی، حداقل یک بار در سال از بیماری‌های غذایی رنج می‌برند؛ بنابراین در حال حاضر نیز استفاده از روش‌هایی جهت کاهش یا حذف میکروارگانیسم‌های پاتوژن غذا به شدت احساس می‌شود (Burt, 2008; Ultee et al., 2002).

تولید بستنی سنتی در کشور ما، همگام با سایر کشورها از دیرباز معمول بوده است. این فرآورده به دلیل ماهیت

ویتامین نقش مهمی در جلوگیری از پیشرفت بیماری آترواسکلروزیز، سرطان، امراض قلبی و عفونت ها دارد. لیمو ترش دارای ماده ای به نام ترپین است که تولید کلسترول در بدن را کنترل می کند و مانع افزایش زیاد آن می شود و از سایر فواید آن می توان به مواردی هم چون بالا بردن عملکرد سیستم ایمنی بدن، تصفیه کننده خون، ضد نقرس، چاقی، دفع رسوبات ادراری و صفراوی، یرقان، مالاریا، استفاده در محل گزیدگی حشرات، ضد تیفوس، ضد سرخک، مخملک، روشن کننده پوست و... اشاره کرد (Takarada et al., 2002, Kawaii et al., 1999). از اینرو این مطالعه به منظور بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره لیمو ترش بر باکتریهای *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در بستنی سنتی انجام شد.

مواد و روش کار

تهیه عصاره لیمو ترش
میوه لیمو ترش در نیمه دوم خرداد از بازار محلی در شهرستان گرگان تهیه شد. پس از انجام مراحل پاک سازی و حذف هر گونه آلودگی از لیموهای تهیه شده، با رعایت مقررات و ضوابط بهداشتی با دستگاه آبمیوه گیری و با فشار دست، عصاره (آب) لیموهای ترش گرفته شد و در ظرف شیشه ای تمیز و در بسته نگهداری گردید.

تهیه سوسپانسیون میکروبی
باکتری های مورد استفاده یعنی *اشریشیا کلی* (PTCC 1338) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC1112) به صورت آمپول لیوفیلیزه از سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران تهیه شدند. جهت تهیه کشت تازه و فعال سازی سوبه های میکروبی از محیط های کشت نوترینت آگار و نوترینت برات (هایمدیا، هند) استفاده شد. پس از فعال سازی سوبه های میکروبی از کشت جوان ۲۴ ساعته هر یک از باکتری ها ۳-۲ کلنی در سه میلی لیتر محیط کشت مایع نوترینت برات تلقیح شد و در ۳۷ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری گردید تا کدورت معادل نیم مک فارلند فارلند (CFU/ml) $10^8 \times 1/5$ حاصل شود (محمودی و همکاران، ۱۳۸۹، محمدی و همکاران، ۱۳۹۰).

گسترده ای دارند، حذف کامل آن در بعضی غذاها غیرممکن ولی کنترل رشد آن در غذا ضروری است؛ بنابراین تلاش برای یافتن نگهدارنده مناسب جهت جلوگیری از رشد این - باکتری دارای اهمیت خواهد بود.

باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* درزمره عوامل بیماری زای حائز اهمیت در صنعت شیر است. *اشریشیا کلی* یک باکتری گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه و در ردیف مهم ترین باکتری های پاتوژن در مواد غذایی مسبب بیماری هایی نظیر گاستروانتریت، مسمومیت غذایی، عفونت خونی و عفونت سائراندامها است. مسمومیت غذایی استافیلوکوکی از مهم ترین مسمومیت های غذایی به شمار می آید به طوری که از مجموع حدود بیست و چهار میلیون مورد کل مسمومیت های غذایی گزارش شده در کشور ایالات متحده آمریکا ۸/۹ میلیون مورد آن مربوط به *استافیلوکوکوس اورئوس* بوده که بیش از یک سوم موارد کل مسمومیت های غذایی در این کشور است (Normanno, 2005; Jay, 2005).

لیموترش میوه رسیده گیاهی با نام علمی *Citrus limonum* و از خانواده روتاسه (Rutaceae) است که دارای روغن های فرار است. عصاره میوه لیمو ترش به رنگ سبز مایل به زرد و دارای بوی مطبوع و معطر بوده و طعم آن ترش و کمی تلخ است. لیمو ترش به دلیل داشتن میزان بالایی از اسیدهای آلی به ویژه اسیدسیتریک و ایجاد شرایط اسیدی در درمان بسیاری از عفونت های روده ای و جلوگیری از مسمومیت های غذایی به کار می رود (Zargari, 1989; Burt, 2004, Viuda-Martos et al., 2008).

اسانس لیمو ترش حاوی ۹۵-۹۲ درصد از ترپن های مختلف است. قسمت اعظم آن را لیمونن همراه با فلاندرن، کامفن و پی نن تشکیل می دهد. بوی مطبوع اسانس لیمو مربوط به وجود سیترال است که به مقدار ۷-۴ درصد در آن یافت می شود. به علاوه دارای ژرانیول آزاد، لینالول، سیترونلول و به مقدار کم از آلدئید نونیلیک و اسید آنترانیلیک است (Calabress et al., 1999, Manners, 2007). لیمو ترش منبع غنی از ویتامین ث بوده که یکی از مهم ترین آنتی اکسیدان های شناخته شده است طوری که این

بستنی حاوی غلظت های مختلف عصاره لیمو ترش را با استفاده از یک مقیاس حسی ۹ نمره ای مشخص نمودند. در این مقیاس نمره ۹ خیلی عالی، نمره ۸ عالی، نمره ۷ خوب، نمره ۶ نسبتاً خوب، نمره ۵ نه خوب و نه بد، نمره ۴ نسبتاً بد نمره ۳ بد، نمره ۲ خیلی بد و نهایتاً نمره ۱ فوق العاده بد لحاظ گردید (Meilgaard et al., 1991).

تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق هر آزمون حداقل در سه تکرار انجام شد و داده های حاصل بر اساس طرح کاملاً تصادفی و به کمک ANOVA یا آنالیز واریانس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگین ها با آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح معنی داری ($P < 0.001$) صورت گرفت و تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS و رسم نمودارها با نرم افزار Excel صورت گرفت.

نتایج

هرچه به غلظت عصاره لیمو ترش در زمان های مختلف افزوده می شود تعداد باکتری /شیرشیا کلی کاهش می یابد که این کاهش با افزایش زمان بیشتر شده است. مثلاً در بستنی حاوی ۵ درصد عصاره لیمو ترش تمامی /شیرشیا کلی های موجود در بستنی پس از ۲۱ روز کشته شدند. و وقتی غلظت عصاره لیمو ترش به ۱۰ درصد رسید کشته شدن تمامی باکتری ها در روز ۱۴ اتفاق افتاد (جدول ۱). بیشترین تأثیر عصاره لیمو ترش بر باکتری /شیرشیا کلی در روزهای هفتم و چهاردهم و بیست و یکم و در غلظت های ۲، ۵ و ۱۰ درصد صورت پذیرفته است یعنی از روز هفتم به بعد تعداد باکتری ها رو به کاهش است. همچنین بیشترین تأثیر کاهشی بر روی تعداد باکتری ها در غلظت ۱۰ و ۵ درصد و در روز چهاردهم و بیست و یکم اتفاق افتاده است (شکل ۱).

روش آزمایش

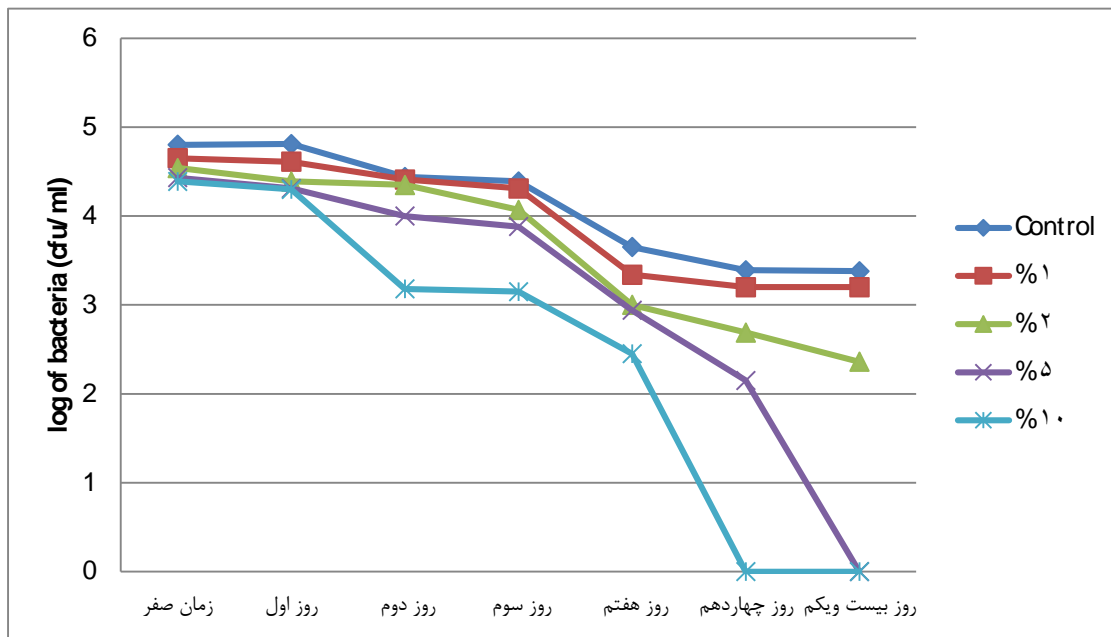
جهت تهیه بستنی در آزمایشگاه، شیر حرارت داده شد و به مقدار مناسب افزودنی های مورد نیاز (شکر و ثعلب) به شیر افزوده شد. از هر یک از سوسپانسیون های باکتریایی به طور مجزا به مایع بستنی آماده شده طوری افزوده شد که غلظت 10^5 CFU/ml از باکتری ها حاصل شود. سپس عصاره لیمو ترش به بستنی های تهیه شده در آزمایشگاه افزوده شد تا بستنی هایی حاوی غلظت های ۱، ۲، ۵ و ۱۰ درصد از این عصاره حاصل شود. این نمونه ها در کنار نمونه های فاقد عصاره و فاقد باکتری به عنوان شاهد در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده شد و در زمان های ۰، ۱، ۲، ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز با استفاده از استاندارد ۲۴۰۶ (سازمان ملی استاندارد ایران، ۱۳۷۲) و کشت بر روی محیط های کشت اختصاصی هر یک از باکتری ها (محیط ویولت رد بایل لاکتوز آگار برای /شیرشیا کلی و محیط کشت برد پارکر آگار برای /ستافیلوکوکوس /اورئوس) تعداد کلنی ها شمارش شده و نتایج (میانگین سه تکرار) به صورت واحدهای تشکیل دهنده کلنی Colony Forming Units (CFU) در هر گرم از نمونه گزارش شد (محمودی و همکاران، ۱۳۸۹، محمدی و همکاران، ۱۳۹۰).

ارزیابی حسی

برای ارزیابی ویژگی های حسی ناشی از افزودن عصاره لیمو ترش به بستنی فاقد باکتری از تست پذیرش حسی استفاده گردید برای این منظور بستنی فاقد باکتری /شیرشیا کلی و /ستافیلوکوکوس /اورئوس، تهیه شده با غلظت های مختلف عصاره لیمو ترش تهیه شده مورد ارزیابی حسی هفت نفر از داوران قرار گرفت. ارزیابی حسی به وسیله یک گروه هفت نفره که از کارکنان آزمایشگاه کنترل مواد خوراکی و آشامیدنی دانشگاه علوم پزشکی استان گلستان بودند، انجام شد. اعضای پانل معیار خود از ارزیابی حسی

جدول ۱- اثر غلظت‌های مختلف عصاره لیموترش بر کاهش تعداد باکتری/شیریشیا کلی در بستنی سنتی در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد

زمان نگهداری	کنترل	بستنی حاوی عصاره ۱٪	درصد کاهش	بستنی حاوی عصاره ۲٪	درصد کاهش	بستنی حاوی عصاره ۵٪	درصد کاهش	بستنی حاوی عصاره ۱۰٪	درصد کاهش
زمان صفر	$6/5 \times 10^4$	$4/6 \times 10^4$	۲۹/۲	$3/5 \times 10^4$	۴۶/۱۵	$2/7 \times 10^4$	۵۸/۴	$2/5 \times 10^4$	۶۱/۵
روز ۱	$6/5 \times 10^4$	$4/1 \times 10^4$	۳۶/۹	$2/55 \times 10^4$	۶۰/۷	$2/05 \times 10^4$	۶۸/۴	2×10^4	۶۹/۲
روز ۲	$2/8 \times 10^4$	$2/6 \times 10^4$	۷/۱۴	$2/2 \times 10^4$	۲۱/۴	$1/05 \times 10^4$	۶۲/۵	$1/6 \times 10^3$	۹۴/۲
روز ۳	$2/5 \times 10^4$	$2/05 \times 10^4$	۱۸	$1/2 \times 10^4$	۵۲	$7/7 \times 10^3$	۶۹/۲	$1/5 \times 10^3$	۹۴
روز هفتم	$4/5 \times 10^3$	$2/1 \times 10^3$	۵۳/۳	1×10^3	۷۷/۷	$8/7 \times 10^3$	۹۳/۳	3×10^2	۹۳/۳
روز چهاردهم	$2/55 \times 10^3$	1×10^3	۶۰/۷	5×10^2	۸۰/۳	$1/5 \times 10^2$	۹۴/۱	۰	۱۰۰
روز بیست و یکم	$2/45 \times 10^3$	$1/5 \times 10^3$	۳۶/۷۳	$2/3 \times 10^2$	۹۰/۴	۰	۱۰۰	۰	۱۰۰



شکل ۱- روند تغییرات تعداد/شیریشیا کلی در بستنی‌های حاوی غلظت‌های مختلف عصاره لیموترش در زمان نگهداری

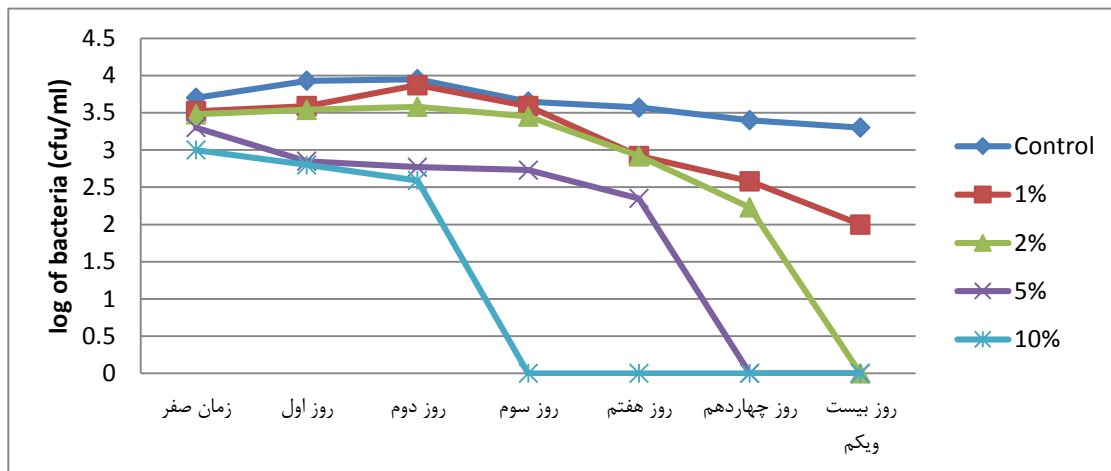
روز ۱۴ و روز سوم تمامی باکتری‌ها از بین می‌روند (جدول ۲). بررسی روند تغییرات استافیلوکوکوس اورئوس در بستنی‌های حاوی غلظت‌های مختلف عصاره لیموترش در طول زمان نشان داد که در روز اول و دوم روند کاهشی قابل ملاحظه‌ای مشاهده نشد ولی از روز سوم به بعد روند کاهشی تعداد باکتری‌ها مشاهده گردیده است، همچنین

روند کاهشی تعداد باکتری‌ها با گذشت زمان در بستنی‌های حاوی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نیز مشاهده شد. باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در مجاورت با غلظت‌های مختلف عصاره لیموترش حساسیت بیشتری نسبت به شیریشیا کلی نشان داد به طوری که مرگ تمامی استافیلوکوکوس اورئوس‌ها در غلظت ۲٪ و در روز ۲۱ اتفاق می‌افتد و با افزایش غلظت به ۵ و ۱۰ درصد به ترتیب در

بیشترین تأثیر کاهش بر روی تعداد باکتری‌ها در غلظت ۵ و ۱۰٪ و در روز بیست و یکم اتفاق افتاده است (شکل ۲).

جدول ۲- اثر غلظت‌های مختلف عصاره لیمو ترش بر کاهش تعداد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در بستنی سنتی در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد

زمان نگهداری	کنترل	بستنی حاوی ۱٪ عصاره	درصد کاهش	بستنی حاوی ۲٪ عصاره	درصد کاهش	بستنی حاوی ۵٪ عصاره	درصد کاهش	بستنی حاوی ۱۰٪ عصاره	درصد کاهش
زمان صفر	$5/1 \times 10^3$	$3/2 \times 10^3$	۳۷/۲۵	$3/05 \times 10^3$	۴۰/۱	$2/5 \times 10^3$	۵۰/۹	$1/1 \times 10^3$	۷۸/۴
روز ۱	$8/6 \times 10^3$	4×10^3	۵۳/۴	$3/55 \times 10^3$	۵۸/۷	$7/15 \times 10^3$	۹۱/۶	$6/45 \times 10^3$	۹۲/۵
روز ۲	$9/1 \times 10^3$	$7/6 \times 10^3$	۱۶/۴۸	$3/8 \times 10^3$	۵۷/۶	$5/95 \times 10^3$	۹۳/۴	$4/1 \times 10^3$	۹۵/۴
روز ۳	$4/6 \times 10^3$	$3/95 \times 10^3$	۱۵/۲	$2/8 \times 10^3$	۳۸	$5/45 \times 10^3$	۸۸/۱۵	۰	۱۰۰
روز هفتم	$3/8 \times 10^3$	$8/5 \times 10^3$	۷۷/۶۳	$8/5 \times 10^3$	۷۷/۶	$2/3 \times 10^3$	۹۳/۹	۰	۱۰۰
روز چهاردهم	$2/5 \times 10^3$	$3/85 \times 10^3$	۸۴/۸	2×10^3	۹۲	۰	۱۰۰	۰	۱۰۰
روز بیست و یکم	2×10^3	1×10^3	۹۰	۰	۱۰۰	۰	۱۰۰	۰	۱۰۰



شکل ۲- روند تغییرات تعداد *استافیلوکوکوس اورئوس* در بستنی‌های حاوی غلظت‌های مختلف عصاره لیمو ترش در طول زمان نگهداری

درصد کاهش نسبت به حالت عدم افزودن آبلیمو معنی دار است ($P < 0/001$). اختلاف معنی داری بین غلظت‌های ۱، ۵ و ۲ درصد وجود دارد اما بین غلظت ۱ درصد و بقیه غلظت‌ها اختلاف معنی داری وجود ندارد.

همچنین در مقایسه کاهش تعداد باکتری در طول زمان نیز مشاهده شد که با گذشت زمان تعداد باکتری‌ها کاهش پیدا

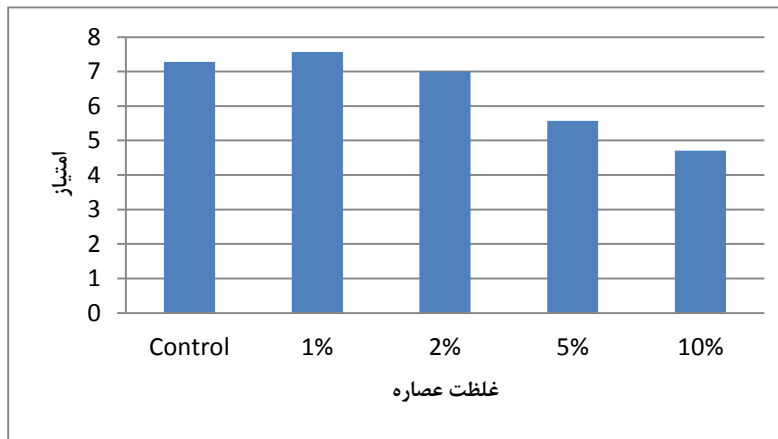
در مقایسه میانگین تعداد باکتری در غلظت‌های مختلف آبلیمو با گروه کنترل مشاهده شد که میانگین تعداد باکتری در همه غلظت‌های آب لیمو به طور معنی داری کمتر از میانگین تعداد باکتری در گروه کنترل است و نسبت به گروه کنترل بیشترین کاهش در تعداد باکتری در غلظت ۱۰ درصد آبلیمو رخ داده است. در سایر غلظت‌های آبلیمو نیز

استافیلوکوکوس اورئوس به طور معنی داری بیشتر از اشیریشیا کلی است ($P < 0.001$).

ارزیابی حسی بستنی‌های حاوی غلظت‌های مختلف عصاره لیمو ترش نشان داد که بستنی حاوی ۱ درصد عصاره لیمو ترش از نظر داوران بهترین شرایط را از نظر طعم و مزه (حسی) دارد. بستنی حاوی ۲ درصد عصاره لیمو ترش از نظر حسی شرایط بسیار مطلوبی داشت ولی با افزایش غلظت مصرف کنندگان (داوران) از ترشی حاصل از افزودن لیمو ترش شکایت داشتند (شکل ۳). لازم به ذکر می‌باشد که نمونه بستنی حاوی ۱ درصد عصاره لیمو ترش حتی از نمونه بستنی شاهد امتیاز بیشتری را به خود اختصاص داده است که علت آن می‌تواند خوشایند نبودن طعم و مزه نمونه بستنی شاهد، بدلیل عدم استفاده از مواد طعم دهنده باشد.

کرده است به طوری که در هفته سوم بیشترین کاهش در میانگین تعداد باکتری مشاهده شده است و نسبت به شروع مطالعه در هفته‌های اول، دوم و سوم درصد کاهش معنی دار است ولی در روزهای اول و دوم کاهش معنی داری دیده نشده است (به ترتیب $P = 0.633$ و $P = 0.128$). بدین معنی که بین روز سوم، هفته اول، هفته دوم و هفته سوم اختلاف معنی داری وجود دارد ولی بین روز اول و دوم در مقایسه با بقیه زمان‌ها اختلاف معنی داری مشاهده نشد.

در مقایسه بین دو نوع باکتری به طور کلی (با در نظر گرفتن تمام زمان‌ها و تمام غلظت‌ها روی هم رفته) نتایج نشان داد که درصد کاهش باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به باکتری اشیریشیا کلی بیشتر بوده است که این اختلاف از نظر آماری معنی دار است یعنی تاثیر آبلیمو در از بین بردن



شکل ۳- میزان رضایت ارزیابی حسی از بستنی حاوی غلظت‌های مختلف عصاره لیموترش

های حاوی غلظت‌های مختلف آبلیمو به طور معنی داری کمتر از میانگین تعداد باکتری در گروه کنترل بود.

از دیگر نتایج این تحقیق تاثیر دوره نگهداری بر تاثیر گذاری عصاره لیمو ترش بود به طوری که با گذشت زمان تعداد باکتری‌ها کاهش یافت و در هفته سوم بیشترین کاهش در میانگین تعداد باکتری مشاهده شده است.

مرادی و محمدی ثانی (۲۰۱۲) با استخراج عصاره آبی گیاه تیموس ولگاریس به بررسی اثرات ضد باکتریایی آن علیه استافیلوکوکوس اورئوس، اشیریشیا کلی و سالمونلا در سه غلظت ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد در بستنی پرداختند، نتایج آنها

بحث

اثرات ضد باکتریایی عصاره لیمو ترش علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیا کلی در شرایط آزمایشگاهی و خارج از بافت مواد غذایی در مطالعات متعددی به اثبات رسیده است (Sudhir et al., 2015; Okeke et al., 2012; رفیعی و همکاران، ۱۳۹۱).

نتایج این تحقیق حاکی از اثرات ضد باکتریایی عصاره لیمو ترش بر باکتری‌های مورد آزمون در بافت بستنی سنتی بود به طوری که میانگین میانگین تعداد باکتری در همه بستنی-

جنوبی (Paz, 1995)، آفریقا (Vlietinck, 1995.)، و استرالیا (Kudi, 1999) و استرالیا (Palombo, 2001) نشان داده شده است. مطالعات نشان داده است که دیواره سلولی باکتریهای گرم مثبت نسبت به باکتریهای گرم منفی در مقابل بسیاری از آنتی بیوتیکها، ترکیبات شیمیایی ضد میکروبی (Krittika, 2007) و حتی بسیاری از داروهای گیاهی (Sharifa, 2008) حساسیت زیادی دارند. وجود لایه لیپولی ساکاریدی دیواره و نیز فضای پری پلاسمیک از دلایل مهم این مقاومت نسبی گرم منفیها میباشد. گزارش شده است که باکتریهای گرم منفی نسبت به عوامل شیمیایی مقاومتر از انواع گرم مثبت هستند (Tortora, 2001).

مسمومیت‌های غذایی و عوارض آن یکی از مشکلات اساسی تمام جوامع است. این موضوع حتی در کشورهای پیشرفته دنیا نیز به میزان زیادی دیده میشود. از این رو افزایش بیماری‌های ناشی از مواد غذایی بسیار نگران کننده تلقی میشود. امروزه مصرف کنندگان با توجه به اثرات مضر نگهدارنده‌های غذایی شیمیایی و سنتتیک خواهان استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی مشتق از منابع گیاهی هستند تا علاوه بر افزایش زمان ماندگاری غذا از اثرات مضر نگهدارنده‌های غذایی شیمیایی مصون باشند. همچنین ترکیبات مشتق از گیاهان باعث بهبود طعم و مزه میشوند که مصرف کنندگان آن را نسبت به مواد شیمیایی ترجیح میدهند (Sharififar et al., 2007). نتایج این تحقیق، استفاده از عصاره لیمو ترش به عنوان یک افزودنی مناسب به مواد غذایی را مطرح می‌سازد که به عنوان یک ماده نگهدارنده طبیعی، مانع فعالیت آلوده کننده‌های بستنی سنتی شود و گمان می‌رود مصرف آن در بستنی‌های سنتی از آمار مسمومیت‌ها می‌کاهد. به این منظور آنالیز ترکیبات شیمیایی عصاره لیمو ترش جهت شناسایی ترکیبات موثره ضد میکروبی پیشنهاد می‌شود.

حاکمی از اثرات ضد میکروبی غلظت ۲۰٪ عصاره مذکور بود (مرادی و محمدی ثانی، ۲۰۱۲).

در مطالعه دیگری به بررسی اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی بره موم علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در بستنی تهیه شده در آزمایشگاه پرداخته شد. عصاره در سه غلظت ۱۰۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر لیتر مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های پژوهش فوق نشان داد که بیشترین تأثیر ضد باکتریایی در غلظت ۶۰۰ میلی گرم بر لیتر و در روز سوم مشاهده شد. به عبارت دیگر هرچه به غلظت عصاره در زمانهای مختلف افزوده می‌شود تعداد باکتری‌ها کاهش می‌یابد این کاهش با افزایش زمان بیشتر می‌شود که با نتایج پژوهش ما منطبق است (El-Bassiony et al., 2012).

محمدی و همکاران (۱۳۹۰) نیز در مطالعه خود به این نتیجه رسیدند که مدت زمان نگهداری بر لگاریتم تعداد باکتری *اشریشیا کلی* در طی مرحله تولید و نگهداری پنیر سفید آب نمکی حاوی غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی تأثیر آماری معناداری دارد ($P < 0.05$) (محمدی و همکاران، ۱۳۹۰).

کاهش رشد باکتری *اشریشیا کلی* در طول دوره نگهداری همزمان با افزایش غلظت اسانس آویشن شیرازی در گوشت چرخ کرده در مطالعه نوری و همکاران گزارش شد که با مطالعه حاضر همخوانی دارد.

از نتایج دیگر مطالعه حاضر این بود که میانگین تعداد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌ها به طور معنی داری کمتر از تعداد باکتری *اشریشیا کلی* بود و این نشان از حساسیت بیشتر *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به *اشریشیا کلی* در بافت بستنی سنتی بود. به طور کلی باکتریهای گرم مثبت نسبت به عصاره‌های گیاهی حساس‌تر از باکتریهای گرم منفی می‌باشند که این پدیده ممکن است به علت تحمل ذاتی گرم منفی‌ها و ماهیت و ترکیبات گیاهی باشد (Krittika, 2007). حساسیت بیشتر باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی در برابر عصاره‌های گیاهان، در مطالعات متعددی از جمله در آمریکای

application in foods-a review. Int J Food Microbiol.94 (3): 223-253.

- 7- Calabrese, V., Randazzo, S.D., Catalano, C., and Rizza, V. 1999. Biochemical studies on a novel antioxidant from lemon oil and its biotechnological application in cosmetic dermatology. Drugs Exp Clin Res.25: 219-225.
- 8- El-Bassiony, T.A., Saad, N.M., and El-Zamkan, M.A. 2012. Study on the antimicrobial activity of Ethanol Extract of Propolis against Enterotoxigenic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in lab prepared Ice-cream, Vet. World. 5(3):155-159.
- 9- Jay, M.J. 2005. Modern Food Microbiology. 7th ed. An Aspen Publication, pp: 323,441-6.
- 10- Kawaii, S., Tomono, Y., and Katase, E. 1999. Antiproliferative effects of the readily extractable fractions prepared from various citrus juices on several cancer cell lines. J Agric Food Chem. 47(7):2509-12.
- 11- Krittika, N. 2007. Antimicrobial effect of five *Zingiberaceae* Essential oils. Molecules. 12:2047-2060.
- 12- Kudi, A.C., Uhoh, J.U., Eduvie, L.O., and Gefu, J. 1999. Screening of some Nigerian medicinal plants for antibacterial activity, J Ethnopharmacol. 67: 225-228.
- 13- Manners, G.D. 2007. *Citrus limonoids*: analysis, bioactivity, and biomedical prospects. J Agric Food Chem. 55 (21):8285-94.
- 14- Meilgaard, M.C., Civille, G.V., and Carr, B.T. 1991. Sensory evaluation techniques. 2nd edition. Crc prees, inc. bocaration, florida. pp: 345-386.
- 15- Moradi, E., and Mohamadi Sani, A. 2012. The investigation of antimicrobial effect of *Thymus vulgaris* on ice-cream. Research in Pharmaceutical Sciences.7 (5):772.

منابع

- ۱- رفیعی، فاطمه و رضانی، رضا. (۱۳۹۱). بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس و عصاره (آب) لیمو ترش بر میکروارگانیسم های دهانی. مجله علمی پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی، دوره چهارم. شماره ۱۴، صفحه ۱۲-۷.
- ۲- سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۷۲). حد مجاز آلودگیهای میکروبی در فرآوردههای شیر. استاندارد شماره ۲۴۰۶.
- ۳- نوری، نگین، رکنی، نوردهر، آخوندزاده بستی، افشین، میثاقی، علی، دباغ مقدم، آراسب، رعیت، رامک یحیی و قنبری سقرلو، نسطونا. (۱۳۹۱). اثر ضد میکروبی اسانس آویشن شیرازی *E.coli* *O157:H7* در گوشت چرخ کرده گوساله در طی نگهداری در دمای یخچالی به منظور جایگزینی با نگهدارنده های شیمیایی و تامین سلامت مصرف کنندگان. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران، شماره ۳، صفحه ۱۹۷-۱۹۲.
- ۴- محمدی، خسرو، کریم، گیتی، حنیفیان، شهرام، تاری نژاد، علیرضا و قاسم نژاد، رضا. (۱۳۹۰). مطالعه تأثیر اسانس گیاه آویشن شیرازی بر باکتری *شریشیاکلی* در پنیر سفید آب نمکی طی فرایند نگهداری. مجله بهداشت مواد غذایی، دوره ۱، شماره ۲، ص ۷۸-۶۹.
- ۵- محمودی، رزاق، احسانی، علی، تاجیک، حسین، آخوندزاده بستی، افشین و خسرو شاهی اصل، اصغر. (۱۳۸۹). اثر ضد میکروبی اسانس پونه کوهی و لاکتوباسیلوس کازویی بر استافیلوکوکوس اورئوس در پنیر سفید ایرانی. مجله پژوهش های صنایع غذایی، شماره ۱، ص ۱۶۱-۱۴۸.
- 6- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential

- against oral pathogens. *Oral Microbiol Immunol.* 19:61-4.
- 24- Tortora, G.J., Funke, B.R., and Case, C.L. 2001. *Microbiology: An Introduction*, Benjamin Cummings, San Francisco. 12.
- 25- Ultee, A., Bennik, H.J., and Moezelaar, R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microb.* 68: 1561-1568.
- 26- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J and Alvarez, A. 2008. "Antibacterial activity of lemon (*Citrus lemon L.*), mandarin (*Citrus reticulata L.*), grapefruit (*Citrus paradisi L.*) and orange (*Citrus sinensis L.*) essential oils. *J Food Safety.* 28(4): 567-576.
- 27- Vlietinck, A.J., van Hoof, L., Totte, J., Lasure, A., Vanden Berghe, D., Rwangabo, P.C., and Mvukiyumwani, J. 1995. Screening of a hundred Rwandese medicinal plants for antimicrobial and antiviral properties, *J Ethnopharmacol.* 46: 31-47
- 28- Zargari, A. 1989. *Pharmaceutical plants*, Tehran University Publications. 1: 488
- 16- Normanno, G. 2005. Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *I Int J Food Microbial.* 98:73-79.
- 17- Okeke, M.I., Okoli, A.S., Eze, E.N., Ekwume, G.C., Okosa, E.U., and Iroegbu, C.U. 2015. Antibacterial activity of *Citrus limonum* fruit juice extract. *Pak J Pharm Sci.* 28(5):1567-71.
- 18- Palombo, E.A., and Semple, S.J. 2001. Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants, *J Ethnopharmacol.* 77: 151-157.
- 19- Paz, E.A., Cerdeiras, M.P., Fernandez, J., Ferreira, F., Moyna, P., Soubes, M., Vazquez, A., Vero, S., and Zunino, L. 1995. Screening of Uruguayan medicinal plants for antimicrobial activity, *J Ethnopharmacol.* 45: 67-70.
- 20- Sharifa, A.A., Neoh, Y.L., Iswadi, M.I., Khairul, O., Abdul Halim, M., Jamaludin, M., Mohamed Azman, A.B., and Hing, H.L. 2008. Effects of Methanol, Ethanol and Aqueous Extract of *Plantago majoron* Gram Positive Bacteria, Gram Negative Bacteria and Yeast. *Annals of Microscopy.* 8:42-44.
- 21- Sharififar, F., Moshafi, M.H., Mansouri, S.H., Khodashenas, M., and Khoshnoodi, M. 2007. In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora Boiss.* *Journal of Food Control.* 18: 800-805.
- 22- Sudhir, K., Singh Defender, N., and Vijay, K. 2012. Evaluation the Antibacterial Activity of Plant Extracts against Bacterial Pathogens. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics.* 2(4), 182-185.
- 23- Takarada, K., Kimizuka, R., Takahashi, N., Honma, K., Okuda, K., and Kato, T.A. 2002. Comparison of the antibacterial efficacies of essential oils

The antibacterial activity of lemon juice in laboratory prepared ice cream

Ghasemi S.M¹, Koohsari H^{*2}, Fadavi A³

1. Graduated student, Department of Food Science and technology, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran.
2. Department of Microbiology, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran.
3. Department of Food Science and technology, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran.

*Corresponding author: hadikoohsari@yahoo.com

Received: 31 Jan 2016

Accepted: 27 Jan 2017

Abstract

Unpasteurized as traditional ice cream production in Iran is very common due to the increasing use of herbal compounds as inhibitors of microbial growth, this study to examine the antibacterial effects of Lemon juice against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in Ice cream prepared in the laboratory. In order to do it, ice creams containing concentrations of 1, 2, 5, and 10% lemon juice was prepared. The samples were inoculated with bacterial suspension containing 10^5 cfu/gr. The samples were stored in the freezer -20 °C. During the time of 1, 2, 3, 7, 14 and 21 days, antibacterial effects of various concentrations of lemon juice was evaluated after culture in specific media. The results showed that in all concentrations, significant difference was observed between the number of bacteria with the control group ($P < 0.001$) and the greatest antibacterial effect was observed at concentrations of 10% and at 7, 14 and 21 days. The average number of *S. aureus* in compared with the *E. coli* significantly was lower ($P < 0.001$) showing more sensitivity of these bacteria. Reducing the number of bacteria increase over time and in the third week the greatest reduction in the average number of bacteria was observed. Overall, the results suggest that lemon extract has antibacterial effects against bacteria tested in traditional ice cream so, using it can be considered as a natural preservative in order to reduce poisoning.

Keywords: Lemon Juice, Ice cream, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*