اثرات ضدمیکروبی عصاره متانولی پوست انار در آب‌سیب علیه *ساکارومایسس سرویزیه*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *آلیسایکلوباسیلوس اسیدوترستریس*

زینب رضوانی فرد[1]، محمدرضا اسحاقی[2]*، سید مهدی حسن زاده[3]

[1] دانشجوی کارشناسی ارشد صنایع غذایی، واحد ورامین، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران.

[2] مدیر گروه تحصیلات تکمیلی صنایع غذایی، واحد ورامین، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران.

[3] انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

***نویسنده مسئول:** *mr.eshaghi@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۱۴

چکیده

هدف از این تحقیق بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره متانولی پوست انار بر روی *ساکارومایسس سرویزیه* PTCC 5269، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* PTCC 1058 و *آلیسایکلوباسیلوس اسیدوترستریس* ATCC 49025 در آب‌سیب می‌باشد. سه غلظت متفاوت از عصاره پوست انار (۲۵۰ ، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) و تیمار شاهد تهیه گردید. تیمارها در دمای یخچال برای ۶۰ روز نگه‌داری گردید و از جهت اسیدیته، pH، کدورت، درجه بریکس، آنالیز میکروبی، در روزهای صفر، ۳۰ و ۶۰ مورد آزمایش قرار گرفت. با افزایش زمان نگه‌داری و همچنین افزایش غلظت عصاره افزایش اسیدیته و کاهش pH مشاهده گردید. با توجه به خصوصیات فیزیکوشیمیایی و ماندگاری آب‌سیب، نهایتاً تیمار با ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره فنولی پوست انار به عنوان تیمار بهینه تشخیص داده شد. نتایج نشان داد که عصاره‌ی الکلی پوست انار به عنوان یک نگه‌دارنده طبیعی و اثرگذار در کاهش کدورت در آب‌سیب در دمای یخچال مطرح می‌باشد.

کلید واژه ها: عصاره متانولی، پوست انار، *ساکارومایسس سرویزیه*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *آلیسایکلوباسیلوس اسیدوترستریس*.

مقدمه

امروزه استفاده از مواد نگه‌دارنده شیمیایی، مانند بنزوات و اسید سوربیک و سولفیت‌ها در آب‌میوه‌ها متداول است (Eissa et al., 2008). از عوامل ایجاد کننده فساد در آبمیوه‌ها، باکتری‌ها و مخمرها می‌باشند. در این میان، باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[1] و مخمر *ساکارومایسس سرویزیه*[2] از عوامل شایع در فساد آب‌میوه‌ها شناخته شده‌اند. *ساکارومایسس سرویزیه* با دکربوکسیله کردن اسید سوربیک و تبدیل آن به ۳،۱- پنتا دی ان و هم‌چنین تولید دی‌اکسیدکربن و اتانول طی فرآیند تخمیر، باعث ایجاد عطر و طعم نامطلوبی در آب‌میوه‌ها می‌گردد. *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* نیز تأثیر بسزایی در ایجاد طعم نامطلوب در آب-میوه‌ها دارد. این باکتری ضمن تولید دی‌استیل به عنوان یک متابولیت فرار، باعث تغییر طعم آب‌میوه‌ها می‌گردد (Bakkali et al., 2008).

پژوهشگران تاکنون روش‌های مختلفی از جمله استفاده از عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی را جهت ممانعت از فعالیت این میکروارگانیسم‌ها در آبمیوه‌ها به‌کار گرفته‌اند (قهفرخی و همکاران، ۱۳۹۳).

در سال‌های اخیر، فعالیت‌های ضدمیکروبی و ضدآنزیمی عصاره و روغن‌های اساسی با منشأ گیاهی در مواد غذایی مختلف مورد بررسی قرار گرفته است (Kaya et al., 2015).

امروزه فواید استفاده از ترکیبات ضدّمیکروبی و مهارکننده‌ی واکنش‌های قهوه‌ای شدن آنزیمی طبیعی، به اثبات رسیده است (Eissa et al., 2008). استفاده از ترکیبات گیاهی برای درمان عفونت‌ها، یک روش قدیمی در اکثر نقاط جهان، به‌خصوص در کشورهای توسعه یافته است و با توجه به اثرات مضر نگه‌دارنده‌های شیمیایی مواد غذایی، استفاده از نگه‌دارنده‌های طبیعی رشد روز افزونی پیدا کرده است (Char et al., 2010). در سال‌های اخیر

[1] *Lactobacillus Plantarum*
[2] *Saccharomyces Cervisea*

تمایل مصرف‌کنندگان و همچنین رویکرد سازمان‌های ملی و بین‌المللی مسئول در زمینه بهداشت مواد غذایی به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی مختلف به جای نگه-دارنده‌های شیمیایی منجر به بررسی بیش تر این ترکیبات شده است (Mcknight et al., 2010).

درخت انار در نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری و در کشورهای مختلفی از جمله ایران، مصر، هند، ترکیه، ایتالیا، اسپانیا و چین کشت می‌شود. تولید سالانه این میوه در دنیا تقریباً یک میلیون و پانصد هزار تن است که ایران ۴۷ درصد از این میزان تولید را به خود اختصاص داده است. صادرات انار از ایران از ۱۴۰۷۵ تن در سال ۲۰۰۳ میلادی به ۲۷۴۳۹ تن در سال ۲۰۰۷ میلادی افزایش داشته است. در سال‌های اخیر بازار انار رو به رشد بوده است که این خود به دلیل افزایش آگاهی مصرف کننده از خواص میوه انار می‌باشد (Salomao et al., 2009).

در کارخانه‌های فرآیند میوه انار بخش زیادی از ضایعات کارخانه که بسته به رقم آن از ۳۰ تا ۶۰ درصد متغیر است را پوست میوه تشکیل می‌دهد. این نکته لزوم استفاده صنعتی از چنین حجم وسیعی از ضایعات را روشن می‌کند. در واقع پوست انار یکی از مهم ترین محصولات جانبی کارخانه‌های آب‌انارگیری است و به دلیل اثبات وجود ترکیبات پلی‌فنولیکی و دارویی فراوان در آن و خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره آن در چند سال اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است. مطالعات متعددی، وجود ترکیبات پلی‌فنولیکی از جمله یونیکالجین و مشتقات الاجی تانن‌ها را در پوست انار اثبات و خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره پوست انار را بررسی نموده‌اند (Koutchma, 2009). امروزه مطالعات به سمت ابداع روش‌های جدیدی در عصاره‌گیری، به منظور حفظ هرچه بیشتر فعالیت بیولوژیکی و خواص مفید پلی‌فنول‌های استخراج شده از پوست انار صورت گرفته است . (Gyawali & Ibrahim, 2014)

لوئی و همکاران (۲۰۰۶)، اثر آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنولیک هسته انار را بر روغن سویا بررسی نمودند و بیان کردند که ترکیبات فنولیک هسته انار بین ۰/۲ تا ۱/۰۲ درصد متغیر بوده و بیشترین ترکیب فنولیک در پوست سیاه انار مشاهده شد. شهابی قهفرخی و همکاران (۱۳۸۷)، با بررسی اثر پوست انار روی *آلیسایکلو باسیلوس* به عنوان یک نگه‌دارنده طبیعی یافتند که که خواص ضدباکتریایی با افزایش میزان ترکیبات فنولی افزایش می‌یابد. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات عصاره متانولی پوست انار بر میزان فعالیت ضدمیکروبی آب‌سیب بوده است.

روش کار

انار رقم آلک ساوه *Malus domestica 'Golden Delicious* از باغات ساوه تهیه گردید و پس از شناسایی گونه و جنس گیاه در موسسه گیاهان دارویی کرج اضافات برگ و ساقه جانبی آن حذف و شسته شد و بعد عمل آبگیری توسط دستگاه آب‌میوه‌گیری انجام شد. *ساکارومایسس سرویزیه* PTCC 5269، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* PTCC 1058 و *آلیسایکلوباسیلوس اسیدوترستریس* ATCC 49025 از انستیتو پاستور ایران تهیه و فعال سازی شدند.

تهیه عصاره متانولی پوست انار

پوست انار از انارهای سالم و تازه خریداری شده از بازار تره-بار واقع در شهر ساوه تهیه شد. و سپس در شرایط دور از گرد و غبار در گرم خانه ۳۵ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به رطوبت در حدود ۹ درصد، خشک گردید و سپس میزان ۲۵ گرم پودر پوست انار به ۱۰۰ میلی لیتر از حلال متانول اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای اتاق به کمک همزن مغناطیسی هم‌زده شد. در مرحله بعد جهت رفع ذرات نامحلول از کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ استفاده گردید. این فرآیند بار دیگر روی باقیمانده محلول به کمک ۱۰۰ میلی لیتر حلال انجام شد. عصاره‌ها به کمک تغلیظ-کننده چرخشی در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد تغلیظ گردیدند و بقایای حلال متانول نیز حذف گردید. عصاره‌های تهیه شده در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در اتوکلاو سترون شدند (خان‌بگی‌دوگاهه و همکاران، ۱۳۹۱).

تهیه آب‌سیب

اضافات برگ و ساقه سیب حذف و سپس شسته شد. در ادامه عمل آبگیری توسط دستگاه آب‌میوه‌گیری انجام شد. آب‌میوه استخراج شده توسط پارچه از جنس چیت صاف شده و در داخل بطری شیشه‌ای درب بندی شد. برای به حداقل رساندن واکنش های قهوه‌ای شدن، بطری‌ها در داخل مخزن آب جوش به مدت ۳۰ ثانیه قرار گرفتند تا آنزیم‌بری انجام شود. سپس در دمای یخچال ۴ درجه سانتیگراد تا آغاز آزمایش نگه‌داری شدند (خان‌بگی‌دوگاهه و همکاران، ۱۳۹۱).

تهیه تیمارهای آب‌سیب

آب‌سیب تا رسیدن به بریکس ۱۱ رقیق‌سازی و pH آن به کمک اسید سیتریک صنعتی در نقطه ۳/۷ تنظیم گردید. در هر ظرف شیشه‌ای ۱۹ میلی‌لیتر آب‌سیب رقیق‌سازی شده توزیع و در اتوکلاو در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه پاستوریزه شد. پس از سرد شدن نمونه‌ها، ۶ نمونه آب‌سیب به مدت ۳ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد و ۳ نمونه به مدت پنج روز در دمای ۲۵ درجه سانتی-گراد گرم‌خانه‌گذاری شد و سپس براساس استاندارد ملی ایران آب‌میوه‌ها از نظر حضور باکتری *الیسیکلوباسیلوس*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و مخمر *ساکارومایسس سروزیه* مورد بررسی قرار گرفتند تا هیچ نوع آلودگی با این میکروارگانیسم‌ها در نمونه‌های آب‌سیب مشاهده نشود (شهابی‌قهفرخی و همکاران، ۱۳۸۶).

لیست کدبندی تیمارهای تحقیق

کدبندی تیمارها	مشخصات تیمار	میزان عصاره پوست انارونوع آن
T	شاهد	----------
T1	*لاکتوباسیلوس پلانتاروم*	عصاره متانولی پوست انار ۲۵۰
T2	*لاکتوباسیلوس پلانتاروم*	عصاره متانولی پوست انار ۵۰۰
T3	*لاکتوباسیلوس پلانتاروم*	عصاره متانولی پوست انار ۱۰۰۰
T4	*ساکارومایسس سرویزیه*	عصاره متانولی پوست انار ۲۵۰
T5	*ساکارومایسس سرویزیه*	عصاره متانولی پوست انار ۵۰۰
T6	*ساکارومایسس سرویزیه*	عصاره متانولی پوست انار ۱۰۰۰
T7	*آلیسایلکو باسیلوس*	عصاره متانولی پوست انار ۲۵۰
T8	*آلیسایلکو باسیلوس*	عصاره متانولی پوست انار ۵۰۰
T9	*آلیسایلکو باسیلوس*	عصاره متانولی پوست انار ۱۰۰۰

آزمون‌های شیمیایی

شامل pH، اسیدیته، بریکس، کدورت در طی روزهای صفر، ۳۰ و ۶۰ توسط استاندارد ملی ۳۴۱۴ ارزیابی گردیدند (استاندارد ملی ایران، ۱۳۷۲).

کشت نمونه‌های تیمار جهت بررسی بقای *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*

مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر نمونه آبمیوه به پلیت سترون منتقل شد. سپس حدود ۱۵ میلی‌لیتر از محیط (de Man Rogosa Sharp (agar MRS که دمای آن حدود ۴۵ درجه سانتی‌گراد بود به هر پلیت اضافه شد. محیط کشت و نمونه را به خوبی مخلوط کرده و پلیت‌ها تا جامد شدن محیط بر روی سطح صاف و خنک قرار داده شدند. پس از جامد شدن محیط کشت، پلیت‌ها به مدت ۳ روز و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه گذاری شدند. کشت نمونه‌ها به صورت ۳ بار تکرار انجام گردید (استاندارد ملی ایران، شماره ۳۴۱۴).

کشت نمونه‌های تیمار جهت بررسی بقای *ساکارومایسس سرویزیه*

پس از تهیه پلیت‌های حاوی محیط کشت استریل (Merck, ، Sabouraud Dextrose Agar (SDA) Germany) ۱ میلی لیتر نمونه آب‌میوه به پلیت اضافه و سپس توسط آنس در محیط کشت پخش شد. نمونه‌ها به مدت ۵ روز و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه-گذاری شدند. پس از پایان زمان تعیین شده پلیت‌ها را بررسی نموده و میکروارگانیسم‌ها شمارش شدند (استاندارد ملی ایران، شماره ۹۹۷).

کشت نمونه‌های تیمار جهت بررسی بقای *آلیسایکلو باسیلوس اسیدوترستریس*

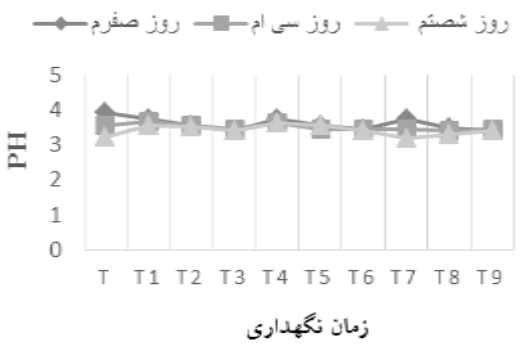
جهت ارزیابی باکتری، کشت اسپورهای آن به صورت پنج بار تکرار صورت پذیرفت و میانگین آن‌ها مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور ۰/۱ میلی‌لیتر از آبمیوه حاوی

اسپورهای *آلیسایکلو باسیلوس اسیدوترستریس* به محیط کشت Orange serum Agar (OSA) (Merck, Germany) تلقیح شده و سپس در دمای ۴۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد و شمارش با استفاده از میکروسکوپ اختلاف فازی (Microscope World) انجام گردید (خواجه نصیری و همکاران، ۱۳۸۴).

نتایج

نتایج تغییرات **pH**

با توجه به نتایج نمودار ۱ ملاحظه شد که اختلافات معنی-داری بین میزان pH تیمار شاهد و هریک از تیمارها وجود دارد. بالاترین میزان اسیدیته متعلق به میزان ۱۰۰۰ میلی‌گرم عصاره متانولی پوست انار و سپس تیمار شاهد بود. تیمارهای با مقادیر ۵۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم عصاره متانولی پوست انار در رده‌های بعدی قرار داشتند. اختلافات معنی‌داری بین تیمارها از نظر اختلاف در نوع میکروارگانیسم‌ها بر اساس تیمار وجود ندارد ($p<۰/۰۱$). زمان نگهداری نیز تأثیرات معنی‌داری را در اختلافات میزان pH تیمارها نشان داد. همچنین یک روند کاهشی در میزان pH با افزایش مدت زمان نگه‌داری وجود داشت، به‌طوری که میزان pH تیمارها در روز اول پس از تولید در حداکثر میزان خود و در انتهای دوره نگه‌داری به حداقل میزان خود رسید. با توجه به نتایج ارزیابی میزان pH تیمارها بر اساس اثرات متقابل نمودار (۴-۳) نیز ملاحظه گردید که میزان pH تیمارها به طور معنی‌داری در طی زمان نگهداری و با در نظر گرفتن تیمارهای آب‌سیب که شامل *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *ساکارومایسس سرویزیه* و همچنین باکتری *آلیسایکلو باسیلوس* می‌باشد، کاهش یافت.

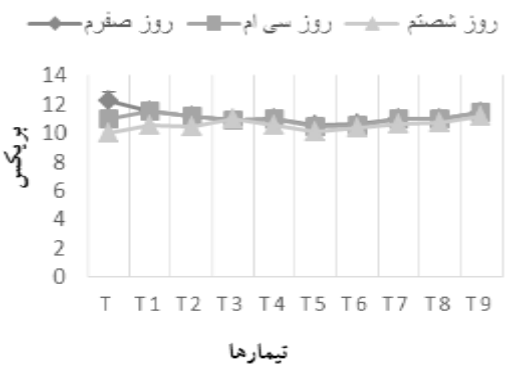


ن

نمودار۱- مقایسه میانگین تیمارهای آب‌سیب بر اساس اثرات متقابل *زمان نگهداری برای صفت pHدر سطح معنی داری ($p<۰/۰۵$)
T=تیمار شاهد+*Lactobacillus plantarum* ۲۵۰ µg/ml, T1= عصاره متانولی پوست انار +*Lactobacillus plantarum* ۵۰۰µg/ml T2= عصاره متانولی پوست انار *Lactobacillus* T3= ۱۰۰۰µg/ml عصاره متانولی پوست انار *plantarum*+ T4= ۲۵۰ µg/ml T5= +*Saccharomyces cerevisiae* ۵۰۰µg/ml عصاره متانولی پوست انار +*Saccharomyces cerevisiae* ۱۰۰۰µg/ml عصاره متانولی پوست انار +T6= *Saccharomyces cerevisiae* ۲۵۰ µg/ml عصاره متانولی پوست انار *Alicyclobacillus acidoterrestris* T7= ۵۰۰ µg/ml عصاره متانولی پوست انار *Alicyclobacillus acidoterrestris* +T8= ۱۰۰۰ µg/ml عصاره متانولی پوست انار *Alicyclobacillus acidoterrestris* + T9=

نتایج تغییرات بریکس

میزان کاهش بریکس در تیمار شاهد و تیمار با ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره متانولی انار پایین‌تر از تیمارهای با عصاره متانولی انار به میزان ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود و همان گونه که در نمودار۲ ملاحظه می‌شود در طی زمان نگه‌داری میزان بریکس تیمارهای با عصاره متانولی انار به میزان ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اختلافات معنی‌داری با روزهای صفر و ۳۰ نشان نداد و میزان بریکس آب‌میوه حفظ گردید. اما در تیمارهای با مقادیر ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره متانولی میزان بریکس افت معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۱$).

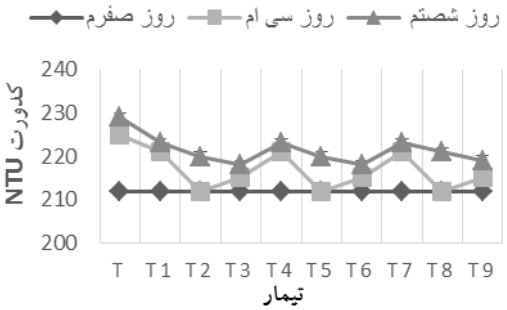


نمودار۲- مقایسه میانگین تیمارهای آب‌سیب بر اساس اثرات متقابل *زمان نگهداری برای صفت بریکس در سطح معنی‌داری (p<۰/۰۵)

تیمارهای آب‌سیب در روز صفر نگه‌داری دارای اختلافات معنی‌داری در میزان کدورت نبودند (p<۰/۰۵) و نوع میکروارگانیسم در روز صفر نیز اختلافات معنی‌داری بر میزان کدورت تیمارها ایجاد ننمود. در روزهای ۳۰ و۶۰ نگه‌داری کدورت تیمارها تغییرات معنی‌داری نسبت به روز صفر نشان دادند. بالاترین میزان کدورت متعلق به تیمارهای با ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره متانولی انار و کمترین میزان کدورت نیز متعلق به تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره متانولی انار است (p< ۰/۰۵) (نمودار ۳).

نتایج تغییرات کدورت

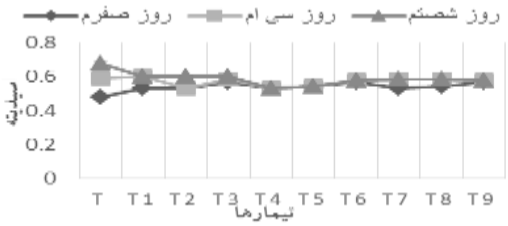
با توجه به نتایج نمودار ۳ نیز مشخص گردید که اختلاف معنی‌داری بر روی میزان کدورت تیمارها در طی زمان نگهداری وجود دارد (P<۰.۰۵). بالاترین میزان کدورت متعلق به تیمار شاهد بود و در طول دوره نگه‌داری افزایش یافت.



نمودار ۳- مقایسه میانگین تیمارهای آب‌سیب بر اساس اثرات متقابل *زمان نگهداری برای صفت کدورت در سطح معنی داری (p<۰/۰۵)

۴. نتایج تغییرات اسیدیته

با توجه به نتایج نمودار ۴ نیز مشخص گردید که اختلاف معنی‌داری بر روی میزان اسیدیته تیمارها در طی زمان نگهداری وجود دارد (P<۰.۰۵). بالاترین میزان اسیدیته متعلق به تیمار شاهد بود و در طول دوره نگه‌داری افزایش یافت.

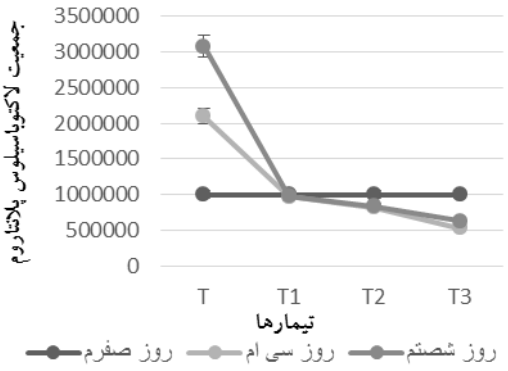


نمودار ۴- مقایسه میانگین تیمارهای آب‌سیب بر اساس اثرات متقابل *زمان نگهداری برای صفت اسیدیته (p<۰/۰۵)

با توجه به نمودار اثرات متقابل تیمار در زمان (نمودار شماره ۵) نیز ملاحظه گردید که کلیه تیمارها در روز صفر از جمعیت میکروبی یکسانی برخوردار بودند و در انتهای روز ۶۰ نگه‌داری جمعیت میکروبی تیمار شاهد به طور معنی‌داری به بالاترین میزان خود افزایش یافت. تیمارهای دارای عصاره متانولی تا روز ۳۰ نگه‌داری با کاهش معنی-داری مواجه بودند و در این میان میزان کاهش جمعیت *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در مقادیر ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر بالاتر از کلیه تیمارها بود. در انتهای روز ۶۰ نگه‌داری نیز مجدداً افزایش معنی‌داری در جمعیت *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* مشاهده شد.

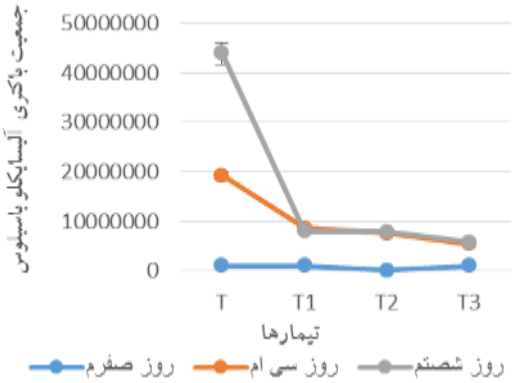
نتایج تغییرات *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*

با توجه به نتایج نمودار ۵ نیز مشخص گردید که اختلاف معنی‌داری بر روی میزان جمعیت *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* تیمارها در طی زمان نگهداری وجود دارد (P<۰.۰۵). بالاترین میزان اسیدیته متعلق به تیمار *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بود و در طول دوره نگه‌داری افزایش یافت.



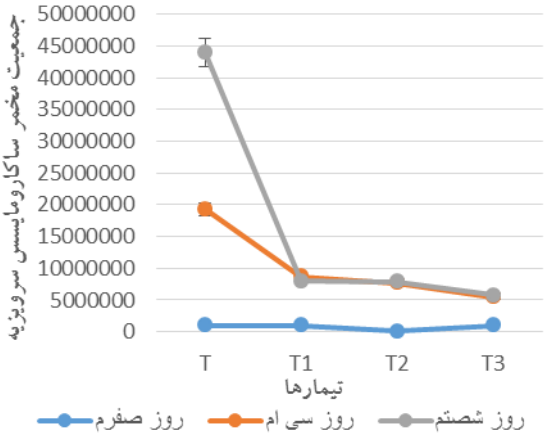
نمودار ۵- مقایسه میانگین تیمارهای آب‌سیب بر اساس تیمار* زمان برای جمعیت *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (p<۰/۰۵)

با توجه به نتایج مطالعه حاضر اختلافات معنی‌داری بین میزان *آلیسایکلو باسیلوس اسیدوترستریس* در تیمارهای با درصدهای مختلف عصاره متانولی وجود دارد. با افزایش میزان استفاده از عصاره متانولی پوست انار کاهش معنی داری در جمعیت *آلیسایکلوباسیلوس اسیدوترستریس* مشاهده گردید. همذچنین با توجه به نمودار اثرات متقابل تیمار در زمان (نمودار شماره ۶) نیز ملاحظه گردید که کلیه تیمارها در روز صفر از جمعیت میکروبی یکسانی برخوردار بودند و در انتهای روز ۶۰ نگه‌داری جمعیت میکروبی تیمار شاهد به طور معنی‌داری به بالاترین میزان خود افزایش یافت. تیمارهای دارای عصاره متانولی تا روز ۳۰ نگه‌داری با کاهش معنی‌داری مواجه بودند و در این میان میزان کاهش جمعیت باکتری *آلیسایکلو باسیلوس اسیدوترستریس* در مقادیر ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر بالاتر از کلیه تیمارها بود. در انتهای روز ۶۰ نیز مجدداً افزایش معنی‌داری در جمعیت باکتری *آلیسایکلو باسیلوس اسیدوترستریس* مشاهده شد.



نمودار ۶- مقایسه میانگین تیمارهای آب‌سیب بر اساس تیمار* زمان برای جمعیت باکتری *آلیسایکلو باسیلوس* در سطح معنی‌داری (p<۰/۰۵)

با توجه به نمودار ۷ ملاحظه گردید که اختلاف معنی‌داری بین مقایسه میانگین تیمارهای آب‌سیب از نظر جمعیت مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* وجود دارد (P<۰/۰۵). بالاترین میزان جمعیت *ساکارومایسس سرویزیه* متعلق به تیمار شاهد فاقد عصاره متانولی انار بود. کمترین میزان جمعیت مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* نیز به تیمار با مقدار ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تعلق داشت. یک روند کاهشی کلی بین تیمارهای مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* نیز با توجه به افزایش میزان غلظت عصاره متانولی انار وجود داشت.



نمودار۷- مقایسه میانگین تیمارهای آب‌سیب بر اساس تیمار* زمان برای جمعیت مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در سطح معنی داری (p<۰/۰۵)

T= تیمار شاهد T۱ = *Saccharomyces cerevisiae* ۲۵۰ +µg/ml
عصاره متانولی T2= *Saccharomyces cerevisiae*۵۰۰ +µg/ml
پوست انار T3= *Saccharomyces cerevisiae*۱۰۰۰ +µg/ml

بحث

از دلایل مشاهده این تغییرات ترکیباتی مانند گالیک اسید، الاژیک اسید، کافئیک اسید، کامپفرول، لوتئین، کوئرستین، اسیدهای چرب و ایندول‌ها می‌باشد (Shamsudin et al., 2014) که بر روی کاهش میزان pH تیمارها تأثیرات معنی‌داری دارد و بدیهی است که با افزایش میزان غلظت این ترکیبات در آب‌میوه، میزان pH تیمارهای آب‌سیب نیز به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. تیمار با بالاترین میزان غلظت ترکیبات عصاره متانولی دارای بالاترین میزان تغییرات pH در مقایسه با تیمار شاهد بود. تخمیر ترکیبات قندی موجود در آب‌سیب مانند اسیدسیتریک و اسیدمالیک در طی زمان نگه‌داری باعث کاهش کلی pH در تیمارهای آب‌سیب می‌گردد (Yoon et al., 2004). فیلیپا و همکاران (۲۰۰۱) نیز در بررسی تحقیقات خود با عنوان حضور اسپورهای *آلیسایکلو باسیلوس* در آب‌میوه طی فرآیند پاستوریزاسیون نیز کاهش میزان pH را گزارش نمودند که با نتایج تحقیق حاضر نیز مطابقت داشت. از آنجایی که باکتری *آلیسایکلوباسیلوس* در اسیدیته پایین نیز قادر به ادامه حیات می‌باشد به محض این که آب‌میوه آلوده به این باکتری در دمای بالا قرار می‌گیرد، شروع به رشد و تکثیر نموده و موجب فساد آن می‌گردد. علاوه برآن در مقابل اسیدهای آلی چون مالیک، سیتریک، تارتاریک نیز مقاوم بوده و این مواد هیچگونه اثرمنفی برقدرت تکثیر آن ندارند (خواجه نصیری و همکاران ، ۱۳۸۴).

بنابراین تولید متابولیت‌های اسیدی از تخمیر ترکیبات قندی موجود در محیط توسط این باکتری اسیدی دوست به طور معنی‌داری باعث کاهش میزان pH می‌گردد. با افزایش درصد ترکیبات عصاره متانولی پوست انار به دلیل افزایش درصد ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و اسیدی، درجه بریکس به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. بنابراین کاهش تدریجی بریکس در طی مدت زمان نگه‌داری به جهت افزایش سرعت تبدیل ترکیبات آلی به قند می‌باشد (Rabelo et al., 2009).

در مطالعه حاضر با افزایش درصد غلظت عصاره پوست انار و بالارقتن میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در فرمولاسیون آبمیوه، جمعیت باکتریایی موجود در *لاکتوباسیلوس‌ها* نیز به طور معنی‌داری کاسته شده و بریکس آب‌میوه با مقادیر ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نیز به طور معنی‌داری کاهش یافت. تولید آب‌سیب شفاف و پایدار در صنایع نوشیدنی و آب‌میوه سازی موضوع قابل توجهی است و شفاف سازی، مرحله مهمی در فرآیند تولید برخی از آب‌میوه جات می‌باشد. برای شفاف کردن آب‌میوه لازم است ترکیباتی نظیر پکتین، نشاسته، صمغ‌ها، پروتئین‌ها، مواد پلی‌فنولی، کاتیون‌های فلزی و لیپیدها که باعث تیرگی قبل یا بعد از نگهداری می‌شوند از آن خارج گردند. Champagne و همکاران در سال ۲۰۰۸ دریافتند که فعالیت *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به صورت آزاد سبب کاهش معنی‌دار میزان شفافیت و افزایش کدورت در آب-سیب شده است. در تیمارهایی که باکتری‌ها در آنها حضور دارند، بخشی از مواد فنولی، نشاسته و ترکیبات پروتئینی که موجب ایجاد کدورت در آب‌سیب می‌شوند، توسط باکتری‌های اسید لاکتیک مورد استفاده قرار گرفته و از این روز در مقادیر پایین تر باکتری‌های اسید لاکتیک میزان کدورت کاهش معنی‌داری نشان داد، اما در مقادیر بالاتر خود باکتری‌ها به دلیل کاهش اکسیژن سلولی و سایر عوامل حیاتی از بین رفته و ته‌نشین گردیده و میزان کدورت به طور معنی‌داری افزایش یافت. بقای باکتری‌ها در مقابل شرایط نامطلوب مانند سمیت اکسیژن، انجماد و نگهداری به حالت منجمد به گونه بستگی داشته که بر روی کدورت ترکیبات آب‌میوه نیز مؤثر است (Dhuique-mayer et al., 2007).

اسیدیته محیطی یکی از شاخص‌های مهم میزان فعالیت و رشد میکروارگانیسم‌ها و همچنین تغییرات فیزیولوژیکی آن ها می‌باشد. با توجه به بررسی اثرات تیمار و زمان بر روی اسیدیته تیمارها ملاحظه شد که میزان اسیدیته تیمارها به

طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. یکی از عوامل مهم در افزایش اسیدیته تیمارها، فرآیند تخمیر میکروبی قند یا سایر انواع اسیدهای موجود در محیط توسط اسید لاکتیک باکتری‌ها و همچنین مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* می‌باشد. در مطالعه حاضر نیز یک روند افزایشی در میزان اسیدیته تیمارها با افزایش عصاره متانولی پوست انار وجود دارد. موسوی و همکاران (۲۰۱۶) در بررسی تاثیر عصاره انار بر روی میزان زنده‌مانی و جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک دریافتند که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* قادر به تخمیر اسید سیتریک که ترکیب عمده موجود در انار می‌باشد، بوده و در طی تخمیر میزان اسیدیته محیطی دستخوش تغییر می‌شود که با نتایج مطالعه حاضر نیز مطابقت دارد. اما میزان افزایش اسیدیته در تیمارهای با مقادیر بالاتر عصاره متانولی پوست انار کمتر بوده است زیرا ترکیبات اکسیداتیو با تغییرات در چرخه پیروات و اکسیده نمودن $NADPH^+$ در فرآیند متابولیکی باکتری‌ها تغییرات معنی‌داری ایجاد می‌کنند. بنابراین قادر به متابولیز کردن ترکیبات قندی نبوده و باعث مرگ سلولی می‌گردند (Sheehan et al., 2007). اما در غلظت‌های پایین‌تر استفاده از عصاره متانولی به جهت کاهش غلظت ترکیبات اکسیداتیوی موجود در محیط، میزان اسیدیته ناشی از فرآیندهای متابولیکی به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (Betoret et al., 2003).

بررسی نتایج ارزیابی شمارش جمعیت باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* حاکی از افزایش میزان مرگ سلولی در مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* با افزایش میزان غلظت عصاره فنولی پوست انار بود. پژوهشگران غلظت، ویژگی‌های ساختاری ترکیبات فنولی از جمله نوع، تعداد و موقعیت‌های گروه‌های استخلافی در حلقه بنزن، نوع و مکانیسم عمل این ترکیبات در عصاره‌های گیاهی را از عوامل مؤثر در فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ها دانسته‌اند (Rabelo et al., 2009). تانن‌ها به‌عنوان ترکیب ضد‌میکروبی مؤثر در عصاره متانولی انار می‌توانند توسط باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ترکیبات فنولی را به مولکول‌های کوچکتری با فعالیت ضدمیکروبی کمتر از جمله گالیک اسید تجزیه کنند و این اسید گالیک اثرات ممانعت‌کنندگی بر روی فعالیت *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* داشته باشد اسیدگالیک در ترکیبات عصاره متانولی پوست انار نیز وجود دارد. بنابراین با افزایش غلظت این مواد ترکیبات عصاره متانولی انار در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، میزان زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. همچنین احتمال دارد که در طی ۶۰ روز نگه‌داری میزان ترکیبات پلی‌فنولی نیز افزایش یابد که این امر می‌تواند ناشی از هیدرولیز پیوندهای بین ترکیبات فنولیک با سایر ترکیبات به ویژه پروتئین‌ها باشد (Noci et al., 2008). شهابی و همکاران (۱۳۸۷) گزارش کرد که محتوی ترکیبات فنولی در نمونه‌های آب‌سیب حاوی عصاره‌های استونی، اتانولی و متانولی پوست انار طی ۲۴ روز نگه‌داری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به تدریج افزایش یافت که با نتایج مطالعه حاضر نیز مطابقت داشت. یانگ و همکاران (۲۰۱۴) نیز در بررسی اثرات آب‌تمشک بر روی میزان مهار رشد باکتری‌های پاتوژن مواد غذایی در آبمیوه به اثرات مثبت آن پی‌بردند. نوئال‌کائکول و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی اثرات *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* فریز درایر شده در پودر میوه فوری جایگزین آب‌میوه‌ها نیز دریافتند که میزان بریکس آب‌میوه نقش مهمی در میزان بقای *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در طی نگه‌داری دارد که با نتایج تحقیق حاضر نیز مطابقت داشت. مردانی قهفرخی و همکاران (۱۳۹۲) در بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره‌های فنولی برگ گیاه گل مغربی بر عوامل فساد در آب‌سیب به نتایج مشابهی دست یافتند. آن‌ها دریافتند که با کاهش افزایش غلظت عصاره گل مغربی بر *ساکارومایسس سرویزیه* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در آب‌سیب طی نگهداری، میزان جمعیت میکروبی تلقیحی به آب‌سیب به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد که با نتایج مطالعه حاضر نیز مطابقت داشت. همچنین نتایج تحقیقات Bevilacqua و همکاران در سال ۲۰۱۰ نیز در بررسی تأثیرات ترکیبی اژنول و سینامالدهید برای کنترل رشد *آلیسایکلو باسیلوس اسیدوترستریس* در

توافق با تحقیقات حاضر بود. مولوا و بیسال (۲۰۱۵) در بررسی اثرات انار و مخلوط انار-سیب بر روی خصوصیات *آلیسایکلو اسیلوس اسیدوترستریس* DSM 3922 نشان داد که استفاده از ترکیبات فنولی باعث کاهش میزان سرعت رشد اسپورهای *آلیسایکلوباسیلوس اسیدوترستریس* می‌شود که با نتایج مطالعه حاضر نیز مطابقت داشت. هچنین در این تحقیق مشخص گردید که مقاومت به گرما و رطوبت اسپورهای *آلیسایکلو باسیلوس اسیدوترستریس* به محیط جوانه زنی آن بستگی دارد. حضور فلزات انتقالی خاص در محیط جوانه زنی برای خصوصیات اسپور مانند تشکیل اسپور، مقاومت به حرارت و خفتگی لازم است. حضور ترکیبات پلی فنولی موجود در عصاره فنولی انار بر میزان و سرعت جوانه زنی اسپورها موثر بوده و باعث افزایش زمان خفتگی آن می‌شود که در این رابطه تحقیقات مشابهی نیز صورت گرفته است (Tserennadmid et al., 2011).

بررسی نتایج ارزیابی شمارش جمعیت مخمر ساکارومایسس سرویزیه حاکی از افزایش میزان مرگ سلولی در این مخمر با افزایش میزان غلظت عصاره فنولی پوست انار بود. مطالعات متعددی بر روی تأثیرات استرس اکسیداتیو و همچنین اثرات ضدسرطانی و ضدباکتریایی انار انجام شده است (Santos et al., 2012). *ساکارومایسس سرویزیه* نیز مخمر مهمی می‌باشد که در بسیاری مطالعات مورد استفاده قرار گرفته است (Kagan et al., 2005; Comitini et al., 2011).

مصرف هیدروژن پراکسید توسط *ساکارومایسس سرویزیه* باعث تغییر سنتز اسیدهای چرب و پروتئین کل موجود در غشای پلاسمایی می‌شود (Matias et al., 2007; Folmer et al., 2008). ترکیب اکسیژن فعال می‌تواند اسید نوکلئوئیک، پروتئین، چربی و کربوهیدرات‌ها را اکسید نماید. بر اساس نتایج مطالعه کوستا و همکاران (۲۰۰۲) مشخص گردید که مصرف هیدروژن پراکسید در مقادیر پایین باعث ایجاد استرس در *ساکارومایسس سرویزیه* و اثرات منفی بر روی سنتز پروتئینی که نهایتاً به مرگ سلولی و کاهش جمعیت باکتریایی با افزایش غلظت ضروری می‌شود هم چنین با افزایش مدت زمان نگهداری به دلیل کاهش منابع قندی موجود نیز از میزان جمعیت *ساکارومایسس سرویزیه* با افزایش زمان نگهداری نیز کاسته شد.

نتیجه گیری

از نتایج مطالعه حاضر نتیجه‌گیری می‌شود که عصاره پوست انار دارای خواص ضدمیکروبی بوده و بطور قابل ملاحظه‌ای در کاهش تعداد باکتری‌ها و مخمر مورد استفاده در این آزمون تأثیر داشته است. با گذشت زمان نگه‌داری افزایش در میزان اسیدیته نمونه‌ها مشاهده گردید از زمینه‌های پیشنهادی جهت تکمیل این آزمون می‌توان به بررسی سایر روش های استخراج عصاره پوست انار و بررسی میزان ترکیبات فنولی آن، بررسی سایر نسبت‌های مورد استفاده عصاره پوست انار در آب‌سیب، بررسی سایر بازه‌های زمانی جهت بررسی تغییرات میزان ماندگاری میکروبی و همچنین بررسی اثرات عصاره متانولی پوست انار در سایر آب‌میوه-های طبیعی اشاره نمود.

منابع

۱. سازمان ملی استاندارد ایران. ۱۳۷۲. ویژگی‌های میکروبیولوژی و تعیین شرایط بهداشتی فراورده‌های میوه-ای که منحصراً با استفاده از روش‌های فیزیکی نگهداری می‌شود. تجدید نظر اول. شماره ۳۴۱۴.

۲. سازمان ملی استاندارد ایران. ۱۳۷۲. روش جستجو و شمارش قارچها (کپک‌ها و مخمرها) به شمارش پرگنه در ۲۵ درجه سلسیوس. تجدید نظر دوم. چاپ دهم. شماره ۹۹۷.

۳. خان‌بگی‌دوگاهه، مینا.، توفیقی، آزاده.، خسروی‌دارانی، کیانوش.، دادگر، مهرناز.، مرتضویان، سیدامیرمحمد.، احمدی، ن. ۱۳۹۱. اثر عصاره پوست انار بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در آب‌انار. فصلنامه علمی –پژوهشی علوم تغذیه و صنایع غذایی، جلد۷ ، شماره ۵، صفحات ۲۴-۱۷.

۴. خواجه‌نصیری، شمس‌الملوک.، شیخی، نریمان.، حسینی، مسعود. ۱۳۸۴. گزارش اولین مورد جداسازی و شناسائی

باکتری آلیسایکلوباسیلوس از آب‌انارهای صادراتی ایران، امور دام و آبزیان. شماره ۷۶، صفحات ۱۰۳-۹۹.

۵. شهابی‌قهفرخی، ایمان.، حجازی، محمدامین.، احمدی زنوز، عادل.، قنبرزاده، بابک.، ایاسه، علی. ۱۳۸۷. بررسی اثر پوست انار روی *Alicyclobacillus acidoterrestris* به عنوان یک نگهدارنده طبیعی عملگر، مجله پژوهشهای کشاورزی، صفحات ۳۷-۳۲.

۶. مردانی‌قهفرخی، ویدا.، اعلمی، مهران.، عربشاهی‌دلویی سعیده.، صادقی‌ماهونک، علیرضا. ۱۳۹۳. بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره‌های فنولی برگ گیاه گل مغربی بر عوامل فساد در آب‌سیب. نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران. شماره ۱، صفحات ۴۵-۳۸.

7. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils – a review. Food Chem Toxicol. 46: 446–475.

8. Betoret, N., Puente, L., Díaz, M.J., Pagán, M.J., García, M.J., Gras, M.L. 2003. Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. J Food Eng. 56(2–3): 273–277.

9. Bevilacqua, A., Rosaria Corbo, M., Sinigarlia, M. 2010. Combination eugenol and cinnamaldehyde to control the growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris*, Food Control, 21: 172-177.

10. Champagne, C.P., Raymond, Y., Gagnon, R. 2008. Viability of *Lactobacillus rhamnosus* R0011 in an apple-based fruit juice under simulated storage conditions at the consumer level. J Food Sci. 73(3): 221-226.

11. Char, C.D., Mitilinaki, E., Guerrero, S.N., Alzamora, S.M. 2010. Use of highintensity ultrasound and UVeC light to inactivate some microorganisms in fruit juices. Food and Bioprocess Tech. 3: 797-803.

12. Costa, V.M.V., Amorim, M.A., Quintanilha, A., Ferreira, P.M. 2002. Hydrogen peroxide-induced carbonylation of key metabolic enzymes in *saccharomyces cerevisiae*: the involvement of the oxidative stress response regulators yap1 and skn7. Free Radical Bio Med. 33: 1507–1515.

13. Comitini, F., Gobbi, M., Domizio P., Romani, C., Lencioni, L. 2011. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarterermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. Food Microb. 28: 873-882.

14. Dhuique-Mayer, C., Tbatou, M., Carail, M., Caris-Veyrat, C., Dornier, M., Amiot, M.J. 2007. Thermal degradation of antioxidant micronutrients in citrus juice: Kinetics and newly formed compounds. Journal of Agricultural and Food Chem. 55(10): 4209−4216.

15. Eissa, H.A., Ramadan, M.T., Ali, H.S., 2008. Effect of natural extracts from the fruits of doum palm, carb and licorice on the quality and safety of apple slices. J Agric Sci Mansoura Univ. 33: 6609-6623.

16. Filipa & Gibbs. 2011. *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit products and design of pasteurization processes,Trends in Food Sci & Tech. 12(2):68.

17. Folmer, V., Pedroso, N., Matias, A.C., Lopes, S.C.D.N., Antunes, F. 2008. H_2O_2 induces rapid biophysical and permeability changes in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim Biophys Acta. 1778: 1141–1147.

18. Gyawali, R., Adkins, A., Minor, R.C., Ibrahim, S.A. 2013. Behavior and changes incell morphology of *Escherichia coli* O157:H7 in liquid medium and skim milk inthe presence of caffeine. CyTA e Journal of Food. 45: 112-119.

19. Kagan, I.A., Michel, A., Prause, A., Scheffler, B.E., and Pace, P. 2005. Gene transcription profiles of *Saccharomyces cerevisiae* after treatment with plant protection fungicides that inhibit ergosterol biosynthesis. Pestic Biochem Phys. 82: 133–153.

20. Kaya, Z., Yıldız, S., Unluturk, S. 201. Effect of UV-C irradiation and heat treatment on the shelf life stability of a lemonemelon juice blend: Multivariate statistical approach. Innovative Food Sci and Emerg Techn. 29: 230-239.

21. Koutchma, T. 2009. Advances in ultraviolet light technology for non-thermal processing of

liquid foods. Food Bioprocess and Technology. 2: 138-155.
22. Matias, A.C., Pedroso, N., Teodoro, N., Marinho, H.S., and Antunes, F. 2007. Downregulation of fatty acid synthase increases the resistance of *Saccharomyces cerevisiae* cells to H_2O_2. Free Radical Bio Med. 43: 1458–1465.
23. McKnight, I.C., Eiroa, M.N.U., Sant'Ana, A.S., Massaguer, P.R. 2010. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in pasteurized exotic Brazilian fruit juices: Isolation, genotypic characterization and heat resistance. Food Microb. 27:1016-1022.
24. Molva, C., Baysal, A.H. 2015. Effects of pomegranate and pomegranate – apple blend juices on the growth characteristics of *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922 type Strain vegetative cells and spores, International J of Food Microb. 200: 52-56.
25. Mousavi, Z.E., Mousavi, S.M., Razavi, Z., Emam-Djomeh, Kiani, H. 2016. Fermentation of pomegrate juice by lactic acid bacteria, World journal of Microbial Biotech. 52(4): 112-119.
26. Noci, F., Riener, J., Walkling-Ribeiro, M., Cronin, D.A., Morgan, D.J., Lyng, J.G. 2008. Ultraviolet irradiation and pulsed electric fields (PEF) in a hurdle strategy for the preservation of fresh apple juice. J Food Eng. 85: 141-146.
27. Nualkaekul, S., Deepika, G., Charalampopoulos, D. 2012. Survival of freeze dried *Lactobacillus plantarum* in instant fruit powders and reconstituted fruit juices, Food Research Int. 48: 627–633.
28. Rabelo, M.C., Fontes, C.P.M.L., Rodrigues, S. 2009. Enzyme synthesis of oligosaccharides using cashew apple juice as substrate. Bioresource Tech. 100 (23): 5574-5580.
29. Salom~ao, B.C.M. 2009. Detecç~ao de patulina e desinfecç~ao de maç~as destinadas _a produç~ao de suco. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Florian_opolis: Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).
30. Santos, E.V., Martinez, A.O., Munizaga, G.T., Reyes, J.E, Won, M.P. 2012. Effect of high hydrostatic pressure (HHP) processing onphysicochemical properties, bioactive compounds and shelf-life of pomegranate juice. Innov Food Sci Emerg. 13: 13–22.
31. Shamsudin, R., Noranizan, M.A., Yap, P.Y., Atikah, M. 2014. Effect of repetitive ultraviolet irradiation on the physico-chemical properties and microbial stability of pineapple juice. Innovative Food Sci and Emerg Tech. 23: 114-120.
32. Sheehan, V.M., Ross, P., Fitzgerald, G.F. 2007. Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. Innovative Food Sci & Emerging Tech. 8(2): 279−284.
33. Tserennadmid, R., Tako, M., Galgoczy, L., Papp, T., Pesti, M., Vágvölgyi, C., Almassy, K., Krisch, J. 2011, Antiyeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk, International Journal of Food Microb. 144: 480-486.
34.Yang H., Hewes D., Salaheen S., Federman C., Biswas D. 2014. Effects of blackberry juice on growth inhibition of foodborne pathogens and growth promotion of Lactobacillus, Food Control. 37: 15-20.
35. Yoon, K.Y., Woodams, E.E., Hang, Y. D. 2004. Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria. J Microbiology, 42(4): 315−318.

The use of peel extracts of pomegranate in apple juice as a preservative against *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum* and *Alicyclobacillus acidoterrstris*

Rezvanifard Z[1], Eshaghi MR[2*], Hasanzadeh SM[3]

[1] Varamin Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

[2] Director of Graduate Food, Varamin Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

[3] Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

***Corresponding author:** *mr.eshaghi@yahoo.com*

Received: 5 August 2018 Accepted: 5 November 2018

Abstract

The aim of this work was to study the influence of pomegranate peel methanol extract on the *Lactobacillus plantarum* PTCC 1058, *Saccharomyces cerevisiae* PTCC 5269 and *Alicyclobacillus acidoterrestris* ATCC 49025 in apple juice. Three different concentration of pomegranate peel extract (250, 500 and 1000 µg /ml) and control sample were prepared. The samples were stored at 4 °C for 60 days and acidity, pH value, microbial analysis, brix value were conducted at zero, 30 and 60 days. Physicochemical properties showed that acidity soured and pH decreased with increasing extract concentration. Turbidity was increased and brix value was decreased in storage time. Turbidity amount in 60th day were increased but treatment with 500 µg /ml had minimum turbidity. These results suggest the potential of pomegranate peel methanol extract as bio preservatives and have effect on decrease of turbidity in apple juice under refrigerated storage.

Keywords: Methanolic extract *Lactobacillus plantarum, Alicyclobacillus acidoterrestris, Saccharomyces cerevisiae,* Pomegranate skin extract.