نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۸، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱، ص. ۲۶۱-۲۵۱

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 8, No. 2, Summer 2012, p. 251-261

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی ریشه شیرین‌بیان در نوشابه پرتقالی

زهره کرمی[۱]- حبیب الله میرزائی[۲]- زهرا امام جمعه[۳]- علیرضا صادقی ماهونک[۴*]- مرتضی خمیری[۵]

تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۲۸
تاریخ پذیرش: ۹۱/۳/۲۱

چکیده

در این پژوهش فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی ریشه شیرین‌بیان بر میکروارگانیسم‌های آلوده‌کننده نوشابه (*لاکتوباسیلوس دلبروکی، لوکونوستوک مزنتروئیدس، ساکارومایسس سرویزیه و کاندیدا کروزئی*) بررسی گردید. مقادیرحداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی بر روی باکتری *لاکتوباسیلوس دلبروکی* به ترتیب ۰/۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، ۰/۷میلی‌گرم در میلی‌لیتر وبر روی *لوکونوستوک مزنتروئیدس* ۰/۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مشاهده شد. همچنین نتایج حاصل از حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی بر روی*ساکارومایسس سرویزیه* و *کاندیدا کروزئی* با روش رقت‌سازی در چاهک، ۰/۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد. در این بررسی برای کنترل رشد میکروارگانیسم‌های عامل فساد نوشابه پرتقالی، از عصاره ریشه شیرین‌بیان در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر شیرین‌بیان (به عنوان جایگزین کامل بنزوات سدیم) و غلظت‌های ۱۰۰۰، ۱۵۰۰و ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر شیرین‌بیان به همراه ۵۰ درصد بنزوات سدیم معمول در فرمولاسیون صنعتی نوشابه پرتقالی استفاده شد. نمونه‌های نوشابه حاوی عصاره به همراه نمونه شاهد در دمای محیط قرار گرفته و روند رشد میکروبی در فواصل زمانی ۱، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰ و ۹۰ روز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمون میکروبی نشان داد که استفاده از عصاره ریشه شیرین‌بیان در نوشابه پرتقالی باعث ماندگاری نوشابه طی ۹۰ روز می‌شود. بررسی میزان ترکیبات فنولی در طی دوره نگهداری نشان داد که عصاره اتانولی ریشه شیرین‌بیان در pH اسیدی نوشابه پرتقالی به خوبی پایداری خود را به مدت ۳ ماه حفظ نموده است.

واژه‌های کلیدی: ریشه شیرین‌بیان، عصاره اتانولی، بنزوات سدیم، فعالیت ضد میکروبی، نوشابه گازدار

مقدمه

شیرین‌بیان[۶] و فرآورده‌های آن از زمان‌های بسیار دور توسط پزشکان و گیاه‌شناسان مورد توجه قرار داشته است. شیرین‌بیان یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی از لحاظ اقتصادی است که به صورت گسترده مورد پژوهش قرار گرفته است و اثرات ضد میکروبی آن شناخته شده است (Gupta *et al.*,2006).گیاه شیرین‌بیان متعلق به تیره اصلی بقولات[۷] و تیره فرعی پروانه واران[۸] و از راسته گل سرخیان[۹] است.گلیسیریزین[۱۰] یکی از اجزای اصلی ریشه شیرین‌بیان است که از لحاظ بیولوژیکی و پزشکی ترکیبی فعال است و از دیرباز در اختلالات تنفسی، زخم‌های معده و روده و نارسایی‌های کبدی استفاده می‌شده است. همچنین دارای اثرات مناسب در درمان ضایعات پوستی مانند درماتیت، اگزما و خارش می‌باشد. هم اکنون عصاره‌های شیرین‌بیان و گلیسیریزین کاربردهای گسترده‌ای در صنایع غذایی، داروسازی و دخانیات دارند. در آمریکا میزان بالایی از شیرین‌بیان و گلیسیریزین با مصرف تقریبی ۳/۶ – ۰/۰۲۷ میلی‌گرم گلیسیریزین به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در هر روز توسط مردم مصرف می‌شود (Fenwick *et al.*,1990). امروزه با افزایش آگاهی مصرف‌کنندگان نسبت به سالم بودن افزودنی‌های غذایی خصوصاً ترکیبات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدان‌ها سعی بر این است که از افزودنی‌های طبیعی که دارای خاصیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی هستند، به جای مواد شیمیایی ترکیبی در مواد غذایی استفاده شود. نوشابه‌ها از جمله مواد غذایی هستند که در آن‌ها هم از مواد ضد میکروبی

۱، ۲، ۴ و ۵- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار، استادیار و دانشیار دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
(*- نویسنده مسئول: (Email : sadeghiaz@yahoo.com)
۳- دانشیار دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه تهران

6- Licorice
7- Leguminoseae
8- Fabaceae
9- Rosales
10- Glycyrrhizine

شیمیایی و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی استفاده می‌شود (توسلی و همکاران، ۱۳۸۸).

نوشابه گازدار فراورده‌ای است که از اختلاط آب، گازکربنیک، مواد افزودنی مجاز خوراکی، شکر و یا سایر شیرین‌کننده‌ها تهیه می‌شود. مضرات ناشی از مصرف نوشابه‌های صنعتی از دیدگاه‌های مختلفی قابل بررسی می‌باشد. نوشابه‌های صنعتی ارزش تغذیه‌ای کمی داشته اما حدود ۱۲ درصد ساکارز دارند. بنابراین مصرف مداوم آن ها در بروز چاقی موثر خواهد بود (Bawa,2005). گزارش‌هایی وجود دارد مبنی بر این که در اثر واکنش میان بنزوات موجود در نوشابه‌ها با اسید آسکوربیک، بنزن تشکیل می‌شود که جزو ترکیبات مولد سرطان می‌باشد. رنگ مصنوعی مورد استفاده در نوشابه‌های زرد به نام سانست یلو[1] از نوع رنگ‌های آزو می‌باشد. بنیان شیمیایی آزو از جمله گروه‌هایی است که به عنوان یک عامل تحریک‌کننده رشد سلول‌های سرطانی شناخته شده است. مشخص شده است که رنگ‌های سنتزی حاوی دو عامل آزو که ساختمان قطبی دارند سرطان‌زا می‌باشند. رنگ مورد استفاده در نوشابه‌های سیاه نیز از نوع کارامل تجاری است که بر اساس آبگیری از قندها در دماهای بالا (حدود ۱۰۰ درجه سانتی گراد) در محیط اسیدی و در حضور کاتالیست آمونیاک حاصل می‌شود و ممکن است دارای آلودگی به بنزوپیرن‌ها باشد (Varnam *et al.*, 1997).

با توجه به مضراتی که از دیدگاه سلامتی مصرف‌کننده به نوشابه‌های صنعتی نسبت داده می‌شود، بسیاری از محققین به دنبال یافتن راهکارهایی جهت بهینه‌سازی مصرف نوشیدنی‌های سنتی و طبیعی می‌باشند چرا که بسیاری از ترکیبات مورد استفاده در نوشابه-های نوع کولا را مواد سنتزی تشکیل می‌دهند. به همین دلیل در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی جهت بهینه‌سازی فرمولاسیون آن‌ها انجام گرفته است (Hunter, 2003).

با توجه به اثرات سودمند شیرین‌بیان (ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد ویروسی، ضد التهاب، ضد زخم معده، ضد سرطانی)، در این تحقیق از عصاره شیرین‌بیان به عنوان یک ترکیب نگهدارنده در فرمولاسیون نوشابه پرتقالی استفاده و فعالیت ضد میکروبی آن در برابر میکروارگانیسم‌های آلوده‌کننده نوشابه در محیط کشت و در نوشابه پرتقالی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ریشه شیرین‌بیان در فصل پاییز ۱۳۸۹ (۲۰ مهر) از ایستگاه تحقیقات کشاورزی گرگان تهیه شد. مواد شیمیایی مورد نظر در این تحقیق آگار، عصاره مخمر، پپتون، گلوکز، اتانول ، مولر هینتون براث، محیط کشت عصاره مخمر گلوکز کلرامفنیکل آگار[2] و عصاره مخمر گلوکز پپتون مالت براث[3]، محیط کشت شمارش پلیتی[4]، محیط کشت حاوی عصاره پرتقال[5] بودند. تمامی مواد مورد استفاده در این تحقیق دارای خلوص بالا بوده و از شرکت مرک خریداری شدند.

تهیه عصاره

ریشه‌های مرطوب شیرین‌بیان پس از تمیز شدن و گرفتن گل و لای آن، با قیچی باغبانی به قطعات کوچک‌تری بریده و در آون معمولی با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ هفته خشک شدند. ریشه‌های خشک شده توسط آسیاب چکشی (ایران خود ساز) به صورت آرد (مش ۲۰) درآمدند. جهت تهیه عصاره اتانولی از حلال اتانول ۸۰ درصد (حجمی:حجمی) استفاده شد. سپس به منظور تهیه عصاره از مایکروویو خانگی (CE3260FJUNE-2008) طبق روش میرزاپور و همکاران (۲۰۱۰) استفاده گردید. در این روش ۵ گرم نمونه باحلال اتانول ۸۰ درصد و با نسبت نمونه به حلال (۱:۱۵) مخلوط گردید. مخلوط سپس با امواج مایکروویو (توان ۱۰۰ وات) در ۵ دقیقه اشعه‌دهی شد. برای کنترل دما، زمان به صورت متناوب اعمال شد به این ترتیب که بعد از هر دقیقه تابش امواج مایکروویو نمونه تا رسیدن به دمای کمتر از ۳۰ درجه سانتی‌گراد در یخچال قرار داده شد. همچنین در این روش برای استخراج بهتر توسط امواج مایکروویو نمونه به مدت ۹۰ دقیقه در اتانول ۸۰ درصد بدون همزدن خیسانده شد. عصاره‌های حاصله با استفاده از کاغذ صافی از مواد گیاهی جدا گردیدند و به وسیله تبخیرکننده چرخان (مدل laborata 4000، ساخت کمپانی هایدولف) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شدند. در نهایت عصاره‌ها توسط خشک‌کن انجمادی (-FDB550Operun ساخت کره جنوبی) در دمای ۵۰- درجه سانتی‌گراد به پودر تبدیل و تا زمان استفاده در ظروف غیر قابل نفوذ به هوا در فریزر ۱۸- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (Pan *et al.*, 2000; Mirzapour *et al.*, 2010).

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها

تهیه سویه‌های میکروبی

میکروارگانیسم‌های مورد بررسی در این مطالعه عبارت بودند از: باکتری‌های *لاکتوباسیلوس دلبروکی*[6] (PTCC 1333)،

1- Sunset Yellow

2- Yeast Glucose chloramphenicol agar
3- Yeast Malt
4- Plate Count Agar
5- Orange Serum Agar
6- *Lactobacillus delbrueckii* PTCC1333

لوکونوستوک مزنتروئیدس[1] (PTCC 1591) و مخمرهای *ساکارومایسس سرویزیه*[2] (PTCC 5269)، *کاندیدا کروزئی*[3] (PTCC 5295) که عمده‌ترین میکروارگانیسم‌های جداسازی شده از نوشابه‌های غیر الکلی گازدار می‌باشند (Woodroof and Philips, 1996). سویه‌های خالص این میکروارگانیسم‌ها از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی خریداری شدند.

روش تهیه محیط‌کشت‌ها

جهت تهیه محیط‌کشت مایع (مولر هینتون براث و عصاره مخمر گلوکز پپتون مالت براث) مورد استفاده در آزمون‌های میکروبی از روش غلظت مضاعف[4] استفاده شد. در واقع میزان وزنی محیط کشت در محلول دو برابر میزان توصیه شده توسط شرکت تولید کننده در نظر گرفته شد تا از رقیق شدن محیط کشت در هنگام اضافه شدن بخش حاوی عصاره در طی آزمون جلوگیری به عمل آید (Thornsberry and McDougal, 1983).

تهیه کشت تازه (در فاز لگاریتمی) از میکروارگانیسم‌ها

هر یک از سویه‌های باکتریایی یک روز قبل از انجام تست حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)[5] و حداقل غلظت کشندگی (MBC)[6] و در مورد مخمرها دو روز قبل از انجام تست بر روی محیط‌کشت ذکر شده، کشت سطحی داده شدند تا میکروارگانیسم‌ها پس از یک شب (باکتری‌ها) یا دو شب (مخمرها) گرمخانه‌گذاری در هنگام تهیه سوسپانسیون میکروبی در فاز لگاریتمی قرار داشته باشند.

تهیه سوسپانسیون با مک‌فارلند شماره یک

سوسپانسیون استاندارد ۱ مک فارلند با استفاده از اضافه کردن ۰/۱ میلی‌لیتراز محلول آبی ۱/۱۷۵ درصد کلرید باریم به طور آهسته و همراه با همزنی مداوم به ۹/۹۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ۱ درصد تهیه گردید و جذب آن در طول موج ۶۲۰ نانومتر خوانده شد (Thornsberry and McDougal, 1983).

تهیه سوسپانسیون میکروبی

یک لوپ کامل از کشت‌های تازه برداشته و به۱۵ میلی‌لیتر محیط دارای غلظت مضاعف استریل اضافه کرده و جذب آن با استاندارد مک‌فارلند شماره یک برابر گردید. در مرحله بعد برای به‌دست آوردن مقدار 10^6 cfu/ml تحت شرایط استریل به نسبت ۱:۳۰۰ با محیط کشت مایع مضاعف مخلوط گردید (Thornsberry and McDougal, 1983).

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی ریشه شیرین‌بیان در برابر باکتری‌ها (*لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *لوکونوستوک مزنتروئیدس*)

حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره‌های اتانولی با استفاده از روش رقت‌سازی در چاهک (میکروبراث دایلوشن) مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور از پلیت‌های استریل ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. عصاره ریشه شیرین‌بیان بافیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتر استریل و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مورد نظر (۴۰۰۰-۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به چاهک‌های پلیت الایزا اضافه گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی به آن اضافه گردید. کلیه رقت‌ها در ۲ تکرار همراه با کنترل منفی بودند. برای هر میکروارگانیسم نیز یک کنترل مثبت شامل محیط و سوسپانسیون و یک کنترل مثبت عدم رشد و از محلول ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کلرامفنیکل استفاده شد. جذب چاهک‌ها در۶۲۰ نانومتر توسط دستگاه خوانش‌گر الایزاخوانده شد و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه نگهداری شدند. پس از ۲۴ ساعت جذب پلیت الایزا در۶۲۰ نانومتر خوانده که در نهایت حداقل غلظتی از عصاره که تغییر دانسیته نوری در آن مشاهده نمی‌شود به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی در نظر گرفته شد. پس از ۲۴ ساعت از هر یک از غلظت‌هایی که در آن‌ها تغییر جذب دیده نشده بر روی محیط‌کشت جامد کشت سطحی انجام گرفت و سپس پلیت‌ها جهت مشاهده رشد یا عدم رشد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند و نتایج MBC گزارش گردیدند (Kulisic *et al.*, 2008).

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی ریشه شیرین‌بیان در برابر مخمرها (*کاندیدا کروزئی* و *ساکارومایسس سرویزیه*)

ابتدا عصاره ریشه شیرین‌بیان با فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتر استریل و غلظت‌های مورد نظر (۳۰۰، ۵۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰، ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) از آن تهیه شد. هر غلظت در ۳ تکرار و با یک کنترل منفی در نظر گرفته شد. به هر میکروتیوب استریل ۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره و ۱ میلی‌لیتر محیط کشت عصاره مخمر گلوکز پپتون مالت براث که به صورت مضاعف تهیه شده بود اضافه شد. به هر میکروتیوب نیز ۰/۱ میلی‌لیتر از

1- *Leuconostoc mesenteroides* PTCC1591
2- *Saccharomyces cerevisiae* PTCC5269
3- Candida krusei PTCC5295
4- Double strength
5- Minimum Inhibitory concentration
6- Minimum bactericidal concentration

سوسپانسیون میکروبی تهیه شده اضافه شد. در ضمن یک کنترل مثبت نیز حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط و ۰/۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون تهیه گردید. نمونه‌ها به مدت ۷۲–۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شدند. بعد از طی زمان لازم، اولین غلظتی که کدورت در آن‌ها مشاهده نگردید به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی تعیین گردید. سپس از غلظت‌هایی که کدورت در آن‌ها مشاهده نشده کشت سطحی بر روی محیط کشت جامد انجام گرفت. پلیت‌ها جهت مشاهده رشد یا عدم رشد به مدت ۷۲–۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند و نتایج حداقل غلظت کشندگی گزارش شد Thornsberry (and McDougal, 1983).

آماده‌سازی نوشابه‌های حاوی عصاره ریشه شیرین‌بیان

نوشابه‌های حاوی عصاره ریشه شیرین‌بیان در غلظت‌های متفاوت تهیه گردیدند. در مرحله بعدی، ارزیابی حسی نمونه‌ها توسط گروه ارزیاب صورت گرفت. با پذیرش نمونه نوشابه‌های با غلظت مشخص از عصاره ریشه شیرین‌بیان، توسط گروه ارزیاب و تطابق نتایج تست پانل با تست حداقل غلظت بازدارندگی، غلظت‌های عصاره ریشه شیرین‌بیان ۲۰۰۰، ۱۵۰۰، ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و ۲۰۰۰+۵۰ درصد میکروگرم در میلی‌لیتر بنزوات سدیم، ۱۵۰۰+۵۰ درصد میکروگرم در میلی‌لیتر بنزوات سدیم، ۱۰۰۰+۵۰ درصد میکروگرم در میلی‌لیتر بنزوات سدیم در نوشابه‌های پرتقالی استفاده شد. لازم به ذکر است که منظور از ۵۰ درصد بنزوات سدیم حذف نیمی از میزان معمول این ترکیب (۰/۱ گرم در لیتر) در فرمولاسیون نوشابه است و سپس بر طبق فرمولاسیون پرتقالی، شربت اولیه نوشابه آماده‌سازی شد. در مرحله بعد توسط دستگاه فیلر، آب گازدار به شربت اولیه اضافه گردید و دربندی صورت گرفت. نمونه‌ها پس از تهیه در دمای محیط نگهداری شدند. در یک دوره نگهداری ۳ ماهه و در ۱۰ مرحله زمانی سینتیک رشد میکروارگانیسم‌ها بررسی گردید. جهت نمونه شاهد از نمونه عادی نوشابه پرتقالی زمزم استفاده شد.

اندازه‌گیری ترکیبات فنلی کل

مقدار کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره ریشه شیرین‌بیان توسط رنگ سنجی به روش فولین–سیوکالته[1] مورد بررسی قرار گرفت (Lin and tang, 2007).

بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی ریشه شیرین‌بیان در نوشابه پرتقالی

باز کردن در نمونه‌ها

ابتدا سطح خارجی بطری نوشابه بایستی با آب و شوینده مناسب شسته شد. سپس بطری را در یک بشرحاوی الکل ۷۰ درجه به گونه‌ای غوطه‌ور ساخته که الکل ۲۵ میلی‌متر از قسمت بالایی بطری را بپوشاند. بطری را از الکل بیرون آورده و صبرکرده تا الکل آن تبخیر شود. با استفاده از یک دربازکن سترون در بطری‌ها را باز کرده و پس از شعله دادن سر بطری‌ها محتویات آن را به یک ظرف سترون منتقل کرده و با تکان دادن مداوم ظرف، گاز آن خارج شد. کلیه مراحل روش کار در مجاورت شعله و با رعایت شرایط سترونی انجام شد (موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی، استاندارد شماره ۳۸۴۶).

کشت نمونه‌ها

پس از خروج گاز از نمونه جهت انجام هریک از فاکتورهای مورد آزمایش (جدول ۱) مقدار ۲ میلی‌لیتر برداشت نموده و به دو پلیت سترون منتقل شد (به هرکدام یک میلی‌لیتر) سپس حدود ۱۵ میلی‌لیتر از محیط مورد نظر که دمای آن حدود ۴۵ درجه سانتی‌گراد باشد، به آن اضافه شد. محیط و نمونه به خوبی مخلوط شده و تا جامد شدن محیط، بر روی سطح صاف و خنک قرار داده شد. پس از جامد شدن محیط‌کشت، پلیت‌ها در دما و زمان مناسب (طبق جدول ۱) گرمخانه‌گذاری شدند. پس از پایان زمان تعیین شده پلیت‌ها را بررسی نموده و میکروارگانیسم‌ها شمارش شدند. کشت نمونه‌ها به صورت دو تکرار (دوپلیتی) می‌باشد. لازم به ذکر است که زمان بین افزودن نمونه به پلیت و محیط به پلیت نباید از ۱۵ دقیقه بیشتر باشد (موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی، استاندارد شماره ۳۸۴۶).

آنالیز آماری

در این پژوهش از روش آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ($P<0/05$) صورت گرفت. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS.9.1 و رسم نمودارها با نرم افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره ریشه شیرین‌بیان در محیط کشت

در این مطالعه اثر ضد باکتریایی مقادیر مختلف عصاره اتانولی ریشه شیرین‌بیان در برابر میکروارگانیسم‌های آلوده کننده نوشابه مورد بررسی قرار گرفت و نتایج در جدول ۲ آورده شده است. عصاره اتانولی ریشه شیرین‌بیان روی میکروارگانیسم‌های مورد بررسی اثر مهارکنندگی نشان داد.

1- Folin-Ciocalteu

جدول ۱- شرایط کشت نوشابه‌های گازدار

نوع میکروارگانیسم	محیط‌کشت اختصاصی	زمان گرمخانه‌گذاری	دمای گرمخانه‌گذاری	روش
شمارش کلی باکتری های هوازی مزوفیل	PCA	۴۸ ساعت	۳۷ درجه سلسیوس	کشت آمیخته
میکروارگانیسم‌های مقاوم به اسید	OSA	۵ روز	۳۰ درجه سلسیوس	کشت آمیخته
کپک و مخمر	YGC	۵ روز	۲۵درجه سلسیوس	کشت آمیخته

مقادیرMIC و MBC *لاکتوباسیلوس دلبروکی*در برابر عصاره اتانولی شیرین‌بیان به ترتیب ۰/۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و ۰/۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود، در حالی که MIC و MBC *لوکونوستوک مزنتروئیدس* یکسان بوده و معادل ۰/۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد. همچنین نتایج حاصل از MIC و MBC *ساکارومایسس سرویزیه* و *کاندیدا کروزئی* با روش رقت‌سازی با مقادیر یکسان معادل ۰/۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود (جدول ۲). فعالیت ضد میکروبی عصاره ریشه شیرین‌بیان می‌تواند به علت حضور آلکالوئید، ساپونین‌ها، فلاونوئیدها، تانن، گلیکوزیدها و فنول‌ها در عصاره خام و اجزای ریشه شیرین‌بیان باشد. این گروه‌های فیتوشیمیایی به عنوان ترکیبات ضد میکروبی شناخته شده‌اند (Lettinga and ;Scalbert, 1991 Field,1992). در رابطه با فعالیت ضد میکروبی ریشه شیرین‌بیان می‌توان به گزارش‌های متعددی از جمله موارد زیر اشاره کرد.

فعالیت ضد میکروبی گلابریدین[1] که از اجزای ریشه شیرین‌بیان می‌باشد ۲۰ برابر بیشتر از عصاره خام یافت شده است (Gupta *et al.,* 2006). در بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی شیرین‌بیان بر علیه *مایکوباکتریوم توبرکلوسیز* $H_{37}R_a$ و $H_{37}R_V$،مقدارMIC، ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شده است و همچنین فعالیت ضد میکروبی گلابریدین در غلظت ۲۹/۱۶ میکروگرم در میلی لیتر (MIC) در برابرگونه‌های مایکوباکتریوم یافت شد. جزء گلابریدین نسبت به گرم مثبت‌ها فعال‌تر از گرم منفی‌ها می‌باشد (Gupta *et al.,* 2006).

در بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره متانولی ریشه شیرین‌بیان مشخص شد که این عصاره فعالیت ضد میکروبی معنی‌داری (۵۰۰-۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی* و *باسیلوس سوبتلیس* داشت اما در برابر *سودوموناس آئروجنس* اثر ضد میکروبی نداشت. فعالیت ضد میکروبی عصاره ریشه شیرین-بیان را می‌توان حضور ترکیباتی چون گلابرن[2]، لیکوایزوفلاون B[3]، ایزولیکوفلاونول[4] مرتبط دانست (Sultana *et al.,*2010). دریک بررسی β گلیسریتینیک[5] جدا شده از شیرین‌بیان،MIC در مقادیر ۷/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر و ۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر را در برابر*باسیلوس سوبتلیس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیس*نشان داد در حالی که چنین اثری را بر *اشرشیا کلی*، *پروتئوس ولگاریس* و انواع قارچ‌ها نداشت. بررسی‌ها با میکروسکوپ هم کانون (کانفوکال[6]) نشان داد که گلیسریتنیک اسید بدون شکستن غشای سلولی، درون باکتری قرار می‌گیرد و سبب جلوگیری از سنتز DNA، RNA و پروتئین می‌شود (Kim *et al.,*2002).

جدول۲- نتایج MIC و MBC عصاره‌های اتانولی ریشه شیرین‌بیان در برابر میکروارگانیسم‌های آلوده‌کننده نوشابه

میکروارگانیسم	MIC_S(mg/ml)	MBC_S(mg/ml)
لاکتوباسیلوس دلبروکی	۰/۷	۰/۸
لوکونوستوک مزنتروئیدس	۰/۹	۰/۹
کاندیدا کروزئی	۰/۸	۰/۸
ساکارومایسس سرویزیه	۰/۸	۰/۸

خواص ضد میکروبی عصاره ریشه شیرین‌بیان در نوشابه پرتقالی

بررسی سینتیک رشد میکروبی نمونه‌های نوشابه

برای بررسی سینتیک رشد میکروارگانیسم‌ها در نوشابه حاوی عصاره ریشه شیرین‌بیان، ابتدا غلظت‌های مورد نظر از عصاره ریشه شیرین‌بیان در عصاره پرتقالی تهیه و در مرحله بعد طبق فرمولاسیون شرکت زمزم، نوشابه‌ها آماده شدند. نمونه عادی زمزم نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. ویژگی‌های شیمیایی نوشابه‌های تهیه شده در جدول ۳ آمده است.

قابل ذکر است که در این طرح با توجه به ارزیابی چشایی، ۳۰

1-Glabridin
2-Glabrene
3-Licoisoflavone B
4-isolicoflavonol
5-β-glycyrrhetinic
6-Confocal

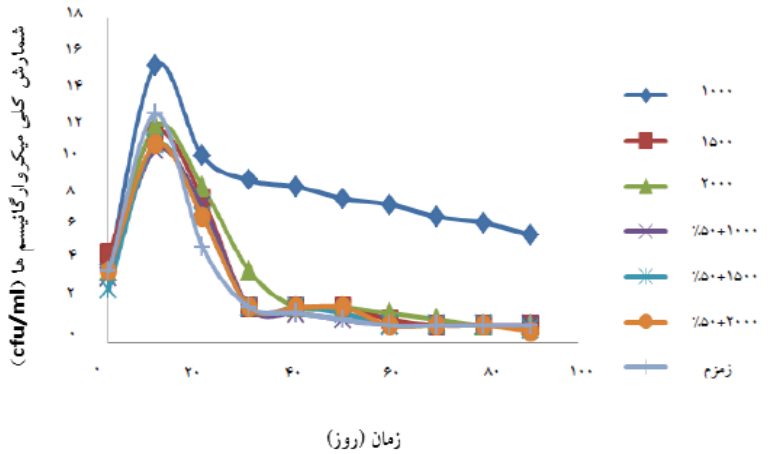
درصد کل شکر مصرفی در فرمولاسیون نوشابه پرتقالی زمزم در حین استفاده در نوشابه‌های پرتقالی حاوی عصاره ریشه شیرین‌بیان حذف گردید تا میزان شیرینی عصاره ریشه شیرین‌بیان در نوشابه به عنوان جایگزینی از شکر نیز سنجیده شود. به همین دلیل بریکس نمونه شاهد (زمزم) نسبت به نمونه‌های حاوی عصاره ریشه شیرین‌بیان بیشتر می‌باشد. ترکیبات فنولی از جمله تانن‌ها، ترکیبات پکتیکی، پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها مثل سلولز و نشاسته از مهمترین عوامل ایجادکننده کدورت هستند که هر یک به تنهایی یا توام با یکدیگر (به صورت تشکیل کمپلکس‌هایی بین مواد فنلی و پروتئین‌ها، مواد فنولی و پکتین، مواد فنولی با یکدیگر و...) در ایجاد کدورت نقش دارند که با گذشت زمان بر میزان کدورت می‌افزایند (Varnam and Sutherland, 1997)، به همین دلیل میزان کدورت نمونه‌های حاوی عصاره ریشه شیرین‌بیان نسبت به نمونه‌های شاهد بیشتر بود. سینتیک رشد میکرواگانیسم‌های هوازی در شکل ۱ نشان داده شده است.

همان‌طورکه در شکل ۱ مشاهده می‌شود در مورد همه غلظت‌ها به جز غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، همانند نمونه شاهد منحنی‌های رشد بعد از رسیدن به حداکثر ، در هر سه غلظت فوق تقریباً با یک شیب تندی کاهش یافت و در روز بیستم تعداد میکروارگانیسم‌های مزوفیل به حد مجاز در نوشابه رسید، که حد مجاز میکروارگانیسم‌های مزوفیل در نوشابه وجود حداکثر ۱۰ کلونی میکروب (cfu/ml) در نمونه می‌باشد. در مورد غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره ریشه شیرین‌بیان بعد از رسیدن به حداکثر رشد در روز پانزدهم، منحنی رشد با شیب ملایمی شروع به کاهش کرد تا در روز چهلم، تعداد میکروب‌ها به حد مجاز رسید. در همه نمونه‌ها همانند نمونه شاهد، بعد از این که رشد میکروبی به حداکثر خود رسید، روند رشد میکروب‌ها با سرعت نسبتاً زیادی سیر نزولی پیدا می‌کند. به نظر می‌رسد که عصاره ریشه شیرین‌بیان با خاصیت میکروبی خود توانسته بار میکروبی نمونه‌های حاوی عصاره را تقریباً به اندازه نمونه حاوی بنزوات (نمونه شاهد) کاهش دهد.

جدول ۳– ویژگی‌های شیمیایی نوشابه‌های پرتقالی حاوی عصاره ریشه شیرین‌بیان

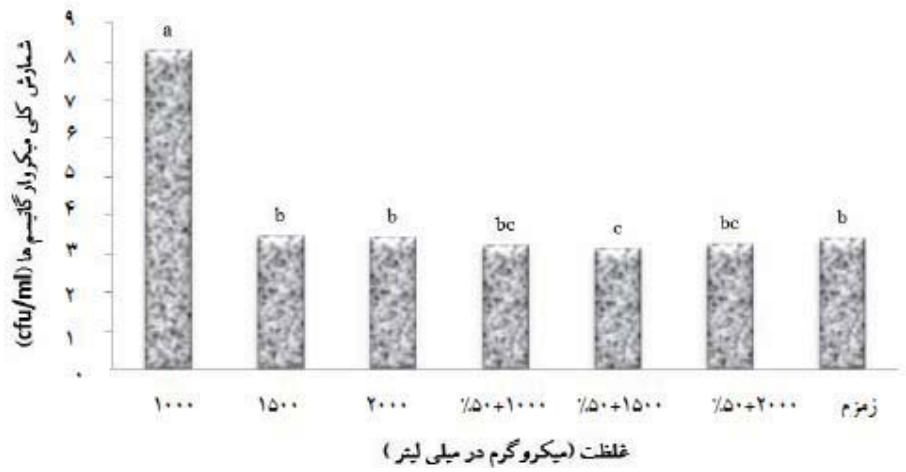
	۱۰۰۰	۱۵۰۰	۲۰۰۰	۱۰۰۰+٪۵۰	۱۵۰۰+٪۵۰	۲۰۰۰+٪۵۰	زمزم
بریکس	۸	۸/۳	۸/۷	۸	۸/۳	۸/۷	۱۱
pH	۲/۸۷	۲/۹۲	۳	۲/۹	۲/۹۶	۳/۰۹	۲/۸
کدورت	۵۱۳	۵۴۲	۵۶۱	۵۱۳	۵۴۲	۵۶۱	۳۲۹

غلظت‌ها بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر و کدورت بر حسب واحد کدورت نفلومتری[1] (NTU) می‌باشد. منظور از ۵۰ درصد، استفاده از بنزوات به میزان نصف مقدار معمول آن در فرمولاسیون نوشابه است.



شکل ۱- منحنی رشد میکروارگانیسم‌های هوازی در محیط کشت PCA در نمونه‌های نگهداری شده در دمای محیط

1-Nephelometric Turbidity Unit



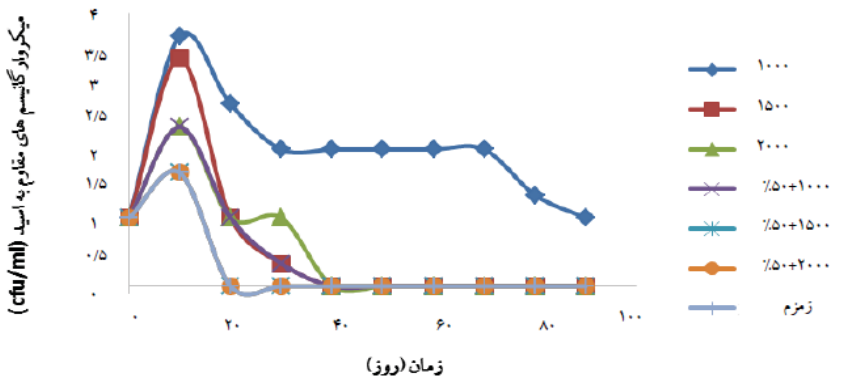
شکل ۲- مقایسه میانگین شمارش کلی میکروارگانیسم‌های هوازی در غلظت‌های مختلف نوشابه‌های حاوی عصاره ریشه شیرین‌بیان در طی دوره نگهداری سه ماهه. حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

همان طورکه در شکل ۲ مشاهده می‌شود بین نمونه‌های حاوی عصاره ریشه شیرین‌بیان در غلظت‌های ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر با نمونه شاهد از نظر شمارش کلی میکروارگانیسم‌های هوازی تفاوت معنی داری وجود ندارد ($P<0/05$)، اما بین نمونه‌های حاوی عصاره ریشه شیرین‌بیان و بنزوات سدیم با نمونه‌های شاهد تفاوت معنی داری وجود دارد به طوری‌که می‌توان گفت این نمونه‌ها بهتر از نمونه شاهد توانسته‌اند بار میکروبی نوشابه را کاهش دهند.

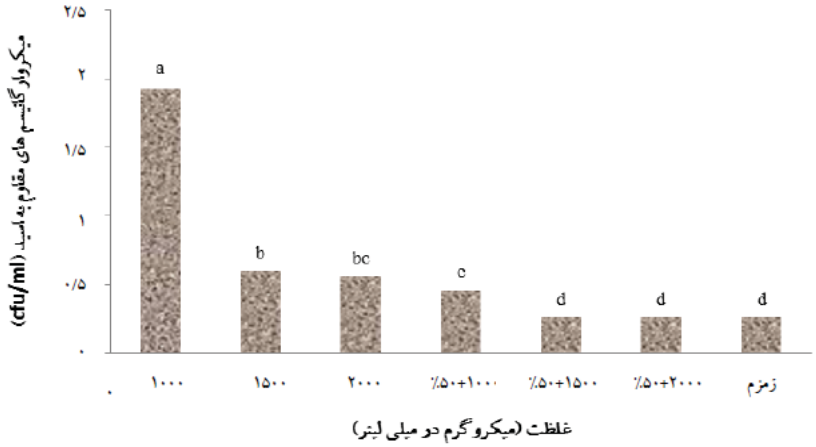
در مورد میکروارگانیسم‌های مقاوم به اسید همان طور که در شکل ۳، مشاهده می‌شود منحنی رشد در همه غلظت‌ها به جزء غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بعد از رسیدن به حداکثر رشد خود با شیب نسبتاً تندی شروع به کاهش کرد. از روز بیستم به بعد بار میکروبی نمونه‌های ۲۰۰۰+۵۰ درصد و ۱۵۰۰+۵۰ درصد همانند نمونه شاهد به صفر رسیده و در نمونه ۱۰۰۰+۵۰ درصد بار میکروبی در روز چهلم به صفر رسید.

همان‌طورکه در شکل ۴ مشاهده می‌شود بین نمونه‌های حاوی عصاره ریشه شیرین‌بیان در غلظت‌های ۵۰٪ +۱۵۰۰ و ۵۰٪+۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر با نمونه شاهد تفاوت معنی داری وجود ندارد ($P<0/05$). بنابراین غلظت‌های ۱۵۰۰+۵۰ درصد و ۲۰۰۰+۵۰ درصد مانند نمونه شاهد توانستند رشد میکروارگانیسم‌های مقاوم به اسید را مهار کنند، اما سایر غلظت‌ها مانند نمونه شاهد نتوانستند رشد میکروارگانیسم‌های مقاوم به اسید را مهار کنند.

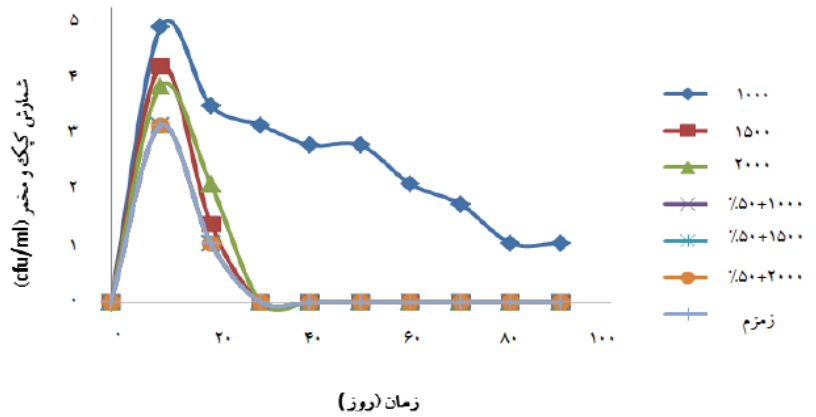
همان‌طورکه در شکل ۵ مشاهده می‌شود به غیر از نمونه حاوی غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره، منحنی رشد کپک و مخمر بقیه نمونه‌های حاوی عصاره ریشه شیرین‌بیان شبیه به نمونه شاهد بوده و منطبق بر یکدیگر می‌باشند. همانند نمودار قبلی، منحنی رشد بعد از رسیدن به حداکثر خود با شیب تندی به صفر رسید، ولی نمونه حاوی ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره به طور کامل نتوانست کپک و مخمر را از بین ببرد.



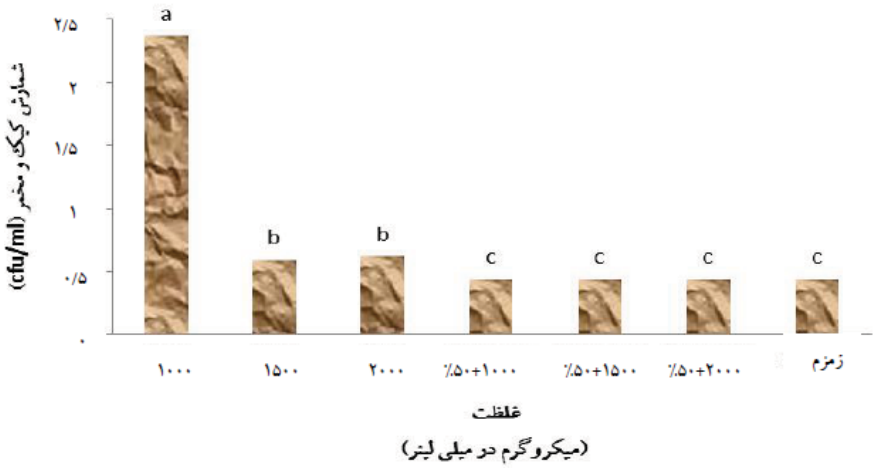
شکل ۳- منحنی رشد میکروارگانیسم‌های مقاوم به اسید نمونه‌های نگهداری شده در دمای محیط



شکل ٤- مقایسه میانگین شمارش میکروارگانیسم‌های مقاوم به اسید (OSA) در غلظت‌های مختلف نوشابه‌های حاوی عصاره ریشه شیرین‌بیان در طی دوره نگهداری سه ماهه. حروف غیر مشابه در هر غلظت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است



شکل ۵- منحنی رشد کپک و مخمر نمونه‌های نگهداری شده در دمای محیط



شکل ٦- مقایسه میانگین شمارش کپک و مخمر در غلظت‌های مختلف نوشابه‌های حاوی عصاره ریشه شیرین‌بیان در طی دوره نگهداری سه ماهه. حروف غیر مشابه در هر غلظت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

همان طورکه در شکل ۶ مشاهده می‌شود بین نمونه‌های حاوی عصاره ریشه شیرین‌بیان در غلظت‌های ۵۰٪ +۱۰۰۰، ۵۰٪ +۱۵۰۰ و ۵۰٪+۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر با نمونه شاهد تفاوت معنی داری وجود ندارد ($P<0/05$). بنابراین غلظت‌های مذکور مانند نمونه شاهد توانستند رشد کپک و مخمر را مهار کنند، اما سایر غلظت‌ها مانند نمونه شاهد نتوانستند رشد کپک و مخمر را مهار کنند.

به طورکلی از نتایج سینتیک رشد نمونه‌های نگهداری شده در دمای محیط به نظر می‌رسد که عصاره ریشه شیرین‌بیان با داشتن ترکیبات ضد میکروبی مانند آلکالوئیدها، ساپونین ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، گلیکوزیدها و فنول‌ها می‌تواند به طور کامل مانع از فعالیت میکروب‌ها در نوشابه پرتقالی شود. البته در روزهای اول بررسی سینتیک رشد، حضور و رشد میکروب‌ها هم در نمونه‌های حاوی عصاره و هم در نمونه حاوی بنزوات (نمونه شاهد) مشاهده گردید. دلیل وجود میکروب در نمونه‌ها، آلودگی در مواد اولیه مصرفی است که یکی از این مواد اولیه شکر است که منبع شناخته شده‌ای از اندوسپورهای باسیلوس هست که بالطبع در محصول نهایی نیز دیده می‌شوند. آب نیز منبع دیگری از باکتری‌هاست که وجود آن‌ها به عنوان شاخص بهداشت ضعیف در کارخانه می‌باشد (Varnam and Jane, 1994). یکی دیگر از دلایل آلودگی نمونه‌ها، آلودگی ثانویه در حین کار است به ویژه در زمان کشت میکروبی که لازم است گاز نمونه‌ها به طور کامل خارج شود.

در بررسی اثر ضد میکروبی سایر گیاهان در نوشابه، محققان نتایجی را گزارش کردند که نتایج تحقیق حاضر با آن‌ها همخوانی دارد. توسلی و همکاران (۱۳۸۸) اثر آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی اسانس رزماری را در نوشابه لیمویی بررسی کردند. بدین منظور نوشابه‌هایی در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی-لیتر اسانس رزماری و ۲۰۰۰+ ۵۰٪ بنزوات تهیه شد و نتایج آزمون میکروبی نوشابه‌ها در طی ۹۰ روز بررسی گردید. طبق نتایج حاصله، در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۵۰٪+۲۰۰۰ اسانس رزماری همانند نمونه شاهد بعد از رسیدن به حداکثر رشد، منحنی‌های رشد هر ۳ غلظت فوق، تقریبا با یک شیب تندی کاهش یافت و در روز سی‌ام تعداد میکروارگانیسم‌های مزوفیل به حد مجاز در نوشابه رسید. در مورد میکروارگانیسم‌های مقاوم به اسید نیز منحنی رشد در همه غلظت‌ها بعد از رسیدن به حداکثر خود با شیب نسبتا تندی شروع به کاهش کرد. حتی نمونه‌های حاوی اسانس رزماری بهتر از نمونه شاهد توانستند باعث از بین رفتن میکروب‌های مقاوم به اسید شوند و از روز سی‌ام به بعد بار میکروبی این نمونه‌ها به صفر رسید. همچنین در رابطه با کپک و مخمر به غیر از نمونه حاوی غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسانس، منحنی رشد بعد از رسیدن به حداکثر خود با شیب تندی به صفر رسید. اسانس رزماری نیز به دلیل داشتن ترکیبات ضد میکروبی همچون ۱و۸ سینئول، کامفور، آلفاپینن، بتاپینن، بورنئول، کامفن و آلفاترپینئول توانست به طور کامل مانع از رشد و فعالیت میکروب‌ها در نوشابه لیمویی شود. الهامی راد و محمدی (۱۳۸۵) از گیاه دارویی بیدمشک جهت تولید نوشابه گازدار استفاده کردند. بررسی روند تغییرات میکروبی و فیزیکوشیمیایی نشان داد که نوشابه بیدمشک از پایداری مناسبی برخوردار است. به طوری که برآیند عوامل موثر بر کیفیت محصول شامل ترکیبات و اجزاء تشکیل دهنده، نوع بسته‌بندی، شرایط پاستوریزاسیون و pH، به گونه‌ای بود که طی دوره نگهداری پارامترهای کیفی محصول شامل pH، اسیدیته، میزان مواد جامد محلول و سطح میکروبی تغییر قابل‌توجهی نکرد اما روند افزایش کدورت نمونه‌ها، تحت دمای محیط و حضور نور به طور قابل‌توجهی شدیدتر بود.

ترکیبات فنولی نمونه نوشابه‌های حاوی عصاره ریشه شیرین‌بیان نگهداری شده در دمای محیط

در اثر ایجاد تنش‌های اکسیداتیو[1] در بدن انسان، عدم تعادلی میان سامانه‌ی آنتی‌اکسیدانی و مواد ناشی از اکسیداسیون ایجاد می-گردد که این مقوله به علت برهم‌کنش میان رادیکال‌های آزاد و گونه-های اکسیژنی فعال با بیومولکول‌ها نظیر پروتئین‌ها، آمینواسیدها، لیپیدها، کربوهیدرات‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌باشد. این امر منجر به ایجاد بیماری‌های نظیر سرطان (Kawanishi *et al.*,2002)، بیماری‌های قلبی–عروقی (Sachidanandame *et al.*, 2005)، آسیب و یا مرگ سلولی و بی نظمی‌های التهابی(Bodamyali *et al.*, 2000) می‌گردد. با توجه به سامانه‌های دفاعی بدن در برابر تنش‌های اکسیداتیو، برای مثال سامانه‌های آنزیمی نظیر سوپراکسیددسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز و حضور آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در بدن نظیر گلوتاتیون، هورمون‌های جنسی استروژنی، اسید اوریک، کوآنزیم Q، ملانین، ملاتونین، همچنان نیاز به استفاده از آنتی‌اکسیدان‌هایی که از طریق مواد غذایی وارد بدن می‌شود، وجود دارد (Laguerre *et al.*,2007). با توجه به این که عامل اصلی تعیین‌کننده پتانسیل آنتی‌اکسیدان غذاها ترکیبات فنولیک می‌باشند، مصرف مواد غذایی حاوی این گونه ترکیبات می‌تواند از طریق اعمال خاصیت آنتی‌اکسیدانی، به حفظ سلامت بدن کمک نماید. به همین دلیل پایداری عصاره اتانولی ریشه شیرین‌بیان در نوشابه پرتقالی در دوره نگهداری ۳ ماهه نیزمورد بررسی قرار گرفت. اندازه‌گیری ترکیبات فنولیک با استفاده از روش فولین انجام گرفت.

همان طور که در جدول۴ مشاهده می‌شود عصاره اتانولی ریشه شیرین‌بیان در pH اسیدی نوشابه پرتقالی نه تنها پایداری خود را در

1 - OXidative stress

طی نگهداری به مدت ۳ ماه حفظ نمود، بلکه بعد از گذشت ۳۰ روز میزان ترکیبات فنولی نوشابه پرتقالی حاوی عصاره ریشه شیرین‌بیان به میزان ۶۰ درصد افزایش نشان داد و سپس مقدار آن ثابت ماند. این افزایش احتمالا می‌تواند ناشی از هیدرولیز پیوندهای بین ترکیبات فنولیک با سایر ترکیبات به ویژه پروتئین‌ها باشد (شهابی و همکاران، ۱۳۸۷).

در بررسی پایداری ترکیبات فنولیک در محیط اسیدی، عربشاهی و اعلمی (۲۰۰۸)، عصاره فنلی شاه توت و نعناع را به آب آناناس اضافه کردند و حلالیت و پایداری آن‌ها را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که عصاره‌های مذکور به خوبی پایداری خود را طی نگهداری به مدت ۴ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد حفظ کردند (Arabshahi-Delouee and Aalami, 2008). شهابی و همکاران (۱۳۸۷) در بررسی پایداری ترکیبات فنلی در آب سیب در طی دوره نگهداری، افزایش ترکیبات فنولی را گزارش کردند.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش حاکی از آن بود که عصاره ریشه شیرین‌بیان با داشتن ترکیبات ضد میکروبی مانند آلکالوئیدها، ساپونین‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، گلیکوزیدها و فنل‌ها دارای فعالیت ضد میکروبی بر روی میکروارگانیسم‌های آلوده کننده نوشابه می‌باشد و در غلظت ۱۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به همراه ۵۰ درصد بنزوات سدیم معمول در فرمولاسیون نوشابه مانع از رشد و فعالیت میکروب‌ها در نوشابه پرتقالی در طی نگهداری شد. با توجه به اثرات نامطلوب نگهدارنده‌های سنتزی بر سلامت انسان و نیز مقاومت سویه‌های باکتریایی به آنتی بیوتیک‌ها، مطالعات بیشتر در زمینه کاربرد این عصاره‌ها در سیستم‌های غذایی فساد پذیرپیشنهاد می‌گردد.

جدول ٤- بررسی پایداری ترکیبات فنلیک (mg/100mL) عصاره ریشه شیرین‌بیان در محیط اسیدی نوشابه پرتقالی در طی دوره نگهداری سه‌ماهه

زمان (روز)/غلظت (پی‌پی‌ام)	۱۰۰۰	۱۵۰۰	۲۰۰۰	۱۰۰۰+٪۵۰	۱۵۰۰+٪۵۰	۲۰۰۰+٪۵۰
۰	۱/۲۸±۰/۰۰۶^{b}	۱/۸۷۷±۰/۰۱۲۲^{c}	۲/۳۳±۰/۳۳^{c}	۱/۲۸±۰/۰۰۵۲^{c}	۱/۸۹±۰/۰۲۹^{b}	۲/۳۷±۰/۰۴۹^{b}
۱۰	۱/۲۸±۰/۰۰۵^{b}	۱/۸۷۳±۰/۰۰۳^{c}	۲/۳۷±۰/۰۱۹^{c}	۱/۲۹±۰/۰۰۷۶^{c}	۱/۸۷±۰/۰۰۶^{b}	۲/۳۸±۰/۰۳۷^{b}
۲۰	۱/۲۷±۰/۰۰۴۳^{b}	۱/۸۸±۰/۰۱۴۱^{c}	۲/۳۸±۰/۰۴۶۲^{c}	۱/۲۷±۰/۰۰۲۳^{c}	۱/۸۸±۰/۰۰۷^{b}	۲/۳۹±۰/۰۳۵^{b}
۳۰	۱/۲۸±۰/۰۰۱۷^{b}	۱/۸۸±۰/۰۱۰۴^{c}	۲/۳۵±۰/۰۱۳^{c}	۱/۳±۰/۰۳۸^{c}	۱/۹۴±۰/۱۰۸^{b}	۲/۴±۰/۰۳۶^{b}
۴۰	۲/۰۶۳±۰/۰۱۱^{a}	۲/۷۱±۰/۰۲۰۸^{b}	۳/۰۷±۰/۵۸۸^{b}	۲/۰۰۸±۰/۰۱^{b}	۲/۸۴±۰/۰۵۵^{a}	۳/۴۲±۰/۰۱۵۸^{a}
۵۰	۲/۰۹±۰/۰۱^{a}	۲/۷۵±۰/۰۳^{b}	۳/۴۲±۰/۰۱^{a}	۲/۱۶±۰/۰۵۷^{a}	۲/۹±۰/۰۲۴^{a}	۳/۴۳±۰/۰۱۸^{a}
۶۰	۲/۰۵۶±۰/۰۴۹^{a}	۲/۸۵±۰/۰۱۳^{a}	۳/۴۹±۰/۰۲۹^{a}	۲/۱۵±۰/۰۲۳^{a}	۲/۸۴±۰/۰۳۵^{a}	۳/۴۲±۰/۰۱۷۳^{a}
۷۰	۲/۰۹۳±۰/۰۰۵۷^{a}	۲/۸۳±۰/۰۱۷^{a}	۳/۴۸±۰/۰۲۰۲^{a}	۲/۱۳±۰/۰۴^{a}	۲/۹۳±۰/۰۸۵^{a}	۳/۴۲±۰/۰۰۶۲^{a}
۸۰	۲/۰۶۶±۰/۰۱۵۲^{a}	۲/۸۲±۰/۰۱۸^{a}	۳/۴۹±۰/۰۰۱^{a}	۲/۱۲±۰/۰۲^{a}	۲/۹۱±۰/۰۰۱^{a}	۳/۴۲±۰/۰۱۱^{a}
۹۰	۲/۰۷±۰/۰۳۴۶^{a}	۲/۸۳±۰/۰۵^{a}	۳/۵۳±۰/۰۳۴^{a}	۲/۱۲±۰/۰۰۱^{a}	۲/۹۱±۰/۰۳۴^{a}	۳/۴۱±۰/۰۱۲^{a}

حروف غیر مشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

منابع

الهامی راد، ا. ح. و محمدی، ع.ا.، ۱۳۸۵، فرمولاسیون نوشابه گازدار با استفاده از عرق بیدمشک و ارزیابی تغییرات فیزیکی و شیمیایی و میکروبی آن در طی نگهداری، مجله پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، جلد دوم، شماره ۱، صفحه ۲۷-۳۹.

توسلی، ص.، ابراهیم زاده موسوی، م ع.، امام جمعه، ز. و رضوی، ه.، ۱۳۸۸، بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی اسانس رزماری در نوشابه لیموییپ، پایان‌نامه، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه تهران.

شهابی، ا.، احمدی، ع. و حجازی، م.، ۱۳۸۷، بررسی خواص آنتی باکتریال ترکیبات فنلی هسته انگور و پوست انار در آب سیب بر باکتری *Alicyclobacillus acidoterrestris*، پایان‌نامه، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه تهران.

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۷۵، ویژگی‌ها و روش‌های آزمون میکروبیولوژی نوشابه‌های گازدار، چاپ اول، شماره استاندارد ایران ۳۸۴۶.

Arabshahi-Delouee, S.,and Aalami M., 2007, Production of functional pineapple juice by incorporation of phenolic extracts from selected plants.International journal of food properties, 10, 479-488.

Bawa,S., 2005, The role of the consumption of beverages in the obesity epidemic. Journal of the Royal

Society for the Promotion of Health, Vol. 125, No. 3, 124-128.
Bodamyali, T., Stevens, C. R. and Blake, D. R., 2000, Reactive oxygen/nitrogen species and acute inflammation: a physiological process. In: Winyard, P.G., Blake, D. R. and Evans, C. H. editors. Free Radical and inflammation. Basel, Switzerland: Birkhauser. 9-11.
Fenwick, G. R., Lutomski, J. and Nieman, C., 1990, Liquorice, composition, uses and analysis. Food Chemistry, 38, 119-143.
Field J.A., and Lettinga., G.,1992, Toxicity of tannic compounds to microorganisms. Plants Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance. Basic Life Science, 59, 673-692.
Hunter, M. L., 2003, Development of low erosive carbonated fruit drinks, 2- Evaluation of an experimental orange drinks in vitro and in situ. Journal of Dentistry, 31, 253-260.
Kawanishi, S., Hiraku, Y., Murata, M., and Oilawa, S., 2002, The role of metals in site-specific DNA damage with refrence to carcinogenesis. Free Radical Biology Method, 32, 822-832.
Kim, H.K., Park, Y., Kim, H.N., B.H., Jeong, H.G., Lee, D.G., and Hahm, k., 2002, Antimicrobial mechanism of *β*-glycyrrhetinic acid isolated from licorice (*Glycyrrhiza glabra).*Biotechnology Letters,24**,** 1899–1902.
Kulisic, T., Radonic, A., and Katalinic, V., 2004, Use of different methods for testing antioxidative of oregano essntial oil. Food Chemistry, 85, 633-640.
Laguerre, M., Lecomte, J. and Villeneuve, P., 2007, Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. Progress in Lipid Research, 46, 244-282.
Lin, J.Y., and Tang, C.Y., 2007, Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. Food Chemistry, 101, 140-147.
Mirzapour, M., Hamedi, M. and Rahimipanah, M, 2010, Sunflower oil stabilization by persian walnut leaves extract during oven storage test. Food Scince and Technology Resaerch, 16,443-446.
Pan, X., Liu, H., Jia, G., and Shu, Y., 2000, Microwave-assisted extraction of glycyrrhizic acid from licorice root. Journal of Biochemical Engineering, 5, 173–177.
Scalbert, A., 1991, Antimicrobial properties of tannins. Phytochemis try, 30, 3875-3883.
Sultana, S., Haque, A., Hamid, K., Urmi, K.F. and Roy, S, 2010, Antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activity of methanolic extract of *Glycyrrhiza Glabra.* Agriculture and Biology Journal of northAmerica.
Thornsberry C. and McDougal L.K., 1983, Successful use of broth microdilution in susceptibility tests for methicillin-resistant (heteroresistant) staphylococci. Journal Clin Microbiol;18,1084-91.
Varnam, A. H. and Sutherland, J. P., 1997, Beverages (Technology, Chemistry, Microbiology), ChapmanandHall.
Varnam, A. H. and Jane P, 1994, Beverage: Technology, Chemistry and Microbiology. Champan and Hall. London. PP, 120-243.