

اثرات ضدآکسندگی و ضد میکروبی عصاره برگ درخت پرتقال (*Citrus sinensis*) کشت شده در ایران و بررسی پایداری اکسیداسیون روغن سویا غنی شده با آن

ابوالفضل فدوی^{۱*}، هادی کوهساری^۲

۱. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آزاد شهر، استان گلستان

۲. گروه علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آزاد شهر، استان گلستان

(تاریخ دریافت: ۹۳/۵/۴، تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۱۹)

چکیده

عصاره‌های متانولی به‌دست آمده از برگ سبز و سیاه شده درخت پرتقال از نظر خواص ضدآکسندگی، محتوی ترکیبات فنولی و اثرات ضد میکروبی بر میکروب‌های *انتروکوکوس فکالیس*، *اشرشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی*، *موریوم*، *شیگلا دیسانتری* و *یرسینیا انتروکولیتیکا* بررسی گردید. سپس این عصاره‌ها در ۳ غلظت ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ ppm در روغن سویای تصفیه شده بدون ضدآکسندگی به‌کار گرفته و در دمای ۶۰ °C به مدت یک ماه ذخیره شدند. متعاقباً مقادیر اسیدیته، اندیس یدی و اندیس پراکسید نمونه‌های روغن تعیین گردیدند. بر اساس نتایج به‌دست آمده، هر دو عصاره برگ پرتقال قدرت ضدآکسندگی و ضد میکروبی ضعیفی داشتند؛ زیرا که در غلظت‌های با ماده خشک ۵۰۰ الی ۲۰۰۰ µg/mL از عصاره‌ها، عصاره سبز آن به‌طور معنی‌داری ($p < 0/01$) قدرت ضدآکسندگی به روش حذف رادیکال‌های DPPH (در محدوده ۲۶/۵٪ - ۳/۵۷) بیش‌تری نسبت به عصاره برگ سیاه (در محدوده ۲۰/۸۵٪ - ۱/۴) داشت. هم‌چنین عصاره برگ سبز پرتقال با حداقل غلظت ماده خشک ۵۵ mg/mL فقط از رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ممانعت کرد. اما عصاره برگ سیاه با حداقل غلظت ماده خشک ۱۱۰ mg/mL توانست از رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *یرسینیا انتروکولیتیکا* جلوگیری نماید. در آزمون‌های پایداری روغن، با افزایش غلظت ماده خشک عصاره برگ سبز مقادیر اسیدیته و پراکسید نمونه‌ها به‌طور معنی‌داری ($p < 0/05$) کاهش یافت. نتایج نهایی نشان داد که روغن سویای حاوی ۱۰۰۰ ppm عصاره برگ‌های سبز پرتقال از نظر مقادیر اسیدیته فاقد اختلاف معنی‌دار ($p < 0/05$)، از نظر مقادیر اندیس یدی مشابه و در آزمون عدد پراکسید واجد اختلاف معنی‌دار ($p < 0/05$) و دارای میزان کم‌تری از عدد پراکسید نسبت به روغن سویای حاوی ضدآکسندگی تجارتي پروپیل گالات (۲۰۰ ppm) بود. لذا عصاره برگ سبز پرتقال می‌تواند به‌عنوان جایگزین آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در نگه‌داری روغن‌ها و چربی‌های خوراکی به‌کار رود، اما با توجه به مشکل کدورت ظاهری ایجاد شده در روغن سویا حاوی آن، روش‌های کدورت زدایی در تحقیقات بعدی پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: عصاره برگ پرتقال، قدرت ضدآکسندگی، اثر ضد میکروبی، پایداری روغن سویا.

1- مقدمه

می‌آیند، می‌توان به پرتقال شهسواری، آملی، جهرمی، دارابی، بمی، پرتقال‌های نافدار¹ هم‌چون تامسون ناول² و یا واشنگتن ناول³ که میوه‌های بی‌دانه دارند و در اثر جهش یافتن جوانه از رقم برزیلی دانه‌دار *Larancia Selecta*⁴ حاصل شده‌اند، اشاره نمود. پرتقال یافا که میوه آن در دی ماه می‌رسد و پرتقال والنسیا⁵ نیز در ایران پرورش داده می‌شوند. هم‌چنین پرتقال‌های خونی⁶ دارای گوشت میوه رنگی در اثر وجود آنتوسیانین بوده و این نوع پرتقال‌ها از نواحی مدیترانه می‌باشند. در ضمن پرتقال‌های ترش⁷ از جمله بوکت و سویل در برخی از کشورها پرورش داده می‌شوند.

تحقیقات نشان داده است که بخش خوراکی گریپ فروت صورتی در مقایسه با پرتقال در خنثی کردن رادیکال‌های آزاد مؤثرتر است [8]. در تحقیق دیگری که روی عصاره‌های مرکبات صورت پذیرفت، عصاره‌های پرتقال، نارنگی و گریپ فروت روی اکسیداسیون لیپوپروتئین‌های استخراج شده از پلاس‌های خنثی شده، هیچ‌گونه اثر آنتی‌اکسیدان را نشان ندادند [9]. در این تحقیق هیسپرتین⁸ و هیسپریدین⁹ که دو ترکیب فنولیک عمده در عصاره میوه پرتقال محسوب می‌شود، فعالیتی از خود نشان نداد، اما در تحقیق دیگری عکس این نتیجه به‌دست آمد و این دو ترکیب را واجد خاصیت آنتی‌اکسیدان معرفی نمود [10]. در دسته بندی عوامل مختلفی که می‌توانند روی قدرت ضداکسندگی برگ‌ها اثر گذار باشند، یکی ترکیبات موجود در آن قسمت از گیاه است و دیگری عواملی که آن ترکیبات را دستخوش تغییر می‌نماید. وارپته و عضو گیاه مورد مطالعه می‌تواند در تفاوت بین خواص ضداکسندگی و محتوی ترکیبات فنولی اثر بخش باشد [11]. آنزیم‌هایی از قبیل سوپر اکسید دیسموتاز، پراکسیداز آسکوربات، ردوکتاز دهیدروآسکوربات و کاتالاز [12] موجود در برگ‌های برخی مرکبات و ترکیبات پلی فنولی اپی گالوکتچین¹⁰، اپی کتچین¹¹،

سرآغاز تغییرات اساسی در ساختار مولکولی ترکیبات آلی، شیمیایی، بیولوژیکی و حتی عناصر معدنی، اکسیداسیون آن‌ها است که این امر به‌خصوص در مواد غذایی، به‌ویژه چربی‌ها، منجر به ناپایداری و عدم تحمل فرایندهای حرارتی گشته و کیفیت ماده غذایی را کاهش می‌دهد. برای جلوگیری از تخریب چربی‌ها و روغن‌ها از ترکیباتی به نام ضد اکسند¹ استفاده می‌کنند که از شروع و پیشرفت واکنش‌های اکسیداسیونی جلوگیری می‌کنند [1]. امروزه استفاده از ضد اکسند^{های} مصنوعی یا سنتزی (BHA، BHT، PG، TBHQ و ...) به‌منظور جلوگیری از این پدیده‌های نامطلوب و کنترل این واکنش‌ها، امری رایج در صنعت غذا شده است، اما تحقیقات اخیر نشان داده که مصرف این ضداکسند^{ها} باعث عوارض نامطلوبی از قبیل سرطان‌زایی و آسیب‌های کبدی در حیوانات آزمایشگاهی می‌گردد [2].

نقش برخی از ترکیبات فنولی با منشاء گیاهی به‌عنوان ضداکسند^{های} طبیعی برای بسیاری از محققان مشخص شده است [3-4] که می‌توانند نقش‌های مهمی را در خنثی کردن رادیکال‌های آزاد، احاطه کردن فلزات انتقالی و فرو نشانند مولکول‌های اکسیژن یگانه و سه گانه از طریق تغییر مکان یا تجزیه پراکسیدها داشته باشند [5]. یک دسته از مواد غذایی که امروزه از ضداکسند^{های} ساختگی برای افزایش ماندگاری آن‌ها استفاده می‌شود، روغن‌های خوراکی با منشاء گیاهی هستند که روغن سویا در بین آن‌ها نقش مهم‌تری در تهیه غذاها و پخت و پز ایفا می‌کند. امروزه محققان به دنبال یافتن راه‌هایی برای حفظ پایداری و کیفیت بیشتر و بهتر آن‌ها توسط ضداکسند^{ها} می‌باشند و در این خصوص ضداکسند^{ها} با منشاء گیاهی که اثرات جانبی برای انسان نداشته و در سلامت بدن هم نقش به‌سزائی داشته باشد نیز مورد توجه است [6-7]. لذا یافتن منبع غنی از این ترکیبات و بررسی امکان استفاده از آن‌ها در بهبود کیفیت مواد غذایی ضروری به نظر می‌رسد.

پرتقال با نام علمی *Citrus sinensis* دارای برگ‌های سبز و گل‌های سفید می‌باشد. از پرتقال‌های محلی که در ایران پرورش داده می‌شوند و از جمله پرتقال‌های شیرین به شمار

1. Antioxidant

1. Navel

2. Thompson Navel

3. Washington Navel

4. Larancia Selecta

5. Valencia

6. Blood oranges

7. Sour oranges

8. Hesperetin

9. Hesperidin

10. Epigallocatechin

11. Epicatechin

کتچین¹، روتین²، گالیک اسید³، نارینجین⁴، کلروژنیک اسید⁵، هسپریدین و پارا-کوماریک اسید⁶ موجود در چای سیاه تهیه شده از برگ‌های مرکبات در ایجاد خاصیت آنتی اکسیدانی می‌توانند موثر باشند [13]. تحقیقات نشان داده که برگ‌ها در تنش‌های حرارتی تولید آنیون‌های سوپر اکسید (O_2^-) می‌نمایند که افزایش فعالیت و تحریک آنزیم‌های واجد خاصیت آنتی اکسیدانی و کاهش فعالیت‌های فتوسنتزی را به همراه دارد [12]. روند پیری برگ‌های پرتقال مجاورت داده شده با اتیلن و تجزیه کلروفیل در افزایش تجمع آلفا-توکوفرول، که یک ترکیب آنتی اکسیدانی شاخص است، نیز می‌تواند در افزایش این خاصیت تاثیر گذار است [14].

2-2- جمع آوری برگ‌ها و تهیه عصاره متانولی برگ‌های سبز و سیاه

برگ‌های درخت پرتقال یافا در ماه شهریور از باغات شهر گرگان با طول و عرض جغرافیایی $36^\circ 50' N$ و $54^\circ 29' E$ و با ارتفاع 100 متر از سطح دریا چیده و جمع‌آوری و سپس، برگ‌ها، شسته و نم‌گیری شدند. برای تهیه برگ‌های سبز خشک، برگ‌های تمیز شده در دمای $60^\circ C$ به مدت 12 ساعت در آون قرار گرفته، پس از خشک شدن به قطعات $0/5$ سانتی متر خرد گردیدند. برای تهیه برگ‌های خشک سیاه، برگ‌های سبز تازه و تمیز را ابتدا در دمای $40^\circ C$ به مدت 4 ساعت پلاسیده نموده، سپس عمل مالش‌دهی و خرد کردن انجام گردید. برای انجام واکنش‌های قهوه‌ای شدن آن‌ها به مدت 8 ساعت در دمای $37^\circ C$ گذاشته شده تا زمانی که واکنش‌ها کامل گردد. سپس دما تا $60^\circ C$ بالا رفت و طی 12 ساعت خشک گردید. برای تهیه عصاره متانولی برگ‌ها، 40 گرم از برگ‌های خشک شده با 200 میلی‌لیتر متانول مخلوط گردیده و به مدت 10 ساعت به حالت سکون ماند. سپس عصاره‌ها با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره 2 صاف و با دستگاه آون تحت خلاء در دمای $50^\circ C$ و فشار 50 میلی‌بار تغلیظ و خشک گردید. عصاره‌های تهیه شده در دمای $20^\circ C$ تا زمان انجام آزمایشات نگهداری گردیدند. غلظت عصاره‌ها در هر آزمون بسته به حداقل اثری که عصاره‌ها از خود نشان دادند، حداقل غلظت‌ها و محدوده آن‌ها تعیین گردید.

2- مواد و روش‌ها

1-2- مواد

معرف فنلی فولین-سیوکالتیو⁷ (Merck)، متانل، اسید گالیک⁸ (Fluka, 98%)، کربنات سدیم بدون آب⁹ (Acros Organics, 98%)،

2-3- اندازه‌گیری فعالیت ضد اکسندگی بر اساس حذف رادیکال‌های DPPH⁵

در این آزمون غلظت‌های $500-2000 \mu g/mL$ از عصاره‌های

- 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl
- Ferrous sulphate hepta-hydrate
- Ferrozine iron reagent
- (3-(2- Pyridyl)-5,6 - diphenyl- 1,2,4- triazine- p,p'- disulfonic acid hydrat monosodium
- Diphenyl-1-picrylhydrazyl-2, 2

1. Catechin
2. Rutin
3. Gallic acid
4. Naringin
5. Chlorogenic acid
6. p-coumaric acid
7. Folin-Ciocalteu's phenol reagent
8. Gallic acid
9. Anhydrous sodium carbonate

برگی پرتقال با حلال متانول تهیه گردید. سپس 0/3 میلی‌لیتر از هر کدام از عصاره‌ها با 2/7 میلی‌لیتر محلول رادیکال‌های DPPH (تهیه شده در غلظت 6×10^{-3} M) مخلوط گردید. مخلوط ایجاد شده به صورت شدید هم زده شده و به مدت 30 دقیقه ساکن می‌ماند و بعد میزان جذب نوری آن در طول موج 517 نانومتر با دستگاه طیف نورسنج خوانده می‌شود. نتایج بر حسب درصد رنگ‌بری ترکیب DPPH بر اساس رابطه زیر محاسبه و گزارش گردید [15]:

برگی پرتقال با حلال متانول تهیه گردید. سپس 0/3 میلی‌لیتر از هر کدام از عصاره‌ها با 2/7 میلی‌لیتر محلول رادیکال‌های DPPH (تهیه شده در غلظت 6×10^{-3} M) مخلوط گردید. مخلوط ایجاد شده به صورت شدید هم زده شده و به مدت 30 دقیقه ساکن می‌ماند و بعد میزان جذب نوری آن در طول موج 517 نانومتر با دستگاه طیف نورسنج خوانده می‌شود. نتایج بر حسب درصد رنگ‌بری ترکیب DPPH بر اساس رابطه زیر محاسبه و گزارش گردید [15]:

که A_0 = میزان جذب نوری در نمونه شاهد و A_c = فعالیت ممانعت کنندگی (%).
نوری در نمونه اصلی می‌باشد.

= قدرت کی لیت کنندگی (%).

$$(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) \times 100 / A_{\text{control}}$$

A_{control} میزان جذب نوری در نمونه شاهد و A_{sample} میزان جذب نوری در نمونه حاوی عصاره می‌باشد [17].

2-4- اندازه گیری میزان کل ترکیبات فنولی

روش آزمون بدین ترتیب است که 300 میکرولیتر از نمونه‌ها با غلظت 200 $\mu\text{g/mL}$ در لوله آزمایش ریخته، به آن 1/5 میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتیو (از محلول 10 برابر رقیق) اضافه شد. سپس 2 میلی‌لیتر محلول وزنی/حجمی 7/5٪ کربنات سدیم به آن اضافه گردید. محلول ایجاد شده به مدت 30 دقیقه ساکن گذاشته شده، سپس میزان جذب نوری آن در طول موج 765 نانومتر خوانده شد. با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده با محلول‌ها با غلظت‌های صفر، 50، 100، 150، 200 و 250 میلی‌گرم در لیتر اسید گالیک، میزان کل ترکیبات فنولی بر حسب میلی‌گرم ترکیبات فنولی معادل گالیک اسید در گرم عصاره خشک شده گزارش شد و در این خصوص از رابطه $y = 0/111x - 0/0148$ ($R^2 = 0/9998$) استفاده گردید که y میزان جذب نور توسط محلول و x محتوی کل فنولی بر حسب میلی‌گرم ترکیبات فنولیک معادل گالیک اسید در گرم عصاره خشک (GAE) است [16].

2-6- اثر ضد باکتریایی

6 گونه باکتری /شیریشیا کلی¹ (PTCC 1399)، سالمونلا تیفی موریوم² (PTCC 1596)، شیگلا دیسانتری³ (PTCC 1188)، استافیلوکوکوس اورئوس⁴ (PTCC 1436)، یرسینیا انتروکولیتیکا⁵ و انتروکوکوس فکالیس⁶ مقاوم به وانکومایسین (Van R 181) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند. از کشت 24 ساعته باکتری‌های مورد نظر در محیط کشت مولر هینتون آگار، یک لوپ به محیط کشت مایع انتقال داده و سوسپانسیونی از باکتری معادل 0/5 مک فارلند تهیه گردید و طبق روش چاهک [18] از سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند بر سطح محیط کشت مولر هینتون آگار به صورت یکنواخت کشت داده شد. سپس با استفاده از چوب پنبه سوراخ کن چاهک‌هایی با قطر 7 میلی‌متر ایجاد شد و 100 میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره‌ها (13/75-110 mg/mL) در چاهک‌ها ریخته شد، سپس به مدت 24 ساعت در 37 درجه سانتی‌گراد در گرمخانه گذاشته شدند. پس از این مدت با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد در

2-5- اندازه‌گیری قدرت کی لیت کنندگی² یون‌های آهن دو ظرفیتی (آزمون FIC)

ابتدا در این آزمون غلظت‌های 100-1000 $\mu\text{g/mL}$ از عصاره‌های برگ پرتقال با حلال متانول تهیه گردید. روش انجام این آزمون بدین ترتیب است که در ابتدا محلول‌های

1. *Escherichia coli*
2. *Salmonella typhimurium*
3. *Shigella dysenteria*
4. *Staphylococcus aureus*
5. *Yersinia entrococlitica*
6. *Enterococcus faecalis*

1. Gallic Acid Equivalent
2. Chelating

اطراف چاهک‌ها، حساسیت یا مقاومت باکتری‌های مورد نظر به عصاره‌ها تعیین شد. هاله‌های عدم رشد بیش از 12 میلی‌متر نشان دهنده حساسیت باکتری به عصاره می‌باشد.

7-2- میزان اسیدیته، عدد پراکسید و عدد یدی

با توجه به این‌که در این تحقیق، غنی‌سازی روغن سویا با عصاره‌های برگ صورت می‌گیرد، این آزمون‌ها از دو جنبه اهمیت دارند. اول از این جهت که به دلیل امکان حضور آنزیم‌های مختلف در عصاره برگ و اثرگذاری آن‌ها روی کیفیت روغن، ممکن است ناپایداری و افت کیفیت روغن‌ها مشاهده گردد. لذا در این خصوص، یکی از آزمون‌هایی که می‌تواند پایداری روغن را نشان دهد، بررسی میزان اسیدیته است. این آزمون بیانگر مقدار اسیدهای چرب آزاد شده در نتیجه هیدرولیز چربی‌ها می‌باشد و مقدار آن تابعی از خلوص، تازگی و درجه هیدرولیز روغن‌ها است. دوم از جنبه امکان توقف یا کندسازی اکسایش روغن‌ها توسط عصاره‌ها که در این خصوص از آزمون‌های کیفی از قبیل عدد یدی (روش ید هانوس)، عدد پراکسید استفاده گردید.

در این مرحله از آزمون، عصاره‌های برگ سبز و سیاه به‌دست آمده از برگ‌های درخت پرتقال در 3 غلظت 500، 750 و 1000 ppm به روغن سویا اضافه شد. روغن سویای مورد استفاده در این تحقیق، روغن تصفیه شده فاقد ضداکسنده تجارتي بوده و از تولید همان روز کارخانه تصفیه روغن شرکت عالیا گلستان واقع در شهرستان کردکوی، استان گلستان تهیه گردید. به همراه نمونه‌های حاوی عصاره‌های گیاهی، نمونه بازاری حاوی ضداکسنده تجارتي پروپیل گالات به غلظت 200 ppm تولید شده در همان کارخانه و نمونه شاهد فاقد ضداکسنده نیز مورد بررسی قرار گرفتند. این نمونه‌ها در دمای °C 60 به مدت 1 ماه قرار گرفتند تا در فرصت دیگری از نظر آزمون‌های تغییرات کیفی از قبیل درصد اسیدیته [19]، عدد پراکسید [20] و عدد یدی (روش ید هانوس) [21] مورد بررسی قرار گیرند.

8-2- تجزیه و تحلیل آماری

این تحقیق به صورت آزمایش مقایسه میانگین‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی در 3 تکرار انجام شد و داده‌های به‌دست

3- نتایج و بحث

3-1- قدرت ضداکسندگی

با توجه به نتایج به‌دست آمده (شکل 1) مشخص گردید که قدرت ضداکسندگی عصاره برگ سبز درخت پرتقال بسیار بیش‌تر از عصاره برگ سیاه آن بوده و در تمامی غلظت‌های مورد آزمون اختلاف آن‌ها معنی‌دار بود ($p < 0/01$). در غلظت‌های مختلف عصاره‌ها که بین 500 تا 2000 میکروگرم ماده خشک بر میلی‌لیتر بود، محدوده نتایج برای عصاره برگ سبز بین 3/57٪ الی 26/5٪ بوده و برای عصاره برگ سیاه این میزان بسیار کم‌تر از عصاره برگ سبز و در محدوده 1/4٪ تا 20/85٪ قرار داشت که برای هر دو عصاره با افزایش میزان غلظت عصاره‌ها این مقادیر افزایش یافت، ولی با توجه به درصد پایین مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد، به‌طور کلی هر دو عصاره فعالیت ضداکسندگی کمی را از خود نشان دادند. این نتایج با یافته‌های کمال و همکاران که روی روغن اسانس به‌دست آمده از پوست پرتقال تحقیق نمودند مشابه بود. در تحقیق آن‌ها اسانس روغنی پوست پرتقال با غلظت (100g/g) 0/24 دارای 14/05٪ قدرت رادیکال زدایی ترکیب DPPH را داشت [22]. اما در مورد میوه پرتقال تامسون نتایج دیگران بیانگر بالاتر بودن این خاصیت نسبت به برگ آن بود [23]. در مقایسه با تحقیقات دیگری که روی 5 رقم از آبمیوه پرتقال اسپانیایی صورت گرفت مشخص گردید که همگی آن‌ها اثر ضداکسندگی آشکاری داشتند که بالاتر از نتایج ما بود [24]. هم‌چنین در خصوص پوست پرتقال مشخص شده است که فلاونوئیدهای موجود در آن نقش موثری در ایجاد قدرت آنتی‌اکسیدانی آن می‌کند [25]. بخش پوست و گوشت چهار پایه پرتقال تامسون نیز توسط قره خانی و همکاران مورد بررسی قرار گرفت که مشخص شد عصاره‌های پوست و گوشت میوه پرتقال تامسون (به خصوص پوست) می‌توانند به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی عمل نموده و پس از آزمایش‌های تکمیلی به مواد غذایی اضافه شوند.

ترکیبات فنولی بهتر می‌باشد. در این خصوص نتایج ما از نظر ارتباط بین افزایش غلظت عصاره با مقادیر کی لیت کنندگی یون آهن با داده‌های به‌دست آمده از دیگر تحقیقاتی که روی عصاره‌های متانولی به‌دست آمده از برگ گونه‌های مختلف زنجبیل زینتی اعم از نوع قرمز [29] و زنجبیل مشعلی [29-30] مشابه بود.

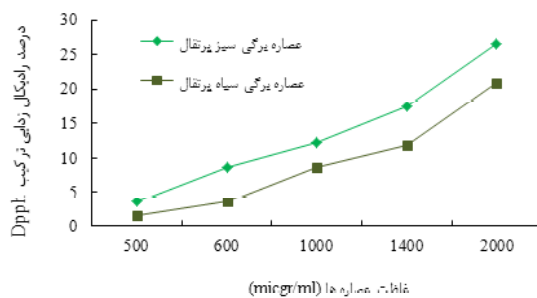
3-3- میزان کل ترکیبات فنولی

در این آزمون، عصاره برگ سبز با غلظت $200 \mu\text{g/mL}$ حاوی $54/12 \pm 0/32 \text{ mg GAE (Gallic Acid Equivalent)/g}$ (میلی‌گرم ترکیبات فنولیک معادل گالیک اسید در گرم عصاره خشک درخت پرتقال) و عصاره برگ سیاه درخت پرتقال با غلظت $200 \mu\text{g/mL}$ حاوی $46/38 \pm 0/41 \text{ mg GAE/g}$ بودند که اختلاف معنی‌داری در سطح اطمینان 99٪ داشتند. با توجه به این‌که عصاره برگ سبز مقادیر بیشتری از این ترکیبات دارد داشتن قدرت ضداکسندگی بیشتر را می‌توان به مقدار ترکیبات فنولی مرتبط داد. ضمن این‌که بین میزان ترکیبات فنولی و داشتن خواص ضداکسندگی ارتباط مستقیمی وجود دارد [31-32]. میزان ترکیبات فنلی بخش پوست و گوشت چهار پایه پرتقال تامسون نیز توسط قره خانی و همکاران مورد

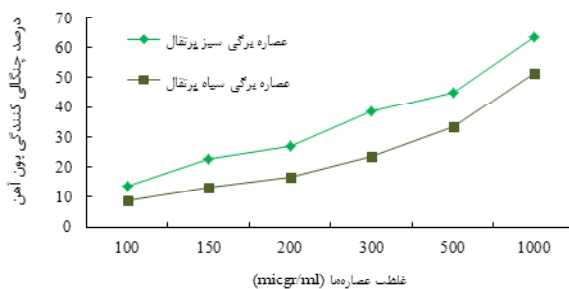
علت بالاتر بودن خاصیت رادیکال زدایی عصاره برگ سبز را می‌توان به حضور و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل ترکیبات فنولی و سالم بودن ترکیبات فنولی آن ارتباط داد [27]. در برگ‌های سیاه، واکنش‌های قهوه‌ای شدن آنزیمی باعث تبدیل گروه‌های هیدروکسیل ترکیبات فنولی، توسط آنزیم‌های پلی فنول اکسیداز، به گروه‌های کتونی می‌گردد که این امر باعث کاهش خاصیت ضداکسندگی آن‌ها می‌گردد [28].

3-2- قدرت کی لیت کنندگی یون آهن

آنالیز نتایج به‌دست آمده (شکل 2) از این آزمون نشان داد که اختلاف معنی‌داری ($p < 0/01$) بین مقادیر قدرت کی لیت کنندگی یون آهن در تمامی غلظت‌های عصاره‌های برگ سبز و سیاه پرتقال وجود دارد. در غلظت‌های 500 تا 1000 میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره برگ‌های سبز و سیاه، محدوده نتایج برای عصاره برگ سبز 13/5٪ الی 63/75٪ بود و برای عصاره برگ سیاه این میزان کم‌تر از عصاره برگ سبز و در محدوده 9٪ تا 51/7٪ قرار داشت و برای هر دو عصاره با افزایش میزان غلظت عصاره، افزایش یافت. تحقیقات پیشین بیانگر نقش کم‌تر ترکیبات فنولی و نقش بیشتر ترکیبات نیتروژن‌دار در این ویژگی می‌باشد، زیرا که نقش کی لیت کنندگی آن‌ها از



شکل (1) میزان رادیکال زدایی (%) عصاره‌های برگ سبز یا سیاه پرتقال



شکل (2) درصد کی لیت کنندگی یون آهن توسط عصاره‌های برگ سبز و سیاه پرتقال

اندازه‌گیری قرار گرفت که از نتایج این تحقیق کم‌تر بود. بر اساس نتایج آن‌ها مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در بخش پوست نسبت به گوشت میوه بیش‌تر بود.

3-4- اثر ضد میکروبی

اثر ضد میکروبی عصاره‌های متانولی برگ‌های سبز و سیاه شده درخت پرتقال در جدول 1 نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌گردد در حالی که عصاره برگ‌های سیاه شده پرتقال توانست در غلظت ماده خشک 110 mg/mL به میزان 9 mm هم از رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *یرسینیا انتروکولیتیکا* ممانعت به‌عمل بیاورد، اما عصاره برگ سبز آن تنها توانست بر رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* اثر منفی بگذارد، که البته حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی روی رشد آن باکتری، کم‌تر از عصاره برگ سیاه (در غلظت 55 mg/mL) بود. سایر میکروارگانیسم‌ها، یعنی *اشرشیا کلی*، *انتروکوکوس فکالیس*، *سالمونلا تیفی موریم*، *شیگلا دیسانتری* و *یرسینیا انتروکولیتیکا*، هیچ‌گونه حساسیتی نسبت به عصاره‌های مورد تحقیق از خود نشان ندادند.

جدول (1) اثر ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف عصاره‌های متانولی برگ‌های سبز و سیاه پرتقال بر حسب قطر هاله عدم رشد به میلی‌متر با غلظت‌های مختلف بر علیه شش گونه باکتری با استفاده از روش چاهک

باکتری	غلظت عصاره برگ‌های سبز پرتقال (mg/mL)				غلظت عصاره برگ‌های سیاه پرتقال (mg/mL)			
	110	55	27/5	13/75	110	55	27/5	13/75
<i>اشرشیا کلی</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>انتروکوکوس فکالیس</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>	-	9 ^a	-	-	10 ^a	9 ^a	-	-
<i>سالمونلا تیفی موریم</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>شیگلا دیسانتری</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>یرسینیا انتروکولیتیکا</i>	-	9 ^a	-	-	-	-	-	-

(-) محدوده ممانعت‌کنندگی کم‌تر از 1 mm؛ فاقد فعالیت ضد میکروبی؛ محدوده ممانعت‌کنندگی بین 2-3 میلی‌متر؛ خاصیت ضد میکروبی ضعیف؛ محدوده ممانعت‌کنندگی بین 4-6 میلی‌متر؛ خاصیت ضد میکروبی متوسط؛ محدوده ممانعت‌کنندگی بین 6-9 میلی‌متر؛ خاصیت ضد میکروبی بالا؛ محدوده ممانعت‌کنندگی بیش از 9 mm؛ خاصیت ضد میکروبی قوی.
a داده‌ها با حرف مشابه (در غلظت‌های متفاوت) بیانگر معنی‌دار نبودن آن‌هاست (سطح اطمینان 95%).

بیانگر اثر مثبت عصاره‌ها در جلوگیری از افزایش اسیدیت می‌باشد. در بین دو گروه عصاره‌ها، از نظر میزان اسیدیت، کیفیت روغن‌های حاوی عصاره برگ سبز بهتر از نمونه‌های حاوی عصاره سیاه بود و با افزایش غلظت عصاره برگ سبز مقادیر اسیدیت نمونه‌ها کاهش معنی‌داری داشت.

علت این امر را می‌توان به فقدان یا میزان کم آنزیم‌های لیپولیتیک و یا فعالیت‌های ممانعت‌کنندگی تجزیه چربی‌ها در عصاره برگ پرتقال ارتباط داد. زیرا تحقیقات نشان داده که در برگ‌های گیاهان، آنزیم‌های تجزیه‌کننده لیپیدها در مقادیر متفاوتی می‌توانند موجود باشند [39] و یا بالعکس آن، مکانیسم‌های جلوگیری‌کننده از تجزیه چربی‌ها در برخی از گونه‌های مرکبات بررسی و دیده شده است [40].

3-5-2- اندیس یدی

جدول 2 نشان دهنده نتایج به‌دست آمده در این آزمون است که محدوده اندیس یدی برای روغن‌های حاوی 500-1000 ppm عصاره برگ سبز 157 تا 181 و هم‌چنین برای نمونه‌های حاوی 500-1000 ppm عصاره برگ سیاه 140 تا 146 (گرم چربی/سانتی‌گرم ید جذب شده) بوده است. مقادیر عدد یدی مربوط به نمونه‌های روغن حاوی غلظت‌های مختلف عصاره برگ سیاه با هم اختلاف معنی‌داری (سطح اطمینان 95%) نداشتند. کم‌ترین این مقدار را در نمونه بدون ضدآکسنده و بیش‌ترین آن در نمونه تجاری (روغن سویای حاوی 200 ppm ضدآکسنده پروپیل گالات است) به‌دست آمد. در این آزمون عصاره‌های برگ سیاه توانایی کم‌تری در حفظ پیوندهای دوگانه تری‌گلیسریدها داشتند و عدد یدی نمونه روغن حاوی 1000 ppm عصاره برگ سبز به میزان 181، نزدیک‌ترین عدد به نمونه روغن بازار، که 198 (گرم چربی/سانتی‌گرم ید جذب شده) است، بود. در نمونه‌های حاوی عصاره برگ سبز، با افزایش غلظت عصاره، میزان اندیس یدی افزایش یافت که این امر بیانگر تاثیر ترکیبات فنولی عصاره سبز در جلوگیری از، از بین رفتن باندهای دوگانه اسیدهای چرب تری‌گلیسریدها است.

3-5-3- اندیس پراکسید

با افزایش درجه غیر اشباعیت روغن‌ها، روغن و یا ماده

انتروکولیتیک اثر ممانعت‌کنندگی از خود به‌جا گذاشت. علت این رفتار می‌تواند به نوع واکنش‌های قهوه‌ای شدن که در برگ‌ها اتفاق می‌افتد، مربوط باشد. زیرا در طی واکنش‌های قهوه‌ای شدن آنزیمی، اکسیداسیون و پلیمریزاسیون ترکیبات فنولی اتفاق می‌افتد که این اتفاقات باعث درگیر شدن گروه‌های فعال ترکیبات فنولی با یکدیگر، کاهش قدرت یونی و کاهش حلالیت آن‌ها می‌گردد [28]. اما در خصوص واکنش‌های قهوه‌ای شدن غیر آنزیمی مایلارد، خاصیت ضد میکروبی افزایش می‌یابد [37]. زیرا فعالیت کی‌لیت‌کنندگی محصولات حاصل از این واکنش‌ها افزایش می‌یابد که طی این پدیده، یون‌های فلزی و کمپلکس‌های فعال با آن‌ها پیوند برقرار می‌کنند. این محصولات فعالیت ضدآکسنده‌گی نداشته ولی دیگر ضدآکسنده‌ها را در برابر تخریب حفظ می‌کنند [38].

3-5-3- خواص کیفی روغن سویای حاوی عصاره‌های برگ

پرتقال

3-5-1- اندیس اسیدی

داده‌های به‌دست آمده در خصوص این آزمون در جدول 2 آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌گردد، برای نمونه‌های روغن سویای بدون ضدآکسنده تجارتي حاوی مقادیر متفاوت عصاره برگ سبز پرتقال، محدوده اسیدیت بین 0/35% الی 0/58% و برای نمونه‌های روغن سویای بدون ضد آکسنده تجارتي حاوی عصاره برگ سیاه پرتقال 0/56% الی 0/95% بود. بر این اساس در بین دو گروه از نمونه‌های حاوی غلظت‌های مشابه عصاره برگ سبز و سیاه پرتقال، اختلاف معنی‌داری (سطح اطمینان 95%) در میزان اسیدیت آن‌ها مشاهده گردید. بیش‌ترین میزان اسیدیت (0/95%) مربوط به دو نمونه سویای فاقد ضدآکسنده و روغن حاوی 500 ppm عصاره برگ سیاه (کم‌ترین غلظت عصاره برگ) بود که با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند. هم‌چنین مشخص گردید که نمونه روغن حاوی 1000 ppm عصاره برگ سبز می‌تواند کاهش قابل توجهی را در میزان اسیدیت نمونه‌های روغن ایجاد نماید به طوری که با نمونه روغن سویای دارای ضد آکسنده تجارتي (حاوی 200 ppm ضدآکسنده پروپیل گالات است) اختلاف معنی‌داری نداشته باشد که مجموعه این نتایج

جدول (2) آزمون‌های کیفی صورت پذیرفته روی روغن سویای فاقد ضد اکسند، روغن سویای تجاری حاوی 200 ppm ضد اکسند پروپیل گالات، روغن سویای فاقد ضد اکسند غنی شده با عصاره ها

غلظت عصاره ها (ppm)			انواع روغن‌های سویا		آزمون
1000	750	500	انواع روغن‌های فاقد ضد اکسند سنتزی حاوی عصاره برگ پرتقال	روغن حاوی 200 ppm پروپیل گالات	روغن فاقد ضد اکسند
0/56 ^c	0/7 ^b	0/95 ^a	حاوی عصاره برگ سیاه پرتقال	0/32 ^e	0/95 ^a
0/35 ^e	0/48 ^d	0/58 ^c	حاوی عصاره برگ سبز پرتقال		
146 ^e	143 ^e	140 ^e	حاوی عصاره برگ سیاه پرتقال	198 ^a	105 ^f
181 ^b	167 ^c	157 ^d	حاوی عصاره برگ سبز پرتقال		
102 ^d	120 ^c	128 ^b	حاوی عصاره برگ سیاه پرتقال	95 ^e	165 ^a
35 ^h	65 ^g	90 ^f	حاوی عصاره برگ سبز پرتقال		

a, b, c, d, e, f, g, h داده‌ها با حروف متفاوت بیانگر معنی دار بودن آن‌هاست (سطح اطمینان 95٪) و داده‌ها میانگین سه تکرار می‌باشند.

نشان دهنده حضور بیش‌تر ترکیبات فنولی در آن‌ها است. میزان پراکسید در روغن حاوی 1000 ppm عصاره برگ سبز بسیار کم‌تر از روغن بازاری حاوی آنتی اکسیدان تجاری بود. نتایج به دست آمده از تحقیق قره‌خانی و همکاران در خصوص بررسی و گوشت میوه پرتقال تامسون در جلوگیری از اکسیداسیون روغن سویا در آزمون‌های پراکسید با نتایج ما مطابقت داشت. آن‌ها مشخص کردند که عصاره‌ها در غلظت‌های 600 و 1000 ppm تاثیر قابل ملاحظه‌ای داشتند، ولی تنها اثر عصاره پوست در غلظت 1000 ppm با 200 ppm ضد اکسند تجاری BHT معادل بود.

مشابه عصاره برگ پرتقال، عصاره استخراجی از تفاله انگور نیز در رقابت با آنتی اکسیدان‌های سنتزی (در نگهداری روغن سویا) عملکرد بهتری داشت. در این خصوص نتایج حاصل از تحقیق 13 روزه نگهداری روغن سویای حاوی 50، 150، 250 و 350 ppm عصاره استخراجی از تفاله انگور نشان داد که در غلظت 150 ppm، عصاره دارای فعالیت مناسبی در مهار اکسیداسیون روغن سویا بود و از نظر آماری تفاوت معنی داری بین سطوح 150، 250 و 350 ppm مشاهده نشد، که در این خصوص با نتایج این تحقیق متفاوت بود. این عصاره‌ها حتی از غلظت 200 ppm آنتی اکسیدان‌های سنتزی، دارای خاصیت بهتری بودند [42]. هم‌چنین طی بررسی که روی میزان فساد اکسیداسیونی روغن سویای حاوی ترکیبات فنولی هسته انار نگهداری شده در دمای 60°C به مدت 12 روز انجام گرفت،

چرب آمادگی بیش‌تری برای اکسیداسیون پیدا می‌کند. در اکسیداسیون مواد چرب، محصول اولیه پراکسید است. وقتی که میزان پراکسید به حد معینی برسد، تغییرات مختلفی صورت گرفته و مواد فرار آلدئیدی و کتوننی ایجاد می‌شوند که در ایجاد بو و طعم نامطبوع مواد چرب موثر هستند [41].

جدول 2، داده‌های به دست آمده از این آزمون را نشان می‌دهد. مقادیر اندیس پراکسید در تمامی نمونه‌های روغن با یکدیگر اختلاف معنی داری (سطح اطمینان 95٪) داشتند. بالاترین میزان اندیس پراکسید در نمونه روغن بدون ضد اکسند به میزان 165 (میلی اکی والان در کیلوگرم روغن) و کم‌ترین آن در نمونه روغن حاوی 1000 ppm عصاره برگ سبز به میزان 35 (میلی اکی والان در کیلوگرم روغن) دیده شد که این نتیجه بیانگر اثر مثبت و معنی دار عصاره‌ها در جلوگیری از افزایش اسیدیت می‌باشد. محدوده اندیس پراکسید برای روغن‌های حاوی عصاره برگ سبز 35 تا 90 و برای نمونه‌های حاوی عصاره برگ سیاه 102 تا 128 (میلی اکی والان در کیلوگرم روغن) بود که این امر بیانگر اثر مطلوب عصاره برگ سبز است. در بین این دو گروه، اختلاف معنی داری (سطح اطمینان 95٪) بین مقادیر اندیس پراکسید در روغن‌های حاوی عصاره برگ سبز با نمونه‌های حاوی عصاره برگ سیاه وجود داشت. در هر دو دسته از نمونه‌ها با افزایش غلظت عصاره برگ، این اندیس کاهش می‌یابد که نشان می‌دهد با افزایش غلظت عصاره برگ مقدار ترکیبات آنتی اکسیدان در عصاره‌ها افزایش می‌یابد و

قوی داشتند که البته در مجموع اثرات ضعیفی از خود نشان دادند. اما در نگهداری روغن سویا عصاره برگ سبز آن تاثیر بسیار خوبی از خود به جا گذاشت. واکنش‌های قهوه‌ای شدن آنزیمی روی خواص ضد میکروبی و رادیکال‌زدایی روی عصاره برگ سیاه درخت پرتقال، اثرات منفی داشتند که منجر به کاهش غلظت موثر اثر ممانعت کنندگی روی / استافیلوکوکوس / اورئوس گردیدند. نتایج حاصل از بررسی کیفیت نمونه‌های روغن سویای حاوی عصاره‌های برگ سبز و سیاه پرتقال نشان داد که نمونه روغن حاوی 1000 ppm عصاره سبز برگ بهترین اثر نگهدارندگی روی روغن سویا را دارد، زیرا آن نمونه در مقایسه با نمونه بازاری (حاوی 200 ppm آنتی اکسیدان تجاری پروپیل گالات)، در آزمون‌های اندیس یدی و اسیدی با همدیگر مشابه بودند، ولی در آزمون اندیس پراکسید نمونه روغن حاوی 1000 ppm عصاره سبز برگ عملکرد بسیار بهتری داشت. لذا با توجه به نتایج به دست آمده، می‌توان گفت که عصاره برگ سبز پرتقال می‌تواند به‌عنوان جایگزین آنتی اکسیدان‌های سنتزی در نگهداری روغن‌ها و چربی‌های خوراکی به کار رود. البته نکته قابل توجه در کاربردی بودن این تحقیق از بین رفتن شفافیت نمونه‌ها، طی غنی سازی است که با توجه به این مسئله، روش‌های کدورت‌زدایی در تحقیقات بعدی پیشنهاد می‌گردد.

نمونه حاوی 350 ppm ترکیبات فنولی هسته انار در مقایسه با نمونه‌های حاوی 200 ppm آنتی اکسیدان تجاری BHA دارای مقادیر پراکسید (به ترتیب 60/69 در برابر 62 میلی اکی والان پراکسید در 1000 گرم) کم‌تری بودند [43] که با مقایسه با نتایج تحقیق حاضر (عدد پراکسید 35 در برابر 95 میلی اکی والان پراکسید در 1000 گرم به ترتیب برای تیمار حاوی 1000 ppm عصاره سبز برگ و روغن حاوی 200 ppm پروپیل گالات)، مشخص می‌شود که عصاره سبز برگ پرتقال اثر نگهدارندگی بهتری روی روغن سویا دارد. نکته قابل ذکر در طی افزودن عصاره‌های متانولی برگ‌ها، کاهش شفافیت نمونه‌ها به‌طور غیر منتظره بود که به‌طور مشهودی نمایان بود. این امر می‌تواند در پذیرش آن توسط مصرف‌کنندگان تاثیر بگذارد.

4- نتیجه گیری

به‌طور کلی با وجود این که در آزمون اندازه‌گیری فعالیت رادیکال‌زدایی DPPH و کی لیت کنندگی، عصاره برگ پرتقال اثرات قابل توجهی را از خود نشان نداد و همچنین در خصوص آزمون‌های ممانعت کنندگی روی شش میکروارگانیزم، عصاره برگ سیاه پرتقال تنها روی دو میکروارگانیزم و عصاره برگ سبز پرتقال روی یک میکروارگانیزم در غلظت‌های بالا تاثیر

منابع

- [1] فاطمی، ح. (1381) شیمی مواد غذایی. انتشارات شرکت سهامی انتشار. 480 ص.
- [2] Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad, F., Hafezi, S. (2008). Antioxidant activities of Iranian corn silk. *Turk J. Biol.*, 32, 43-49.
- [3] Lewis, N.G. (1993). *Plant Phenolics. Antioxidants in Higher Plant*, pp. 135-169. Boca Raton, FL: CRC Press.
- [4] Rao, M.V., Paliyath, G., Ormrod, D.P. (1996). Ultraviolet-B-and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *arabidopsis thaliana*, *Plant Physiol.*, 110, 125-136.
- [5] Gil, M.I., Tomás-Barberán, F.A., Hess-Pierce, B., Kader, A.A. (2002). Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. *J. Agr. Food Chem.*, 50, 4976-4982.
- [6] Cerutti, P. (1991). Oxidant stress and carcinogenesis. *Eur. J. Clin. Inves.*, 21, 1-5.
- [7] Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Method. Enzymology*, 186, 1-85.
- [8] Wang, H., Cao, G., Prior, R.L. (1996). Total antioxidant capacity of fruits, *J. Agr. Food Chem.*, 44, 701-705.

- ha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agr. Food Chem.*, 47, 3954-3962.
- [17] Singh, N., Rajini, P. (2004). Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel. *Food Chem.*, 85, 611-616.
- [18] Indu, M., Hatha, A., Abirosh, C., Harsha, U., Vivekanandan, G. (2006). Antimicrobial activity of some of the south-Indian spices against serotypes of *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila*. *Braz. J. Microbiol.*, 37, 153-158.
- [19] AOAC, I. (1990). *AOAC International Accreditation Criteria for Laboratories Performing Food Microbiological and Chemical Analyses in Foods, Feeds, and Pharmaceutical Testing*. No:925.41, P. 612, AOAC International, USA.
- [20] AOAC, I. (1990). *AOAC International Accreditation Criteria for Laboratories Performing Food Microbiological and Chemical Analyses in Foods, Feeds, and Pharmaceutical Testing*. No:965.33, P. 612., AOAC International, USA.
- [21] AOAC, I. (1990). *AOAC International Accreditation Criteria for Laboratories Performing Food Microbiological and Chemical Analyses in Foods, Feeds, and Pharmaceutical Testing*. NO; 920.158, P. 612, AOAC International, USA.
- [22] Kamal, G. M., Ashraf, M. Y., Hussain, A. I., Shahzadi, A., Chughtai, M. I. (2013). Antioxidant potential of peel essential oils of three Pakistani citrus species: *Citrus reticulata*, *Citrus sinensis* and *Citrus paradisi*. *Pakistan J. Bot.*, 45, 1449-1454.
- [23] Nakhaee Moghaddam, M. (1388). Effect of antimicrobial of methanolic extract of orange peel (*Citrus sinensis*) against clinical *Helicobacter Piloee* in Vivo. *Journal of microbial biotechnology of Islamic Azad*
- [9] Vinson, J. A., Jang, J., Yang, J., Dabbagh, Y., Liang, X., Serry, M., Proch, J., Cai, S. (1999). Vitamins and especially flavonoids in common beverages are powerful in vitro antioxidants which enrich lower density lipoproteins and increase their oxidative resistance after ex vivo spiking in human plasma. *J. Agr. Food Chem.*, 47, 2502-2504.
- [10] Miller, N.J., Rice-Evans, C.A. (1997). The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chem.*, 60, 331-337.
- [11] Lagha-Benamrouche, I., Madani, K. (2013). Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Ind. Crop. Prod.*, 50, 723- 730.
- [12] Guo, Y.P., Zhou, H.F., Zhang, L.C. (2006). Photosynthetic characteristics and protective mechanisms against photooxidation during high temperature stress in two citrus species. *Scientia Horticulturae*, 108, 260-267.
- [13] Pękal, A., Drózdź, P., Biesaga, M., Pyrzynska, K. (2011). Evaluation of the antioxidant properties of fruit and flavoured black teas. *Eur. J. Nutr.*, 50, 681-688.
- [14] Rise, M., Cojocar, M., Gottlieb, H.E., Goldschmidt, E.E. (1989). Accumulation of α -tocopherol in senescing organs as related to chlorophyll degradation. *Plant Physiol.*, 89, 1028-1030.
- [15] Hatano, K., Yasuhara, Okuda, T. Hatano, H. Kagawa, T. Yasuhara, T. Okuda, (1988). Two new flavonoids and other constituents I licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 36, 2090-2097.
- [16] Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauhala, J.-P., Pihlaja, K., Kujala, T. S. & Heinonen, M.

- [33] Norajit, K. (2007). Antimicrobial effect of five Zingiberaceae Essential oils. *Molecules.*, 12, 2047-2060.
- [34] Schlievert, P., Deringer, J., Kim, M., Projan, S., Novick, R. (1992). Effect of glycerol monolaurate on bacterial growth and toxin production. *Antimicrob Agent. Ch.*, 36, 626-631.
- [35] McDonnell, G., Russell, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin. microbiol. Rev.*, 12, 147-179.
- [36] Priscila G.M, Alzira M.S.M., Thereza C.V.P. (2006). Chemical resistance of the gram negative bacteria to different sanitizers in a water purification system. *BMC Infectious Disease.*, 6, 131-137.
- [37] Einarsson H., Eklund T., Nes IF. (1988). Inhibitory mechanism of Maillard reaction products, *Microbios.*, 53, 27-36.
- [38] Kajimoto, G.Y.H. (1975). Relationship between the reaction of melanoidin and metal in oil system and effect of melanoidin-metal complex on the rancidification of oil. *Yukagaku.*, 24, 297-300.
- [39] Lee, M.R., Winters, A.L., Scollan, N.D., Dewhurst, R.J., Theodorou, M.K., Minchin, F.R. (2004) Plant-mediated lipolysis and proteolysis in red clover with different polyphenol oxidase activities. *J. Sci. Food Agr.*, 84, 1639-1645.
- [40] Lin, X., Xu, B., Rui, L. (2014). Pancreatic Lipase Inhibitory Effects of Mangosteen Pericarps. *Advance J. Food Sci. Tech.*, 6.
- [41] Gunstone, F. D. (2004). *Rapeseed And Canola Oil: Production, Processing, Properties, And Uses*, CRC Press.
- [42] Ruzbahan, E., Ali pour, D., Barzegar, M., Azizi, M. H. (1387). Antioxidant activity of phenolic compound of grape pulp. *J. Food Sci. Food Indust.*, 5, 69-74.
- [43] Samadluee, H., Azizi, M.H., Barzegar (1386). effect of phenolic compound of seed pomegranate on soybean oil. *J. Agr. Sci. Nat. Resour.*, 14, 42-49.
- [24] Rapisarda, P., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Bonina, F., De Pasquale, A., Saija, A. (1999). Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juices. *J. Agr. Food Chem.*, 47, 4718-4723.
- [25] Liu, L., Zhang, Y., Sha, J., Li, R. (2010). Study on the extraction of flavonoid compound in orange peel and its antioxidant property. *J. Northeast Agricultural University.*, 4, 030.
- [26] Gharekhani, M., Ghorbani, M., Gharekhani, A., Sadeghi Mahunak, A., Jebraeei, Sh., Ghasemi, E. (1390). Effect of orange Thamsen peel and pulp extracts in prevention of soybean oil oxidation, *Fasname Giahani Daruee.*, 8, 55-66.
- [27] Catherine, A., Rice-Evans, C.A., Nicholas, J.M., George, P. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Bio. Med.*, 20, 933-956.
- [28] Pokorny, J., Schmidt, S. (2001). *Natural Antioxidant Functionality During Food Processing. Antioxidants in Food*, pp 331-354. Boca Raton: CRC Press.
- [29] Wong, L. F. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of Alpinia species, B. Sc.(Hons.) Thesis, Monash University Malaysia.
- [30] Chan, E., Lim, Y., Omar, M. (2007). Antioxidant and antibacterial activity of leaves of Etlingera species (Zingiberaceae) in Peninsular Malaysia. *Food Chem.*, 104, 1586-1593.
- [31] Zheng, W., Wang, S.Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agr. Food Chem.*, 49, 5165-5170.
- [32] Awika, J.M., Rooney, L.W., Wu, X., Prior, R.L., Cisneros-Zevallos, L. (2003). Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *J. Agr. Food Chem.*, 51, 6657-6662.
33. Norajit, K. (2007) Antimicrobial effect of five Zin-