DOI: http://dx.doi.org/10.22104/jift.2015.128

فصلنامه فناوری‌های نوین غذایی، سال دوم، شماره ۷، صفحه ۹۶-۸۵ ، بهار ۱۳۹۴

اثرات ضداکسندگی و ضدمیکروبی عصاره برگ درخت پرتقال (*Citrus sinensis*) کشت‌شده در ایران و بررسی پایداری اکسیداسیون روغن سویا غنی سازی‌شده با آن

ابوالفضل فدوی[1]* ، هادی کوهساری[2]

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

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

(تاریخ دریافت: **93/5/4**، تاریخ پذیرش: **93/6/19**)

چکیده

عصاره‌های متانولی به‌دست آمده از برگ سبز و سیاه شده درخت پرتقال از نظر خواص ضداکسندگی، محتوی ترکیبات فنولی و اثرات ضدمیکروبی بر میکروب‌های *انتروکوکوس فکالیس*، *اشرشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *شیگلا دیسانتری* و *یرسینیا انتروکولیتیکا* بررسی گردید. سپس این عصاره‌ها در 3 غلظت 500، 750 و 1000 ppm در روغن سویای تصفیه شده بدون ضداکسنده به‌کار گرفته و در دمای 60 °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 ضداکسندگی و ضدمیکروبی ضعیفی داشتند؛ زیرا که در غلظت‌های با ماده خشک 500 الی 2000 µg/mL از عصاره‌ها، عصارهٔ سبز آن به‌طور معنی‌داری ($p<0/01$) قدرت ضداکسندگی به روش حذف رادیکال‌های DPPH (در محدوده 26/5%- 3/57) بیش‌تری نسبت به عصارهٔ برگی سیاه (در محدوده ٪20/85- 1/4) داشت. هم‌چنین عصارهٔ برگ سبز پرتقال با حداقل غلظت ماده خشک 55 mg/mL فقط از رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ممانعت کرد. اما عصارهٔ برگی سیاه با حداقل غلظت ماده خشک 110 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 1000 ppm عصارهٔ 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 ضداکسنده تجارتی پروپیل گالات (200 ppm) بود. لذا عصاره برگ سبز پرتقال می‌تواند به‌عنوان جایگزین آنتی اکسیدان‌های 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 برگی پرتقال، قدرت ضداکسندگی، اثر ضدمیکروبی، پایداری روغن سویا.

* نویسنده مسئول: fadavi.ac.ir@gmail.com

1- مقدمه

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 اکسنده[1] استفاده می‌کنند که از شروع و پیشرفت واکنش‌های اکسیداسیونی جلوگیری می‌کنند [1]. امروزه استفاده از ضد اکسنده‌های مصنوعی یا سنتزی (TBHQ، PG، BHT، BHA 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 ضداکسنده‌ها باعث عوارض نامطلوبی از قبیل سرطان‌زایی و آسیب‌های کبدی در حیوانات آزمایشگاهی می‌گردد[2].

نقش برخی از ترکیبات فنولی با منشاء گیاهی به‌عنوان ضداکسنده‌های 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 نشاندن مولکول‌های اکسیژن یگانه و سه گانه از طریق تغییر مکان یا تجزیه پراکسیدها داشته باشند[5]. یک دسته از مواد غذایی که امروزه از ضداکسنده‌های 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 ضداکسنده‌ها می‌باشند و در این خصوص ضداکسنده‌ها 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 می‌آیند، می‌توان به پرتقال شهسواری، آملی، جهرمی، دارابی، بمی، پرتقال‌های نافدار[1] هم‌چون *تامسون ناول*[2] و یا *واشنگتن ناول*[3] که میوه‌های بی‌دانه دارند و در اثر جهش یافتن جوانه از رقم برزیلی دانه‌دار *لا رانجا سلکتا*[4] حاصل شده‌اند، اشاره نمود. پرتقال یافا که میوه آن در دی ماه می‌رسد و پرتقال والنسیا[5] نیز در ایران پرورش داده می‌شوند. هم‌چنین پرتقال‌های خونی[6] دارای گوشت میوه رنگی در اثر وجود آنتوسیانین بوده و این نوع پرتقال‌ها از نواحی مدیترانه می‌باشند. در ضمن پرتقال‌های ترش[7] 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 آنتی اکسیدان را نشان ندادند [9]. در این تحقیق هیسپرتین[8] و هیسپریدین[9] که دو ترکیب فنولیک عمده در عصارهٔ 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 آنتی اکسیدان 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. واریته 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 گالوکتچین[10]، اپی کتچین[11]،

1. Antioxidant

1. Navel
2. *Thompson Navel*
3. *Washington Navel*
4. *Larania Selecta*
5. Valencia
6. Blood oranges
7. Sour oranges
8. Hesperetin
9. Hesperidin
10. Epigallocatechin
11. Epicatechin

کتچین[1]، روتین[2]، گالیک اسید[3]، نارینجین[4]، کلروژنیک اسید[5]، هسپریدین و پارا-کوماریک اسید[6] 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].

علی‌رغم مطالعات مختلفی که روی شناخت ویژگی‌های ضداکسندگی قسمت‌های خوراکی، میوه و روغن هسته پرتقال صورت پذیرفته است، منابع اندکی را می‌توان در مورد خصوصیات ضداکسندگی و ضدمیکروبی عصاره برگی و نقش کاربردی آن پیدا نمود. لذا ضرورت شناخت اثر ضداکسندگی این قسمت از این گیاه امری مهم برای استفاده صنعتی و تولید ضداکسنده‌های گیاهی می‌باشد. علاوه بر آن، یکی از پدیده‌های رایج در برگ‌ها، اکسیداسیون و سیاه شدن آن‌ها می‌باشد که این پدیده در تهیه چای از آن‌ها کاربرد دارد، که بررسی اثر این پدیده بر فعالیت ضداکسندگی آن‌ها یکی دیگر از اهداف این تحقیق است. به‌طور کلی هدف از این تحقیق بررسی و مقایسه خصوصیات ضداکسندگی و ضدمیکروبی برگ‌های سبز و سیاه شده درخت پرتقال می‌باشد. ضمن این که پایداری روغن‌های سویای حاوی این عصاره‌ها که تحت فرایند دمایی قرار گرفته‌اند نیز بررسی می‌گردد.

2- مواد و روش ها

2-1- مواد

معرف فنلی فولین-سیوکالتیو[7] (Merck)، متانل، اسید گالیک[8] (Fluka, 98%)، کربنات سدیم بدون آب[9] (Acros Organics, 98%)، 1-1 دی فنیل-2- پیکریل هیدرازیل[1] (Sigma Chemical Co.)، فروس سولفات هپتا هیدرات[2] (Acros Organics, 98%)، معرف فروزین[3] حاوی 3-(2-پیریدیل) 5، 6 دی فنیل-1، 2، 4 تریازین-p،p´ دی سولفونیک اسید هیدرات مونو سدیم[4] (Sigma, 90%).

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

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 E ″29 ,°54، و N ″50 ,°36 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°C به مدت 12 ساعت در آون قرار گرفته، پس از خشک شدن به قطعات 0/5 سانتی متر خرد گردیدند. برای تهیهٔ برگ‌های خشک سیاه، برگ‌های سبز تازه و تمیز را ابتدا در دمای 40°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 °C گذاشته شده تا زمانی که واکنش‌ها کامل گردد. سپس دما تا 60°C بالا رفت و طی 12 ساعت خشک گردند. برای تهیه عصارهٔ 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 شمارهٔ 2 صاف و با دستگاه آون تحت خلاء در دمای 50°C و فشار 50 میلی‌بار تغلیظ و خشک گردید. عصاره‌های تهیه شده در دمای 20°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.

2-3-اندازه‌گیری فعالیت ضداکسندگی بر اساس حذف رادیکال‌های DPPH[5]

در این آزمون غلظت‌های 500-2000 µg/mL از عصاره‌های

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

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 M 6×10^{-3}) مخلوط گردید. مخلوط ایجاد شده به صورت شدید هم زده شده و به‌مدت 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 رابطهٔ زیر محاسبه و گزارش گردید [15]:

فعالیت ممانعت کنندگی(٪) = $(A_o - A_c) \times 100 / A_o$

که A_o= میزان جذب نوری در نمونهٔ شاهد و A_c = میزان جذب نوری در نمونهٔ اصلی می‌باشد.

4-2- اندازه گیری میزان کل ترکیبات فنولی

روش آزمون بدین ترتیب است که 300 میکرولیتر از نمونه‌ها با غلظت 200 µg/mL در لولهٔ 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 (R^2=0/9998) y=0/111 x -0/0148 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)[1] است[16].

5-2- اندازه‌گیری قدرت کی لیت کنندگی[2] یون‌های آهن دو ظرفیتی (آزمون FIC)

ابتدا در این آزمون غلظت‌های 100-1000 µg/mL از عصاره‌های برگی پرتقال با حلال متانول تهیه گردید. روش انجام این آزمون بدین ترتیب است که در ابتدا محلول‌های 2 mM سولفات آهن ($FeSo_4$) و 5 mM معرف فروزین تهیه می‌گردد. هر محلول 20 برابر رقیق گردید. سپس 1 میلی‌لیتر از محلول رقیق شدهٔ سولفات آهن با 1 میلی‌لیتر از محلول نمونه مخلوط شده و سپس 1 میلی‌لیتر از محلول رقیق شده معرف فروزین به آن اضافه گردید. سپس به مدت 10 دقیقه به مخلوط به‌دست آمده استراحت داده شده و میزان جذب نوری آن در طول موج 562 نانومتر خوانده شد. نمونهٔ شاهد فاقد عصاره نیز مورد آزمون قرار می‌گیرد. نتایج این آزمون بر حسب درصد قدرت کی لیت کنندگی بر اساس رابطهٔ زیر گزارش شد.

قدرت کی لیت کنندگی(٪)، = $(A_{control} - A_{sample}) \times 100 / A_{control}$

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

6-2- اثر ضد باکتریایی

6 گونه باکتری *اشریشیا کلی*[1](PTCC 1399)، *سالمونلا تیفی موریوم*[2] (PTCC 1596)، *شیگلا دیسانتری*[3] (PTCC 1188)، *استافیلوکوکوس اورئوس*[4] (PTCC 1436)، *یرسینیا انتروکولیتیکا*[5] و *انتروکوکوس فکالیس*[6] 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 مولرهینتون 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 مولرهینتون 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 در37 درجه سانتی‌گراد در گرمخانه گذاشته شدند. پس از این مدت با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد در

1. Gallic Acid Equivalent
2. Chelating

1. *Escherichia coli*
2. *Salmonella typhimurium*
3. *Shigella dysenteria*
4. *Staphylococcus aureus*
5. *Yercinia enthrocolitica*
6. *Entherococcus faecalis*

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.

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

با توجه به این‌که در این تحقیق، غنی‌سازی روغن سویا با عصاره‌های برگی صورت می‌گیرد، این آزمون‌ها از دو جنبه اهمیت دارند. اول از این جهت که به دلیل امکان حضور آنزیم‌های مختلف در عصاره برگی 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 برگی 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 تجارتی 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، نمونهٔ بازاری حاوی ضداکسنده تجارتی پروپیل گالات به غلظت 200 ppm تولید شده در همان کارخانه و نمونهٔ شاهد فاقد ضداکسنده نیز مورد بررسی قرار گرفتند. این نمونه‌ها در دمای 60 °C 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.

2-8- تجزیه و تحلیل آماری

این تحقیق به صورت آزمایش مقایسه میانگین‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی در 3 تکرار انجام شد و داده‌های به‌دست آمده توسط نرم افزار SAS آنالیز و میانگین‌ها در سطح 0/05 مقایسه و در نهایت نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel رسم شدند.

3- نتایج وبحث

3-1- قدرت ضداکسندگی

با توجه به نتایج به‌دست آمده (شکل 1) مشخص گردید که قدرت ضداکسندگی عصارهٔ برگ سبز درخت پرتقال بسیار بیش‌تر از عصارهٔ برگی 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 برگی سبز بین 3/57٪ الی 26/5٪ بوده و برای عصاره برگی سیاه این میزان بسیار کم‌تر از عصاره برگی 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 باتوجه به درصد پایین مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد، به‌طورکلی هر دو عصاره فعالیت ضداکسندگی کمی را از خود نشان دادند. این نتایج با یافته‌های کمال و همکاران که روی روغن اسانسی 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 درخصوص پوست پرتقال مشخص شده است که فلاونوئیدهای موجود در آن نقش موثری در ایجاد قدرت آنتی اکسیدانی 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 آنتی اکسیدان طبیعی عمل نموده و پس از آزمایش‌های تکمیلی به مواد غذایی اضافه شوند.

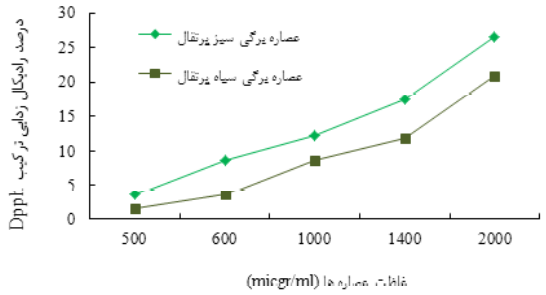
علت بالاتر بودن خاصیت رادیکال زدایی عصاره برگ سبز را می‌توان به حضور و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل ترکیبات فنولی و سالم بودن ترکیبات فنولی آن ارتباط داد [27]. در برگ‌های سیاه، واکنش‌های قهوه‌ای شدن آنزیمی باعث تبدیل گروه‌های هیدروکسیل ترکیبات فنولی، توسط آنزیم‌های پلی فنول اکسیداز، به گروه‌های کتنی می‌گردد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

3-2- قدرت کی لیت کنندگی یون آهن

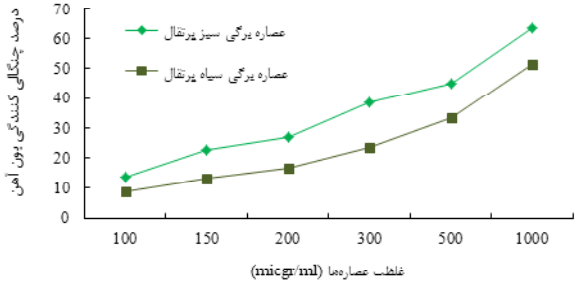
آنالیز نتایج به‌دست آمده (شکل2) از این آزمون نشان داد که اختلاف معنی‌داری ($p<0/01$) بین مقادیر قدرت کی لیت کنندگی یون آهن در تمامی غلظت‌های عصاره‌های برگی سبز و سیاه پرتقال وجود دارد. در غلظت‌های 500 تا 1000 میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره برگ‌های سبز و سیاه، محدوده نتایج برای عصاره برگ سبز 13/5٪ الی 63/75٪ بود و برای عصاره برگ سیاه این میزان کم‌تر از عصارهٔ برگی 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 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 [30-29] مشابه بود.

3-3- میزان کل ترکیبات فنولی

در این آزمون، عصاره برگ سبز با غلظت 200 µg/mL حاوی 54/12±0/32 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 µg/mL حاوی 46/38 ±0/41 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 [32-31]. میزان ترکیبات فنلی بخش پوست و گوشت چهار پایه پرتقال تامسون نیز توسط قره خانی و همکاران مورد



شکل (1) میزان رادیکال زدایی (٪) عصارهای برگی سبز یا سیاه پرتقال



شکل (2) درصد کی لیت کنندگی یون آهن توسط عصارهای برگی 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.

4-3- اثر ضدمیکروبی

اثر ضدمیکروبی عصاره‌های متانولی برگ‌های سبز و سیاه شده درخت پرتقال در جدول 1 نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌گردد در حالی‌که 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.

تحقیقات پیشین نشان داده است که به طور کلی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به عصاره‌های گیاهی حساس‌تر از باکتری‌های گرم منفی می‌باشند که با توجه به گرم مثبت بودن *استافیلوکوکوس اورئوس* و حساسیت آن به عصاره‌ها، این امر موید نتیجه به دست آمده در این تحقیق نیز می‌باشد. این پدیده ممکن است به علت تحمل ذاتی گرم منفی‌ها به ترکیبات گیاهی باشد [33].

مطالعات مختلف نشان داده است که دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی در مقابل بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها، ترکیبات شیمیایی ضدمیکروبی [33] و حتی بسیاری از داروهای گیاهی حساسیت زیادی دارند [34-35]. اما در مقابل، در باکتری‌های گرم منفی، وجود لایه لیپوپلی ساکاریدی دیواره و نیز فضای پری پلاسمیک مقاومت نسبی آن‌ها را افزایش داده است [36].

از نتایج به‌دست آمده در این تحقیق چنین برداشت می‌گردد که واکنش‌های قهوه‌ای شدن در برگ‌های پرتقال از یک طرف باعث کاهش اثر ضدمیکروبی آن گردیدند (غلظت 55 mg/mL عصاره روی *استافیلوکوکوس اورئوس* اثری نداشت) و از طرف دیگر باعث تقویت آن خاصیت گردیدند (روی باکتری *یرسینیا*

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)			
	13/75	27/5	55	110	13/75	27/5	55	110
اشرشیا کلی	-	-	-	-	-	-	-	-
انتروکوکوس فکالیس	-	-	-	-	-	-	-	-
استافیلوکوکوس اورئوس	-	-	9 [a]	10 [a]	-	-	-	9 [a]
سالمونلا تیفی موریم	-	-	-	-	-	-	-	-
شیگلا دیسانتری	-	-	-	-	-	-	-	-
یرسینیا انتروکولیتیکا	-	-	-	-	-	-	-	9 [a]

(-) محدوده ممانعت‌کنندگی کم‌تر از 1 mm: فاقد فعالیت ضدمیکروبی؛ محدوده ممانعت‌کنندگی بین 2-3 میلی‌متر: خاصیت ضدمیکروبی ضعیف؛ محدوده ممانعت‌کنندگی بین 4-6 میلی‌متر: خاصیت ضدمیکروبی متوسط؛ محدوده ممانعت کنندگی بین 6-9 میلی‌متر: خاصیت ضدمیکروبی بالا؛ محدوده ممانعت کنندگی بیش از 9 mm: خاصیت ضدمیکروبی قوی.

a داده‌ها با حرف مشابه (در غلظت‌های متفاوت) بیانگر معنی‌دار نبودن آن‌هاست (سطح اطمینان 95%).

انتروکولیتیکا اثر ممانعت کنندگی از خود به‌جا گذاشت). علت این رفتار می‌تواند به نوع واکنش‌های قهوه‌ای شدنی 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 ضدمیکروبی افزایش می‌یابد [37]. زیرا فعالیت کی لیت کنندگی محصولات حاصل از این واکنش‌ها افزایش می‌یابد که طی این پدیده، یون‌های فلزی و کمپلکس‌های فعال با آن‌ها پیوند برقرار می‌کنند. این محصولات فعالیت ضداکسندگی نداشته ولی دیگر ضداکسنده‌ها را در برابر تخریب حفظ می‌کنند [38].

3-5- خواص کیفی روغن سویای حاوی عصاره‌های برگی 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 ضداکسنده تجارتی حاوی مقادیر متفاوت عصاره برگی سبز پرتقال، محدوده اسیدیته بین 0/35٪ الی 0/58٪ و برای نمونه‌های روغن سویای بدون ضد اکسنده تجارتی حاوی عصاره برگی سیاه پرتقال 0/56٪ الی 0/95٪ بود. بر این اساس در بین دو گروه از نمونه‌های حاوی غلظت‌های مشابه عصاره برگی سبز و سیاه پرتقال، اختلاف معنی‌داری (سطح اطمینان 95٪) در میزان اسیدیته آن‌ها مشاهده گردید. بیش‌ترین میزان اسیدیته (0/95٪) مربوط به دو نمونه سویای فاقد ضداکسنده و روغن حاوی 500 ppm عصاره برگی سیاه (کم‌ترین غلظت عصاره برگی) بود که با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند. هم‌چنین مشخص گردید که نمونه روغن حاوی 1000 ppm عصاره برگی سبز می‌تواند کاهش قابل توجهی را در میزان اسیدیته نمونه‌های روغن ایجاد نماید به طوری که با نمونه روغن سویای دارای ضد اکسنده تجارتی (حاوی 200 ppm ضداکسنده پروپیل گالات است) اختلاف معنی‌داری نداشته باشد که مجموعه این نتایج بیانگر اثر مثبت عصاره‌ها در جلوگیری از افزایش اسیدیته می‌باشد. در بین دو گروه عصاره‌ها، از نظر میزان اسیدیته، کیفیت روغن‌های حاوی عصاره برگی سبز بهتر از نمونه‌های حاوی عصاره سیاه بود و با افزایش غلظت عصاره برگ سبز مقادیر اسیدیته نمونه‌ها کاهش معنی‌داری داشت.

علت این امر را می‌توان به فقدان یا میزان کم آنزیم‌های لیپولیتیک و یا فعالیت‌های ممانعت‌کنندگی تجزیه چربی‌ها در عصاره برگی پرتقال ارتباط داد. زیرا تحقیقات نشان داده که در برگ‌های گیاهان، آنزیم‌های تجزیه کننده 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 برگی سبز 157 تا 181 و هم‌چنین برای نمونه‌های حاوی 500-1000 ppm عصاره برگی سیاه 140 تا 146(گرم چربی/سانتی‌گرم ید جذب شده) بوده است. مقادیر عدد یدی مربوط به نمونه‌های روغن حاوی غلظت‌های مختلف عصاره برگی سیاه با هم اختلاف معنی‌داری (سطح اطمینان 95%) نداشتند. کم‌ترین این مقدار را در نمونه بدون ضداکسنده و بیش‌ترین آن در نمونه تجاری (روغن سویای حاوی 200 ppm ضداکسنده پروپیل گالات است) به‌دست آمد. در این آزمون عصاره‌های برگی سیاه توانایی کم‌تری در حفظ پیوندهای دوگانه تری گلیسریدها داشتند و عدد یدی نمونه روغن حاوی 1000 ppm عصاره برگی سبز به میزان 181، نزدیک‌ترین عدد به نمونه روغن بازار، که 198 (گرم چربی/سانتی‌گرم ید جذب شده) است، بود. در نمونه‌های حاوی عصاره برگی 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 تری گلیسریدها است.

3-5-3- اندیس پراکسید

با افزایش درجه غیر اشباعیت روغن‌ها، روغن و یا ماده

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

آزمون	روغن فاقد ضداکسنده	روغن حاوی 200 ppm پروپیل گالات	انواع روغن‌های فاقد ضداکسنده سنتزی حاوی عصاره برگی پرتقال	غلظت عصاره ها (ppm) 500	750	1000
(%) اسیدیته	$0/95^{a}$	$0/32^{e}$	حاوی عصاره برگی سیاه پرتقال	$0/95^{a}$	$0/7^{b}$	$0/56^{c}$
			حاوی عصاره برگی سبز پرتقال	$0/58^{c}$	$0/48^{d}$	$0/35^{e}$
اندیس یدی (گرم چربی/ (سانتی گرم ید جذب شده	105^{f}	198^{a}	حاوی عصاره برگی سیاه پرتقال	140^{e}	143^{e}	146^{e}
			حاوی عصاره برگی سبز پرتقال	157^{d}	167^{c}	181^{b}
اندیس پراکسید (میلی اکی (والان در کیلوگرم روغن	165^{a}	95^{e}	حاوی عصاره برگی سیاه پرتقال	128^{b}	120^{c}	102^{d}
			حاوی عصاره برگی سبز پرتقال	90^{f}	65^{g}	35^{h}

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

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 کتونی ایجاد می‌شوند که در ایجاد بو و طعم نامطبوع مواد چرب موثر هستند [41].

جدول2، داده‌های به‌دست آمده از این آزمون را نشان می‌دهد. مقادیر اندیس پراکسید در تمامی نمونه‌های روغن با یکدیگر اختلاف معنی‌داری (سطح اطمینان 95٪) داشتند. بالاترین میزان اندیس پراکسید در نمونه روغن بدون ضد اکسنده به میزان 165(میلی اکی والان در کیلوگرم روغن) و کم‌ترین آن در نمونه روغن حاوی 1000 ppm عصاره برگی سبز به میزان 35 (میلی اکی والان در کیلوگرم روغن) دیده شد که این نتیجه بیانگر اثر مثبت و معنی‌دار عصاره‌ها در جلوگیری از افزایش اسیدیته می‌باشد. محدوده اندیس پراکسید برای روغن‌های حاوی عصاره برگی سبز 35 تا90 و برای نمونه‌های حاوی عصاره برگی سیاه 102 تا 128(میلی اکی والان در کیلوگرم روغن) بود که این امر بیانگر اثر مطلوب عصارهٔ برگی سبز است. در بین این دو گروه، اختلاف معنی‌داری (سطح اطمینان 95%) بین مقادیر اندیس پراکسید در روغن‌های حاوی عصاره برگی سبز با نمونه‌های حاوی عصاره برگی سیاه وجود داشت. در هر دو دسته از نمونه‌ها با افزایش غلظت عصارهٔ برگی، این اندیس کاهش می‌یابد که نشان می دهد با افزایش غلظت عصارهٔ برگی مقدار ترکیبات آنتی اکسیدان در عصاره‌ها افزایش می‌یابد و نشان دهنده حضور بیش‌تر ترکیبات فنولی در آن‌ها است. میزان پراکسید در روغن حاوی 1000 ppm عصاره برگی سبز بسیار کم‌تر از روغن بازاری حاوی آنتی اکسیدان تجارتی بود.

نتایج به‌دست 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 ضداکسنده تجارتی BHT معادل بود.

مشابه عصاره برگی 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 معنی‌داری 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 12روز انجام گرفت،

نمونه حاوی 350 ppm ترکیبات فنولی هسته انار در مقایسه با نمونه‌های حاوی 200 ppm آنتی اکسیدان تجارتی BHA دارای مقادیر پراکسید (به‌ترتیب 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 به‌ترتیب برای تیمار حاوی 1000 ppm عصاره سبز برگی و روغن حاوی 200 ppm پروپیل گالات)، مشخص می‌شود که عصاره سبز برگی 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 رادیکال زدایی DPPH و کی لیت کنندگی، عصاره برگی پرتقال اثرات قابل توجهی را از خود نشان نداد و هم‌چنین در خصوص آزمون‌های ممانعت‌کنندگی روی شش میکروارگانیسم، عصاره برگی سیاه پرتقال تنها روی دو میکروارگانیسم و عصاره برگی سبز پرتقال روی یک میکروارگانیسم در غلظت‌های بالا تاثیر 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 ضدمیکروبی 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 برگی سبز و سیاه پرتقال نشان داد که نمونه روغن حاوی 1000 ppm عصاره سبز برگی بهترین اثر نگه‌دارندگی روی روغن سویا را دارد، زیرا آن نمونه در مقایسه با نمونه بازاری (حاوی 200 ppm آنتی اکسیدان تجارتی پروپیل گالات)، در آزمون‌های اندیس یدی و اسیدی با همدیگر مشابه بودند، ولی در آزمون اندیس پراکسید نمونه روغن حاوی 1000 ppm عصاره سبز برگی 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 به‌کار 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.

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 Ppharmaceutical 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 paradisii*. *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 Piloree* 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, l., 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., Dróżdż, 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., Cojocaru, 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., Rauha, 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 todifferent 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.

University, 2, 37-43.

[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 it's antioxidant property. *J. Northeast Agricultural University.*, 4, 030.

[26] GhareKhani, M., Ghorbani, M., GhareKhani, A, Sadeghi Mahunak, A., Jebraeeli, Sh., Ghasemi, E. (1390). Effect of orange Thamson peel and pulp extracts in prevention of soybean oil oxidation, *Faslname Giahan 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-