ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی، فیتوشیمیایی و ضد میکروبی اسانس نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) بر جمعیت ریزاندامگان عامل مسمومیت و عفونت غذایی

فریده طباطبایی یزدی[1*]، بهروز علیزاده بهبهانی[2]، علیرضا وسیعی[2]، سید علی مرتضوی[1]، فخری شهیدی[1]

۱- استاد و عضو هئیت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۹۵/۰۵/۰۸ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۷/۱۳)

چکیده

نعناع فلفلی با نام علمی *Mentha piperita* از خانواده *Lamiaceae* یکی از گیاهان دارویی پر مصرف می باشد که اسانس آن مصارف دارویی و غذایی دارد. هدف این پژوهش، ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی، فیتوشیمیایی و ضد میکروبی اسانس نعناع فلفلی در شرایط آزمایشگاهی بود. فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس نعناع فلفلی با استفاده از روش های 2،2 دی فنیل- ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) و بتا کاروتن/لینولئیک اسید و فعالیت ضد میکروبی توسط روش ارزیابی دیسک-دیفوژن و حداقل غلظت مهارکنندگی به روش میکرودایلوشن براث و رقت در آگار تعیین شد. حداقل غلظت کشندگی و ترکیبات فیتوشیمیایی اسانس نعناع فلفلی نیز تعیین گردید. نتایج حاصل از آزمون کربی-بوئر نشان داد که بیشترین قطر هاله عدم رشد اسانس نعناع فلفلی مربوط به *کاندیدا آلبیکنس* و کمترین قطر هاله عدم رشد مربوط به باکتری *سودوموناس ائروژینوزا* بود. نتایج حاصل از حداقل غلظت بازدارندگی اسانس نعناع فلفلی برای میکروارگانیسم های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *لیستریا اینوکوا*، *سالمونلا تیفی* و *کاندیدا آلبیکنس* به ترتیب ۹/۲، ۱۸/٤، ۷۳/٦ و ٤/٦ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس نعناع فلفلی به روش‌های DPPH و بتاکاروتن/لینولئیک اسید به ترتیب ۱۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و ٤۱/۳ بود. تست های فیتوشیمیایی وجود ترکیباتی همانند فلاونوئیدها، فلاون، ساپونین، تانن و آلکالوئید را در اسانس نعناع فلفلی را تایید نمود. براساس نتایج این مطالعه مشخص گردید که اسانس نعناع فلفلی دارای فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی در برابر سویه های بیماری زا می باشد در نتیجه می توان از اسانس آن در محصولات غذایی بهره برد.

کلید واژه گان: نعناع فلفلی، اسانس، فعالیت آنتی اکسیدانی، ترکیبات شیمیایی، فعالیت ضد میکروبی.

* مسئول مکاتبات: Tabatabai@um.ac.ir

۱- مقدمه

در حال حاضر امنیت و بهداشتی بودن مواد غذایی از لحاظ میکروبی و مسمومیت ناشی از طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها (باکتری‌ها و قارچ‌ها) مشکل اساسی و حائز اهمیت است که با وجود روش‌های مختلف نگهداری همچنان مورد توجه سازمان‌های استاندارد و نظارتی، تولید کنندگان، مصرف‌کنندگان و صنعت غذا می‌باشد [۱و ۲].

مصرف غذاهای آلوده در سراسر دنیا یک مشکل مهم و اساسی به شمار می‌رود که از کشورهای پیشرفته تا کشورهای جهان سوم را در بر می گیرد. طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO) حدود ۳۰ درصد مردم در کشورهای پیشرفته به وسیله ریزاندامگان عامل عفونت و مسمومیت مواد غذایی بیمار می-شوند. در سال ۲۰۰۰ حدود دو میلیون نفر در کل جهان در اثر بیماری اسهال جان باختند. بنابراین همچنان نیاز به روش‌های نوین برای حذف یا کاهش ریزاندامگان بیماری‌زا وجود دارد [۳].

از آنجا که نگهدارنده‌های شیمیایی و سنتزی دارای اثرات نامطلوب (سرطان‌زایی و سمیت) می‌باشند، بیشتر مصرف‌کنندگان مواد غذایی تمایل دارند که از نگهدارنده‌های طبیعی (مشتق شده از منابع گیاهی، حیوانی و میکروبی) برای افزایش زمان ماندگاری غذا استفاده گردد [٤]. لذا استفاده از اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهان طبیعی جایگزین بسیار مناسبی به جای نگهدارنده‌های شیمیایی هستند.

از آن جا که خواص عملکردی اسانس و عصاره‌های گیاهی (همانند اثر ضد باکتریایی و قارچی و فعالیت آنتی اکسیدانی) جهت کاربرد آن ها در صنایع غذایی و دارویی وابسته به ترکیبات زیستی فعال می‌باشد، مسئله مهم در رابطه با عصاره‌ها و اسانس ها استخراج آن‌ها از ماتریکس گیاه می باشد، که بتواند به خوبی این ترکیبات فعال طبیعی را از منابع گیاهی استخراج نماید [٥].

متابولیت های ثانویه گیاهان همانند فنول، فلاون و فلاونوئید از گیاهان دارای پتانسیل بسیار خوبی برای مهار و کنترل رادیکال-های آزاد می‌باشند. ترکیبات فنولی گروه بزرگی از مواد طبیعی گیاهی شامل فلاونوئیدها، تانن‌ها، آنتوسیانین‌ها، گلیکوزید و فلاون می باشند که معمولا در میوه ها، سبزیجات، گیاهان و سایر بخش‌های گیاهان یافت می شوند، از آنجا که این مواد دارای اثرات مطلوب زیستی و درمانی بسیاری می‌باشند در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه پژوهشگران در سراسر جهان قرار گرفته است [٦].

نعناع فلفلی با نام علمی *Mentha piperita* و نام رایج *Peppermint* گونه ای دو رگه (هیبرید) می باشد و از پیوند بین دو گونه *Mentha aquatica* و *Mentha spicata* به دست آمده است. خانواده نعناع متشکل از ۲۰۰ جنس و بیش از ٤۰۰۰ گونه گیاهی است که به طور پراکنده در نقاط مختلف جهان یافت می شود. تاکنون ۵۰ گونه متعلق به جنس نعناع شناسایی شده اند. بخش‌های مورد استفاده گیاه نعناع فلفلی شامل برگ و اسانس آن می‌باشد. نعناع فلفلی گیاهی است که از زمان‌های گذشته به عنوان یک گیاه معطر و اشتها آور به کار می-رود. از خواص دارویی نعناع فلفلی می‌توان به اثر ضد اسپاسم، پیش گیری کننده از استفراغ و ضد نفخ و خنک کنندگی آن اشاره کرد. از ۲۰۰۰ سال قبل تاکنون از گونه‌های مختلف نعناع به عنوان ادویه و دارو استفاده می‌شود. مقدار اسانس این گیاه بسته به شرایط کشت بین ۱-۳٪ متغیر است. حدود ۳۰-۷۰٪ اسانس نعناع فلفلی را ماده ای به نام منتول تشکیل می دهد و شامل بیش از ٤۰ نوع ترکیب دیگر (منتون، متیل استات، انواع ترپنوئیدها و ...) است [۹-۷].

هدف از این پژوهش سنجش ترکیبات فیتوشیمیایی، قدرت آنتی اکسیدانی نعناع فلفلی و بررسی فعالیت ضد باکتری و ضد قارچی اسانس آن بر تعدادی از ریزاندامگان عامل مسمومیت و عفونت غذایی در شرایط برون تنی بود.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- محیط کشت و سویه‌های میکروبی

محیط کشت مورد استفاده در این پژوهش شامل مولرهینتون آگار، مولر هینتون براث، سابروز دکستروز آگار، سابروز دکستروز براث (مرک آلمان) بود. در این پژوهش از ٤ سویه میکروبی *لیستریا اینوکوا* ATTC 33090، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* PTCC 1435، *سالمونلا تیفی* PTCC 1609 و *کاندیدا آلبیکنس*

PTCC 5027 جهت ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس نعناع فلفی در شرایط آزمایشگاهی استفاده گردید.

۲-۲- مواد و دستگاه‌های مورد استفاده

در این پژوهش از اتانول ۹٦ درصد، گلیسرول، باریم کلرید، اسید سولفوریک ساخت مرک آلمان، تری فنیل تترازولیوم کلراید (TTC) ساخت شرکت سیگما، دی متیل سولفاکساید (DMSO) ساخت شرکت مرک آلمان، قرص رینگر ساخت شرکت مرک آلمان، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (جنتامایسین، ونکومایسین و نیستاتین) ساخت شرکت پادتن ایران، DPPH مرک آلمان، میکروپلیت ۹٦ خانه‌ای دربدار استریل، فیلتر سرنگی با اندازه قطر ذرات ۰/۲۲ میکرومتر، آسیاب آزمایشگاهی مدل Warning ساخت آلمان، ترازوی دیجیتال EK 300i با دقت ۰/۰۱، بن ماری مدل Memmert، هیتر Shimifan، انکوباتور Flash shaker CIT 53، انکوباتور Avaran مناسب، اتوکلاو مدل Memmert، یخچال الکترو استیل جهت نگهداری کشت‌ها در شرایط، اسپکتروفتومتر Sigma مدل 3-30k، سمپلر متغیر (اپندروف) مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۳- تهیه گیاه نعناع فلفی و استخراج اسانس

بعد از تهیه گیاه نعناع فلفلی، استخراج اسانس به روش تقطیر با آب انجام شد. استخراج اسانس به مدت ٤ ساعت و با دستگاه کلونجر انجام شد، اسانس به دست آمده با استفاده از سولفات سدیم خشک و وزن آن‌ها اندازه گیری شد. از آنجا که اسانس نعناع فلفلی نسبت به نور، دما و اکسیژن حساس می‌باشد و در چنین شرایطی ترکیبات آن دچار تغییر می‌شود، لذا اسانس استخراج شده به یک شیشه تیره در بسته منتقل و تا انجام آزمایش‌ها در ظروف تیره استریل و در دمای یخچال نگهداری شد[۱۱و ۱۰].

۲-٤- تعیین ترکیبات فیتوشیمیایی

اسانس نعناع فلفلی در حلال مناسب قرار گرفت و سپس ترکیبات فیتوشیمیایی مطابق با روش‌های زیر تعیین گردید.

۲-٤-۱- تعیین آلکالوئید

به ۰/۲۵ گرم از نعناع فلفلی ۵ میلی لیتر اسید کلریدریک اضافه کرده و به مدت ۵ دقیقه روی شعله آزمایشگاهی جوشانده شد. سپس حجم آن به میزان اولیه رسانده شد و در انتها توسط کاغذ واتمن، صاف گردید. محلول صاف شده توسط آمونیاک و اتیل اتر استخراج شد. معرف بوشارد (Bouchard) اضافه و تشکیل رسوب قهوه ای رنگ نشان دهنده‌ی وجود آلکالوئید است [۱٤-۱۲].

۲-٤-۲- تعیین تانن

به ۰/۲۵ گرم از نعناع فلفلی سدیم کلراید ۱۰٪ افزوده شد. سپس یک قطره کلروفریک اضافه شد. ایجاد رنگ سبز متمایل به آبی نشان دهنده‌ی وجود تانن است [۱٤-۱۲].

۲-٤-۳- تعیین ساپونین

۰/۵ گرم نعناع فلفلی در لوله‌ی آزمایش ریخته و کمتر از یک دقیقه به شدت تکان داده شد. ثابت ماندن کف پس از گذشت ۳۰ دقیقه نشان دهنده ی حضور ساپونین است (۱۲، ۱۳ و ۱٤).

۲-٤-٤- تعیین فلاون

به اسانس نعنا فلفی ٤ میلی لیتر متانول ۵۰ درصد اضافه گردید. سپس دو قطره محلول غلیظ اسید کلریدریک اضافه شده، رنگ نارنجی نشان دهنده حضور فلاون بود [۱٤-۱۲].

۲-٤-۵- تعیین فلاونوئید

به اسانس نعنا فلفی ٤ میلی لیتر متانول ۵۰ درصد اضافه گردید. سپس دو قطره محلول غلیظ اسید کلریدریک اضافه شده، رنگ قرمز مربوط به فلاونوئیدها می باشد [۱۲-۱٤].

۲-۵- آزمایش بتا کاروتن - لینولئیک اسید

در این روش فعالیت آنتی اکسیدانی، با میزان مهار اکسیداسیون لینولئیک اسید و جلوگیری از ایجاد ترکیبات فرار و هیدروپراکسیدهای کونژوگه، مورد سنجش قرار می گیرد. برای انجام آزمایش مطابق با روش داپکیویکوس (۱۹۹۸) عمل گردید [۱۵].

۲-٦- روش ارزیابی میزان مهارادیکال آزاد

برای انجام این آزمایش مطابق با روش نیک آور (۲۰۰٦)، عمل گردید. نتایج به صورت IC_{50} (مقداری از آنتی اکسیدان که لازم است تا غلظت DPPH به ۵۰ درصد مقدار اولیه برسد) بیان گردید [۱٦].

۲-۷- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس نعناع فلفلی

در این پژوهش از روش های متفاوت و متنوع کمی و کیفی برای ارزیابی و حساسیت اسانس نعناع فلفی بر سویه‌های مورد مطالعه استفاده گردید. در زیر این روش‌ها به صورت خلاصه آورده شده است.

۲-۷-۱- روش کربی- بائر

روش کربی-بائر، روش مصوب سازمان غذا و دارو آمریکا است که به عنوان یک روش استاندارد در کمیته ملی برای استاندارهای آزمایشگاهی بالینی[1] (NCCLS) به ثبت رسیده است. این روش عموماً برای یک بررسی مقدماتی جهت اندازه گیری فعالیت ضد میکروبی قبل از انجام مطالعات دقیق تر صورت می‌گیرد. از روش کربی- بائر (۱۹٦٦)، جهت تعیین حساسیت اسانس نعناع فلفلی استفاده گردید. برای بررسی اثر ضد میکروبی، دیسک‌های کاغذی بلانک (ساخت پادتن طب) با فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت روی آگار قرار داده شدند. ۲۰ میکرولیتر از اسانس نعناع فلفلی به دیسک‌ها اضافه شدند. همچنین از دیسک‌های آنتی-بیوتیک‌های جنتامایسین، ونکومایسین و نیستاتین به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. محیط کشت حاوی باکتری و قارچ به ترتیب در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۲۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲٤ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند. قطر هاله‌های تشکیل شده در اطراف دیسک‌ها اندازه گیری شد، تمامی آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام پذیرفت [۱۷].

۲-۷-۲- تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی به روش رقت در آگار

این آزمون طبق روش ویگاند و همکاران (۲۰۰۸) انجام شد. در این روش اسانس نعناع فلفلی در غلظت های مختلف (۲/۳، ٤/٦، ۹/۲، ۱۸/٤، ۳٦/۸، ۷۳/٦ و ۱٤۷/۲) با تعداد مشخص از سلول باکتری و قارچ طبق استاندارد مک فارلند، به صورت مستقیم و بدون واسطه (دیسک کاغذی) در پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار یا سابروز دکستروز آگار، تلقیح شد. پلیت‌های تلقیح شده فاقد اسانس نعناع فلفلی به عنوان کنترل منفی و پلیت-های حاوی اسانس نعناع فلفلی و بدون تلقیح به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند. سپس محیط کشت حاوی باکتری و قارچ به ترتیب در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۲۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲٤ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند [۱۸]. رقت مربوط به اولین پلیت که در آن رشدی مشاهده نشد، به عنوان MIC[2] گزارش شد. نتایج این روش به عنوان قابل اعتماد ترین نتایج در تعیین MIC در نظرگرفته می‌شود.

۲-۷-۳- تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی به روش میکرودایلوشن براث

در این روش اسانس نعناع فلفلی در غلظت های مختلف (۲/۳، ٤/٦، ۹/۲، ۱۸/٤، ۳٦/۸، ۷۳/٦ و ۱٤۷/۲) تهیه شد و با تعداد مشخص از سویه‌های مورد مطالعه طبق استاندارد مک فارلند حداقل غلظت مهار کنندگی به روش میکرودایلوشن براث و در میکروپلیت ۹٦ خانه‌ای انجام شد. میکروپلیت‌ها از نظر کدورت مورد بررسی قرار گرفت و اولین خانه‌ای که در آن کدورت مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی در نظر گرفته شد [۱۹].

۲-۷-٤- تعیین حداقل غلظت کشندگی

برای تعیین حداقل غلظت کشندگی میکروپلیت‌های فاقد کدورت جداگانه بر محیط کشت مولر هینتون آگار و سابروز دکستروز آگار کشت داده شد. اولین محیط کشتی که فاقد کلنی بود به عنوان حداقل غلظت کشندگی تعیین شد [۱۹].

۲-۸- آنالیز آماری

تمامی آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام شد. داده‌ها حاصل به روش تجزیه واریانس یک طرفه و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ تجزیه و تحلیل شد. برای مقایسه میانگین‌ها از روش آزمون چند دامنه ای دانکن و در سطح ۵ درصد استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

محاسبه راندمان اسانس نعناع فلفلی نشان داد که بعد از طی ٤ ساعت از ۱۰۰ گرم نعناع فلفلی مقدار ۱/۱ میلی لیتر اسانس به

1. National Committee for Clinical Laboratory Science

2. Minimum Inhibitory Concentration

دست آمد که در نتیجه راندمان حجمی- وزنی اسانس نعناع فلفلی برابر با ۱/۱ درصد بود. اسانس نعناع فلفلی بوی تند و دارای رنگ متمایل به زرد داشت. طبق مطالعه ای که توسط الوندی و همکاران (۲۰۱۰)، روی نعناع فلفلی پرورش یافته در کرج انجام گرفت، مشخص گردید که راندمان استخراج اسانس ۱/۲ می‌باشد، هر چند در سایر مطالعات با توجه به شرایط متفاوت کشت، آب و هوایی، خاک و روش استخراج این میزان بازدهی اسانس متفاوت می‌باشد [۹].

نتایج مربوط به شناسایی ترکیبات فیتوشیمیایی اسانس نعناع فلفلی در جدول ۱، آورده شده است. نتایج نشان داد که اسانس نعناع فلفلی دارای ترکیبات آلکالوئید، تانن، ساپونین، فلاون و فلاوونوئید می‌باشد و تست‌های انجام شده تاییدی برای حضور این ترکیبات بود. نتایج این مطالعه تفاوت اندکی با یافته‌های مطالعه‌ی زیدی و همکاران (۲۰۱۵)، داشت. این پژوهشگران وجود ترکیبات آلکالوئید، ساپونین فلاون و فلاوونوئیدی را در اسانس نعناع فلفلی کشت شده در کشور الجزایر مورد تایید قرار دادند، اما بیان نمودند که اسانس نعناع فلفلی فاقد تانن می‌باشد [۱۲]. سینگ و همکاران (۲۰۱۵)، عصاره‌های مختلف نعناع فلفلی را مورد بررسی قرار دادند این پژوهشگران گزارش کردند که در عصاره‌های آبی و اتانولی نعناع فلفلی تانن یافت شد.

نتایج مربوط به فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس نعناع فلفلی به دو روش بتا کاروتن - لینولئیک اسید و روش ارزیابی میزان مهار رادیکال آزاد بر حسب IC_{50} در جدول ۲، آورده شده است. نتایج نشان داد که اسانس نعناع فلفلی دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی مناسبی می‌باشد. در روش مهار رادیکال آزاد فعالیت آنتی اکسیدانی ۱۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد و در روش بتا کاروتن - لینولئیک اسید ۴۱/۳ تعیین گردید.

پژوهش‌های مختلفی جهت تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی در کشورهای مختلف انجام شده است که مقایسه نتایج این پژوهش‌های انجام گرفته متفاوت بودن نتایج فعالیت آنتی اکسیدانی را نشان می‌دهد. باتوجه به شرایط محیطی همانند دما، زمان کشت، نوع ترکیبات کود و همچنین با توجه به روش-های متفاوت انجام گرفته برای تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی اختلاف نتایج توجیه پذیر است. نکته‌ای که حائز اهمیت است در تمامی این پژوهش‌ها فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس نعناع فلفلی مورد تایید قرار گرفته است. نیک آور و همکاران (۲۰۰۸)، فعالیت آنتی اکسیدانی ۵ گونه مختلف نعناع را به روش های $ABTS^{+}$ و DPPH را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران فعالیت آنتی اکسیدانی گونه‌های مختلف نعناع را مورد تایید قرار داد. نتایج پژوهش ذکر شده با یافته‌های این مطالعه همخوانی داشت [۱۶]. کامکار و همکاران (۲۰۰۹)، ظرفیت آنتی اکسیدانی اسانس و عصاره نعناع ایرانی را مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره اتانولی با استفاده از تکنیک‌های ۲ و ۲ دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل بر مبنای درصد مهار تولید رادیکال آزاد و سیستم بتاکاروتن-لینولئک اسید، با روش اسپکتروفتومتری تعیین شد. نتایج این پژوهشگران نشان داد که فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس نعنا دارای ۴۰ درصد اثر مهاری می‌باشد [۲۰]. یادگاری نیا و همکاران (۲۰۰۶)، فعالیت آنتی اکسیدانی نعناع فلفلی را به روش بتاکاروتن-لینولئیک اسید مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که اسانس نعناع فلفلی دارای قدرت مهاری ۵۰/۱۷ درصد می باشد [۲۱]، مقایسه این پژوهشگران با یافته های مطالعه اخیر نشان می‌دهد که قدرت مهاری اسانس نعناع فلفلی پژوهش حاضر کمتر بود.

Table 1 Phytochemical constituents of the *Peppermint*

Plant constituents	Verification method	Observations	Occurrences
Alkaloids	Mayer and Bosshardt	Formation of a yellow or brown sediment	+
Tannins	Ferric chloride test	Green bluish	+
Saponins	Froth test	Formation of a stable foam	+
Flavonoids	Shinoda test	Red solution	++
Flavone	Shinoda test	Orange solution	+

+ = Present in small concentrations
++ = Present in moderately high concentrations

Table 2 Antioxidant activities of the essential oil of *Mentha piperita* and standard antioxidants using DPPH radical-scavenging activity (IC50, µg/ml) and ß-Carotene-linoleic acid assay (%)

Sample	DPPH	ß-CL
Mentha piperita essential oil	1300	41.3
Butylated hydroxyl toluene (BHT)	19.20	94.65

نتایج مربوط به قطر هاله بازدارندگی اسانس نعناع فلفلی در جدول ۳، آورده شده است.

Table 3 Average of inhibition zone (mm) of *Mentha piperita* on some pathogenic bacteria and fungi through disk diffusion method (DDM)

No	Microorganism	Average of inhibition zone (mm)
1	*Staphylococcus epidermidis*	12.20 ±0.50
2	*Listeria innocua*	11.00 ±0.28
3	*Salmonella typhi*	8.80 ±0.52
4	*Candida albicans*	13.50 ±0.50

در روش انتشار در آگار به کمک دیسک (کربی-بوئر) نتایج نشان داد که بیشترین قطر هاله عدم رشد اسانس نعناع فلفلی مربوط به مخمر *کاندیدا آلبیکنس* با قطر ۱۳/۵ میلی‌متر بود، همچنین بیشترین مقاومت نسبت به اسانس نعناع فلفلی مربوط به باکتری *سالمونلا تیفی* بود. به طور کلی نتایج نشان داد که اسانس نعناع فلفلی بر باکترهای گرم مثبت، گرم منفی و مخمر موثر است اما میزان اثر بخشی آن بسته به نوع میکروارگانیسم متفاوت است (جدول ۳). براساس روش دیسک دیفوژن مخمر *کاندیدا آلبیکنس* در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی حساس‌تر بود (جدول ۳). نتایج آنالیز آماری نشان داد که قطر هاله عدم رشد مخمر *کاندیدا آلبیکنس* در مقایسه با سایر سویه‌ها به جز سویه گرم مثبت *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* دارای اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد می‌باشد، همچنین اختلاف معنی‌داری (۵ درصد) بین قطر هاله‌های باکتری‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* با *سالمونلا تیفی* و باکتری *لیستریا اینوکوا* با *سالمونلا تیفی* مشاهده شد.

درباره مکانیسم تاثیر اسانس و عصاره‌ها بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی تئوری‌های متعددی ذکر شده است. در این میان دلیل حساست بیشتر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی اختلاف در دیواره سلولی می‌باشد که مورد تایید اکثر پژوهشگران نیز می‌باشد [۲۲و ۱۹]. طبق بررسی‌های انجام شده درباره نحوه تاثیر اسانس‌ها بر مخمرها و کپک ها و چرایی این که اسانس‌ها بر مخمرها دارای بازدارندگی بیشتری می‌باشند پژوهش‌های فروانی انجام پذیرفته است، اما هنوز مکانیسم آن به طور دقیق مشخص نگردیده است. کاوانگ (۲۰۰۷)، مکانیسم اثر ضد قارچی را مورد بررسی قرار داد. مخمرها میکروارگانیسم‌های هوازی هستند که در سطح محیط کشت رشد می کنند، از طرف دیگر مکانیسم جذب اسانس‌ها به دو صورت جذب مستقیم و به صورت بخار توسط میکروارگانیسم و یا به شکل غیر مستقیم از طریق محیط کشت اسانس را جذب می نماید، لذا همانگونه که قبلا ذکر شد مخمرها عمدتا در سطح محیط کشت رشد می‌کنند، بنابراین به اثر مستقیم بخار حاصل از اسانس حساس‌تر می‌باشند، در حالی که اثر ضدمیکروبی بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی وابسته به تجمع بخار اسانس درون محیط کشت می‌باشد که عوامل دیگری همچون نوع محیط کشت، pH، غلظت، قطر و ... بر آن نیز موثر می‌باشد [۲۳].

ایزدی و همکاران (۲۰۱۰)، اثر ضد میکروبی اسانس‌های نعناع فلفلی و مریم نخودی را بر *اشرشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *سالمونلا اینتریتدیس* را مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران بیان داشتند که اثر ضد میکروبی اسانس نعناع فلفلی از مریم نخودی بیشتر بوده و اثر ضد باکتریایی اسانس نعناع فلفلی بر باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشترین می‌باشد، همچنین بیشترین مقاومت نسبت به اسانس را باکتری گرم منفی *سالمونلا*

اینتریتدیس از خود نشان داد [٢٤]. نتایج این پژوهشگران با یافته‌های این مطالعه همخوانی داشت. عطایی کچویی (٢٠١٦)، اثر ضد میکروبی اسانس گیاهان نعناع فلفلی، پونه کوهی و زیره سیاه را بر برخی باکتری‌های جدا شده از مواد غذایی همانند *اشرشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی موریوم* مورد ارزیابی قرار دادند، لازم به ذکر می‌باشد منبع جداسازی باکتری‌ها از شیر و گوشت بود. این پژوهشگران بیان کردند که سویه‌های باکتریایی جدا شده از گوشت مقاومت بیشتری نسبت به تمام اسانس‌های تست شده داشتند اما الگوی اثر بخشی اسانس‌ها بر سویه‌های جدا شده از هر دو منبع یکسان بود [١١].

نتایج مربوط به حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس نعناع فلفلی در جدول ٤، آورده شده است.

Table 4 MIC, MBC and MFC of *Mentha piperita* some pathogenic bacteria and fungi

Microorganism	MIC (Micro dilution broth (mg/ml))	MIC (Agar dilution (mg/ml))	MBC / MFC (mg/ml)
S. epidermidis	9.2	≥9.2	9.2
L. innocua	18.4	≥18.4	36.8
S. typhi	73.6	≥73.6	147.2
C. albicans	4.6	≥4.6	9.2

نتایج حاصل از حداقل غلظت بازدارندگی اسانس نعناع فلفلی برای میکروارگانیسم‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *لیستریا اینوکوا*، *سالمونلا تیفی* و *کاندیدا آلبیکنس* به ترتیب ٩/٢، ١٨/٤، ٧٣/٦ و ٤/٦ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر بود و حداقل غلظت کشندگی اسانس نعناع فلفلی برای میکروارگانیسم‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *لیستریا اینوکوا*، *سالمونلا تیفی* و *کاندیدا آلبیکنس* به ترتیب ٩/٢، ٣٦/٨، ١٤٧/٢ و ٩/٢ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر بود. الوندی و همکاران (٢٠١٠)، ترکیب شیمیایی و اثر ضد میکروبی اسانس گیاه نعناع فلفلی را مورد بررسی قرار دادند. این محققان اثر ضد میکروبی اسانس نعناع فلفلی را به روش رقیق سازی در محیط آگار و بر باکترهای *اشرشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی* مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس ترین باکتری در برابر اسانس نعناع فلفلی می باشد و باکتری *اشرشیا کلی* نیز مقاوم ترین باکتری بود [٩]. نتایج این پژوهشگران با نتایج پژوهش حاضر همخوانی داشت. ایسکان و همکاران (٢٠٠٢)، بیان کردند که اسانس نعناع فلفلی بر باکتری‌های گرم مثبت دارای فعالیت کشندگی بیشتری می‌باشد و باکتری‌های گرم منفی در برابر اسانس نعناع فلفلی مقاوم‌تر هستند [٢٥]، نتیجه این پژوهشگران با یافته‌های این مطالعه همخوانی داشت. امیری و همکارن (٢٠١٦)، اثر ضد باکتریایی عصاره هیدروالکلی آنغوزه، زنیان و نعناع فلفلی بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس و مقاوم به متی سیلین، *اشرشیاکلی* و *سالمونلا تیفی موریوم* را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که عصاره هیدروالکلی نعناع فلفلی نسبت به عصاره‌های هیدروالکلی آنغوزه و زنیان دارای بیشترین اثر مهارکنندگی بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس و مقاوم به متی سیلین، *اشرشیاکلی* و *سالمونلا تیفی موریوم* بود [٢٦]. صالحی و همکاران (٢٠٠٧)، اثر ضد میکروبی قسمت‌های هوایی گیاه *Nepeta ispahanica* (نوعی گیاه بومی ایران و متعلق به خانواده نعناییان)، را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که رشد باکتری‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* و *باسیلوس سوبتیلیس*) نسبت به باکتری‌های گرم منفی (*اشرشیا کلی*، *کلبسیلا پنومونیه* و *سودوموناس ائروژینوزا*) در غلظت‌های کم‌تری از اسانس گیاهی متوقف شد و اسانس گیاه بیشترین اثر را بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (٢٤/٣ میلی‌متر) داشت، درحالی که قادر به مهار رشد *سودوموناس ائروژینوزا* نبود.

٤- نتیجه گیری کلی

با توجه به نتایج این پژوهش و اینکه اسانس گیاه نعناع فلفلی دارای اثر مهارکنندگی و کشندگی بر میکروارگانیسم‌های عامل عفونت و مسمومیت غذایی می‌باشد، لذا استفاده از این اسانس در مواد غذایی به عنوان یک ترکیب ضد میکروب طبیعی به جای

مواد نگهدارنده سنتزی یک امر مفید و مؤثر به نظر می‌رسد. همچنین برای استفاده عملی از اثر آنتی اکسیدانی اسانس نعناع فلفلی پژوهش‌های جامع تر و گسترده‌تری از جمله تهیه عصاره و اسانس از قسمت‌های مختلف گیاه و همچنین ارزیابی قدرت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره آن در مدل‌های غذایی باید انجام گردد.

۵- تقدیر و تشکر

مقاله علمی-پژوهشی حاضر مستخرج از طرح پژوهشی با کد مصوب ۲/٤۰۱۰٤ در دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد. نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به دلیل مساعدت‌های مالی لازم جهت اجرای این طرح پژوهشی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

٦- منابع

[1] Lattanzio, V., Kroon, P. A., Linsalata, V., and Cardinali, A. 2009. Globe artichoke: a functional food and source of nutraceutical ingredients. Journal of Functional Foods, 1(2): 131-144.

[2] Negi, P. S. 2012. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. International Journal of Food Microbiology, 156(1): 7-17.

[3] Lacuna, M. L., Carmona, M. L., Amparado, B. B., Daclan, M. A., and Ranido, L. A. 2013. Antimicrobial activity of supercritical fluid extracts of two Philippine medicinal plants, Psidium guajava and Euphorbia hirta: Implications to community health. Advances in Agriculture and Botanics, 5(1): 1-13.

[4] Roller, S. 1995. The quest for natural antimicrobials as novel means of food preservation: status report on European research project. Int Biodeter Biodegr. 36:333-45.

[5] Oliveira, D. A., Salvador, A. A., Smania Jr, A., Smania, E. F. A., Maraschin, M., and Ferreira, S. R. S. 2013. Antimicrobial activity and composition profile of grape (Vitis vinifera) pomace extracts obtained by supercritical fluids. Journal of Biotechnology, 164: 423– 432.

[6] Raghavendra, H., Vijayananda, B., Madhumathi, G. and Hiremath, A. 2010. In vitro antioxidant activity Of (Vitex negundo L.) Leaf extracts. Chiang Mai Journal of Science, 37 (3): 489- 497.

[7] Mikaili, P., Mojaverrostami, S., Moloudizargari, M., and Aghajanshakeri, S. 2013. Pharmacological and therapeutic effects of Mentha Longifolia L. and its main constituent, menthol. Anc Sci Life. 33: 131-128.

[8] Mimica-Dukić, N., Bozin, B., Soković, M., Mihajlović, B., and Matavulj, M. 2003. Antimicrobial and antioxidant activities of three Mentha species essential oils. Planta Med. 69: 413-419.

[9] Kazem Alvandi, R., Sharifan. A., Aghazadeh, Meshghi. M. 2010. Study of chemical composition and antimicrobial activity of peppermint essential oil. Journal of comparative pathobiology. 7(4):355-364.

[10] Bernath, J. 2000. Medicinal and aromatic plants. Flav Frag Journal. 4: 85-89.

[11] Ataie Kachouei, M. 2016. Study the antimicrobial effects of the essential oils of Origanum vulgare, Mentha piperita and Carum carvi on the bacteria isolates from food stuffs. 3(1):1-10.

[12] Zaidi, S. and Dahiya, P. 2015. In vitro antimicrobial activity, phytochemical analysis and total phenolic content of essential oil from Mentha spicata and Mentha piperita. International Food Research Journal. 22(6): 2440-2445.

[13] Edeoga H, Okwu D, Mbaebie B. 2005. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. African journal of biotechnology. 4(7):685-8.

[14] Chhabra SC, Uiso FC, Mshiu EN.1984. Phytochemical screening of Tanzanian medicinal plants. Part1. Ethnopharmacol.11: 157-179.

[15] Dapkevicius A, Venskutonis R, Van Beek T. A, Linssen P. H. 1998Antioxidant activity of extractsobtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. Journal ofthe Science of Food and Agriculture. 77: 146–140.

[16] Nickavar B, Kamalinejad M, Haj-Yahya M and Shafaghi B. 2006. Comparison of the free radical scavenging activity of six Iranian Achillea species. Pharm. Biol. 44: 208-212.

[17] Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C . &Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method . Am J Clin Pathol. 6: 493-495.

[18] Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nature protocols. 2008;3(2):163-75.

[19] Yeganegi M, Comparison methods for the extraction of Equisetum telmateia Ehrh. extract using supercritical fluid extraction and Maceration, evaluation of its Antimicrobial activity against food infective and intoxication microorganisms. MSc Thesis. 2016. Ferdowsi University of Mashhad.

[20] Kamkar A, JebeliJavan A, Jamshidi R. Antioxidant capacity of essential oil and extract of Iranian Mentha spicat. 3. 2009; 1 (1) :69-77.

[21] Yadegarinia, D., Gachkar, L., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A., Rasooli, I. 2006. Biochemical activities of Iranian Mentha Piperita L. and Myrtus Communis L. essential oils. Phytochemistry. 67, 1249-1255.

[22] Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Shahidi F, Mohebbi M, Hossein Zanganeh. Investigation of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the Aqueous and Ethanolic Avicennia Marina Extracts on Gram Positive and Gram Negative Bacteria “in vitro”. Sadra Med Sci J, 2014; 2(2): 123-134.

[23] Cavanagh, H.M.A. 2007. Antifungal activity of thevolatile phase of essential oils: a brief review. Natural Product Communications.: 1-13.

[24] Izadi Z, Ahmadvand G, Esna-Ashari M, Piri K, Davoodi P. 2010. Biochemical and Antimicrobial Activities of Salvia Officinalis L. and Mentha Piperita L. Essential oils. Armaghane danesh. 15 (1) :19-29.

[25] Iscan, G., Kirimer, N., Kurkcouglu, M., Husnu Canbaser, K., and Demirci, F. 2002. Antimicrobial screening of Mentha piperita essential oils. J Agric Food Chem. 50: 3943-3946.

[26] Amiri A, Jomehpour N. 2016. Evaluation the Effect of Anti bacterial of Ferula assa-foetida L, Carum copticum, Mentha piperita L Hydroalcoholic Extract on Standard Sensitive and Methicillin- Resistant Staphylococcus aureus, Escherichia coli O157H7 and Salmonella typhimurium. journal of ilam university of medical sciences. 24 (2) :72-79.

[27] Salehi, Peyman., Sonboli, Ali., and Allahyari, Leila. 2007. Antibacterial and antioxidant properties of the essential oil and various extracts of Nepeta ispahanica from Iran. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 10(4): 324-331.

Evaluation antioxidant activity, phytochemical constituents and antimicrobial of *Mentha Piperita* essential oil on some infectious and poisonous microorganisms

Tabatabaei Yazdi, F. [1*] , Alizadeh Behbahani, B. [2], Vasiee, A. R. [2], Mortazavi, S. A. [1], Shahidi, F. [1]

1. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
2. Ph.D student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

(Received: 2016/07/29 Accepted:2016/10/04)

Mentha Piperita belonging to the family of *Lamiaceae*, is a usable medicinal herb that has therapeutic effects that essential oil has various applications in pharmaceutical industries and food. The aim of this study was to investigate the antioxidant properties, phytochemical constituents and antimicrobial effects of *Mentha Piperita* "*in vitro*". Antioxidant activity was evaluated through 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay and ß-carotene/linoleic acid assay. The essential oil was individually tested by disc diffusion assay and evaluating minimum inhibitory concentration (MIC) by method micro dilution broth and *agar dilution.* The minimum bactericidal/fungicidal concentration (MBC/MFC) and phytochemical constituents were tested. The results of the Kirby-Baur test showed that the maximum diameter of inhibition zone of *Mentha piperita* to the *Candida albicans and t*he minimum zone diameter was associated with *Salmonella typhi*. The MIC of *Mentha piperita* for *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria innocua*, *Salmonella typhi* and *Candida albicans* were 9.2, 18.4, 73.6 and 4.6 mg/ml, respectively. The IC_{50} and B-CL of *Mentha piperita* essential oil were equal to 1300 µg/ml and 41.3% respectively. Preliminary phytochemical analysis demonstrated the presence of most of the phytochemicals including flavonoids, saponins, flavone, saponins, tannins and alkaloids in the essential oil tested. Based on the present study, the essential oil from *Mentha piperita* antioxidant activity and antimicrobial activity against several clinical isolates tested and thus can be a good source of food industrial.

Keywords: *Mentha Piperita*, Essential oil, Antioxidant activity, Phytochemical constituents, Antimicrobial effect.

* Corresponding Author E-Mail Address: Tabatabai@um.ac.ir