

بررسی خاصیت ضد میکروبی عصاره متانولی، اسانس و نانولیپوزوم حاوی اسانس نعناع فلفلی

ساسان قره‌نقده^{۱*}، سمیرا فرقانی^۲، سامان قره‌نقده^۳، محمود صوتی خیابانی^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهرود

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۳- دانشجوی دکتری، فیتوشیمی، دانشگاه شهید بهشتی

۴- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

(تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۳/۱۷)

چکیده

نگهدارنده‌های طبیعی استخراج شده از گیاهان دارویی، جزء مهمترین ترکیبات زیست فعال هستند که می‌توانند در تولید مواد غذایی مورد استفاده قرار بگیرند. استفاده از این اسانس‌ها به صورت آزاد برای نگهداری مواد غذایی عموماً با محدودیت‌هایی همراه است. یکی از روش‌های کاهش این محدودیت‌ها، درون‌پوشانی کردن اسانس‌ها در حامل‌های لیپیدی از جمله نانولیپوزوم‌ها است. از این رو هدف این پژوهش بررسی خاصیت ضد میکروبی عصاره متانولی، اسانس و نانولیپوزوم حاوی اسانس نعناع فلفلی می‌باشد. اسانس‌گیری از گونه نعناع فلفلی به روش تقطیر با بخار آب انجام شد و ترکیب‌های موجود در آن با استفاده از GC و GC-MS شناسایی شدند. عصاره متانولی نیز به روش خیساندن تهیه شد. نانولیپوزوم حاوی اسانس نعناع به روش هیدراسیون لایه نازک و سونیکاسیون تولید شدند. اندازه ذره‌ای نانولیپوزوم با استفاده از پراکندگی نور پویا و پتانسیل زتا با استفاده از زتا سایزر مورد بررسی گرفت. خواص ضد میکروبی نیز با روش میکروداپلوشن اندازه‌گیری شد. مهمترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس عبارت بودند از: متول (۴۰/۴۶٪)، متون (۱۶/۳۳٪)، متوفوران (۱۳/۳۷٪) و متیل استات (۷/۱۱٪). اندازه ذرات و پتانسیل زتا به ترتیب ۹۸/۵۳ نانومتر و ۱۴- میلی‌ولت بود و نانولیپوزوم حاصل به مدت ۴۰ روز پایدار بود. میزان حداقل غلظت بازدارندگی اسانس در هر دو حالت آزاد و درون‌پوشانی بر روی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از گرم منفی و نمونه قارچی بود در حالی که عصاره بر روی باکتری‌های گرم منفی و قارچ غیرفعال بود و خاصیت ضعیفی بر روی باکتری‌های گرم مثبت داشت. همچنین اسانس در حالت درون‌پوشانی خاصیت ضد میکروبی بیشتری نسبت به حالت آزاد داشت.

کلید واژگان: نعناع فلفلی، نانولیپوزوم، ضد میکروبی، GC-MS

* مسئول مکاتبات: sasan.gharenaghadeh90@gmail.com

۱- مقدمه

در گیاهان ترکیبات شیمیایی زیادی مانند متابولیت‌های ثانویه وجود دارد که دارای خواص زیست فعالی و بیوشیمیایی بسیاری هستند که این ترکیبات ثانویه در صنایع مختلف دارویی، شیمیایی، آرایشی و بخصوص صنعت غذا کاربرد دارند [۱]. وجود ترکیبات ضد میکروبی در عصاره و اسانس گیاهان دارویی، در سال‌های اخیر توجه ویژه‌ای را در تحقیقات به خود جلب کرده است. از سوی دیگر نگهداری غذا به صورت سالم و با کیفیت بالا در طول مراحل تولید، انبارداری و مصرف از جمله دغدغه‌های اصلی متخصصان صنایع غذایی و تغذیه می‌باشد. بنابراین می‌توان با پیوند دادن گیاهان دارویی و خواص سلامتی بخش آن‌ها با صنعت غذا نه تنها سلامت مصرف کننده را تضمین کرد؛ بلکه با وجود ترکیبات معطر در ترکیبات ثانویه گیاه، باعث بهبود عطر و طعم غذا و رضایتمندی مصرف کننده شد. وجود فلور میکروبی طبیعی در مواد غذایی مختلف و همچنین آلودگی‌های ثانویه در طی مراحل تولید می‌تواند سبب مسمومیت‌های غذایی شده، از این حیث کنترل بار میکروبی مواد غذایی طی مراحل تولید تا مصرف بسیار حائز اهمیت است. نتایج تحقیقات مختلف نشان داده است که ترکیبات فنولی و ترپنیدی استخراج شده از گیاهان دارویی سبب از بین رفتن میکروارگانیسم‌ها می‌شود [۲]. گیاه نعناع فلفلی با نام علمی *Mentha piperita* از تیره *Lamiaceae* از جمله گیاهان دارویی است که به واسطه اثرات دارویی متعدد از دیرباز توجه محققان را به خود معطوف داشته است [۳]. آریدوغان و همکاران (۲۰۰۰)، با بررسی فعالیت ضد میکروبی برخی از اسانس‌ها مشاهده کردند که اسانس نعناع فلفلی خاصیت ضدباکتری قوی علیه دو میکروارگانیسم *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* دارد [۴]. ایشجان و همکاران (۲۰۰۲)، در مطالعه خواص ضد میکروبی اسانس نعناع فلفلی را بروی برخی از میکروارگانیسم‌های پاتوژن بررسی کردند، نتایج این محققان نشان داد که اسانس نعناع فلفلی از رشد میکروارگانیسم‌های پاتوژن به شدت جلوگیری می‌کند [۵]. مصرف اسانس‌ها عموماً به دلیل محلولیت پایین در آب، فشار بخار بالا و ناپایداری فیزیکی و شیمیایی با دشواری‌هایی در کاربرد همراه است [۶]. علاوه بر این، اسانس‌ها در محصولات

ایجاد بو و مزه می‌کنند که این امر خوشایند مصرف‌کنندگان نیست. یکی از روش‌های به حداقل رساندن این اثرات نامطلوب اسانس‌ها، استفاده از نانولیپوزوم آنها می‌باشد که سبب افزایش پایداری ترکیبات فرار و افزایش خواص ضد میکروبی آن‌ها می‌شود [۷]. درون‌پوشانی، تکنولوژی به دام انداختن مواد جامد، مایع یا گازی در کپسول‌هایی که محتویات خود را در سرعت‌های کنترل شده و تحت شرایط ویژه آزاد می‌کنند، می‌باشد که شامل مراحل تشکیل دیواره اطراف ترکیب زیست فعال، اطمینان از عدم نشت این ترکیبات به بیرون و عدم پوشش ترکیبات نامطلوب در کپسول می‌باشد (۸). لیپوزوم‌ها یکی از مهمترین حامل‌های لیپیدی هستند که می‌توانند برای درون‌پوشانی ترکیبات غذا-دارو مورد استفاده قرار گیرند. از جمله مزیت‌های لیپوزوم‌ها نسبت به دیگر روش‌های ریزپوشانی پایداری انتقال لیپوزوم‌ها به مواد محلول در آب در کار با محیط‌های با فعالیت آبی بالاست. مزیت دیگر این است که آن‌ها از ترکیباتی ساخته شده‌اند که برای سلامتی انسان مفیدند. تحقیقات اخیر در مورد عملکردهای بیولوژیکی فسفولیپیدها و اسفنگولیپیدها، فواید متعددی را برای سلامتی از جمله حفاظت کبد، تقویت حافظه و جلوگیری از جذب کلاسترول ذکر کرده‌اند (۹).

با توجه به نتایج قابل قبول اسانس‌ها و تمایل به تولید مواد نگهدارنده طبیعی، تلاش برای افزایش اثرات اسانس به شیوه‌های گوناگونی دیده می‌شود. لذا هدف از این مطالعه بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره متانولی، اسانس و نانولیپوزوم حاوی اسانس نعناع فلفلی در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

مواد

فسفولیپید (ال- آلفا- لسیتین گرانولار با درجه خلوص ۹۹٪، شرکت *Across* آمریکا)، محیط کشت‌های نوترینت آگار، مولر هیتتون آگار، نوترینت برات (شرکت *Merck*) و حلال‌های مصرفی از شرکت مجللی تهران تهیه شدند. گیاه نعناع فلفلی نیز از مناطق آذربایجان غربی (شهرستان نقده) چیده شد.

استخراج اسانس

ابتدا گیاه مذکور خرد شده و اسانس گیری از آن با روش تقطیر با بخار آب به وسیله‌ی دستگاه کلونجر صورت گرفت [۱۰]. آب گیری از اسانس به وسیله‌ی افزودن اندکی سدیم سولفات انجام شد. اسانس بدون آب در ظرف تیره در یخچال در دمای 4°C نگهداری شد [۱۱].

شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس

آنالیز اسانس به کمک دستگاه گاز کروماتوگرافی Thermoquest مدل Trace مجهز به ستون DB-5 به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت لایه نازک ۰/۲۵ میکرومتر انجام شد. دمای محفظه تزریق و آشکارساز به ترتیب 250°C و 300°C بود و از نیتروژن با سرعت ۱/۱ میلی لیتر بر دقیقه به عنوان گاز حامل استفاده شد. دمای آون به طور صعودی از 60°C تا 250°C با سرعت ۵ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه افزایش یافته و به مدت ۱۰ دقیقه در 250°C ثابت ماند. شناسایی اجزاء اسانس به کمک دستگاه گاز کروماتوگرافی کوپل شده با طیف سنج جرمی Finnigan-Thermoquest مدل Trace مجهز به ستون DB-5 به طول ۶۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت لایه نازک ۰/۲۵ میکرومتر انجام شد. هلیوم با سرعت جریان ۱/۱ میلی لیتر بر دقیقه به عنوان گاز حامل و انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت استفاده شد. برنامه دمایی مانند دستگاه GC تنظیم گردید [۱۲].

تهیه عصاره گیاهی

عصاره گیری از اندام هوایی گونه *Mentha piperita* جهت انجام تست ضد میکروبی با استفاده از حلال متانول انجام شد. برای تهیه عصاره این گیاه بر روی ۲۰ گرم از قسمت های پودر شده گیاه (اندام هوایی یا ریشه)، ۲۰۰ میلی لیتر حلال متانول اضافه شد، سپس مخلوط حاصل به مدت ۲ ساعت توسط همزن تکان داده شد و نهایتاً در ظرف در بسته ای به مدت ۲۴-۴۸ ساعت نگه داری شد. سپس عصاره متانولی حاصل صاف شده و توسط دستگاه تبخیر کننده دوار (شرکت Heidolph، کشور آلمان) در فشار کاهش یافته تغلیظ گردید [۱۳].

تهیه نانولیپوزوم

جهت تهیه نانولیپوزوم از لسیتین استفاده گردید. لیپوزوم چند لایه‌ای بر اساس روش آب پوشانی لایه نازک تهیه شد [۱۴]. به این منظور ابتدا ۹۰ mg لسیتین با توزین دقیق و افزودن حلال اتانول کاملاً حل شد. لایه نازک با تبخیر حلال در دستگاه تبخیر کننده دوار (شرکت Heidolph، کشور آلمان) با سرعت rpm ۱۴۰ و دمای 50°C تشکیل یافت و سپس با افزودن اسانس و ۱۰ ml آب مقطر عمل هیدراسیون انجام شد. در انتها نیز به منظور ریز کردن لیپوزوم چند لایه‌ای و تبدیل آن‌ها به لیپوزوم تک لایه نمونه توسط هموژنایزر (شرکت Heidolph، کشور آلمان) با دور rpm ۲۰۰۰۰ و در دمای بالاتر از انتقال فاز لیپوزومی به مدت ۱۰ دقیقه همگن شد. در نهایت با استفاده از دستگاه سونیکاتور پروب‌دار (Materials & Sonics، کشور انگلستان) ریز کردن لیپوزوم در مدت ۵ دقیقه، طی ۵ چرخه‌ی ادقیقه‌ای با فاصله ۱ دقیقه استراحت انجام شد. به این صورت لیپوزوم تک‌لایه‌ای در مقیاس نانومتری تولید شدند [۱۵].

تعیین اندازه ذره‌ای لیپوزوم

اندازه‌گیری ذره‌ای نانولیپوزوم توسط دستگاه پراکندگی نور پویا (مدل Nanophox Sympatec GmbH، ساخت آلمان) در دمای 25°C تعیین شد. نمونه‌ها با آب دیونیزه شده رقیق شدند تا تعداد ذرات محدوده‌ای مشخص (بین ۲۰۰ تا ۲۰۰۰ kCPS) داشته باشند [۱۶].

پتانسیل زتا

برای تعیین پتانسیل زتا لیپوزوم حاوی اسانس از دستگاه زتا سایزر (Nano-ZS ساخت شرکت Malvern کشور انگلستان) استفاده شد. برای این منظور نمونه نخست با آب مقطر ۵۰ برابر رقیق شد. سپس نمونه توسط سرنگی داخل لوله موئین منتقل و لوله موئین در محل مخصوص در داخل دستگاه قرار گرفت. اندازه‌گیری پتانسیل زتا محلول لیپوزومی در $\text{pH}=7/4$ در دمای 25°C و توان ۱۴۹ وات انجام شد [۱۷].

پایداری فیزیکی درون پوشانی

پایداری بلند مدت نانوحامل تولید شده با اندازه‌گیری تغییرات در اندازه قطره‌های آن و همچنین ظاهر آنها در طی نگه‌داری در دمای آزمایشگاه (تقریباً ۲۵°C) به مدت ۴۰ روز بررسی شد. برای تعیین پایداری نانولیپوزوم تولید شده، اندازه ذرات در روز اول و روز چهلیم با دستگاه DLS اندازه گرفته شد [۱۸].

ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی اسانس

سوش‌های میکروبی

باکتری‌های مورد مطالعه شامل استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923)، اشرشیا کلی (ATCC 25922)، باسیلوس سرئوس (ATCC 11778) و نمونه قارچی کاندیدا آلبیکنز بودند. باکتری‌های اخذ شده از کلکسیون میکروبی مرکز تحقیقات دارویی دانشگاه تبریز برای اطمینان یکبار روی محیط نوترینت آگار^۳ کشت داده شده و تک کلنی انتخاب گردید. سپس تک کلنی به صورت نقطه‌ای روی مولر هینتون آگار کشت شده و پس از رشد تا زمان استفاده جهت آزمون‌های بعدی در یخچال نگهداری گردیدند [۱۹].

تعیین کمترین غلظت مهار کننده رشد (MIC)

برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از روش رقت سازی در پلیت ۹۶ خانه استفاده شد. بدین منظور محلول استوک اولیه با غلظت ۴۰۰۰۰ μg/ml استفاده از محیط کشت نوترینت برات تهیه شد. سری رقتی از ماده‌ی مورد بررسی در نوترینت برات تهیه شد. سوسپانسیونی از کشت تازه (۲۰-۱۸ ساعته) باکتری در سرم فیزیولوژی تهیه و کدورت آن با لوله نیم مک‌فارلند تنظیم شد. این سوسپانسیون به نسبت ۱:۱۰۰ با نوترینت برات رقیق شد و سپس ۱۰۰ μl از آن به هر چاهک اضافه گردید. به این ترتیب در هر چاهک ۱۰^۶ × ۰/۵ - ۱ باکتری مورد سنجش وجود داشت. با اضافه شدن سوسپانسیون باکتری، غلظت نهایی ماده‌ی مورد بررسی در هر چاهک نصف می‌شد. پس از گرمخانه گذاری، چاهک‌ها از لحاظ داشتن کدورت بررسی شده و اولین چاهک بدون کدورت به عنوان کم‌ترین غلظت مهار کننده‌ی

رشد، تعیین و بر اساس μg/ml ثبت شد. در مورد مواردی که پس از حل شدن در محیط کشت باعث ایجاد کدورت می‌شدند از معرف Resazurine برای تمیز چاهک‌های دارای رشد از چاهک‌های بدون رشد استفاده شد. محلول ذخیره‌ای از معرف، با غلظت نهایی ۴ mg/ml در آب مقطر تهیه شده و با فیلتر ۰/۲ μm استریل شد. از این محلول ۵ μl به هر چاهک و چاهک کنترل مثبت اضافه شده و پلیت بر روی شیکر قرار داده شد. به محض تغییر رنگ چاهک کنترل مثبت (نفش به سرخابی یا صورتی پر رنگ)، MIC تعیین و ثبت شد [۲۰ و ۲۱].

تعیین کمترین غلظت کشندگی (MBC)

حداقل غلظت کشندگی به معنای غلظتی از ماده‌ی مورد بررسی است که سبب کشتن % ۹۹/۹ از تعداد باکتری مورد بررسی می‌گردد. برای تعیین این غلظت، ۱۰۰ μl از محتویات هر چاهک بدون رشد، پس از هم‌زدن، بر روی یک پلیت نوترینت آگار پخش شده و به شکل پورپلیت کشت داده می‌شد. گرمخانه گذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای مناسب انجام شده و کم‌ترین غلظتی که سبب از بین رفتن % ۹۹/۹ از تعداد شمارش اولیه‌ی باکتری شده بود، به عنوان MBC ثبت می‌گردید [۲۲].

۳- نتایج و بحث

بررسی در صد اسانس

اسانس حاصل از گیاه نعناع فلفلی به رنگ زرد و دارای بویی نافذ بود. بازده اسانس حاصله که با روش تقطیر با آب و دستگاه کلونجر به دست آمده است، ۱/۲۸ درصد بود که با مطالعات یزدانی و همکاران مطابقت داشت. طبق بررسی یزدانی درصد اسانس نعناع فلفلی کاشته شده در مناطق مختلف کشور وابسته به شرایط محیطی بوده و میزان آن بین ۱/۱۵ تا ۳/۲ درصد متغیر است که این مقدار تحت تأثیر فاکتورهای مختلف محیطی از جمله آب و هوا، خاک، ارتفاع محل رویش گیاه و طول مدت روشنایی، بود [۲۳]. در تطابق با پژوهش جاری، فدائی و همکاران با استفاده از روش تقطیر با آب اسانس گیاه نعناع فلفلی را استخراج کردند که نتایج نشان داد که گیاه مذکور حاوی ۱/۲۴ درصد اسانس بود [۲۴]. زمانزاده و همکاران نیز از روش تقطیر با آب برای استخراج اسانس از گیاه نعناع فلفلی کرده و گزارش

3. Nutrient Agar

اجزای غالب اسانس شامل منتول (۲۶/۵۷٪)، کاروون (۱۶/۱۴٪)، منتون (۱۴/۰۱٪)، نئومنتول (۵/۸۵) و استات منتول (۳/۶۲٪) تعیین گردید [۲۵]. طبق تحقیقات ایزدی و همکاران پیپریتون اکسید (۲۱/۲٪)، آلفا ترپینن (۱۵/۲٪)، منتول (۱۸/۶٪)، ایزومنتون (۱۰/۱٪) و بتا کاریوفیلن (۶/۹٪) از ترکیبات شاخص اسانس حاصل از گیاه نعناع فلفلی می‌باشد [۲۶]. این در حالی است که در مطالعه ما پیپریتون اکسید و آلفا ترپینن شناسایی نشدند. تفاوت‌های مشاهده شده در مواد تشکیل دهنده اسانس نعناع فلفلی جمع آوری شده از مناطق مختلف ممکن است به دلیل تفاوت در روش اسانس‌گیری، زمان جمع‌آوری گیاه و یا تفاوت‌های اکولوژیک محل رویش گیاه باشد.

کردند که بازده اسانس حاصله از این گیاه ۱/۲ درصد بود [۲۴]. با مطالعه و بررسی دقیق زمان‌های بازداری ترکیبات، شاخص‌های بازداری، طیف‌های جرمی و مقایسه‌ی این پارامترها با ترکیبات استاندارد و کتابخانه‌ی دستگاه، ترکیبات موجود در اسانس شناسایی شدند. نتیجه‌ی آنالیز اسانس در جدول ۱ آورده شده است. طی آنالیز اسانس گیاه نعناع فلفلی ۲۵ ترکیب شناسایی شد که جمعاً ۹۸/۵۳٪ کل اسانس را تشکیل می‌دهند. منتول (۴۰/۴۶٪)، منتون (۱۶/۳۳٪)، منتوفوران (۱۳/۳۷٪)، متیل استات (۷/۱۱٪) و ۱/۸ سینئول (۴/۱۱٪) به عنوان ترکیبات اصلی اسانس به شمار می‌آیند. در مطالعه الوندی و همکاران نیز ترکیب اصلی اسانس نعناع فلفلی مشابه آنالیز اسانس مطالعه حاضر بوده است [۲۵]. در مطالعه دیگری که توسط فدائی و همکاران انجام شد،

Table 1 Chemical composition of *Mentha piperita* essential oil

Row	Combine name	Kovats Retention indices (KI)	%
1	α -Pinene	934	0.93
2	Sabinene	973	0.52
3	β -Pinene	978	1.06
4	β -Myrcene	991	0.17
5	3-Octanol	996	0.13
6	p-Cymene	1026	0.12
7	Limonene	1028	5.86
8	1.8- Cineol	1032	4.1
9	Sabinenehydrate	1068	0.26
10	Butyric acid	1102	0.18
11	Menthone	1156	16.33
12	Menthofuran	1169	13.37
13	Menthol	1188	40.86
14	Pulegone	1244	2.89
15	Piperitone	1256	0.94
16	Menthylacetate	1294	7.11
17	Menthol acetate	1294	0.33
18	β -Bourbonene	1382	0.45
19	Caryophyllene	1420	2.27
20	E- β -Farnesene	1455	0.26
21	Germacrene D	1480	0.99
22	Bicyclogermacrene	1495	0.58
23	Caryophylleneoxide	1582	0.2
24	Veridiflorol	1593	0.39
25	Nonadecane	1900	0.22

تعیین اندازه و پتانسیل زتا

جدول ۲ نتایج آزمایش‌های اندازه‌ی ذره‌ای، پتانسیل زتا و پایداری دورون پوشانی را با سه تکرار برای هر آزمایش را نشان می‌دهد.

میانگین اندازه‌ی ذره‌ای و پتانسیل زتا به ترتیب 98.53 ± 65.2 نانومتر و 0.11 ± 14 میلی ولت بود. اندازه ذرات پس از ۴۰ روز به 240.38 ± 25.2 نانومتر افزایش و پتانسیل زتا نیز به 0.18 ± 9.25 میلی ولت کاهش یافت که نشان دهنده پایدار بودن نانولیپوزوم تولیدی بعد از ۴۰ روز می‌باشد.

Table 2 Physicochemical properties of *Mentha piperita* nanoemulsion

Parameter	first day	40eith day
Particle size (nm)	98.53 ± 65.2	240.38 ± 25.2
Zeta potential	-14 ± 0.11	-9.25 ± 0.18

چگالی بار سطحی آسان‌تر است، بنابراین بار ذرات معمولاً بر اساس پتانسیل زتا گزارش می‌شود [۲۹].

بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس

حداقل غلظت کشندگی و حداقل غلظت بازدارندگی عصاره متانولی، اسانس و نانولیپوزوم حاوی اسانس نعنای فلفلی در برابر باکتری‌های مورد آزمون در جدول ۳ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد که اسانس نعنای فلفلی در حالت آزاد و درون پوشانی شده فعالیت ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای در برابر باکتری‌های مورد آزمایش نشان داد. در حالی که عصاره متانولی فقط بر روی باکتری‌های گرم مثبت تاثیر داشت. بر اساس نتایج حاصل شده می‌توان نتیجه‌گیری نمود که اسانس فعالیت ضد باکتریایی بیشتر و در مقایسه با عصاره متانولی دارد که این نتایج با نتایج عزیزخانی و همکاران مطابقت داشت [۳۰]. بطور کلی ترکیبات فعال ضد میکروبی اسانس‌ها، ترین‌ها نظیر اوژنول، تیمول و کارواکرول می‌باشند که ماهیت فنولی دارند. بویژه خاصیت ضد میکروبی اسانس گیاه نعنای که در محیط برات و مدل سیستم‌های غذایی توسط Sivropoulou و همکاران و Tassou و همکاران بررسی شد و نشان داده شد که این خاصیت بعلت وجود منتول و کتون‌ها نظیر ایزومنتول و کاروون می‌باشند [۳۱ و ۳۲].

اندازه ذرات سیستم‌های کلئیدی مانند لیپوزوم‌ها، اهمیت ویژه‌ای در تعیین خصوصیات آن‌ها دارد. اندازه ذرات کوچک‌تر منجر به به وجود آمدن سطح تماس بیشتر و در نتیجه کارایی زیستی، شفافیت و حلالیت بالاتر می‌شود [۲۷]. هنگامی که ترکیبات، روش و پارامترهای فرآیند (زمان، دما، فشار، نوع تجهیزات و غیره) به منظور بهینه کردن شرایط تولید تغییر می‌کنند، اندازه ذرات نیز تغییر می‌کند. از فاکتورهای موثر بر متوسط اندازه ذرات می‌توان به ماهیت نانو حامل، ماهیت ماده‌ی زیست فعال، فرآیند فرمولاسیون، روش تولید و نسبت حامل به ماده فعال و شرایط محیطی مانند دما اشاره کرد [۲۸]. یکی دیگر از ویژگی‌های فیزیکی مهم لیپوزوم‌ها پتانسیل زتا است که عملکرد لیپوزوم را در شرایط بیولوژیک پیش‌بینی می‌کند. پتانسیل الکتریکی در صفحه برشی بین لایه غیر متحرک و لایه متحرک، پتانسیل زتا نامیده می‌شود. پتانسیل زتا عامل مهمی در تعیین پایداری سیستم کلئیدی به حساب می‌آید و بهترین شاخص برای تعیین وضعیت الکتریکی سطحی دیسپرسیون-هاست. به دلیل اینکه این عامل، نشان‌دهنده میزان تجمع بار در لایه غیرمتحرک و شدت جذب یون‌های مخالف به سطح ذره است و همچنین اندازه‌گیری آن از پتانسیل الکتریکی سطحی و

Table 3 minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of nanoliposome and the essential oil of *Mentha piperita*

Sample	Bacteria							
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Bacillus cereus</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Candida albicans</i>	
	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)
Essential oil	20000	10000	1250	2500	625	625	20000	5000
Nanoliposome	2500	5000	312/5	1250	312/5	312/5	1250	1250
Extract	NA	NA	40000	NA	20000	40000	NA	NA

NA: Non-Active

رشد مصرف غذاهای سالم، گرایش به استفاده از مواد دارای فعالیت ضد میکروبی با منشا طبیعی افزایش یافته است. اسانس‌های گیاهی و ترکیبات آن‌ها به عنوان افزودنی‌های ضدباکتری و ضدقارچی یکی از این روش‌ها می‌باشد. نتایج این بررسی نشان داده است که نعنای فلفلی دارای ترکیباتی با ویژگی‌های ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی است. با توجه به اینکه اسانس نعنای در غلظت‌های پایین قادر به از بین بردن باکتری‌های مولد فساد مواد غذایی و همچنین غیر فعال کردن رادیکال‌های آزاد می‌باشد لذا استفاده از این اسانس در مواد غذایی به عنوان ترکیبات ضد میکروبی می‌تواند مفید باشد. ولی با توجه به اینکه استفاده از اسانس‌ها در مواد غذایی با محدودیت‌هایی همراه است می‌توان از فرم کپسوله آن‌ها استفاده کرد، که نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که خاصیت ضد میکروبی اسانس نعنای فلفلی در حالت کپسوله شده در لیپوزوم بیشتر از حالت آزاد است.

۵- منابع

- [1] Gourine, N., Yousfi, M., Bombarda, I., Nadjemi, B., Stocker, P., and Gaydou, E. M. 2010. Antioxidant activities and chemical composition of essential oil of *Pistacia atlantica* from Algeria. *Industrial Crops and Products*, 31(2): 203-208.
- [2] Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D., and Corke, H. 2007. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 117(1): 112-119.
- [3] Hay, R., and Waterman, P. (1998), *Volatile oil crops: their biology, biochemistry and*

در حالت کلی تاثیر اسانس‌ها و عصاره‌ی گیاهان دارویی و ترکیبات آن‌ها بر روی باکتری‌های گرم مثبت، قدری بیشتر از تاثیر آن‌ها بر روی باکتری‌های گرم منفی است. به عبارت دیگر گرم مثبت‌ها، نسبت به اثر ضد میکروبی اسانس‌ها حساسیت بیشتری نشان دادند [۳۳]. همچنین حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی نانولیپوزوم در مقایسه با اسانس آزاد در همه باکتری‌ها پایین‌تر است که می‌تواند به این دلیل باشد که با توجه به این که در سطح غشای باکتری‌ها حفراتی وجود دارد که محل ورود و خروج مواد می‌باشد، هرچه نانوذرات تولیدی کوچکتر باشد راحت‌تر می‌تواند به این حفرات وارد شده و ماده زیست فعال خود را آزاد سازند. علاوه بر این، به دلیل اینکه جنس نانولیپوزوم از فسفولیپید بود، سیالیت غشایی بیشتری داشته در نتیجه در این حالت اسانس راحت‌تر می‌تواند از غشای باکتریایی به داخل سلول نفوذ کند و سبب تخریب دیواره سلولی شود. نتایج این پژوهش با نتایج نودوست و همکاران (۲۰۱۵) مطابقت داشت، بطوریکه عصاره چای سبز بعد از درون پوشانی در لیپوزوم خاصیت ضد میکروبی بالاتری از حالت آزاد نشان داد [۳۴]. نتایج چوی و همکاران (۲۰۱۶)، نیز نشان داد انکپسولایون اسانس مریم گلی درون لیپوزوم سبب ثبات و همچنین اثر ضد- میکروبی بیشتری نسبت به حالت اسانس آزاد در برابر بیوفیلم استافیلوکوکوس اروئوس در ظروف شیر می‌شود [۳۵].

۴- نتیجه گیری

با افزایش روز افزون آگاهی مصرف کنندگان مواد غذایی نسبت به مضرات استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی و تقاضای رو به

- of metanolic extract of 12 herbal species on 6 bacterial strains using cylinder-plate method. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*, 8(3): 227-238.
- [14] Bangham, A. D., Standish, M. M., and Watkins, J. C. 1965. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of molecular biology*, 13(1): 238-252.
- [15] Xia, S., and Xu, S. 2005. Ferrous sulfate liposomes: preparation, stability and application in fluid milk. *Food research international*, 38(3): 289-296.
- [16] Moghimi, R., Ghaderi, L., Rafati, H., Aliahmadi, A., and McClements, D. J. 2016. Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. *Food chemistry*, 194: 410-415.
- [17] Fatouros, D. G., and Antimisariis, S. G. 2002. Effect of amphiphilic drugs on the stability and zeta-potential of their liposome formulations: a study with prednisolone, diazepam, and griseofulvin. *Journal of colloid and interface science*, 251(2): 271-277.
- [18] Chanda, H., Das, P., Chakraborty, R. and Ghosh, A. 2011. Development and evaluation of liposomes of fluconazole. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 5: 1-9.
- [19] Fateh, R., Nasiri Kashani, M. J., Motevallian, M., Falahati, M., and Yazdanparast, A. 2010. In vitro antifungal activity of *Allium hirtifolium* in comparison with miconazole. *Medical Journal of The Islamic Republic of Iran*, 24(1): 17-22.
- [20] Oroojalian, F., Kasra-Kermanshahi, R., Azizi, M., and Bassami, M. R. 2010. Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. *Food chemistry*, 120(3): 765-770.
- [21] Demirci, F., Guven, K., Demirci, B., Dadandi, M. Y., and Baser, K. H. C. 2008. Antibacterial activity of two *Phlomis* essential oils against food pathogens. *Food Control*, 19(12): 1159-1164.
- [22] Celiktas, O. Y., Kocabas, E. H., Bedir, E., Sukan, F. V., Ozek, T., and Baser, K. H. C. 2007. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus* production, Baghalian, K and Naghdi Badi, H, Tehran, Andarz, 21- 29.
- [4] Andoğan, B. C., Baydar, H., Kaya, S., Demirci, M., Özbaşar, D., and Mumcu, E. 2002. Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. *Archives of pharmacal research*, 25(6): 860-864.
- [5] Mimica-Dukić, N., Bozin, B., Soković, M., Mihajlović, B., and Matavulj, M. 2003. Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta medica*, 69(5): 413-419.
- [6] Alizadeh, H., Farzaneh, M., and Azami, Z. 2015. Effects of nano-emulsion of cinnamon oils in decreasing strawberry post-harvest rots. *biological control of pestes & plant diseases*, 4(1): 57-64.
- [7] Liolios, C. C., Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J., and Chinou, I. 2009. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food chemistry*, 112(1): 77-83.
- [8] Fang, Z., and Bhandari, B. 2010. Encapsulation of polyphenols—a review. *Trends Food Sci. Tech*, 21(10): 510-23.
- [9] Reza Mozafari, M., Johnson, C., Hatziantoniou, S., and Demetzos, C. 2008. Nano liposomes and their applications in food nanotechnology. *Journal of liposome research*, 18(4): 309-327.
- [10] Ghosh, V., Saranya, S., Mukherjee, A., and Chandrasekaran, N. 2013. Cinnamon oil nanoemulsion formulation by ultrasonic emulsification: investigation of its bactericidal activity. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 13(1): 114-122.
- [11] Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., and Ozkan, H. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food chemistry*, 103(4): 1449-1456.
- [12] Tenore, G. C., Ciampaglia, R., Arnold, N. A., Piozzi, F., Napolitano, F., Rigano, D., and Senatore, F. 2011. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil of *Salvia lanigera* from Cyprus. *Food and Chemical Toxicology*, 49(1): 238-243.
- [13] Mahdavi Meymand, Z., Moshafi, M. H., and Forutanfar, H. 2009. Antibacterial activity

- University of Medical Sciences and Health Services, 36(4): 102-111.
- [30] Azizkhani, M., and Ataee, M. 2012. Antioxidant and antibacterial activity of the essential oil and methanol extract from *Mentha longifolia* Hudson. *Journal of Food Research*, 22(1): 29-38.
- [31] Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T., and Arsenakis, M. 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 44(5): 1202-1205.
- [32] Tassou, C., Koutsoumanis, K., and Nychas, G. J. 2000. Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Research International*, 33(3): 273-280.
- [33] Morris, J., Khettry, A. and Seitz, E. 1979. Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56: 595-603.
- [34] Noudoost, B., Noori, N., Amo Abedini, G., Gandomi, H., Akhondzadeh Basti, A., Jebeli Javan, A., and Ghadami, F. 2015. Encapsulation of Green Tea Extract in Nanoliposomes and Evaluation of its Antibacterial, Antioxidant and Prebiotic Properties. *Journal of Medicinal Plants*. 3(55): 66-78.
- [35] Cui, H., Zhou, H., and Lin, L. 2016. The specific antibacterial effect of the *Salvia* oil nanoliposomes against *Staphylococcus aureus* biofilms on milk container. *Food Control*, 61: 92-101.
- officinalis, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, 100(2): 553-559.
- [23] Yazdani, D., Jamshidi, A. H., and Mojab, F. 2002. Comparison on menthol content of cultivated peppermint at different regions of Iran. *Journal of Medicinal Plants*, 3(3): 73-77.
- [24] Fadaei, S., Abroumand, A. P., Sharifan, A., and Larijani, K. 2011. Evaluation of antimicrobial activity of *Mentha piperita* L. essential oil and its comparison with sodium benzoate. *Food Technology & Nutrition*. 8: 34-41.
- [25] Kazem, A. R., Sharifan, A., and Aghazadeh, M. M. 2011. Study of chemical composition and antimicrobial activity of peppermint essential oil. *Journal of Comparative pathobiology Iran*. 7(4): 355-363.
- [26] Izadi, Z., Esna-Ashari, M., Ahmadvand, G., Davoodi, P., and Piri, K. H. 2009. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essence oil of Peppermint (*Mentha piperita* L.). *Armaghane danesh*, 14(3): 45-54.
- [27] Wu, L., Zhang, J., and Watanabe, W. 2011. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced drug delivery reviews*, 63(6): 456-469.
- [28] Donsì, F., Annunziata, M., Sessa, M., and Ferrari, G. 2011. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT-Food Science and Technology*, 44(9): 1908-1914.
- [29] Mohammadi, M., Ghanbarzadeh, B., Mokarram, R. R., Hoseini, M. Y., and Hamishehkar, H. 2014. Study of Stability, Zeta-potential, and Steady Rheological Properties of Nanoliposomes Containing Vitamin D₃. *Medical Journal of Tabriz*

Evaluation of Antimicrobial Properties of Methanolic Extract, Essential Oil and Nanoliposome of *Mentha piperita*

Gharenaghadeh, S. ^{1*}, Forghani, S. ², Gharehaghadeh, S. ³, Sowti, M. ⁴

1. Masters student, Department of Food Science, Faculty of Agriculture, Shahrood University
 2. Masters student, Department of Food Science, Faculty of Agriculture, Tabriz University
 3. PhD student, phytochemistry, Shahid Beheshti University
 4. Associate Professor, Department of Food Science, Faculty of Agriculture, Tabriz University
- (Received: 2016/03/16 Accepted: 2016/06/06)

Natural preservatives that extracted from medicinal plants are the most important bioactive compounds that can be used in foods manufacturing. Generally, using of these free oils as food preservatives are limited. One way to reduce these limitations is encapsulation of these oils in lipid carriers such as nanoliposomes. The aim of this study was to evaluate the antioxidant and antimicrobial activity of the *Mentha piperita* essential oil and methanolic extract. The extraction of essential oil of *Mentha piperita* species was performed by steam distillation and its chemical composition were identified using GC and GC-MS. Methanolic extracts were obtained by wet method. Nanoliposomes of *Mentha piperita* essential oil was prepared by thin layer hydration and sonication methods. Nanoliposomes particle size was evaluated by using dynamic light scattering and zeta potential was evaluated by using zeta sizer. Also to evaluate the antimicrobial properties, the microdilution method was used. The most predominant constituents were menthol (40.46%), menthone (16.33%), mentho furan (13.37%) and menthyl acetate (7.11%) respectively. Particle size and zeta potential were 98.53 nm and -14 mV respectively and Nanoliposome was stable for 40 days. The minimum inhibitory concentration of essential oils in both free and inside overlap mode on gram-positive bacteria is more than gram-negative bacteria and fungi, while the methanolic extract was disabled on gram-negative bacteria and fungi, also had poor inhibitory effect on the gram-positive bacteria. The antimicrobial effect of overlapped essential oil was more than free.

Keywords: *Mentha piperita*, Nanoliposome, antimicrobial, GC-MS

* Corresponding Author E-Mail Address: sasan.gharenaghadeh90@gmail.com