بررسی خاصیت ضدمیکروبی عصاره متانولی، اسانس و نانولیپوزوم حاوی اسانس نعناع فلفلی

ساسان قره‌نقده[1*]، سمیرا فرقانی[2]، سامان قره‌نقده[3]، محمود صوتی خیابانی[4]

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

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

٣- دانشجوی دکتری، فیتوشیمی ، دانشگاه شهید بهشتی

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

(تاریخ دریافت: ٩٤/١٢/٢٦ تاریخ پذیرش: ٩٥/٠٣/١٧)

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 عموما 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 ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی نیز با روش میکرودایلوشن اندازه‌گیری شد. مهمترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس عبارت بودند از: منتول (٤٠/٤٦ ٪)، منتون (١٦/٣٣٪)، منتوفوران (١٣/٣٧٪) و منتیل استات (٧/١١٪). اندازه ذرات و پتانسیل زتا به ترتیب ٩٨/٥٣ نانومتر و ١٤- میلی‌ولت بود و نانولیپوزوم حاصل به مدت ٤٠ 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 ضدمیکروبی بیشتری نسبت به حالت آزاد داشت.

کلید واژگان: نعناع فلفلی، نانولیپوزوم، ضدمیکروبی، 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 ضدمیکروبی 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 آلودگی-های ثانویه در طی مراحل تولید می‌توانند 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 ترپنویدی استخراج شده از گیاهان دارویی سبب از بین رفتن میکروارگانیسم‌ها می-شود [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 ضدمیکروبی برخی از اسانس‌ها مشاهده کردند که اسانس نعناع فلفلی خاصیت ضدباکتری قوی علیه دو میکروارگانیسم *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* دارد [٤]. 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 میکروارگانیسم های پاتوژن به شدت جلوگیری می کند [٥]. مصرف اسانس‌ها عموما به دلیل محلولیت پایین در آب، فشار بخار بالا و ناپایداری فیزیکی و شیمیایی با دشواری‌هایی در کاربرد همراه است [٦]. 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 می باشد که سبب افزایش پایداری ترکیبات فرار و افزایش خواص ضد میکروبی آن‌ها می-شود [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[1] 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 کلسترول ذکر کرده‌اند [۹].

با توجه به نتایج قابل قبول اسانس‌ها و تمایل به تولید مواد نگهدارنده طبیعی، تلاش برای افزایش اثرات اسانس به شیوه های گوناگونی دیده می شود. لذا هدف از این مطالعه بررسی فعالیت ضدمیکربی 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 هینتون آگار، نوترینت براث (شرکت Merck) و حلال‌های مصرفی از شرکت مجللی تهران تهیه شدند. گیاه نعناع فلفلی نیز از مناطق آذربایجان‌غربی (شهرستان نقده) چیده شد.

1. Nutraceuticals

استخراج اسانس

ابتدا گیاه مذکور خرد شده و اسانس گیری از آن با روش تقطیر با بخار آب به وسیله‌ی دستگاه کلونجر صورت گرفت [١٠]. آب گیری از اسانس به وسیله‌ی افزودن اندکی سدیم سولفات انجام شد. اسانس بدون آب در ظرف تیره در یخیال در دمای ٤ ^{o}C نگهداری شد [١١].

شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس

آنالیز اسانس به کمک دستگاه گاز کروماتوگرافی Thermoquest مدل Trace مجهز به ستون DB-٥ به طول ٣٠ متر و قطر داخلی ٠/٢٥ میلی متر و ضخامت لایه نازک ٠/٢٥ میکرومتر انجام شد. دمای محفظه تزریق و آشکارساز به ترتیب ٢٥٠ و ٣٠٠^{o}C بود و از نیتروژن با سرعت ١/١ میلی لیتر بر دقیقه به عنوان گاز حامل استفاده شد. دمای آون به طور صعودی از ٦٠ تا ٢٥٠ ^{o}C با سرعت ٥ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه افزایش یافته و به مدت ١٠ دقیقه در ٢٥٠ ^{o}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-٥ به طول ٦٠ متر و قطر داخلی ٠/٢٥ میلی متر و ضخامت لایه نازک ٠/٢٥ میکرومتر انجام شد. هلیوم با سرعت جریان ١/١ میلی لیتر بر دقیقه به عنوان گاز حامل و انرژی یونیزاسیون ٧٠ الکترون ولت استفاده شد. برنامه دمایی مانند دستگاه GC تنظیم گردید [١٢].

تهیه عصاره گیاهی

عصاره گیری از اندام هوایی گونه *Mentha piperita* جهت انجام تست ضدمیکروبی با استفاده از حلال متانول انجام شد. برای تهیه عصاره این گیاه بر روی ٢٠ گرم از قسمت های پودر شده گیاه (اندام هوایی یا ریشه)، ٢٠٠ میلی لیتر حلال متانول اضافه شد، سپس مخلوط حاصل به مدت ٢ ساعت توسط همزن تکان داده شد و نهایتاً در ظرف در بسته ای به مدت ٤٨- ٢٤ 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 [١٣].

تهیه نانولیپوزوم

جهت تهیه نانولیپوزوم از لسیتین استفاده گردید. لیپوزوم چند لایه‌ای بر اساس روش آب پوشانی لایه نازک تهیه شد [١٤]، به این منظور ابتدا ٩٠ mg لسیتین با توزین دقیق و افزودن حلال اتانول کاملا حل شد. لایه نازک با تبخیر حلال در دستگاه تبخیر کننده دوار (شرکت Heidolph، کشور آلمان) با سرعت rpm ١٤٠ و دمای ٥٠ ^{o}C تشکیل یافت و سپس با افزودن اسانس و ١٠ 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 ٢٠٠٠٠rpm و در دمای بالاتر از انتقال فاز لیپوزومی به مدت ١٠ دقیقه همگن شد. در نهایت با استفاده از دستگاه سونیکاتور پروب‌دار (Materials & Sonics vibracell، کشور انگلستان) ریز کردن لیپوزوم در مدت ٥ دقیقه، طی ٥ چرخه‌ی ١دقیقه‌ای با فاصله ١ دقیقه استراحت انجام شد. به این صورت لیپوزوم تک‌لایه‌ای در مقیاس نانومتری تولید شدند [١٥].

تعیین اندازه ذره‌ای لیپوزوم

اندازه‌گیری ذره‌ای نانولیپوزوم توسط دستگاه پراکندگی نور پویا[2] (مدل Nanophox Sympatec GmbH، ساخت آلمان) در دمای ٢٥ ^{o}C تعیین شد. نمونه‌ها با آب دیونیزه شده رقیق شدند تا تعداد ذرات محدوده‌ای مشخص (بین ٢٠٠ تا ٢٠٠٠ kCPS) داشته باشند [١٦].

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 ٥٠ 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 pH=٧/٤ در دمای٢٥ ^{o}C و توان ١٤٩ وات انجام شد [١٧].

2. Dynamic light scattering (DLS)

پایداری فیزیکی درون پوشانی

پایداری بلند مدت نانوحامل تولید شده با اندازه‌گیری تغییرات در اندازه قطره‌های آن و همچنین ظاهر آنها در طی نگه -داری در دمای آزمایشگاه (تقریباً ۲۵°C) به مدت ٤٠ روز بررسی شد. برای تعیین پایداری نانولیپوزوم تولید شده، اندازه ذرات در روز اول و روز چهلم 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 [3] 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 آزمون های بعدی دریخچال نگهداری گردیدند [۱۹].

تعیین کمترین غلظت مهار کننده رشد (MIC)

برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از روش رقت سازی در پلیت ۹٦ خانه استفاده شد. بدین منظور محلول استوک اولیه با غلظت ٤٠٠٠٠ µg/ml با استفاده از محیط کشت نوترینت براث تهیه شد. سری رقتی از ماده‌ی مورد بررسی در نوترینت براث 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 براث رقیق شد و سپس ۱۰۰ µl از آن به هر چاهک اضافه گردید. به این ترتیب در هر چاهک $۱۰^{٦}$× CFU/ml ۱– ۰/۵ 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 ٤ mg/ml در آب مقطر تهیه شده و با فیلتر µm ۰/۲ 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 نوترینت‌آگار پخش شده و به شکل پورپلیت کشت داده می‌شد. گرماخانه گذاری به مدت ٢٤ 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، ۱/۲۸درصد 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 ۱/۲٤ درصد اسانس بود [٢٤]. زمانزاده و همکاران نیز از روش تقطیر با آب برای استخراج اسانس از گیاه نعناع فلفلی کرده و گزارش

3. Nutrient Agar

کردند که بازده اسانس حاصله از این گیاه ۱/۲ درصد بود [٢٤]. 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. نتیجه ی آنالیز اسانس در جدول ۱ آورده شده است. طی آنالیز اسانس گیاه نعناع فلفلی ۲۵ ترکیب شناسایی شد که جمعا ۹۸/۵۳٪ کل اسانس را تشکیل می دهند. منتول (٤٠/٤٦ ٪)، منتون (١٦/٣٣٪)، منتوفوران (١٣/٣٧ ٪)، منتیل استات (٧/١١٪) و ۱/۸ سینئول (٤/١١ ٪) به عنوان ترکیبات اصلی اسانس به شمار می آیند. در مطالعه الوندی و همکاران نیز ترکیب اصلی اسانس نعناع فلفلی مشابه آنالیز اسانس مطالعه حاضر بوده است [٢٥]. در مطاله دیگری که توسط فدائی و همکاران انجام شد، اجزای غالب اسانس شامل منتول (٢٦/٥٧٪)، کاروون (١٦/١٤٪)، منتون (١٤/٠١٪)، نئومنتول (٥/٨٥) و استات منتول (٣/٦٢٪) تعیین گردید [٢٥]. طبق تحقیقات ایزدی و همکاران پیپریتون اکسید (٢١/٢٪)، آلفا ترپینن (١٥/٢٪)، منتول (١٨/٦٪)، ایزومنتون (١٠/١٪) و بتا کاریوفیلن (٦/٩٪) از ترکیبات شاخص اسانس حاصل از گیاه نعناع فلفلی می‌باشد [٢٦]. 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 تفاوت-های اکولوژیک محل رویش گیاه باشد.

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-Octabol	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

تعین اندازه و پتانسیل زتا

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

میاانگین اندازه‌ای ذره‌ای و پتانسیل زتا به ترتیب ۲/٦٥ ± ۹۸/۵۳ نانومتر و ۰/۱۱ ±۱٤- میلی ولت بود. اندازه ذرات پس از ٤۰ روز به ۲/۲۵± ۲٤۰/۳۸ نانومتر افزایش و پتانسیل زتا نیز به ۰/۱۸± ۹/۲۵ میلی ولت کاهش یافت که نشان دهنده پایدار بودن نانولیپوزوم تولیدی بعد از ٤۰ 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

اندازه ذرات سیستم های کلوئیدی مانند لیپوزوم‌ها ، اهمیت ویژه ای در تعیین خصوصیات آن ها دارد. اندازه ذرات کوچک تر منجر به به وجود آمدن سطح تماس بیشتر و در نتیجه کارایی زیستی، شفافیت و حلالیت بالاتر می شود [۲۷]. هنگامی که ترکیبات، روش و پارامترهای فرآیند (زمان، دما، فشار، نوع تجهیزات وغیره) به منظور بهینه کردن شرایط تولید تغییر می کنند، اندازه ذرات نیز تغییر می کند. از فاکتورهای موثر بر متوسط اندازه ذرات می توان به ماهیت نانو حامل، ماهیت ماده‌ی زیست فعال، فرایند 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 کلوئیدی 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 چگالی بار سطحی آسان‌تر است، بنابراین بار ذرات معمولا بر اساس پتانسیل زتا گزارش می‌شود [۲۹].

بررسی اثرات ضدمیکروبی اسانس

حداقل غلظت کشندگی و حداقل غلظت بازدارندگی عصاره متانولی، اسانس و نانولیپوزوم حاوی اسانس نعناع فلفلی در برابر باکتریهای مورد آزمون در جدول ۳ آورده شده است

نتایج نشان می‌دهد که اسانس نعناع فلفلی در حالت آزاد و درون پوشانی شده فعالیت ضدمیکروبی قابل ملاحظه‌ای در برابر باکتری‌های مورد آزمایش نشان داد. در حالی که عصاره متانولی فقط بر روی باکترهای گرم مثبت تاثیر داشت. بر اساس نتایج حاصل شده می‌توان نتیجه‌گیری نمود که اسانس فعالیت ضدباکتریایی بیشتر و در مقایسه با عصاره متانولی دارد که این نتایج با نتایج عزیزخانی و همکاران مطابت داشت [۳۰]. بطور کلی ترکیبات فعال ضد میکروبی اسانس‌ها، ترپن‌ها نظیر اوژنول، تیمول و کارواکرول می‌باشند که ماهیت فنولی دارند. بویژه خاصیت ضد میکروبی اسانس گیاه نعناع که در محیط براث 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].

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

Sample \ Bacteria	*Escherichia coli*		*Bacillus cereus*		*Staphylococcus* aureus		*Candida albicans*	
	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/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

در حالت کلی تاثیر اسانس ها و عصاره‌ی گیاهان دارویی و ترکیبات آن ها بر روی باکتری های گرم مثبت، قدری بیشتر از تاثیر آن ها بر روی باکتری های گرم منفی است. به عبارت دیگر گرم مثبت‌ها، نسبت به اثر ضدمیکروبی اسانس‌ها حساسیت بیشتری نشان دادند [۳۳]. همچنین حداقل غاظت 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 می‌توانند 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 [۳٤]. نتایج چوی و همکاران (۲۰۱٦)، 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].

٤- نتیجه‌گیری

با افزایش روز افزون آگاهی مصرف کنندگان مواد غذایی نسبت به مضرات استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی و تقاضای رو به رشد مصرف غذاهای سالم، گرایش به استفاده از مواد دارای فعالیت ضد میکروبی با منشا طبیعی افزایش یافته است. اسانس-های گیاهی و ترکیبات آن‌ها به عنوان افزودنی‌های ضدباکتری و ضدقارچی یکی از این روش‌ها می‌باشد. نتایج این بررسی نشان داده است که نعناع فلفلی دارای ترکیباتی با ویژگی‌های ضدمیکربی و آنتی‌اکسیدانی است. با توجه به اینکه اسانس نعناع 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 نعناع فلفلی در حالت کپسوله شده در لیپوزوم بیشتر از حالت آزاد است.

٥- 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

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 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 Antimisiaris, 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

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 Technilogy & 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 D_3. Medical Journal of Tabriz 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 Researc, 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-

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

Gharenaghadeh, S. [1*], Forghani, S. [2], Gharehnaghadeh, 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, useing 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 piperitas* 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*s 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 evaluation 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 disable on gram-negative bacteria and fungi, also had poor inhibitory effect on the gram-positive bacteria. The antimicrobial effect of overlaped essential oil was more than free.

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

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