



ارزیابی فنول و فلاونوئید کل، قدرت آنتی‌اکسیدانی و اثر ضدقارچی اسانس نعناع سبز بر سویه‌های عامل فساد میوه توت‌فرنگی

مصطفی رحمتی جنیدآباد*^۱، بهروز علیزاده بهبهانی^۲، محمد نوشاد^۲

^۱گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
^۲گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۲۰

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی تعیین محتوای فنول و فلاونوئید کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و اثر ضدقارچی اسانس نعناع سبز بر سویه‌های قارچی عامل فساد میوه توت‌فرنگی (بوتریتیس سینه‌را، آسپرژیلوس نایجر و رازوپوس استولونیفر) در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. برای این هدف، ابتدا اسانس گیاه نعناع سبز توسط دستگاه کلونجر استخراج شد. اسانس نعناع سبز حاوی ۵۵/۱۵ mg GAE/g محتوای فنول کل و ۲۹/۲۵ mg QE/g فلاونوئید کل بود که نقش مهمی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدقارچی اسانس دارد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس، برحسب IC_{50} و مطابق روش‌های مهار رادیکال DPPH، مهار رادیکال ABTS و بتا-کاروتن/لینولئیک اسید، به ترتیب ۲۳/۳۵، ۱۹/۸۰ و ۲۷/۱۱ به دست آمد. نتایج آزمون‌های ضد میکروبی (دیسک دیفیوژن آگار، انتشار چاهک در آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی) نشان دادند که اسانس نعناع سبز دارای فعالیت ضدقارچی بالقوه بالایی است؛ به طوری که، آسپرژیلوس نایجر و بوتریتیس سینه‌را حساس‌ترین و مقاوم‌ترین سویه‌های قارچی نسبت به اسانس بودند. حداقل غلظت مهارکنندگی برای بوتریتیس سینه‌را برابر با ۵۰ mg/ml، برای رازوپوس استولونیفر برابر با ۲۵ mg/ml و برای آسپرژیلوس نایجر برابر با ۱۲/۵ mg/ml بود. مشخص شد که حداقل غلظت کشندگی برای بوتریتیس سینه‌را برابر با ۲۰۰ mg/ml و برای رازوپوس استولونیفر و آسپرژیلوس نایجر برابر با ۱۰۰ mg/ml بود. مطابق نتایج، اسانس نعناع سبز به عنوان عامل آنتی‌اکسیدان و ضد میکروب در مواد غذایی قابل استفاده است.

واژگان کلیدی: اثر ضدقارچی، اسانس، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، نعناع سبز.

* Rahmati@asnruk.ac.ir

مقدمه

نعناع سبز با نام علمی *Mentha spicata* یکی از مهمترین و مشهورترین گونه‌های نعناع است که تفاوت‌هایی از لحاظ ترکیب اسانس با دیگر گونه‌های نعناع دارد. به طوری که این گونه فاقد منتول بوده و ترکیب اصلی تشکیل دهنده آن کاروون^۵ است. گیاه نعناع سبز به طور گسترده‌ای در طب سنتی جهت هضم بهتر مواد غذایی، درمان سرماخوردگی و وبا، افزایش حرکات دستگاه گوارش و کاهش التهاب استفاده می‌شده است. همچنین، از نعناع سبز در تهیه انواع محصولات غذایی و آرایشی-بهداشتی استفاده می‌شود. علاوه بر این، گزارش شده است که اسانس نعناع سبز دارای فعالیت ضدباکتریایی، ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (۵ و ۶).

در این پژوهش، با توجه به پتانسیل ضد میکروبی اسانس نعناع سبز، تأثیر ضدقارچی آن بر قارچ‌های عامل فساد و پوسیدگی توت‌فرنگی در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. علاوه بر این، مقدار فنول و فلاونوئید کل و همچنین پتانسیل آنتی‌اکسیدانی اسانس نعناع سبز نیز بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و محیط‌های کشت میکروبی

بتا-کاروتن، لینولئیک اسید، معرف فولین-سیوکالتو، گالیک اسید، کوئرستین و رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS از شرکت سیگما (آمریکا) خریداری شدند. محیط‌های کشت میکروبی ساپروز دکستروز آگار و ساپروز دکستروز براث از شرکت مرک (آلمان) تهیه شدند. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش از درجه آزمایشگاهی برخوردار بودند.

سویه‌های میکروبی

سویه‌های میکروبی بوتریتیس سینه‌را^۶ (ATCC 28387)، آسپرژیلوس نایجر^۷ (PTCC 5010) و رایزوپوس استولونیزر^۸ (ATCC 14037) از آزمایشگاه میکروبیولوژی

توت‌فرنگی، با اینکه میوه‌ای نافرازگرا است، اما به‌عنوان یکی از فسادپذیرترین میوه‌ها با طول عمر انبارداری بسیار پایین شناخته می‌شود که این امر عمدتاً ناشی از فعالیت متابولیکی و تنفس نسبی بالا و حساسیت به فساد و پوسیدگی قارچی، بویژه کپک خاکستری پس از برداشت می‌باشد (۱). بنابراین، لازم است تیمارهایی جهت حفظ کیفیت و افزایش عمر انبارداری توت‌فرنگی مورد استفاده قرار گیرند. استفاده از سموم شیمیایی برای کاهش خسارات پس از برداشت ناشی از عوامل بیماری‌زای گیاهی اجتناب ناپذیر است؛ به طوری که بهترین راه کنترل بیماری‌های پس از برداشت توت‌فرنگی، استفاده از قارچ‌کش‌هایی مانند بنومیل^۱، تیابندازول^۲، اورتوفیل فئات^۳ و ایمازلیل^۴ است. با اینحال، کاربرد این سموم شیمیایی منجر به مسمومیت حاد یا مزمن از طریق خاصیت تجمعی در بدن یا خاصیت سرطان‌زایی در انسان می‌شود. علاوه بر این، استفاده زیاد از قارچ‌کش‌ها سبب افزایش مقاومت گونه‌های قارچی به قارچ‌کش‌ها می‌شود (۲). در این راستا، توجه ویژه به سلامتی و محیط‌زیست سبب افزایش انگیزه و تقاضا برای یافتن ترکیبات جایگزین سموم شیمیایی و استفاده از مواد نگهدارنده طبیعی با منشأ گیاهی شده است.

استفاده از اسانس‌های گیاهی به‌عنوان یکی از روش‌های سالم و بی‌خطر جهت کنترل بیماری‌های پس از برداشت میوه‌ها و سبزیجات شناخته می‌شود. این ترکیبات طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه با فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و زیست‌تنظیمی می‌باشند. اسانس‌های گیاهی دارای ترکیبات شیمیایی پیچیده‌ای از قبیل الکل‌ها، هیدروکربن‌ها، آلدئیدها و کتون‌ها هستند و اثر ضدقارچی آن‌ها در میوه توت‌فرنگی در پژوهش‌های مختلف به اثبات رسیده است (۳ و ۴).

^۵ Carvon^۶ *Botrytis cinerea*^۷ *Aspergillus niger*^۸ *Rhizopus stolonifer*^۱ Benomyl^۲ Tiabendazole^۳ o-phenylphenate^۴ Imazalil

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس نعناع سبز

فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

از روش داسیلوا راموس^۱ و همکاران (۱۱) با کمی اصلاحات جهت بررسی ظرفیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH اسانس نعناع سبز استفاده شد. ابتدا محلول متانولی رادیکال آزاد DPPH (۴۰ µg/ml) تهیه و سپس ۲/۷ ml از آن با ۳۰۰ µl اسانس یا متانول (کنترل) مخلوط شد. بعد از این مرحله، مخلوط به مدت ۳۰ min در مکان تاریک و در دمای محیط نگهداری و جذب آن (A) در طول موج ۵۱۷nm ثبت شد. فعالیت مهارکنندگی اسانس در برابر رادیکال آزاد DPPH مطابق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{رادیکال آزاد DPPH} = \frac{A_{\text{نمونه}} - A_{\text{کنترل}}}{A_{\text{کنترل}}} \times 100$$

رادیکال آزاد DPPH (%)

فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS

فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS اسانس نعناع سبز مطابق روش پادماکوماری^۲ و همکاران (۱۲) با کمی تغییرات بررسی شد. محلول کاتیون رادیکال ABTS^{•+} از طریق واکنش محلول استوک ۷ mM ABTS با محلول ۲/۴۵ mM پتاسیم پرسولفات تهیه شد و سپس قبل از استفاده به مدت ۶ h در دمای اتاق و تاریکی نگهداری شد. محلول ABTS^{•+} سپس تا رسیدن به جذب ۰/۷ در طول موج ۷۳۴ nm رقیق شد. در ادامه ۱۰۰ µl از اسانس یا کنترل (متانول) با ۸۰۰ µl محلول ABTS^{•+} مخلوط و جذب آن بعد از ۷ min گرمخانه‌گذاری قرائت شد. فعالیت مهارکنندگی اسانس نعناع سبز در برابر رادیکال آزاد ABTS بصورت زیر محاسبه شد:

$$\text{رادیکال آزاد ABTS} = \frac{A_{\text{نمونه}} - A_{\text{کنترل}}}{A_{\text{کنترل}}} \times 100$$

رادیکال ABTS (%)

روش رنگبری بتا-کاروتن/لینولئیک اسید

به‌طور خلاصه در این روش، ۲۰ µl از محلول بتا-کاروتن (۲۰ mg/ml در کلروفرم) به ۴۰ µl لینولئیک اسید، ۴۰۰ توئین ۴۰ و ۱ ml کلروفرم اضافه شد. سپس مخلوط

صنعتی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شدند.

جمع‌آوری گیاه نعناع سبز و استخراج اسانس آن

گیاه نعناع سبز از شهرستان اهواز (خوزستان، ایران) خریداری و بعد از تأیید نام علمی آن، عمل اسانس‌گیری توسط دستگاه کلونجر که بر پایه تقطیر با آب استوار است، انجام شد. ابتدا گیاه موردنظر آسیاب شد و سپس به‌منظور به‌دست آوردن ذرات با اندازه یکسان از الک عبور داده شد. در ادامه، ۵۰ g از پودر نعناع سبز به دستگاه کلونجر منتقل و ۷۵۰ ml آب مقطر به آن اضافه شد. عمل اسانس‌گیری بعد از ۳ h تکمیل شد. پس از استخراج، اسانس توسط سولفات سدیم بدون آب آبگیری شده و اسانس حاصله در ظروف تیره‌رنگ و در دمای ۴°C نگهداری شد (۷ و ۸).

تعیین محتوای فنول کل

در این روش به‌طور خلاصه، ۵۰۰ µl اسانس با ۲/۵ ml محلول فنول (۱۰٪) مخلوط و محلول به‌دست آمده به مدت ۱۰ min در مکان تاریک و در دمای اتاق نگهداری شد. سپس، ۲ ml از محلول کربنات سدیم (۷٪) اضافه شد و نمونه به مدت ۹۰ min نگهداری شد. جذب محلول در طول موج ۷۶۵ nm اندازه‌گیری و مقدار فنول کل اسانس با کمک منحنی استاندارد گالیک اسید محاسبه شد و برحسب میلی‌گرم گالیک اسید در گرم (mg GAE/g) اسانس گزارش شد (۹).

تعیین محتوای فلاونوئید کل

مقدار فلاونوئید کل اسانس نعناع سبز مطابق روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلرید اندازه‌گیری شد. برای این هدف، ۵۰۰ µl از اسانس با ۵۰۰ µl از محلول ۲٪ متانولی آلومینیوم کلرید مخلوط و محلول حاصله به مدت ۱۵ min در دمای اتاق نگهداری شد. مقدار فلاونوئید کل با استفاده از منحنی استاندارد کوئرستین (۰/۵ mg/ml) محاسبه و برحسب میلی‌گرم کوئرستین در گرم اسانس (mg QE/g) گزارش شد (۱۰).

² Padmakumari

¹ da Silva Ramos

چاهک توسط خط کش اندازه گیری و به عنوان فعالیت ضد میکروبی اسانس گزارش شد (۱۵).

حداقل غلظت مهارکنندگی^۱

از روش رقیق سازی در مایع مطابق روش عزیزاده بهبهانی و همکاران (۷) با کمی اصلاحات جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس استفاده شد. در این آزمون، غلظت های مختلف اسانس (با رقت های متوالی) به لوله های آزمایش ۱۰ ml حاوی سوسپانسیون میکروبی (در محیط کشت ساپروز دکستروز براث) منتقل شد. سپس لوله های آزمایش به مدت ۷۲ h در دمای ۲۷ °C گرمخانه گذاری شدند. بعد از ۷۲ h، ظاهر شدن کدورت در لوله آزمایش بیانگر رشد میکروبی می باشد. اولین غلظتی از اسانس که سبب جلوگیری از کدورت شد، به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی آن گزارش شد.

حداقل غلظت کشندگی^۲

جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی اسانس، از محتوای لوله آزمایشی (در آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی) که فاقد کدورت بود، بر پلیت حاوی محیط کشت ساپروز دکستروز آگار کشت داده شد. گرمخانه گذاری مطابق شرایط فوق انجام شد و اولین غلظتی از اسانس نعنای سبز که فاقد کلنی میکروبی بود به عنوان حداقل غلظت کشندگی آن در نظر گرفته شد (۱۶).

تجزیه و تحلیل آماری داده ها

از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ و آزمون واریانس یک طرفه جهت آنالیز داده های حاصل از این پژوهش استفاده شد. آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ برای مقایسه میانگین ها استفاده شد. لازم به ذکر است که آزمون ها حداقل در ۳ تکرار انجام شدند.

نتایج

فعالیت آنتی اکسیدانی، فنول و فلاونوئید کل

در دمای ۴۵ °C به مدت ۵ min و به منظور حذف کلروفرم، تبخیر و بلافاصله با ۱۰۰ ml آب مقطر رقیق شد. آب مقطر به آرامی به مخلوط اضافه شد و سپس مخلوط جهت تهیه امولسیون همزده شد. در ادامه، ۲/۵ ml از امولسیون به لوله آزمایش حاوی ۳۵۰ µl اسانس نعنای سبز منتقل شد. لوله آزمایش در دمای ۵۰ °C به مدت ۲ h حرارت داده شد و سپس جذب محلول (A) هر ۳۰ min یکبار در طول موج nm ۴۷۰ و در برابر شاهد (امولسیون فاقد بتا-کاروتن) ثبت شد. فعالیت آنتی اکسیدانی بصورت درصد بازداری اکسایش بتا-کاروتن و بصورت زیر اندازه گیری شد (۱۳):

$$100 \times \frac{A - A_{\text{شاهد}}}{A_{\text{شاهد}}} = \text{درصد بازداری (\%)}$$

بررسی فعالیت ضدقارچی اسانس نعنای سبز

دیسک دیفیوژن آگار

جهت بررسی فعالیت ضد میکروبی اسانس در برابر سویه های قارچی مولد فساد و پوسیدگی توت فرنگی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن آگار، ابتدا دیسک کاغذی بلانک (قطر ۶/۲ mm) با اسانس نعنای سبز (۲۰ µl) استریل آغشته شد و سپس به روی سطح محیط کشت ساپروز دکستروز آگار حاوی سویه های قارچی منتقل شد. پتری دیش (حاوی سویه قارچی و اسانس) در دمای ۲۷ °C به مدت ۷۲ h گرمخانه گذاری شد و قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک توسط خط کش اندازه گیری و به عنوان فعالیت ضد میکروبی اسانس ثبت شد (۱۴).

انتشار چاهک در آگار

این روش ضد میکروبی دارای اصول مشابهی با روش دیسک دیفیوژن آگار می باشد. بدین صورت که ابتدا چاهک هایی سطحی و با قطر مشابه در محیط کشت ساپروز دکستروز آگار ایجاد و سپس سویه های قارچی روی محیط کشت داده شدند. در ادامه، ۲۰ µl اسانس استریل در هر یک از چاهک ها ریخته شد و محیط کشت به مدت ۷۲ h در دمای ۲۷ °C گرمخانه گذاری شد. هاله عدم رشد اطراف

² Minimum Fungicidal Concentration

¹ Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

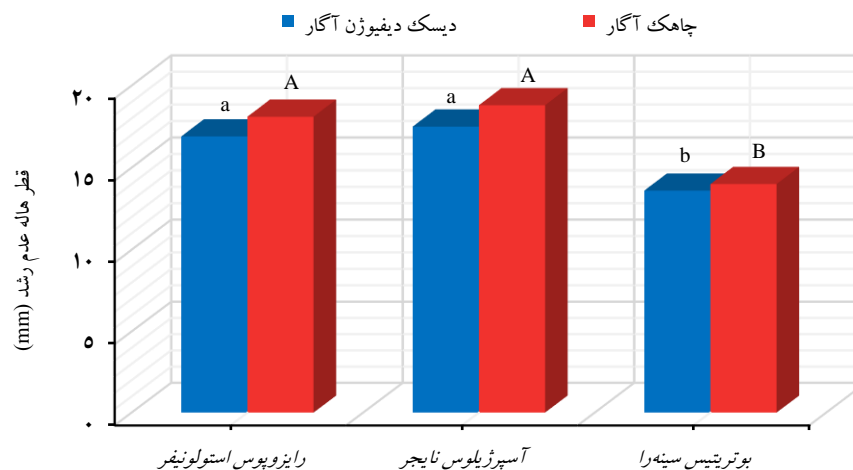
رادیکال آزاد ABTS و رنگبری بتا-کاروتن / لینولئیک اسید اندازه‌گیری شد (جدول ۱). نتایج حاصل برای فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH برابر با $23/35 \mu\text{g/ml}$ ، برای فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS برابر با $19/80 \mu\text{g/ml}$ و برای رنگبری بتا-کاروتن / لینولئیک اسید برابر با $27/11 \mu\text{g/ml}$ بود که فعالیت آنتی‌اکسیدانی مناسب اسانس نعناع سبز را بازگو می‌کند.

میزان فنول کل اسانس با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید محاسبه شد که بر این اساس میزان فنول کل $55/15 \text{ GAE/g}$ به دست آمد. همچنین، میزان فلاونوئید موجود در اسانس نعناع سبز بر حسب میلی‌گرم کوئرستین در گرم اسانس ($29/25 \text{ mg QE/g}$) بود (جدول ۱).
فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس نعناع سبز بر اساس IC_{50} روش‌های فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، فعالیت مهار

جدول ۱. محتوای فنول کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس نعناع سبز

فنول کل (mg GAE/g)	فلاونوئید کل (mg QE/g)	فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر حسب IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	
		مهار رادیکال DPPH	مهار رادیکال ABTS
$55/15 \pm 0/37$	$29/25 \pm 0/30$	$23/35 \pm 0/29$	$19/80 \pm 0/18$

نتایج به صورت "انحراف معیار \pm میانگین" سه تکرار ($n=3$) گزارش شده‌اند.



شکل ۱. میانگین قطر هاله عدم رشد (mm) اسانس نعناع سبز بر سویه‌های عامل فساد میوه توت‌فرنگی به روش‌های دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار بر حسب mm (حروف غیر مشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰.۰۵٪ می‌باشد).

جدول ۲. تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی اسانس نعناع سبز بر سویه‌های عامل فساد میوه توت‌فرنگی

فانگس	حداقل غلظت مهارکنندگی (mg/ml)	حداقل غلظت کشندگی (mg/ml)
رایزوپوس استولونیفیر	۲۵	۱۰۰
آسپرژیلوس نایجر	۱۲/۵	۱۰۰
بوتریتیس سینه‌را	۵۰	۲۰۰

فعالیت ضدقارچی

در بررسی اثر ضدقارچی اسانس نعناع سبز با استفاده از روش دیسک دیفیوژن آگار آسپرژیلوس نایجر با بیشترین قطر هاله عدم رشد، کمترین میزان مقاومت و بوتریتیس سینه را با کمترین قطر هاله عدم رشد، بیشترین میزان مقاومت را در برابر اسانس نشان دادند (شکل ۱). همچنین، در روش انتشار چاهک در آگار کمترین و بیشترین میزان مقاومت به ترتیب در آسپرژیلوس نایجر و بوتریتیس سینه را مشاهده شد. نتایج حاصل از حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس در جدول ۲ نشان داده است. حداقل غلظت مهارکنندگی برای بوتریتیس سینه را برابر با ۵۰ mg/ml، برای ریزوپوس استولونیفر برابر با ۲۵ mg/ml و برای آسپرژیلوس نایجر برابر با ۱۲/۵ mg/ml بود. همچنین مشخص شد که حداقل غلظت کشندگی برای بوتریتیس سینه را برابر با ۲۰۰ mg/ml و برای ریزوپوس استولونیفر و آسپرژیلوس نایجر برابر با ۱۰۰ mg/ml بود.

بحث

آنتی اکسیدانها نقش اساسی در درمان بیماریها دارند. فلاونوئیدها و ترکیبات فنولی منابع طبیعی آنتی اکسیدانی موجود در گیاهان می باشند (۱۷ و ۱۸). کاتچین، اپی کاتچین، روتین، میریستین، لوتین، آپیزنین و نارنجین از مهمترین ترکیبات فلاونوئیدی و اریوسیتین، لوتولین، رزماریک اسید و کافیک اسید از مهمترین ترکیبات فنولی موجود در گیاه نعناع سبز می باشند (۱۷ و ۱۹). سابا^۱ و همکاران (۲۰۱۸) میزان فنول و فلاونوئید کل موجود در اسانس گیاه نعناع سبز مناطق مختلف آب و هوایی را به ترتیب ۳۸/۱۹ mg GAE/g - ۳۱/۲۱ و ۱۴/۸۸ mg QE/g - ۸/۷۶ گزارش کردند (۲۰). در حالیکه در پژوهش دیفی^۲ و همکاران (۲۰۱۳) میزان فنول اسانس این گیاه ۳۸/۴ mg QE/g گزارش شده است (۱۹). تفاوت در میزان فنول و فلاونوئید در این مطالعه با سایر پژوهشهای انجام شده به شرایط آب و هوایی و

جغرافیایی محل رشد گیاه مثل میزان آب، نوع خاک و ارتفاع محیط و همچنین روشهای مختلف اندازه گیری این دو ترکیب وابسته می باشد (۲۱).

از آنجایی که ترکیبات فنولی نقش اساسی در فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهان معطر ایفا می کنند (۲۲)، بنابراین فعالیت آنتی اکسیدانی بالای اسانس گیاه نعناع سبز به میزان بالای فنول و فلاونوئید موجود در اسانس نسبت داده می شود. در روش مهار رادیکال آزاد DPPH، توانایی اسانس در تبدیل رادیکال آزاد DPPH به فرم احیا شده آن یعنی DPPH-H بررسی می شود (۲۰). اسانس گونه های مختلف نعناع منابع بالقوه ای از مهارکننده های رادیکال آزاد DPPH می باشند. به عنوان مثال گولاس^۳ و همکاران (۲۰۰۷) بیان کردند که اسانس *M. longifolia* فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH خوبی را نشان می دهد (۲۳). دورمان^۴ و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که در گونه های مختلف نعناع مانند نعناع فلفلی، دالماتیکاه و نعناع سبز قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH متفاوت بوده و نعناع فلفلی دارای بیشترین میزان فعالیت و پس از آن دالماتیکا و نعناع سبز قرار دارند (۲۴). ترکیبات فنولی موجود در گیاه نعناع سبز از توانایی بالایی در اهدا هیدروژن برخوردار بوده و خواص ساختاری ایده آل آنها برای اصلاح فعالیت رادیکالهای آزاد، این ترکیبات را به آنتی اکسیدانهای خوبی تبدیل کرده است (۲۵).

آزمون مهار رادیکال ABTS بر پایه اکسیداسیون مستقیم ABTS توسط پتاسیم پرسولفات و تولید رادیکال کاتیونی پایدار ABTS می باشد. رنگ آبی-سبز محلول رادیکال کاتیونی در حضور آنتی اکسیدانها کاهش یافته و این کاهش (احیاء شدن) در طول موج ۷۳۴ nm اندازه گیری می شود. ترکیبات آنتی اکسیدانی با احیای مستقیم رادیکالهای ABTS از طریق انتقال الکترون و خنثی سازی رادیکال با انتقال اتم هیدروژن قادر به مهار رادیکالهای ABTS می باشند (۲۶). قدرت بالای مهار رادیکال ABTS

⁴ Dorman

⁵ Dalmatica

¹ Saba

² Dhifi

³ Gulluce

و لیمون نسبت داده‌اند (۳۲). فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای اسانس نعناع سبز ناشی از قابلیت اهداء الکترون یا اتم هیدروژن ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی آن می‌باشد؛ اگرچه، غلظت این ترکیبات و همچنین شرایط استخراج اسانس در فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن موثر می‌باشند.

اثر ضد میکروبی اسانس نعناع سبز و سایر گونه‌های نعناع در پژوهش‌های مختلف بررسی شده است (۵ و ۶). به عنوان مثال، هادیان^۵ و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که برخی از اسانس‌های گیاهان دارویی از جمله نعناع فلفلی دارای اثر ضدقارچی بر قارچ‌های آلوده کننده توت‌فرنگی از جمله بوتریتیس سینه‌را، اسپرژیلوس نایجر و رایزوپوس می‌باشند (۳۳). همچنین اثر ضدقارچی اسانس‌های گیاه نعناع ذرتی (وحشی) و زنجبیل گزارش شده است (۳۴). در پژوهشی دیگر اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی اسانس گیاهان نعناع، پونه و *Mentha viridis* بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و قارچ‌هایی مانند موکور *Ramania nos* و *آسپرژیلوس اوکراسئوس* بررسی و قطر هاله‌های ایجاد شده توسط این اسانس‌ها برای موکور *Ramania nos* ۳۵-۴۰ mm و برای *آسپرژیلوس اوکراسئوس* ۳۲ - ۴۳ mm گزارش شده است. اثر ضد قارچی اسانس‌ها ممکن است به دلیل هم‌افزایی بین اجزای آن‌ها باشد. بنابراین، احتمال ایجاد نژادهای مقاوم قارچ پس از استفاده از اسانس‌ها در میوه و سبزیجات ناچیز خواهد بود (۳۵). فعالیت ضدقارچی بالای اسانس نعناع سبز می‌تواند ناشی از ترکیبات فرار ضدقارچی و بخارات آن باشد که منجر به کاهش جوانه‌زنی کنیدی و در نهایت مرگ قارچ می‌شوند (۳۶). همچنین، ترکیبات فنولی موجود در اسانس‌های گیاهی قادر به ایجاد صدمات شدید به غشای میکروارگانیسم از طریق اختلالات مستقیم و متابولیکی می‌باشند. تغییر عملکرد طبیعی میتوکندری، ممانعت از سنتز ATP در میتوکندری و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن در سلول نیز به عنوان مکانیسم‌های ضدقارچی اسانس‌ها گزارش شده‌اند که در نهایت منجر به آپوپتوزیس^۶ سلول می‌شوند

توسط انواع گونه‌های نعناع از جمله نعناع سبز در این پژوهش نشان از فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیب می‌باشد. یانگ^۱ و همکاران (۲۰۱۰)، ترکیبات شیمیایی اسانس گیاهان مختلف از جمله نعناع فلفلی، اکلیل کوهی (رزماری) و گریپ‌فروت را شناسایی و فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS هر یک از آن‌ها را بررسی کردند. بالاترین میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS در نعناع فلفلی (۱/۶٪) مشاهده شد (۲۷). خادم^۲ و همکاران (۲۰۰۹) تفاوت در میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS اسانس گونه‌های مختلف نعناع را به دلیل مقادیر مختلف ترکیبات فنولی موجود در هر یک از این گونه‌ها گزارش کرده‌اند (۲۸).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس نعناع سبز با روش رنگبری بتا-کاروتن نیز اندازه‌گیری شد. رنگبری بتا-کاروتن بر اساس از بین رفتن رنگ زرد بتا-کاروتن در نتیجه واکنش با رادیکال‌های تولیدی در اثر اکسیداسیون لینولئیک اسید می‌باشد (۲۹). پراکسیدهای تولیدی Fe^{+2} را به Fe^{+3} اکسید می‌کند. سپس، Fe^{+3} با SCN^{-} تشکیل کمپلکس می‌دهد و غلظت آن از طریق جذب اندازه‌گیری می‌شود. جذب بالا نشان دهنده تولید مقادیر زیادی پراکسید و جذب پایین نشان از تولید آنتی‌اکسیدان‌ها در طول واکنش می‌باشد (۳۰). فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای اسانس و عصاره گیاه نعناع سبز در مطالعات مختلف گزارش شده است (۳۰). در مطالعه ماتا^۳ و همکاران (۲۰۰۹) فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس گیاه نعناع سبز کمتر از گیاه رزماری و بیشتر از گیاه نعناع پونه گزارش شده است (۳۱). اسنوزی و همکاران (۲۰۱۵) فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس نعناع سبز را به روش‌های مختلفی اندازه‌گیری و میزان رنگبری بتا-کاروتن را $6/4 \mu g/ml$ گزارش کردند (۶). مارتینز^۴ و همکاران (۲۰۱۲) ترکیبات شیمیایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس گونه‌های مختلف نعناع را بررسی کردند و میزان رنگبری بتا-کاروتن را $14/9$ ٪ گزارش کردند. آن‌ها میزان بالای فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس را به وجود ترکیبات فنولی و ترکیباتی مانند کاروون

⁴ Martins

⁵ Hadian

⁶ Apoptosis

¹ Yang

² Mkaddem

³ Mata

۲. علیزاده ح، فرزانه م، اعظمی ذ. تأثیر نانو امولسیون اسانس دارچین در کاهش پوسیدگی های پس از برداشت میوه توت فرنگی. کنترل بیولوژیک آفات و بیماری های گیاهی. ۱۳۹۴؛ ۴(۱): ۵۷-۶۴.

۳. رستگار س، طهماسبی س. استفاده از اسانس گل راعی، مورخوش و سالویا در جلوگیری از رشد قارچ بوتریتیس سینر در دو رقم میوه توت فرنگی. نشریه ی نوآوری در علوم و فناوری غذایی. ۱۳۹۷؛ ۱۰(۳): ۸۳-۹۴.

۴. بهداد م، اعتمادی ن، بهداد ا، زینلی ح. بررسی اثر ضدقارچی اسانس چند گیاه دارویی در کنترل قارچ *Rhizopus stolonifer* عامل پوسیدگی نرم روی میوه توت فرنگی. فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. ۱۳۹۲؛ ۲۹(۲): ۳۹۹-۴۱۱.

۵. زارع بیدکی م، عرب م، خزاعی م، افکار ا. ۱۳۹۳. اثر ضدباکتریایی اسانس نعنای سبز (*Mentha spicata* L.) بر هشت گونه باکتری بیماریزای مهم دستگاه گوارش. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۳۹۳؛ ۲۱(۳): ۲۷۴-۲۸۲.

6. Snoussi M, Noumi E, Trabelsi N, Flamini G, Papetti A, and De Feo V. *Mentha spicata* essential oil: chemical composition, antioxidant and antibacterial activities against planktonic and biofilm cultures of *Vibrio* spp. strains. *Molecules*, 2015; 20(8): 14402-14424.

۷. علیزاده بهبهانی ب، نوشاد م، فلاح ف. بررسی فعالیت ضد میکروبی اسانس رازیانه بر تعدادی از ریزاندامگان عامل عفونت و مسمومیت غذایی و برهمکنش آن با آنتیبیوتیک کانامایسین. علوم و صنایع غذایی. ۱۳۹۸؛ ۹۱(۱۶): ۲۳۳-۲۴۱.

8. Behbahani BA, Yazdi FT, Shahidi F, Mortazavi SA, and Mohebbi M. Principle component analysis (PCA) for investigation of relationship between population dynamics of microbial pathogenesis, chemical and sensory characteristics in beef slices containing Tarragon essential oil. *Microbial pathogenesis*. 2017; 105: 37-50.

۹. علیزاده بهبهانی ب، فلاح ف، وسیعی ع، طباطبایی یزدی ف، مرتضوی ع. اثر ضد میکروبی اسانس بهار نارنج بر تعدادی از ریزاندامگان بیماریزا با منشاء غذایی و تعیین ترکیبات شیمیایی، فنل کل، فلاونوئید و پتانسیل

(۳۷). علاوه براین، گزارش شده است که اسانس های گیاهی اثر ضدقارچی خود را به طور مستقیم از طریق جذب بخار اسانس و یا به طور غیر مستقیم از طریق محیط کشتی که اسانس را جذب کرده است، نشان می دهند. با توجه به اینکه قارچ ها عمدتاً در سطح محیط کشت رشد می کنند، بنابراین نسبت به اثر مستقیم اسانس های گیاهی حساس تر می باشند (۱۴).

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که اسانس نعنای سبز دارای محتوای فنول و فلاونوئید کل و متعاقباً فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی است. علاوه براین، رشد سویه های مولد فساد و پوسیدگی میوه توت فرنگی به طور معنی داری تحت تأثیر اسانس نعنای سبز قرار گرفت و آسپرژیلوس نایجر حساس ترین و بوتریتیس سینه را مقاوم ترین سویه ها نسبت به اسانس بودند. فعالیت آنتی اکسیدانی و ضدقارچی اسانس نعنای سبز بدلیل حضور ترکیبات زیست فعال مختلف در آن می باشد. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، می توان اسانس نعنای سبز را به عنوان ترکیب آنتی اکسیدان طبیعی جهت کنترل واکنش اکسیداسیون و به عنوان ترکیب ضد میکروب برای کنترل رشد قارچ های مولد فساد بسیاری از محصولات غذایی مورد استفاده قرار داد.

تقدیر و تشکر

مقاله حاضر مستخرج از طرح پژوهشی با کد ۹۹۱/۱۱ می باشد، لذا نویسندگان مقاله بر خود لازم می دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

۱. نوروزی فاز ف، میردهقان س، کریمی ح، علایی ح. تأثیر اسانس های تیمول و منتول به همراه بسته بندی با پوشش سلوفان در حفظ کیفیت پس از برداشت میوه توت فرنگی رقم پاروس. علوم باغبانی ایران. ۱۳۹۵؛ ۷۴(۱): ۸۱-۹۱.

spicata and *Phytolacca americana*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2007; 10(4): 637-640.

19. Dhifi W, Jelali N, Mnif W, Litaïem M, and Hamdi N. Chemical composition of the essential oil of *Mentha spicata* L. from Tunisia and its biological activities. *Journal of Food Biochemistry*. 2013; 37(3): 362-8.

20. Saba I, and Anwar F. Effect of Harvesting Regions on Physico-chemical and Biological Attributes of Supercritical Fluid-Extracted Spearmint (*Mentha spicata* L.) Leaves Essential Oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2018; 21(2): 400-419.

21. Barzegar H, Behbahani BA, and Mehrnia MA. Quality retention and shelf life extension of fresh beef using *Lepidium sativum* seed mucilage-based edible coating containing *Heracleum lasiopetalum* essential oil: an experimental and modeling study. *Food Science and Biotechnology*. 2020; 29: 717-728.

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

23. Gulluce M, Sahin F, Sokmen MU, Ozer H, Daferera D, Sokmen AT, Polissiou M, Adiguzel A, and Ozkan H. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food chemistry*. 2007; 103(4): 1449-1456.

24. Dorman HD, Koşar M, Kahlos K, Holm Y, and Hiltunen R. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2003; 51(16): 4563-4569.

25. Kanatt SR, Chander R, and Sharma A. Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. *Food Chemistry*. 2007; 100(2): 451-458.

26. Nooshkam M, Varidi M, and Bashash M. The Maillard reaction products as food-born antioxidant and antibrowning agents in model and real food systems. *Food chemistry*. 2019; 275: 644-60.

27. Yang SA, Jeon SK, Lee EJ, Shim CH, and Lee IS. Comparative study of the chemical composition and antioxidant activity of six essential oils and their components. *Natural Product Research*. 2010; 24(2): 140-151.

28. Mkaddem M, Bouajila J, Ennajar M, Lebrihi A, Mathieu F, and Romdhane M. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of *Mentha* (*longifolia* L. and *viridis*) essential oils. *Journal of food science*. 2009; 74(7): M358-363.

29. Shahsavari N, Barzegar M, Sahari MA, and Naghdibadi H. Antioxidant activity and chemical characterization of essential oil of *Bunium*

آنتی‌اکسیدانی آن. *علوم و صنایع غذایی*. ۱۳۹۸؛ ۱۶(۱۶): ۲۷۵-۲۸۸.

10. Moosavy MH, Hassanzadeh P, Mohammadzadeh E, Mahmoudi R, Khatibi SA, and Mardani K. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Lemon (*Citrus limon*) peel in vitro and in a food model. *Journal of food quality and hazards control*. 2017; 4(2): 42-48.

11. da Silva Ramos R, Rodrigues ABL, Farias ALF, Simões RC, Pinheiro MT, Ferreira R, et al. Chemical composition and in vitro antioxidant, cytotoxic, antimicrobial, and larvicidal activities of the essential oil of *Mentha piperita* L. (Lamiaceae). *The Scientific World Journal*. 2017; 4927214.

12. Padmakumari KP, Sasidharan I, and Sreekumar MM. Composition and antioxidant activity of essential oil of pimento (*Pimenta dioica* (L) Merr.) from Jamaica. *Natural product research*. 2011; 25(2): 152-160.

13. Lee WC, Mahmud R, Pillai S, Perumal S, and Ismail S. Antioxidant activities of essential oil of *Psidium guajava* L. leaves. *APCBEE Procedia*. 2012; 2: 86-91.

14. Behbahani BA, Shahidi F, Yazdi FT, Mortazavi SA, and Mohebbi M. Use of *Plantago major* seed mucilage as a novel edible coating incorporated with *Anethum graveolens* essential oil on shelf life extension of beef in refrigerated storage. *International journal of biological macromolecules*. 2017; 94: 515-526.

۱۵. طباطبایی یزدی ف، علیزاده بهبهانی ب، وسیعی ع، روشنگر س، مرتضوی ع. تولید پوشش خوراکی ضد میکروبی بر پایه موسیلاژ دانه بارهنگ کبیر در ترکیب با اسانس گلپر: بررسی ویژگیها و کاربرد آن در گوشت گاو نگهداری شده در دمای یخچال. فصلنامه میکروبیولوژی کاربردی در صنایع غذایی. ۱۳۹۷؛ ۳(۳): ۱-۲۱.

16. Alizadeh Behbahani B, and Imani Fooladi AA. Development of a novel edible coating made by Balangu seed mucilage and Feverfew essential oil and investigation of its effect on the shelf life of beef slices during refrigerated storage through intelligent modeling. *Journal of food safety*. 2018; 38(3): e12443.

17. Scherer R, Lemos MF, Lemos MF, Martinelli GC, Martins JD, and da Silva AG. Antioxidant and antibacterial activities and composition of Brazilian spearmint (*Mentha spicata* L.). *Industrial crops and products*. 2013; 50: 408-413.

18. Hosseinimehr SJ, Pourmorad F, Shahabimajd N, Shahrbandy K, and Hosseinzadeh R. In vitro antioxidant activity of *Polygonum hyrcanicum*, *Centaurea depressa*, *Sambucus ebulus*, *Mentha*

- persicum. *Plant foods for human nutrition*. 2008; 63(4): 183-188.
30. Hussain AI, Anwar F, Shahid M, Ashraf M, and Przybylski R. Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of spearmint (*Mentha spicata* L.) from Pakistan. *Journal of Essential Oil Research*. 2010; 22(1): 78-84.
31. Mata AT, Proença C, Ferreira AR, Serralheiro ML, Nogueira JM, and Araújo ME. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food chemistry*. 2007; 103(3): 778-786.
32. Martins MR, Tinoco MT, Almeida AS, and Cruz-Morais J. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of three essential oils from Portuguese flora. 2012; 3(1): 39-44.
33. Hadian J, Ghasemnezhad M, Ranjbar H, Frazane M, and Ghorbanpour M. Antifungal potency of some essential oils in control of postharvest decay of strawberry caused by *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2008; 11(5): 553-562.
34. Tripathi P. *Evaluation of some plant products against fungi causing postharvest diseases of some fruits* (Doctoral dissertation, Ph. D. thesis, Department of Botany, Banaras Hindu University). 2001.
35. Tripathi P, and Dubey NK. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest biology and Technology*. 2004; 32(3): 235-245.
36. Reddy MB, Angers P, Gosselin A, and Arul J. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. *Phytochemistry*. 1998; 47(8): 1515-1520.
37. Farzaneh M, Kiani H, Sharifi R, Reisi M, and Hadian J. Chemical composition and antifungal effects of three species of *Satureja* (*S. hortensis*, *S. spicigera*, and *S. khuzistanica*) essential oils on the main pathogens of strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 2015; 109: 145-151.

Evaluation of total phenols and flavonoids, antioxidant power, and antifungal effect of *Mentha spicata* essential oil against species causing strawberry's rot

Mostafa Rahmati-Joneidabad^{1*}, Behrooz Alizadeh Behbahani², Mohammad Noshad²

¹ Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

² Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

Abstract

This study was aimed to investigate the total phenols and flavonoids content, antioxidant activity, and antifungal effect of *Mentha spicata* essential oil on fungi species causing strawberry's rot (*Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, and *Rhizopus stolonifer*). For these purposes, the essential oil of *M. spicata* was firstly extracted by the Clevenger apparatus. The *M. spicata* essential oil contained 55.15 mg GAE/g total phenols and 29.25 mg QE/g total flavonoids, which show an important role in its antioxidant and antifungal activities. The antioxidant activity (IC₅₀) of the essential oil was found to be 23.35, 19.80, and 27.11 µg/ml, respectively, based on the DPPH radical scavenging, ABTS radical scavenging, and beta-carotene/linoleic acid assays. The antimicrobial tests (disk diffusion agar, well diffusion agar, minimum inhibitory concentration, and minimum fungicidal concentration) showed that the essential oil of *M. spicata* had a potentially high antifungal activity; *Aspergillus niger* and *Botrytis cinerea* were the most sensitive and resistant fungi species to the essential oil. The minimum inhibitory concentration for *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, and *Rhizopus stolonifer* was 12.5, 50 and 25 mg/mL, respectively. The minimum fungicidal concentration for *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, and *Rhizopus stolonifer* was 100, 200 and 100 mg/mL, respectively. Based on the results, the *M. spicata* essential oil can be used as an antioxidant and antimicrobial agent in food products.

Keywords: Antifungal effect, Essential oil, Antioxidant activity, *Mentha spicata*.

* Rahmati@asnruk.ac.ir