



ارزیابی فنول و فلاونوئید کل، قدرت آنتی اکسیدانی و اثر ضدقارچی اسانس نعناع سبز بر سویه های عامل فساد میوه توت فرنگی

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 آنتی اکسیدانی و اثر ضدقارچی اسانس نعناع سبز بر سویه های قارچی عامل فساد میوه توت فرنگی (بوتریتیس سینه‌را، آسپرژیلوس نایجر و رایزوپوس 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 آنتی اکسیدانی و ضدقارچی اسانس دارد. فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس، برحسب IC₅₀ و مطابق روش های مهار رادیکال DPPH، مهار رادیکال ABTS و بتا-کاروتن/لینولئیک اسید، به ترتیب ۲۳/۳۵، ۱۹/۸۰ و ۲۷/۱۱ به دست آمد. نتایج آزمون های 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 حساس ترین و مقاوم ترین سویه های قارچی نسبت به اسانس بودند. حداقل غلظت مهارکنندگی برای بوتریتیس سینه‌را برابر با ۵۰ mg/ml، برای رایزوپوس 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 رایزوپوس استولونیفر و آسپرژیلوس نایجر برابر با ۱۰۰ mg/ml بود. مطابق نتایج، اسانس نعناع سبز به عنوان عامل آنتی اکسیدان و ضد میکروب در مواد غذایی قابل استفاده است.

واژگان کلیدی: اثر ضدقارچی، اسانس، فعالیت آنتی اکسیدانی، نعناع سبز.

* Rahmati@asnrukh.ac.ir

مقدمه

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 اجتناب‌ناپذیر است؛ به‌طوری‌که بهترین راه کنترل بیماری‌های پس از برداشت توت‌فرنگی، استفاده از قارچ‌کش‌هایی مانند بنومیل^۱، تیابندازول^۲، اورتوفیل فئات^۳ و ایمازالیل^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 زیست تنظیمی 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).

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. به‌طوری‌که این گونه فاقد منتول بوده و ترکیب اصلی تشکیل دهنده آن کاروون^۵ است. گیاه نعناع سبز به‌طور 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 سابروز دکستروز آگار و سابروز 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 ریزوپوس استولونیزفر^۸ (ATCC 14037) از آزمایشگاه میکروبیولوژی

^۵ Carvon

^۶ *Botrytis cinerea*

^۷ *Aspergillus niger*

^۸ *Rhizopus stolonifer*

^۱ Benomyl

^۲ Tiabendazole

^۳ o-phenylphenate

^۴ Imazalil

بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس نعنای 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 نعنای 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:

$$100 \times \left[\frac{A_{\text{کنترل}} - A_{\text{نمونه}}}{A_{\text{کنترل}}} \right] = \text{فعالیت مهارکنندگی}$$

رادیکال آزاد DPPH (%)

فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS

فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS اسانس نعنای سبز مطابق روش پادماکوماری^۲ و همکاران (۱۲) با کمی تغییرات بررسی شد. محلول کاتیون رادیکال ABTS^{•+} (ABTS ۷ mM استوک محلول استوک 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 گرمخانه گذاری قرائت شد. فعالیت مهارکنندگی اسانس نعنای سبز در برابر رادیکال آزاد ABTS بصورت زیر محاسبه شد:

$$100 \times \left[\frac{A_{\text{کنترل}} - A_{\text{نمونه}}}{A_{\text{کنترل}}} \right] = \text{فعالیت مهارکنندگی}$$

رادیکال ABTS (%)

روش رنگبری بتا-کاروتن/لینولئیک اسید

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

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

جمع آوری گیاه نعنای سبز و استخراج اسانس آن

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

تعیین محتوای فنول کل

در این روش به طور خلاصه، ۵۰۰ µl اسانس با ۲/۵ ml محلول فنول (۱۰٪) مخلوط و محلول به دست 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 اندازه گیری و مقدار فنول کل اسانس با کمک منحنی استاندارد گالیک اسید محاسبه شد و برحسب میلی گرم گالیک اسید در گرم (mg GAE/g) اسانس گزارش شد (۹).

تعیین محتوای فلاونوئید کل

مقدار فلاونوئید کل اسانس نعنای سبز مطابق روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید اندازه گیری 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 - ۰) محاسبه و برحسب میلی گرم 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 ۴۷۰ nm 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):

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

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)

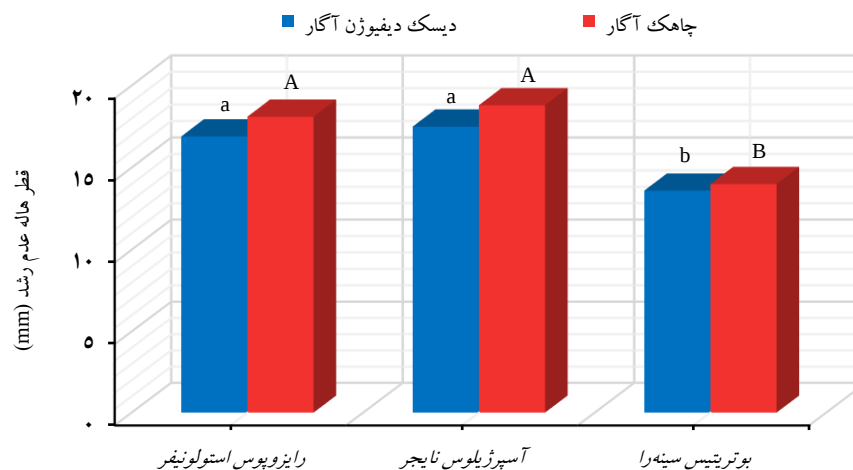
رادیکال آزاد ABTS و رنگبری بتا-کاروتن/لینولئیک اسید اندازه‌گیری شد (جدول ۱). نتایج حاصل برای فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH برابر با $23/35 \mu\text{g/ml}$ ، برای فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS برابر با $19/80 \mu\text{g/ml}$ و برای رنگبری بتا-کاروتن/لینولئیک اسید برابر با $27/11 \mu\text{g/ml}$ بود که فعالیت آنتی اکسیدانی 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 میلی گرم کوئرستین در گرم اسانس ($29/25 \text{ mg QE/g}$) بود (جدول ۱).
فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس نعناع سبز بر اساس IC_{50} روش‌های فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، فعالیت مهار

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

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

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

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

فعالیت ضدقارچی

در بررسی اثر ضدقارچی اسانس نعنای سبز با استفاده از روش دیسک دیفیوژن آگار آسپریلوس نایجر با بیشترین قطر هاله عدم رشد، کمترین میزان مقاومت و بوتریتیس سینه‌را 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 آسپریلوس نایجر و بوتریتیس سینه‌را مشاهده شد. نتایج حاصل از حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس در جدول ۲ نشان داده است. حداقل غلظت مهارکنندگی برای بوتریتیس سینه‌را برابر با ۵۰ mg/ml، برای رازیوپوس استولونیفر برابر با ۲۵ mg/ml و برای آسپریلوس نایجر برابر با ۱۲/۵ mg/ml بود. همچنین مشخص شد که حداقل غلظت کشندگی برای بوتریتیس سینه‌را برابر با ۲۰۰ mg/ml و برای رازیوپوس استولونیفر و آسپریلوس نایجر برابر با ۱۰۰ mg/ml بود.

بحث

آنتی‌اکسیدان‌ها نقش اساسی در درمان بیماری‌ها دارند. فلاونوئیدها و ترکیبات فنولی منابع طبیعی آنتی‌اکسیدانی موجود در گیاهان می‌باشند (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 نعنای سبز می‌باشند (۱۷ و ۱۹). سابا^۱ و همکاران (۲۰۱۸) میزان فنول و فلاونوئید کل موجود در اسانس گیاه نعنای 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 mg GAE/g و ۱۰/۳۸ و میزان فلاونوئید آن 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 اندازه‌گیری این دو ترکیب وابسته می‌باشد (۲۱).

از آنجایی که ترکیبات فنولی نقش اساسی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان معطر ایفا می‌کنند (۲۲)، بنابراین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای اسانس گیاه نعنای سبز به میزان بالای فنول و فلاونوئید موجود در اسانس نسبت داده می‌شود. در روش مهار رادیکال آزاد DPPH، توانایی اسانس در تبدیل رادیکال آزاد DPPH به فرم احیا شده آن یعنی DPPH-H بررسی می‌شود (۲۰). اسانس گونه‌های مختلف نعنای منابع بالقوه‌ای از مهارکننده‌های رادیکال آزاد DPPH می‌باشند. به عنوان مثال گولاس^۳ و همکاران (۲۰۰۷) بیان کردند که اسانس *M. longifolia* فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH خوبی را نشان می‌دهد (۲۳). دورمان^۴ و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که در گونه‌های مختلف نعنای مانند نعنای فلفلی، دالماتیکا^۵ و نعنای سبز قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH متفاوت بوده و نعنای فلفلی دارای بیشترین میزان فعالیت و پس از آن دالماتیکا و نعنای سبز قرار دارند (۲۴). ترکیبات فنولی موجود در گیاه نعنای سبز از توانایی بالایی در اهدا هیدروژن برخوردار بوده و خواص ساختاری ایده‌آل آن‌ها برای اصلاح فعالیت رادیکال‌های آزاد، این ترکیبات را به آنتی‌اکسیدان‌های خوبی تبدیل کرده است (۲۵).

آزمون مهار رادیکال ABTS بر پایه اکسیداسیون مستقیم ABTS توسط پتاسیم پرسولفات و تولید رادیکال کاتیونی پایدار ABTS می‌باشد. رنگ آبی-سبز محلول رادیکال کاتیونی در حضور آنتی‌اکسیدان‌ها کاهش یافته و این کاهش (احیاء شدن) در طول موج ۷۳۴ nm اندازه‌گیری می‌شود. ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با احیای مستقیم رادیکال‌های ABTS از طریق انتقال الکترون و خنثی‌سازی رادیکال با انتقال اتم هیدروژن قادر به مهار رادیکال‌های ABTS می‌باشند (۲۶). قدرت بالای مهار رادیکال ABTS

^۴ Dorman

^۵ Dalmatica

^۱ Saba

^۲ Dhifi

^۳ Gulluce

و لیمونن نسبت داده اند (۳۲). فعالیت آنتی اکسیدانی بالای اسانس نعناع سبز ناشی از قابلیت اهداء الکترون یا اتم هیدروژن ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی آن می باشد؛ اگرچه، غلظت این ترکیبات و همچنین شرایط استخراج اسانس در فعالیت آنتی اکسیدانی آن موثر می باشند.

اثر ضد میکروبی اسانس نعناع سبز و سایر گونه های نعناع در پژوهش های مختلف بررسی شده است (۵ و ۶). به عنوان مثال، هادیان^۵ و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که برخی از اسانس های گیاهان دارویی از جمله نعناع فلفلی دارای اثر ضدقارچی بر قارچ های آلوده کننده توت فرنگی از جمله بوتریتیس سینه را، آسپرژیلوس نایجر و رایزوپوس می باشند (۳۳). همچنین اثر ضدقارچی اسانس های 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 باکتری های گرم مثبت و گرم منفی و قارچ هایی مانند موکور *رامانیوس* و *آسپرژیلوس اوکراسئوس* بررسی و قطر هاله های ایجاد شده توسط این اسانس ها برای موکور *رامانیوس* ۳۵-۴۰ mm و برای *آسپرژیلوس اوکراسئوس* ۳۲-۴۳ mm گزارش شده است. اثر ضد قارچی اسانس ها ممکن است به دلیل هم افزایی بین اجزای آن ها باشد. بنابراین، احتمال ایجاد نژادهای مقاوم قارچ پس از استفاده از اسانس ها در میوه و سبزیجات ناچیز خواهد بود (۳۵). فعالیت ضدقارچی بالای اسانس نعناع سبز می تواند ناشی از ترکیبات فرار ضدقارچی و بخارات آن باشد که منجر به کاهش جوانه زنی کنیدی و در نهایت مرگ قارچ می شوند (۳۶). همچنین، ترکیبات فنولی موجود در اسانس های گیاهی قادر به ایجاد صدمات شدید به غشای میکروارگانیسم از طریق اختلالات مستقیم و متابولیکی می باشند. تغییر عملکرد طبیعی میتوکندری، ممانعت از سنتز ATP در میتوکندری و تجمع گونه های فعال اکسیژن در سلول نیز به عنوان مکانیسم های ضدقارچی اسانس ها گزارش شده اند که در نهایت منجر به آپوپتوزیس^۶ سلول می شوند

توسط انواع گونه های نعناع از جمله نعناع سبز در این پژوهش نشان از فعالیت آنتی اکسیدانی این ترکیب می باشد. یانگ^۱ و همکاران (۲۰۱۰)، ترکیبات شیمیایی اسانس گیاهان مختلف از جمله نعناع فلفلی، اکلیل کوهی (رزماری) و گریپ فروت را شناسایی و فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS هر یک از آن ها 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 گونه های مختلف نعناع را به دلیل مقادیر مختلف ترکیبات فنولی موجود در هر یک از این گونه ها گزارش کرده اند (۲۸).

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

⁴ Martins

⁵ Hadian

⁶ Apoptosis

¹ Yang

² Mkaddem

³ Mata

(۳۷). علاوه بر این، 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 بر این، 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.

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 کانامایسن. 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

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, Lebrhi 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*

آنتی اکسیدانی آن. علوم و صنایع غذایی. ۱۳۹۸؛ ۸۷(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،

روشنک 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. Hosseini-mehr 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@asnrukh.ac.ir