

(مقاله پژوهشی)

بررسی مقایسه‌ای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی عصاره آزاد و ریزپوشانی شده پونه معطر (*Mentha pulegium* L)

رضا مهدی زاده مقدم^۱، پیمان آریایی^{۲*}، محمد احمدی^۲

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت ا... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت ا... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۲۲

DOI: 10.30495/jfst.2021.1912076.1679

چکیده

در مطالعه حاضر خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی و ضدباکتریایی عصاره آزاد و ریزپوشانی عصاره پونه معطر (*Mentha pulegium* L) بررسی شد. بدین منظور، عصاره گیاه پونه معطر با استفاده از روش اولتراسوند استخراج و مقادیر ترکیبات فنولی و ترکیبات شیمیایی عصاره سنجیده شد. نتایج نشان داد میزان ترکیبات فنولی کل در عصاره پونه معطر برابر با $75/64 \pm 1/25$ میلی گرم گالیک اسید بر گرم بود و بیشترین ترکیبات عصاره شامل cis-Piperitone epoxide (۲۸/۲۵ درصد)، pulegone (۱۹/۹۸ درصد)، Menthone (۱۳/۸۹ درصد) و Piperitenone oxide (۹/۹۵ درصد) بود. سپس عصاره توسط مالتودکسترین - کنسانتره پروتئین آب پنیر ریزپوشانی شد و ویژگی‌های عصاره ریزپوشانی شده شامل اندازه نانوذرات، پتانسیل زتا و راندمان ریزپوشانی تعیین شد. اندازه ذرات عصاره ریزپوشانی ۱۰۰/۱۴ نانومتر، پتانسیل زتا ۱۷/۴۴ میلی ولت و راندمان ریزپوشانی ۶۰/۰۶ درصد تعیین شد. با توجه به نتایج مربوط به میکروسکوپ الکترونی، ساختار عصاره ریزپوشانی شده، ساختاری بدون حضور منافذ و ترک‌ها، عیوب و نقوص‌های آشکار هستند. همچنین خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آزاد و ریزپوشانی شده تولیدی از طریق مهار رادیکال آزاد DPPH و قدرت احیاء کنندگی آهن، خاصیت ضد باکتریایی از طریق قطر هاله عدم رشد علیه باکتری‌های پاتوژن و خاصیت ضد سرطانی علیه سلول‌های SW742 (سلول‌های سرطان کولون) تعیین شد. نتایج نشان داد عصاره آزاد و ریزپوشانی شده دارای خاصیت ضد میکروبی بالایی بودند و با افزایش غلظت عصاره فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی عصاره افزایش یافت و فعالیت ضد میکروبی، ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانی عصاره ریزپوشانی شده به طور معنی‌داری بالاتر از عصاره بود ($P < 0/05$). بر اساس نتایج این مطالعه، عصاره ریزپوشانی شده پونه معطر می‌تواند به عنوان جایگزین مناسب ترکیبات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی سنتزی رایج مطرح شود.

واژه‌های کلیدی: اولتراسوند، کنسانتره پروتئین آب پنیر، عصاره پونه، ضد میکروبی، ریزپوشانی، مالتودکسترین.

۱- مقدمه

طی سال‌های اخیر استفاده از عصاره‌ها و اسانس‌های مختلف گیاهی در فرمولاسیون‌های غذایی به دلیل محرزگردیدن اثرات فراسودمندی و درمانی این ترکیبات مورد توجه قرار گرفته‌است. افزودن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی (از جمله عصاره گیاهی) در غذاها به عنوان یک عامل محافظت‌کننده نقش مهمی ایفا می‌کنند. مطالعات نشان داده است که آنتی‌اکسیدانها می‌توانند از پیشرفت بیماریهای مانند سرطان، بیماری‌های قلبی عروقی، چاقی، دیابت نوع ۲، فشار خون بالا، پیری زودرس و بیماری‌های التهابی جلوگیری کنند (۳۲). گیاه پونه معطر *Mentha pulegium L.* گیاهی متعلق به تیره نعنائیان می‌باشد. در ایران در دامنه‌های البرز، شمال و شمال شرقی و برخی نقاط دیگر انتشار دارد. این گیاه دارای ساقه‌ای با ظاهر تقریباً استوانه‌ای به ارتفاع ۱۰ تا ۱۵ سانتی‌متر است (۲۰). کاهش پراکسیداسیون لیپدها، کاهش چربی‌خون، اثرات آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌باکتریال و اثر درمانی بر بیماری التهابی روده از جمله اثرات مطالعه شده بر گیاهان این جنس است. ترکیبات شناسایی شده در پونه معطر از دسته فلاونوئیدها^۱، ترین‌ها^۲، ساپونین‌ها^۳، بی‌بنزیل^۴، ترکیبات فنولی^۵ و استرول‌ها^۶ هستند که بسیاری از آن‌ها در طی مطالعات این گیاه شناسایی شده‌اند (۲۸). استخراج ترکیبات زیست فعال مذکور از گیاه به عوامل متعددی بستگی دارد که مهم‌ترین آن‌ها حلال‌وروش استخراج می‌باشند. با انتخاب روش استخراج صحیح، می‌توان حداکثر غلظت ترکیبات فنولیک را با خلوص بالا از ماده مورد نظر استخراج کرد. انتخاب روش استخراج به نوع بافت گیاهی، ساختار شیمیایی ترکیبات موثره و پایداری ماده موثره در برابر حرارت بستگی دارد. روش سنتی استخراج این ترکیبات، استفاده از حلال می‌باشد، که دارای مشکلات متعددی از جمله زمان طولانی فرآیند، انتخاب پذیری کم، بازده پایین و کاربرد مقادیر زیاد حلال سمی است (۲۹).

-
- 1-Flavonoids
 - 2-Terpenes
 - 3-Saponin
 - 4-Bibenzyl
 - 5-Phenolic compound
 - 6-Sterol

یکی از روش‌های نوین استخراج، استفاده از امواج فراصوت (اولتراسوند) است. این روش ارزان، ساده و موثر بوده و افزایش بازده عصاره‌گیری و افزایش سرعت واکنش از مهمترین محاسن آن به شمار می‌رود. در این روش امواج فراصوت با فرکانس بالاتر از ۲۰ کیلو هرتز به داخل ماده نفوذ کرده، موجب ایجاد کشیدگی و جمع شدن‌های پی در پی (موسوم به حفره‌زایی یا کاویتاسیون)^۷ شده که در نتیجه آن حفراتی داخل ماده گیاهی ایجاد می‌شوند. این حفرات به صورت نامتقارن به هم پیوسته و موجب خروج سریع مواد از داخل سلول‌ها به خارج از آن می‌شوند. به علاوه این امواج می‌توانند موجب تخریب دیواره سلول‌های زیستی شده و موجب تسهیل خروج مواد گردند (۳، ۱۷). ترکیبات زیست فعال (ترکیبات فنولی) استخراجی از گیاهان دارای ویژگیهای ساختاری ایده‌آلی برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود هستند که عمدتاً به دلیل توانایی آن‌ها در اهدای اتم هیدروژن یا الکترون است. با این حال به شکل آزاد (غیرکپسوله)، حلالیت محدودی در آب دارند، علاوه بر این بسیاری از پلی فنول‌ها طعم ناخوشایندی دارند که باید قبل از افزوده شدن به مواد غذایی با داروهای خوراکی پوشش داده شود (۱۹). تکنولوژی پوشینه‌دار کردن در فرآیند غذایی شامل پوشش دهی ذرات یا ترکیبات ریز (مانند مواد عطر و طعم‌زا، رنگ‌ها، چربی‌ها، اسیدها) و سایر مواد مغذی (مانند ویتامین‌ها، مواد معدنی و آنتی-اکسیدان‌ها) می‌باشد. ریزپوشینه‌ها از یک پوشش بیرونی به نام غشا یا دیواره و یک بخش مرکزی به نام هسته تشکیل شده‌اند. غشا، نیمه تراوا، کروی، نازک و محکم است (۱۴). بنابر برخی از مطالعات ریزپوشانی می‌تواند، خاصیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی ترکیبات را افزایش داده و همچنین سبب حفظ پایداری خواص آن برای مدت طولانی‌تر می‌شود (۲۴، ۸). از جمله مواد پوشش‌دهنده می‌توان به پروتئین‌ها (گلوتن، کازئین، ژلاتین، آلبومین، پروتئین آب پنیر و غیره)، کربوهیدرات‌ها (نشاسته، مالتو دکسترین^۸ و غیره)، لیپدها (مونوگلیسیریدها، دی‌گلیسیریدها، موم‌ها و غیره)، صمغ‌ها (آلژینات، کیتوزان، آگار، کاراجینان و غیره) و سلولزها

-
- 7-Cavitation
 - 8-Maltodextrin

۲-۲- استخراج عصاره با امواج اولتراسوند

۱۰ گرم نمونه گیاه پونه معطر با ۱۰۰ میلی لیتر از اتانول: آب (۵۰:۵۰) در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و زمان ۲۰ دقیقه در حمام اولتراسوند در ۲۰ KHz عصاره‌گیری شد. سپس محلولها با کاغذ واتمن شماره ۱ صاف و حلالها توسط تبخیر کننده تحت خلاء (مدل EW-28705-01، ساخت شرکت Heidolf، آمریکا) تبخیر شد. عصاره حاصله تا زمان انجام آزمایش در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۹).

۲-۳- اندازه‌گیری ترکیبات فنولی کل

روش فولین سیو کالتیو از متداول‌ترین روش‌های اندازه‌گیری فنولی می‌باشد. اساس کار در این روش، احیای معرف فولین توسط ترکیبات فنولی در محیط قلیایی و ایجاد کمپلکس آبی‌رنگ است که حداکثر جذب را در طول موج ۷۶۰ نانومتر نشان می‌دهد. ترکیبات فنولی کل بر اساس روش رشیدایی و همکاران (۲۰۱۹) با استفاده از اسپکتروفتومتر مدل T80 ساخت کشور انگلستان بر مبنای اسید گالیک تعیین شد (۳۴).

۲-۴- شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده عصاره

آنالیز اسانس توسط دستگاه گاز کروماتوگراف طیف نگار جرمی (HP-5973 (MS/GC، Hewlett Packard، آمریکا)، نوع ستون، HP-5MS به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت فاز ساکن ۰/۳۲ میکرون صورت گرفت. برای این منظور ابتدا عصاره گیاه با سولفات سدیم بدون آب، آب‌گیری و پس از تزریق به دستگاه MS/GC با استفاده از ضرایب بازداری هر یک از اجزای تفکیک شده و طیف جرمی آن‌ها و مقایسه با استاندارد، ترکیبات تشکیل دهنده اسانس شناسایی شد. دمای آون از ۴۰ تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۲/۵ دور بر دقیقه افزایش یافت. از گاز هلیوم با سرعت جریان ۱/۱ میلی‌لیتر در دقیقه و از انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت استفاده شد (۴).

۲-۵- تهیه عصاره ریزپوشانی شده

برای تهیه عصاره گیاه پونه معطر ریزپوشانی شده، مالتودکسترین کنسانتره پروتئینی آب‌پنیر به عنوان حامل انتخاب شد. ریزپوشانی با استفاده از روش نوشاد و همکاران (۲۰۱۵) انجام خواهد

(کربوکسی متیل سلولز، متیل سلولز و غیره) اشاره کرد. مالتودکسترین محصولی از هیدرولیز جزئی نشاسته بوده و الیگوساکاریدی است که به عنوان افزودنی در صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. مالتودکسترین به دلیل حلالیت بالا و ویسکوزیته پائین، یکی از مهم‌ترین و پرکاربردترین ترکیبات حامل است (۱۲). کنسانتره پروتئینی آب‌پنیر^۱ از محصولات جانبی تولید پنیر در صنایع لبنی است که حدود ۲۰ درصد از پروتئین‌های اولیه شیر را داراست. به دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی خاص خود، به عنوان مثال امکان استفاده از پروتئین‌های آب‌پنیر به عنوان هیدروژل‌های حساس به pH در آزادسازی کنترل شده ترکیبات زیست فعال ریزپوشانی شده، مصارف غذایی و غیر غذایی دارد و گزینه مناسبی برای پوشش دار کردن ریز پوشینه‌های کربوهیدراتی می‌باشد. همچنین با توجه به مطالعات انجام گرفته، پروتئین آب‌پنیر به دلیل اثرات سلامتی بخش خود مانند فعالیت ضد سرطانی می‌تواند به عنوان افزودنی برای تولید مواد غذایی فراسودمند در نظر گرفته شود (۳۳). با توجه به مطالب بیان شده هدف از مطالعه حاضر بررسی مقایسه‌ای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد سرطانی عصاره آزاد و ریزپوشانی شده گیاه پونه معطر با عصاره ریزپوشانی توسط مالتو دکسترین کنسانتره پروتئینی آب‌پنیر می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد اولیه

گیاه پونه معطر (*Mentha pulegium L.*)، از مناطق ییلاقی شهرستان کیش شهرستان گیلان تهیه، بعد از تأیید نام علمی از سوی گروه کشت و توسعه انستیتو گیاهان دارویی، قسمت‌های زائد آن جدا و بلافاصله پس از شستشو خشک گردید. سپس در آون تحت خلأ با درجه حرارت ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ دقیقه خشک شد. توسط خردکن کاملاً پودر شد و تا زمان انجام آزمایش در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت مرک آلمان تهیه و دارای درجه تجزیه ای بود.

در این معادله W_1 مقدار عصاره در مایع فوقانی مقدار معین از نانو کپسول و W_2 مقدار عصاره افزوده شده برای آماده سازی همان مقدار نانو کپسول می باشد که بر حسب میلی گرم گالیک اسید به ازای هر گرم گیاه بیان می شوند.

۲-۵-۲- اندازه گیری اندازه ذرات

اندازه ذرات با کمک دستگاه آنکسار نور لیزر مدل Zetasizer nano zs (شرکت Malvern، کشور انگلستان) اندازه گیری شد. قطر متوسط ذرات با نماد $d_{4,3}$ (قطر حجم- طول) نشان داده شد و بر طبق رابطه ۲ محاسبه گردید. در این فرمول Zi تعداد ذرات با قطر d_i خواهد بود (۲۵).
رابطه (۲)

$$D_{4,3} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3}$$

۲-۵-۳- اندازه گیری پتانسیل زتا

برای اندازه گیری پتانسیل زتا از دستگاه زتاسایزر (مدل Zetasizer nano zs، شرکت Malvern، کشور انگلستان) استفاده شد. دستگاه حامل یک سل الکتروشیمیایی حاوی دو الکترود است. نمونه ها با آب دیونیزه به نسبت ۵:۱ رقیق و در سل قرار داده شد. زمانی که ولتاژ اعمال گردید، ذرات با بار منفی به سمت الکترود مثبت حرکت کردند و سرعت حرکت ذرات اندازه گیری گردید (۲۵).

۲-۵-۴- رهاپش عصاره از کپسول ها در محیط آزمایشگاهی

میزان رهاپش ترکیبات فنولی نانوریز پوشانی شده در طی شرایط نگهداری روغن، مطابق چن و همکاران (۲۰۰۸) بر اساس روش فولین سیو کالتیو اندازه گیری شد (۱۲). بدین منظور ۳ گرم از کپسول با ۳ گرم از فسفات بافر (pH=۷) ترکیب و بعد در ۵۰۰ دور در دقیقه، در دمای اتاق و به مدت ۹۰ دقیقه سانتیفریژ شد و سپس فاز پایینی جمع آوری شد. مقدار کل ترکیبات فنولی آن اندازه گیری و بر اساس گالیک اسید بیان شد. با استفاده از فرمول زیر میزان رهاپش ترکیبات از طریق رابطه ۳ محاسبه شد:

$$\text{رابطه (۳)} = \frac{C_2 \times 100}{C_1} = \text{درصد رهاپش}$$

که در آن C1 درصد ریز پوشانی شدن ترکیبات فاز خارجی و C2 درصد ریز پوشانی شدن ترکیبات فاز داخلی می باشند.

شد (۳۰). مخلوط مالتودکسترین-کنسانتره پروتئینی آب پنیر در محلول کلروفورم/متانول (۱:۳ حجمی:حجمی) انحلال یافت. سپس محلول حاصله به منظور حذف حلال ها در روتاری اوپراتور قرار داده شد تا یک فیلم نازک بر روی دیوار تشکیل شد. عصاره گیاه پونه معطر نیز در محلول دی کلرومتان/متانول (۱:۲ حجمی: حجمی) حل شد و مخلوط حاصل با مخلوط مالتودکسترین-کنسانتره پروتئینی آب پنیر با نسبت ۱:۴، (مالتودکسترین-کنسانتره پروتئینی آب پنیر: عصاره) ترکیب شد و حلال های موجود تحت بخار نیتروژن تبخیر شدند. فیلم تولید شده با ۲ میلی لیتر بافر فسفات (۱۰ میلی مول / لیتر، pH=۴) انحلال یافت و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به وسیله دستگاه هموژنایزر در فشار ۲۰۰ بار هموژنیزه شد. سوسپانسیون به دست آمده به مدت ۲ ساعت در تاریکی در دمای اتاق قرار داده شد سپس با سرعت ۶۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتیفریژ شد. در نهایت، عصاره گیاه پونه معطر ریز پوشانی شده با استفاده از خشک کن انجمادی (Operon FDB-550، کره جنوبی) خشک گردید.

۲-۵-۱- راندمان ریز پوشانی^۱

راندمان ریز پوشانی پلی فنول ها مطابق روش توضیح داده شده توسط روبرت و همکاران (۲۰۱۵) تعیین شد (۳۶). ۲۰۰ میلی گرم ریز پوشینه به ۲ میلی لیتر اتانول اضافه و به مدت یک دقیقه همزده شد و در ادامه تحت اولتراسوند به مدت ۲۰ دقیقه در دو مرحله با شدت ۱۰۰ درصد و فرکانس ۲۰ کیلو هرتز قرار گرفت. بعد از این مرحله سانتیفریژ کردن در ۳۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲ دقیقه انجام گرفت. الکل میتواند عصاره ای که خارج از کپسول است را بدون تخریب در خود حل کند. مقدار ترکیبات فنولی کل در محلول رویی با استفاده از روش فولین سیو کالتو و جذب در ۷۴۰ نانومتر به وسیله اسپکتروفتومتر تعیین شد. درصد کارایی کپسوله کردن از رابطه ۱ محاسبه شد:

$$\text{رابطه ۱: } \text{Encapsulation Efficiency (\%)} = \frac{w_1 - w_2}{w_2} \times 100$$

۲-۵-۵-آزمون SEM^۱

برای بررسی ساختار میکروسکوپی نانوریزپوشانی‌های تهیه شده با پوشش‌های مختلف، از میکروسکوپ الکترونی روبشی (مدل TeScan- Mira III ساخت کشور جمهوری چک) استفاده شد. نمونه‌ها به وسیله دستگاه پوشش‌دهنده با لایه طلا-پالادیوم پوشانده شدند. سپس از سطح خارج آن‌ها با ولتاژ ۳۰ کیلوولت با بزرگنمایی ۲۰۰۰ برابر تصویر برداری شد (۲۵).

۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ میلی‌مولار DPPH اضافه شد و مخلوط حاصل به خوبی تکان داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در اتاق تاریک قرار داده شد و سپس جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷nm در مقابل شاهد قرارداد شد و تمامی این مراحل در مورد BHA^۲ (با غلظت ۱۰۰ ppm) به عنوان آنتی‌اکسیدان استاندارد انجام گرفت (۲۹).

۱۰۰ (جذب شاهد / جذب شاهد-جذب نمونه) = درصد مهار رادیکال آزاد DPPH

رابطه (۵)

۲-۷-خصوصیات ضد میکروبی عصاره آزاد و ریزپوشانی شده
فعالیت ضد میکروبی عصاره آزاد و ریزپوشانی شده بر روی میکرو ارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد شامل استفیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1112) و اشرشیاکلی (PTCC 1399) با استفاده از روش نفوذ در محیط آگاردار^۳ مورد بررسی قرار گرفت. میکروارگانیسم‌های مذکور از بانک میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شد. میکروارگانیسم‌ها به مدت یک شبانه‌روز در محیط کشت ب‌اچ‌آی آگار^۴ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. عصاره آزاد و ریزپوشانی شده با استفاده از یک قالب به دیسک‌هایی به قطر ۱۳/۴ میلی متر تبدیل شد. قبل از قرار دادن دیسک‌ها بر روی سطح محیط کشت، عمل کشت سطحی با استفاده از ۰/۱ میلی لیتر کشت مایع (تقریباً برابر با ۱۰^۶ - ۱۰^۷) هر کدام از باکتری‌های مورد آزمایش انجام شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. قطر هاله‌های تشکیل شده با استفاده از کولیس با دقت ۰/۰۲ میلی متر اندازه‌گیری شده و سپس از قطر دیسک کم شد. این اختلاف به عنوان ناحیه بازدارنده محلول تشکیل دهنده پوشش‌ها گزارش شد (۱۱).

۲-۸-خصوصیات ضد سرطانی عصاره آزاد و ریزپوشانی شده

۲-۸-۱-کشت سلولی

سلول‌های SW742 (سلول‌های سرطان کولون) از انستیتو پاستور ایران-تهران تهیه گردید، سپس در محیط DMEM^۵

۲-۶-اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آزاد و ریزپوشانی شده

۲-۶-۱-بررسی مهار رادیکال آزاد (ABTS)

تعیین فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS با خلیقی و همکاران (۲۰۱۳) تعیین شد (۲۷). محلول رادیکال ABTS با مخلوط کردن ۵ میلی‌لیتر از ۷ABTS میلی‌مولار و ۸۸ میکرو مولار پتاسیم پروسولفات ۱۴۰ میلی‌مولار تهیه شد و ۱۶ ساعت در دمای محیط در تاریکی نگهداری شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول موجود با ۴۰ میلی‌لیتر (بافر فسفات ۵ میلی‌مولار، ۷/۴pH، حاوی ۰/۲ NaCl مولار) تا جذب محلول رادیکال ABTS در طول موج ۷۳۴ نانومتر عدد ۰/۰۲ ± ۰/۷۰ بدست آید، ترکیب شد. ۶۵ میکرو مولار از غلظت‌های مختلف عصاره آزاد و ریزپوشانی شده به‌طور جداگانه (۱۰۰ ppm، ۵۰۰ و ۱۰۰۰) با ۶۵ میکرومولار بافر فسفات ترکیب و ۶۶/۶۷ میکرومولار از این مخلوط با ۹۱۰ میکرو مولار محلول ABTS ترکیب شد. ۶۶/۶۷ میکرو مولار بافر فسفات به عنوان شاهد با ۹۱۰ میکرو مولار محلول ABTS ترکیب و پس از ۱۰ دقیقه در دمای محیط در تاریکی قرار گرفت و جذب در ۷۳۴ نانومتر خوانده شد.

تعیین فعالیت پاک‌کنندگی رادیکال آزاد ABTS با استفاده از رابطه ۴ محاسبه می‌شود:

رابطه (۴)

۱۰۰ (میزان جذب کنترل / میزان جذب نمونه) - ۱ = درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS

۲-۶-۲-بررسی مهار رادیکال آزاد (DPPH)

بدین منظور ۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره آزاد و ریزپوشانی شده به‌طور جداگانه (۱۰۰ ppm، ۵۰۰ و ۱۰۰۰) با

2-Butylated Hydroxyanisole

3-Agar Diffusion Method

4-BHA Agar

5-Dulbecco's Modified Eagle Medium

1-Scanning Electron Microscope

۳- نتایج و بحث

۳-۱- مقادیر ترکیبات فنولی

اندازه گیری محتوای فنولی تام با معرف فولین-سیوکالتیو یک ارزیابی کلی از محتوای ترکیبات فنولی تام عصاره ها را فراهم می سازد. میزان ترکیبات فنولی کل در تیمارهای مختلف عصاره گیاه پونه معطر استخراجی توسط اولتراسوند $75/64 \pm 1/25$ میلی گرم گالیک اسید بر گرم عصاره تعیین شد. اقبال و همکاران (۲۰۱۳) مقادیر ترکیبات فنولی عصاره گیاه پونه توسط روش سوکسله و حلال های مختلف استخراج شامل هگزان، دی کلرومتان و متانول را $2/5$ تا 70 میلی گرم گالیک اسید بر گرم عصاره اعلام نمودند. مقادیر ترکیبات فنولی در ارتباط با روش و حلال استخراج می باشد (۲۲).

۳-۲- تعیین ترکیبات تشکیل دهنده عصاره پونه معطر

نتایج مربوط به ترکیبات شیمیایی عصاره پونه معطر نشان داد، در مجموع ۱۷ ترکیب با مجموع $94/39$ درصد شناسایی شد. بیشترین ترکیبات عصاره شامل cis-Piperitone، epoxide ($28/25$ درصد)، pulegone ($19/98$ درصد)، Menthone ($13/89$ درصد) و Piperitenone oxide ($9/95$ درصد) بوده است. اقبال و همکاران (۲۰۱۳) ترکیبات فنولی پونه را به ترتیب epoxidicis-Piperitone ($28/30$ درصد)، piperitenone ($24/90$ درصد)، germacrene ($8/16$ درصد) اعلام نمودند (۲۲). در مجموع در مقدار و نوع ترکیبات عصاره در مطالعات متنوع تفاوت هایی وجود دارد، به طور کلی ترکیبات تشکیل دهنده عصاره های گیاهی بر حسب منطقه جغرافیایی رویش، زمان برداشت گیاه، شرایط محیطی و فصلی، روش خشک کردن و استخراج عصاره، عصاره گیری از اندام های مختلف و در نهایت تفاوت ژنتیکی گیاه می تواند تغییر کند (۲۴ و ۲۹).

به همراه ۵ درصد سرم جنین گوساله (FCS^1) پنی سیلین 100 واحد بر میلی لیتر و استرپتومایسین 100 میکروگرم بر میلی لیتر کشت گردید. سلول ها در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد و در رطوبت 90 درصد و CO_2 5% در صد قرار گرفت. سلول های نرمال (Mouse C34/An connective tissue) L929 در FCS 10 درصد قرار گرفت. بعد از 24 ساعت، 48 ساعت و 72 ساعت سلول ها در معرض غلظت های مختلف عصاره آزاد و ریزپوشانی شده به طور جداگانه (100 ، 500 و 1000) قرار گرفت. هم زمان نمونه کنترل فاقد عصاره نیز مانند نمونه های حاوی عصاره در نظر گرفته شد.

۲-۸-۲- بررسی زنده بودن سلول ها

زنده بودن سلول ها توسط تست MTT (3 ، 4 ، 5) دی متیل تیازول 2 یل 5 ، 2 دی فیل ترازولیوم) مورد ارزیابی قرار گرفت. به طور خلاصه سلول ها به تعداد 5 هزار در پلیت 96 خانه ای قرار گرفت و در زمان های 24 ساعت، 48 ساعت و 72 ساعت پس از اضافه کردن عصاره به سلول ها محیط کشت رویی دور ریخته شد و سلول ها در محلول MTT (5 میلی گرم / میلی لیتر در بافر فسفات سالین (PBS^2) به مدت 4 ساعت قرار گرفت و پس از محلول سازی فرمازان (تبدیل رنگ به بنفش ارغوانی) توسط 100 میکرو لیتر $DMSO^3$ جذب نوری در 570 نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر خوانده شد (۶).

۲-۹- تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آزمایش هادر طرح آزمایشی کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد و نتیجه به صورت میانگین با انحراف معیار گزارش گردید. آنالیز آماری تیمارها توسط جدول آنالیز واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم افزار SPSS (SPSS version 18) صورت گرفت. برای بیان تفاوت معنی داری میانگین ها از آزمون دانکن در سطح $0/05$ استفاده شد و شکل ها با نرم افزار Microsoft Excel ترسیم شد.

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی عصاره گیاه پونه معطر

ردیف	ترکیبات	درصد
۱	cis-Piperitone epoxide	۲۸/۲۵
۲	pulegone	۱۹/۹۸
۳	Menthone	۱۳/۸۹
۴	Piperitenone oxide	۹/۹۵
۵	α -Terpineol	۵/۷۸
۶	1,8-Cineol	۴/۸۹
۷	Piperitenone	۳/۲۷
۸	Linalool	۱/۹۵
۹	Thymol	۱/۴۷
۱۰	Thymol acetate	۱/۰۱
۱۱	Camphor	۰/۹۳
۱۲	β -Caryophyllene	۰/۷۹
۱۳	γ -terpinene	۰/۶۵
۱۴	α -Pinene	۰/۴۸
۱۵	Sabinene	۰/۴۸
۱۶	β -Pinene	۰/۳۹
۱۷	Terpinolene	۰/۲۳
مجموع		۹۴/۳۹

۳-۳-۳- بررسی آزمون‌های عصاره ریزپوشانی

۱-۳-۳- بررسی اندازه ذرات

نتایج مربوط به اندازه ذرات عصاره ریزپوشانی توسط مالتودکسترین - کنسانتره پروتئینی آب‌پنیر در مطالعه حاضر برابر با $100/14 \pm 5/89$ نانومتر بود، که با توجه به نتایج عصاره ریزپوشانی شده از اندازه کوچکی برخوردار است. عصاره‌های ریزپوشانی شده با اندازه کوچکتر دارای پایداری بیشتری می‌باشند که به دلیل مقاومت بالاتر نسبت به نیروی ثقل به واسطه حرکت برآونی است (۱۷).

۲-۳-۳- بررسی پتانسیل زتا

در یک سیستم کلوئیدی، اختلاف پتانسیل بین لایه یونی غیر متحرک و لایه متحرک (لایه انتشار) در اتمسفر یونی اطراف ذرات باردار، پتانسیل زتا نامیده می‌شود. پتانسیل زتا بهترین شاخص برای تعیین وضعیت الکتریکی سطح ذرات است؛ زیرا نشان‌دهنده میزان تجمع بار در لایه غیرمتحرک و شدت

جذب یون‌های مخالف روی سطح ذره است. بالا بودن پتانسیل زتای ذرات موجب بالا رفتن نیروی دافعه الکترواستاتیک و در نتیجه افزایش پایداری فیزیکی سیستم می‌شود (۱۴). پتانسیل زتا در مطالعه حاضر $17/44 \pm 0/52$ میلی ولت بوده است، به طور کلی در دیسپرسیون‌های کلوئیدی سیستم‌های دارای پتانسیل زتا از $+30$ تا -30 میلی ولت را پایدار در نظر می‌گیرند (۳۵). بالا بودن میزان پتانسیل زتا در عصاره ریزپوشانی شده، نشان از پایداری بالای نانوذرات ایجاد شده دارد. طبق پژوهش‌های قبلی، با کاهش اندازه لیپوزوم‌ها، پتانسیل زتا افزایش می‌یابد (۳۵).

۳-۳-۳- راندمان ریزپوشانی

راندمان ریزپوشانی یکی از فاکتورهای مهم در تعیین پایداری ترکیبات کپسوله شده می‌باشد که مانع از دست رفتن مواد فرار و سبب افزایش مدت ماندگاری محصولات با کاهش

که منجر به آزاد شدن مواد کپسول می‌شود. منجر به آزاد شدن مواد کپسول می‌شود. بتز وهمکاران (۲۰۱۱) در پژوهش خود در مورد ریزپوشانی آنتوسیانین‌ها اعلام نمودند که تجزیه میکروکپسول منجر به آزادسازی آنتوسیانین‌ها می‌شود و در نهایت ۱۰۰ درصد آنتوسیانین‌های موجود در کپسول خارج می‌شوند (۹). اسماعیل زاده کناری و پناهی (۱۳۹۷) نیز اعلام نمودند میزان رهایش عصاره برگ‌گزنه عصاره ریزپوشانی در بیوپلیمر مرکب مالتودکسترین: ثعلب با گذشت زمان افزایش یافته و پس از گذشت زمان ۴۰ ساعت به میزان ۸۴/۳۲ درصد افزایش یافت که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشت (۱).

مقدار روغن سطحی بر سطح ذرات می‌گردد (۲۲). راندمان ریزپوشانی برابر با $60/06 \pm 3/11$ درصد تعیین شد. بهرامی و خادمی، (۲۰۲۰) اندازه ذرات عصاره چای ترش ریز پوشانی شده به وسیله مالتودکسترین - کنسانتره پروتئینی آب‌پنیر رابا $139/03 \pm 2/76$ نانومتر، بازده ریزپوشانی برابر با $67/30 \pm 1/37$ درصد اعلام نمودند (۷).

۳-۳-۴- میزان رهایش عصاره از نانوکپسول‌ها

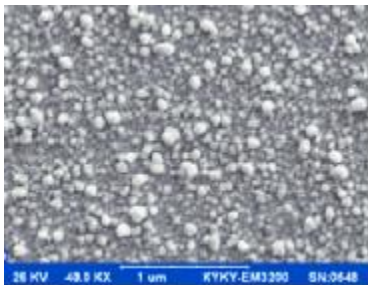
نتایج مربوط به میزان رهایش عصاره از نانوکپسول‌ها طی دوره‌نگهداری (جدول ۲) نشان داد که با گذشت زمان نگهداری میزان رهایش عصاره افزایش می‌یابد. در هنگام نگهداری با گذشت زمان به تدریج تجزیه نانوکپسول‌ها اتفاق می‌افتد

جدول ۲- میزان رهایش عصاره ریز پوشانی شده طی دوره نگهداری

زمان نگهداری (ساعت)						
۴۰	۳۲	۲۴	۱۶	۸	۰	
$73/12 \pm 2/23^a$	$64/67 \pm 1/19^b$	$52/58 \pm 2/11^c$	$35/44 \pm 0/78^d$	$18/94 \pm 1/12^e$	$2/98 \pm 0/03^f$	میزان رهایش (%)

* اعداد در یک ستون با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند (a, b, c, ...)

ویژگی‌های سطحی دیواره نانوکپسول‌ها تاثیر دارند که از آن جمله می‌توان به سرعت خشک کردن نانوامولسیون، ترکیب دیواره و شرایط تولید نانوامولسیون اشاره نمود (۳۵). رضایی و همکاران (۲۰۲۰) نیز مورفولوژی مشابهی از عصاره گیاه زوفای انکپسوله شده در نانوامولسیون‌های بیوپلیمری قدومه شهری و ثعلب نشان دادند (۳۵).



شکل ۱- تصویر گرفته شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوذرات

۳-۳-۵- بررسی ساختار میکروسکوپی نانوریزپوشانی‌ها یکی از ویژگی‌هایی که می‌توان با گرفتن عکس‌های میکروسکوپی به آن پی برد، شرایط سطوح خارجی میکروکپسول‌های تولید شده با خشک کن انجمادی و بررسی یکنواختی یا وجود فرورفتگی‌ها بر سطح آن‌ها می‌باشد. با توجه به شکل ۱ مشخص شد که ساختار عصاره ریز پوشانی شده توسط مالتودکسترین کنسانتره پروتئینی آب‌پنیر سطحی نرم و یکنواخت با درصد حفره‌گی پایین دارد که این خصوصیات بیان کننده ویژگی مناسب عصاره ریزپوشانی شده تهیه شده به روش مذکور است شبکه مناسب و پوشش یکنواخت دیواره در اطراف عصاره بر روی میزان باقی ماندن عصاره در کپسول، میزان ته نشینی و رهایش نانوکپسول‌ها طی دوره نگهداری بسیار موثر است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود ذرات حاصل همگی دارای شکل کروی هستند. تورفتگی و شکستگی در ساختار نانوکپسول‌ها مشاهده نشد. عوامل مختلفی بر روی

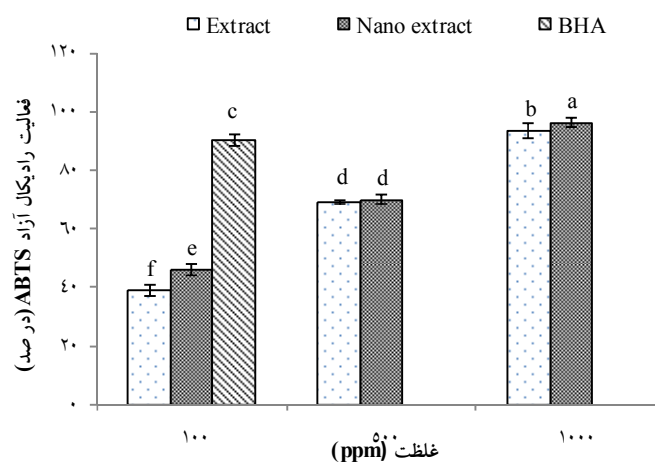
۳-۴-اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آزاد و

ریزپوشانی شده

۳-۴-۱- بررسی مهار رادیکال آزاد (ABTS)

تست ABTS یکی از رایج‌ترین روش‌های سنجش غیر مستقیم خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. این روش بر اساس ردیابی کاهش تولید کاتیون رادیکال ABTS به وسیله اکسیداسیون ABTS در حضور یک نمونه حاوی ترکیبات فنولی می‌باشد. از محاسن تست ABTS سادگی نسبی آن در تعیین مقادیر رایج آزمایشگاهی می‌باشد. از معایب تست ABTS وابستگی آن به زمان را می‌توان نام برد، زیرا واکنش اکسیداتیو برخی ترکیبات ممکن است با تأخیر صورت پذیرد و در تست مشخص نشود. لذا زمان انکوباسیون در نتایج به دست آمده مؤثر می‌باشد (۲۷). نتایج مربوط به مطالعه حاضر نشان داد، با افزایش غلظت عصاره، مقادیر فعالیت رادیکال آزاد ABTS (نمودار ۱) افزایش یافت به طوری که عصاره در غلظت ppm ۱۰۰۰ بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را دارا بود ($P < 0.05$) و مقادیر فعالیت رادیکال آزاد ABTS در این غلظت به اختلاف

در این غلظت به اختلاف معنی‌داری با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHA نداشت ($P > 0.05$). عصاره‌های گیاهی به علت دارا بودن ترکیبات فنولی، اهدا کننده هیدروژن می‌باشد که می‌تواند با رادیکال‌ها برای تبدیل محصولات غیرقابل پیش‌بینی واکنش دهند، بنابراین واکنش زنجیره رادیکال آزاد را خاتمه می‌دهند (۲۷). همچنین استفاده از عصاره ریزپوشانی شده سبب افزایش فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS شد. در مجموع بیشترین مقادیر فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS در عصاره ریزپوشانی شده با غلظت ppm ۱۰۰۰ مشاهده شد (۹۶/۲۵)٪ ($P < 0.05$). استفاده از نانو حامل‌ها باعث حفاظت ترکیبات فنولی از فاکتورهای محیطی نظیر pH، اکسیژن، نور و ... می‌شود. همچنین مولکول‌های فرار با این روش پایدار مانده و باعث حفاظت آن‌ها از تغییرات اکسیداتیو، نوری و فراریت می‌شود. بنابراین عصاره ریزپوشانی شده پتانسیل بیشتری به منظور افزایش فراهمی زیستی، بهبود کنترل رهاش، هدف قراردادن دقیق ترکیبات زیستی در نتیجه بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌شوند (۱۵).



نمودار ۱- فعالیت رادیکال آزاد ABTS در تیمارهای مختلف

* ستون‌ها با حروف متفاوت نسبت به هم اختلاف معنی‌دار دارند. (a, b, c, ...)

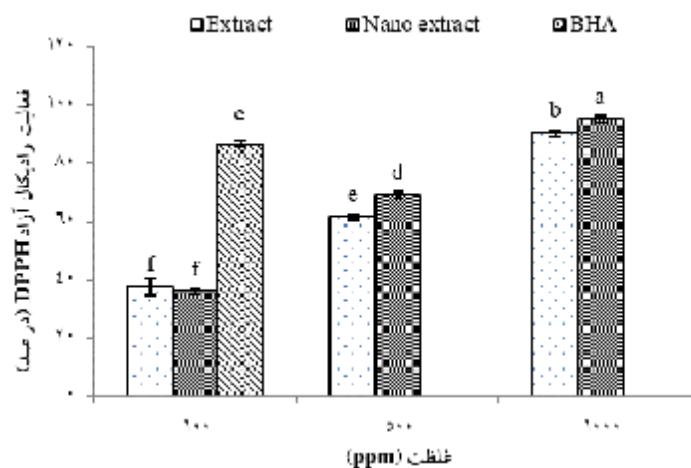
DPPH بر اساس واکنش رادیکال آزاد پایدار DPPH ترکیبات دهنده هیدروژن مانند فنل‌ها استوار می‌باشد. این تست نسبت به ABTS اختصاصی‌تر عمل می‌کند و بخصوص با ترکیباتی که حاوی گروه هیدروکسیل می‌باشند، واکنش

۳-۴-۲- بررسی فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

تست DPPH یکی از قدیمی‌ترین روش‌های سنجش غیر مستقیم خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد که برای یافتن ترکیبات دهنده هیدروژن در مواد طبیعی پیشنهاد شده است. تست

ترکیبات فنولی، خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره نیز افزایش می یابد (۲۹، ۳۴). اقبال و همکاران (۲۰۱۳) اعلام نمودند عصاره گیاه پونه معطر (*Mentha pulegium*) دارای خاصیت آنتی اکسیدانی می باشد و می تواند رادیکال آزاد DPPH را مهار نماید، همچنین آن ها اعلام نمودند ترکیبات فنولی نقش مهمی در مهار رادیکال آزاد DPPH دارد (۲۲). همچنین استفاده از عصاره ریزپوشانی شده سبب افزایش فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH شد. در مجموع بیشترین مقادیر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH در عصاره ریزپوشانی شده با غلظت ۱۰۰۰ ppm مشاهده شد (۹۵/۳۵ درصد) ($P < 0.05$). در واقع می توان این گونه بیان نمود انکپسولاسیون عصاره سبب افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی می شود. نتایج مشابهی توسط اسماعیلی و همکاران (۲۰۲۰) گزارش شد، آن ها نیز اعلام نمودند که ریزپوشانی نانو کیتوزان-صمغ دانه شاهی سبب افزایش مهار رادیکال آزاد DPPH می گردد (۱۴).

می دهد. برعکس ABTS رادیکال DPPH با فلاونوئیدهایی که گروه هیدروکسیل در حلقه B خود ندارند و اسیدهای آروماتیک که حاوی تنها یک گروه هیدروکسیل می باشند، واکنش نمی دهد (۳۷). با توجه به نتایج مربوط به فعالیت رادیکال آزاد DPPH (نمودار ۲)، با افزایش غلظت عصاره مقادیر فعالیت رادیکال آزاد DPPH افزایش یافت. به طوری که عصاره در غلظت ۱۰۰۰ ppm بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی را دارا بود و مقادیر فعالیت رادیکال آزاد DPPH در این غلظت بالاتر از آنتی اکسیدان سنتزی BHA بود ($P < 0.05$). عصاره های گیاهی به علت دارا بودن ترکیبات فنولی دارای فعالیت آنتی اکسیدانی می باشد، فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات فنولی عمدتاً به دلیل ویژگی های اکسیداسیون احیای آن ها می باشد، بنابراین به عنوان عوامل احیا کننده، دهنده هیدروژن و درگیر کننده اکسیژن فعال عمل می کنند. با افزایش غلظت ترکیبات فنولی، فعالیت مهار رادیکالی عصاره نیز افزایش می یابد، سایر محققین نیز اعلام نمودند با افزایش غلظت



نمودار ۲- فعالیت رادیکال آزاد DPPH در تیمارهای مختلف

* ستون ها با حروف متفاوت نسبت به هم اختلاف معنی دار دارند. (a, b, c, ...)

امروزه بیشتر مطالعه ها در جهت جداسازی و شناخت ترکیبات عصاره ها و بررسی فعالیت ضد میکروبی آن ها در مواد غذایی بدون تاثیر نامطلوب در ارزش تغذیه ای و حسی می باشد. تاکنون مطالعات وسیعی در زمینه اثر ضد باکتریایی شماری از عصاره های گیاهان بر روی باکتری های انتقال یافته از مواد غذایی انجام شده است. به طور کلی مطالعات

۳-۵- بررسی حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی

امروزه توجه به سلامت غذا و ارائه راهکارهایی جهت سلامت و محافظت هر چه بیشتر مواد غذایی ضروری به نظر می رسد. کنترل پاتوژن های غذا بوسیله محصولات و ترکیبات مشتق شده از گیاهان کاربرد گسترده ای پیدا کرده است.

صورت گرفته روی عصاره‌های گیاهی نشان داده است که عصاره‌ها فاز تأخیری رشد باکتریایی را طولانی کرده در حالی که سرعت رشد در فاز لگاریتمی را کاهش می‌دهند عملکرد آن‌ها از یک‌ساز و کار واحد تبعیت کرده که مربوط به تجمع آن‌ها در دو لایه لیپیدی غشا سلول و تخریب ساختار آن می‌باشد (۳۸ و ۳۹). با توجه به نتایج MIC (جدول ۳) و MBC (جدول ۴) باکتری اشرشیاکلی، حساس‌تر از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (جدول ۲) بود. فضای پری پلاسمیک هم شامل آنزیم‌های بسیاری است که قادر به تجزیه مولکول‌های خارجی که از فضای بیرون وارد می‌شوند، هستند (۱۴). کامکار و همکاران (۲۰۱۲) ثابت کردند عصاره آبی پونه معطر دارای ترکیبات تریپنوتیدی مانند منتول است (۲۶). با توجه به اثبات اثر قوی این ترکیبات بر باکتری‌های گرم منفی اثربشترین عصاره بر ضد باکتری‌های گرم منفی را می‌توان به وجود این ترکیبات نسبت داد (۱۸). این نتایج با نتایج جلی و همکاران (۲) در ارتباط با خاصیت

ضد میکروبی پونه معطر هم‌خوانی دارد. آن‌ها نیز اعلام نمودند عصاره پونه معطر دارای خاصیت ضد میکروبی می‌باشد و باکتری اشرشیاکلی، حساس‌تر از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بود. همچنین استفاده از نانوذرات سبب افزایش میزان قطر هاله عدم رشد در تمامی تیمارها شد. در مجموع بیشترین مقادیر قطر هاله عدم رشد در تیمار عصاره ریزپوشانی شده مشاهده شد ($P < 0/05$) که این امر نشان دهنده افزایش خاصیت ضد میکروبی عصاره پس از انکپسولاسیون می‌باشد. مطالعات قبلی نشان داد که نانوذرات فعالیت ضد باکتریایی بالاتری در برابر باکتری‌های گرم منفی یا گرم مثبت در مقایسه با عصاره دارند (۱۴). اثر مهارکنندگی بهتر عصاره ریزپوشانی شده می‌تواند با توجه به سطح بزرگتر آن برای واکنش با دیواره سلولی باکتری تفسیر شود. این عصاره ریزپوشانی شده می‌تواند به صورتی پایدار و محکم بر روی سطح دیواره سلولی باکتری جذب و در نتیجه باعث تخریب غشاء سلول و از بین رفتن باکتری شوند (۳۱).

جدول ۳- مقادیر MIC عصاره آزاد و ریزپوشانی شده

نوع باکتری	عصاره آزاد	عصاره ریزپوشانی شده
اشرشیاکلی	$133/33 \pm 14/43^{Ba}$	$116/67 \pm 14/43^{Bb}$
استافیلوکوکوس اورئوس	$266/67 \pm 14/44^{Aa}$	$191/66 \pm 14/43^{Ab}$

*اعداد در یک ردیف با حروف متفاوت متفاوت معنی دار دارند. (a, b, c, ...)

*اعداد در یک ستون با حروف متفاوت متفاوت معنی دار دارند. (A, B, C, ...)

جدول ۴- مقادیر MBC عصاره آزاد و ریزپوشانی شده

نوع باکتری	عصاره آزاد	عصاره ریزپوشانی شده
اشرشیاکلی	$266/67 \pm 14/44^{Ba}$	$208/33 \pm 14/43^{Bb}$
استافیلوکوکوس اورئوس	$375/00 \pm 25/00^{Aa}$	$325/00 \pm 25/00^{Ab}$

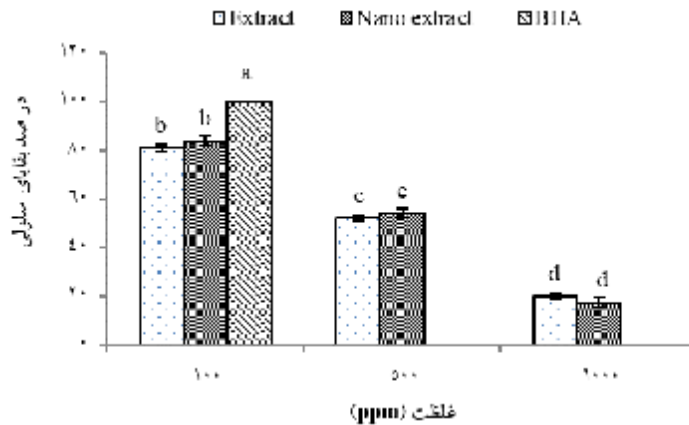
*اعداد در یک ردیف با حروف متفاوت متفاوت معنی دار دارند. (a, b, c, ...)

*اعداد در یک ستون با حروف متفاوت متفاوت معنی دار دارند. (A, B, C, ...)

۳-۶- بررسی خاصیت ضد سرطانی

نتایج مربوط به بقایای سلول‌های SW742 (نمودار ۳) تحت تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره و عصاره ریزپوشانی شده بود و با افزایش غلظت بقایای سلول‌های SW742 کاهش یافت. به طوری که عصاره ریزپوشانی شده در غلظت ۱۰۰۰ بالاترین فعالیت ضد سرطانی را دارا بود و بقایای سلول‌های SW742 در این غلظت ۱۷/۲۵ درصد تعیین شد.

در مطالعه حاضر، ارتباط معنی‌داری بین ترکیبات فنولی با سمیت سلولی وجود داشت. ترکیبات فنولی کاربردهای بالقوه در سرطان‌روده و سرطان‌های دیگر دارند (۶). همانطور که ذکر شد استفاده از نانوحامل‌ها باعث حفاظت ترکیبات فنولی می‌شود. بنابراین عصاره ریزپوشانی شده پتانسیل دارای فعالیت ضد سرطانی بالاتری می‌باشد.



نمودار ۳- مقادیر زنده مانده بقایای سلول‌های SW742

۴- نتیجه گیری

در این مطالعه خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطانی و ضد میکروبی عصاره آزاد و ریزپوشانی شده توسط مالتو دکسترین کنسانتره پروتئینی آب پنیر گیاه پونه معطر بررسی شد. بدین منظور در ابتدا عصاره گیاه پونه معطر از روش اولتراسوند استخراج و میزان ترکیبات فنولی عصاره سنجیده و ترکیبات شیمیایی عصاره تعیین شد. در مجموع ۱۷ ترکیب با مجموع ۹۹/۲۹ درصد شناسایی شد. بیشترین ترکیبات عصاره شامل cis-Piperitone epoxide (۲۸/۲۵ درصد)، pulegone (۱۹/۹۸ درصد)، Menthone (۱۳/۸۹ درصد) و Piperitenone oxide (۹/۹۵ درصد) بوده است. سپس تاثیر عصاره آزاد و ریزپوشانی شده بر روی میکروارگانیسم های گرم منفی اشرشیاکلی و گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس ارزیابی شد. با توجه به نتایج MIC و MBC حساس ترین باکتری، باکتری اشرشیاکلی بود. همچنین ۳ آزمون مختلف شامل مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاکنندگی آهن (FRAP) و مهار رادیکال آزاد ABTS به منظور بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره انجام شد. نتایج مربوط به هر ۳ آزمون

آنتی‌اکسیدانی باهم مطابقت داشت. عصاره پونه معطر دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و خاصیت ضد سرطانی بود. همچنین ریزپوشانی نیز تاثیر مثبتی در افزایش خصوصیات آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطانی و ضد میکروبی داشت. بنابراین این عصاره ریزپوشانی شده پونه معطر ممکن است به عنوان نگهدارنده در فرآورده‌های گوشتی، میوه ها و سبزی‌ها، به منظور جلوگیری از فساد اکسیداسیونی و میکروبی و افزایش ماندگاری غذاها استفاده شود.

۵- منابع

۱. اسماعیل زاده کناری، ر.، پناهی، پ. ۱۳۹۷. بررسی تاثیر عصاره نانوریزپوشانی شده برگ گزنه در کنترل پایداری اکسایشی روغن سویا. فصلنامه علوم و صنایع غذایی ایران. ۱۵، ۷۵، ۳۳-۲۳.
۲. جبلی جوان، ج.، احمدی همدانی، م.، بیانی، م.، کیخسروی، ک.، عبداللهی، ز.، علیجانپور، ز. و کنعانی، م. ۱۳۹۳. بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی پرمصرف‌ترین گونه‌های نعناع در

- permeability, mechanical and thermal properties of casein based Zataria multiflora Boiss. Extract containing film. *LWT-Food Science and Technology*, 44(10): 2316-2323.
11. Chen, L. Remondetto, GE. Subirade, M. 2008. Food protein based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends Food science and Technolgy*. 17: 272-283.
 12. Chranioti, C., Nikoloudaki, A. and Tzia, C. 2015. Saffron and beetroot extracts encapsulated in maltodextrin, gum Arabic, modified starch and chitosan: Incorporation in a chewing gum system. *Carbohydrate polymers*, 127: 252-263.
 13. Deepa, V., Sridhar, R, Goparaju, A., Reddy, P., and Murthy P. 2012. Nanoemulsified ethanolic extract of *Pyllanthus amarus* Scham & Thonn ameliorates ccl4 induced hepatotoxicity in Wistar rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 50: 785-794.
 14. Esmaeili, M., Ariaii, P., Nasiraie, L.R. and Yousef Pour, M.Y. 2020. Comparison of coating and nano-coating of chitosan-Lepidium sativum seed gum composites on quality and shelf life of beef. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 1-12.
 15. Ezhilarasi. P., Karthik, P., Chhanwal, N. and Anandharamakrishnan. C. 2013. Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 6:628-647.
 16. Fathi, M., Mozafari, M. R. and Mohebbi, M. 2012. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in Food Science and Technology*, 23: 13-27.
 17. Garcia, K. and Castro, T. 2003. Determination of Antioxidant Potential of Volatile Extracts Isolated from Various Herbs and Spices. *Agricultural and Food Chemistry*, 50: 4947 – 4952.
 18. Ghafghazi, H., Chedia, A., Weslati, M., Trakhna, F., Houssine, S., Abderrazak, M. and Brahim, H. 2013. Chemical composition and in vitro
 - نواحی دریای خزر، ایران. تحقیقات آزمایشگاهی دامپزشکی. دوره ۶، شماره ۲، ۱۰۲-۹۳.
 ۳. ذوالفقاری، ب. و یکدانه، ا. ۱۳۸۹. پیشرفت‌های اخیر در زمینه روش‌های استخراج ترکیب‌های گیاهی، داروهای گیاهی، ۱، ۵۵-۵۱.
 ۴. کامکار، ا.، شریعتی‌فر، ن.، جمشیدی، ا.، جبلی‌جوان، ا.، صادقی. ط.، ضیغم منفرد، م. م. ۱۳۹۰. مطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره پونه (*Mentha longifolia*) ایرانی در شرایط آزمایشگاهی. فصلنامه گیاهان دارویی، جلد ۱۱، شماره ۱، ۱۹۴-۱۸۵.
 ۵. محقق. ن، توکل. ج، بروک. ا. ۱۳۹۰. بررسی اثر سمیت سلولی عصاره‌ی آبی زنجبیل تازه بر سلول‌های سرطان پستان. افق دانش. دوره ۱۷، شماره ۳، ۳۳-۲۸.
 6. Afshari, J., Brook, A., Moheghi, N. 2011. The cytotoxic effect of zingiber officinale in breast cancer (MCF7) cell line. *Ofogh-e-Danesh*, 4(17): 28-33.
 7. Bahrami Feridoni, S. and Khademi Shurmasti, D. 2020. Effect of the nanoencapsulated sour tea (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract with carboxymethylcellulose on quality and shelf life of chicken nugget. *Food Science & Nutrition*, 8: 3704–3715.
 8. Bagheri, R., Izadi Amoli, R., Tabari Shahndash, N. and Shahosseini, S. R. 2016. Comparing the effect of encapsulated and unencapsulated fennel extracts on the shelf life of minced common kilka (*Clupeonella cultriventris caspia*) and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in the mince. *Food science and nutrition*, 4(2): 216–222.
 9. Betz, M. and Kulozik, U. 2011. Microencapsulation of bioactive bilberry anthocyanins by means of whey protein gels. *Procedia Food Science*, 1: 2047–2056.
 10. Broumand, A., Emam-Djomeh, Z., Hamedi, M., and Razavi, S. H. 2011. Antimicrobial, water vapour

26. Kamkar, A., Jebelli Javan, A., Nemati, G., Falahpour, F., Partovi, R., 2012. Effects of Mentha pulegium water extract dipping on quality and shelf life of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) during superchilled storage. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 13(2): 341-353
27. Khalighi-Sigaroodi, F., Ahvazi, M., Ebrahimzadeh, H. and Rahimifard, N. 2013. Chemical Composition of the Essential Oil and Antioxidant Activities, Total Phenol and Flavonoid Content of the Extract of *Nepeta pogonosperma*. *J. Med. Plants*, 12 (48):185-198
28. Mahdavi, V., Hosseini, E. and Sharifian, A. 2018. Effect of edible chitosan film enriched with anise (*Pimpinella anisum* L.) essential oil on shelf life and quality of the chicken burger. *Food science and nutrition*, 6 (2): 269- 279.
29. Maleki, M., Ariaii, P. and Fallah, H. 2016. Effects of Celery Extracts on the Oxidative Stability of Canola Oil Under Thermal Condition. *Journal of food processing and preservation*, 40 (3): 531-540.
30. Noshad, M., Mohebbi, M., Koocheki, A., Shahidi, F. 2015. Microencapsulation of vanillin by spray drying using soy protein isolate-maltodextrin as wall material. *Flavour and Fragrance journal*, 30: 387-391.
31. Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C. and Zou, X. 2004. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydr Research*, 339: 2693-2700.
32. Rafieian-Kopaei, M. and Baradaran, A. 2013. Rafieian M. Oxidative stress and the paradoxical effects of antioxidants. *Journal of Research in Medical Sciences*, 18(7):628.
33. Rajam, R., Karthik, S., Pathasasarathi, G., Josef, S. and Anandharamkrishnan, G. 2012. Effect of whey protein-alginat wall systems on survival of micro encapsulated lactofacillus plantarum in simulated gastrointestinal conditions. *Journal Funct. Foods*,4:891-898.
- antimicrobial activities of menthe pulegium leaves extraction against foodborn pathogens. *Journal of food safety*, 33: 239-246.
19. Gibbs, M., Vogt, E. and Weiss, J. 2012. Encapsulation of polyphenolic grape seed extract in polymer-coated liposomes. *Food and Function*, 3:246-254.
20. Hassanpour, H., Khavari-Nejad, R., Niknam, V., Najafi, F., Razavi, K.H. 2012. Effects of penconazole and water deficit stress on physiological and antioxidative responses in pennyroyal (*Mentha pulegium* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 34: 1537-49.
21. Hosseini, S. F., Ramezanzade, L., Nikkhah, M. 2017. Nano-liposomal entrapment of bioactive peptidic fraction from fish gelatin hydrolysate. *Int. J. Biol. Macromol*, 105(1):1455-1463.
22. Iqbal, T., Hussain, A.I., Chatha, S.A., Naqvi, S. A., and Bokhari, T. H. 2013. Antioxidant Activity and Volatile and Phenolic Profiles of Essential Oil and Different Extracts of Wild Mint (*Mentha longifolia*) from the Pakistani Flora. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 536490.
23. Jalali, M., Ariaii, P. and Fattahi, E. 2016. Effect of alginate/carboxyl methyl cellulose composite coating incorporated with clove essential oil on the quality of silver carp fillet and *Escherichia coli* O157:H7 inhibition during refrigerated storage. *J Food Sci Technol*, 53(7): 757-765.
24. Javadian, S. R., Shahosseini, S. R. and Ariaii, P. 2017. The effects of liposomal encapsulated thyme extract on the quality of fish mince and *Escherichia coli* O157: H7 inhibition during refrigerated storage. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 26 (1): 115-123.
25. Joye, I.J., Davidov-Pardo, G. and McClements, D. J. 2015. Encapsulation of resveratrol in biopolymer particles produced using liquid antisolvent precipitation. Part 2: Stability and functionality. *Food Hydrocolloids*, 49:127-134.

37. Roginsky, V. and Lissi, E.A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92: 235 - 54.
38. Safari, R., Shahosseini, S.R., Javadian, S.R. 2018. Antibacterial and antioxidant effects of the Echinophora cinerea extract on Bighead carp (*Aristichthys nobilis*) fillet during two storage conditions. *Journal of AquatCaspian Sea*, 3(2): 13–24.
39. Shahosseini, S.R., Safari, R., Javadian, S.R., Habibi, F. 2019. Effect carboxymethyl cellulose coating with Anethum graveolens extract on oil uptake and preserving the quality of fried Bighead carp (*Aristichthys nobilis*) fillet. *Journal of AquatCaspian Sea*, 4(2):37–46.
34. Rashidaie Abandansarie, S. S., Ariaai, P. and Charmchian Langerodi, M. 2019. Effects of encapsulated rosemary extract on oxidative and microbiological stability of beefmeat during refrigerated storage. *Food Science & Nutrition*, 00,1–10.
35. Rezaei Savadkouhi, N., Ariaai, P., Charmchian Langerodi, M. 2020. The effect of encapsulated plant extract of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) in biopolymer nanoemulsions of Lepidium perfoliatum and Orchis mascula on controlling oxidative stability of soybean oil. *Food Sci Nutr*, 8:1264–1271.
36. Robert, P., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J., Saenz, C. 2015. Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International journal of food science & technology*, 45:1386-1394.

(Original Research Paper)
Evaluation of Antioxidant, Anti-cancer and Antibacterial Properties of Pennyroyal (*Mentha pulegium* L) Extract and Nano-Extract

Reza Mahdizadeh Moghaddam¹, Peiman Ariayi^{2*}, Mohammad Ahmady²

1-Ph.D student of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

2-Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

Received: 13/10/2020

Accepted:07/02/2021

Abstract

In the present study, the antioxidant, anti-cancer and antibacterial properties of *Mentha pulegium* L extract and nano-extract were investigated. For this purpose, pennyroyal extract was extracted using ultrasound method and the amounts of phenolic compounds and chemical compounds of the extract were measured. The results showed that the amount of total phenolic compounds in pennyroyal extract was 75.64 ± 1.25 mg/ g gallic acid per gram and the most components of the extract included cis-piperitone epoxide (28.25%), pulegone (19.98%), Menthone (13.89%) and Piperitenone oxide (9.95%). The extract was coated with maltodextrin-whey protein concentrate and the properties of the nano-extract including nanoparticle size, zeta potential and microcoating efficiency were determined. According to the results, the particle size of pennyroyal extract was equal to 100.14 ± 5.89 nm, the zeta potential was equal to 17.44 ± 0.52 mV and the microcoating efficiency was equal to $60.06 \pm 3.11\%$. The results of the electron microscope showed that the structure of the nanostructure is a structure without the presence of pores and cracks, obvious defects. Also, the antioxidant properties of the extract and nano-extracts were determined by free radical scavenging of DPPH and the regenerative power of iron, the antibacterial properties through the growth of diameter against pathogenic bacteria and the anti-cancer properties against SW742 cells (colon cancer cells). The results showed that the extract and nano-extract had high antimicrobial properties and with increasing the concentration of the extract, the antioxidant and anticancer activity of the extract increased and the antimicrobial, anticancer and antioxidant activity of the nano extract was significantly higher than extract ($P < 0.05$). Based on the results of this study, pennyroyal nano extract can be a suitable alternative to common synthetic antimicrobial and antioxidant compounds.

Keywords: Ultrasound, Whey Protein Concentrate, Pennyroyal Extract, Microencapsulation, Maltodextrin.

*Corresponding Author: p.aryaye@yahoo.com