تأثیر روش‌های مختلف آبزدایی روی پروفایل ترکیبات شیمیایی و کارآیی ضدباکتریایی اسانس نعناع فلفلی علیه باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* در شرایط In vitro

محسن مختاریان[1*]

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران.

اطلاعات مقاله

دریافت مقاله: ۰۱/۰۶/۰۵

پذیرش مقاله: ۰۱/۰۶/۲۳

کلمات کلیدی:

نعناع فلفلی

خشک کردن

انتشار دیسک

استافیلوکوکوس آرئوس

چکیده

مقدمه: نعناع فلفلی یکی از گیاهان دارویی ارزشمند با خواص ضدمیکروبی و ضداکسیدانی قوی بوده که کاربردهای متنوعی در صنایع غذایی دارد.

روش‌ها: برگ‌های تازهٔ نعناع فلفلی به‌صورت تک لایه توسط روش‌های مختلف خشک کردن (خورشیدی، آفتابی و سایه) فرآوری شد. سپس تأثیر روش‌های مختلف خشک کردن روی کیفیت و کمیت ترکیبات مؤثرهٔ اسانس توسط دستگاه GC-MS ارزیابی شد. همچنین، قدرت ضدباکتریایی اسانس یاد شده در برابر باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* به روش انتشار دیسک مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج: نتایج نشان داد که مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس نعناع فلفلی شامل منتون، منتول، ایزومنتول، منتوفوران، پولِگون و پیپریتون می‌باشند. بیشترین میزان هالهٔ عدم رشد باکتری در مورد اسانس استحصال شده از برگ‌های نعناع فلفلی خشک شده به روش خورشیدی مشاهده شد (هالهٔ عدم رشد معادل ۵۵ میلی متر).

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی، روش خشک کردن یکی از مراحل اصلی فرآوری گیاهان دارویی بوده که تأثیر چشم‌گیری روی ترکیبات زیست‌فعال (عصاره و اسانس) گیاهان دارویی دارد. بنابراین بکارگیری روش صحیح خشک کردن ضروری می‌باشد.

استناد (ونکوور): مختاریان م. تأثیر روش‌های مختلف آبزدایی روی پروفایل ترکیبات شیمیایی و کارآیی ضدباکتریایی اسانس نعناع فلفلی علیه باکتری استافیلوکوکوس آرئوس در شرایط In vitro. مجله پژوهشنامه حلال. تابستان ۱۴۰۱؛۵(۲):۵۴ -۶۴.

۱- مقدمه

امروزه بسیاری از دانشمندان، پژوهشگران، کارخانجات و شرکت‌های داروسازی، تحقیق و پژوهش روی گیاهان دارویی را در اولویت برنامه‌های خود قرار داده‌اند. ایران نیز با شرایط آب و هوایی بسیار متنوع، از فلور گیاهی غنی برخوردار است و در سال‌های اخیر فعالیت‌های ارزشمندی همگام با تلاش‌های جهانی در زمینه گسترش کاربرد گیاهان دارویی و داروهای گیاهی توسط مؤسسات علمی تحقیقاتی و به‌ویژه دانشگاه‌های سراسر کشور صورت گرفته است(۱-۲).

ترکیبات فرار موجود در اسانس گیاهان به‌طور مؤثری تحت تأثیر روش‌های فرآوری می‌باشند. از مهم‌ترین و در عین حال رایج‌ترین تمهیدات فیزیولوژی پس از برداشت گیاهان دارویی عملیات خشک کردن اندام‌های گیاهی (دارویی) جمع‌آوری شده می‌باشد(۳). این فرآیند شامل حذف رطوبت با استفاده از عمل تبخیر تا حد رسیدن به یک آستانه ایمن است تا بتوان محصول را برای مدت طولانی انبار کرد و فعالیت‌های آنزیمی، میکروارگانیسم‌ها و مخمرها را در آن متوقف نمود(۴). متأسفانه به دلیل ناآگاهی مؤسسات و اشخاص حقیقی درگیر در تولید و فرآوری گیاهان دارویی، روش صحیح خشک کردن گیاهان معمولاً رعایت نمی‌گردد. نتیجهٔ ناگزیر این امر کاهش محتوی، عملکرد و تغییر

* نویسنده مسئول: محسن مختاریان، آدرس پست الکترونیکی: mokhtarian.mo@riau.ac.ir ، شماره تماس: ۰۹۳۵-۲۶۰۱۷۸۸

This paper is open access under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license

https://doi.org/10.30502/h.2022.357777.1111

محسوس مادهٔ مؤثرهٔ گیاهان دارویی و به تبع آن کاهش اثرات درمانی و بیولوژیکی مواد مؤثره گیاهان فوق‌الذکر خواهد بود و همچنین باعث کاهش جدی آب و بروز واکنش‌های غیرمفید در مواد مؤثره گیاهان می‌گردد و تغییرات نامطلوبی را در مواد مؤثره گیاهان ایجاد می‌کند. تأثیرات براساس دمای خشک کردن گیاه، طول مدت خشک کردن و گونه گیاهی فرق می‌کند. کاهش میزان اسانس در همه گیاهان یکسان نبوده و به ساختمان شیمیایی اجزای اسانس بستگی دارد(۲-۳). بنابراین به‌کارگیری روش‌های مناسب خشک کردن، انبارداری و بسته‌بندی در گیاهان دارویی و افزایش کیفیت آن از مؤثرترین گزینه‌های کاهش حجم ضایعات و بهبود کیفیت محصول نهایی است(۳).

از جمله گیاهانی که از قدیم در طب سنتی به عنوان گیاهان دارویی مصرف می‌شده‌اند، گیاهان تیره نعناع می‌باشد، که بیشتر گونه‌های آن دارای ارزش دارویی، غذایی، آرایشی، بهداشتی و غیره هستند. نعناع فلفلی با نام علمی *Mentha piperita* و با نام عمومی *Peppermint* که در رده‌بندی گیاهی از تیره *Lamiaceae* راسته *Lamialse* و رده *Rosidae* می‌باشد، یک گیاه دورگه (هیبرید) است که بطور خودبه‌خودی در طبیعت بوجود آمده و والدین آن را *M. spicata* و *M. aquatica* ذکر کرده‌اند. نعناع فلفلی از جمله گیاهان دارویی بسیار مهم است که مصارف گسترده‌ای در صنایع دارویی، غذایی و بهداشتی دارد(۲). برگ‌های خشک و تازه نعناع از منابع آشپزخانه‌ای[1] بوده که در خوش‌بو کردن تنفس، نوشیدنی‌ها، ضدعفونی‌کنندهٔ دهان[2] (دهان شویه)، خمیردندان، نوشیدنی‌ها، ژله‌ها، شربت‌ها، بستنی، شکلات نعناعی برای چای[3] و همچنین برای تولید چای تورگ[4] (یکی از چای‌های محبوب در کشورهای آفریقایی و عربی) به کار می‌رود. پژوهش‌های مختلفی در زمینهٔ ارزیابی کمی و کیفی و نیز خصوصیات ممانعت‌کنندگی از رشد باکتری‌ها، روی اسانس‌های دارویی (به‌ویژه نعناع) صورت گرفته است که در ادامه به بررسی آنها پرداخته می‌شود.

سینگ و همکاران (۲۰۱۵) تاثیر حلال‌های مختلف را روی خصوصیات ضداکسیدانی و ضدباکتریایی برگ نعناع فلفلی مطالعه نمودند. نتایج نشان داد که استفاده از حلال کلروفرم در استخراج منجر به ظرفیت ضداکسیدانی (۹۱/۲٪) و گیرندگی رادیکال آزاد DPPH (۹۱٪/۸) بیشتری گردید. همچنین بیشترین خاصیت ضدباکتریایی در برابر باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس*، *استافیلوکوکوس پیوژنز*، *اشریشیاکلی* و *کلبسیلا پنومونیا* به‌ترتیب در حلال‌های استخراجی پترولیوم اتر و اتیل استات، کلروفرم، اتیل استات و اتیل استات مشاهده شد(۵). قاسمی پیربلوطی و همکاران (۲۰۱۳) تاثیر روش‌های خشک کردن را روی ویژگی‌های کمی و کیفی روغن‌های ضروری دو نوع ریحان مطالعه کردند. نمونه‌های سبز و خالص ریحان در سایه، آفتاب، آون (در دمای ۴۰ و ۶۰ درجه سانتیگراد)، مایکروویو در توان ۵۰۰ وات و خشک‌کن انجمادی خشک شدند. نتایج نشان داد که بیشترین راندمان روغن‌های ضروری در روش خشک کردن در سایه و سپس در روش خشک کردن انجمادی مشاهده شد. درصد متیل کاویکول موجود در اسانس، به‌طور معنی‌دار هنگام استفاده از آون در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد و یا مایکروویو کاهش یافت(۶). فیجی‌اِل و همکاران (۲۰۱۰) تأثیر روش خشک کردن (جابجایی هوای داغ در ۶۰ درجه سانتیگراد، خشک کردن با مایکروویو تحت خلاء و روش ترکیبی جابجایی-مایکروویو تحت خلاء) را روی ترکیبات فرار آویشن (*Origanum vulgare*) مطالعه نمودند. نتایج نشان داد که ۳۴ ترکیب فرار در این گیاه دارویی شناسایی گردید که بخش اعظم آن را کارواکرول، تیمول و گاما-ترپینِن تشکیل می‌دهد. غلظت ترکیبات فرار کل در آویشن تازه (۳۳/۰ g/kg) بوده که طی خشک کردن به‌طور معنی‌دار کاهش می‌یابد که به نوع روش خشک کردن وابسته می‌باشد. مقدار ترکیبات فرار برای روش‌های خشک کردن جابجایی هوای داغ، خشک کردن با مایکروویو تحت خلاء و روش ترکیبی جابجایی-مایکروویو تحت خلاء به‌ترتیب ۱۰/۲g/kg،

[1] Culinary Source
[2] Antiseptic Mouth Rinses
[3] Mint Chocolate Teas
[4] Touareg Tea

g/kg ۲۷/۹ و g/kg ۱۳/۱ تعیین شد. به‌طور کلی نتایج نشان داد که خشک کردن به روش مایکروویو تحت خلاء به‌عنوان بهترین روش خشک کردن معرفی شد(۷).

کاراگوزلو و همکاران (۲۰۱۱) تاثیر اسانس‌های نعناع و ریحان را روی بقاء باکتری *اشریشیاکلی* O157:H7 و *سالمونلا تیفی ماریوم* در نگهداری خرفه و کاهو به‌صورت تازه مطالعه نمودند. در این مطالعه از غلظت‌های ۰/۰۱ تا ml/L ۰/۰۸ اسانس‌های روغنی استفاده شد. بدین منظور نمونه‌ها به مدت ۱۰ و ۱۵ دقیقه در تیمارهای ضدعفونی‌کنندهٔ فوق قرار گرفته و سپس به‌صورت هوازی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته نگهداری شدند. بررسی‌ها نشان داد که تاثیر ضدمیکروبی اسانس روغنی نعناع روی پاتوژن‌ها بیشتر از اسانس روغنی ریحان بود(۸).

محمودزاده و همکاران (۱۳۹۵) اثر اسانس گیاه آویشن کوهی یا کهلیک اوتی را روی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و حسی دوغ مطالعه نمودند. نتایج آنالیز GC-MS نشان داد که تیمول (۵۱/۱٪)، پاراسیمن (۱۳/۷۸٪) و گاما-ترپینن (۹٪/۰۳) بیشترین درصد ترکیبات را تشکیل می‌دهند. اسانس در غلظت‌های پایین اضافه شده به دوغ در همان روزهای اولیه باکتری اشریشیاکلی را از بین برد و همچنین حداقل غلظت بازدارنده اسانس µg/ml ۴۷۰ بود(۹). کاظم‌الوندی و همکاران (۱۳۸۹) ترکیب شیمیایی و اثر ضدمیکروبی اسانس گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) را بررسی نمودند. میزان حداقل غلظت بازدارندگی اسانس روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس آرئوس*، *اشرشیاکلی* و *سالمونلا تیفی* به‌ترتیب ۱۵۰، ۳۰۰ و ppm ۲۵۰ بدست آمد(۱۰).

فدائی و همکاران (۱۳۸۸) اثر ضدمیکروبی اسانس نعناع فلفلی را با بنزوات سدیم مقایسه نمودند. در این تحقیق حداقل غلظت بازدارندگی اسانس نعناع فلفلی و یک نگهدارنده شیمیایی مورد مصرف در صنایع غذایی (بنزوات سدیم) علیه سه میکروارگانیسم *اشریشیاکلی*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *سالمونلا تیفی موریوم* تعیین گردید. نتایج آزمایش میکروبی نشان داد که حداقل غلظت بازدارندگی اسانس نعناع فلفلی برای سه میکروب مذکور یکسان و برابر با ppm ۱۰۰۰ می‌باشد. اما حداقل غلظت بازدارندگی بنزوات سدیم روی باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* برابر با ppm ۳۰۰۰ و روی باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *باسیلوس سوبتیلیس* برابر با ppm ۳۵۰۰ به‌دست آمد. در مجموع نتایج بیان‌گر خاصیت ضدمیکروبی بالاتر اسانس نعناع فلفلی نسبت به بنزوات سدیم است(۱۱).

هدف از این پژوهش بررسی تأثیر روش‌های مختلف آبزدایی روی کیفیت و کمیت اسانس نعناع فلفلی و ارزیابی تأثیر اسانس استحصالی از روش‌های مختلف خشک کردن، روی میزان ممانعت‌کنندگی از رشد باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- آماده‌سازی ماده اولیه

نعناع فلفلی تازه (Mentha piperita L.) به‌عنوان مادهٔ خام اولیه به‌صورت روزانه از یکی از مزارع اطراف سبزوار جمع‌آوری گردید. قبل از خشک کردن، ابتدا برگ‌ها از ساقه جدا و برگ‌های پژمرده و خراب از سایر برگ‌ها جداسازی گردید. جهت جلوگیری از حذف رطوبت سطحی و پژمردگی، برگ‌های تازه نعناع در کیسه‌های پلاستیکی از جنس پلی اتیلن بسته‌بندی شدند. سپس تا زمان شروع آزمایشات در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد(۱۲).

۲-۲- روش‌های مختلف آبزدایی

برای خشک کردن ابتدا نعناع‌های مورد استفاده دو ساعت قبل از شروع خشک کردن به‌منظور تعدیل دمایی با محیط، بیرون از یخچال قرار گرفتند. مقدار نعناع تازهٔ مورد استفاده در هر روش خشک کردن حدوداً kg ۲/۵ بود. روش‌های خشک کردن مورد مطالعه به‌صورت زیر می‌باشد:

- خشک کردن در سایه: برگ‌های تازه نعناع به‌صورت تقریباً تک لایه (ضخامت بستر حدوداً ۲ سانتی‌متر) روی یک پارچه نخی پهن و در هوای آزاد قرار گرفت و تا رسیدن به وزن ثابت خشک گردید. میانگین سرعت باد، دمای روز و رطوبت نسبی محیط طی دورهٔ خشک کردن طبق گزارشات

ایستگاه هواشناسی منطقه به‌ترتیب ۲/۹۸ m/s، ۳۲/۶۶ درجه سانتی‌گراد، ۱۲/۶۹٪ گزارش شد.

• خشک کردن آفتابی: برگ‌های تازه نعناع به‌صورت تقریباً تک لایه (ضخامت بستر حدوداً ۲ cm) روی یک پارچه نخی پهن و در معرض تابش مستقیم خورشید قرار گرفت و تا رسیدن به وزن ثابت خشک گردید. میانگین سرعت باد، دمای روز، رطوبت نسبی محیط و شدت تابش خورشید طی دوره خشک کردن طبق گزارشات ایستگاه هواشناسی منطقه به‌ترتیب ۰ m/s، ۲۹/۰۶ درجه سانتی‌گراد، ۲۳٪/۹۴ و ۹۵۶/۹۵ W/m^2 گزارش شد.

• خشک کردن خورشیدی: برگ‌های تازه نعناع به‌صورت تقریباً تک لایه روی سینی‌های خشک‌کن پهن گردید و توسط هوای گرم شده توسط جمع‌کننده (کلکتور)، تا رسیدن به وزن ثابت خشک گردید. میانگین شدت تابش خورشید طی دوره خشک کردن طبق گزارشات ایستگاه هواشناسی منطقه W/m^2 ۸۶۰/۳۸ گزارش شد.

۲-۳- آزمون‌های کیفی

۲-۳-۱- میزان رطوبت

میزان رطوبت برگ‌های نعناع تازه و خشک شده مطابق استاندارد AOAC به شمارهٔ ۹۳۴/۰۶ انجام گرفت(۱۳).

$$MC(\%wb) = \frac{W_i - W_f}{W_i} \times 100 \qquad (۱)$$

در این معادله، MC میزان رطوبت بر پایه‌تر (٪)، W_i وزن محصول تازه (kg) و W_f وزن محصول خشک (kg) است.

۲-۳-۲- بازده اسانس و شناسایی ترکیبات اسانس

استخراج روغن‌های ضروری برگ‌های خشک شده و تازهٔ نعناع، با استفاده از تقطیر با آب توسط دستگاه کِلِونجر انجام گردید. بدین منظور ۲۰۰g نمونه خشک شده (برای نمونهٔ تازه نیز ۲۰۰g نمونه انتخاب شد) به‌صورت دقیق توزین و به بالن ژوژه حاوی ۱۰۰۰ml آب مقطر اضافه گردید و فرآیند استخراج به مدت ۲ ساعت ادامه یافت. بازده روغن ضروری با توجه به میزان مواد خشک نمونه بر حسب (ml/kg d.m.) تعیین شد. بازده روغن ضروری در سه تکرار انجام گرفت. عمل آبگیری اسانس استحصال شده در معرض سولفات سدیم بدون آب (Na_2So_4) انجام و سپس در شیشه‌های کوچک قهوه‌ای رنگ درب‌بندی و در فریزر با دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد تا زمان آزمایشات بعدی نگهداری گردید(۱۲).

شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهندهٔ روغن ضروری نعناع خشک شده به روش کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (GMI، Agilent 6890 و Agilent 5973N، آمریکا) اندازه‌گیری شد. مشخصات کاری دستگاه شامل: نوع ستون BPX5، طول ستون ۳۰m، قطر داخلی ستون ۰/۲۵µ، ضخامت لایه ۰/۲۵µm، دمای اولیهٔ ستون ۵۰ درجه سانتی‌گراد، دمای نهایی ستون۳۰۰ درجه سانتی‌گراد، دتکتور Mass و گاز حامل هلیم ۹۹/۹۹۹٪ می‌باشند(۱۲).

۲-۴- اثرات ضدباکتریایی

جهت بررسی اثر ضدباکتریایی اسانس‌های استخراج شده (در روش‌های مختلف خشک کردن) از گونهٔ *استافیلوکوکوس اورئوس*[5] (PTCC ۱۱۱۲) استفاده شد که از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. بدین منظور از کشت ۲۴ ساعتهٔ تازهٔ باکتری (سوسپانسیون تهیه شده دارای $۱/۵\times۱۰^{۶}$cfu/ml باکتری بود که به روش تراکم نوری یا OD در طول موج ۶۲۵ nm تعیین شد) مورد نظر به میزان ۰/۱ ml به محیط کشت مولر هینتون آگار انتقال داده شد و به روش کشت چمنی (توسط پخش‌کننده پهن شد) یک کشت یکنواخت در سطح پلیت تهیه شد. سپس به‌منظور سنجش هالهٔ عدم رشد اطراف مواد مهارکننده (یعنی اسانس نعناع استحصال شده، آنتی‌بیوگرام آنتی‌بیوتیک *Ciprofloxacin* و منتول خالص) از روش انتشار دیسک استفاده شد (لازم به ذکر است که آنتی‌بیوتیک *Ciprofloxacin*، یک آنتی‌بیوتیک اختصاصی برای ممانعت از رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* است). در ادامه، بعد

[5] *Staphylococcus aureus* (PTCC 1112)

از کشت باکتریایی در سطح پلیت، برای هر اسانس به‌صورت مجزا، یک پلیت آماده و دیسک‌های شاهد (به قطر ۶ mm) روی سطح پلیت در شرایط کاملاً سترون، منتقل شد. سپس غلظت‌های مختلفی از اسانس توسط حلال DMSO[6] تهیه (از ۰/۶۲۵ تا ۹۰۰mg/ml) و به میزان ۲۰µl به هر کدام از دیسک‌ها (یعنی ۶mm disk ۲۰/µL) توسط سمپلر تزریق شد. آنگاه، پلیت‌ها به‌منظور رشد باکتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در گرمخانه گذاشته شدند. همچنین، به روشی مشابه، در یک پلیت جداگانه، آزمون فوق روی منتول خالص (یعنی ۶mm disk ۲۰/µL)، آنتی‌بیوتیک *Ciprofloxacin* و حلال ٪۵ DMSO (به‌منظور بررسی و تأیید عدم آلودگی حلال و تأثیر آن روی رشد باکتری فوق) نیز انجام و نتایج با گرمخانه‌گذاری در شرایط فوق مشاهده شد. پس از این مدت با اندازه‌گیری قطر هالهٔ عدم رشد یا ناحیهٔ بازداری (*IZ*) در اطراف دیسک‌ها حساسیت یا مقاومت باکتری مورد نظر تعیین شد (هاله‌های عدم رشد بیش از ۱۲mm بیانگر حساسیت باکتری به عصاره است). این آزمون در سه تکرار صورت گرفته و میانگین نتایج گزارش گردید(۱۲).

۵-۲- تجزیه و تحلیل آماری

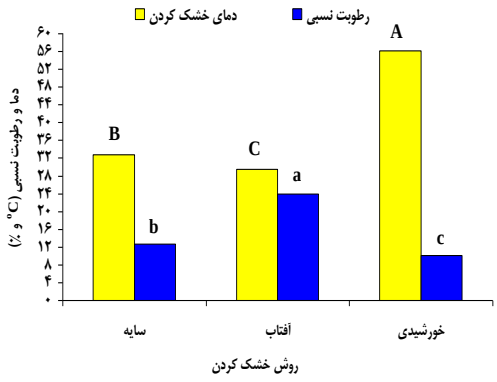
آنالیز آماری با استفاده از طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح اطمینان ۹۹ درصد انجام گرفت. جهت آنالیز آماری از نرم افزار Statistix نسخه ۸ استفاده گردید. کلیهٔ آزمون‌های کیفی در ۳ تکرار انجام گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تغییرات دما و رطوبت نسبی طی خشک کردن

با استفاده از حسگرهای دما و رطوبت نسبی، تغییرات دما و رطوبت نسبی هوا طی دورهٔ خشک کردن نعناع فلفلی پایش گردید. در شکل ۱ مقادیر میانگین دما و رطوبت نسبی هوا در حالت‌های مختلف خشک کردن نعناع فلفلی ثبت و مورد مقایسه قرار گرفت. همان‌طور که مشاهده می‌شود، بیشترین میانگین دمای هوای ثبت شده طی خشک کردن، در روش خشک کردن با سامانه خشک‌کن خورشیدی گزارش گردید (نسبت به روش‌های خشک کردن در آفتاب و سایه به ترتیب حدود ۴۷/۴۵٪ و ۴۱/۵۸٪ بیشتر بود). همان‌طور که از شکل پیداست، با افزایش دمای هوای خشک کردن، از میزان رطوبت نسبی هوا کاسته شده، به طوری که بیشترین میزان رطوبت نسبی با اختلاف معنی‌دار ($p<۰/۰۱$) در روش خشک کردن در آفتاب مشاهده شد (کمترین دمای هوای خشک کردن، معادل ۲۹/۵۳ درجه سانتی‌گراد، در این روش مشاهده شد).

مختاریان و همکاران (۲۰۱۶) فرآیند خشک کردن پسته را در یک خشک‌کن خورشیدی مجهز به سیستم بازگردش هوا بررسی و آنها میانگین دمای هوای خشک کردن را در دامنهٔ ۳۵ تا ۵۲ درجه سانتی‌گراد گزارش نمودند که نتایج این پژوهش را تأیید می‌کند(۱۳). آکپینار (۲۰۱۰) خشک کردن برگ نعناع را توسط یک خشک‌کن خورشیدی مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که میانگین دمای هوای ثبت شده در خشک کردن برگ‌های نعناع معادل ۵۸/۹ درجه سانتی‌گراد بود که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد(۱۴). قاسمی پیربلوطی و همکاران (۲۰۱۳) تأثیر فرآیند خشک کردن را روی ویژگی‌های کیفی و کمی اسانس دو گونهٔ ریحان مطالعه نمودند. آنها دمای ۴۰ تا ۶۰ درجه



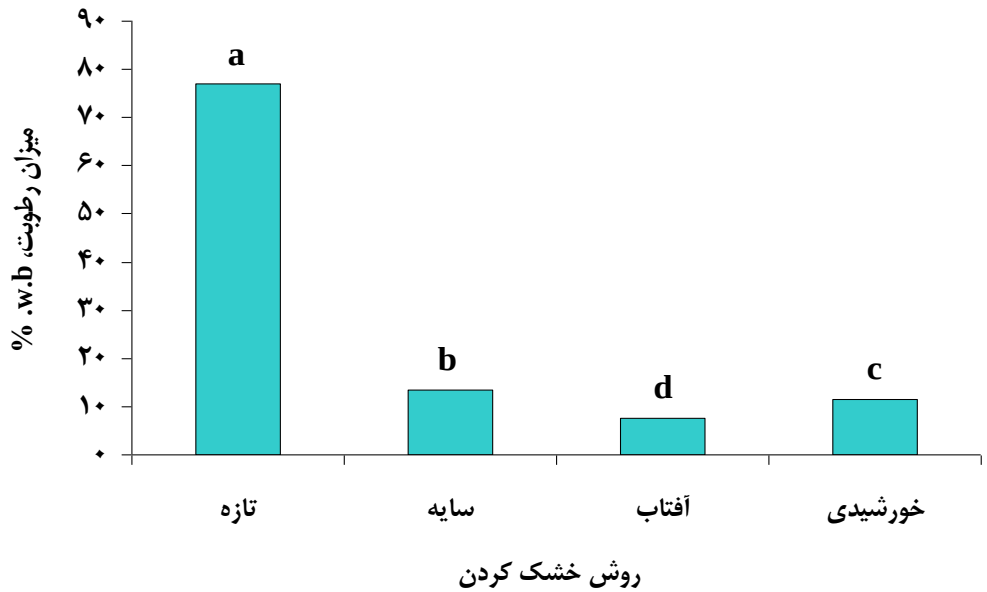
شکل ۱. مقایسه میانگین تغییرات دما (با حروف لاتین بزرگ نمایش داده شده است) و رطوبت نسبی هوا (با حروف لاتین کوچک نمایش داده شده است) طی خشک کردن برگ‌های نعناع فلفلی در شرایط مختلف فرآوری.

[6] Dimethyl sulfoxide [DMSO or $2SO(CH_3)$]

سانتی‌گراد را برای خشک کردن بخش‌های هوایی ریحان پیشنهاد نمودند(۶).

۳-۲- میزان رطوبت

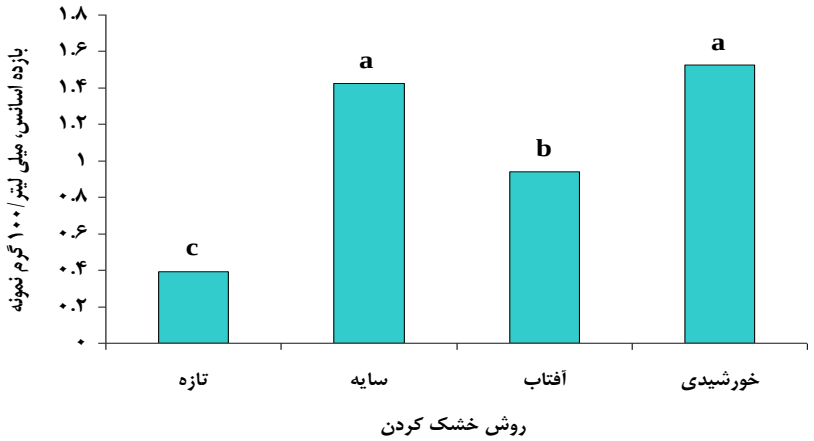
مقایسه میانگین تأثیر نوع روش خشک کردن روی میزان رطوبت نعناع فلفلی خشک شده در شکل ۲ ارائه شده است. همان‌طور که از نمودار مشخص است، نوع روش خشک کردن تأثیر معنی‌دار ($p<۰/۰۱$) روی میزان رطوبت نعناع خشک شده دارد. به‌طوری‌که بیشترین میزان رطوبت در برگ نعناع تازه مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد که کمترین میزان رطوبت در روش خشک کردن سنتی در آفتاب مشاهده گردید. این حالت به‌دلیل تابش مستقیم نور خورشید و گرم شدن سطحی برگ‌های نعناع بوده (یعنی بیشتر بودن تنش حرارتی) که سبب خشک شدن سریع رطوبت سطحی و انتقال سریع‌تر رطوبت از قسمت‌های درونی بافت برگ‌های نعناع توسط ویژگی موئینه شده است. نتایج مشابه درخصوص خشک کردن ارقام مختلف برگ نعناع، در پژوهش‌های پیشین گزارش گردید که نتایج ارائه شده در این مطالعه را تأیید می‌نماید. آکپینار (۲۰۱۰) فرآیند خشک کردن نعناع را در دو حالت خشک کردن با خشک‌کن خورشیدی و سنتی در آفتاب مورد بررسی قرار داد. نتایج این محقق نشان داد که میزان رطوبت نهایی برگ‌های نعناع خشک شده حدوداً ۴/۷۶ ٪ w.b. است(۱۴). دویمز (۲۰۰۶) در پژوهشی گزارش نمود که میزان رطوبت اولیه و نهایی برگ‌های نعناع خشک شده به‌ترتیب ۸۴/۷ ٪ w.b. و ۱۰ ٪ w.b. می‌باشد(۱۵). مولر (۱۹۸۹) فرآیند خشک کردن برگ‌های نعناع را در یک خشک‌کن خورشیدی گلخانه‌ای مورد بررسی قرار داد. نتایج این محقق حاکی از آن بود که میزان رطوبت اولیه و نهایی نعناع خشک شده به‌ترتیب ۸۰ ٪ w.b. و ۱۱ ٪ w.b. می‌باشد(۱۶).



شکل ۲. تأثیر روش‌های مختلف آبزدایی روی میزان رطوبت برگ نعناع فلفلی.

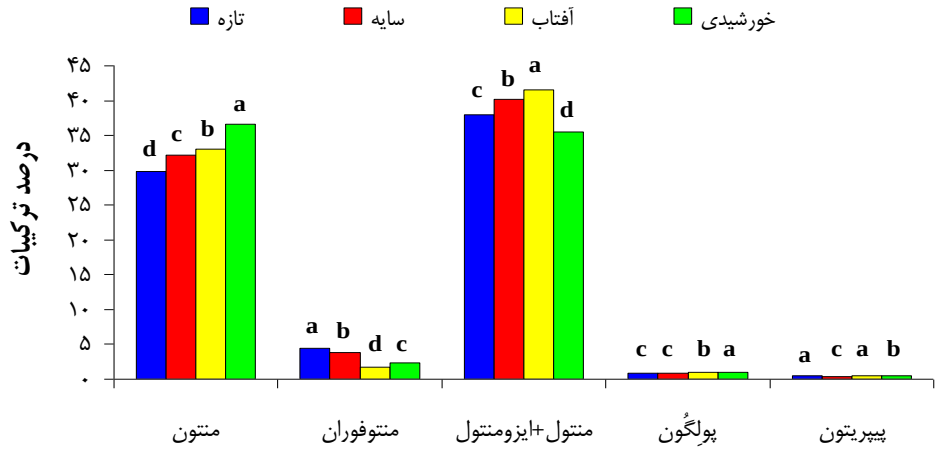
۳-۳- بازده و ترکیبات اسانس

مقایسه میانگین تأثیر نوع روش خشک کردن روی استحصال اسانس روغنی از برگ نعناع فلفلی خشک شده در شکل ۳ ارائه شده است. همانطور که از نمودار مشخص است، نوع روش خشک کردن تأثیر معنی‌دار ($p<۰/۰۱$) روی استحصال اسانس روغنی از برگ نعناع خشک شده دارد. به‌طوری‌که بیشترین استحصال اسانس روغنی از برگ نعناع فلفلی خشک شده به روش خورشیدی مشاهده شد که تفاوت آماری معنی‌دار با برگ نعناع فلفلی خشک شده به روش سنتی در سایه نداشت ($p>۰/۰۱$). همچنین نتایج نشان داد که کمترین میزان اسانس روغنی استحصال شده در نمونه برگ نعناع فلفلی تازه مشاهده شد.

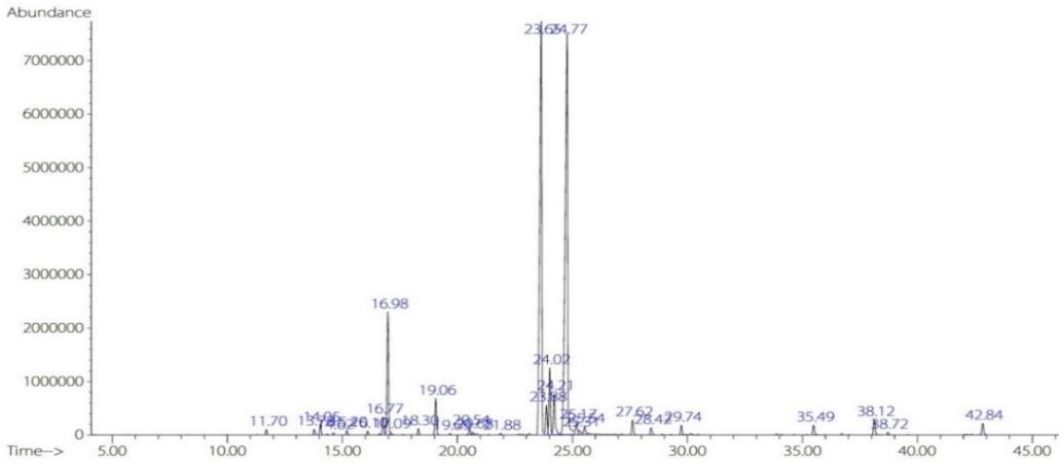


شکل ۳. تأثیر روش‌های مختلف آبزدایی روی استحصال اسانس روغنی از برگ نعناع فلفلی.

مقایسه میانگین تأثیر نوع روش خشک کردن روی مهمترین ترکیبات شیمیایی شناسایی شده در اسانس روغنی استحصال شده از بخش‌های هوایی نعناع فلفلی در شکل ۴ ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، مهمترین ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس نعناع فلفلی شامل منتون، منتول و ایزومنتول، منتوفوران، پولِگون و پیپریتون می‌باشند. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که، نوع روش خشک کردن تأثیر معنی‌دار ($p<۰/۰۱$) روی میزان ترکیبات شیمیایی اسانس روغنی نعناع فلفلی دارد. بررسی تأثیر روش خشک کردن روی میزان منتون و پولِگون نشان داد که بیشترین و کمترین میزان این ترکیبات به‌ترتیب در روش خشک کردن خورشیدی و اسانس حاصل از نمونهٔ نعناع فلفلی تازه مشاهده شد. در مورد تأثیر روش خشک کردن روی میزان ترکیب منتوفوران، بیشترین و کمترین میزان به‌ترتیب در نمونهٔ نعناع فلفلی تازه و نعناع فلفلی خشک شده به روش خشک کردن خورشیدی مشاهده شد. بیشترین میزان ترکیبات منتول و ایزومنتول در نعناع فلفلی خشک شده به روش سنتی در آفتاب مشاهده شد. به‌علاوه نتایج نشان داد که بیشترین میزان پیپریتون در نعناع فلفلی خشک شده به روش سنتی مشاهده شد که اختلاف آماری معنی‌دار با اسانس حاصل از نمونهٔ نعناع فلفلی تازه نداشت. به‌طور کلی می‌توان چنین ارزیابی نمود که در درجهٔ اول منتول و ایزومنتول و سپس منتون، مهمترین ترکیبات شناسایی شده در اسانس نعناع فلفلی هستند.



الف)



ب)

شکل ۴. (الف) مقایسه میانگین مهمترین ترکیبات شناسایی شده در اسانس نعناع فلفلی و (ب) کروماتوگرام بدست آمده از تزریق اسانس نعناع فلفلی به دستگاه GC-MS.

۴-۳- ضدباکتریایی

در این پژوهش به‌منظور بررسی تأثیر روش‌های مختلف خشک کردن روی قابلیت ممانعت‌کنندگی اسانس نعناع فلفلی، اسانس استحصالی از هر روش خشک کردن در غلظت‌های مختلف (۹۰۰-۰/۹ mg/ml) روی باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس آرئوس* (PTCC 1112) مورد آزمون قرار گرفت. نتایج آزمون بر اساس میزان هالهٔ عدم رشد یا ناحیهٔ بازدانده (IZ) گزارش گردید. نتایج این آزمون در جدول ۱ ثبت شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، در غلظت‌های کمتر از ۰/۹ mg/ml در کلیهٔ اسانس‌های استحصالی، هالهٔ عدم رشد مشاهده نشد و در غلظت بالاتر از ۹ mg/ml، فقط هالهٔ عدم رشد در مورد اسانس بدست آمده از نعناع فلفلی تازهٔ مشاهده شد. نتایج نشان داد که بیشترین میزان هالهٔ عدم رشد در مورد اسانس استحصال شده از برگ‌های نعناع فلفلی خشک شده به روش خورشیدی مشاهده شد (مثلاً در غلظت ۹۰۰ mg/ml، میزان هالهٔ عدم رشد ۵۵ mm). همچنین نتایج نشان می‌دهد که در غلظت یاد شده (یعنی ۹۰۰ mg/ml)، میزان هالهٔ عدم رشد در مورد اسانس استحصالی از برگ‌های نعناع فلفلی تازه نیز ۵۵ mm ثبت شد. این حالت بیان می‌دارد که روش خشک کردن توسط دستگاه خشک‌کن خورشیدی، توانسته است، تا جای ممکن ترکیبات مؤثر در بازدارندگی میکروبی را نسبت به سایر روش‌ها بهتر حفظ نماید (یعنی تقریباً مشابه با نمونهٔ شاهد) که مطابق با فرضیهٔ محققین است. به منظور بررسی دقیق‌تر تأثیر اسانس‌های استحصال شده از برگ‌های نعناع فلفلی خشک شده/تازه روی میزان بازدارندگی از رشد باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس*، از منتول خالص به‌عنوان استاندارد استفاده و نتایج با اسانس‌های بدست آمده از نعناع فلفلی مقایسه گردید. نتایج نشان داد که در غلظت‌های کم (یعنی ۲/۵ mg/ml)، هیچ گونه اثر بازدارندگی از رشد باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* مشاهده نشد. با این حال، استفاده از غلظت بالاتر (یعنی ۵۰ mg/ml)، توانست هالهٔ عدم رشد به میزان ۵۵ mm< را ثبت نماید. این نتایج نشان می‌دهد که، استاندارد منتول توانسته است با غلظت ۱۸ برابر کمتر (حدوداً ۹۴/۴۴٪ کمتر) از اسانس‌های استحصال شده از برگ‌های نعناع فلفلی خشک شده/تازه، هالهٔ عدم رشد مشابهی را به همراه داشته باشد که دور از انتظار محققین نیز نبود (یعنی هالهٔ عدم رشد حدوداً برابر با ۵۰ mg/ml). همچنین از آنتی‌بیوتیک اختصاصی Ciprofloxacin نیز به‌منظور ممانعت از رشد باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* استفاده شد. نتایج نشان داد که آنتی‌بیوتیک توانست میزان هالهٔ عدم رشد معادل با ۱۵ mm را در غلظت ۰/۰۱۲ mg/ml ثبت نماید (یعنی حدوداً ۹۹/۹۸٪ کمتر نسبت به اسانس استحصال شده از برگ‌های نعناع فلفلی خشک شده/تازه در غلظت ۹۰ mg/ml). همچنین از حلال DMSO (غلظت ۵٪) نیز به عنوان کنترل منفی استفاده

گردید و نتایج نشان داد که این حلال هیچ تأثیری روی هالهٔ عدم رشد باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* ندارد.

جدول ۱. ارزیابی تأثیر روش خشک کردن روی توانایی ممانعت‌کنندگی اسانس نعناع فلفلی روی باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* (PTCC ۱۱۱۲).

اسانس/آنتی بیوتیک/حلال	غلظت، mg/mL یا ٪	ناحیه بازدارنده یا IZ، mm
اسانس نعناع فلفلی تازه (شاهد)	۹۰۰	۵۵
	۹۰	۱۴
	۹	۱۲
	۰/۹	-
اسانس نعناع فلفلی خشک شده در سایه	۹۰۰	۵۳
	۹۰	۲۰
	۹	-
	۰/۹	-
اسانس نعناع فلفلی خشک شده در آفتاب	۹۰۰	۵۰
	۹۰	۱۰
	۹	-
	۰/۹	-
اسانس نعناع فلفلی خشک شده در خشک‌کن خورشیدی	۹۰۰	۵۵
	۹۰	۱۵
	۹	-
	۰/۹	-
منتول خالص	۲/۵	-
	۵۰	>۵۵
Ciprofloxacin	۰/۰۱۲	۱۵
DMSO (%)	۵	-

۴- نتیجه‌گیری

بیماری‌های غذازاد در نتیجه مصرف غذاهای آلوده به باکتری‌های عامل فساد و بیماری‌زاد به‌طور مستقیم در سلامت جامعه نقش دارد. از طرف دیگر، استفاده از مواد نگهدارندهٔ شیمیایی به‌منظور به تأثیر انداختن فساد مواد غذایی امروزه دارای کاربرد وسیعی می‌باشند. بنابراین با توجه به این مهم، و نیز بالا رفتن سطح آگاهی مصرف‌کنندگان در سطح جهانی، علاقهٔ چشمگیری به استفاده از مواد نگه‌دارندهٔ طبیعی نظیر اسانس‌ها شده است. ترکیبات فرار موجود در اسانس گیاهان دارویی به‌طور مؤثری تحت تأثیر روش‌های فرآوری (به‌ویژه خشک کردن) هستند. در این مطالعه تأثیر روش‌های مختلف خشک کردن روی کارآیی ضدباکتریایی اسانس نعناع فلفلی علیه باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* در شرایط In vitro مورد پژوهش قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود که خشک کردن به روش خورشیدی به‌دلیل شرایط مطلوب فرآوری (دما و رطوبت نسبی) توانست کیفیت و کمیت اسانس نعناع فلفلی را طی فرآوری حفظ نماید و بیشترین ناحیهٔ بازداری در جلوگیری از رشد باکتری یاد شده حاصل شد.

۵-تضاد منافع

نتایج حاصل از این مطالعه با منافع نویسندگان و محققان در تعارض نیست.

References

1.Ahmadi A. The effect of different drying methods and storage on content and compounds of peppermint essence (*Mentha piperita*). Thesis for MSc., Horticultural Sciences, medicinal plants, Orumiyeh University. 2012. [In persian]

2.Omid Beygi R. Production and processing of medical plant (Vol. 2). Qods Razavi Province Publications, 1st publication, 2005. [In persian]

3.Haghiralsadat BBF. Bernard F. Kelant SM. Sheykhha MH. Hokmallahi F, Azimzadeh M. Hori M. Investigation of the effective compounds and antioxidant properties of the black cumin medicinal plant essential oil of Yazd province. J. Shahid Sadoughi Uni. Medical Sci. 2010; 18(4): 284-291. [In persian]

4.Azizi M. Rahmati M. Ebadati T. Hassanzadeh Khayat M. Investigating the effect of different drying methods on the rate of weight loss, essential oil content and the percentage of camazolin of the chamomile (*Matricaria recutita* L.) medicinal plant. Iran J Medicinal Aromatic Plants Res. 2009; 25(2): 182-192. [In persian]

5.Singh R. Shushni MAM. Belkheir A. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L.. Arabian J. Chem. 2015; 8: 322-328.

6.Ghasemi Pirbalouti A. Mahdad E. Craker L. Effects of drying methods on qualitative and quantitative properties of essential oil of two basil landraces. Food Chem. 2013; 141: 2440-2449.

7.Figiel A. Szumny A. Gutierrez-Ortiz A. Carbonell-Barrachina AA. Composition of oregano essential oil (*Origanum vulgare*) as affected by drying method. J. Food Eng. 2010; 98: 240-247.

8.Karagözlü N. Ergönül B. Özcan D. Determination of antimicrobial effect of mint and basil essential oils on survival of E. coli O157:H7 and S. typhimurium in fresh-cut lettuce and purslane. Food Control. 2011; 22: 1851-1855.

9.Mahmodzadeh F. Ghajarbeygi P. Mahmodi R. Mohammad Poorasl. The effect of thyme (*Thymus kotschyanus*) essential oil on the physicochemical and sensory properties of dough. Food Sci. Technol. 2016; 55(13): 91-101. [In persian]

10. Kazem Alvandi R. Sharigan A. Aghazadeh-Meshki M. Investigating the chemical composition and antimicrobial effect of peppermint (*Mentha piperita*) essential oil. 2010; 7(4): 355-364. [In persian]

11. Fadaei S. Abromand-Azar P. Sharifan A. Larijani K. Investigating the antimicrobial effect of peppermint essential oil and its comparison with sodium benzoate. Food Sci. Nutri. 2009; 8(1): 1-9. [In persian]

12. Mokhtarian M. Kalbasi-Ashtari A. Xiao HW. Effects of solar drying operation equipped with a finned and double-pass heat collector on energy utilization, essential oil extraction and bio-active compounds of peppermint (*Mentha Piperita* L.). Drying Technol. https://doi.org/10.1080/07373937.2020.1836650.

13. Mokhtarian M. Tavakolipour H. Kalbasi-Ashtari A. Energy and exergy analysis in solar drying of pistachio with air recycling system. Drying Technol. 2016; 34(12): 1484-1500.

14. Akpinar EK. Drying of mint leaves in a solar dryer and under open sun: Modelling, performance analyses. Energy Convers. Manag. 2010; 51: 2407-2418.

15. Doymaz I. Thin-layer drying behaviour of mint leaves. J. Food Eng. 2006; 74: 370-375.

16. Müller J. Reisinger G. Kisgeci J. Kotta E. Tesic M. Mühlbauer W. Development of a greenhouse-type solar dryer for medicinal plants and herbs. Solar Wind Technol. 1989; 6: 523-530.

Effects of different drying methods on the chemical compounds profile and antibacterial efficacy of peppermint essential oil against *Staphylococcus aureus* bacteria in vitro conditions

Mohsen Mokhtarian[1]*

1- Department of Food Science and Technology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran.

ARTICLE INFO

Received:27 August 2022

Acceptance:14 September 2022

Keywords:

Peppermint
Drying
Disc Diffusion
Staphylococcus Aureus

ABSTRACT

Introduction: Peppermint is one of the valuable medicinal plants with strong anti-microbial and anti-oxidant properties, which has various applications in the food industry.

Methods: Fresh peppermint leaves were processed as a single layer by different drying methods (solar, sun and shade). Then, the effect of different drying methods on the quality and quantity of essential oil compounds was evaluated by GC-MS. Also, the antibacterial efficiency of the noted essential oil against *Staphylococcus aureus* bacteria was studied by disk diffusion method.

Results: The results showed that the most important chemical compounds in peppermint essential oil include menthone, menthol, isomenthol, mentofuran, polygon and piperitone. The highest amount of bacterial inhibition zone (IZ) was observed in the case of essential oil extracted from peppermint leaves dried by solar method (IZ=55 mm).

Conclusion: In general, the drying method is one of the main stages of medicinal plants processing, which has a significant effect on the bioactive compounds (extracts and essential oils) of medicinal plants. Therefore, it is necessary to use the suitable drying method.

Citation (Vancouver): Mokhtarian M. Effects of different drying methods on the chemical compounds profile and antibacterial efficacy of peppermint essential oil against Staphylococcus aureus bacteria in vitro conditions. Journal of Halal Research. Summer 2022;5(2):54-64. [In Persian] https://doi.org/10.30502/h.2022.357777.1111

*Correspondance to: Mohsen Mokhtarian, Email: mokhtarian.mo@riau.ac.ir, Tel: +98-935-2601788

This paper is open access under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license