خصوصیات ضدباکتریایی و پایداری میکروامولسیون‌های حاوی اسانس زیره سبز (*Cuminum cyminum*) و لعل کوهستان(*Oliveriadecumbens*Vent) تهیه شده با فراصوت

حبیب اله عباسی[1*]، هدا فهیم[2]، محدثه محبوبی[3]، نعمت طهماسبی[4]

۱- استادیار گروه مهندسی شیمی، گروه مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی جندی شاپور دزفول
۲- همکار پژوهشی، دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، گروه مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی جندی شاپور دزفول
۳- دکترای زیست سلولی-مولکولی گرایش میکروب شناسی، بخش میکروب شناسی شرکت داروسازی باریج اسانس، کاشان
٤- استادیار گروه فیزیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه صنعتی جندی شاپور دزفول

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۵/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۱٦)

چکیده

در این مقاله امولسیون های حاصل از دو اسانس زیره سبز و لعل کوهستان در غلظت های ۱، ۳، ۵، ۱۰ و ۱۵٪ با استفاده از امواج فراصوت تهیه شده و خصوصیات فیزیکی و ضد میکروبی این امولسیون ها بررسی گردید. نتایج نشان داد که تمامی امولسیون ها پس از سانتریفوژ پایداری خود را حفظ کردند، همچنین تمام امولسیون‌هایی که چرخه‌ی حرارت- سرما را گذارنده بودند،پایدار بوده، اما پس از گذراندن چرخه‌ی انجماد-خروج از انجماد دو فاز شدند. از میان نمونه امولسیونها، نمونه امولسیون‌ها۱۰ و ۱۵٪ی که در دمای ٤٥ درجه به مدت ۳۵ روزه نگهداری شدند، دوفاز شدند. اندازه‌گیری کدورت نمونه‌های امولسیون با اسپکتوفتومتر، نشان داد که با افزایش غلظت فاز پراکنده، امولسیون کدورت بیشتری می‌یابد. هر دو امولسیون در برابر دو باکتری اثر بازدارندگی داشتند، اما امولسیون زیره در برابر اشرشیاکلی و امولسیون لعل کوهستان در برابر استافیلوکوکوس اورئوس هاله ی بزرگتری تشکیل دادند. از طرفی در هر دو امولسیون با افزایش غلظت، قطرهاله عدم رشد افزایش یافت.

کلید واژگان: امولسیون، لعل کوهستان، زیره سبز، اسانس، التراسوند

*مسئولمکاتبات: habbasi@jsu.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

۱- مقدمه

امولسیون‌ها سیستم‌های کلوئیدی ناهمگنی هستند که در آن حداقل یک مایع به صورت ناپیوسته به شکل قطرات در مایع دیگری پراکنده شده است [۱]. از جمله محدودیت‌های این سیستم‌ها ناپایداری ترمودینایکی آنها می‌باشد به نحوی که به دلیل وجود نیروی کشش بین سطحی و اختلاف دانسیته بین دو فاز امولسیون در گذر زمان شکسته شده و دوفاز می‌شود، از جمله موارد ناپایداری فیزیکی امولسیون‌ها می‌توان به خامه‌ای شدن[1]، انبوهش[2]، و هم آمیختن[3] و.. اشاره کرد [۲]. در این بین نانوامولسیون‌ها، سیستم‌هایبا پایداری سینتیکی هستند که دربرابر رسوب و خامه‌ای شدن مقاومت کرده و به دلیل اندازه ذرات خود به صورت شفاف یا نیمه شفاف دیده می‌شوند.

اسانس‌های گیاهیترکیبات فرار گیاهی، با اثرات ضدمیکروبی شناخته شده هستندکهمطالعات مختلف،نیز عملکرد این ترکیبات را در برابر باکتری‌های پاتوژن تایید نموده است، از طرفی فرموله کردن اسانس‌های گیاهیبه صورت نانوذرات در سیستم‌های رسانش بر پایه‌ی آب می‌تواند فعالیت ضدمیکروبی آنها را بهبود بخشد [۳]. استفاده ازاسانس‌ها در محلول‌های آبی به دلیل محلولیت پایین، فشار بخار بالا و ناپایداری فیزیکی و شیمیایی مشکل می‌باشد. روش‌های مختلفی برای غلبه بر این مشکلات طراحی شده است که یکی از آنها استفاده از سیستم نانوامولسیون است [٤]. فراصوت اجازه‌ی تولید امولسیون‌هایی با ذرات بسیار کوچک را برای استفاده در فرمولاسیون‌های مختلف را فراهم می‌کند[٥].این روش برای تولید نانوامولسیون‌هایی با اندازه ذرات بسیارکوچک و پراکندگی کمشناخته شده است. در این روش از امواجصوتی با فرکانس ۲۰ کیلوهرتز و بالاتر استفاده می‌شودو با عمل فراصوت، لرزش مکانیکی و در ادامه‌ی آن حفره‌های صوتی ایجاد می‌شود. در ادامه تخریب این حفره‌های تولیدی موج‌های تنشی قدرتمندی حاصل می‌شودکه سبب درهم شکستن ذرات درشت می‌گردد [٦]. امولسیون های حاوی اسانس های ضدمیکروبی در صنعت غذا مورد ازمایش قرار گرفته اند، در این رابطه میری و همکاران نانوامولسیون اسانس آویشن در آب را که حاوی غلظت های مختلف مالتودکسترین و آب‌پنیر بود مورد بررسی قرار دادند [۷]، همچنین نانوامولسیون‌های حاوی اسانس سیر نیز تولید شده و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی و نیز راندمان درون پوشانی این اسانس مورد بررسی قرارگرفته است [۸]. نانوامولسیون حاوی اسانس آویشن شیرازی نیز توسط محققان تهیه شده و اثرات ان علیه باکتری اشریشیاکلی *O157: H7*تایید گردیده است [۹]. گیاه لعل کوهستان (*Oliveria decumbens* Vent) از خانواده چتریان بوده و در مناطق جنوبی ایران یافت می‌شود. بخش‌های هوایی این گیاهبه صورت سنتی در درمان بیماری‌های عفونی مورد استفاده قرار می‌گیرد. طبق بررسی محبوبی و همکاران اسانس این گیاه اثرات ضدمیکروبی خوبی در برابر باکتری‌های گرم مثبت،گرم منفی و نیز قارچ‌ها از خود نشان می‌دهد [۱۰]. زیره سبز (*Cuminum cyminum*) نیز که از گیاهانی است که در آب و هوای مدیترانه‌ای می‌روید از قدیم الایام یکی از گیاهان داوریی و ادویه‌ای مهم ایران بوده و خواص درمانی و ضد باکتری آن به خوبی شناخته شده است، حقیرالسادات در بررسی اسانس حاصله از زیره سبز وجود خواص انتی اکسیدانی آن را اثبات کرده و نیز ترکیبات موثره‌ی آن را با استفاده از روش‌های کارماتوگرافی گازی تعیین نمود [۱۱]،همچنین رومیانی طی بررسی اسانس زیره سبز در غلظت‌های مختلف تاثیر بازدارندگی آن را در برابر باکتری*Streptococcus iniae* تایید نمود [۱۲]. هدف از این مطالعه بررسی خصوصیات فیزیکی و ضدمیکروبی امولسیون‌های تهیه شده از دو اسانس زیره و لعل کوهستان با غلظت‌های ۱، ۳، ۵، ۱۰ و ۱۵٪ تهیه شده در طی دو زمان ۱۰ و ۲۰ دقیقه فراصوت می‌باشد.

۲- مواد و روش ها

اسانس‌های زیره و لعل کوهستان از شرکت باریج اسانس اصفهان خریداری شد. محیط‌های کشت از شرکت مرک تهیه شد. فیلتر سر سرنگی برای استریل کردن نمونه‌ها از شرکت بایوفیل جت (۰,٤٥ µm) خریداری گردید. باکتری‌های مورد استفاده سویه‌های اشریشیاکلی *ATCC 25922* و استافیلوکوکوس

1. Creaming
2. Flocculation
3. Coalescence

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

اورئوس *ATCC 25923* از موسسه پژوهشی و تولیدی بهارافشان تهیه شدند.

۲-۱- تهیه امولسیون

تهیه ی امولسیون بر اساس روش میری و همکاران (۱۳۹۶) با اندکی تغییر انجام شد [۷]. سوسپانسیون کلوئیدی اولیه با حل کردن اسانس‌های زیره و لعل کوهستان و امولسیفایر توئین ۸۰ با نسبت وزنی (w/w) ۵۰:۵۰ تهیه شده و سپس با آب مقطر به مدت ۱۰ دقیقه با همزنمغناطیسیمخلوط گردید تا غلظت‌های ۱، ۳، ۵، ۱۰ و ۱۵٪ به دست آید.سپسسوسپانسیون‌های حاصلهبه جهت ریزتر شدن ذرات تحت تیمار فراصوت(Topsonics, Iran) با شرایط عملیاتی زیر قرار گرفت: توان ۱۷۵ وات، زمان آف ۳ ثانیه، زمان عمل ۷ ثانیه، زمان کل عمل ۱۰ و ۲۰ دقیقه. برای جلوگیری از افزایش دما حین فرایند ظرف محتوای امولسیون در حمام آب خنک قرار گرفت به نحوی که دمای آن فراتر از ۲۵ ^{o}C نشد. امولسیون تولیدی پس از تهیه در ظروف شیشه‌ای تیره و درب‌دار قرار داده شده و تا زمان آزمایشات در یخچال نگهداری شد. تیمارها با توجه به زمان اعمال فراصوت بر آنها و غلظت اسانس به صورت زیر شماره‌گذاری شدند:

Table1 Micro -emulsionsprepared by different time and essential oil concentrations

Treatment No.	time	concentration
1	10	1
2	10	3
3	10	5
4	10	10
5	10	15
6	20	1
7	20	3
8	20	5
9	20	10
10	20	15

۲-۲- اندازه گیری پایداری امولسیون

۱۲ میلی‌لیتر از هر تیمار در یک لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شده و درب آن محکم بسته شد. از تمامی نمونه‌ها سه سری تولید شد و در سه دمای^{o}C ٤، ۲۵ ^{o}C و ٤۵ ^{o}C به مدت ۳۵روز نگهداری شد. جدا شدن فاز در فواصل ۷ روزه بررسی گردید.ارتفاع لایه‌ی جدا شده در بالای لوله (HC) اندازه گیری شده و شاخص پایداری امولسیون بر حسب ارتفاع اولیه‌یامولسیون (HE) و ارتفاع لایه‌ی جدا شده به صورت زیر محاسبه گردید [۷]:

$$ESI = 100 \times \frac{H_E - H_C}{H_E}$$

۲-۳- پایداری ترمودینامیک

از هر نمونه ۱۰ میلی‌لیتر در لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شده و به مدت ۱ ساعت در ٤٤۷۲g در دمای اتاق سانتریفوژ شد. جدایی فاز نمونه‌ها سپس اندازه گیری گردید [۳].

۲-٤- چرخه ی حرارت-سرما

۱/۵میلی‌لیتر از هر نمونه را در میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری قرار داده و ٤۸ ساعت در دمای ٤۵^{o}C و بلافاصله ٤۸ ساعت در دمای^{o}C ٤ قرار داده شد. جداسازی فاز به صورت نتیجه‌ی مثبت یا منفی گزارش شد [۱۳].

۲-۵- استرس فریزر-خروج از انجماد

۱/۵ میلی‌لیتر از هر تیمار درون میکروب ۱/۵میلی‌لیتری ریخته شده و ٤۸ ساعت در دمای ۲۰^{o}C- و بلافاصله پس از آن ٤۸ ساعت در دمای^{o}C ۲۵ قرارداده شد. جداسازی فاز به صورت نتیجه‌ی مثبت یا منفی گزارش شد [۱۳].

۲-٦- کدورت

امولسیون‌ها به نسبت ۱:۱۰۰ در آب مقطر رقیق شده و جذب آنها در طول موج‌های ۸۰۰ و ٤۰۰ نانومتر اندازه گیری شد. کدورت امولسیون‌ها به صورت نسبت جذب در ۸۰۰ نانومتر بهنسبت جذب در ٤۰۰ نانومتر تعریف می‌شود. از آب مقطر به عنوان شاهد استفاده شد (١٤).

۲-۷- ارزیابی اثر ضدمیکروبی امولسیون به روش دیسک دیفیوژن

خصوصیات ضدمیکروبی امولسیون‌ها در برابر دو باکتری گرم منفی اشریشیاکلی و گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس بر اساس روش معصومی و همکاران [۹]با روش دیسک دیفیوژن و اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد تعیین گردید. ابتدا باکتری روی محیط کشت مناسب کشت گردید و سپس از آن یک

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند تهیه شد و با استفاده از یک سوآب استریل، سوسپانسیون میکروبی روی پلیت حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار به صورت چمنی کشت گردید.۱۰ میکرولیتر از هر تیمار اسانس روی دیسک‌های بلانک با قطر ٦ میلی‌متر لود شده و روی محیط کشت تلقیح شده، قرار داده شد. پلیت‌ها به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ ^{o}C گرمخانه‌گذاری شدند و پس از آن قطر هاله‌ی بازدارندگی بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

۲-۸- آنالیز آماری

در این مطالعه از نرم‌افزار SPSS 16 استفاده شد. مدل خطی تعمیم یافه (GLM) برای تجزیه و تحلیل واریانس و ازمقایسه میانگین دانکن برای بررسی معنی‌داری اختلاف میانگین بین تیمارها در سطح۰/۰۵ درصد استفاده شد.برای بررسی پایداری امولسیون‌ها در یک دوره‌ی ۳۵ روزه از آنالیز اندازه‌گیری‌های تکراری با سطح اطمینان ۰/۰۵ درصد استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- پایداری امولسیون

نتایج پایداری امولسیون‌های ۱۰ و ۱۵٪ زیره و لعل کوهستان در دمای ٤٥ ^{o}C به ترتیب در شکل ۱ و ۲ آورده شده‌اند. امولسیون‌ها در سه دمای ٤^{o}C، ۲۵ ^{o}C و ٤٥ ^{o}C به مدت ۳۵ روز نگهداری شدند و در این بین تنها نمونه‌هایی با غلظت ۱۰ و ۱۵٪ که در دمای ٤٥^{o}C نگهداری شده بود،دو فاز شدندو امولسیون‌هایدو دمای نگهداری دیگر،هیچگونه جداسازی فازی نداشتند (داده‌ها آورده نشده اند). در شکل ۱ مشخص است که امولسیون زیره سبز که به مدت ۲۰ دقیقه تحت فراصوت قرار گرفته، نسبت به امولسیونی که ۱۰ دقیقه فراصوت شده سریعتر دچار جداسازی فازی شده است به طوری که امولسون دوم از شروع نگهداری به تدریج جداسازی فاز را نشان داد. در حالی که امولسیون با ۱۰ دقیقه فراصوت از هفته‌ی دوم به بعد جداسازی فاز را نشان داد. سیر جداسازی فاز در هر دو امولسیون نزولی بود اما این روند در امولسیون با ۲۰ دقیقه فراصوت شیب تندتری داشت. در شکل ۲ که امولسیون اسانس لعل کوهستان را نشان می‌دهد روند جداسازی فاز کاملا با امولسیون زیره متفاوت است. در هر دو امولسیون ۱ (۱۰ دقیقه تیمار با فراصوت) و ۲ (۲۰ دقیقه تیمار با فراصوت) تا روز ۲۸ جداسازی فاز قابل توجهی رخ نداد و امولسیون پایدار بود، از روز ۲۸ به بعد امولسیونی که تحت ۱۰ دقیقه فراصوت قرار گرفته بود جداسازی فاز واضحی را نشان داد در حالیکه امولسیونی که تحت ۲۰ دقیقه فراصوت قرارگرفته بود جدایی فاز بسیار کمتری نسبت به امولسیون ۱ نشان داد. این حالت کاملا برعکس امولسیون اسانس زیره بود چرا که در امولسیون اسانس زیره ۲۰ دقیقه فراصوت سبب کاهش پایداری امولسیون شده بود.

ناپایداری امولسیون‌ها به عوامل متعددی بستگی دارد که مهمترین آنها تجمع و بزرگ شدن قطرات می‌باشد، این تغییرات با اندازه قطرات و نحوه توزیع آنها در فاز پراکنده ارتباط دارد. طبق قانون استوکس، سرعت حرکت ذرات با مربع شعاع ذرات در ارتباط است،بنابراین پایداری امولسیون با کاهش اندازه ذرات و افزایش گرانروی افزایش می‌یابد [۱۵]. از طرفی افزایش دما با کاهش ویسکوزیته و گرانروی می‌تواند پایداری امولسیون را کاهش دهد. با توجه به نسبت ثابت امولسیفایر به اسانس در تمامی تیمارها، و این که جداسازی تنها در دمای ٤٥ ^{o}C رخ داده است، می‌توان دما را یکی از مهمترین عوامل ناپایداری امولسیون ها دانست. پایدار بودن نمونه‌ها در دو دمای ٤ ^{o}Cو ۲۵ در طول ۳۵ روز و نیز پایداری تمامی امولسیون های ۱، ۳ و ۵٪ را می‌توان به نقش مواد دیواره (در اینجا امولسیفایر توئین ۸۰) مرتبط دانست. امولسیفایرها می‌توانند کشش سطحی را بیشتر و سریعتر کاهش داده و به نوعی ملکول‌های آبگریز اسانس را در خود جای دهند و بدین طریق پایداری خوبی را فراهم آورند (١٦)در این رابطه توئین ۸۰، یک سورفاکتنت غیر یونی است که HLB آن برابر با ۱۵ بوده و در نتیجه برای امولسیون‌های اسانس در آب مناسب می باشد، این سورفکتانت در ساختار خود چهار سر حاوی عوامل آبدوست دارد. غلظت بحرانی میسل (CMC)[4] تولید شده توسط این امولسیفایر در محدوده ی ۰,۰۱۰ تا ۰,۰۱۵ mM در دمای ۲۵ درجه می‌باشند، در غلظت‌های بالاتر از آن، میسل‌ها خود مجتمع شده و با افزایش اندازه سبب ناپایداری فازی

4. critical micelleconcentration

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

می‌شوند [۱۷] که این حالت در امولسیون‌های با غلظت ۱۰ و ۱۵٪ مشاهده شد. در دمای ٤٥ درجه روند ناپایداری هم در دو اسانس و هم تحت تیمارهای ۱۰ و ۲۰ دقیقه فراصوت متفاوت بود، همایونفال و همکاران [۱۸] بیان کردند که بین زمان فرایند و قطر ذرات (و درنتیجه پایداری امولسیون‌ها) رابطه‌ی معکوسی برقرار است. یعنی هر قدر زمان فرایند فراصوت بیشتر باشد، ذرات شکسته شده‌ی روغن فرصت بیشتری دارند تا توسط امولسیفایر پوشش‌دهی شوند که به پایداری امولسیون کمک می‌کند. از طرف دیگر همین محققان بیان کردند در صورتی که میزان امولسیفایر در دسترس برای پوشاندن ذرات ریز تولیدی حین تنش برشی کافی نباشد، به دلیل کمبود ماده‌ی فعال سطحی ذرات ممکن است به یکدیگر چسبیده و کارایی فرایند و نیز پایداری امولسیفایر را کاهش دهند. از طرف دیگر با افزایش شدت تنش، غشای امولسیفایری تشکیل شده روی ذرات ممکن است تخریب شده و سبب افزایش قطر ذرات گردد که منجر به ناپایداری امولسیون می‌شود. این نتیجه گیری با آنچه در نمونه‌های امولسیون اسانس زیره مشاهده شد مطابقت دارد و احتمالا کاهش پایداری امولسیون پس از ۲۰ دقیقه فراصوت به این دلیل می‌تواند باشد. از طرفی روند مشابهی در مورد امولسیون اسانس لعل مشاهده نشد. این تفاوت احتمالا مرتبط با تفاوت در میزان آبگریز بودن این اسانس‌ها می‌باشد که مستقیماً به ترکیبات تشکیل دهنده اسانس مربوط است، با توجه به این کهامولسیفایر مورد استفاده در این آزمایشHLB بالاتر از ۱۰ داشته و آبدوست‌تر است، و اسانس لعل کوهستان نیز آبگریزی کمتری نسبت به اسانس زیره دارد، این سورفاکتانتدیواره‌های پایدارتری پیرامون اسانس لعل کوهستان تشکیل داده و توانسته در طول دوره‌ی ماندگاری و دمای بالا (٤٥ ^{o}C) پایداری امولسیون را حفظ کند.آبگریزی بالای اسانس زیره نیزTahir و همکاران [۱۹]تایید شده است و آن‌ها در بررسی خود بیان داشتند که اسانس زیره کاملا در آب نامحلول است.

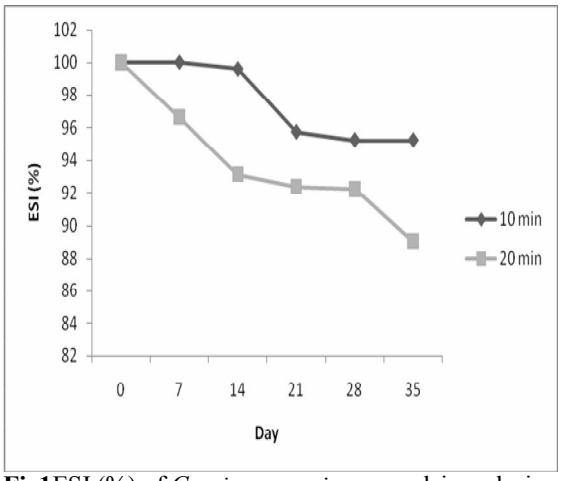

Fig1ESI (%) of *Cuminum cyminum* emulsions during a 35-days period

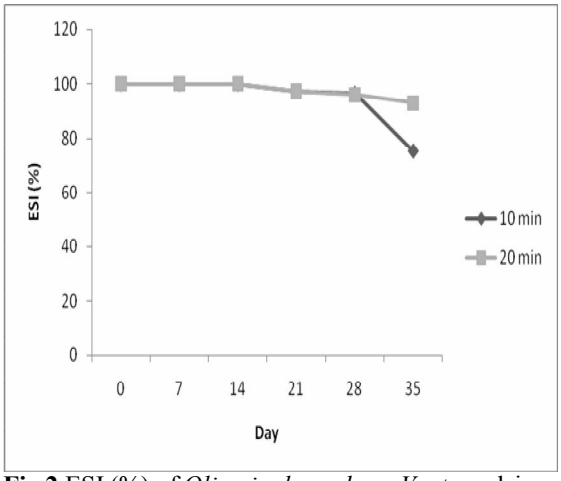

Fig 2 ESI (%) of *Oliveria decumbens Vent* emulsions during a 35-days period

۳-۲- پایداری ترمودینامیک

هیچ یک از نمونه امولسیون‌های تحت سانتریفیوژ با دور ٤٠٠٠ rpm جدایی فاز نشان ندادند. به دلیل عدم جدایی فازی، داده‌های مربوطه در مقاله آورده نشده است. این نتیجه نشان دهنده‌ی کارایی بالای عمل فراصوت در تولید امولسیون‌هایی با پایداری مکانیکی بالا می‌باشد. در این رابطه Tahir, و همکاران [۱۹]نشان دادند که امولسیون‌های اسانس زیره سبز با امولسیفایر توئین ۸۰ از نظر پایداری ترمودینامیکی پایدار بودهو پس از سانتریفیوژ جدایی فازی در آنها دیده نشده است که داده‌های حاصل از این مطالعه مطابقت دارد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

۳-۳- چرخه‌ی حرارت-سرما و استرس فریزر-خروج از انجماد

نتایج کیفی این آزمون برای امولسیون زیره و لعل کوهستان به ترتیب در جداول ۱ و ۲ آورده شده اند. امولسیونهای زیره و لعل کوهستانپس از طیاسترس فریزر-خروج از انجماد، جدایی فاز نشان دادند، در حالی‌که هیچ یک از آنها در حین آزمون چرخه‌ی حرارت-سرما جداسازی فاز نداشته و پایداری خود را حفظ کرده بودند. در کار مشابهی که Shaaban و همکاران [۳] روی اسانس سیاه دانه(*Nigella sativa*) انجام دادند مشخص شد که میکروامولسیون تولیدی آنها قادر به تحمل چرخه‌های متعدد فریزر و خروج از انجماد بوده که احتمالا بخاطر تناسب امولسیفایر مورد استفاده (توئین ۲۰) با سیستم امولسیونی آب/اسانس است که با نتایج Ghosh و همکاران [٦]که نانوامولسیون اسانس دارچین را با استفاده از امواج فراصوت تهیه کرده بودند مشابهت دارد، اما با نتایج این مطالعه کاملا متفاوت است.به طور کلی، در امولسیون های O/W آب فاز پیوسته بوده و با فریز کردن این فاز منجمد می شود در نتیجه با توسعه کریستال‌های یخ، سطح در تماس روغن-آب فشرده شده دچار نفوذیا نشت می‌شوند در نتیجه قطرات متراکم شده و درنهایت ذرات بهم می‌پیوندند [۲۰]. تمامی این رخدادها در نهایت سبب ناپایداری فازی امولسیون طی چرخه‌ی فریزر-خروج از انجماد می گردند در حالی‌که در حین نگه‌داری امولسیون در سرما هیچ کریستال یخی تشکیل نشده و در نتیجه دوفاز شدن نیز رخ نداده است.Ramisettyو همکاران [۲۱]گزارش کردند که امولسیفایر با HLBبرابر۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۲ در برابر چرخه‌های انجماد و خروج از انجماد کاملا پایدار استو این در حالی است که امولسیفایر توئین ۸۰ باHLB برابر با ۱۵ و نسبت ۱:۱ امولسیفایر: اسانس این مطالعه،قادر به تحمل این استرس نبود، در حالی‌که در برابر شرایط حرارت-سرما مقاومت نشان داد که می تواند مرتبط با آبدوستی بالاتر این امولسیفایر باشد.

۳-٤- کدورت امولسیون

کدورت امولسیون‌های زیره و لعل کوهستان در جدول ۱ و ۲ آورده شده است. نمونه‌های امولسیون، سه غلظت ۱، ۳ و ۵٪ با تیمار ۱۰ دقیقه فراصوت، کدورتی نداشتند به معنایابعاد بسیار کوچک ذرات امولسیون تحت فراصوت است که موجب عدم وجود جذب در طول موج ٤۰۰ گردید. در حالیکه همین غلظت‌ها در تیماری ۲۰ دقیقه فراصوت، جذبی در محدوده‌ی ۰/۰۵-۰/۷ نشان دادند، که ناشی از ابعاد بزرگتر ذرات تولید شده ۲۰ دقیقه فراصوت،نسبت به ۱۰ دقیقه فراصوت است.

در مورد امولسیون های لعل کوهستان نیز همین روند مشاهده شد، یعنی در امولسیون های با غلظت ۱ تا ۳٪ تحت تیمار ۱۰ دقیقه هیچ جذبی در ٤۰۰ مشاهده نشد، در حالیکه نسبت جذب همین غلظت‌ها در تیمار ۲۰ دقیقه فراصوت بین ۰/۰۰۵-۰/۰۲۵بود.

در امولسیون زیره بالاترین جذب برای غلظت ۱۵٪ و تحت ۱۰ دقیقه فراصوت به دست آمد،در حالیکهجذب امولسیون با غلظت ۱۵٪ با ۲۰ دقیقه فراصوت به صورت معنی‌داری کمتر بود ($p\leq0.05$).سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری با این دو تیمار نداشتند.

در امولسیون لعل کوهستان، بالاترین جذب مربوط به غلظت های ۱۰ و ۱۵٪ تحت هر دو تیمار ۱۰ و ۲۰ دقیقه فراصوت بود و بین آنها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در حالیکه جذب سایر تیمارها کمتر از این چهارتیمار ذکر شده و اختلاف آنها معنی‌دار بود ($p\leq0.05$).

به طور کلی Dluzewskaو همکاران [۱۵]گزارش کردند که صرفنظر از امولسیفایر مورد استفاده، با افزایش غلظت فاز پراکنده، کدورت امولسیون‌ها افزایش می‌یابد که مطابق با نتایج این مطالعه است. همچنین مشخص شده است که کدورت امولسیون‌ها بستگی به اندازه ذرات و نیز غلظت فاز روغنی امولسیون‌ها دارد و الزاما افزایش کدورت با افزایش قطر ذرات و در ادامه ناپایداری امولسیون‌ها در ارتباط نمی‌باشد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

Table 2 Heat-Cool(H-C) cycle, Freeze-Thaw (F-T)cycle, size index an inhibition zones for *Cuminum cyminum* micro-emulsions

	Heat-Coolcycle	Freeze-Thawcycle	size index	inhibition zone	
treatment				*E.coli*(mm)	*Staphylococcus aureus*(mm)
1	-	+	0	0	0
2	-	+	0	0	0
3	-	+	0	$7.5^{b}\pm0.0$	0
4	-	+	$0.02^{b}\pm0.03$	$8^{ab}\pm0.0$	$6^{d}\pm0.0$
5	-	+	$0.12^{a}\pm0.04$	$8^{ab}\pm0.0$	$6.5^{c}\pm0.0$
6	-	+	$0.07^{ab}\pm0.04$	$7.75^{ab}\pm0.35$	0
7	-	+	$0.0275^{b}\pm0.01$	$9^{ab}\pm1.41$	0
8	-	+	$0.055^{ab}\pm0.05$	$10^{a}\pm2.83$	$7.25^{b}\pm0.35$
9	-	+	$0.065^{ab}\pm0.01$	$7.5^{b}\pm0.0$	$7.3^{b}\pm0.0$
10	-	+	$0.025^{b}\pm0.04$	$7.25^{b}\pm0.35$	$10^{a}\pm0.0$

Diameter of inhibition zones (mm); values are the mean ± standard deviation of triplicates
Mean with different superscript letters in the same column indicate significant difference ($p < 0.05$)

Table 3 Heat-Cool (H-C) cycle, Freeze-Thaw (F-T) cycle, size index an inhibition zones for *Oliveria decumbens Vent* micro-emulsions

	Heat-Cool cycle	Freeze-Thaw cycle	size index	inhibition zone	
treatment				*E.coli* (mm)	*Staphylococcus aureus* (mm)
1	-	+	0	$7.5^{bc}\pm0.71$	0
2	-	+	0	$7.75^{abc}\pm0.35$	$3.0^{cd}\pm4.24$
3	-	+	0	$7.75^{abc}\pm0.35$	$1^{d}\pm0.32$
4	-	+	$0.1^{a}\pm0.01$	$7.75^{abc}\pm0.35$	$11.25^{a}\pm0.35$
5	-	+	$0.11^{a}\pm0.01$	$8.25^{abc}\pm0.35$	$7.25^{b}\pm0.35$
6	-	+	$0.01^{d}\pm0.01$	$8.75^{a}\pm0.35$	$6.5^{bc}\pm0.71$
7	-	+	$0.05^{b}\pm0.01$	0^{d}	$10.0^{ab}\pm2.83$
8	-	+	$0.03^{c}\pm0.01$	$7.25^{c}\pm0.35$	$12.5^{a}\pm0.71$
9	-	+	$0.11^{a}\pm0.02$	$7.75^{abc}\pm0.35$	$11.75^{a}\pm0.35$
10	-	+	$0.09^{a}\pm0.01$	$8.5^{ab}\pm0.71$	$8.5^{ab}\pm0.71$

H-C: heat-cool cycle, F-T: freeze-thaw cycle
Diameter of inhibition zones (mm); values are the mean ± standard deviation of triplicates
Mean with different superscript letters in the same column indicate significant difference ($p < 0.05$).

۳-۵-بررسی اثر ضدمیکروبی با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد

نتایج قطر هاله‌ی عدم رشد امولسیون زیره و لعل کوهستان در برابر دو باکتری اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس در جداول ۱ و ۲ آورده شده است.غلظت ۱ و ۳٪ امولسیون زیره تیمار شده با ۱۰ دقیقه امواج فراصوت در مقابل اشرشیاکلی قطر هاله عدم رشدی ایجاد نکرد،ولی با افزایش غلظت تا ۱۵٪، هاله‌ی بازدارندگی افزایش یافت. از طرفی در تمامی امولسیون‌های زیره فراصوت شده در مدت زمان ۲۰ دقیقه، تمامی غلظت‌ها اثر بازدارندگی در برابر اشرشیاکلیداشتند. بیشترین هاله عدم رشد در غلظت ۵٪ امولسیون زیره مشاهده شد و غلظت‌های ۱ و ۳٪ با آن اختلاف معنی‌داری نداشتند، اما دو غلظت ۱۰ و ۱۵٪هاله‌ی کوچکتری نسبت به غلظت‌های قبلی نشان دادند.

نتایج اثر بازدارندگی امولسیون زیره در برابراستافیلوکوکوس اورئوس نشان داد که امولسیون زیره در غلظت‌های پایین‌تر اثر بازدارندگی کمتری بر این باکتری دارد تا باکتری *E.coli*. امولسیون تهیه شده تحت ۱۰ دقیقه فراصوت در سه غلظت ۱ تا

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

۳٪ اصلا اثر بازدارندگی نداشته و تنها دو غلظت ۱۰ و ۱۵٪ هاله‌ای به ترتیب برابر با ٦ و ٦,٥ میلی‌متر تولید کردند. در امولسیون‌های تهیه شده با ۲۰ دقیقه فراصوت نیز غلظت ۱ و ۳٪ اثر بازدارندگی نشان ندادند، اما با افزایش غلظت از ۵٪ به ۱۵٪ هاله‌ی بازدارندگی از ۷,۲۵ میلی‌متر به ۱۰میلی‌متر افزایش یافت. این نتایجنشان داد کهاسانس زیره در غلظت‌های بالا اثر بیشتری روی*S. aureus*دارد.

Gachkar و همکاران [۲۲]گزارش کردند که اسانس زیره سبز در برابر اشرشیاکلی نسبت به استافیلوکوکوس اورئوس هاله‌ی بازدارندگی بزرگتری را ایجاد می‌کند، قطر هاله برای اشرشیاکلیو استافیلوکوکوس اورئوس به‌ترتیب برابربا ۱۳ و ۱۰ میلی‌متر بود. این محققان در مطالعه ی خود از اسانس خالص برای بررسی قطر هاله ی ضدمیکروبی استفاده کرده بودند در حالی که در کار ما امولسیون های تهیه شده از این اسانس ها استفاده شده که حداکثر مقدار اسانس در ان ها ۱۵٪ بود در نتیجه قطر هاله ی کمتری گزارش شدهدر کار ما قابل توجیه به نظر می رسدولی به طور کلی نتایج به دست آمده از مطالعه آنها با کار ما مطابقت داشت.

امولسیون‌های لعل کوهستان بر خلاف امولسیون زیره هاله‌های بزرگتری در برابر باکتری استافیلوکوکوس اورئوسنشان دادند(جدول۲). تمامی غلظت‌های ۱ تا ۱۰٪ امولسیون تحت تیمار۱۰ دقیقه ای با فراصوت، در برابر اشرشیاکلی هاله‌ای برابر با ۷/۷۵ میلی‌متر نشان داد، اما در غلظت ۱۵٪ قطر هاله به ۸/۲۵ میلی‌متر افزایش یافت که با توجه به افزایش غلظت طبیعی به نظر می‌رسد. اما در امولسیونی که با ۲۰ دقیه فراصوت تهیه شده بود غلظت ۱ و ۱۰٪ از نظر قطر هاله اختلاف معنی‌دار نداشتند ($p\leq0.05$).

نتایج هاله‌ی بازدارندگی امولسیون لعل کوهستان در برابر باکتری استافیلوکوکوس اورئوسنشان داد این امولسیون در تمامی غلظت‌ها بجز در غلظت ۱٪ تیمار با ۱۰ دقیقه فراصوت روی این باکتری اثر بازدارندگی دارد. بالاترین قطرهاله در امولسیون‌های تهیه شده با ۱۰ دقیقه فراصوت، امولسیون حاوی غلظت ۱۰٪ اسانس لعل کوهستان بود، درحالی که در تیمارهای تحت ۲۰ دقیقه امواج فراصوت، اختلاف معنی‌داری بین غلظت های ۳ تا ۱۵٪ مشاهده نشد با این حال بالاترین قطر هاله از نظر عددی مربوط به امولسیون حاوی ۵٪ اسانس لعل کوهستان است.

اثر ضدمیکروبی اسانس لعل کوهستان موضوع مطالعات بسیاری بوده است. میانگین قطر هاله عدم رشداسانس لعل کوهستان بر استافیلوکوکوس اورئوس برابر با ۳۰/٦ میلی‌متر و برای اشرشیاکلی۱۲ میلی‌متر گزارش شده که نشان دهنده حساسیت بیشترباکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی به این اسانس است [۱۰]که منطبق بر نتایج این مطالعه است، با این حال درمطالعه ی این محققان قطر هاله ی به دست امده از اسانس لعل کوهستان نسبت به کار ما بسیار بزرگتر بود، این تفاوت را می توانبا توجه به درصد غلظت اسانس در امولسیون های ما توجیه کرد،در مطالعه ی ما امولسیون های با غلظت‌های اسانس ۱ تا ۱۵٪ بررسی شد که میزان اسانس ان ها نسبت به اسانس خالص کمتر بود، در این رابطه معصومی و همکاران نیز نشان دادند که متوسط قطر هاله ی اسانس خالص آویشن شیرازی در برابر اشرشیاکلی*O157: H 7*به صورت معنی داری بزرگتر از نانوامولسیون تولید شده از همین اسانس استکه با نتایج حاصل از کار ما مشابهت داشت [۹]به نظر می رسد استفاده از توئین ۸۰ به عنوان امولسیفایر در امولسیون ها سبب شده است تا دیواره ی پایداری پیرامون ذرات اسانس شکل گرفته و رهایش اسانس از ذرات تشکیل شده کمتر شود، درنتیجه اثر ضدباکتری امولسیون ها نسبت به اسانس خالص کمتر گزارش شد.قطر هاله عدم رشد برای اسانس لعل کوهستان توسط امین و همکاران (۲٤)در مقابل استافیلوکوکوس اورئوس۸۰ میلی‌متر و برای اشرشیاکلی٤۰ میلی‌متر گزارش شده است.مطالعات مختلف نشان داده‌اند که اثر ضدباکتری لعل کوهستان مربوط به دو جز تیمول و کارواکرول می‌باشد که بیشترین جز تشکیل دهنده‌ی این اسانس است[۱۰ و ۹].

٤- نتیجه گیری

نتایج نشان می‌دهد که امولسیون‌های تولیدی از پایداری ترمودینامیکی خوبی در طول زمان برخوردار بوده، بجز نمونه‌های با غلظت بالا که در دمای ٤٥°C نگهداری شده بودند، همچنین امولسیون‌ها توانستند چرخه‌های حرارت-سرما را تحمل کرده، اما

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

پس از چرخه‌ی فریزر و خروج از انجماد دو فاز شده بودند.نمونه‌های امولسیون کدورت پایینی داشته ولی با افزایش غلظت اسانس کدورت آنها افزایش یافت. خصوصیات ضدمیکروبی نشان دهنده‌ی افزایش بازدارندگی امولسیون با افزایش غلظت بوده و اسانس زیره در برابر اشرشیاکلیو اسانس لعل در برابر استافیلوکوکوس اورئوسقطرهاله‌ی بزرگتری داشتند.

۵- منابع

[1] Abismaıl, B., Canselier, J. P., Wilhelm, A. M., Delmas, H., & Gourdon, C. (1999). Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. Ultrasonics Sonochemistry, 6(1-2), 75-83.

[2] Karimi, N., Mohammadifar, MA., Nayebzade, K. (2013). Effect of two types of Iranian gum tragacanth on stability and rheological properties of oil-in-water emulsion, Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology, 3(8): 87-98.

[3] Shaaban, H. A., Sadek, Z., Edris, A. E., & Saad-Hussein, A. (2015). Analysis and antibacterial activity of *Nigella sativa* essential oil formulated in microemulsion system. Journal of oleo science, 64(2), 223-232.

[4] Alizadeh, H., Farzaneh, M., Azami, Z. (2015). The effect of cinnamon essential oil nanoemulsion on reductioon of postharvest decay of strawberry.Biological control of pests and plant diseases. 4:1. 57-64.

[5] Canselier, J. P., Delmas, H., Wilhelm, A. M., & Abismail, B. (2002). Ultrasound emulsification—an overview. Journal of dispersion science and technology, 23(1-3), 333-349.

[6] Ghosh, V., Saranya, S., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2013). Cinnamon oil nanoemulsion formulation by ultrasonic emulsification: investigation of its bactericidal activity. Journal of nanoscience and nanotechnology, 13(1), 114-122.

[7] Miri, M., Koocheki, A., Mohebbi, , M., Najafi, M. 2017. Effect of maltodextrin and whey protein concentrate on thyme essential oil nanoemulsion. Journal of food science and technology. 65:14. 149-160.

[8] Hasanzadeh, H., Alizadeh, M., Rezazad Bari, M. 2017. Production and assessment of physicochemical characteristics and encapsulation efficiency of garlic essential oil nanoemulsions. Journal of food research. 27:4. 159-170.

[9] Masoumiو V O., tajik, H., moradi, M., Forough, M., Shahabi, N.2016. Antimicrobial effects of zataria multiflora boiss. Essential oil nanoemulsion against *Escherichia Coli* O157:H7. J urmia univ med sci; 27 (7) :608-617.

[10] Mahboubi, M., Feizabadi, M.M., Haghi, G., Hosseini, H. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil from *Oliveria decumbens Vent*. Iranian journal of medicinal and aromatic plants, 24:1. 56-65.

[11] Haghiroalsadat F, Vahidi A, Sabour M, Azimzadeh M, Kalantar M, Sharafadini M. The indigenous *cuminum cyminum L.* of yazd province: chemical assessment and evaluation of its antioxidant effects. J shahid sadoughi univ med sci; 19(4): 472-81.

[12] Roomiani, L. (2013). Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* essential oil and nisin on *Streptococcus inaie* in lab and fillets of rainbow trout. Iranian scientific fisheries journal.22:3. 50-59.

[13] Mirhosseini, H., Tan, C. P., Hamid, N. S., & Yusof, S. (2008). Effect of arabic gum, xanthan gum and orange oil contents on ζ-potential, conductivity, stability, size index and pH of orange beverage emulsion. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and engineering aspects, 315(1-3), 47-56.

[14] Din, M. U., Sarfraz, R. A., & Shahid, T. (2015). Biological activity‐based assessment of essential oil emulsions. Journal of food processing and preservation, 39(6), 1452-1456.

[15] Dłużewska, E., Stabiecka, A., & Maszewska, M. (2006). Effect of oil phase concentration on rheological properties and stability of beverage emulsion. Acta scientiarum polonorum technologia alimentaria, 5(2), 147-156.

[16] Razavizadeh, B. M., Khanmohammadi, F., Azizi,S. N. (2015). Study of physicochemical properties of rice Bran oil in water microemulsion: effect of ultrasound and concentration of tween 80. Food science and technology.13:1. 21-30.

[17] Tang, X., Huston, K. J., & Larson, R. G. (2014). Molecular dynamics simulations of

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

structure–property relationships of tween 80 surfactants in water and at interfaces. The Journal of physical chemistry B, 118(45), 12907-12918.

[18] Homayoonfal, M., Khodaiyan, F., Mousavi, M., Hosseini Panjak, M. (2013). Preparation and characterization evaluations of walnut oil-based emulsions usingresponse surface methodology. Iranian journal of nutrition sciences &food technology, 8:2, 191-199.

[19] Tahir, H. U., Sarfraz, R. A., Ashraf, A., & Adil, S. (2016). Chemical composition and antidiabetic Activity of essential oils obtained from two spices (S*yzygium aromaticum* and *Cuminum cyminum*). International journal of food properties, 19(10), 2156-2164.

[20] Lin, C., He, G., Dong, C., Liu, H., Xiao, G., & Liu, Y. (2008). Effect of oil phase transition on freeze/thaw-induced demulsification of water-in-oil emulsions. Langmuir, 24(10), 5291-5298.

[21] Ramisetty, K. A., Pandit, A. B., & Gogate, P. R. (2015). Ultrasound assisted preparation of emulsion of coconut oil in water: understanding the effect of operating parameters and comparison of reactor designs. Chemical engineering and processing: process intensification, 88, 70-77.

[22] Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M. B., Taghizadeh, M., Astaneh, S. A., & Rasooli, I. (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. Food chemistry, 102(3), 898-904.

[23] Masoomi, V., Tajik, H., Moradi, M., Forough, M., Shahabi, N. (2016). Antimicrobial effects of *Zataria multiflora boiss*. essential oil nanoemulsion against Escherichia coli O157:H7. The Journal of Urmia University of Medical Sciences. 27(7), 608-617.

[24] Amin, G., Sourmaghi, M. S., Zahedi, M., Khanavi, M., & Samadi, N. (2005). Essential oil composition and antimicrobial activity of *Oliveria decumbens*. Fitoterapia, 76(7-8), 704-707.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

Antibacterial properties and stability of emulsions containing *Cuminum cyminum* and*Oliveria decumbens Vent.*essential oils prepared by ultrasound

Abbasi, H. [1*], Fahim, H. [2], Mahboubi, M. [3], Tahmasebi, N. [4]

1. Assistant Professor, Department of Chemical Engineering, Jundi-Shapur University of Technology, Dezful, Iran.
2. Research Assistant, M.Sc. graduated of Food Science and Technology, Department of Chemical Engineering, Jundi-Shapur University of Technology, Dezful, Iran.
3. PhD in Microbiology, Department of Microbiology, Medicinal Plants, Research Center of Barij, Kashan, Iran.
4. Nemat Tahmasebi, Assistant Professor, Department of Physics, Faculty of Science, Jundi-Shapur University of Technology, Dezful, Iran

(Received: 2018/08/03 Accepted:2019/03/07)

Physical and antibacterial properties of ultrasound assisted emulsions from two essential oils (*Cuminum cyminum* and *Oliveria decumbens*) at concentrations of 1, 3, 5, 10 and 15% were studied. The results showed that all emulsions were stable after centrifugation. Although the samples were stable after heat-cool cycles, they became unstable at the freeze-thaw cycles. Emulsion samples with concentrations of 10 and 15%, were stored at 45 ºC for 35-days were unstable and became two-phase. Measuring the turbidity of emulsion samples with a spectrophotometer showed that with increasing concentrations of dispersed phase, the emulsion turbidity increased. Both emulsions showed antibacterial activity. But the *C. cyminum* emulsions showed higher inhibition zones against *Escherichia coli*, while *O. decumbens* emulsions represented higher inhibition zone against *Staphylococcus aureus.* Generally, the inhibition zone diameters of both emulsions increased dose dependently.

Keywords: Emulsion, *Oliveria decumbens* Vent., *Cuminum cyminum*, Essential oil, Ultrasound

* Corresponding Author E-Mail Address:habib.abbasi@hotmail.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]