



## بررسی پایداری فیزیکی و شیمیایی نانوامولسیون امگا۳ و اثر ضدباکتریایی آن بر دو باکتری

## استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروجینوزا

زهرا غفوری<sup>۱</sup>، علی فضل آرا<sup>۲\*</sup>، مهدی پورمهدی<sup>۲</sup>، ندا باورصاد<sup>۳،۴</sup>

۱- دانشجوی Ph.D، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۲- گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۳- گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

۴- مرکز تحقیقات نانو فناوری، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله :	
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۰۷	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۰۲	
کلمات کلیدی:	
امگا۳،	
نانوامولسیون،	
شیمیایی،	
فیزیکی،	
استافیلوکوکوس اورئوس	
DOI: 10.22034/FSCT.19.128.119	
DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.128.18.3	
* مسئول مکاتبات:	
a.fazlara@scu.ac.ir	

علی‌رغم اینکه روغن ماهی از منابع بسیار مهم امگا۳ می‌باشد و مصرف آن از جنبه تغذیه توصیه شده است، اما به دلیل عدم پایداری آن، امکان استفاده مستقیم در سیستم غذایی وجود ندارد. لذا با تبدیل ذرات آن به ابعاد نانو می‌توان بر پایداری آن افزود. هدف از انجام این مطالعه بررسی پایداری فیزیکی و شیمیایی نانوامولسیون امگا۳ در دماهای متفاوت و خواص ضدباکتریایی آن می‌باشد. بدین منظور روغن ماهی حاوی اسیدهای چرب امگا۳ به روش انرژي بالا در ابعاد نانو تولید گردید و خصوصیات فیزیکی (ابعاد ذرات، پتانسیل زتا، ویسکوزیته، و پایداری فیزیکی) و شیمیایی (pH و کدورت) آن طی نگهداری در ۳ دمای ۴، ۲۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد در طی گذشت ۷ روز، همین‌طور خواص ضدباکتریایی نانوامولسیون روغن ماهی بر دو باکتری شاخص گرم + و - مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که نانوامولسیون امگا۳ تولید شده بهترین پایداری را در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد داشته است. همین‌طور غلظت بهینه ۴ درصد از نانوامولسیون امگا۳ خاصیت ضدباکتریایی بر دوباکتری مورد بررسی، به ویژه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد.

## ۱- مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یک پاتوژن شناخته شده است که در سطح وسیعی از محیط زندگی کرده و مسئول بخش عمده‌ای از مسمومیت‌های میکروبی ناشی از مصرف مواد غذایی تازه و فرآوری شده می‌باشد [۱]. سودوموناس آئروجینوزا، مهم‌ترین پاتوژن گروه سودوموناس‌ها و همینطور جزء باکتری‌های فرصت طلب بوده که به طور وسیعی منجر به عفونت‌هایی در انسان می‌گردد. از جمله عفونت‌های ناشی از این باکتری در انسان ایجاد سپتی سمی، پنومونی، مننژیت و بیماری‌های کشنده دیگر می‌باشد. در بسیاری از مطالعات صورت گرفته، انتقال آلودگی و نهایتاً شیوع سودوموناس آئروجینوزا را از انواع نمونه‌های مواد غذایی گزارش نموده‌اند [۲، ۳، ۴].

در دهه‌های اخیر، عصاره‌های مختلف طبیعی مورد توجه بسیاری قرار گرفته‌اند. به‌ویژه فعالیت ضد میکروبی روغن‌ها و عصاره‌های با منشا گیاهی و حیوانی اساس بسیاری از کاربردها از جمله نگه‌داری مواد غذایی خام و فرآوری شده، مکمل‌سازی و درمان‌های طبیعی می‌باشد. در واقع به دلیل نگرانی فزاینده مردم در رابطه با ایمنی مواد غذایی و تاثیر احتمالی مواد افزودنی سنتزی بر سلامتی، محصولات طبیعی با خاصیت ضد میکروبی مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته‌اند. اسیدهای چرب امگا ۳، چربی‌های اشباع نشده با زنجیر بلند می‌باشند. از نظر کمی، مهم‌ترین اسیدهای چرب اشباع نشده با زنجیره بلند در رژیم غذایی، اسید سیس ایکوزاپنتانویک (EPA<sup>1</sup>) و اسید سیس دوکوزاهگزانویک (DHA<sup>2</sup>) هستند، که در منابع دریایی به‌خصوص در روغن ماهی به وفور وجود دارند [۵]. مصرف میزان کافی از اسیدهای چرب امگا ۳، به عنوان راهی برای کاهش خطر مرگ و میر خصوصاً در بیماری‌های قلبی شناخته شده است [۶].

علاوه بر مزایای سلامت‌بخش شناخته شده مصرف اسیدهای چرب امگا ۳ برای انسان از جمله بهبود حافظه، سلامت قلب و عروق و کاهش التهابات، فعالیت ضد میکروبی امگا ۳ نیز در مطالعات به خوبی ثابت شده است [۷، ۸، ۹]. در مطالعه‌ای با بررسی خواص ضد میکروبی اسیدهای چرب بلند زنجیر بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، میزان MIC<sup>3</sup> را برای هر دو اسید چرب (EPA و DHA)، ۱۲۸ میلی‌گرم بر لیتر و میزان

MBC<sup>4</sup> را برای EPA و DHA، به ترتیب ۱۲۸ و ۲۵۶ میلی‌گرم بر لیتر گزارش کردند [۱۰].

متأسفانه علی‌رغم ارزش غذایی بالا، میزان مصرف این اسیدهای چرب در رژیم غذایی کمتر از مقادیر توصیه شده است [۱۱]. برای مقابله با این مشکل، اخیراً بر تلفیق روغن‌های غنی از امگا ۳ به محصولات غذایی جهت غنی‌سازی تاکید شده است که منجر به افزایش علاقه در مشتریان و صنعت غذا می‌گردد [۱۲]. مشکلات مربوط به تولید غذای غنی شده با اسیدهای چرب امگا ۳ به دلیل عدم پایداری آنها و همین‌طور حلالیت کم در محیط آبی، با اکسیداسیون خود به خودی اسیدهای چرب بلند زنجیره همراه می‌باشد که منجر به رنسدیتی، کاهش زمان نگهداری [۱۳] و تخریب و بروز عطر و طعم "ماهی" این محصولات می‌گردد [۱۴]. لذا امکان استفاده مستقیم آنها در سیستم غذایی وجود ندارد.

این ویژگی‌ها، تاثیر منفی بر استفاده در سیستم‌های مایع و دیگر مواد غذایی دارد و کاربرد آنها را بسیار محدود می‌کند. بنابراین لازم است سیستم‌های تحویل موثر توسعه پیدا نماید که بتوان EPA و DHA را در سیستم غذایی به طور موثرتری توزیع کرد و به منظور افزایش کاربرد آنها و ثبات عملکردشان در غذاهای تجاری، از آنها در برابر ناپایداری محافظت نمود [۱۵]. استفاده از روغن ماهی با تصفیه بالا و بدون بو یا نانوامولسیون شده ممکن است روشی جایگزین برای پوشاندن خصوصیات حسی نامطلوب و در نتیجه محافظت از روغن ماهی در برابر اکسیداسیون خود به خودی در طی فرآوری باشد [۱۶]. استفاده از نانوذرات برای انتقال و حفاظت از مواد مغذی محلول در چربی و یا به عبارت دیگر فرم نانوکپسوله این ترکیبات، راهی مناسب جهت حل این مشکلات است [۱۷]. نانوامولسیون‌ها به عنوان امولسیون با اندازه ذرات کمتر از ۱۰۰ نانومتر تعریف شده‌اند [۱۸]. فناوری نانوامولسیون به دلیل ایجاد اندازه ذرات کوچک، افزایش پایداری و همین‌طور آماده‌سازی آسان، از موثرترین روش‌های کپسوله کردن بوده که با استفاده از آن، لپیدها می‌توانند برای دستیابی به انتشار بهتر در سیستم‌های غذایی، محافظت در برابر تخریب و در نهایت تقویت دسترسی زیستی<sup>5</sup>، در یک فاز آبی پراکنده شوند [۱۲].

4. Minimum bactericidal concentration  
5. Delivery systems  
6. Bioavailability

1. Eicosapentaenoic acid  
2. Docosahexaenoic acid  
3. Minimum inhibitory concentration

مطالعات متعددی در زمینه تهیه اثربخش نانومولسیون از روغن‌های مختلف صورت گرفته است [۱۹، ۲۰].

نانومولسیون با ترکیبات مناسب، پایدار و خواص کاربردی را می‌توان از طریق ترکیب امولسیفایرهای تجاری، روغن‌ها و آب به روش‌های با انرژی بالا (فراصوت و هموژنیزاسیون) و انرژی پایین (امولسیون‌سازی خود به خودی) تولید کرد. با این‌حال، اطلاعات کمی در رابطه با توسعه و ارزیابی نانومولسیون روغن ماهی مورد استفاده در فرمولاسیون مواد غذایی موجود است و همچنان برخی از چالش‌های روغن ماهی کپسوله شده توسط نانومولسیون و کاربرد آن در محصولات غذایی برطرف نشده است، زیرا روغن ماهی نسبت به عوامل محیطی (مانند عملیات حرارتی، هوا، قدرت یونی) در طی فرآوری و نگهداری نسبتاً ناپایدار است. به همین دلیل این مطالعه با هدف بررسی پایداری فیزیکی و شیمیایی نانومولسیون امگا۳ صورت گرفت. علاوه بر این، استفاده از این ترکیبات طبیعی برای جلوگیری از عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی از طریق اندازه‌گیری حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) علیه دو باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروجینوزا مورد بررسی قرار گرفت. این دو باکتری در لیست اولویت‌های جهانی WHO/OMS<sup>1</sup> به عنوان باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک می‌باشند [۲۱].

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مواد

روغن ماهی حاوی امگا۳ به طور آماده از شرکت داروسازی کارن تهیه گردید. مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه از جمله توئین ۸۰، لسیترین، محیط کشت مولر هینتون برات و حلال‌های مورد استفاده (اتانول و متانول) با درجه خلوص بالا از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. در تمامی آزمایش‌ها از آب مقطر دوبار تقطیر استفاده شد.

### ۲-۲- تهیه نانومولسیون امگا۳

نانو امولسیون امگا۳ به روش مقیمی و همکاران با کمی تغییرات تهیه شد. در ابتدا، لسیترین به عنوان سورفاکتانت (۰/۲)

(گرم) با امگا۳ (۴ گرم) مخلوط گردید. در مرحله بعدی، توئین ۸۰ به عنوان سورفاکتانت غیریونی (۴ گرم) در آب مقطر دوبار تقطیر (۹۵/۹ درصد) در بشرهایی به صورت جداگانه حل گردید. تمام مواد مصرفی باید به دمای اتاق رسیده باشند. سرانجام، فاز روغنی به فاز آبی اضافه شده و به مدت ۶۰ ثانیه با سرعت ۳۰۰۰ RPM<sup>2</sup> هموژنیزاسیون و به دنبال آن با استفاده از پردازنده ۲۰/۵ کیلوهرتز اولتراسونیک، با حداکثر توان خروجی ۴۰۰ وات به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. در طی سونیکاسیون دما با استفاده از حمام یخ ثابت نگه داشته شد [۲۲].

## ۲-۳- اندازه‌گیری سایز ذرات نانومولسیون

### امگا۳

روش‌هایی که بر پایه تفرق نور کار می‌کنند برای تعیین اندازه ذرات بین ۰/۱ تا ۱۰۰۰ میکرومتر مورد استفاده قرار می‌گیرند. زمانی که پرتوی نوری به یک سیستم کلوئیدی برخورد می‌کند، توسط ذرات یا قطرات پراکنده می‌شود. قطر متوسط ذرات در دستگاه آنالیز کننده ذرات DLS<sup>3</sup> تعیین گردید. این دستگاه بر اساس پراکنش نور لیزر عمل می‌کند. اندازه‌گیری ذرات بلافاصله پس از تهیه نانومولسیون و نگهداری نمونه‌ها در دماهای ۴، ۲۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد در روزهای ۰، ۳، ۵ و ۷ انجام شد. متوسط اندازه ذرات بر اساس میانگین قطر قطرات و کلیه نمونه‌ها در ۳ تکرار و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شدند [۲۰].

## ۲-۴- اندازه‌گیری پتانسیل زتا

برای تعیین بار الکتریکی سطحی ذرات در مقابل pH که به پتانسیل زتا موسوم است و شاخص توزیع اندازه ذرات (PDI)<sup>4</sup> از دستگاه اندازه‌گیری زتاسایزر شرکت مالورن انگلستان استفاده شد. تمامی آزمایشات در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت [۲۳]. بدین منظور، هریک از نمونه‌ها ابتدا با استفاده از آب مقطر ۱۰ برابر رقیق شدند. سپس نمونه‌ها توسط سرنگی داخل لوله موئین منتقل و لوله موئین در محل مخصوص در داخل دستگاه قرار گرفت. اندازه‌گیری پتانسیل زتا در pH معادل ۷/۴ و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و توان ۱۴۹ وات انجام شد.

2. Revolutions Per Minute  
3. Dynamic light scattering  
4. Polydispersity index

1. World Health Organization / Organización Mundial de la Salud

## ۲-۹- آنالیز حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) امگا ۳ و نانوامولسیون آن

MIC با استفاده از روش میکروداپلوشن براث در پلیت میکروتیتر ۹۶ خانه، در یک دوره زمانی تعیین و نهایتاً نسبت به انتخاب دوز بهینه اقدام شد. بدین منظور نانوامولسیون به طور سریال در محیط استریل مولر هیتون براث (MHB) در هر چاهک با غلظت‌های ۲، ۳، ۴ و ۵ درصد نانوامولسیون تهیه شد. هر چاهک با ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی استاندارد شده *استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923* ( $10^6$  CFU/ml) و *سودوموناس آئروجینوزا* جدا شده از مواد غذایی ( $10^8$  CFU/ml) تلقیح و به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. مقادیر MIC به عنوان کم‌ترین غلظت از نانوامولسیون که منجر به مهار رشد باکتریایی می‌شود، توسط میکروپلیت ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر با سلول‌های کنترل منفی (محیط کشت بدون تلقیح) مقایسه و مشخص شد. باکتری تلقیح شده در محیط کشت بدون افزودن عامل بازدارنده رشد به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. پس از آن MBC با کشت ۱۰۰ میکرولیتر از محتوی چاهک-های بدون رشد در پلیت‌های نوترینت آگار مورد بررسی واقع شد و به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. MBC به عنوان کم‌ترین غلظت نانوامولسیون که منجر به از بین رفتن ۹۹/۹٪ سلول‌های باکتریایی، پس از انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت می‌گردد، در نظر گرفته شد. تمام آزمایشات با ۳ تکرار صورت گرفت. تمام مراحل ذکر شده نیز برای امگا ۳ صورت گرفت [۲۸].

## ۲-۱۰- تجزیه و تحلیل آماری

تمام آزمایشات در ۳ تکرار و نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شدند. برای تحلیل داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس با اندازه‌گیری تکراری در سطح احتمال ۹۵٪ استفاده شد. محاسبات با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 انجام شد و نمودارها توسط نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۳ رسم شد.

## ۲-۵- سنجش میزان خامه‌ای شدن نانوامولسیون

پایداری فیزیکی با استفاده از روشی که توسط کوهن و کونا ارائه شده است (۲۰۱۲)، مورد بررسی قرار گرفت. بلافاصله پس از آماده‌سازی، ۱۵ میلی‌لیتر از نانوامولسیون درون یک استوانه مدرج پوشیده از پارافیلیم ریخته شده و به مدت ۱ هفته در ۳ دمای ۴، ۲۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پایداری امولسیون توسط اندازه‌گیری ارتفاع فاز سرم پایین (H) در زمان نگهداری، با استفاده از معادله زیر تعیین شد [۲۴].

$$\text{Separation \%} = 100 \times (H/H_0)$$

که در آن:

ارتفاع اولیه امولسیون  $H_0 =$

ارتفاع امولسیون پس از جداسازی فاز  $H =$

## ۲-۶- اندازه‌گیری ویسکوزیته ظاهری

میزان ویسکوزیته ظاهری نانوامولسیون تولید شده با استفاده از دستگاه ویسکومتر چرخشی بروکفیلد در دمای محیط، توسط پروب شماره ۱ با سرعت دورانی ۳۰ rpm اندازه‌گیری شد [۲۵]. برای این کار ۲۰ میلی‌لیتر از نمونه داخل ظرف مخصوص دستگاه ریخته شد و پروب به آرامی به‌طوری‌که با بدنه و کف برخورد نکند، داخل نمونه غوطه‌ور شد. مقدار ویسکوزیته پس از گذشت مدت زمانی حدود ۳۰ ثانیه از چرخش پروب تا رسیدن به یک مقدار عدد ثابت قرائت شد. مقدار ویسکوزیته برحسب (centipoise) cp گزارش شد.

## ۲-۷- اندازه‌گیری pH

اندازه‌گیری pH نانوامولسیون‌های امگا ۳، طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۲۸۵۲، در دماهای نگهداری ۴، ۲۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد به‌وسیله دستگاه pH متر دیجیتال در روزهای ۰، ۳، ۵ و ۷ اندازه‌گیری شد [۲۶].

## ۲-۸- اندازه‌گیری کدورت

کدورت نانوامولسیون‌های نگهداری شده در دماهای ۴، ۲۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر UV-VIS در طول موج ۶۰۰ نانومتر در روزهای ۰، ۳، ۵ و ۷ اندازه‌گیری شد. قبل از آنالیز، نمونه‌ها به نسبت ۱ به ۴۰ با محلول بافر فسفات ۱ مولار (pH: 7) رقیق شدند [۲۷].

## ۳- نتایج و بحث

## ۳-۱- بررسی پایداری امولسیون‌ها در طول

## مدت نگهداری

برای اینکه بتوان از فرمولاسیونی در صنایع غذایی و نوشیدنی استفاده کرد، می‌باید آن فرمولاسیون در دراز مدت پایدار باشد. لذا تاثیر زمان و دمای نگهداری شده با بررسی قطر قطرات، تغییر توزیع اندازه آن‌ها و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی بر پایداری امولسیون‌ها ارزیابی شد.

## ۳-۲- پتانسیل زتا

یکی از عوامل موثر در پایداری نانوامولسیون پتانسیل زتا می‌باشد، که هرچه قدر مقدار آن از صفر دورتر باشد (مثبت یا منفی) به واسطه دافعه الکتریکی بین ذرات، امولسیون پایدارتر است. با توجه به شکل ۱ در این مطالعه مقدار این پارامتر  $mV$  ۲۶۷- گزارش شده است، که می‌توان نتیجه گرفت تا حدودی بالا بودن مقدار آن تاثیر قابل توجهی در پایداری نانوامولسیون داشته است. همین‌طور میزان پارامتر  $PDI$  ۰/۳۸ مشاهده شده است که با گزارش سایز ذرات مطالعه حاضر، همین‌طور با نتایج مطالعه مارکس و همکاران (۲۰۱۸) مطابقت دارد [۲۹]. در واقع  $PDI$  منعکس کننده قطر ذرات بوده و می‌تواند برای نشان دادن توزیع اندازه ذرات امولسیون استفاده شود. میزان  $PDI$   $> 0.4$  نشان دهنده پایداری سیستم امولسیون می‌باشد.

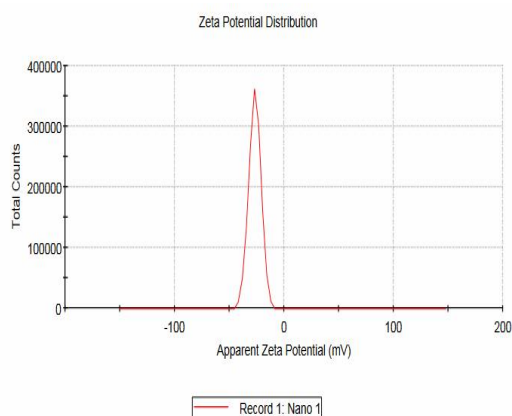


Fig 1 zeta potential of nanoemulsion

## ۳-۳- تاثیر دما و زمان بر سایز ذرات

## نانوامولسیون

براساس نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت، که در فاکتور سایز ذرات، زمان، دما و اثر متقابل آن‌ها تاثیر داشته

است ( $p < 0.001$ ). به طوری که روند تغییرات در ۳ دمای مورد بررسی و همین‌طور تمام دماها با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشته‌اند ( $p < 0.05$ ). بر اساس نتایج می‌توان دریافت با وجود آن‌که در فرمولاسیون نسبت سورفاکتانت به ماده حامل رعایت شده، و میزان کافی از سورفاکتانت پوشاندن کامل سطح ذرات روغن-آب را فراهم نموده است و با ایجاد ممانعت فضایی و دافعه الکترواستاتیک بالا، از افزایش اندازه ذرات و آمیختن ذرات ممانعت به عمل آمده، دما تاثیر معنی‌داری بر تولید و توزیع قطر قطرات داشته است. این نتیجه با نتایج کومایکو و همکاران (۲۰۱۵) و تیان و همکاران (۲۰۱۶) مطابقت داشت [۳۱،۳۰]. میانگین سایز ذرات نانوامولسیون در روز صفر و همچنین پس از گذشت ۷ روز همچنان زیر ۱۰۰ نانومتر بود که نشان‌دهنده پایداری آن در دماهای متفاوت پس از ۱ هفته می‌باشد که مشابه نتایج دیگر مطالعات می‌باشد [۳۲]. همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، بعد از

نگهداری در دماهای ۴، ۲۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز، تفاوت معنی‌داری در اندازه ذرات نانوامولسیون‌ها دیده شده است که ثابت می‌شود آن‌ها در برابر دما ناپایدار بوده، در صورتی‌که در برابر افزایش قطر قطرات ناشی از لخته شدن، ادغام<sup>۱</sup> و رسیدن استوالد<sup>۲</sup> پایدار بوده‌اند. رسیدگی استوالد در نانوامولسیون‌های روغن در آب، به عنوان افزایش در میانگین متوسط قطر در نتیجه انتشار فاز روغن از قطرات کوچک به قطرات بزرگ‌تر توصیف می‌شوند. شامل انتشار فاز روغن از قطرات کوچک تا به قطرات بزرگ‌تر است که منجر به افزایش میانگین اندازه قطرات می‌شود [۳۳]. بر طبق نتایج گزارش شده در جدول ۱، علاوه بر این‌که بهترین دمای نگهداری برای پایداری اندازه ذرات، ۲۵ درجه سانتی‌گراد نشان داده شده است، همچنین دیده می‌شود که افزایش یا کاهش دمای نگهداری از دمای محیط، منجر به افزایش سایز ذرات به دلیل ادغام ناشی از رسیدگی استوالد می‌شود. در مطالعه منصوری‌نژاد و همکاران در سال ۲۰۱۶، بررسی پایداری نانوامولسیون روغن ماهی برای ۲۸ روز نشان داد که اندازه ذرات در ۴ درجه سانتی‌گراد نسبتاً ثابت باقی ماند، در حالی‌که افزایش قابل توجهی در ۲۵ درجه سانتی‌گراد از روز ۱۴ نشان داده شد [۳۴]. همین‌طور در بررسی صورت گرفته توسط لیانگ و همکاران (۲۰۱۳)، گزارش کردند

1. Fusion  
2. Ostwald ripening

با گذشت زمان، ویسکوزیته در هر ۳ دما افزایشی بود که در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، مطابق با نتایج مرتبط با سایز ذرات کم‌ترین افزایش را داشته است. افزایش میزان برخورد قطرات به یکدیگر سبب افزایش ویسکوزیته فاز پیوسته می‌گردد، این نتایج با نتایج حاصل از اندازه‌گیری میانگین قطر قطرات و کدورت هم‌خوانی دارد. به عبارتی با کاهش در اندازه ذرات، حرکت براونی ذرات بر نیروهای جاذبه غلبه کرده و باعث افزایش ویسکوزیته می‌گردد که با پژوهش‌های لی و همکاران (۲۰۱۴) و لیانگ و همکاران (۲۰۱۴) مطابقت دارد [۳۸، ۳۹].

### ۳-۵- تاثیر دما و زمان بر کدورت

پخش نور توسط قطرات امولسیون، میزان کدورت امولسیون را تعیین می‌کند. ویژگی‌های نوری نانوامولسیون توسط جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد که در شکل ۳-b آمده است. براساس نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت، که در فاکتور کدورت، زمان، دما و اثر متقابل آن‌ها تاثیر داشته است ( $p < 0.001$ ). به طوری که روند تغییرات در هر ۳ دمای مورد بررسی، معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0.05$ ). با گذشت زمان نگهداری نانوامولسیون‌ها در دماهای ۴ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد، میزان کدورت کاهش یافت. اگر چه تغییرات در روزهای ۳ و ۵ چندان معنی‌دار نبود. دلیل اصلی کاهش کدورت، کاهش در میانگین قطر ذرات می‌باشد. به‌ویژه در دو دمای ۴ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد با گذشت زمان تا روز ۷ میانگین قطر ذرات کاهش داشته است. همینطور مطابق با نتایج گزارش شده توسط بیردی (۲۰۰۸) پراکنش نوری در قطرات ریزتر کم‌تر بود [۷]. دلیل دیگر این پدیده می‌تواند حل شدن قسمتی از فاز روغنی در میسل‌های سورفاکتانت در طول نگهداری باشد. این نتیجه با نتایج آزمون اندازه‌گیری میانگین قطر ذرات مطابقت داشت. هم‌چنین راثو و مک کلمنتز (۲۰۱۲) کاهش میزان کدورت نانوامولسیون‌ها هم‌زمان با کاهش در میانگین قطر ذرات را گزارش نمودند [۴۰]. فرجی و همکاران (۲۰۲۰) در مطالعه‌ای به مقایسه تاثیر نوع سورفاکتانت بر روی اندازه ذرات نانوامولسیون تهیه شده پرداخته‌اند، نتایج گزارش شده توسط آن‌ها نشان می‌دهد که سورفاکتانت توپین ۸۰ منجر به تولید نانوامولسیون با اندازه ذرات ریزتر می‌شود [۴۱]. همین‌طور لی و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی نانوامولسیون کورکومین نامحلول در آب نتیجه گرفتند که در حضور سورفاکتانت توپین ۸۰ کدورت کاهش یافت [۴۲] که با

که در طی ۳۰ روز نگهداری نانوامولسیون بتاکاروتن در دماهای ۴ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد، اندازه ذرات نانوامولسیون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد پایدارتر بوده است [۳۵]. با گذشت زمان تا روز ۷، کاهش در میانگین اندازه ذرات دیده می‌شود که این پدیده یعنی کاهش قطر قطرات، حل شدن (Solubilization) نامیده می‌شود و علت آن احتمالاً این است که با گذشت زمان میسل‌های سورفاکتانت موجود در توده، بخشی از مولکول‌های موجود در سطح قطرات را جذب می‌کنند [۳۶] و قطره‌های جدیدی می‌سازند. در پژوهش دولگراکی (۲۰۱۷) مشاهده شد که در مدت زمان نگهداری، قطر قطرات در امولسیون مونو دیسپرس به سمت تولید قطرات ریزتر تغییر پیدا می‌کند [۳۷].

### ۳-۴- تاثیر دما و زمان بر ویسکوزیته

اندازه‌گیری ویسکوزیته یک پارامتر بسیار مهم در تعیین خصوصیات فیزیکوشیمیایی دیسپرسیون‌های کلوییدی می‌باشد. معمولاً ویسکوزیته نانوامولسیون بزرگتر از امولسیون‌های معمولی است، زیرا لایه سطحی بزرگتر در اطراف ذرات کوچک‌تر احاطه شده است. براساس نتایج به دست آمده در شکل ۲ می‌توان نتیجه گرفت، که در فاکتور ویسکوزیته، زمان، دما و اثر متقابل آنها تاثیر داشته است ( $p < 0.001$ ). ویسکوزیته نانوامولسیون با توجه به مقدار فاز پیوسته و گسسته متفاوت است. همان‌طور که گزارش شده است دما تاثیر معنی‌داری در افزایش یا کاهش ویسکوزیته طی گذشت ۷ روز داشته است. به طوری که روند تغییرات در هر ۳ دمای مورد بررسی معنی‌دار بوده است اما اختلاف معنی‌داری بین دمای ۴ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد دیده نمی‌شود ( $p > 0.05$ ).

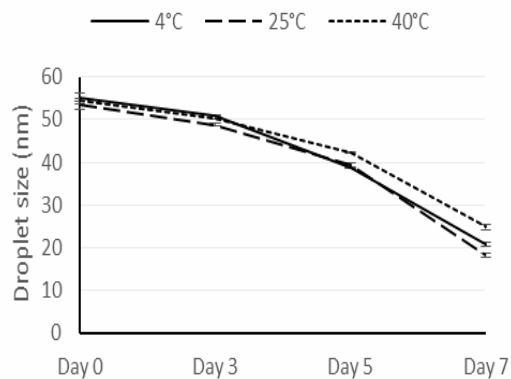


Fig 2 Effect of different time and temperature on the droplet size in nanoemulsion

### ۳-۶- تاثیر دما و زمان بر خامه‌ای شدن

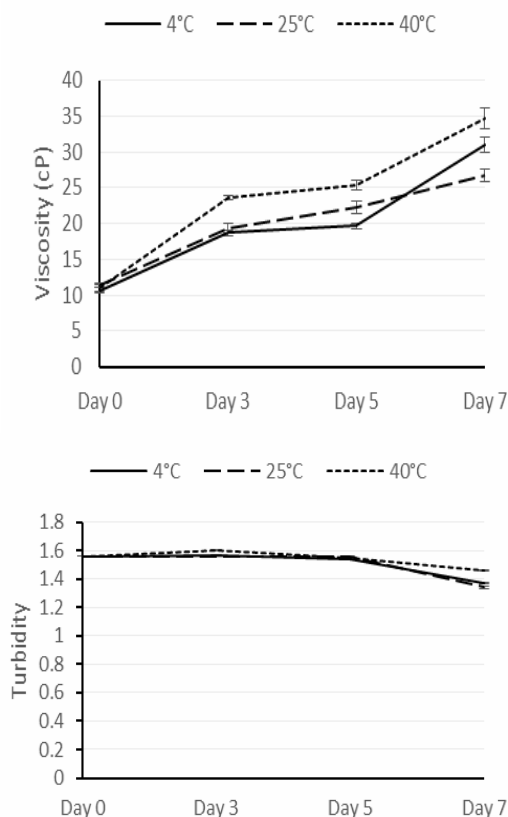
#### نانوامولسیون

نانوامولسیون‌ها همانند امولسیون‌های متداول، سیستم‌های نیمه پایداری هستند و در طول زمان در اثر فرآیندهای فیزیکوشیمیایی مختلف اعم از تفکیک گرانشی<sup>۱</sup>، انبوهش<sup>۲</sup>، ادغام دچار شکست می‌شوند. در مقایسه با امولسیون‌های متداول، نانوامولسیون‌ها نسبت به پدیده‌های تفکیک گرانشی و انبوهش قطرات از پایداری بیشتری برخوردار هستند [۴۳] ولی به‌علت کوچک بودن اندازه ذراتشان، به‌شدت مستعد رسیدگی استوالد می‌باشند.

براساس نتایج به‌دست آمده در شکل ۴-ا می‌توان نتیجه گرفت، که در فاکتور خامه‌ای شدن زمان، دما و اثر متقابل آن‌ها تاثیر داشته است ( $p < 0.001$ ). به‌طوری‌که نتایج مربوط به دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد با دو دمای دیگر اختلاف معنی‌دار دارد ( $p < 0.05$ ). با توجه به جدول ۱، دمای ۲۵ و ۴ درجه سانتی‌گراد با میانگین (۱۱/۴۸٪ و ۱۱/۶۸٪) به‌ترتیب بهترین نتیجه را پس از ۷ روز نشان می‌دهند. به عبارتی پایداری بالاتر نانوامولسیون در برابر پدیده انبوهش به‌دلیل قطر کوچک آن‌ها بوده، زیرا کاهشی شدن قدرت نیروی جاذبه نسبت به نیروی دافعه میان سطح ذرات نانوامولسیون، متناسب با کاهش در میانگین قطر قطرات می‌باشد. مطابق قانون استوک، با کاهش در اندازه ذرات، آهنگ صعود ذرات به سطح نمونه‌ها کاهش می‌یابد. مطابق نمودار در مدت زمان نگهداری میزان خامه‌ای شدن روند صعودی نشان داده است. افزایش در اندیس خامه‌ای شدن توسط مکانیسم‌های مختلف مانند انبوهش، هم‌آمیختگی و رسیدگی استوالد توصیف می‌شود. اگرچه اندازه ذرات در طی مدت زمان نگهداری روند کاهش داشته است، اما به‌دلیل وجود ذراتی با اندازه‌های ناهمگون و وجود ذرات بدون سورفاکتانت احتمالی، ذرات در اثر حرکات تصادفی با یکدیگر ادغام شده و پدیده انبوهش در طی مدت زمان نگهداری صورت می‌گیرد. البته پدیده انبوهش نوعی توده‌ای شدن برگشت‌پذیر می‌باشد که با وارد کردن مقدار کم انرژی مانند تکان دادن، بازگرداندن ذرات امکان‌پذیر است. به‌طور کلی نتایج رئولوژیکی مطالعه حاضر نشان می‌دهد که نانوامولسیون تولید شده در طول نگهداری در برابر خامه‌ای شدن و جداسدن فازها پایدار بوده و به همین جهت مناسب برای افزوده شدن در سیستم‌های غذایی و نوشیدنی می‌باشد.

نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. در واقع این کاهش ناشی از به هم پیوستن ذرات فاز پراکنده و در نتیجه کاهش جذب نوری امولسیون‌ها است. دمای نگهداری بالاتر سبب افزایش ویسکوزیته فاز پیوسته شده و سرعت حرکت فاز پراکنده به سطوح بالایی را کاهش داده و سبب تأخیر در کاهش کدورت نمونه‌ها می‌گردد.

اندازه غلظت و ضریب شکست نسبی ذرات از جمله عوامل موثر بر میزان کدورت سوسپانسیون هستند و کاهش این پارامترها می‌تواند موجب کاهش در کدورت شود. نتایج بدست آمده نشان داد که کاهش در میزان کدورت را می‌توان به کاهش در اندازه ذرات کمپلکس (مطابقت با نتایج مربوط به اندازه ذرات)، میزان پایین قطرات امگا۳ آزاد در محیط آبی، تغییر در ضریب شکست نور تابیده شده و پراکنده کردن آن نسبت داد. به‌طور کلی با توجه به شکل ۳-ب، کدورت نانوامولسیون‌های تولید شده متاثر از طول زمان و دمای نگهداری می‌باشند.



**Fig 3** Effect of different time and temperature on the a) viscosity b) turbidity in nanoemulsion

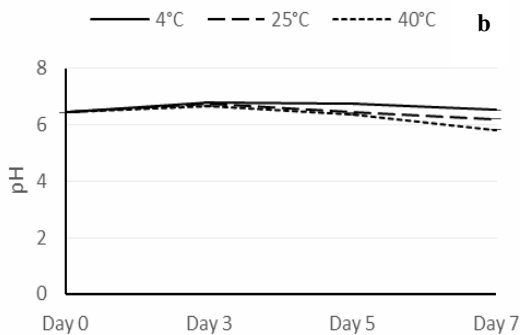
1. Gravitational separation
2. Aggregation

**Table 1** Physicochemical properties of Omega3 nanoemulsion

Storage time (day)	Storage temperature (°C)	Turbidity	Creaming (%)	pH	Drop size (nm)	Viscosity (cP)
0	A	1.56 ± 0.002 <sup>aA</sup>	6.51 ± 0.12 <sup>cA</sup>	6.44 ± 0.000 <sup>cA</sup>	55 ± 1.33 <sup>aA</sup>	10.67 ± 0.33 <sup>cA</sup>
	B	1.56 ± 0.002 <sup>aA</sup>	6.81 ± 0.18 <sup>bB</sup>	6.44 ± 0.000 <sup>bA</sup>	53.33 ± 1.04 <sup>aA</sup>	11.33 ± 0.33 <sup>dA</sup>
	C	1.56 ± 0.002 <sup>aA</sup>	10 ± 0.000 <sup>cC</sup>	6.44 ± 0.000 <sup>bA</sup>	54.52 ± 0.28 <sup>aA</sup>	11 ± 0.58 <sup>dA</sup>
3	A	1.57 ± 0.0007 <sup>aA</sup>	12.87 ± 0.41 <sup>bA</sup>	6.79 ± 0.006 <sup>aA</sup>	51.04 ± 0.16 <sup>aA</sup>	18.67 ± 0.33 <sup>bA</sup>
	B	1.56 ± 0.0017 <sup>aB</sup>	13.06 ± 0.18 <sup>aA</sup>	6.75 ± 0.003 <sup>aB</sup>	48.78 ± 0.28 <sup>aB</sup>	19.33 ± 0.67 <sup>cB</sup>
	C	1.60 ± 0.0017 <sup>aC</sup>	13.60 ± 0.16 <sup>bA</sup>	6.66 ± 0.003 <sup>aC</sup>	50.35 ± 0.36 <sup>bA</sup>	23.67 ± 0.33 <sup>cA</sup>
5	A	1.54 ± 0.0017 <sup>aA</sup>	12.99 ± 0.28 <sup>bA</sup>	6.75 ± 0.009 <sup>aA</sup>	38.74 ± 0.26 <sup>bB</sup>	19.67 ± 0.33 <sup>bC</sup>
	B	1.56 ± 0.0011 <sup>aB</sup>	12.07 ± 0.94 <sup>aA</sup>	6.44 ± 0.003 <sup>bB</sup>	39.27 ± 0.65 <sup>bB</sup>	22.33 ± 0.87 <sup>bB</sup>
	C	1.55 ± 0.0020 <sup>aC</sup>	13.43 ± 0.21 <sup>bA</sup>	6.36 ± 0.007 <sup>cC</sup>	42.25 ± 0.26 <sup>cA</sup>	25.33 ± 0.67 <sup>bA</sup>
7	A	1.37 ± 0.0017 <sup>bA</sup>	14.37 ± 0.26 <sup>aA</sup>	6.51 ± 0.003 <sup>bA</sup>	20.78 ± 0.41 <sup>cA</sup>	31 ± 1.15 <sup>aB</sup>
	B	1.34 ± 0.005 <sup>bB</sup>	13.96 ± 0.66 <sup>aA</sup>	6.20 ± 0.003 <sup>cB</sup>	18.23 ± 0.38 <sup>cB</sup>	26.67 ± 0.88 <sup>aB</sup>
	C	1.46 ± 0.0011 <sup>bC</sup>	14.47 ± 0.28 <sup>aA</sup>	5.82 ± 0.006 <sup>dC</sup>	24.85 ± 0.58 <sup>dC</sup>	34.67 ± 1.45 <sup>aA</sup>

A: 4 °C, B: 25 °C, C: 40 °C

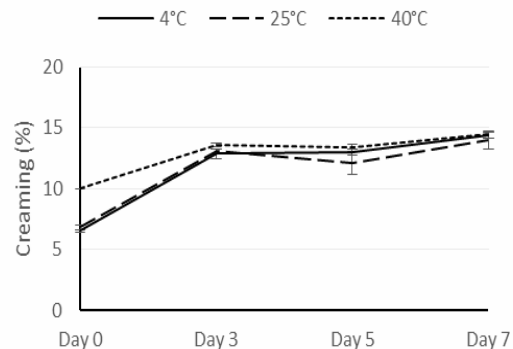
Different superscript letters among columns denote significant difference (p<0.05) (big and small letters related to the time and temperature, respectively)



**Fig 4** Effect of different time and temperature on the a) creaming b) pH in nanoemulsion

### ۳-۷-تاثیر دما و زمان بر pH

بر اساس نتایج مندرج در جدول ۱ می‌توان نتیجه گرفت، که در فاکتور pH، زمان، دما و اثر متقابل آن‌ها تاثیر داشته است (p<0.001). تاثیر دما بر پایداری pH نانوامولسیون‌ها در دماهای ۴، ۲۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز بررسی شد. با توجه به شکل b-pH تمام نمونه‌های مورد بررسی در طی ۷ روز نگهداری در دماهای متفاوت در محدوده مناسب (۶/۱۹-۶/۸) اکثر مواد غذایی می‌باشد، به جز نمونه نگهداری شده در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در روز ۷ (pH معادل ۵/۸۲) که ممکن است به دلیل هیدرولیز اسیدهای چرب به واسطه نگهداری در دمای بالا باشد. بر اساس نمودار، نتایج مربوط به دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تفاوت معنی‌داری با دیگر دماهای مورد بررسی داشته و بهترین نتیجه را دمای ۴ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد به ترتیب با میانگین (۶/۶۲ و ۶/۴۶) پس از گذشت ۷ روز داشته‌اند.



### ۳-۸-اثر ضد میکروبی

حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) برای اسیدهای چرب سیس ایکوزاپنتانویک (EPA) و سیس دوکوزاهگزانویک (DHA) توسط روش میکرودیالوژن برات بر روی دو باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آنروجینوزا صورت گرفت. در تمام آزمایشات اتانول و دی متیل سولفوکساید (DMSO) به عنوان حلال در نظر گرفته شدند، لازم به ذکر است که این حلال‌ها در غلظت و میزان به‌کار رفته هیچ‌کدام اثر بازدارندگی بر رشد باکتری‌های مورد بررسی نداشتند. به منظور شناسایی غلظت بهینه نانوامولسیون با خاصیت ضدباکتریایی، غلظت‌های مختلفی از امگا ۳ (۲، ۳، ۴، ۵٪) تهیه شد. اما به دلیل بالا رفتن بوی ماهی و عدم پذیرش ارگانولپتیکی در غلظت ۵ درصد، نهایتاً غلظت ۴ درصد به عنوان کاربردی‌ترین غلظت



ضدمیکروبی، به صورت گسترده مورد استقبال واقع نشده است. با این وجود اثر این عوامل بر روی غشای سلولی میکروبی نشان داده شده است که از رشد میکروارگانیسم‌ها جلوگیری کرده و باعث بهبود در سلامت انسان و حیوان می‌گردد. از سویی با توجه به آن که مقاومت میکروبی نسبت به عوامل ضدمیکروبی در حال افزایش است، اسیدهای چرب امگا ۳ به دلیل دارا بودن خواص ضدمیکروبی و تنظیم کننده سیستم ایمنی بدن، همین‌طور پایداری فیزیکی و شیمیایی نانوامولسیون‌های تولیدی مربوطه می‌تواند به عنوان افزودنی‌های جایگزین و یا جانبی در لیست عوامل ضدمیکروبی طبیعی در نظر گرفته شوند. هرچند مطالعات بیشتری مورد نیاز است تا از این فرضیه حمایت کند.

### ۵- سپاسگزاری

هزینه‌های انجام مطالعه حاضر از طریق پژوهانه سال ۱۴۰۰ به شماره SCU.VF400.417 دانشگاه شهید چمران اهواز تأمین شده است که بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه سپاسگزاری می‌گردد.

### ۶- منابع

- [1] Wu, Q., Ye, Y., Li, F., Zhang, J., & Guo, W. 2016. Prevalence and genetic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* in drinking water in Guangdong Province of China. *LWT-Food Science and Technology*, 69, 24-31.
- [2] Benie, C., Nathalie, G., Adjéhi, D. 2017. Prevalence and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from bovine meat, fresh fish and smoked fish. *Arch Clin Microbiol*, 8 (3):1-9.
- [3] Sharafati Chaleshtori, R., Mazroii Arani, N., Alizadeh, E., & Etemadi, A. 2020. Prevalence and antimicrobial resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from rose water and herbal distillates in Kashan, 2018. *Journal of Food Microbiology*, 7(2), 10-17.
- [4] Danaei, G., Ding, E. L., Mozaffarian, D., Taylor, B., Rehm, J., Murray, C. J., & Ezzati, M. 2009. The preventable causes of death in the United States: comparative risk assessment of dietary, lifestyle, and

با خاصیت ضدباکتریایی گزارش شد. بر طبق نتایج حاصله، هرچند تفاوت آماری معنی‌داری در نتایج امگا ۳ و نانوامولسیون آن با یکدیگر دیده نشد، با این حال، غلظت ۴ درصد از نانوامولسیون امگا ۳ اثر بهتری بر بازدارندگی از رشد باکتری‌های مورد بررسی از خود نشان داد. بر اساس مطالعه‌ای که واکر در سال ۲۰۱۶ بر روی اثر ضدباکتریایی روغن بقایای ماهی سالمون سالار بر دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروجینوزا* انجام داد، نتایجی مشابه نتایج مطالعه حاضر گزارش داده است. این محقق گزارش کرد که بیش‌ترین اثر ضدباکتریایی بر روی باکتری *سودوموناس آئروجینوزا* غلظت ۱۲/۵٪ (حجمی/حجمی) بوده است [۴۴]. مطالعات آزمایشگاهی و بالینی نیز نشان می‌دهد که اسیدهای چرب امگا ۳، به تنهایی یا به صورت ترکیب با داروهای ضدمیکروبی، دارای خواص ضدمیکروبی می‌باشند. برای مثال، به کمک افزایش بیوستز اسیدهای چرب امگا ۳ در نوعی ماهی تراریخته، مشاهده شده که با افزایش تولید EPA و DHA از رشد باکتریایی جلوگیری شده و تولید سیتوکینازهای ضد التهابی افزایش یافته و در نتیجه از عفونت ماهی با ویبریو وولنیفیکوس محافظت می‌شود [۳۸]. همین‌طور میل هومنز و همکاران (۲۰۱۲) با مطالعه بر روی اثر ضدباکتریایی اسید چرب DHA بر باکتری *بورخولدریا سنوسپاسیا*، گزارش کردند که اسیدهای چرب امگا ۳ خواص ضدمیکروبی موثری داشته است [۴۵].

### ۴- نتیجه‌گیری کلی

نانوامولسیون‌های امگا ۳ تولید شده با گذشت ۷ روز و در دماهای متفاوت به لحاظ شیمیایی و فیزیکی پایدار بوده‌اند، اما با نگهداری در دماهای بالاتر، قطر قطرات کاهش کمتری داشته که به دلیل تجمع ناشی از دست دادن آب قسمتی از سورفاکتانت می‌باشد، همین‌طور ویسکوزیته و کدورت بیشتری نسبت به نگهداری در دماهای پایین‌تر داشتند. لذا نگهداری در دمای محیط، بهترین پایداری را در نانوامولسیون امگا ۳ نشان داده است. همچنین با در نظر گرفتن پذیرش ارگانولپتیکی و سایر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مربوط به نانوامولسیون مورد مطالعه، غلظت ۴ درصد خاصیت ضدباکتریایی موثری از خود نشان داد. با این حال، به دلیل وجود درک کمی از مکانیسم ضدمیکروبی امگا ۳، استفاده از آن به عنوان عوامل

- obstacles in the food industry. *Food & Function*, 6(1):41-54.
- [15] Iafelice, G., Caboni, M. F., Cubadda, R., Criscio, T. D., Trivisonno, M. C., & Marconi, E. 2008. Development of functional spaghetti enriched with long chain omega-3 fatty acids. *Cereal chemistry*, 85(2), 146-151.
- [16] Liu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Zhou, C., & Zhang, Z. 2008. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*, 60(15), 1650-1662.
- [17] Moghimi, R., Aliahmadi, A., Rafati, H., Abtahi, H. R., Amini, S. H., Feizabadi, M. M. 2018. Antibacterial and anti-biofilm activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* oil against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Molecular Liquids* 265 765-770
- [18] Yang, Y., Marshall-Breton, C., Leser, M. E., Sher, A. A., & McClements, D. J. 2012. Fabrication of ultrafine edible emulsions: Comparison of high-energy and low-energy homogenization methods. *Food hydrocolloids*, 29(2), 398-406.
- [19] Chee, C. P., Gallaher, J. J., Djordjevic, D., Faraji, H., McClements, D. J., Decker, E. A., Coupland, J. N. 2005. Chemical and sensory analysis of strawberry flavoured yogurt supplemented with an algae oil emulsion. *Journal of dairy research*, 72(3), 311-316.
- [20] Saberi, A. H., Fang, Y., & McClements, D. J. 2013. Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: factors affecting particle size using spontaneous emulsification. *Journal of colloid and interface science*, 391, 95-102.
- [21] Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Zorzet, A. 2018. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), 318-327.
- [22] Hosseinnia, M., Alizadeh Khaledabad, M., Almasi, H. 2017. Optimization of *Ziziphora clinopodioides* essential oil microencapsulation by whey protein isolate and pectin: A comparative study. *International Journal of Biological Macromolecules*. 101, 958-966.
- [23] Kuhn, K. R. and Cunha, R. L. 2012. Flaxseed oil – Whey protein isolate emulsions: Effect of high pressure metabolic risk factors. *PLoS medicine*, 6(4); 1-23.
- [5] Shin, S. Y., Bajpai, V. K., Kim, H. R., & Kang, S. C. 2007. Antibacterial activity of eicosapentaenoic acid (EPA) against foodborne and food spoilage microorganisms. *LWT-Food Science and Technology*, 40(9), 1515-1519.
- [6] Desbois, A. P., & Lawlor, K. C. 2013. Antibacterial activity of long-chain polyunsaturated fatty acids against *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus*. *Marine drugs*, 11(11), 4544-4557.
- [7] Chanda, W., Joseph, T. P., Guo, X. F., Wang, W. D., Liu, M., Vuai, M. S., Zhong, M. T. 2018. Effectiveness of omega-3 polyunsaturated fatty acids against microbial pathogens. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 19(4), 253.
- [8] Cui H.Y, Zhou H, Lin L. 2016. The specific antibacterial effect of the salvia oil nanoliposomes against *Staphylococcus aureus* biofilms on milk container. *Food Control*. 61:92-98.
- [9] Lenihan-Geels, G., & Bishop, K. S. 2016. Alternative origins for omega-3 fatty acids in the diet. In *Omega-3 Fatty Acids* (pp. 475-486). Springer, Cham.
- [10] Mason, T. G., Wilking, J. N., Meleson, K., Chang, C. B., & Graves, S. M. 2006. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: condensed matter*, 18(41), R635.
- [11] Salvia-Trujillo, L.; Soliva-Fortuny, R.C.; Rojas-Graü, M.A.; Martín-Belloso, O.; McClements, D.J. 2017. Edible nanoemulsions as carriers of active ingredients: A review. *Annu. Rev. Food Sci. Technol*, 8, 439-466.
- [12] Schreiner, M., & Windisch, W. 2006. Supplementation of cow diet with rapeseed and carrots: influence on fatty acid composition and carotene content of the butter fat. *Journal of Food Lipids*, 13(4), 434-444.
- [13] Henna Lu, F. S., & Norziah, M. H. 2011. Contribution of microencapsulated n-3 PUFA powder toward sensory and oxidative stability of bread. *Journal of Food Processing and Preservation*, 35(5), 596-604.
- [14] Walker RM, Decker EA, McClements DJ. 2015. Development of food-grade nanoemulsions and emulsions for delivery of omega-3 fatty acids: opportunities and

- ripening stability. *Langmuir*, 24(22), 12758-12765.
- [34] Nejadmansouri, M., Hosseini, S. M. H., Niakosari, M., Yousefi, G. H. & Golmakani, M. T. 2016. Physicochemical properties and oxidative stability of fish oil nanoemulsions as affected by hydrophilic lipophilic balance, surfactant to oil ratio and storage temperature. *Colloids & Surfaces A Physicochemical & Engineering Aspects*, 506, 821-832.
- [35] Liang, R., Shoemaker, C. F., Yang, X., Zhong, F., & Huang, Q. 2013. Stability and bioaccessibility of  $\beta$ -carotene in nanoemulsions stabilized by modified starches. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(6), 1249-1257. McClements D, Rao J. Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2011; 51: 285-330
- [36] Ariyaprakai, S., & Dungan, S. R. 2007. Solubilization in monodisperse emulsions. *Journal of colloid and interface science*, 314(2), 673-682.
- [37] Doulgeraki, A. I., Di Ciccio, P., Ianieri, A., & Nychas, G. J. E. 2017. Methicillin-resistant food-related *Staphylococcus aureus*: a review of current knowledge and biofilm formation for future studies and applications. *Research in microbiology*, 168(1), 1-15.
- [38] Liang, Y., Gillies, G., Patel, H., Matia-Merino, L., Ye, A., & Golding, M. 2014. Physical stability, microstructure and rheology of sodium-caseinate-stabilized emulsions as influenced by protein concentration and non-adsorbing polysaccharides. *Food hydrocolloids*, 36, 245-255.
- [39] Cheng, C. L., Huang, S. J., Wu, C. L., Gong, H. Y., Ken, C. F., Hu, S. Y., & Wu, J. L. 2015. Transgenic expression of omega-3 PUFA synthesis genes improves zebrafish survival during *Vibrio vulnificus* infection. *Journal of biomedical science*, 22(1), 1-13.
- [40] Rao, J., & McClements, D. J. 2012. Food-grade microemulsions and nanoemulsions: Role of oil phase composition on formation and stability. *Food hydrocolloids*, 29(2), 326-334.
- [41] Faraji, N., Alizadeh, M., & Almasi, H. 2020. Evaluation of Physicochemical and homogenization. *Journal of Food Engineering*, 111(2), 449–457.
- [24] Rosso, D. Huo, D L. Stenstrom, M K. 2006. Effects of interfacial surfactant contamination on bubble gas transfer. *Journal Chemical Engineering Science*, 61(16), 5500-5514
- [25] Komaiko, J., & McClements, D. J. 2015. Low-energy formation of edible nanoemulsions by spontaneous emulsification: Factors influencing particle size. *Journal of Food Engineering*, 146, 122-128.
- [26] Iranian National Standardization Organization. ISIRI. 2010. Milk and milk products – Determination of titrable acidity and value pH-Test method. *Inst Stand Indus Res Iran 1 th Edition*. 2852
- [27] Lee, S. J., & McClements, D. J. 2010. Fabrication of protein-stabilized nanoemulsions using a combined homogenization and amphiphilic solvent dissolution/evaporation approach. *Food Hydrocolloids*, 24(6-7), 560-569.
- [28] Li, M., Ma, Y., & Cui, J. 2014. Whey-protein-stabilized nanoemulsions as a potential delivery system for water-insoluble curcumin. *LWT-Food science and technology*, 59(1), 49-58.
- [29] da Silva Marques, T. Z., Santos-Oliveira, R., de Siqueira, L. B. D. O., da Silva Cardoso, V., de Freitas, Z. M. F., & da Silva Ascenção, R. D. C. 2018. Development and characterization of a nanoemulsion containing propranolol for topical delivery. *International journal of nanomedicine*, 13, 2827.
- [30] Tian, Y., Guo, Y., & Zhang, W. 2016. Effect of Oil Type, Aliphatic Alcohol, and Ionic Surfactants on the Formation and Stability of Ceramide-2 Enriched Nanoemulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 37(8), 1115-1122.
- [31] Henna Lu, F. S., & Norziah, M. H. 2011. Contribution of microencapsulated n-3 PUFA powder toward sensory and oxidative stability of bread. *Journal of Food Processing and Preservation*, 35(5), 596-604.
- [32] Birdi, K. A. S. 2008. *Handbook of surface and colloid chemistry*. CRC press. p 415-438.
- [33] Wooster, T. J., Golding, M., & Sanguansri, P. 2008. Impact of oil type on nanoemulsion formation and Ostwald

- fish waste oil: Fatty acids composition and antibacterial activity. *PeerJ*, 8, e9299.
- [44] Walker, R. M. 2016. Fish oil nanoemulsions: optimization of physical and chemical stability for food system applications. *Masters Theses*. 313
- [45] Mil-Homens, D., Bernardes, N., & Fialho, A. M. 2012. The antibacterial properties of docosahexaenoic omega-3 fatty acid against the cystic fibrosis multiresistant pathogen *Burkholderia cenocepacia*. *FEMS microbiology letters*, 328(1), 61-69.
- sensory Properties of low fat probiotic Yogurt Enriched by Iranian Shallot Nanoemulsion containing omega3 fatty acid. *Food Science and Technology*, 17(100), 77-101.
- [42] Li, M., Ma, Y., & Cui, J. 2014. Whey-protein-stabilized nanoemulsions as a potential delivery system for water-insoluble curcumin. *LWT-Food science and technology*, 59(1), 49-58.
- [43] Inguglia, L., Chiaramonte, M., Di Stefano, V., Schillaci, D., Cammilleri, G., Pantano, L., Arizza, V. 2020. *Salmo salar*



## Evaluation of physical and chemical stability of Omega-3 nanoemulsion and its antibacterial effect on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*

Ghafoori, Z.<sup>1</sup>, Fazlara, A.<sup>2\*</sup>, Pourmahdi, M.<sup>2</sup>, Bavarsad, N.<sup>3,4</sup>

1. Ph.D. Student of Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
2. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
3. Nanotechnology Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
4. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

### ABSTRACT

Although fish oil is a very important source of omega-3 and its consumption is recommended in terms of nutrition, it cannot be used directly in the food system due to its instability. Therefore, its stability can be increased by converting the particle to the nanoscale. The aim of this study was to investigate the physical and chemical stability of omega-3 nanoemulsion at different temperatures and its antibacterial properties. For this purpose, fish oil containing omega-3 fatty acids was produced by high energy method in nanoparticles and its physical (particle size, zeta potential, viscosity, and physical stability) and chemical properties (pH and turbidity) were evaluated during storage at 4, 25 and 40 °C during 7 days, as well as antibacterial properties of fish oil nanoemulsion against two gram-positive and gram-negative bacteria. The results showed that the omega-3 nanoemulsion produced had the optimum stability at 25 °C. The optimal concentration of 4% of omega-3 nanoemulsions also showed antibacterial properties against the studied bacteria, especially *Staphylococcus aureus*.

### ARTICLE INFO

#### Article History:

Received 2022/ 04/ 27

Accepted 2022/ 07/ 24

#### Keywords:

Omega-3,  
Nanoemulsion,  
Chemical,  
Physical,  
*Staphylococcus aureus*.

DOI: 10.22034/FSCT.19.128.119

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.128.18.3

\*Corresponding Author E-Mail:

a.fazlara@scu.ac.ir