نانو–درون پوشانی عصاره سیر به روش امولسیون آب در روغن: ویژگی های فیزیکوشیمیایی و ضد میکروبی

حامد حسن زاده اوچتپه[1*]، محمد علیزاده خالد آباد[2] و محمود رضازاد باری[3]

۱- دکتری تخصصی گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه ارومیه
۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه ارومیه
۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه ارومیه

(تاریخ دریافت: ۹٦ /۰۸/۰۸ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۷/۲۹)

چکیده

در این مطالعه تولید نانو امولسیون حاوی عصاره سیر به منظور پوشاندن بوی نامطلوب سیر و نیز حفظ خواص عملکردی آن مورد بررسی قرار گرفته است. بدین منظور، فرمولاسیون‌های مختلف نانو امولسیون حاوی عصاره سیر به روش پرانرژی (حمام اولتراسوند) تولید و تأثیر درصدهای مختلف عصاره بر روی اندازه قطرات، کارایی درون‌پوشانی، خاصیت آنتی‌اکسیدانی، خاصیت ضد میکروبی، هدایت الکتریکی و کدورت نانو امولسیون‌ها بررسی گردید. اندازه قطرات از ٦۲ تا ۳۰۲ نانومتر برای نانو امولسیون‌های آب در روغن بر اساس کسر حجمی متغیر بود. نتایج حاصل از کروماتوگرافی گازی نشان داد که نانو امولسیون‌های تولیدشده کارایی نسبتاً بالایی در درون‌پوشانی ترکیبات فرار حاصله از عصاره سیر داشتند، اما با افزایش کسر حجمی (عصاره سیر) در فرمولاسیون نانو امولسیون‌ها از ۵ به ۲۵ درصد، کارایی درون‌پوشانی از ۸۹ به ۸۰ درصد رسید. نتایج میکروبی به روش انتشار دیسک نانو امولسیون نشان داد که نانو امولسیون‌های آب در روغن دارای خاصیت ضد میکروبی نسبتا ضعیفی بوده و تنها در کسر حجمی بالا (۲۵ درصد) دارای قدرت مهار کنندگی رشد باکتری ها بودند. نتایج بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH نشان داد که به طور کلی نانو امولسیون‌های آب در روغن دارای قدرت بالایی در مهار رادیکال آزاد-بودند. همچنین به دلیل روغنی بودن فاز پیوسته این نوع نانو امولسیون، هدایت الکتریکی نمونه‌ها بسیار کم (کمتر از ۱۰ میکرو زیمنس) بود.

کلید واژگان: نانو-درون پوشانی، نانوامولسیون ضد میکروبی، عصاره سیر، خاصیت آنتی اکسیدانی

مسئول مکاتبات: hamed.hassanzadeh2010@gmail.com

۱- مقدمه

یک امولسیون از فاز آبی، فاز روغنی و امولسیفایر یا سورفاکتانت و گاهی کوسورفکتانت تشکیل‌شده است. در امولسیون‌ها مؤلفه‌ای به نام پایداری امولسیون مطرح می‌شود که دو عامل، حرکت براونی و نیروهای پخش (واندروالسی) در شروع فرایند ناپایداری امولسیون‌ها مؤثرند. عواملی مانند انرژی مکانیکی، نوع مواد ترکیبی (اختلاف کشش سطحی) و میزان فعال‌کننده سطحی (سورفاکتانت) در اندازه قطرات دخیل هستند [۱].

اغلب در منابع علمی از امولسیون‌های با اندازه قطرات (در محدوده ۲۰ تا ۲۰۰ نانومتر) تحت عناوین مینی امولسیون، نانو امولسیون، امولسیون‌های فوق‌ریز، امولسیون‌های زیرمیکرون و غیره یاد می‌شود. نانو امولسیون‌ها به واسطه اندازه ریزشان، با چشم غیرمسلح به‌صورت شفاف و نیمه شفاف قابل‌مشاهده‌اند و پایداری بالایی در برابر پدیده‌های ته‌نشینی[1] و رونشینی[2] دارند [۱-۳]. ازجمله کاربردهای سامانه‌های نانو امولسیونی در صنایع غذایی می‌توان به نقش آن‌ها در فرمولاسیون مواد غذایی و نوشیدنی‌های دارای ترکیبات فراسودمند پوشینه‌دار شده مانند کوآنزیم Q1، لیکوپن، لوتئین، بتاکاروتن، اسیدهای چرب امگا ۳، ویتامین‌های A، D3، E، فیتواسترول‌ها و ایزوفلاون‌ها اشاره کرد [٤].

نانو امولسیون‌های ضدمیکروبی قطرات روغن در آب با اندازه ذرات حدود ۲۰۰ تا٦۰۰ نانومتر هستند. این نانو امولسیون‌ها از آب و روغن تشکیل‌شده‌اند و به‌وسیله سورفاکتانت‌ها و الکل‌ها پایدار شده‌اند. نانو امولسیون‌ها دارای فعالیت علیه طیف وسیعی از باکتری‌ها، ویروس‌های پوشش‌دار، اسپورها و قارچ‌ها هستند. برای ساخت آن‌ها از مخلوط کننده‌ها با سرعت بالا استفاده می‌گردد که انرژی این دستگاه‌ها باعث کاهش اندازه ذرات می‌شود و واحدهای پرانرژی‌تر در واحد حجم ایجاد می‌کند. ذرات نانو امولسیون به‌طور ترمودینامیکی به سمت ارگانیسم هایی که در ساختار غشایشان دارای جز لیپیدی هستند، رانده می‌شوند که این اتصال به‌وسیله جاذبه الکترواستاتیک بین بار کاتیونی امولسیون و بار آنیونی میکروارگانیسم افزایش می‌یابد. وقتی نانو امولسیون به اندازه کافی به پاتوژن ملحق شد انرژی که در آن ذخیر شده است، آزاد می‌گردد و به‌این‌ترتیب غشای لیپیدی پاتوژن ناپایدار و موجب هضم سلول شده و مرگ آن را باعث می‌شود که یکی از سازوکارهای اصلی نانو امولسیون‌ها در از بین بردن میکروارگانیسم‌هاست. در ساختار نانو امولسیون‌ها علاوه بر ترکیبات گفته‌شده از مواد ضد میکروب نیز استفاده می‌گردد. بنابراین انرژی و ماده مؤثره در نانو امولسیون برای خاصیت ضد میکروبی آن مهم است[۵].

سیر با نام علمی *Allium sativum* و نام انگلیسی Garlic ، گیاهی علفی و دارای ساقه‌ای به ارتفاع ۲۰ -٤۰ سانتی‌متر و گاهی بیشتر است. خانواده سیر در بین گیاهان دارویی جایگاه بالایی دارد و حاوی ویتامین B و C است و خواص طبی آن از عهد قدیم شناخته‌شده است [٦]. بوی کاملاً مشخص و متمایز سیر به دلیل وجود ماده آلیسین و فعالیت آنزیمی بنام آلیناز است که حاوی مواد سولفوری مانند Cystein sulfoxid می باشد و پس از بریدن و فشردن حبه تازه آن به دست می‌آید [۷]. اگرچه وجود برخی تیوسولفینات‌های دیگر موجود در سیر نیز در خاصیت درمانی آن موثر گزارش شده اند [۸]. مقالات متعددی به خاصیت ضد باکتریایی عصاره سیر اشاره کرده‌اند که در همگی آنان آلیسین و مشتقات دیگر سولفوری موجود در سیر باعث جلوگیری از رشد میکروب‌های گرم مثبت یا منفی از قبیل *Micrococcus*، *Pseudomonas*، *Enterobacter*، *Klebsiella*، *Lactobacillic*، *Shigella*، *Protevs*، *Helicobacteria*، *Escherichia*، *Salmonella* شده اند [۹, ۱۰].

Lupi و همکاران (۲۰۱۱) به بررسی خصوصیات رئولوژیکی امولسیون‌های آب در روغن زیتون پرداختند و عنوان کردند که فاز روغنی را با مخلوط کردن یک روغن با اسید اولئیک بالا (روغن زیتون) با یک منبع اسیدهای چرب اشباع طبیعی (کره کاکائو) آماده کرده و به‌وسیله سرد کردن سریع فاز روغنی ذوب‌شده در سرعت‌های برشی پایین موفق به تولید شبکه‌ای با ساختار مطلوب شده‌اند. امولسیون‌های تولیدشده در مقایسه با مارگارین‌های تجاری، خواص رئولوژیکی مناسبی را جهت استفاده به‌عنوان چربی‌های جامد از خود نشان داده‌اند[۱۱].

1. Sedimentation
2. Creaming

Tabibiazar و Hamishehkar (۲۰۱۵) به بررسی تأثیر فاکتورهایی نظیر زمان اولتراسوند، افزودن نمک کلرید کلسیم و سرم آلبومین گاوی به فاز آبی، نوع فاز روغنی (ذرت یا میگلیول) و میزان PGPR[3] را بر روی پایداری فیزیکی و اندازه ذرات نانو امولسیون‌های آب در روغن در نسبت ثابت آب به روغن ۳۰ به ۷۰ پرداختند و گزارش کردند که کاهش شدیدی در کشش بین سطحی تا ٦ میلی نیوتن بر متر و اندازه ذرات تا ۳۵±۳٤۷ نانومتر در امولسیون‌های تشکیل‌شده با آب و میگلیول، مشاهده شده اما پایداری فیزیکی کافی حاصل نشده است. همچنین افزودن نمک کلرید کلسیم و سرم آلبومین باعث کاهش اندازه ذرات تا ۳۷±۱۲۸ نانومتر و افزایش پایداری فیزیکی امولسیون‌های آب در روغن بر پایه روغن ذرت شده است [۱۲].

یکی از مشکلاتی که امروزه در صنعت غذا مطرح می‌شود استفاده روزافزون از نگه‌دارنده‌های شیمیایی در مواد غذایی است که استفاده از چنین موادی ارتباط مستقیمی با شیوع روزافزون بیماری‌های خطرناکی مثل سرطان دارد. از این نظر، یافتن هر دریچه‌ای جهت حذف مواد نگه‌دارنده شیمیایی یا حداقل کاهش دز مصرفی آن‌ها در مواد غذایی با حفظ کیفیت آن، از اهمیت قابل‌توجهی برخوردار است. عصاره و اسانس سیر، با توجه به خواصی که از آن‌ها در تحقیقات مختلف به اثبات رسیده است می‌توانند به‌عنوان نگه‌دارنده‌های کاملاً طبیعی و جایگزین نگه‌دارنده‌های شیمیایی حداقل در بعضی از مواد غذایی مطرح شوند. از طرف دیگر با افزودن عصاره و اسانس سیر به مواد غذایی می‌تواند آن‌ها را به‌عنوان غذاهای فراسودمند معرفی کرد که در این صورت جایگاه مهمی در سبد غذایی مردم در آینده خواهد داشت. لذا در این مطالعه از روغن به عنوان پوشش جهت انکپسوله کردن عصاره سیر استفاده شده و خصوصیات فیزیکوشیمیایی و ضد میکروبی آن نیز مد نظر قرار گرفته است.

۲- مواد و روش ها

۲-۱-تولید نانو امولسیون‌های آب در روغن

ابتدا حبه‌های سیر از بازار خریداری کرده و حبه سیر را به‌منظور جداسازی بهتر پوست در آب خیس کرده و سپس پوست و ته حبه‌های سیر را جدا کرده و حبه‌های سیر شستشو داده شدند. بعد از شستشو سیرها را داخل همزن ریخته و بعد از خرد کردن کامل آن‌ها با نسبت ۱ به ۱ با آب مقطر مخلوط کرده سپس مواد را ۲٤ تا ٤۸ ساعت در دمای زیر ۱۵ درجه نگهداری شد. درنهایت ترکیب را از صافی پارچه‌ای جهت جداسازی ذرات درشت سیر عبور داده و مایع صاف‌شده را از کاغذ صافی نیز عبور داده و نهایتاً با سرعت دورانی ٦۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه عصاره را سانتریفیوژ کرده و به‌این‌ترتیب عصاره سیر تهیه گردید [۱۳].

بعد از آماده شدن عصاره سیر، روغن آفتابگردان با سورفاکتانت PGPR را در حال هم زدن مخلوط کرده و سپس عصاره سیر به‌صورت قطره‌قطره و به‌آرامی به مخلوط روغن و سورفاکتانت در حال هم زدن با سرعت دورانی ۵۰۰ دور در دقیقه افزوده شد. مخلوط تهیه‌شده با سرعت دورانی ۷۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه ادامه یافت و به دستگاه اولتراسونیک هموژنایزر جهت همگن کردن بیشتر منتقل گردید و به‌این‌ترتیب نانو امولسیون موردنظر تهیه شد.

۲-۲- اندازه ذرات

جهت اندازه‌گیری ذرات ابتدا همه نانو امولسیون‌ها به‌منظور جلوگیری از پراکنش متعدد ذرات (Multiple Scattering)، توسط روغن آفتابگردان با نسبت ۱ به ۵۰ رقیق شده و اندازه ذرات در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و با زاویه ۹۰ درجه به‌وسیله دستگاه DLS[4] (Malvern Instruments Ltd)، مشخص گردید.

۲-۳- محاسبه کارایی درون‌پوشانی

پس از تهیه نانو امولسیون‌ها، مواد فرار حاصل از عصاره سیر از فضای بالای نمونه های نانوامولسیون (ریخته شده در شیشه های تمیز با درب های تیوبی بسته) به وسیله سرنگ (حدود ۵ سی‌سی) برداشته شد و به دستگاه کروماتوگرافی گازی (Agilent Technologies. Inc) ساخت کشور آمریکا تزریق شد.

دمای اتاقک تزریق ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد، دمای آغازین آون ٤۰ درجه سانتی‌گراد و گرادیان دمایی، ۵ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه

3. Polyglycerol polyricinoleate

4. Dynamic Light Scattering

تا رسیدن به دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد بود، دستگاه به مدت دو دقیقه در این دما باقی ماند و زمان کل هر آزمایش ۱۲ دقیقه بود. ستون مورد استفاده از نوع (Agilent Technologies. Inc Catalog 19091J-413 HP-5) و دارای طول ۵۰ متر با قطر داخلی ۰/۳۲ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرون بود. سرعت جریان گاز حامل نیتروژن ۰/۷ میلی‌لیتر در دقیقه و شناساگر از نوع یونیزاسیون شعله‌ای با دمای ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد بود. در مرحله بعد مجموع مساحت زیر پیک‌های حاصله از مواد فرار ناشی از عصاره و اسانس سیر اندازه‌گیری شد تا درصد پوشاندن بو توسط فاز پیوسته در نانو امولسیون‌های آب در روغن مشخص شود.

درنهایت با مقایسه مجموع مساحت سطح زیر پیک‌های حاصل از نانو امولسیون و مساحت سطح زیر پیک‌های حاصل از عصاره سیر بدون درون‌پوشانی در غلظت یکسان عصاره و شرایط کاملاً یکسان، کارایی درون‌پوشانی و پوشاندن بو طبق فرمول زیر مشخص شد.

کارایی درون‌پوشانی = ۱ − مجموع مساحت زیر پیک‌های حاصل از نانوامولسیون / مجموع مساحت زیر پیک‌های حاصل از سیر بدون درون پوشانی ×100

۲-٤- بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی

خاصیت آنتی‌اکسیدانی نانو امولسیون تهیه‌شده و همچنین اسانس سیر هرکدام به‌صورت جداگانه به روش DPPH اندازه‌گیری شد. در این روش ۰/۲ میلی‌لیتر از نانو امولسیون تهیه‌شده به ٤ میلی‌لیتر از محلول متانولی ٦۰ میکرو مولار رادیکال آزاد DPPH افزوده شده و به مدت ٦۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. سپس جذب محلول در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Pharmacia Nova Spec II) خوانده گردید. همچنین یک نمونه حاوی ۰/۲ میلی‌لیتر متانول به همراه ٤ میلی‌لیتر DPPH به‌عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شده و با استفاده از فرمول مربوطه فعالیت گیرندگی رادیکال محاسبه گردید.

درصد مهار کنندگی رادیکال = جذب شاهد − جذب نمونه / جذب شاهد ×100

۲-۵- اندازه‌گیری هدایت الکتریکی نانو امولسیون‌ها

جهت اندازه‌گیری هدایت الکتریکی نمونه‌های نانو امولسیونی از هدایت سنج (Metrohm ساخت سوئیس) استفاده شده است. به‌طوری‌که ابتدا دستگاه هدایت سنج توسط محلول KCl با نرمالیته‌های مختلف (۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ نرمال) کالیبره شده و سپس هدایت الکتریکی نمونه‌های نانو امولسیونی در دماها و زمان‌های مختلف اندازه‌گیری شد.

۲-٦- آزمون میکروبی به روش انتشار دیسک

باکتری‌های مطالعه شده شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* (۲۵۹۲۳ *ATCC*) و *اشریشیا کلای* H_7O_{157} (*ATCC* ۷۰۰۷۲۸) در لوله‌های فالکون ۱۵ میلی‌لیتر که حاوی محیط کشت مولرهینتون مایع بودند تلقیح شده و به مدت۲٤ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از ۲٤ ساعت گرمادهی باکتری‌های رشد کرده در محیط مایع کدورت ایجاد کردند بنابراین جهت به دست آوردن رسوب باکتری، لوله‌های فالکون در دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. رسوب باکتری دو بار با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شد و در چهارمین مرحله از سانتریفیوژ رقت ۰/۵ مک فارلند با کمک لوله‌های استاندارد مک فارلند و توسط سرم فیزیولوژی استریل، تهیه گشت [۱٤]. سپس از کلنی‌های این محیط توسط سرم فیزیولوژی، رقت ۰/۵ مک فارلند که جذب آن در طول‌موج ٦۲۰ نانومتر برابر ۰/۰۸ تا ۰/۱ است (تعداد باکتری‌ها در این مقدار جذب برابر $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ CFU/ml است) ، تهیه شد. باکتری‌ها به‌وسیله‌ی سواپ استریل کشت چمنی گسترده بر روی محیط مولر هینتون آگار پخش شدند، سپس دیسک‌های کاغذی (که به مدت یک ساعت در درون نانو امولسیون‌های تهیه‌شده غوطه‌ور بودند) روی پلیت قرار داده شدند. نهایتاً پلیت‌ها درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و بعد از ۲٤ ساعت قطر هاله‌های عدم رشد به‌وسیله خط کش میلی‌متری اندازه‌گیری شد.

۲-۷- آنالیز آماری

در این مطالعه آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام شدند. آنالیز واریانس داده‌ها (ANOVA) با استفاده

از نرم‌افزار Minitab نسخه ۱۷ انجام شد و از آزمون چند دامنه‌ای دانکن توسط نرم افزار SPSS برای مقایسه میانگین تیمارها استفاده شد. از نرم‌افزار اکسل و STATGRAPHIC جهت رسم نمودارها استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- اندازه قطرات نانو امولسیون‌ها

نتایج حاصله از DLS برای نانو امولسیون‌های آب در روغن مشخص کرد که با افزایش کسر حجمی (عصاره سیر) اندازه ذرات نیز به‌طور چشمگیری افزایش پیدا کرده است. چنانچه از جدول ۱ پیداست با بالا بردن درصد عصاره سیر از ۵ به ۲۵ درصد، اندازه ذرات از ٦۲ به ۳۰۲ نانومتر افزایش پیدا کرده است که این وضعیت نشان‌دهنده این است که اندازه ذرات نانو امولسیون‌های آب در روغن نسبت به نانو امولسیون‌های روغن در آب، بیشتر تحت تأثیر کسر حجمی قرارگرفته‌اند.

در راستای تائید این موضوع، Porras و همکاران (۲۰۰۵) به مطالعه تولید نانو امولسیون‌های آب در روغن پرداختند و گزارش کردند که با افزایش نسبت فاز آبی از ۵ به ۲۵ درصد، اندازه ذرات از ۳۰ به ۱۲۰ نانومتر رسیده است[۱۵]. همچنین Peng و همکاران (۲۰۱۰) به بهینه‌سازی نانو امولسیون‌های آب در روغن به‌وسیله مخلوطی از سورفاکتانت‌ها پرداختند و گزارش کردند که با ثابت نگه‌داشتن نسبت سورفاکتانت (۱۰ درصد) و با افزایش درصد آب در فرمولاسیون نانو امولسیون‌های آب در روغن از ۱۰ به ٤۰ درصد، اندازه ذرات آن‌ها از ۱۳ به ۱۸٦ نانومتر رسید[۱٦].

Table 1 The effect of dispersed phase ratio on particle size. nanoemulsions

Nanoemulsion type	Droplet size (%)	
Nanoemulsions containing 5 % garlic extract	62.5±5. 4	a
Nanoemulsions containing 15 % garlic extract	197±12.6	b
Nanoemulsions containing 25 % garlic extract	302±20	c

Similar letters show no significant difference in (α=0.05)

۳-۲- کارایی درون‌پوشانی نانو امولسیون‌ها

همانند نانو امولسیون‌های روغن در آب، برای نانو امولسیون‌های آب در روغن نیز از کروماتوگرافی گازی برای محاسبه کارایی درون‌پوشانی ترکیبات فرار حاصله از عصاره سیر استفاده شده است. نتایج حاصله نشان داد که مولکول‌های فرار عصاره سیر به‌خوبی توسط مولکول‌های روغن و سورفاکتانت پوشانده شده و کارایی درون‌پوشانی بسیار بالا به‌دست‌آمده است (جدول ۲). با مقایسه نتایج حاصله از کارایی درون‌پوشانی نانو امولسیون‌های روغن در آب و آب در روغن می‌توان دریافت که روغن نسبت به آب پوشاننده بهتری برای ترکیبات فرار سیر است. هرچند جهت مقایسه کارایی درون‌پوشانی این دو نوع امولسیون باید اشاره کرد که اسانس سیر مورداستفاده در نانو امولسیون‌های روغن در آب نسبت به عصاره سیر مورداستفاده نانو امولسیون‌های آب در روغن دارای مواد فرار بسیار قوی‌تر بوده و این موضوع نیز در اختلاف بین کارایی درون‌پوشانی این دو نوع امولسیون تأثیرگذار است.

Table 2 Obtained encapsulation efficiency for produced nanoemulsions by gas chromatography

Nanoemulsion type	Encapsulation efficiency (%)	
Nanoemulsions containing 5 % garlic extract	89.5±1. 5	a
Nanoemulsions containing 15 % garlic extract	80.4±1.12	b
Nanoemulsions containing 25 % garlic extract	79.2±1.25	b

Similar letters show no significant difference in (α=0.05)

همان‌طور که در شکل ۱ نیز مشاهده می‌شود، همانند کروماتوگرام مربوط به نانو امولسیون‌های روغن در آب در این نوع نانو امولسیون نیز کارایی درون‌پوشانی ترکیبات فرار سیر بیشتر مربوط به پوشاندن همان ترکیب شاخص (آلیسین) است. با مقایسه پیک مربوط به نانو امولسیون روغن در آب حاوی ۱۵ درصد عصاره سیر (A) و پیک مربوط به نمونه امولسیون نشده با ترکیبات و درصدهای یکسان آن‌ها (B) می‌توان مشاهده کرد که اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها وجود داشته به‌طوری‌که حداکثر ارتفاع پیک شاخص در نمونه نانو امولسیونی کمتر از ٤۰ پیکو آمپر بوده درحالی‌که این مقدار برای نمونه‌های امولسیون نشده بالاتر از ۱۲۰ پیکو آمپر است.

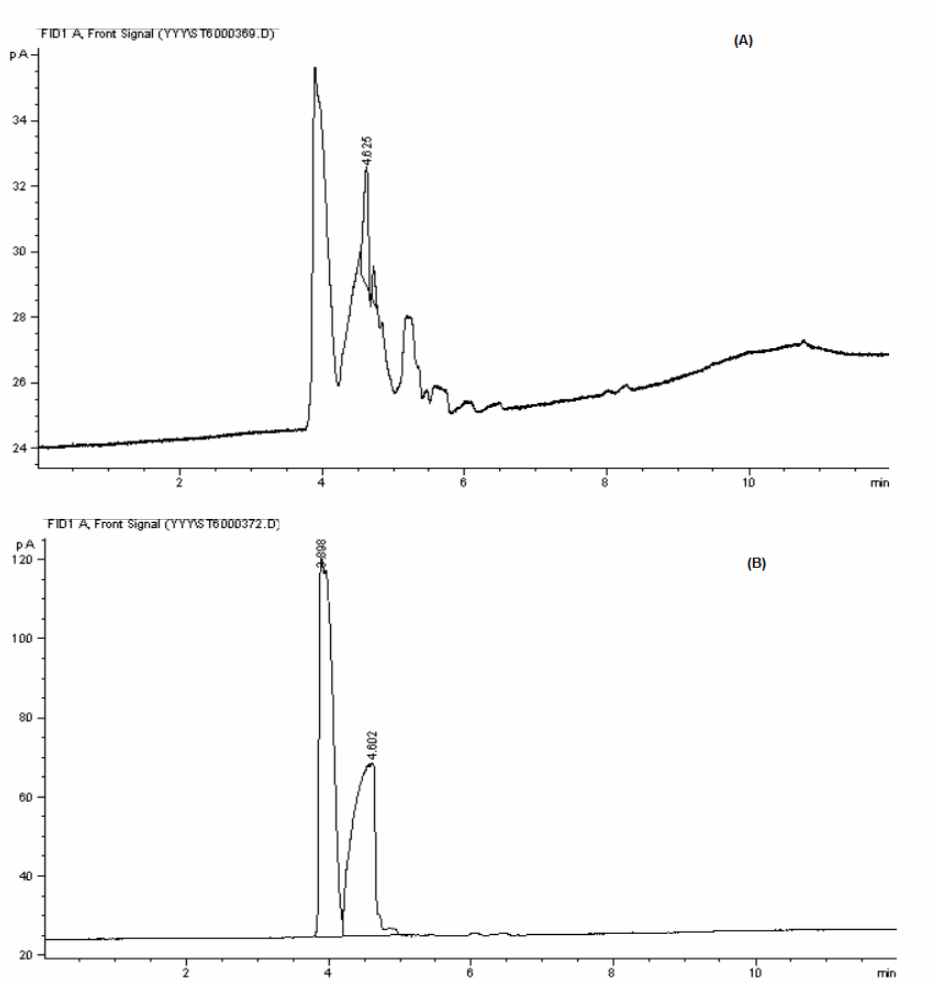

Fig 1 Recorded peaks by detector of gas chromatography for nanoemulsions containing garlic essential oil at fixed ratios (15 % garlic extract) (A) and garlic extract and sunflower oil mixture (B).

۳-۳- خاصیت آنتی‌اکسیدانی نانو امولسیون‌ها

نتایج به‌دست‌آمده از روش DPPH برای نانو امولسیون‌های آب در روغن نشان داد که به‌طورکلی این نوع نانو امولسیون دارای خاصیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد بیشتری نسبت به نانو امولسیون‌های روغن در آب هستند که دلیل این موضوع می‌تواند به وجود ترکیبات فنولیک در فاز روغنی نانو امولسیون‌های آب در روغن برگردد درحالی‌که فاز بیرونی نانو امولسیون‌های روغن در آب، آب مقطر بوده و عاری از هرگونه مواد فنولیک است و خاصیت آنتی‌اکسیدانی این نوع نانو امولسیون به رهایش مواد فرار اسانس سیر از فاز درونی به فاز بیرونی نانو امولسیون برمی‌گردد. چنانچه در شکل ۲ مشاهده می‌شود اختلاف معنی‌داری بین نانو امولسیون‌های تهیه‌شده با فرمولاسیون مختلف وجود نداشته و تمامی فرمولاسیون‌های تهیه‌شده دارای بیشتر از ۹۰ درصد ظرفیت مهار رادیکال‌های آزاد هستند.

لازم به ذکر است که اشاره شود تحقیقات انجام‌شده در مورد خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانو امولسیون‌های آب در روغن به‌ویژه خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها بسیار نادر است.

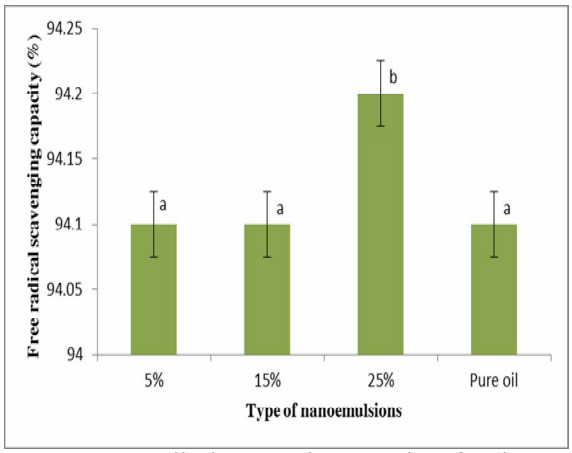

Fig 2 Free radical scavenging capacity of various nanoemulsions and sunflower oil

۳-٤- آزمون میکروبی (روش انتشار دیسک)

اگرچه تاکنون تحقیقی در مورد خواص ضد میکروبی نانو امولسیون‌های آب در روغن چاپ نشده است اما در این تحقیق سعی شده است که خواص ضد میکروبی نانو امولسیون‌های آب در روغن حاوی عصاره سیر نیز بررسی شود. حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی برای نانو امولسیون‌های آب در روغن حاوی درصدهای مختلف عصاره نشان داد که تنها در درصدهای بالای عصاره سیر در فرمولاسیون نانو امولسیون‌های آب در روغن، فعالیت ضد میکروبی در برابر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده شد (جدول ۳). با مقایسه فعالیت ضد میکروبی نانو امولسیون‌های روغن در آب و نانو امولسیون‌های آب در روغن می‌توان دریافت نانو امولسیون‌های آب در روغن دارای فعالیت ضد میکروبی کمتری هستند که دلیل آن می‌تواند شدت بیشتر مواد فرار در اسانس سیر نسبت به عصاره آن باشد. در این نوع نانو امولسیون نیز مشخص شد که فعالیت ضد میکروبی بیشتری در برابر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی دارند.

Table 3 Average of inhibition zone diameter (mm) for tested bacteria affected by produced nanoemulsions and pure garlic extract

Nanoemulsion type	NE 0	NE 1	NE 2	NE 3	GE
Type of bacteria					
S. areus	-	-	-	11.5±0.8	26.2±1.7
E. coli	-	-	-	7.4±0.6	15.3±1.2

NE 0: Nanoemulsion without GE, NE1: Nanoemulsion containing 5 % GE, NE 2: Nanoemulsion containing 15 % GE, NE 3: Nanoemulsion containing 25 % GE: GE= Garlic Extract

عصاره حاصل از جنس Allium سبب کاهش دریافت اکسیژن، ممانعت از سنتز لیپیدها، پروتئین‌ها و اسید نوکلئیک، کاهش رشد و نهایتاً آسیب به دیواره سلولی می‌گردد [۱۷]، بنابراین حضور مقادیر قابل توجه ترکیبات گوگردی و سایر ترکیبات ذکرشده با مکانیسم‌های فوق به ویژه تأثیر بر غشاء سلولی و مختل نمودن فعالیت آن و نیز ایجاد اختلال در فعالیت‌های متابولیسمی نشان از توان بالای فعالیت ضد میکروبی اسانس سیر و موسیر است. چندین سازوکار برای تشریح فعالیت ضدمیکروبی سیر پیشنهاد شده است. جلوگیری از سنتز DNA و RNA و پروتئین سلول‌ها ازجمله سازوکارهای پیشنهادی می‌باشند [۱۸]. بیان شده است که بخش عمده‌ای از خواص ضدمیکروبی سیر مربوط به آلیسین و متابولیت‌های حاصل از آن است. این ترکیبات فعالیت‌های ضدمیکروبی خود را از طریق مهار اختصاصی آنزیم استیل کوآنزیم آ -سنتتاز ایفا می‌کنند. مهار این آنزیم موجب مهار زیست سنتز لیپید و اسیدهای چرب شده و درنهایت باعث اختلال در قابلیت زیستی سلول می‌شود. یکی از خصوصیات مهم ترکیبات ارگانوسولفور سیر، قابلیت نفوذپذیری و عبور از طریق فسفولیپیدهای غشاء است. در بین ترکیبات موجود در عصاره آبی سیر، ترکیب دی آلیل تیوسولفینات مؤثرترین ترکیب در فعالیت‌های بیولوژیکی و ضدمیکروبی سیر می‌باشد. چنانچه از جدول ۳ پیداست، به دلیل پوشاندن قسمت عمده ترکیبات فرار و کاربردی عصاره سیر در طی فرآیند امولسیفیه کردن، نانو امولسیون‌های دارای درصد عصاره سیر کمتر، فعالیت ضد میکروبی از خود نشان نداده و تنها نانو امولسیون حاوی ۲۵ درصد عصاره سیر دارای فعالیت ضد میکروبی در برابر استافیلوکوکوس اورئوس نشان داده است.

۳-۵- هدایت الکتریکی نانو امولسیون‌ها

یکی از روش‌های تعیین نوع امولسیون، اندازه‌گیری هدایت الکتریکی آن‌ها است. به‌طوری که نانو امولسیون‌های آب در روغن دارای هدایت الکتریکی بسیار کمتری نسبت به نانو

امولسیون‌های روغن در آب هستند. چنانچه در جدول ٤ دیده می شود همه نانو امولسیون های تولید شده دارای هدایت الکتریکی بسیار پایینی هستند که این مسئله می تواند به دلیل روغنی بودن فاز پیوسته آنها باشد زیرا روغن دارای هدایت الکتریکی بسیار کمتری نسبت به آب می باشد. نتایج نشان داد که با افزایش درصد عصاره سیر در فرمولاسیون نانو امولسیون های آب در روغن میزان هدایت الکتریکی نیز افزایش اندکی داشته است و همین افزایش اندک نیز به دلیل کم بودن مقادیر آن ها از لحاظ آماری معنی دار بوده است. دلیل افزایش هدایت الکتریکی در اثر افزایش درصد عصاره سیر می تواند به حضور آب در عصاره مربوط باشد زیرا همانطور که اشاره شد آب دارای هدایت الکتریکی بسیار بالاتری نسبت به روغن می باشد.

Table 4 The electrical conductivity of nanoemulsions at the ambient temperature.

Nanoemulsion type	Electrical conductivity (µs/cm)	
Nanoemulsions containing 5 % garlic extract	0.48±0. 02	a
Nanoemulsions containing 15 % garlic extract	0.82±0.04	b
Nanoemulsions containing 25 % garlic extract	1.1±0.05	c

Similar letters show no significant difference in (α=0.05)

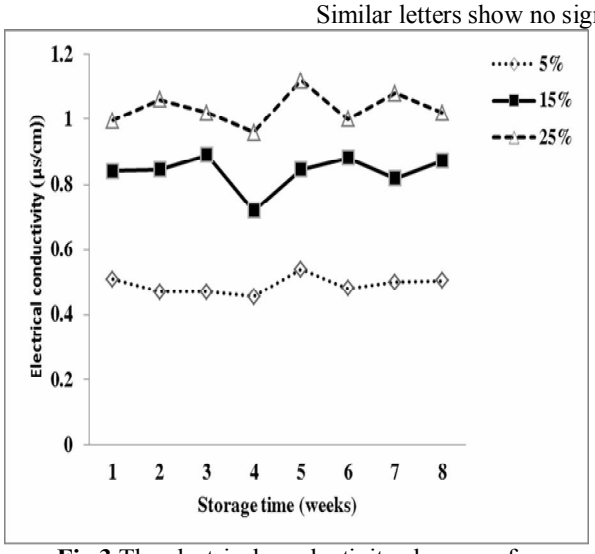

Fig 3 The electrical conductivity changes of nanoemulsions during storage time at ambient temperature

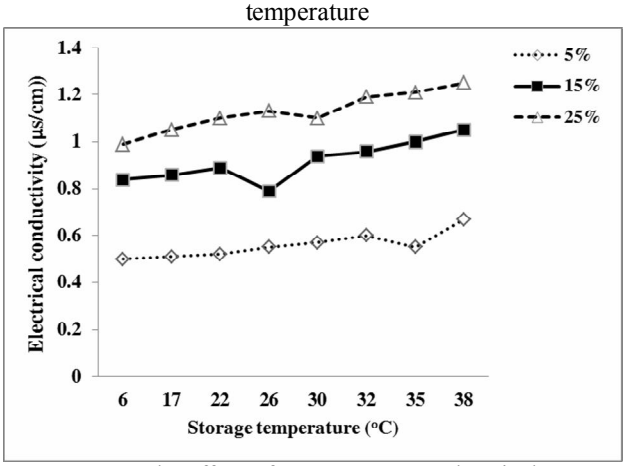

Fig 4 The effect of temperature on electrical conductivity of nanoemulsions with various percent of garlic extract

چنانچه در جدول ٤ مشاهده می‌شود، با افزایش درصد عصاره سیر در فرمولاسیون نانو امولسیون‌های آب در روغن، هدایت الکتریکی آن‌ها نیز افزایش می‌یابد که می‌تواند به دلیل وجود آب بیشتر در فرمولاسیون نانو امولسیون‌های حاوی ۲۵ درصد عصاره سیر باشد.

۳-٦- اثر دما و زمان نگهداری بر روی هدایت الکتریکی نانو امولسیون‌ها

همانند نانو امولسیون‌های روغن در آب، اثرات دماهای نگهداری مختلف و گذشت زمان بر روی میزان هدایت الکتریکی نمونه‌های نانو امولسیونی آب در روغن بررسی شده است. شکل‌های ٤ و ٥ نشان می‌دهند که گذشت زمان اثر معنی‌داری بر روی میزان هدایت الکتریکی نمونه‌ها ندارد درحالی‌که افزایش دمای نگهداری باعث افزایش هدایت الکتریکی نمونه‌ها می‌شود. بالا بردن دمای نمونه‌ها باعث افزایش تحرک یون‌ها شده و این مسئله به نوبه خود میزان هدایت الکتریکی نمونه‌ها را زیاد می‌کند. همچنین افزایش دما باعث تفکیک یون ها شده و بدین ترتیب تعداد یون ها بیشتر شده و نتیجتا هدایت الکتریکی نیز افزایش پیدا می کند.

در زمینه تغییرات هدایت الکتریکی نانو امولسیون‌ها در طی زمان نگهداری و مرتبط بودن آن با پایداری سیستم‌های کلوئیدی تحقیقاتی انجام گرفته است. Bernardi و همکاران (۲۰۱۱) تغییرات هدایت الکتریکی در طی ۹۰ روز نگهداری در دماهای مختلف را مطالعه کردند و گزارش کردند که تغییرات هدایت الکتریکی خیلی محسوس نبوده و تأثیری نیز بر روی اندازه ذرات نداشته است و بیان کردند که بررسی پایداری نانو امولسیون‌ها منحصراً بر اساس تغییرات هدایت الکتریکی مشکل به نظر می‌رسد زیرا بین این دو رابطه خطی وجود ندارد [۱۹]. Pereira و همکاران ۲۰۱٦ نیز تغییرات هدایت الکتریکی را برای نانو امولسیون‌های حاوی مشتقات لانولین در طی زمان نگهداری بررسی کردند و مشاهده کردند که تغییرات اندکی در میزان هدایت الکتریکی نمونه رخ داده است اما آنان نیز ارتباطی بین ناپایداری نانو امولسیون‌ها با تغییرات هدایت الکتریکی آن‌ها گزارش نکردند[۲۰]. نتایج محققین دیگر نیز با نتیجه تحقیق حاضر درزمینهٔ اثر دما بر روی هدایت الکتریکی همخوانی دارد. Corach و همکاران (۲۰۱۲) به بررسی تغییرات هدایت الکتریکی مخلوط متیل استرهای اسید چرب چندین روغن گیاهی و تأثیرات دما بر روی هدایت الکتریکی پرداختند و گزارش کردند که با افزایش دما، هدایت الکتریکی نیز افزایش پیدا کرده است[۲۱]. همچنین Pereira و همکاران (۲۰۱٦) به بررسی هدایت الکتریکی نانو امولسیون‌های تهیه‌شده از روغن‌های گیاهی پرداختند و افزایش هدایت الکتریکی را درنتیجه افزایش دما تائید کردند [۲۰]. البته لازم به ذکر است در تحقیق حاضر نسبت به تحقیقات اشاره شده، هدایت الکتریکی به میزان کمتری افزایش پیدا کرده است زیرا در این تحقیق نانوامولسیون های تولیدی از نوع آب در روغن بوده و به طور کلی دارای هدایت الکتریکی بسیار کمتری نسبت به انواع روغن در آب بودند.

٤- نتیجه گیری

نتایج نشان داد که درون‌پوشانی ترکیبات فرار سیر به روش امولسیفیه کردن در نانو امولسیون‌های آب در روغن (برای درون-پوشانی عصاره سیر) ضمن حفظ ترکیبات فرار سودمند سیر، با کارایی بالایی انجام‌پذیر بوده و قسمت اعظم بوی حاصله از محصولات سیر را پوشانده است. نانوامولسیون‌های آب در روغن تولید شده درای خواص آنتی اکسیدانی بالا و فعالیت ضد میکروبی کمتری بودند که دلیل این موضوع می تواند به تجمع مواد پلی فنولیک سیر (مسئول فعالیت آنتی اکسیدانی) و مقادیر پایین‌تر ترکیبات ترپنوئیدی (مسئول فعالیت ضد میکروبی) در عصاره سیر مربوط باشد. اندازه قطرات به دست آمده در کسر حجمی های پایین زیر ۱۰۰ نانومتر بوده و کارایی درون پوشانی نیز حدود ۹۰ درصد بوده است. نانوامولسیون های تولید شده دارای هدایت الکتریکی بسیار پایینی بوده و دما و زمان نگهداری تاثیر چشمگیری بر روی آن نداشتند.

٥- منابع

[1] McClements D: Emulsion rheology. *Food emulsions-Principles, practice and techniques* 1999:235-266.

[2] Gutiérrez J, González C, Maestro A, Sole I, Pey C, Nolla J: Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 2008, 13:245-251.

[3] Jafari SM, He Y, Bhandari B: Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques. *Journal of Food Engineering* 2007, 82:478-488.

[4] McClements DJ: *Food emulsions: principles, practices, and techniques.* CRC press; 2015.

[5] NIMBS-Website: Michigan Nanotechnology Institute for Medicine and Biological Sciences. [Accessed October 21, 2009]. [NIMBS Web site] Available at: http://nano.med.umich.edu/Platforms/Antimicrobial-Nanoemulsion.html.

[6] Ayatollah Mousavi S. A, Mehrabian M, Yaghmaei B: Compare the effect of different concentrations of aqueous and methanol extracts of garlic on Opportunistic Fungi Sporothrix , Cryptococcus neoformans and Candida albicans. *Journal of Medical Sciences of Rafsanjan* 2008, 7 (4), 227-234. [In Persian].

[7] Ross Z, O'Gara EA, Hill DJ, Sleightholme H, Maslin DJ: Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: evaluation of methodologies and comparisons with garlic

oil sulfides and garlic powder. *Applied and environmental microbiology* 2001, 67:475-480.

[8] Ellmore GS, Feldberg RS: Allin lyase localization in bundle sheaths of the garlic clove (Allium sativum). *American Journal of Botany* 1994:89-94.

[9] Martin KW, Ernst E: Herbal medicines for treatment of bacterial infections: a review of controlled clinical trials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003, 51:241-246.

[10] Ankri S, Mirelman D: Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and infection* 1999, 1:125-129.

[11] Lupi FR, Gabriele D, De Cindio B, Sánchez MC, Gallegos C: A rheological analysis of structured water-in-olive oil emulsions. *Journal of Food Engineering* 2011, 107:296-303.

[12] Tabibiazar M, Hamishehkar H: Formulation of a Food Grade Water-In-Oil Nanoemulsion: Factors Affecting on Stability. *Pharmaceutical Sciences* 2015, 21.

[13] Bekayyan M, Bammeri Z: Aqueous extract of garlic in vitro antibacterial effect on resistant Enterococci. *Journal of Medical Research* 2011, xx-xx, [In Persian].

[14] Andrews JM: Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy* 2001, 48:5-16.

[15] Porras M, Martínez A, Solans C, González C, Gutiérrez JM: Ceramic particles obtained using W/O nano-emulsions as reaction media. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2005, 270:189-194.

[16] Peng L-C, Liu C-H, Kwan C-C, Huang K-F: Optimization of water-in-oil nanoemulsions by mixed surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2010, 370:136-142.

[17] Hann G: *History, folk medicine and legendary uses of garlic*. 2 edn: Williamsand Wilkins press; 1996.

[18] Feldberg RS, Chang SC, Kotik AN, Nadler M, Neuwirth Z, Sundstrom DC, Thompson NH: In vitro mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1988, 32:1763-1768.

[19] Bernardi DS, Pereira TA, Maciel NR, Bortoloto J, Viera GS, Oliveira GC, Rocha-Filho PA: Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: in vitro and in vivo assessments. *Journal of nanobiotechnology* 2011, 9:44.

[20] Pereira TA, Guerreiro CM, Maruno M, Ferrari M, Rocha-Filho PA: Exotic Vegetable Oils for Cosmetic O/W Nanoemulsions: In Vivo Evaluation. *Molecules* 2016, 21:248.

[21] Corach J, Sorichetti P, Romano S: Electrical properties of mixtures of fatty acid methyl esters from different vegetable oils. *international journal of hydrogen energy* 2012, 37:14735-14739.

Nano-encapsulation of garlic extract by water-in-oil emulsion: physicochemical and antimicrobial characteristics

Hassanzadeh, H.[1*], Alizadeh, M. [2], Rezazad, B. M. [3]

1. Ph.D. of food technology, Department of food science, Urmia University
2. Professor of food technology, Department of food science, Urmia University
3. Associated Professor of food technology, Department of food science, Urmia University

(Received: 2017/10/30 Accepted:2018/10/21)

In this study, the feasibility of fabrication of nanoemulsions containing garlic extract to hide the unpleasant odor and keeping its functional properties was considered. For this purpose, the various formulations of nanoemulsions containing garlic extract using high energy method (water bath type ultrasonic) were produced and also, the effect of various ratios of garlic extract on droplet size, encapsulation efficiency, antioxidant and antimicrobial activity, viscosity, electrical conductivity and turbidity of nanoemulsions was evaluated. Droplet size of various nanoemulsions ranged from 62 to 302 nm for water in oil nanoemulsions based on the dispersed phase ratio. The results of gas chromatography showed that the produced nanoemulsions were covered the volatile compounds of garlic extracts by a relatively high performance, but with an increase in the percentage of dispersed phase (garlic extract) from 5 to 25 percent, encapsulation efficiency was dropped from 89 to 80 % in water-in-oil nanoemulsion. Results from microbial test showed that water-in-oil nanoemulsions have a relatively low antimicrobial activity and they have only an inhibitory effect in high percent of garlic extract (25 %). Results of antioxidant activity by DPPH method cleared that water-in-oil nanoemulsions have a high free radical scavenging power. Also, the electrical conductivity of water-in-oil nanoemulsions was very low due to the oily continuous phase of nanoemulsions.

Keywords: Nano-encapsulation, Antimicrobial nanoemulsions, Garlic extract, Antioxidant activity

* Corresponding Author E-Mail Address: hamed.hassanzadeh2010@gmail.com