



انکپسولاسیون اسانس روغن دانه کتان و اکالیپتوس با استفاده از الکتروریسی

سارا دانشمند^۱، محمد امین میری^{۲*}، فاطمه نورا

۱- استادیار، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل، ایران.

۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران؛ آزمایشگاه الکتروریسی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۶/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۷/۲۷

کلمات کلیدی:

انکپسولاسیون،

الکتروریسی،

روغن دانه کتان،

اسانس اکالیپتوس،

ضد میکروب

DOI: 10.22034/FSCT.20.145. 170

* مسئول مکاتبات:

ma.miri@uoz.ac.ir

استفاده از گیاهان دارویی در مواد غذایی دارای سابقه طولانی است. روغن دانه کتان و اسانس اکالیپتوس به علت دارا بودن خواص زیستی بسیار مورد توجه قرار دارد. در این تحقیق، هدف بررسی خاصیت ضد میکروبی نانوالیاف زئین حاوی روغن دانه کتان و اسانس اکالیپتوس برای کنترل باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* در محیط آزمایشگاهی می باشد. بدین منظور روغن دانه کتان و اسانس اکالیپتوس در محلول زئین مخلوط گردید. سپس به وسیله ی دستگاه الکتروریسی به نانوالیاف تبدیل شد. جهت بررسی ویژگی ها و خاصیت ضد میکروبی نانوالیاف حاصل، آزمایشاتی شامل میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، تعیین قطر الیاف با نرم افزار Image J، میکروسکوپ نیرو اتمی (AFM)، پراش اشعه ایکس (XRD)، آنالیز حرارتی گرماسنجی وزنی (TGA)، راندمان انکپسولاسیون به روش اسپکتروفتومتری و بررسی خاصیت ضد میکروبی نانوالیاف تولیدی به روش دیسک دیفیوژن انجام شد. نتایج SEM نشان داد که مورفولوژی الیاف الکتروریسی شده، یکنواخت و فاقد گویچه بودند. تصاویر AFM بیانگر تصاویر سه بعدی و لوله ای شکل الیاف حاصل از الکتروریسی زئین/روغن دانه کتان/اسانس اکالیپتوس می باشد. الگوی پراش اشعه ایکس نشان دهنده افزایش شدت بلورینگی تیمارها نسبت به نمونه شاهد است. بر اساس نتایج آنالیز حرارتی، روغن دانه کتان و اکالیپتوس باعث افزایش پایداری حرارتی نانوالیاف زئین شده است. نتایج نشان داد که افزودن روغن دانه کتان به اسانس اکالیپتوس باعث تقویت خاصیت ضد میکروبی نانوالیاف شد. با توجه به نتایج تحقیق حاضر، می توان الیاف زئین/روغن دانه کتان/اسانس اکالیپتوس را به عنوان ضد میکروب های طبیعی استفاده نمود.

۱- مقدمه

نظر به اینکه صنایع غذایی امروزه به دنبال استفاده کمتر از مواد شیمیایی هستند، استقبال رو به رشدی برای استفاده از افزودنی‌های غذایی طبیعی با خاصیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی که هیچ گونه اثرات مضر بر بدن ندارند، وجود دارد [۱]. اسانس‌های (EOs) استخراج شده از ادویه‌جات، دارای خواص ضدباکتری و آنتی‌اکسیدانی هستند که آنها را به عنوان یک افزودنی مورد علاقه در صنایع غذایی قرار داده است. به علاوه اغلب آنها با عنوان به طور کلی ایمن (GRAS) شناخته می‌شوند [۱].

گیاه کتان، گیاهی دو لپه ای با نام علمی *Linum Usitatissimum* از دسته گیاهان گلدار، رده‌ی دو لپه‌ای‌ها، راسته‌ی مالپیگی سانان، تیره‌ی کتانیان، سرده‌ی کتان می‌باشد. دانه‌ی گیاه غنی از فیبر، پروتئین و روغن است. انسان‌ها از آغاز تمدن‌های اولیه، دانه کتان مصرف می‌کردند. در مصر و یونان باستان برای مقاصد پزشکی، عمدتاً برای تسکین دردهای شکمی و همچنین به عنوان منبع انرژی مورد استفاده قرار می‌گرفت [۲]. روغن دانه کتان منبع غنی از اسیدهای چرب ضروری، به ویژه اسید آلفا لینولنیک (ALA) است که یک اسید چرب امگا ۳ است. علاوه بر مصارف خوراکی این روغن، به عنوان یک آنتی اکسیدان ضد التهاب و مسکن، داروی ضد فیروز، ضد دیابت تثبیت کننده سطح قند خون، ضد ویروس و باکتری‌کش شناخته شده است [۲]. تحقیقات نشان داده است که روغن دانه کتان فعالیت ضد میکروبی وسیع الطیف علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی از خود نشان می‌دهد. به عنوان مثال، مطالعه‌ای توسط Sing و همکاران گزارش کرد که روغن بذر کتان اثرات بازدارنده‌ای را در برابر پاتوژن‌های رایج مانند *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* نشان داد [۳].

اکالیپتوس با نام علمی *Eucalyptus globulus* یکی از درختان دارویی است که مدت‌هاست به دلیل اثرات ضد میکروبی و سایر خواص مورد توجه قرار گرفته است. این گیاه سرشار از پلی فنول است و ترکیب مهم اسانس برگ آن می‌تواند اکالیپتول یا سینئول باشد که بسته به نوع و شرایط زیستگاه متفاوت است [۴]. اسانس این گیاه بدون رنگ یا زرد مایل به قرمز و دارای بوی بسیار قوی، خنک، سوزان و بسیار فراری دارد که با انواع روش از جمله تقطیر، استخراج می‌شود. اسپانیا، استرالیا و پرتغال مهمترین تولیدکنندگان اسانس اکالیپتوس هستند [۵]. از خواص درمانی اکالیپتوس می‌توان به خلط آور، ضد عفونی کننده عمومی، ضد اسپاسم، ترمیم زخم و ضد انگل اشاره کرد. در چین و ژاپن از اسانس برگ اکالیپتوس به عنوان آنتی بیوتیک و کرم‌کش استفاده می‌شود. از این ماده به عنوان محرک و نرم کننده سینه و در موارد آسم و برونشویت مزمن استفاده می‌شود [۶]. همچنین اسانس اکالیپتوس روی طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نظیر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *شیگلا دیسانتری*، *سالمونلا پاراتیفی*، *اشرشیا کلی*، *باسیلوس سرئوس* و نیز قارچ *کاندیدا آلبیکنس* فعالیت ضد میکروبی از خود نشان داده است [۷]. اما استفاده از آنها در صنایع غذایی به علت محدودیت‌های اقتصادی، و هزینه بر بودن، داشتن مزه تند و تاثیر بر خواص چشایی غذا با محدودیت روبرو شده است. همچنین این ترکیبات در مواد غذایی به اکسیژن، حرارت بالا، نور و ... حساس بوده و در آب نامحلول می‌باشند. برای برخی مصارف، کنترل رهاش آنها ضروری است. به همین دلیل از روش‌های انکپسوله کردن مواد مؤثره (حالت مایع، جامد یا گاز) درون لایه‌ای از پلیمرهای مختلف (پروتئین، پلی ساکارید یا لیپید) استفاده می‌شود تا ماده مؤثره را تحت شرایط کنترل شده و در زمان دلخواه، درون ماتریکس غذایی آزاد نموده و از بد طعمی در اثر

به عنوان پوشش فعال برای انتقال ترکیبات زیست فعال به محصولات غذایی کاربرد دارد.

زئین پروتئین اصلی ذرت بوده که حدود ۵۰٪-۴۵ پروتئین ذرت را تشکیل می‌دهد. زئین نامحلول در آب می‌باشد. که علت عدم حلالیت در آب، وجود مقادیر زیاد از اسیدهای آمینه غیر قطبی مانند لوسین، پرولین و آلانین می‌باشد. در حال حاضر، زئین به علت دارا بودن ویژگی‌های استثنایی از جمله تشکیل فیلم، مقاومت حرارتی بالا و ممانعت کنندگی بالا در برابر اکسیژن، کاربردهای فراوانی در صنایع غذایی و دارویی یافته است [۱۱]. هدف از تحقیق حاضر انکپسولاسیون روغن دانه کتان و اسانس اکالیپتوس با استفاده از روش الکترورسی و بررسی ویژگی‌ها و خواص ضد میکروبی غشاء الیاف حاصل بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد اولیه

پودر زئین با شماره کاتالوگ Z3625 از کمپانی سیگما آلدریج، اسید استیک با خلوص ۹۹/۷ درصد از شرکت مرک آلمان، اسانس اکالیپتوس از شرکت باریج اسانس (ایران)، روغن دانه کتان از شرکت اکسیر (ایران)، اتانول ۹۶ درصد از شرکت هامون طب ایران و آب مقطر دوبار تقطیر از سرم سازی ثامن ایران تهیه گردید.

۲-۲- تهیه محلول الکترورسی

محلول الکترورسی از افزودن روغن دانه کتان (۵ درصد) و اسانس اکالیپتوس (۰، ۲/۵، ۵ و ۱۰ درصد) به محلول زئین تهیه شد. برای تهیه محلول زئین (۲۷٪) مقادیر مورد نیاز از پودر زئین توزین و در بالن ژوژه با اسید استیک گلاسیال حل گردید و به حجم رسانده شد. محلول حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد تا حباب‌های موجود

مصرف بی رویه و زیاد غذا، جلوگیری می‌کند [۸]. همچنین اثر آنتی اکسیدانی و ضدباکتریایی دراز مدتی را برای نگهداری از مواد غذایی دارا می‌باشد. اما، یک محدودیت کلی برای تمام روشهای انکپسولاسیون، عدم وجود سطح تماس مطلوب برای کپسول‌ها می‌باشد که امکان حداکثر تحویل مواد مغذی را به بدن فراهم کند. گزارش شده است که سرعت انحلال داروها با افزایش سطح تماس، افزایش می‌یابد. افزایش سطح تماس می‌تواند منجر به جذب بهتر و رساندن دارو به بافتهای بدن گردد. این محققین گزارش نمودند که نانوالیاف با توجه به داشتن سطح تماس گسترده، در مقایسه با ذراتی مانند میکروکپسول‌ها که سطح مقطع کروی دارند، قادر به دارو رسانی بهتر می‌باشند. بنابراین، استفاده از نانوالیاف به عنوان یک جایگزین و احتمالاً روش برتر غنی‌سازی مواد غذایی مورد توجه زیادی قرار گرفته است. الکترورسی یکی از روش‌های جدید انکپسولاسیون می‌باشد که قادر به تولید لایه پلیمری با ساختار نانوالیاف است. نانوالیاف تولید شده به روش الکترورسی، در تهیه سیستم‌های انتقال موضعی دارو، انکپسولاسیون دارو، ویتامین‌ها و ... استفاده می‌شود [۹]. الکترورسی روشی است که با نیروی محرکه الکترواستاتیک نانوالیاف تولید می‌کند. الیاف نانو از یک محلول پلیمر مایع یا مذاب تشکیل شده است که از یک لوله مویرگی به منطقه‌ای با میدان الکتریکی بالا منتقل می‌شود. هنگامی که نیروهای الکترواستاتیک بر کشش سطحی مایع غالب می‌شوند، مخروط تیلور تشکیل شده و یک جت باریک به سرعت به طرف هدف (جمع کننده) که متصل به زمین است یا دارای بار مخالف می‌باشد شتاب می‌گیرد. عدم ثبات در این جت باعث ایجاد حرکت شدید جت می‌شود، که به نوبه خود باعث افزایش و باریک شدن جت می‌گردد و تبخیر حلال یا خنک شدن مذاب و تشکیل نانوالیاف در سطح هدف را موجب می‌شود [10]. نانوالیاف

کسب نتیجه مطلوبی برای آشکارسازی الکترون های ثانویه می شود، از آن بعنوان یک پوشش دهنده استفاده می شود. SEM در فاصله کاری ۱۳ mm و ولتاژ ۵ kV انجام شد. با استفاده از نرم افزار مهندسی Image J قطر ۵۰ عدد از الیاف هر سری تولید که به صورت تصادفی انتخاب شده بود اندازه گیری شد و میانگین این داده ها به عنوان میانگین قطر الیاف آن تصویر در نظر گرفته شد [۱۴].

۲-۵- میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)

برای توصیف بهتر توپوگرافی سطح الیاف الکترونیسی شده از میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) استفاده شد [۱۱]. تصاویر در حالت غیر تماسی در هوا با استفاده از کنسول های تجاری Si (شرکت تحقیقاتی آرا پژوهش، ایران) با فرکانس رزونانس ۱۸۰ کیلوهرتز اسکن شدند.

۲-۶- آنالیز توزین حرارتی (TGA)

این آزمایش برای بررسی نحوه رفتار نانوالیاف زئین خالص و نانوالیاف بارگذاری شده با اکالیپتوس و روغن دانه کتان در برابر حرارت انجام شد. آنالیز بر روی محلول پلیمر و غلظت های مختلف محلول زئین- اکالیپتوس-روغن دانه کتان انجام گردید. آنالیزهای TGA بر روی SDT-Q600 (TA Instruments, USA) با سرعت اسکن ۲۰ درجه سانتیگراد در دقیقه انجام شد. در حالی که نمونه ها (۴/۸ میلی گرم) گرما دریافت می کرد، دمای آنها از ۲۵ به ۷۰۰ درجه سانتیگراد با سرعت افزایش دمای ۱۰ °C / min مورد آنالیز قرار گرفت [۱۵].

۲-۷- آزمون پراش اشعه ایکس (XRD)

از آزمون پراش اشعه ایکس به منظور بررسی نحوه اختلاط و پراکنش ترکیبات مختلف و تعیین وضعیت فیزیکی اکالیپتوس در الیاف الکترونیسی شده زئین، استفاده گردید. آزمون بر روی ۴ نمونه که عبارتند از نمونه هایی که در

خارج شده و پیوندهای بین مولکولی در زئین تشکیل شده و محلولی یکدست بدست آید [۱۲].

۲-۳- فرآیند الکترونیسی

جهت تهیه نانوالیاف زئین حاوی اسانس اکالیپتوس و روغن دانه کتان، از دستگاه الکترونیسی تک محوره مجهز به یک منبع تغذیه با ولتاژ بالا در دامنه ۰ تا ۳۵ کیلوولت استفاده شد. به عنوان رشته ساز از سر سوزن فولادی ضد زنگ با قطر ۰/۹ میلی متر (G18) استفاده شد. محلول پلیمری را درون سرنگ های ۵ میلی لیتری وارد کرده و از طریق یک لوله باریک به سر سوزن منتقل شد. سرنگ در وضعیت افقی بر روی یک پمپ دارای کنترل دیجیتالی قرار داده شد، به طوری که سر سوزن به شکل عمودی و رو به روی درام جمع کننده واقع گردید. سر سوزن به الکتروود دارای قطبیت مثبت و منبع انرژی ولتاژ بالا متصل شد. پس از تشکیل مخروط تیلور، یک جت از محلول پلی مری با بار مثبت، شکل گرفت که پس از طی نمودن فاصله سر سوزن تا جمع کننده، بر روی جمع کننده که قبلا با فویل آلومینیومی پوشانده شده بود، به صورت الیاف بافته نشده نشست. الکترونیسی در دمای اتاق و به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد [13].

۲-۴- میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

مورفولوژی الیاف حاصل از الکترونیسی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی در چهار درشت نمایی ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ برابر بررسی شد. برای این منظور نمونه ها در ابعاد $0.5 \times 0.5 \text{ cm}^2$ بریده شده بر روی پایه های مخصوص قرار گرفتند و قبل از تصویر برداری، نمونه ها توسط آلیاژ طلا-پالادیوم پوشش داده شدند. از آنجا که نانوالیاف پلیمری باید توسط یک ماده رسانا پوشش داده شوند و به دلیل آنکه طلا براحتی ایجاد بخار می کند، و بمباران آن با الکترون های پرا انرژی موجب

بطوریکه O_t مقدار کل روغن/اسانس (در تئوری) و O_d مقدار روغن/اسانس محلول در هگزان را نشان داد.

۱۰-۲- طرح آماری

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن انجام گرفت.

۳- نتایج و بحث

۱-۳- مورفولوژی و قطر الیاف

تصاویر SEM از الیاف الکترورسی شده را در نمونه های دارای اسانس و روغن دانه کتان در شکل ۱ قابل مشاهده می‌باشد. این تصاویر توسط نرم افزار Image J آنالیز شدند و میانگین قطر الیاف محاسبه شده است و نتایج محاسبات در جدول ۱ درج شده است. طبق تصاویر تمامی الیاف دارای مورفولوژی مناسب و فاقد گویچه و یکدست و یکنواخت می‌باشد. همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود با افزایش میزان اسانس میانگین قطر الیاف افزایش می‌یابد همچنین هدایت الکتریکی کاهش می‌یابد. بطور کلی، با افزایش هدایت الکتریکی محلول چگالی بار افزایش می‌یابد بنابراین افزایش بارهای حاصل از محلول باعث افزایش کشش محلول می‌شود و این امر منجر به تولید الیاف^۳هایی با قطر کوچک می‌شود. نتایج حاصل مطابق با نتایج حسینی و همکاران (۲۰۲۱) و قاسمی و همکاران (۲۰۲۲) دارد [۹، ۱۱]. همچنین افزایش غلظت عامل دیگر میتواند برای افزایش قطر الیاف باشد. گزارش شده است که مهمترین پارامتر در کنترل مورفولوژی و قطر الیاف الکترورسی شده در فرآیند الکترورسی غلظت محلول است. با افزایش غلظت، قطر فیبر نیز افزایش می‌یابد. این

سطوح ۰، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۱۰٪ اسانس اکالیپتوس و ۵٪ روغن دانه کتان بارگذاری شده اند، انجام شد. در این آزمون نمونه ها با استفاده از دستگاه پراش پرتو ایکس، با پرتوی $CuK\alpha$ با طول موج $\lambda = 1.5418$ Å = آنگستروم و زاویه برخورد 2θ از ۱۰ تا ۴۰ درجه، در دمای محیط اسکن شده و طیف پراش پرتو ایکس آنها، مقایسه گردید [۱۶].

۸-۲- آزمون ضد میکروبی غشاء نانوالیاف

روش انتشار دیسک برای سنجش خواص ضد میکروبی تشک های الیافی الکترورسی شده علیه گونه های میکروبی مدل، از جمله *S. aureus* (ATCC 1112) و *E. coli* (ATCC 1330) مطابق روش توصیف شده توسط حسینی و همکاران (۲۰۲۱) استفاده شد. غشاهای نانوالیاف ساخت دیسک های ۱۰ میلی متری جدا شدند. ۱۰۰ میکرولیتر کشت براث 10^5 - 10^6 CFU/mL از باکتری ها روی مولر هیتون آگارپلیت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت کشت گردید. هنگامی که انکوباسیون به پایان رسید، قطر هاله عدم رشد اندازه گیری گردید [۹].

۹-۲- راندمان انکپسولاسیون

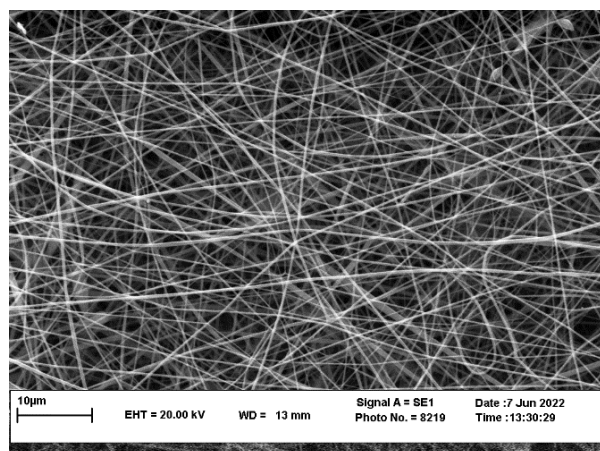
در این مطالعه، میزان مواد موثره بر روی سطح نانوالیاف، با غوطه ور کردن غشاء الکترورسی شده زئین در حلال هگزان اندازه گیری شد [۱۱]. زئین در هگزان حل نمی شود، اما روغن دانه کتان و اسانس اکالیپتوس به راحتی حل می شود. میزان جذب و مقدار روغن/اسانس محلول در طول موج ۲۷۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر UV/vis تعیین شد. مقدار مواد موثره روی سطح الیاف الکترورسی شده زئین از کل مواد موثره بارگیری شده در الیاف الکترورسی شده کم شد. بنابراین، راندمان کپسولاسیون طبق فرمول زیر به دست آمد:

$$\text{Encapsulation efficiency (\%)} = \frac{O_t - O_d}{O_t} \times 100$$

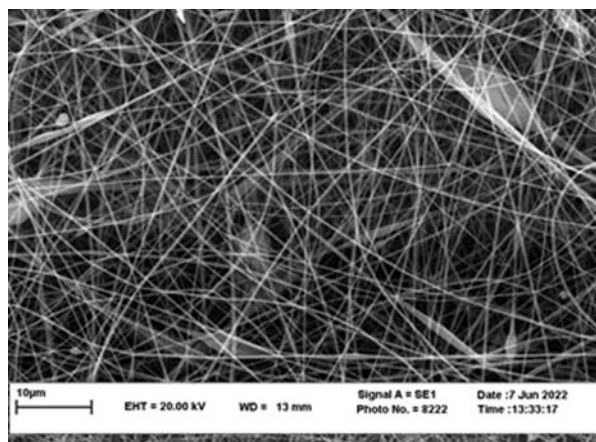
زئین الکترورسی شده، لوله ای هستند و ساختار دیگری تشکیل نشده که نشان دهنده یکپارچگی مناسب می باشد که تصاویر SEM را تایید می کند. نتیجه مشابه یافته های میری و همکاران (۲۰۱۶) است [۱۳]. تصاویر AFM شکل لوله ای الیاف الکترورسی شده را بهتر از تصاویر SEM نشان می دهد. به نظر می رسد که الیاف لوله ای شکل زمانی تشکیل می شوند که از یک سیستم حلال بسیار فرار مانند اسید استیک برای الکترورسی استفاده شود [۱۳]. می توان نتیجه گرفت که کپسوله کردن اسانس اکالیپتوس و روغن دانه کتان مورفولوژی الیاف الکترورسی شده زئین را تغییر نداد، اما قطر الیاف الکترورسی شده با افزایش غلظت اسانس افزایش یافت. نتایج با تیلاقی و همکاران [۱۷] مطابقت دارد.

احتمالاً به دلیل مقاومت بیشتر محلول های با غلظت بالا است که به سمت جمع کننده کشیده می شوند [۱۱]. افشار و همکاران (۱۳۹۷) در مطالعه ای گزارش کردند که با افزودن اسانس نعناع به محلول کیتوزان-پروتئین گاودانه، هدایت الکتریکی کاهش یافته که دلیل آن غیریونی بودن ساختار اسانس نعناع است. همچنین افزایش هدایت الکتریکی محلول موجب کاهش قابل توجهی در قطر نانوالیاف می گردد [۲۰].

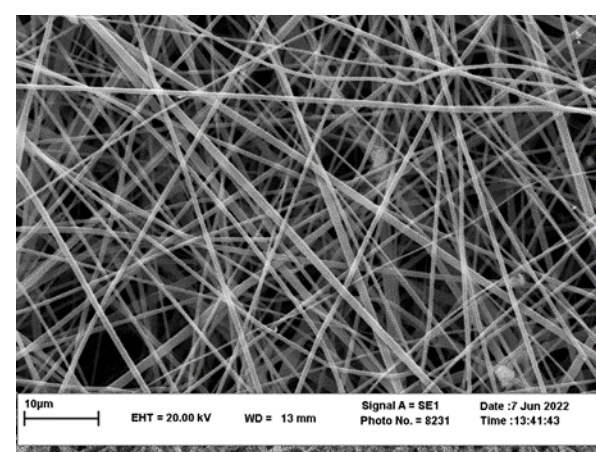
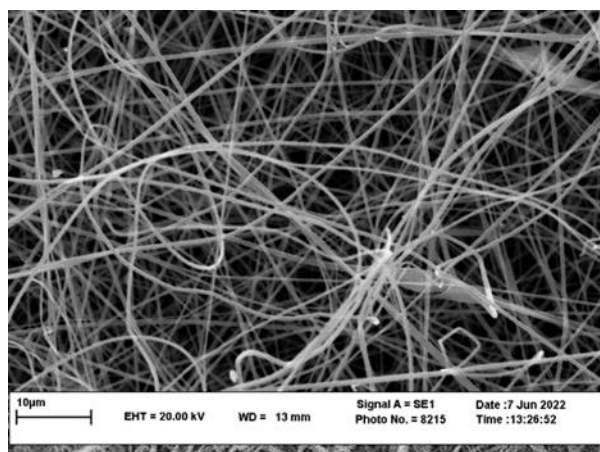
برای توصیف بهتر توپوگرافی سطح الیاف الکترورسی شده از میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) استفاده شد. در شکل ۲ تصاویر سه بعدی AFM الیاف حاصل از الکترورسی زئین حاوی روغن دانه کتان و اسانس اکالیپتوس مشخص می شود. تصاویر AFM نشان می دهد که تمام نانوالیاف



(a)



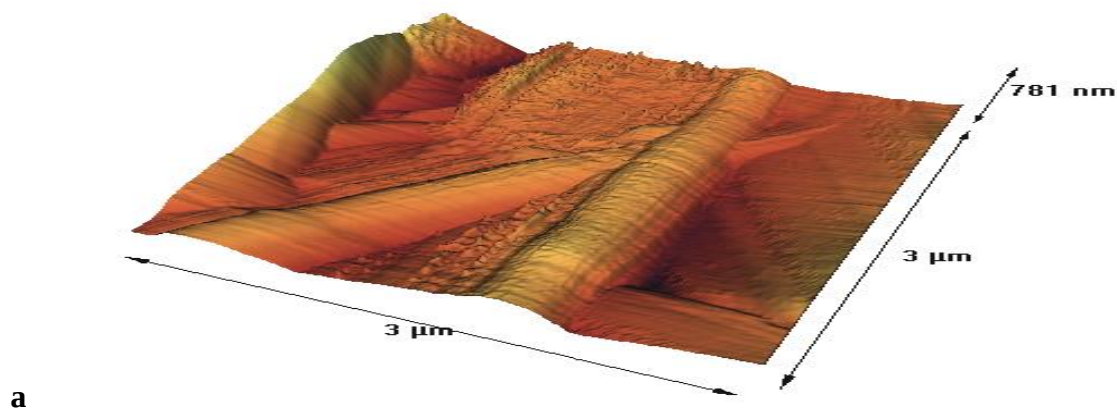
(b)

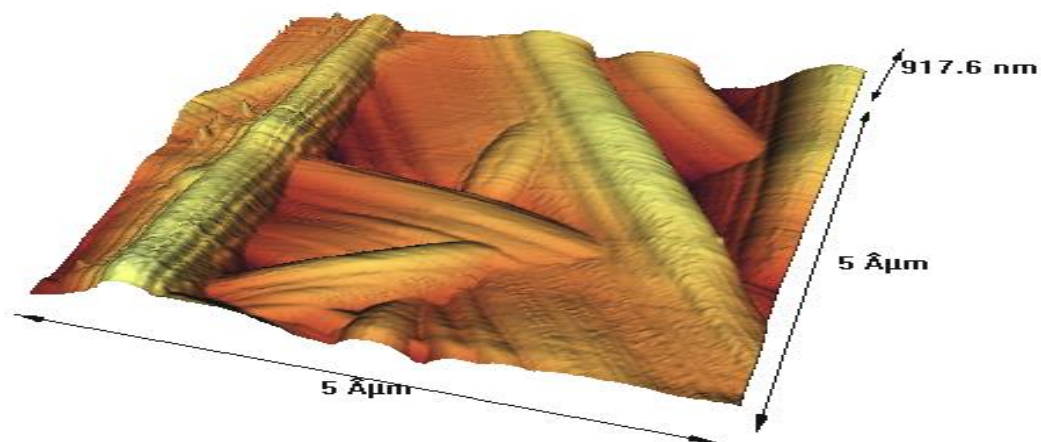


(c) (d)
Figure 1 SEM images of flaxseed oil/ eucalyptus essential oil/zein electrospun fibers: (a) 0%, (b) 2.5%, (c) 5%, and (d) 10%.

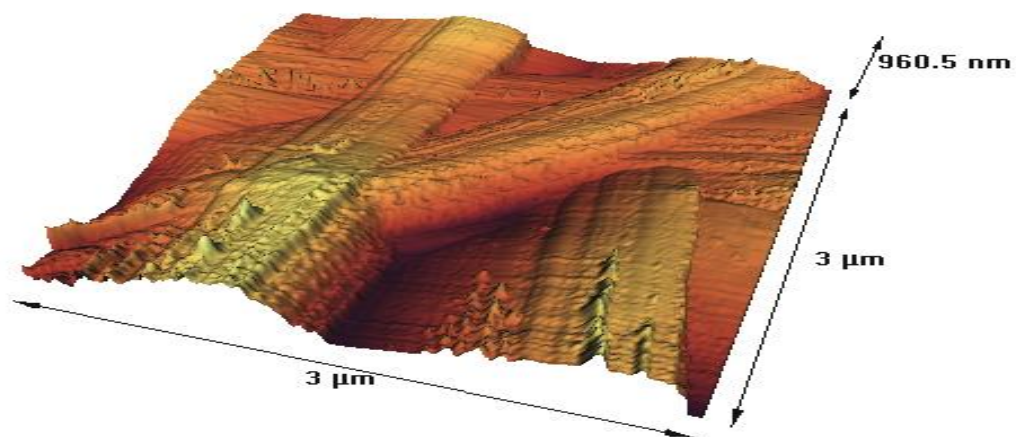
Table 1 Morpholgy, average diameter and electrical conductivity of flaxseed oil/eucalyptus essential oil/zein electrospun fibers *

Concentration (%)	Morphology	SEM	EC
0	Free bead		24.1
2.5	Free bead	360	20.3
5	Free bead	480	18.96
10	Free bead	600	15.6





b



c

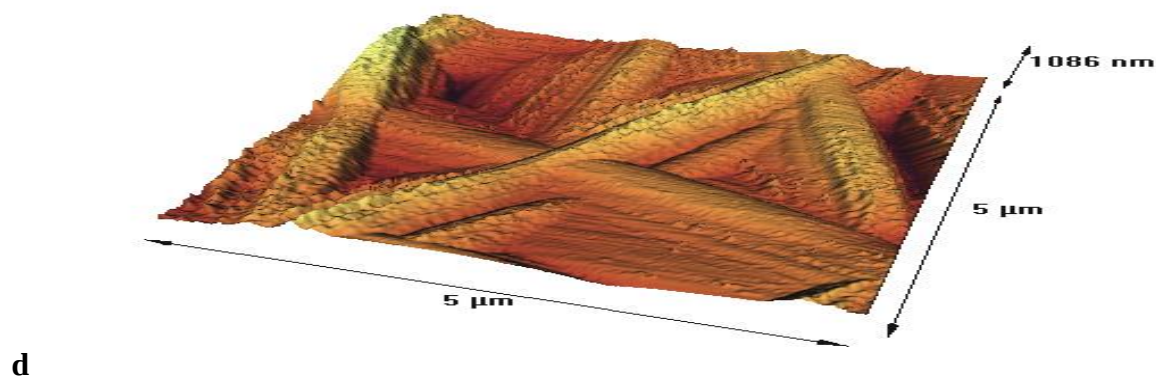


Figure 2 AFM images of flaxseed oil/ eucalyptus essential oil/zein electrospun fibers: (a) 0%, (b) 2.5%, (c) 5%, and (d) 10%.

بارگذاری شده، نشان می‌دهد که شدت پیک‌ها در مقایسه با نمونه شاهد افزایش پیدا کرده است که بیانگر تاثیر اسانس اکالیپتوس بر d_1 و d_2 است. این بدان معنی است که افزایش اسانس باعث افزایش تجمعات مولکولی و محتوای ساختار آلفا هلیکس می‌شود که احتمالاً به دلیل واکنش آبگریزی بین روغن دانه کتان، اسانس و زئین باشد. همانطور که الگوهای پراش اشعه ایکس نشان می‌دهد، شدت پیک‌ها در مقایسه با نمونه شاهد افزایش پیدا کرده است که نشان دهنده افزایش شدت بلورینگی نسبت به نمونه شاهد است که دلیل آن می‌تواند افزایش افزایش تجمعات مولکولی باشد [۹]. این افزایش شدت پیک‌های زئین با افزودن فازهای آمورف به آن در مطالعات دیگری نیز مشاهده شده است [۹، ۱۹]. در پژوهشی افشار و همکاران بیان کردند که درصد تبلور با تشکیل کمپلکس پروتئین-پلیمر (کیتوزان) کم می‌شود. در حقیقت با تشکیل این مجموعه در هر مرحله، قله وسیع‌تر شده و از شدت آن کاسته می‌شود. به بیانی دیگر، ساختار بلوری به سمت ساختار آمورف حرکت می‌کند [۲۰].

۲-۳- آزمون پراش پرتو ایکس (XRD)

در اثر برخورد اشعه ایکس به اتم‌های یک ماده الکترون‌ها متحرک می‌شوند و نوسان می‌کنند در نتیجه اشعه ایکس ورودی در اتم پراکنده می‌شود. در صورتی که هم فاز باشند اشعه‌های ایکس پراکنده شده یکدیگر را تقویت می‌کنند. در مواد آمورف اشعه‌ها یکدیگر را تضعیف می‌کنند و پدیده پراش اتفاق نمی‌افتد. الگوهای XRD نانوالیاف زئین حامل ۵ درصد روغن دانه کتان و صفر درصد اسانس اکالیپتوس دو پیک در زوایای $2\theta = 8.9^\circ$ و $2\theta = 19.8^\circ$ نشان می‌دهد که به ترتیب مربوط به فاصله صفحات بین مارپیچ‌های همسایه در ساختار پروتئین (d_1) و فاصله صفحات ساختارهای آلفا هلیکس (d_2) (۱۰) در پیکربندی زئین است. پیک‌های به دست آمده برای نانوالیاف زئین قابل مقایسه با نتایج هوآنگ و همکاران [۱۸] می‌باشد. الگوهای پراش اشعه ایکس نمونه‌های

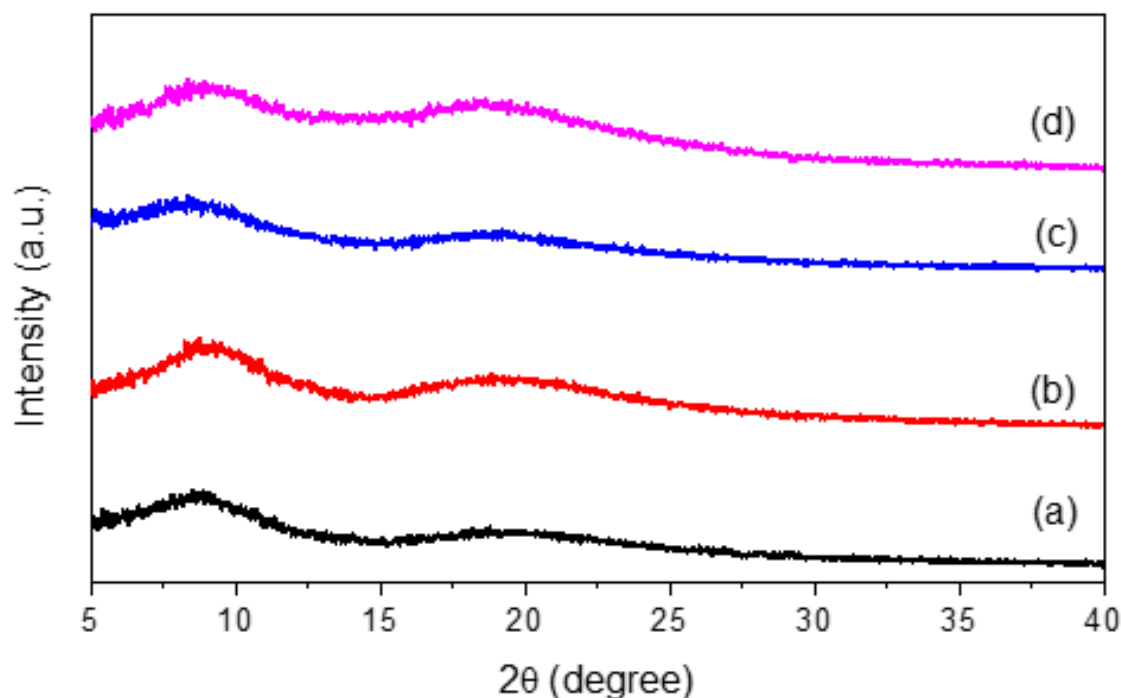


Figure 3 X-ray diffraction patterns of flaxseed oil/ eucalyptus essential oil/zein electrospun fibers: (a) 0%, (b) 2.5%, (c) 5%, and (d) 10%.

تاخوردگی زنجیره پروتئینی می‌باشد که با افزایش غلظت اسانس و حضور روغن دانه کتان دمای تاخوردگی زنجیره پروتئینی برای نمونه های نانوالیاف افزایش یافته است که دلیل آن می‌تواند واکنش بین حامل و ترکیبات موثره بارگذاری شده باشد. نتایج آزمون DSC نشان می‌دهد که اسانس اکالیپتوس و روغن دانه کتان با موفقیت در الیاف الکتروریسی ژئین کپسوله شده است.

۳-۳- آنالیز حرارتی روبشی افتراقی (DSC)

ویژگی های حرارتی نانوالیاف ژئین به وسیله تکنیک DSC بررسی شد. همان طور که در شکل ۴ مشخص شده است گرماسنج DSC برای نانوالیاف در دمای ۸۰ تا ۹۰ درجه سانتی گراد یک پیک نشان داده است که به علت تبخیر اجزای فرار مولکول ها است که بدلیل وجود مواد فرار در مواد انکپسوله باشد. این دما در محدوده پایین تر از نمونه ۰٪ می باشد. در محدوده دمایی ۲۵۰ تا ۳۰۰ درجه سانتی گراد نمودار پیک هایی مشاهده می گردد که مربوط به

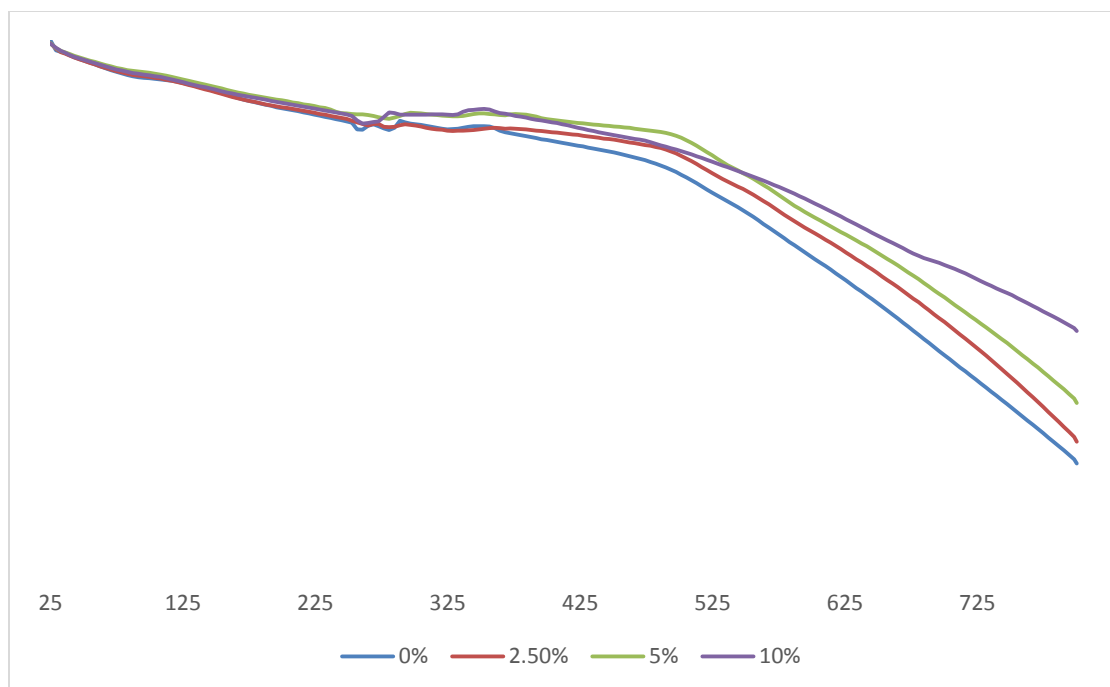
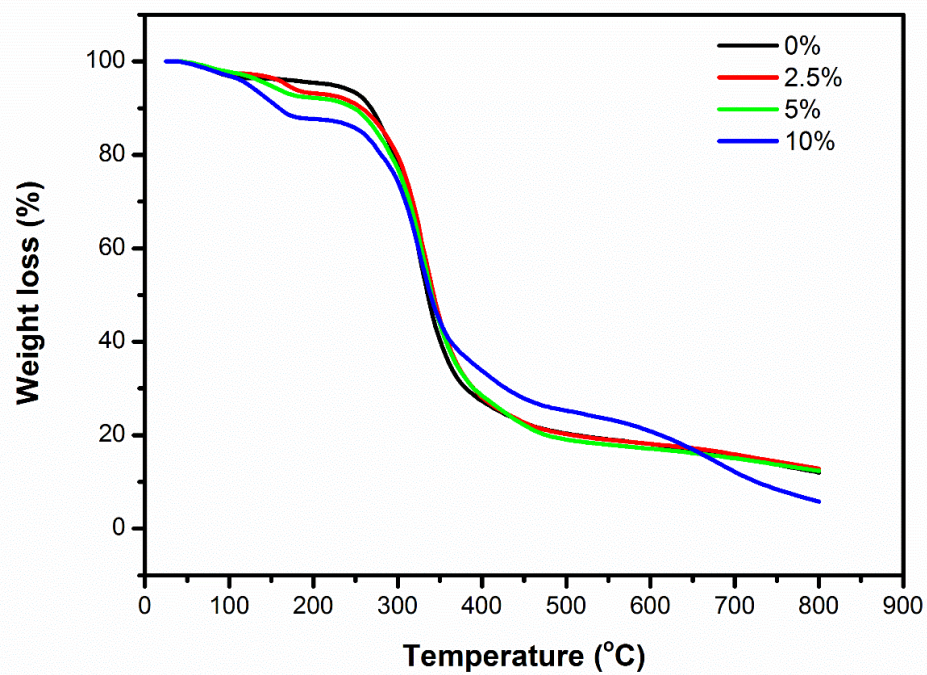


Figure 4 DSC thermograms of flaxseed oil/ eucalyptus essential oil/zein electrospun fibers.

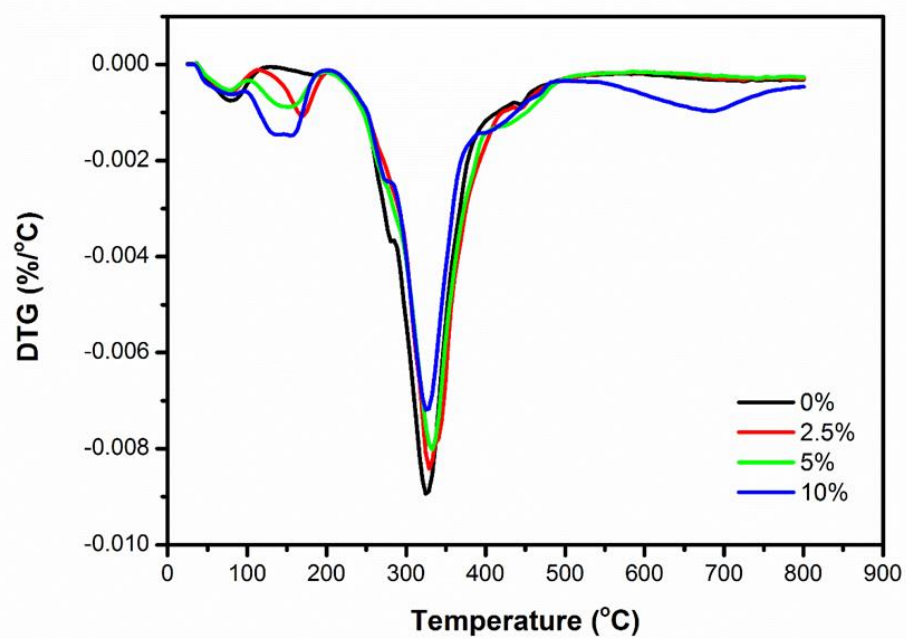
در شکل ۵ و مقادیر کاهش وزن مربوط به هر مرحله در جدول ۲ آورده شده است.

۳-۴- آنالیز گرماسنجی وزنی (TGA)

به منظور بررسی خواص حرارتی نمونه های مورد بررسی از آزمون TGA استفاده شده و نمودارهای TGA و DTG



(a)



(b)

Figure 5 (a) TGA and (b) DTG of flaxseed oil/ eucalyptus essential oil/zein electrospun fibers.**Table 2** Weight loss values related to each step for the examined samples

Sample	First step (%)	Second step (%)	Third step (%)	Remained ash (%)
	25-200°C	200-500°C	500-800°C	800°C
0%	4.55		83.45	12
2.5%	6.83		80.33	12.84
5%	7.77		79.85	12.38
10%	12.31	62.49	19.39	5.81

این می‌تواند به ساختار کریستالی‌تر نمونه‌های حاوی مقادیر بیشتر اسانس ربط داده شود. در واقع همراستایی بیشتر زنجیره‌ها با افزایش درصد اسانس در اثر اندرکنش‌های واندروالس بین ترکیبات اسانس، روغن دانه کتان و زئین، باعث شده است که علاوه بر افزایش بلورینگی ساختار، پایداری حرارتی آن نیز افزایش یابد.

همچنین در نمونه ۱۰٪ یک پیک گرمایگر در محدوده دمایی ۵۵۰ تا ۸۰۰ درجه سانتی گراد مشخص است که در دیگر نمونه‌ها قابل مشاهده نیست و به تجزیه حرارتی کمپلکس‌های آمینو اسیدی ایجاد شده با ترکیبات روغن دانه کتان و اسانس اکالیپتوس مربوط می‌باشد [۲۳] که پایداری حرارتی بسیار بالایی دارد. همچنین مطابق جدول ۲، مقدار خاکستر باقی مانده در نمونه ۲/۵٪ حدود ۸۴/۰٪ نسبت به نمونه ۰٪ بیشتر بوده است که این می‌تواند به دلیل وجود ترکیبات حاصل از اسانس در این خاکستر باشد. با این حال جالب توجه است که با افزایش بیشتر غلظت، مقدار خاکستر باقی مانده روند کاهشی داشته و در نمونه ۱۰٪، مقدار خاکستر باقی مانده به شدت کاهش یافته و به حدود ۵/۸٪ رسیده است. این می‌تواند بدین معنی باشد که ترکیبات اسانس و

مطابق شکل ۵، مرحله اول کاهش وزن در محدوده دمایی ۲۵ تا ۲۰۰ درجه سانتی گراد برای همه نمونه‌ها یک پیک گرمایگر قابل مشاهده است که مربوط به تبخیر آب جذب سطحی، آب ساختاری و دیگر حلال‌های موجود در نمونه‌ها می‌باشد [۲۱، ۲۲]. مطابق جدول ۲ بیشترین آب جذب سطحی مربوط به نمونه ۱۰٪ و پس از آن نمونه ۵٪ بوده است. کمترین میزان آب موجود در ساختار نیز متعلق به نمونه ۰٪ بوده است. در واقع به نظر می‌رسد با افزایش غلظت در ساختار، به دلیل آب دوست بودن ترکیبات موجود در اسانس، جذب آب بالاتری اتفاق افتاده است.

مرحله بعدی کاهش وزن در محدوده ۲۰۰ تا ۸۰۰ درجه سانتی گراد نیز به تجزیه حرارتی آمینواسیدهایی با پایداری حرارتی پایین و ساختار پروتئینی اولیه زئین است [۲۳]. همچنین ترکیبات موجود در روغن دانه کتان و اسانس اکالیپتوس نیز در این محدوده دمایی تخریب می‌شود [۲۴].

مطابق شکل ۵ و جدول ۲، مشخص است که در این مرحله، افزایش غلظت باعث کمتر شدن کاهش وزن شده است که

روغن دانه کتان توانسته‌اند با ایجاد اندرکنش با ساختار زئین، مانند یک کاتالیست موجب تشدید تجزیه حرارتی ساختار زئین شوند.

۳-۵- راندمان انکپسولاسیون

در انکپسولاسیون، راندمان یک عامل تعیین کننده مهم است که تعیین می‌کند یک کپسول تا چه حد می‌تواند مواد موثره را به طور موثر حفظ کند [۹]. نتایج راندمان انکپسولاسیون $1/5 \pm 0.68$ ، 2 ± 0.72 درصد و 5 ± 0.78 درصد برای الیاف الکترورسی شده بود. نتایج حاصل مشابه نتایج مطالعات حسینی و همکاران (۲۰۲۱) و قاسمی و همکاران (۲۰۲۲) بود [۹، ۱۱].

۳-۶- نتایج فعالیت ضد میکروبی الیاف حاوی روغن دانه کتان و اسانس اکالیپتوس

فعالیت ضد باکتریایی غشاء نانوالیاف نقش مهمی در کاربردهای غذایی آن دارد. بنابراین، فعالیت ضد باکتریایی غشاء نانوالیاف زئین حاوی روغن دانه کتان و اسانس اکالیپتوس بر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *شرشیا کلی* مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج فعالیت ضد میکروبی نانوالیاف در برابر باکتریها در جدول ۵ مشاهده می‌شود. غشاء نانوالیاف حاوی روغن دانه کتان، فعالیت ضد باکتریایی قوی در برابر باکتریهای علیه *استافیلوکوکوس*

اورئوس (17 mm) و *شرشیا کلی* (16 mm) نشان دادند. گزارشات زیادی قابلیت ضد میکروبی قوی روغن دانه کتان را گزارش نمودند [۲، ۲۵]. فعالیت ضد میکروبی روغن بذر کتان به اجزای زیست فعال آن، به ویژه وجود اسیدهای چرب امگا ۳، آلفا لینولنیک اسید (ALA) و لیگنان‌های موجود در روغن دانه کتان، مانند *secoisolariciresinol diglucoside* نسبت داده شده است [۳، ۲۵، ۲۶]. نتایج حاصل مشابه نتایج مهیمنی و همکاران می‌باشد [۲۷]. غشاهای نانوالیاف حاوی روغن دانه کتان و اسانس اکالیپتوس، فعالیت ضد باکتریایی قوی با قطر هاله عدم 19mm ، $19/5$ ، $21/4$ در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* و 18mm ، 19 ، 21 در برابر *شرشیا کلی* نشان دادند. همانطور که نتایج نشان می‌دهد افزودن روغن دانه کتان به اسانس اکالیپتوس باعث تقویت خاصیت ضد میکروبی می‌شود. وجود برخی از ترکیبات مانند آلفا پینن در اسانس اکالیپتوس یا همه ترکیبات می‌تواند در فعالیت ضد میکروبی اسانس مشارکت داشته باشد. به طور کلی، اسانس‌ها می‌تواند از طریق تخریب دیواره سلولی، واکنش با پروتئین‌های غشایی، افزایش نفوذپذیری دیواره سلولی و نشت محتوای سلول در برابر میکروارگانیسم‌ها فعالیت ضد میکروبی داشته باشد [۱۱].

Table 3 Inhibition zone diameter of flaxseed oil/ eucalyptus essential oil/zein electrospun fibers against *S. aureus* and *E. coli* *

	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
0	0 ^c	0 ^c
2.5	19 ± 0.8 ^b	18 ± 1.3 ^b
5	19.5 ± 1 ^b	19 ± 0.9 ^b
10	21.4 ± 1.3 ^a	21 ± 1.4 ^a

* Different letters (a, b, c, d) within the same column represent significant statistical differences ($p < 0.05$) between 0, 2.5, 5, and 10% concentrations. ($n=3$).

۴- نتیجه گیری

طبق نتایج بدست آمده از تصاویر SEM تمامی الیاف الکترورسی شده زئین یکدست و فاقد گویچه می باشد و با افزایش میزان اسانس قطر الیاف نیز افزایش یافته است که این افزایش قطر به علت کاهش هدایت الکتریکی بود. تصاویر تهیه شده AFM نشان داد که همگی الیاف الکترورسی شده لوله ای شکل می باشد. الگوهای XRD بدست آمده از الیاف الکترورسی شده دارای پراکندگی با دو هاله ی پراش است و شدت پیک های نمونه های تیمار در مقایسه با نمونه شاهد افزایش پیدا کرده. نتایج بدست آمده از آنالیز حرارتی نشان دهنده این بود که پایداری حرارتی نانوالیاف زئین حامل اسانس و روغن دانه کتان افزایش یافته است. طبق تحقیقات انجام شده بر روی دو باکتری *شرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* این نتیجه حاصل شد که الیاف الکترورسی شده ی زئین حامل روغن دانه

کتان و اسانس اکالیپتوس دارای خاصیت ضد میکروبی می باشد و نتایج نشان داد که افزودن روغن دانه کتان به اسانس اکالیپتوس باعث تقویت خاصیت ضد میکروبی نانوالیاف شد و می توان نتیجه گرفت که از نانوالیاف زئین/روغن دانه کتان/اسانس اکالیپتوس در کنترل عوامل میکروبی استفاده کرد.

۵- قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی زابل بخاطر تصویب این طرح با شناسه اخلاق IR.ZBMU.REC.1398.138 و تامین منابع مالی توسط این معاونت که ما را در اجرای این طرح یاری نمودند تشکر و قدردانی می نمایند.

۶- منابع

- [1] Burt S (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol* 94:223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- [2] Elrahman F, . A, Khader N, et al (2023) Physicochemical characteristics and antimicrobial of composition from linum usitatissimum L seeds oil. *Int J Chem Res Dev* 5:01–04. <https://doi.org/10.33545/26646552.2022.v4.i2b.40>
- [3] Singh KK, Mridula D, Rehal J, Barnwal P (2011) Flaxseed: A potential source of food, feed and fiber. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51:210–222
- [4] BAA, . OOA (2008) The Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of Leaf Extracts of Eucalyptus camaldulensis and Eucalyptus torelliana (Myrtaceae). *Res. J. Med. Plant* 2:34–38
- [5] Pashazanousi M., Khalizade MA, Hejazy SM, Dolphian S (2013) Measurement of Eucalyptus essential oil compounds with gas chromatography technique connected to mass spectrometer (GC/MS). *J Quantum Chem Spectrosc [Persian]* 2:33–38
- [6] Rahmani H, Aghjehgheshlagh FM, Navidshad B, et al (2019) A review on the eucalyptus herb and its effect on livestock and poultry nutrition. In: 2nd international & 6th national conference on organic va. conventional agriculture,. City Ardabil, pp 1–9
- [7] Dhakad AK, Pandey V V, Rawat JM (2018) Biological, medicinal and toxicological significance of. *J Sci Food Agri* 98:833–848
- [8] Antunes MD, da Silva Dannenberg G, Fiorentini ÂM, et al (2017) Antimicrobial electrospun ultrafine fibers from zein containing eucalyptus essential oil/cyclodextrin inclusion complex. *Int J Biol Macromol* 104:874–882.

- <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.095>
- [9] Hosseini F, Miri MA, Najafi M, et al (2021) Encapsulation of rosemary essential oil in zein by electrospinning technique. *J Food Sci* 86:4070–4086. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15876>
- [10] Miri MA, Ghorani B, Miri HR (2019) Electroencapsulation: Fundamentals and applications in food industry. *JFST* 16:1–21
- [11] Ghasemi M, Miri MA, Najafi MA, et al (2022) Encapsulation of Cumin essential oil in zein electrospun fibers: Characterization and antibacterial effect. *J Food Meas Charact* 16:1613–1624. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01268-z>
- [12] Bumedi F, Aran M, Miri MA, Seyedabadi E (2023) Preparation and characterization of zein electrospun fibers loaded with savory essential oil for fruit preservation. *Ind Crop Prod* 203:. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117121> Received
- [13] Miri MA, Movaffagh J, Najafi MBH, et al (2016) Optimization of electrospinning process of zein using central composite design. *Fibers Polym* 17:769–777. <https://doi.org/10.1007/s12221-016-6064-0>
- [14] Movaffagh J, Amiri N, Ebrahimi S, et al (2018) Electrospun zein nanofibers as nanocarrier of vancomycin: Characterization, release and antibacterial properties. *JFST* 15:199–212
- [15] Brahatheeswaran D, Mathew A, Aswathy RG, et al (2012) Hybrid fluorescent curcumin loaded zein electrospun nanofibrous scaffold for biomedical applications. *Biomed Mater* 7:. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/7/4/045001>
- [16] Iranmanesh S, Aran M, Miri MA, Pirnia M (2022) Preparation and Characterization of Zein Electrospun Fibers for Nano Encapsulation of Ajowan (*Trachyspermum copticum* L.) Essential Oil. *J Essent Oil-Bearing Plants* 25:219–233. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2022.2068970>
- [17] Teilaghi S, Movaffagh J, Bayat Z (2020) Preparation as Well as Evaluation of the Nanofiber Membrane Loaded with Nigella sativa Extract Using the Electrospinning Method. *J Polym Environ* 28:1614–1625. <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01700-3>
- [18] Huang W, Zou T, Li S, et al (2013) Drug-loaded zein nanofibers prepared using a modified coaxial electrospinning process. *AAPS PharmSciTech* 14:675–681. <https://doi.org/10.1208/s12249-013-9953-1>
- [19] Vahedikia N, Garavand F, Tajeddin B, et al (2019) Biodegradable zein film composites reinforced with chitosan nanoparticles and cinnamon essential oil: Physical, mechanical, structural and antimicrobial attributes. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 177:25–32. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.01.045>
- [20] Afshar N, Shekarchizadeh H, Kadivar M, Fathi M (2018) Preparation and Evaluation of Bitter Vetch Protein /Chitosan Composite Nanofibers by Electrospinning and its Use to Encapsulate Peppermint Essential Oil
- [21] Roshanghias A, Sodeifian G, Javidparvar AA, Tarashi S (2022) Construction of a novel polytetrafluoroethylene-based sealant paste: The effect of polyvinyl butyral (PVB) and nano-alumina on the sealing performance and construction formulations. *Results Eng* 14:100460. <https://doi.org/10.1016/J.RINENG.2022.100460>
- [22] Javidparvar AA, Naderi R, Ramezanzadeh B (2019) Epoxy-polyamide nanocomposite coating with graphene oxide as cerium nanocontainer generating effective dual active/barrier corrosion protection. *Compos Part B Eng* 172:. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2019.05.055>
- [23] De Figueredo GP, De Carvalho AFM, De Araújo Medeiros RLB, et al (2017) Synthesis of MgAl₂O₄ by Gelatin Method: Effect of Temperature and Time of Calcination in Crystalline Structure. *Mater Res* 20:254–259. <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2017-0105>
- [24] Akbarzadeh S, Ramezanzadeh M, Ramezanzadeh B, Bahlakeh G (2020) A green assisted route for the fabrication of a high-efficiency self-healing anti-corrosion coating through graphene oxide nanoplateform reduction by Tamarindus indica extract. *J*

- Hazard Mater 390:122147.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122147>
- [25] Keykhasalar R, Homayouni Tabrizi M, Ardalan P (2020) Antioxidant Property and Bactericidal Activity of *Linum usitatissimum* Seed Essential Oil Nanoemulsion (LSEO-NE) on *Staphylococcus aureus*. *Int J Infect* 7:.. <https://doi.org/10.5812/iji.101639>
- [26] Sangiorgio P, Errico S, Verardi A, et al (2023) Bioactive Lignans from Flaxseed: Biological Properties and Patented Recovery Technologies. *Nutraceuticals* 3:58–74
- [27] Mohimani B, Safaeian S, MousaviNadoshan R, et al (2023) Evaluation of qualitative and microbial properties of cocoa cream containing microencapsulated linseed oil (Production of functional chocolate ganache). *J Food Sci Technol* 19:187–198.



Encapsulation of flaxseed oil and eucalyptus essential oil using electrospinning

Sara Daneshmand¹, Mohammad Amin Miri^{2*}, Fatemeh Noora³

1- Assistant Professor, Department of pharmaceuticals, School of pharmacy, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran.

2- Department of Food Science and Technology, University of Zabol, Zabol, Iran; Electrospinning Laboratory, University of Zabol, Zabol, Iran.

3- M.Sc. student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.

ABSTRACT

ARTICLE INFO

The use of medicinal plants in food has a long history. Flaxseed oil and eucalyptus essential oil are highly regarded due to their biological properties. In this research, the aim is to investigate the antimicrobial properties of zein nanofibers containing flaxseed oil and eucalyptus essential oil to control *staphylococcus aureus* and *escherichia coli* bacteria in a laboratory environment. For this purpose, flaxseed oil mixed with eucalyptus essential oil in zein solution. Then, it was converted into nanofibers using an electrospinning machine. In order to study the characteristics and antimicrobial properties of the nanofibers, tests including scanning electron microscopy (SEM), fiber diameter determination with Image J software, atomic force microscopy (AFM), X-ray diffraction (XRD), thermal gravimetric analysis (TGA) were performed. Investigation of antimicrobial properties of produced nanofibers by disk diffusion method were performed. The SEM results showed that the morphology of the electrospun fibers was uniform and free of beads. AFM images represented three-dimensional and tubular images of fibers obtained from electrospinning zein/flaxseed oil/eucalyptus essential oil. The X-ray diffraction pattern showed an increase in the crystallinity intensity of the treatments compared to the control sample. Based on thermal analysis results, eucalyptus and flaxseed oil increased the thermal stability of zein nanofibers. The results showed that the addition of flaxseed oil to eucalyptus essential oil strengthened the antimicrobial properties of nanofibers. According to the results of the present research, the zein/flaxseed oil/eucalyptus essential oil fibers can be used as natural antimicrobials.

Article History:

Received: 2023/9/17
Accepted: 2023/10/19

Keywords:

Encapsulation,
electrospinning,
flaxseed oil,
eucalyptus essential oil,
antimicrobial

DOI: 10.22034/FSCT.20.145.170

*Corresponding Author E-Mail:
ma.miri@uoz.ac.ir