Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Food Processing and Preservation Journal

Print ISSN: 2423-3544
Online ISSN: 2423-3803

Iranian Association of Food Scientists and Technologists

Production and Evaluation of Natural Antioxidant and Antibacterial Microemulsion with Frankincense, Garlic, and Nigella Essential Oi

Soheila Molaie[1], Behnaz Memar Maher[2*], Navideh Anarjan[3], Hamed Hamishehkar[4]

[1] Ph.D. student, Department of Chemical Engineering, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Chemical Engineering, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran, Email: maher@iau-ahar.ac.ir
[3] Assistant Professor, Department of Engineering, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
[4] Associate Professor, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received: 2024-03-18
Revised: 2024-08-20
Accepted: 2024-09-04

Keywords:
Essential oil
Microemulsion
Nigella
Antioxidant
Antibacterial

ABSTRACT

Background and objectives: Plant essential oils, known for their strong antimicrobial properties, are utilized as antioxidants and natural preservatives in the food industry. Essential oils from frankincense, garlic, and nigella are particularly suitable for use as antioxidants due to their beneficial properties. However, their effectiveness is often limited by their high volatility and poor solubility, which can impede their use, a challenge common to many essential oils. To address these issues, recent advancements have focused on encapsulating essential oils in microemulsion and nanoparticles to prevent evaporation and degradation. Microemulsions offer a promising solution by enhancing the chemical stability of essential oils, protecting them from air, light, moisture, high temperature, and other factors that could lead to rapid evaporation and degradation. Compared to nanoemulsion, microemulsions are more thermodynamically stable, featuring very small particles with low surface tension. They are stable for a long time and formed spontaneously. One of the special properties of microemulsions is their particle size, which falls within the micrometer or nanometer range. Achieving stable microemulsions from the essential oil of frankincense and studying their physico-chemical and antibacterial characteristics against the pathogenic bacteria Escherichia coli and Staphylococcus aureus are the objectives of this study.

Materials and methods: Thus, in this study, the frankincense, garlic, and nigella essentials oil, both alone and in equal weight percent mixtures were successfully placed in microemulsion systems through low energy spontaneity technique. By carrying preliminary screening tests out. Garlic and Nigella essential oils were chosen and their synergistic properties with Frankincense essential oil were analyzed at a nanoscale. For this purpose, different microemulsions with oily phases of pure essential oils of Frankincense, Garlic, and Nigella and their combination with equal combination percentages were prepared.

Results: As part of this research, a microemulsion system was developed consisting of two oil phases including frankincense, garlic,

and nigella essentials oil. During the study on the antibacterial effect of samples, the minimum concentration of growth inhibition against the Staphylococcus aureus method was determined. Microbial and turbidity results manifested that reduced particle size of essential oil in the nanoemulsion range can increase their antibacterial and antioxidant properties in the case of using microemulsion systems. Also, Results showed that a combination of these essential oils had more microbial and antioxidant effects than one kind of essential oil (with equal amounts). It also became clear that all of the independent parameters studied have a significant effect on frankincense essential oil microemulsions. Due to the inclusion in microemulsions, the antibacterial activity of the essential oil is also significantly increased. In analyzing the antibacterial effect of the samples employing the method of determining the minimum concentration of growth inhibition against Staphylococcus aureus, the synergistic effect of the essential oils has increased about 1.6 times or 160 percent and it is a very surprising achievement. The combination of essential oils had a higher inhibitory effect in comparison with the rest of the samples confirming the synergistic effect of the used essential oils

Conclusion: It is possible to create nanoparticles of frankincense, garlic, and nigella essential oil nanoparticles with the smallest particle sizes, good appearance, and high antioxidant and antibacterial properties through formulation and fixing processing parameters synthesized. These nanoparticles can be used in various food and beverage applications.

Cite this article: Molaie, S., Memar Maher, B., Anarjan, N., Hamishehkar, H. 2024. Production and Evaluation of Natural Antioxidant and Antibacterial Microemulsion with Frankincense, Garlic, and Nigella Essential Oi. *Food Processing and Preservation Journal*, 16 (2), 67-86.

© The Author(s). DOI: 10.22069/fppj.2024.22300.1805
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

فرآوری و نگهداری مواد غذایی
شاپا چاپی: ۳۵۴۴-۲۴۲۳
شاپا الکترونیکی: ۳۸۰۳-۲۴۲۳

تولید و ارزیابی میکروامولسیون‌های ضداکسیدان و ضد باکتری طبیعی ترکیبی از اسانس‌های کندر، سیر و سیاهدانه

سهیلا مولایی[۱]، بهناز معمارماهر[۲*]، نویده انرجان[۳]، حامد همیشه کار[۴]

[۱] دانشجوی دکتری، گروه مهندسی شیمی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران
[۲] استادیار، گروه مهندسی شیمی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران، رایانامه: b_maher@iau-ahar.ac.ir
[۳] استادیار، گروه مهندسی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
[۴] دانشیار، مرکز تحقیقات کاربردی علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی-پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۸
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۰۵/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۱۴

واژه‌های کلیدی:
اسانس
میکرو امولسیون
کندر
آنتی‌اکسیدان
آنتی باکتری

چکیده

سوابق و هدف: اسانس‌های روغنی گیاهان که دارای خاصیت ضدمیکروبی بالایی هستند به عنوان آنتی‌اکسیدان و ماده نگهدارنده طبیعی در صنایع غذایی استفاده می‌شوند. با توجه به خواص اسانس‌های کندر، سیاهدانه و سیر کاندیدای مناسب جهت استفاده به عنوان آنتی‌اکسیدان می‌باشند. متأسفانه مانند سایر اسانس‌ها، فراریت بالا و حلالیت نامطلوب اسانس کندر نیز باعث کاهش کارایی آن‌ها می‌شود و کاربرد آن‌ها را مختل می‌کند. به همین دلیل در سال‌های اخیر برای جلوگیری از تبخیر و تخریب شدن اسانس‌ها، آن‌ها را در میکرو و نانو ذرات فرموله می‌کنند. میکرو امولسیون‌ها یک جایگزین خوب برای حل کردن مشکلات عمده و ترکیب اسانس‌ها در محصولات غذایی با استفاده از افزایش پایداری شیمیایی در حضور هوا، نور، رطوبت و درجه حرارت بالا و عواملی که می‌تواند به تبخیر سریع و به تخریب اجزای فعال منجر شود، هستند. میکرو امولسیون‌ها از لحاظ ترمودینامیکی پایدار می‌باشند که مزیت این سیستم‌ها نسبت به نانو امولسیون‌ها می‌باشد. همچنین میکرو امولسیون‌ها دارای ذراتی با اندازه‌ی بسیار کوچک هستند، کشش سطحی پایین دارند، مدت زمان طولانی پایدارند و به طور خود به خودی تشکیل می‌شوند. یکی از خواص ویژه‌ی میکرو امولسیون‌ها اندازه ذرات آن‌هاست که در حد مقیاس میکرومتری است. هدف از کار حاضر تولید میکرو امولسیون‌های پایدار از اسانس کندر و بررسی خواص فیزیکی-شیمیایی و آنتی باکتریال آن‌ها در برابر باکتری‌های عفونت زا *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* است.

مواد و روش‌ها: بنابراین در این تحقیق اسانس کندر، سیر و سیاهدانه به‌تنهایی و به‌صورت ترکیبی با اسانس سیر و سیاهدانه (با ترکیب درصدهای برابر) با موفقیت از طریق تکنیک خودبه‌خودی کم انرژی در سیستم‌های میکرو امولسیون گنجانیده شد. با انجام آزمایش‌های اولیه غربالی دو اسانس سیر و سیاهدانه انتخاب شده و خواص هم‌افزایی آن‌ها در مقیاس نانو با اسانس کندر مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور میکرو امولسیون‌های مختلف با فازهای روغنی متشکله از اسانس خالص کندر، سیر و سیاهدانه و هم‌چنین ترکیب آن‌ها با ترکیب

درصدهای برابر تهیه گردید.

یافته‌ها: به عنوان بخشی از این پژوهش، یک سیستم میکرو امولسیون توسعه یافت که شامل دو فاز روغنی شامل کندر، سیر و سیاهدانه بود. طی بررسی اثر ضد باکتریایی نمونه‌ها، حداقل غلظت بازدارندگی رشد در برابر روش *استافیلوکوکوس اورئوس* تعیین شد. نتایج میکروبی و کدورت نشان داد که کاهش اندازه ذرات اسانس در محدوده نانو امولسیون می‌تواند خواص ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی آن‌هارا با استفاده از سیستم‌های میکرو امولسیونی افزایش دهد. نتایج نشان داد که مخلوط این اسانس‌ها، اثر ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی بیش‌تری در مقایسه با یک نوع اسانس (با مقادیر برابر) دارد. همچنین نتایج نشان داد که تمام پارامترهای مستقل مورد مطالعه به‌طور معناداری تأثیر بالایی بر روی میکرو مول سی ون‌های اسانس کندر دارد. فعالیت ضد باکتریایی اسانس نیز به دلیل درون‌گیری در میکرو امولسیون‌ها به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. در بررسی اثر ضد باکتریایی نمونه‌ها به روش تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، اثر هم‌افزایی اسانس‌ها حدود ۱/۶ برابر یا ۱۶۰ درصد افزایش یافته است. که نتیجه بسیار شگفت‌انگیزی می‌باشد. مخلوط اسانس‌ها دارای اثر مهارکنندگی بالاتری نسبت به بقیه نمونه‌ها داشت که موید اثر هم‌افزایی اسانس‌های استفاده شده می‌باشد.

نتیجه‌گیری: بنابراین می‌توان، نانو ذرات اسانس کندر، سیر و سیاهدانه را با کوچک‌ترین اندازه ذرات، ظاهر مطلوب و خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی بالا از طریق فرمولاسیون و تثبیت پارامترهای فرآوری امکان‌پذیر است. از این نانو ذرات می‌توان در مصارف مختلف غذایی و نوشیدنی استفاده کرد.

استناد: مولایی، سهیلا؛ معمارماهر، بهناز؛ انرجان، نویده؛ همیشه کار، حامد. (۱۴۰۳). تولید و ارزیابی میکروامولسیون‌های ضداکسیدان و ضد باکتری طبیعی ترکیبی از اسانس‌های کندر، سیر و سیاهدانه. *فرآوری و نگهداری مواد غذایی*، ۱۶ (۲)، ۸۶-۶۷.

DOI: 10.22069/fppj.2024.22300.1805

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان © نویسندگان.

مقدمه

مصرف گیاهان دارویی در کشورهای مختلف روزبه‌روز در حال افزایش است و این به دلیل به اثبات رسیدن اثربخشی بسیاری از این مواد در مجامع علمی و مقبولیت آن در اکثر جوامع بشری است. به‌دلیل نگرانی روزافزون در مورد عوارض داروهای شیمیایی و بی‌اثر بودن تعدادی از آن‌ها در مصرف طولانی مدت، استفاده از ترکیبات طبیعی به‌صورت جایگزین یا مکمل درمان، بیش‌ازپیش مورد توجه قرار گرفته است. استفاده انسان از گیاهان به‌عنوان دارو از ابتدای تمدن بشری تاکنون ادامه دارد (۱، ۲). داروهای گیاهی به‌عنوان درمان جایگزین با عوارض کمتر و خواص متعدد و در برخی موارد به عنوان تنها درمان مؤثر مورد استفاده قرارمی‌گیرند (۳-۸).

اسانس ها ترکیبات آلی پیچیده با انواع مختلفی از ساختارهای آلی و همچنین ترکیبات فراری می باشند که توسط گیاهان معطر به متابولیت های ثانویه سنتز شده‌اند (۹-۱۱). اسانس‌ها به‌دلیل فعالیت بیولوژیکی مختلف خود، توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند (۱۲). اسانس‌ها در طب سنتی و همچنین در مقالات علمی متعدد به دلیل فعالیت بیوشیمیایی (ضدباکتری، ضد ویروسی و ضد قارچی) و خواص آنتی اکسیدانی به عنوان محصولات سالم پیشنهاد شده اند (۱۳، ۱۴). این ترکیبات اخیراً به علت اثر ممانعت کنندگی و کشندگی میکروارگانیسم‌های پاتوژن مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۵). اسانس‌ها که ترکیبات طبیعی تولید شده توسط گیاهان می‌باشند به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی و ضدمیکروبی کاربرد گسترده‌ای به‌عنوان مواد تشکیل دهنده در مواد غذایی، آرایشی و بهداشتی دارند (۱۶، ۱۷). اسانس‌ها بسیار آب‌گریز، محلول در الکل، حلال‌های غیر قطبی و کمی قطبی، واکس‌ها، روغن‌ها و به‌اندازه خیلی کمی در آب هستند. به خاطر ساختار مولکولی‌شان (پیوندهای دوگانه، گروه‌های کاربردی مانند هیدروکسیل، آلدهید، استر و...) به‌راحتی توسط نور، گرما و هوا اکسیده می‌شوند. باوجود این که اسانس‌ها ترکیبات طبیعی و ایمن هستند اما به‌دلیل ماهیت هیدروفوبی (آب گریز)، مصرفشان در موادغذایی و نوشیدنی ها محدود شده است. این مشکل به‌سادگی با فرموله کردن اسانس‌ها در سیستم‌های نانو ذرات کلوئیدی قابل حل می باشد (۱۸-۲۳). یکی از اسانس های مهم اسانس گیاه کندر می باشد که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. کندر با نام علمی بوسولیا سراتا[1] کندور یا لبان، یک نوع صمغ[2] رزینی معطر است که به نام‌های فرانکینسنس[3]، گم آلیبانوم[4]، سالایگاگال[5] نیز شناخته می‌شود. جنس بوسولیا متعلق به خانواده بورسراسیا[6] از راسته ی افراها است (۲۳، ۲۴). اسانس کندر دارای خواص متعددی از جمله قدرت سرطانی (۲۵)، کاهش ورم مفاصل، ضد درد، ضدالتهاب (۲۶، ۲۷)، ضدآسم (۲۸)، درمان اسهال (۲۹)، کاهش کلسترول و افزایش لیپوپروتئین با چگالی بالا[7] (۳۰، ۳۱)، ضد زخم گوارشی (۳۲)، کاهش قند خون (۳۳)، محافظت در برابر آسیب‌های کبدی (۳۴)، افزایش قدرت حافظه و یادگیری و کاهش پیشرفت آلزایمر (۳۵، ۳۶) می‌باشد. مهم‌ترین خاصیت اسانس کندر مهار معنی‌دار رشد در باکتری‌های گرم مثبت و منفی از جمله مهار رشد استافیلوکوک اورئوس، اشرشیاکولی[8] و پروتئوس

1. Boswellia serrata
2. Gum
3. Frankincense
4. Gumolibanum
5. Salaigaggal
6. Burseraceae
7. High-density lipoprotein (HDL)
8. Escherchia coli

میرابیلیس[1] است (۳۷). فعالیت ضدقارچی اسانس کندر نیز بر روی قارچ کاندیدا آلبیکنس[2] در شرایط آزمایشگاهی ثابت شده است (۳۸).

سیر از خانواده زنبق، گیاهی متعلق به خانواده لیلیاسه بوده و بومی آسیای مرکزی می‌باشد هرچند این گیاه امروزه در تمام نقاط دنیا یافت می‌شود. اجزای اصلی اسانس سیر، پلی سولفیدهای آلیل مانند دی آلفل سولفید، دیال دی سولفید، آلیل متیل تری سولفید، دی آلیل تری سولفید، آلیل متیل دی سولفید و... هستند (۳۹، ۴۰). اصلی‌ترین ماده ضد میکروبی موجود در سیر، ترکیب ارگانوسولفوری به نام تیو-۲ پروپن ۱- سولفینیک اسید S- آلیل استر می‌باشد که آلیسین۳ نامیده می‌شود. سیر دارای خواص آنتی‌باکتریایی، آنتی‌ویروسی، آنتی‌قارچی، آنتی‌اکسیدانی و عامل ضدالتهابی است (۴۳-۴۱)..سیر به‌عنوانبه‌عنوانبه‌عنوان یک عامل ضدباکتریایی قوی شناسایی شده و خاصیت ممانعت‌کنندگی آن‌هم بر روی باکتری‌های گرم منفی اشرشیا کلی، گونه‌های پروتئوس، سالمونلا، سراشیا، سیتروباکتر، انتروباکتر، پورفیرومونـاس جینجیوالیس، سودوموناس، کلبسیلا و هلیکوباکتر پیلوری (و هم برعلیه باکتری‌های گرم مثبت) استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس موتانس، استرپتوکوکوس پنومونیه، استرپتوکوکوس سانگوئیس، استرپتوکوک‌های گروه نتراسیس) به اثبات رسیده است (۴۱).

گیاه سیاهدانه از خانواده رانونکولاسه[4] و بومی اروپای جنوبی، آفریقای شمالی و آسیا است. اصلی‌ترین ترکیب آن سیامن[5] است و تقریباً ۶۱/۴۸ درصد از وزن روغن فرار آن را تشکیل می‌دهد (۴۴). اثرات ضداکسایشی، ضدالتهابی، تقویت‌کننده سیستم ایمنی و آنتی هیستامینی روغن و عصاره دانه گیاه سیاه‌دانه باعث شده است اثرات فارماکولوژیک متعددی مانند کاهش قند، چربی و فشارخون بالا، دفع کننده صفرا و اسیداوریک، محافظ بافت‌های کبد، کلیه و قلب و عروق و همچنین اثرات ضد میکروب و ضد انگل از این گیاه گزارش شود (۴۵). تأثیر روغن سیاهدانه علیه میکروارگانیسم‌های اشرشیاکولی و کاندیدا آلبیکنس، استافیلوکوک اورئوس و ماده دی تیموکنیون موجود در روغن فرار گیاه سیاهدانه برعلیه باکتری‌های گرم مثبت گزارش شده است (۴۶).

متأسفانه مانند سایر اسانس‌ها، فراریت بالا و حلالیت نامطلوب، پایداری شیمیایی ضعیف اسانس کندر سبب استفاده محدود از اسانس‌های گیاهی در پزشکی شده است. به همین دلیل در سال‌های اخیر برای جلوگیری از تبخیر و تخریب شدن اسانس‌ها، آن‌ها را در میکرو و نانو ذرات فرموله می‌کنند (۴۷، ۴۸). بنابراین بهتر است قبل از استفاده به‌منظوربه‌منظوربه‌منظور بهبود بهره‌وری و پایداری و کارایی آن‌هااسانس‌ها را درون سیستم‌های تحویل کپسوله کنند. در حال حاضر در میان سیستم‌های تحویل میکرو امولسیون‌ها به دلیل سهولت آماده‌سازی و ویژگی‌های عملکردی مطلوب، به‌ویژه در محصولات غذایی برای سیستم‌های حامل ترکیبات فعال زیستی استفاده می‌شوند(۴۹).

اخیراً فرمولاسیون میکرو امولسیون‌ها به دلیل پتانسیل آن‌ها در برنامه‌های کاربردی از جمله صنایع‌غذایی، دارویی و بهداشتی توجه زیادی را به خود جلب کرده است. میکرو امولسیون‌ها دارای پراکندگی فوق‌العاده روغن در آب هستند که حاوی قطرات ریز نانومتری می‌باشند (۵۰).

1. Proteus mirabilis
2. Candida albinacs
3. Allicin
4. Ranunculaceae
5. P-cymen

برخلاف سیستم‌های نانو امولسیون، میکرو امولسیون‌ها از نظر ترمودینامیکی پایدار هستند که به سادگی توسط اختلاط دو مایع غیرقابل امتزاج به‌وسیله امولسیفایر تولید می‌شوند (۵۱).

کوچک بودن ابعاد قطرات میکرو امولسیون‌ها، فعالیت بیولوژیکی ترکیبات فعال شده در داخل آن‌ها را افزایش می‌دهد. ترکیبات میکرو امولسیون زیست فعال[1]، حلالیت در آب، خاصیت زیست‌فراهمی[2] و ثبات اسانس‌ها را بهبود می‌بخشد (۵۲). بااین‌حال، سیستم تحویل‌های نانو معمولاً تکنیک‌های انرژی بالا هستند و برای ایجاد پایداری به ترکیبات مختلفی نیاز دارند. تاکنون، اسانس کندر به‌صورتبه‌صورت جداگانه نانو کپسول نشده است و خصوصیات آن ارزیابی نشده است. هدف از کار حاضر تولید میکرو امولسیون‌های پایدار از اسانس کندر و بررسی خواص فیزیکی-شیمیایی و آنتی باکتریال آن‌ها در برابر باکتری‌های عفونت‌زا اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس است.

مواد و روش‌ها

مواد: اسانس کندر و سیاهدانه (اسانس ۱۰۰٪) از شرکت ناجیان (NG، تبریز، ایران) تهیه شدند. اسانس سیر از طرف شرکت ماگنولیا (ساوه، ایران) اهدا گردید. ۲،۲-دی فنیل-۱ پیکریل هیدرازیل[3]، سورفاکتانت‌های غیریونی توین ۸۰ (HLB =۱۵) و گلیسرول (HLB=۴/۵) از شرکت مرک (در مشتات[4]، آلمان) خریداری شدند. آب مقطر دو بار تقطیر توسط شرکت دکتر مجللی تأمین شد (تهران، ایران). اشرشیا کلی (E oli، PTCC ۱۲۷۶) و استافیلوکوکوس اورئوس (S ureus، PTCC ۱۴۳۱) توسط مجموعه فرهنگ نوع فارسی میکروبی (PTCC، تهران، ایران) به‌دست آمد. محیط مولر هینتون براث[5] (MHB) از شرکت بیولف (میلان، ایتالیا) خریداری شد.

روش‌ها

فرمولاسیون میکرومولسیون‌ها: به منظور آماده‌سازی میکرو امولسیون‌های اسانس کندر، سیر و سیاهدانه و مخلوط آنها، ابتدا سورفکتانت۶ (توئین ۸۰) با کوسورفکتانت (گلیسرول) مخلوط شد و با همزن مغناطیسی (IKA Plate، RCT digital، Deutschland، آلمان) به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت چرخش ۵۰۰ دور بر دقیقه هم زده شد. سپس اسانس کندر، سیر یا سیاهدانه و یا مخلوط اسانس‌ها با ترکیب درصد برابر از تمام اسانس‌ها به مخلوط گلیسرول-توئین ۸۰ اضافه شد (با نسبت ۲: ۵:۱ درصد وزنی:وزنی:وزنی از اسانس:سورفکتانت:کوسورفکتانت) و به مدت ۱۵ دقیقه دیگر هم هم زده شد. این مخلوط با حجم مشخصی از آب مقطر به صورت قطره‌ای، به کمک همزن مغناطیسی داخل مخلوط و تحت حمام آب تا زمانی که یک ظاهر شفاف همگن پدیدار شود، تیتر شد. این مخلوط بعد از گذشت ۱ روز از تعادل در دمای اتاق، از سیستم های شفاف به سیستم‌های کاملاً شفاف تبدیل شد (۵۳).

روش آزمایش

میانگین اندازه ذرات و توزیع اندازه: برای اندازه‌گیری اندازه و توزیع اندازه ذرات از دستگاه پراش نور دینامیکی[7] (DLS) استفاده شد. اندازه‌گیری‌ها بر روی نمونه ها در این دستگاه (Microtrac ،۰/۳ nm –۱۰μm، ساخت ژاپن). پس

1. Bioactive compounds
2. Bioavailability
3. (DPPH)
4. Darmstadt
5. Muller-Hinton agar
6. Surfactant
7. Dynamic light scattering

از تهیه و نگهداری آن‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب انجام شد. اندازه‌گیری برای هر نمونه، سه بار انجام شده و نتیجه تحت عنوان قطر هیدرودینامیکی نمونه‌ها (deiameter z-average mean) و توزیع اندازه ذرات (PDI)، با محاسبه میانگین این سه بار سنجش، گزارش گردید (۵۴). ویسکوزیته و کشش سطحی به‌عنوان نتایج جانبی از این دستگاه به‌دست آمد.

اندازه‌گیری کدورت: میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول‌موجطول‌موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر UV-visable (مدل ۲۰۰۰ Ultraspec، ساخت انگلیس)، برای هر نمونه در سه تکرار اندازه‌گیری شده و میانگین به‌عنوان کدورت نمونه‌ها ثبت گردید (۵۵).

اندازه‌گیری خواص آنتی‌اکسیدانی براساس مهار رادیکال DPPH: به‌منظور اندازه‌گیری خواص آنتی اکسیدانی نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر، محلول ۰/۱ میلی‌مولار DPPH، با حل کردن ۳/۹ میلی‌گرم DPPH در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول تهیه شد. محلول برای تکمیل واکنش به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگه‌داشته شد. سپس ۲ میلی‌لیتر از نمونه (۱۰۰ درصد وزنی) با ۲ میلی‌لیتر از محلول DPPH متانولی مخلوط گردید (حجمی/ حجمی ۵۰٪)، این محلول به‌شدت تکان داده شده و در تاریکی به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل ۲۰۰۰ Ultraspec، ساخت انگلیس) در برابر متانول به عنوان نمونه شاهد قرائت شد (۵۶). جهت محاسبه درصد بازدارندگی رادیکال از رابطه‌ی ۱ استفاده شد. به‌این‌ترتیب که جذب blank، جذب محلول DPPH قبل از واکنش می‌باشد و جذب Sample، جذب پس از واکنش می‌باشد (۵۷).

رابطه ۱

$$\text{خواص بازدارندگی رادیکال} = \frac{\text{جذب}_{blank} - \text{جذب}_{Sample}}{\text{جذب}_{blank}} \times 100$$

آنالیز ضد باکتری: حداقل غلظت مهاری (MIC[1]) اسانس و میکرو امولسیون (بهترین نمونه، نمونه شماره ۲) در برابر یک باکتری گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس – ATCC 33591) و یک باکتری گرم منفی (اشرشیا کولی – ATCC 11775) با استفاده از محیط کشت آگار مورد بررسی قرار گرفت. مقدار زیادی از نمونه‌ها به‌ترتیب در یک صفحه[2] ۹۶ چاهک حاوی محیط MHB[3] رقیق شدند تا غلظت‌های مختلفی برای اسانس خالص یا امولسیون تولید شود. غلظت نهایی هر سویه باکتری‌ها با کدورت نیم مک (۱/۵×۱۰۸ باکتری در هر میلی‌لیتر) رقت ۰/۰۱ تنظیم شد. برای ارزیابی MIC برای اسانس خالص، محلول تویین ۸۰ با غلظت مشابه میکرومولسیون به محیط اضافه شد. صفحات به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و حداقل غلظت اسانس که هیچ رشد میکروبی در صفحه نداشتند به عنوان MIC ثبت شد. ۱۰۰ میکرو لیتر محلول از صفحات دارای رشد میکروبی روی MHB پوشانده شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد تا حداقل غلظت ضد باکتری (MBC) به‌دست آید. MBC حداقل غلظتی است که می‌تواند تمام سلول‌های باکتریایی را از بین ببرد (۵۸).

تحلیل آماری

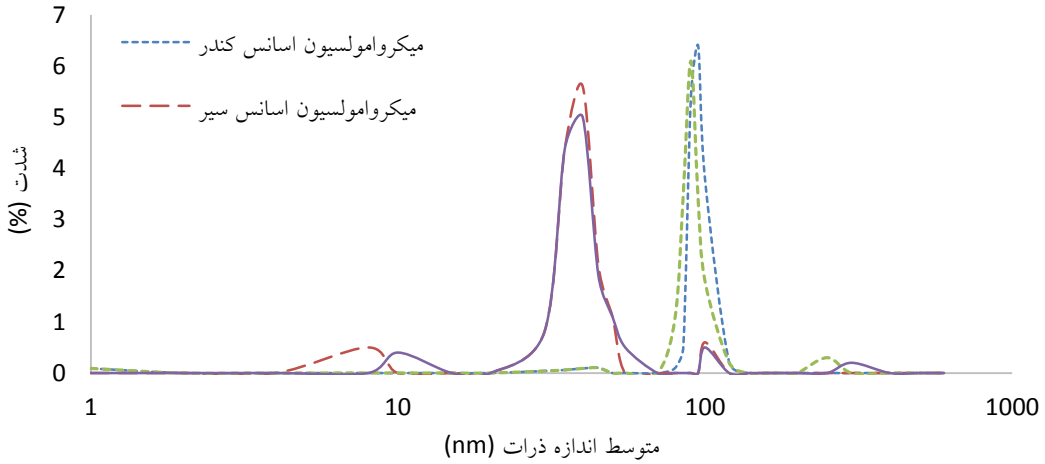
همه سنجش ها حداقل در سه تکرار روی نمونه‌های تهیه شده، انجام شده و نتایج به عنوان میانگین± انحراف معیار (SD) گزارش شدند.

1. Minimum inihibitory concent
2. Plate
3. Muller-Hinton Agar

تجزیه و تحلیل داده‌های واریانس یک‌طرفه (ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار Minitab۱۷ با سطح معنی‌داری در p<۰/۰۵ انجام شد.

نتایج و بحث

بررسی اندازه ذرات میکرو امولسیون‌ها: توزیع اندازه ذرات میکرو امولسیون‌های اسانس‌های تهیه شده در شکل ۱ و میانگین اندازه ذرات، ویسکوزیته و کشش سطحی اسانس‌های خالص نیز در جدول ۱ نشان داده شده است. همان‌طوری که از این جدول قابل مشاهده است، میکرو امولسیون‌های تهیه شده همگی دارای فاز پراکنده میسلی نانو ساختار میانگین اندازه ذرات کمتر از ۱۰۰ نانومتر می‌باشند.



شکل ۱- توزیع اندازه ذرات میکروامولسیون‌های اسانس‌های کندر، سیر و سیاهدانه و ترکیب آن‌ها (با درصد برابر وزنی).

Figure 1- Comparison of particle size distribution in microemulsions of frankincense, garlic, and nigella essential oils, both individually and in equal weight percent mixtures..

جدول ۱- ویسکوزیته، کشش سطحی و میانگین اندازه ذرات میکروامولسیون اسانس‌های کندر، سیر و سیاهدانه و ترکیب آن‌ها (با درصد برابر وزنی).

Table 1. Comparison of viscosity, surface tension, and average particle size in microemulsions containing frankincense, garlic, and Nigella essential oil, both individually and in equal weight percent mixtures..

مواد	ویسکوزیته ($\times^{-3}$۱۰) ($N.s/m^2$)	کشش سطحی ($\times^{-3}$۱۰) (N/m^2)	میانگین اندازه ذرات (nm)
کندر	۰/۹۲۲	۲۲/۵۶	۹۸/۱±۵/۳ [a]
سیر	۰/۷۲۳	۱۹/۸۹	۴۴/۹۲±۳/۲ [b]
سیاهدانه	۰/۸۹۳	۲۱/۷۶	۹۵/۶۹±۲/۶ [a]
کندر+ سیر+ سیاهدانه (ترکیب درصدهای برابر)	۰/۸۴۶	۲۱/۴۰	۴۶/۲۸±۸/۶ [b]

a-b حروف متفاوت بیان‌گر اختلاف معنادار در مشخصه مقایسه شده می‌باشد.

اسانس‌های روغنی دارای ویسکوزیته و کشش سطحی کمتر عمدتاً ذرات کوچک‌تری ایجاد می‌کنند. زیرا شکست این ذرات روغنی به اجزای کوچک‌تر در زمان‌های کمتر و با انرژی پایین‌تری انجام می‌گردد (۵۹- ۶۱). علاوه بر این فازهای روغن بسیار آب‌گریز از طریق ایجاد وارونگی فاز مانع تشکیل سیستم کلوئیدی می‌شوند (۵۹، ۶۲). به همین دلایل، اسانس‌های دارای ویسکوزیته و کشش سطحی کمتر و

قطبیت بالاتر منجر به تشکیل میکروامولسیسون‌های با اندازه ذرات کوچک‌تری می‌گردند. با توجه به مقادیر ویسکوزیته و کشش سطحی اسانس‌های خالص و ترکیب آن‌ها (جدول ۱)، و قطبیت اجزای مهم اسانس‌های استفاده شده، این حقیقت در نتایج حاصل از این تحقیق و بررسی اندازه ذرات میکرو امولسیون‌های تهیه شده نیز به اثبات می‌رسد. بر اساس تحقیقات گذشته، نتایج آنالیز کروماتوگرافی گازی، بیش‌ترین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس کندر هیدروکربن‌های ترپنوئیدی و عمدتاً آلفا-پینن می‌باشد (۶۳). اسانس سیر عمدتاً از دی آلیل تری سولفید و آلیسین تشکیل شده و ترانس – آنتول مهم‌ترین ترکیب شیمیایی اسانس سیاهدانه می‌باشد (۶۴، ۶۵).

تحقیقات قبلی نشان داده که یکی از پارامترهای مهم در اندازه ذرات میکرو امولسیون‌ها ماهیت فاز روغنی آن‌هامی‌باشد. به‌عنوان مثال، هرچه فاز روغنی آب‌گریزتر باشد، میکرو امولسیون‌هایی با اندازه ذرات بزرگ‌تر تولیدمی‌کند یا هرچه فاز روغنی دارای ساختار فضایی پیچیده تر باشد، نانو ذرات آن‌ها بزرگ‌تر است زیرا امکان آرایش مناسب و محاط کردن سورفکتانت‌ها و کوسورفکتانت‌ها در اطراف مولکول‌های روغن سخت‌تر می‌گردد(۶۱). با توجه به این که قطبیت اجزای مهم تشکیل‌دهنده اسانس‌ها به‌صورت آلیسین> دی آلیل تری سولفید> ترانس آنتول> آلفا پینن می‌باشد (۶۲)، لذا اندازه ذرات کوچک‌تر اسانس سیر خالص و اندازه بزرگ‌تر اسانس‌های کندر و سیاهدانه خالص قابل توجیه می‌باشد. ساختار فضایی پیچیده آلفا-پینن در اسانس کندر و همچنین حلقه بنزنی موجود در ترانس- آنتول نیز می‌تواند از دلایل اندازه ذرات بزرگ‌تر دو اسانس کندر و سیاهدانه باشد (۶۳، ۶۴). درحالی‌که اندازه ذرات اسانس‌های خالص با توجه به تحقیقات قبلی تا حدودی قابل پیش‌بینی بود، اندازه کوچک میکرو امولسیون‌های تولید شده با فاز روغنی مختلط (سه‌تایی کندر-سیر-سیاهدانه) بسیار تعجب برانگیز بود. به نظر می‌رسد که ترکیبات فعال سه اسانس استفاده شده قادر به ایجاد یک‌سری پیوندهای فیزیکی با هم بوده‌اند به‌طوری در هم‌تنیدگی در مولکول‌های آن‌ها اتفاق افتاده و منجر به تشکیل یک اجتماع با اندازه کوچک‌تر و ساختار فشرده‌تر شده‌اند. این در هم تنیدگی می‌تواند بین مولکول‌های اسانس‌های استفاده شده به‌صورت دوتایی، سه تایی یا بیشتر رخ داده باشد (۶۲). لذا فاز روغنی میکرو امولسیون‌های مخلوط اسانس‌ها کوچک‌تر از اسانس‌های کندر و سیاهدانه به‌صورت خالص بوده است. از طرفی توزیع اندازه ذرات برای میکرو امولسیون‌های مخلوط اسانس‌ها بسیار بیشتر از اسانس های خالص بوده است که این امر می‌تواند به ماهیت روغنی متفاوت نانو ذرات تشکیل شده در این سیستم مربوط باشد. به‌طوری‌که در سیستم‌های میکرو امولسیونی دارای فاز روغنی مخلوط احتمالاً انواع میکرو امولسیون‌ها با فاز روغنی خالص اسانس‌ها، ترکیب دوتایی اسانس‌ها با ترکیب درصدهای مختلف و ترکیب سه تایی اسانس ها با ترکیب درصدهای مختلف که هر کدام نیز اندازه ذرات متفاوتی داشته اند، تشکیل شده است. خواص فیزیکی سیستم‌های کلوئیدی خصوصاً سیستم‌های نانو امولسیون و میکرو امولسیون به خواص فیزیکی-شیمیایی فاز روغنی آن‌ها مانند ویسکوزیته، کشش سطحی، قطبیت، چگالی و ضریب شکست بستگی دارد (۶۲).

بررسی کدورت میکرو امولسیون‌ها: اسانس‌های روغنی دارای ویسکوزیته و کشش سطحی کمتر عمدتاً ذرات کوچک‌تری ایجاد می‌کنند. افزایش اندازه ذرات سیستم نانودیسپرسیون حاصل متعاقباً کدورت سیستم را نیز افزایش داده است. بنابراین کدورت

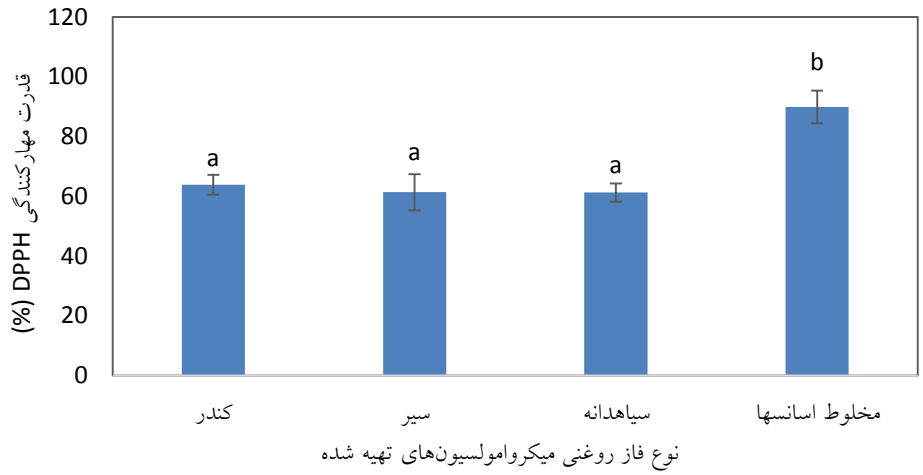
پایین مخلوط اسانس‌ها با توجه به اندازه ذرات کوچکتر آن قابل انتظار بود.

جدول ۲- مقایسه کدورت میکروامولسیون‌های اسانس‌های کندر، سیر و سیاهدانه و ترکیب آنها.

Table 2. Comparison of turbidity levels in microemulsions containing frankincense, garlic, and nigella essential oils, both individually and in equal weight percent mixtures.

مواد	کدورت
کندر	۰/۰۱۴ ±۰/۰۰۷ [a]
سیر	۰/۲۰۳ ±۰/۱۰۱ [c]
سیاهدانه	۰/۵۰۴ ±۰/۰۲۵۴ [d]
کندر+ سیر+ سیاهدانه	۰/۰۸۱ ±۰/۰۰۱ [b]

a-d حروف متفاوت بیان‌گر اختلاف معنادار در مشخصه مقایسه شده می‌باشد.



a-b حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنادار در مشخصه مقایسه شده می‌باشد.

شکل ۲- قدرت مهار کنندگی رادیکال آزاد میکروامولسیون‌های اسانس‌های کندر، سیر و سیاهدانه و ترکیب آن‌ها.

Figure 2. The free radical scavenging effect of microemulsions containing frankincense, garlic, and Nigella essential oil , both individually and in equal weight percent mixtures.

بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی میکرو امولسیون‌ها:

هدف اصلی در استفاده از مخلوط اسانس‌ها در ابعاد مختلف میکرو یا نانو، رسیدن به اثر هم‌افزایی در خواص آنتی اکسیدانی و آنتی باکتریایی آن هامی‌باشد. منظور از هم‌افزایی ترکیب عملکرد چند سیستم می‌باشد به‌طوری‌که اثر آن، از مجموع عملکرد تک‌تک اجزا بیش‌تر باشد. در صورت حصول اثر هم افزایی مثلاً هم افزایی آنتی اکسیدانی، این اثر تقویت شده و محدوده عمل بزرگ‌تری نسبت به رادیکال‌های مختلف پیدا می‌شود (۶۶). مقاومت شیمیایی رادیکال‌ها کاهش می‌یابد و مقدارهای مورد نیاز، هزینه و عوارض جانبی موادی که اثر هم‌افزایی داشته اند نیز کمتر می‌گردد. این امر خصوصاً در مورد اسانس‌ها با توجه به آرومای شدید آن‌ها و امکان ایجاد تداخل در خواص حسی غذای پایه بسیار کاربردی می‌باشد. ترکیب اسانس‌ها در صورت داشتن اثر هم‌افزایی در بروز اثر آنتی اکسیدانی، عملکرد مشابه یا بهتری نسبت به آنتی اکسیدان‌های مصنوعی بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن[1] و بوتیلیتد هیدروکسی آنیسول[2] نشان می‌دهند. بروز اثر هم‌افزایی

1.Butylated hydroxytoluene (BHT)
2.Butylated hydroxyanisole (BHA)

در خاصیت آنتی اکسیدانی اسانس‌ها می‌تواند با ماهیت پیچیده فرآیند اکسیداسیون توجیه گردد به‌طوری‌که مخلوط اسانس‌ها می‌توانند روی طیف بیش‌تری از رادیکال‌های آزاد تأثیر گذاشته و آن‌ها را غیرفعال کنند (۶۶). قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد میکرو امولسیون‌های تهیه شده نیز در شکل ۲ نشان داده شده است.

گرچه صنعت غذا در درجه اول از اسانس‌ها به عنوان طعم‌دهنده و ایجادکننده آروما استفاده می‌کند، عملکرد بیش‌تر این ترکیبات به‌عنوان ماده طبیعی ضد میکروب بسیار قابل توجه است. زیرا این مواد به علت داشتن ترکیبات شیمیایی مختلف اغلب چندین مکانیسم انهدامی در مقابل باکتری‌ها و سایر میکروارگانیسم‌ها داشته و باعث تقویت این اثر می‌گردند (۶۷). این ترکیبات اثر کشندگی کم‌تری در مقابل باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با گونه‌های گرم مثبت دارند. زیرا اولاً لیپوپلی‌ساکاریدها[1] موجود در غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی که به‌عنوان یک محافظ عمل می‌کند و مانعی در برابر مولکول‌های درشت آب گریز اسانس‌ها می‌باشند. طبیعت آب گریز اسانس‌ها باعث می‌شود تا این ترکیبات لیپیدهای غشای سلول باکتریایی در گونه‌های گرم مثبت و تا حدی در باکتری‌های گرم منفی را تخریب کنند و باعث نفوذپذیری آن‌ها شوند به‌طوری‌که مواد سلولی و یون‌ها از آن‌ها نشت پیداکنند. هرچند درجاتی از نشت این مواد توسط سلول‌ها تحمل می‌شوند ولی از دست دادن گسترده یا از دست دادن اجزای اساسی می‌تواند منجر به مرگ آن‌ها شود (۱۷، ۶۸). تغییر ترکیب اسیدهای چرب از غشاء، حل کردن یا تشکیل کانال در دولایه فسفولیپید، دخالت کردن یا مانع جذب شدن گلوکز، مهار فعالیت آنزیم‌های مهم از دیگر مکانیسم‌های کشندگی میکروارگانیسم‌ها توسط اجزای اسانس‌ها می‌باشند (۶۹). اثر ضد باکتریایی نمونه‌های میکرو امولسیونی تهیه شده در مقابل دو باکتری رایج گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و گرم منفی *اشرشیا کولی* به دو روش رایج چاهک و محاسبه کم‌ترین غلظت بازدارندگی محاسبه گردید و نتایج در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است.

بررسی قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH: قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد مانند DPPH اسانس‌های روغنی گیاهان عمدتاً به علت وجود ترکیبات ترپنی و فنولی آن‌ها می‌باشد. با توجه به این‌که اسانس‌های استفاده شده در غلظت‌های برابر دارای طیف وسیعی از ترکیبات زیست فعال ترپنی و فنولی و مشتقات آن‌ها می‌باشند، لذا اثر بازدارندگی از خود نشان دادند (۷۰). اثر برابر بازدارندگی میکرو امولسیون‌های اسانس‌های خالص دور از انتظار بود. زیرا هر اسانس دارای ترکیبات فعال با ساختمان‌های شیمیایی متفاوت و در نتیجه قدرت مهارکنندگی متفاوت می‌باشد. به نظر می‌رسد که اثر مقدار مواد مؤثره در ارائه اثر بازدارندگی رادیکالی برای میکرو امولسیون‌های اسانس‌های خالص بیش‌تر از اثر ساختار شیمیایی آن‌ها بوده است. مواد تشکیل دهنده میکرو امولسیون مخلوط اسانس‌ها دارای اثر مهارکنندگی بالاتری نسبت به بقیه نمونه‌ها داشت که مؤید اثر هم‌افزایی اسانس‌های استفاده شده می‌باشد. اثر هم‌افزایی نمونه مخلوط اسانس‌ها به‌صورت زیر محاسبه می‌شود.

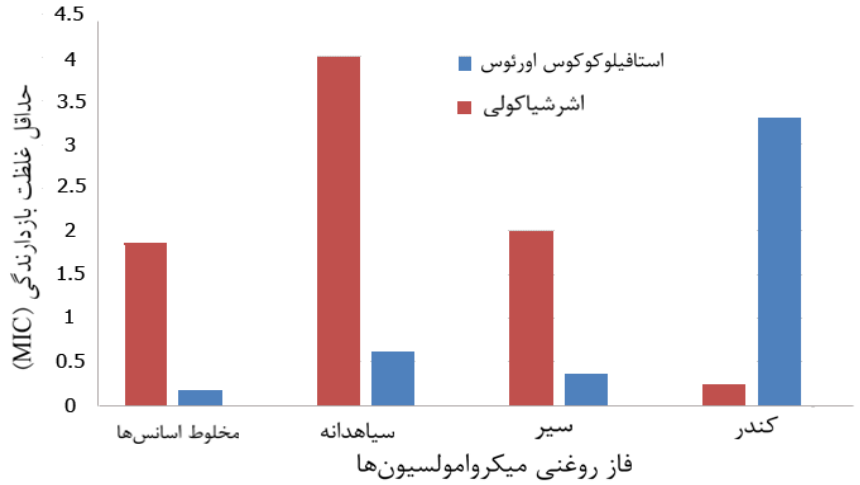
(۲۱/۸۰+۶۱/۶۳+ =قدرت بازدارندگی رادیکال آزاد ظاهری

(۶۱/۳۲ * ۰/۳۳= ۶۲/۱۱

۸۹/۸۶ =قدرت بازدارندگی رادیکال آزاد واقعی

۳۰٪ = (قدرت بازدارندگی رادیکال آزاد واقعی) / (قدرت بازدارندگی رادیکال آزاد ظاهری – قدرت بازدارنگی رادیکال واقعی) = اثر هم‌افزایی

1. Lipopolysacchaides



شکل ۳- حداکثر غلظت بازدارندگی میکروامولسیون‌های اسانس‌های کندر، سیر و سیاهدانه و ترکیب آن‌ها.

Figure 3- The maximum inhibitory concentration of microemulsion containing frankincense, garlic, and Nigella essential oil , both individually and in equal weight percent mixtures.

a-b حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنادار در مشخصه مقایسه شده می‌باشد.

شکل ۴- قطر هاله بازدارنده رشد باکتریهای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کولی*.

Figure 4. The diameter of the inhibition zone for the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia. Coli*

لذا می‌توان نتیجه گرفت که اسانس‌های انتخاب شده دارای ۳۰ درصد اثر هم‌افزایی در بروز اثر مهارکنندگی رادیکال آزاد داشته‌اند. لذا می‌توان نتیجه گرفت که هرچند در میکرو امولسیون های اسانس های خالص تفاوت در ساختار شیمیایی مواد تشکیل دهنده آن ها منجر به بروز اثرهای بازدارندگی متفاوت نمی‌شد، در میکرو امولسیون مخلوط اسانس‌ها، بر هم‌کنش اجزای سازنده اسانس ها، منجر به تقویت واکنش پذیری آن ها مقابل رادیکال آزاد و اصطلاحاً تقویت اثر مهارکنندگی آن گردیده است. هرچند در برخی تحقیقات انجام شده قبلی، گزارش شده است که اسانس های دارای وزن مولکولی بالاتر، داشتن حلقه آروماتیک بیش‌تر و داشتن تعداد گروه‌های بیشتر هیدروکسیلی اثر رادیکال های آزاد را تقویت می‌کند، این نتیجه در تحقیق حاضر مشاهده نگردید (۶۸). اثر هم افزایی ضد

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به‌صورت زیر محاسبه می‌شود.

$$MICo=\frac{MIC1+MIC2+MIC3}{3}=\frac{3.3+18.4+2.3}{3}=8$$

$$MICr=20.9$$

$$\text{Synergistic effect}=\frac{20.9-8}{8}=1.6$$

MIC0 حداقل غلظت بازدارندگی ظاهری یا محاسبه شده و MICr حداقل غلظت بازدارندگی واقعی یا مشاهده شده می‌باشد. می‌توان نتیجه گرفت که در بررسی اثر ضد باکتریایی نمونه‌ها به روش تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد علیه استافیلوکوکوس اورئوس، اثر هم‌افزایی اسانس‌ها حدود ۱/۶ برابر یا ۱۶۰ درصد افزایش‌یافته است که نتیجه بسیار شگفت‌انگیزی می‌باشد. اثر هم‌افزایی ضد باکتری اشریشیا کولی نیز به‌صورت زیر محاسبه می‌شود.

$$MICo=\frac{MIC1+MIC2+MIC3}{3}=\frac{20{,}9+13{,}1+11{,}3}{3}=15.1$$

$$MICr=23.4$$

$$\text{Synergistic effect}=\frac{23.4-15.1}{15.1}=0.55$$

اثر هم‌افزایی اسانس‌ها در بررسی اثر ضد باکتریایی نمونه‌ها به روش تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد علیه اشریشیا کولی هم مشاهده گردید (۵۵ درصد). هرچند این اثر در مقایسه با اثر ضد استافیلوکوکوس اورئوس بسیار کمتر است. مطالعات قبلی اثرات هم‌افزایی برای اسانس‌های گیاهی ماکرو ساختار مختلف به‌صورت ترکیب دوتایی از اسانس‌های زیره–دارچین، آویشن–دارچین، زیره–آویشن، آویشن–جعفری، آویشن–سیر، برگ بو–سیر و آویشن–رزماری در مقابل طیف وسیعی از باکتری‌های پاتوژن به اثبات رسیده است (۶۸). اثر بازدارندگی اسانس سیر مقابل باکتری‌های مختلف گرم مثبت و گرم منفی چه به‌صورت ماکرو ساختار و چه به‌صورت نانو ساختار در تحقیقات پیشین به اثبات رسیده است (۷۱، ۷۲). هرچند اسانس کندر ماکرو ساختار نیز اثرات ضد باکتریایی اثبات شده‌ای دارد (۷۳)، طبق بررسی منابع انجام شده، بررسی قابل استنادی روی کندر نانو ساختار تاکنون انجام‌نشده است. در مطالعات انجام شده پیشین هم‌چنین سیاهدانه ماکرو ساختار اثرات ضد باکتریایی قابل توجهی از خود نشان داده و با ترکیبات آنتی‌بیوتیک مختلف نیز اثر هم‌افزایی داشته است (۷۴). نانو امولسیون‌های سیاهدانه نیز در تحقیقات قبلی با استفاده از روش اولتراسونیک تهیه شده و اثر ضد سرطانی داشته است (۷۵). در یکی از تحقیقات اخیر استفاده از ترکیبات میکرو امولسیون‌های مختلف برای افزایش اثرات هم‌افزایی و روش‌های استخراج، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی و مکانیسم‌های عمل آن‌هامرور شده است. میکرو امولسیون پونه کوهی پرمصرف‌ترین میکرو امولسیون همراه با دارچین، رزماری و آویشن برای بسیاری از کاربردهای صنعتی معرفی شده است. به‌طور مشابه، میکرو امولسیون آویشن و میخک همراه با زیره و دارچین به‌طور هم‌افزا عمل می‌کند و بر فرآیندهای بیوشیمیایی متعدد در باکتری‌ها تأثیرگذار بودند (۷۶). در مطالعه دیگر اثرات هم‌افزایی بالقوه ترکیبات میکرو امولسیون‌ها را در برابر باکتری اشرشیاکولی و مونوسیتوژن مشاهده شده است. ترکیب عصاره نعناع، آویشن موثرترین ماده معرفی شدند (۷۷). بااین‌وجود پیش از تحقیق حاضر این سه اسانس روغنی (کندر، سیر و سیاهدانه)، با هم یا به‌صورت دوتایی چه در مقیاس نانو و چه در مقیاس میکرو باهم ترکیب نشده و از نظر تأثیر ضد باکتریایی و بررسی امکان هم‌افزایی مورد آنالیز قرار نگرفته بودند.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق میکرو امولسیون‌های اسانس‌های خالص کندر، سیر و سیاهدانه با میانگین اندازه ذرات از کمتر از ۱۰۰ نانومتر، با استفاده از توئین ۸۰ به‌عنوان

سورفکتانت و گلیسرول به‌عنوان کوسورفکتانت، از طریق یک فرآیند خود به خودی کم انرژی تهیه شدند. فعالیت‌های ضد باکتریایی تمام نانو ذرات اسانس کندر، سیر و سیاهدانه در شرایط آزمایشگاهی از طریق کاهش اندازه ذرات آن‌ها در محدوده نانو افزایش یافت. اندازه کوچک میکرو امولسیون‌های تولید شده با فاز روغنی مختلط (سه تایی کندر–سیر–سیاهدانه) در مقایسه با نمونه‌های خالص مشاهده گردید. لذا فاز روغنی میکرو امولسیون‌های مخلوط اسانس‌ها کوچک‌تر از اسانس‌های کندر و سیاهدانه به صورت خالص بوده است. از طرفی توزیع اندازه ذرات برای میکرو امولسیون‌های مخلوط اسانس‌ها بسیار بیشتر از اسانس های خالص بوده است که این امر می‌تواند به ماهیت روغنی متفاوت نانو ذرات تشکیل شده در این سیستم مربوط باشد. کدورت پایین‌تر فاز روغنی مختلط (سه‌تایی کندر–سیر–سیاهدانه) به‌دلیل اندازه ذرات کوچک‌تر فاز روغنی مختلط از نتایج دیگر به دست آمده در این پژوهش بود. اما از نتایج مطلوب این تحقیق خاصیت هم‌افزایی فاز روغنی مختلط (سه تایی کندر–سیر–سیاهدانه) بود که این اثر، موجب افزایش اثر مهارکنندگی رادیکال آزاد فاز روغنی مختلط (سه تایی کندر–سیر–سیاهدانه) به میزان ۳۰٪ و اثر هم‌افزایی ضد باکتریایی نمونه‌ها به روش تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد علیه اشرشیا کولی به میزان ۵۵٪ و علیه استافیلوکوکوس اورئوس به میزان ۱۶۰٪ افزایش یافته است. بنابراین فاز روغنی مختلط (سه‌تایی کندر–سیر–سیاهدانه) در سیستم میکرو امولسیونی می‌تواند به‌عنوان نگهدارنده طبیعی در فرمولاسیون‌های مختلف غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

References

1. Dattner, A.M. 2003. From medical herbalism to phytotherapy in dermatology: back to the future. Dermatologic therapy, 16(2):106-13
2. Fong, H.H. 2002. Integration of herbal medicine into modern medical practices: issues and prospects. Integrative cancer therapies, 1(3), 287-293.
3. Huseini, H.F., Larijani, B., Heshmat, R., Fakhrzadeh, H., Radjabipour, B., Toliat, T. 2006. The efficacy of Silybum marianum (L.) Gaertn (silymarin) in the treatment of type II diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 20(12):1036-1039.
4. Huseini, H.F., Darvishzadeh, F., Heshmat, R., Jafariazar, Z., Raza, M., Larijani, B. 2009. The clinical investigation of Citrullus colocynthis (L.) schrad fruit in treatment of Type II diabetic patients: a randomized, double blind, placebo-controlled clinical trial. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 23(8), 1186-1189.
5. Thatte, U., Rege, N., Phatak, S., Dahanukar, S. 1993. The flip side of Ayurveda. Journal of postgraduate medicine, 39(4), 179.
6. Ramesh, S., Chaughule, S., Rajesh, S.B. 2024. Role of herbal medicines in the treatment of infectious diseases. Vegetous, 37, 41–51.
7. Parab, S., Kulkarni, R., Thatte, U. 2003. Heavy metals in herbal medicines. Indian journal of gastroenterology: official journal of the Indian Society of Gastroenterology, 22(3), 111.
8. Salem, M.L., Hossain, M.S. 2000. Protective effect of black seed oil from Nigella sativa against murine cytomegalovirus infection. International journal of immunopharmacology, 22(9), 729-740.
9. Manzoor, M., Yousuf, Y., Pandith. J.A., Ahmad, S. 2023. Plant-derived active substances incorporated as antioxidant, antibacterial, or antifungal components in coatings/films for food packaging applications. Food Bioscience, 53, 102717.

10. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils–a review. Food and chemical toxicology, 46(2), 446-475.
11. Ali, I.B.E.H., Chaouachi, M., Bahri, R., Chaieb, I., Boussaïd, M., Skhiri, F.H. 2015. Chemical composition and antioxidant, antibacterial, allelopathic and insecticidal activities of essential oil of Thymus algeriensis Boiss. et Reut. Industrial crops and products, 77, 631-639.
12. Donsì, F., Annunziata, M., Sessa, M., Ferrari, G. 2011. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. LWT-Food Science and Technology, 4(9), 1908-1914.
13. Mayaud, L., Carricajo, A., Zhiri, A., Aubert, G. 2008. Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. Letters in applied microbiology, 47(3), 167-173.
14. Leistner, L. 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. International journal of food microbiology, 55(1-3), 181-186.
15. Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International journal of food microbiology, 94(3), 223-253.
16. Chang, Y., McLandsborough, L., McClements, D.J. 2011. Physicochemical properties and antimicrobial efficacy of electrostatic complexes based on cationic ε-polylysine and anionic pectin. Journal of agricultural and food chemistry, 59(12), 6776-6782.
17. Chang, Y., McLandsborough, L., McClements, D.J. 2012. Physical properties and antimicrobial efficacy of thyme oil nanoemulsions: influence of ripening inhibitors. Journal of agricultural and food chemistry, 60(48), 12056-12063.
18. Donsì, F., Cuomo, A., Marchese, E., Ferrari, G. 2014. Infusion of essential oils for food stabilization: Unraveling the role of nanoemulsion-based delivery systems on mass transfer and antimicrobial activity. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 22, 212.
19. Trujillo, L.S., Graü A.R. Fortuny R.S., Belloso O.M. 2013. Physicochemical characterization of lemongrass essential oil–alginate nanoemulsions: effect of ultrasound processing parameters. Food and Bioprocess Technology, 6(9), 2439-2446.
20. Trujillo, L.S., Graü, A.R., Fortuny, R.S., Belloso, O.M. 2014. Impact of microfluidization or ultrasound processing on the antimicrobial activity against Escherichia coli of lemongrass oil-loaded nanoemulsions. Food Control, 37, 292-297.
21. Wu, J.E., Lin, J., Zhong, Q. 2014. Physical and antimicrobial characteristics of thyme oil emulsified with soluble soybean polysaccharide. Food Hydrocolloids, 39, 144-150.
22. Ziani, K., Chang, Y., McLandsborough, L., McClements, D. J. 2011. Influence of surfactant charge on antimicrobial efficacy of surfactant-stabilized thyme oil nanoemulsions. Journal of agricultural and food chemistry, 59(11), 6247-6255.
23. Assimopoulou, A., Zlatanos, S, Papageorgiou, V. 2005. Antioxidant activity of natural resins and bioactive triterpenes in oil substrates. Food chemistry, 92(4), 721-727.
24. Wahab S. A., Aboutabl, E., El-Zalabani, S., Fouad. H., Pooter, H. D., Fallaha B. E. 1987. The essential oil of olibanum. Planta medica, 53(4), 382-384.
25. Qurishi, Y., Hamid, A., Zargar, M., Singh, S.K., Saxena, A.K. 2010. Potential role of natural molecules in health and disease: Importance of boswellic acid. Journal of Medicinal Plants Research, 4(25), 2778-2786.
26. Safayhi, H., Rall, B., Sailer, E.R., Ammon, H.P.T. 1997. Inhibition by boswellic acids of human leukocyte elastase. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 281(1), 460-463.
27. Gupta, I., Gupta, V., Parihar, A., Gupta, S., Lüdtke, R., Safayhi, H. 1998. Effects of Boswellia serrata gum resin in patients with bronchial asthma: results of a double-blind, placebo-controlled, 6-week clinical study. European journal of medical research, 3(11), 511.
28. Borrelli, F., Capasso, F., Capasso, R., Ascione, V., Aviello, G., Longo, R. 2006. Effect of Boswellia serrata on intestinal motility in rodents: inhibition of diarrhea without constipation. British journal of pharmacology, 148(4), 553.

29. Pandey R.S., Singh, B.K., Tripathi, Y.B. 2005. Extract of gum resins of Boswellia serrata L. inhibits lipopolysaccharide induced nitric oxide production in rat macrophages along with hypolipidernic property.
30. Zutshi, U., Rao, P., Kaur, S., Singh, G., Surjeet, S., Atal, C. 1986. Mechanism of cholesterol lowering effect of Salai guggal ex. Boswellia serrata roxb. Indian Journal of Pharmacology, 18(3), 182.
31. Desai, J.K., Goyal, R.K., Parmar, N.S. 1997. Pathogenesis of peptic ulcer disease and current trends in therapy. Indian journal of physiology and pharmacology, 41(1), 3-15.
32. Kavitha, J., Rosario, J. F., Chandran, J., Anbu, P. 2007. Hypoglycemic and other related effects of Boswellia glabra in alloxan-induced diabetic rats. Indian journal of physiology and pharmacology, 51(1), 29-39.
33. Jyothi, Y., Kamath, J.V., Asad, M. 2006. Effect of hexane extract of Boswellia serrata oleo-gum resin on chemically induced liver damage. Pakistan journal of pharmaceutical sciences, 19(2), 129-33.
34. Hosseini, S.M., Esfandiari, E., Alaei, H. 2004. Effects of frankincense aqueous extract during gestational period on increasing power of learning and memory in adult offsprings.
35.Dhingra, D., Parle, M., Kulkarni, S. 2004. Memory enhancing activity of Glycyrrhiza glabra in mice. Journal of ethnopharmacology, 91(2-3), 361-365.
36. Kasali, A., Adio, A., Kundaya, O., Oyedeji, A., Eshilokun, A., Adefenwa, M. 2002. Antimicrobial activity of the essential oil of Boswellia serrata Roxb. J Essent Oil Bearing Plants, 5(3), 173-175.
37. Camarda, L., Dayton, T., Stefano V.D., Pitonzo, R., Schillaci, D. 2007. Chemical composition and antimicrobial activity of some oleo gum resin essential oils from Boswellia spp.(Burseraceae). Annali di Chimica: Journal of Analytical, Environmental, and Cultural Heritage Chemistry, 97(9), 837-844.
38. Asbahan,i A.E., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E.A., Casabianca, H. 2015. Essential oils: from extraction to encapsulation. International journal of pharmaceutics, 483(1-2), 220-243.
39. Satyal, P., Craft, J.D., Dosoky, N.S, Setzer, W.N. 2017. The chemical compositions of the volatile oils of garlic (Allium sativum) and wild garlic (Allium vineale). Foods, 6(8), 63.
40. Verma, T., Aggarwal, A., Dey, P., Chauhan, A.K., Rashid, S., Chen, K.T., Sharma, R. 2023. Medicinal and therapeutic properties of garlic, garlic essential oil, and garlic-based snack food An updated review. Frontiers in Nutrition, 10, 1120377.
41. Banerjee, S.K., Maulik, S.K. 2002. Effect of garlic on cardiovascular disorders: a review. Nutrition Journal, 1(1), 1-14.
42. Benavides, G.A., Squadrito, G.L., Mills, R.W., Patel, H.D., Isbell, T.S., Patel, R.P. 2007. Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. Proceedings of the national academy of sciences, 104(46), 17977-17982.
43. Muwen, L.., Chen, C., Xiao, J., Lan, Y., Cao, Y., Huang, Q., Ho, C.T. 2022. Health benefits of bioactive components in pungent spices mediated via the involvement of TRPV1 channel. Trends in Food Science & Technology, 129, 266-282.
44. Chauhan, N.B. 2006. Effect of aged garlic extract on APP processing and tau phosphorylation in Alzheimer's transgenic model Tg 2576. Journal of ethnopharmacology,108(3), 385-394.
45. Fukao, H., Yoshida, H., Tazawa, Y.i., Hada, T. 2007. Antithrombotic effects of odorless garlic powder both in vitro and in vivo. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 71(1), 84-90.
46. Abdulla, S.A., Sali, T.F.M., Ham, A.A., Ali, S.I., Hamaamin, H.H. 2021, The antibacterial property of nigella sativa (Black seed) oil against gram-positive and gramnegative Bacteria. Kurdistan Journal of Applied Research , 6(2), 156-165.
47. Sugumar, S., Nirmala, J., Ghosh, V., Anjali, H., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. 2013. Bio-based nanoemulsion formulation, characterization and antibacterial activity against food-borne pathogens. Journal of basic microbiology, 53(8), 677-685.

48. Rao, J., McClements D.J. 2011. Food-grade microemulsions, nanoemulsions and emulsions: Fabrication from sucrose monopalmitate & lemon oil. Food hydrocolloids, 25(6), 1413-1423.
49. Flanagan, J., Singh, H. 2006. Microemulsions: a potential delivery system for bioactives in food. National library of medicine, 46(3), 221-237.
50. Kale, S. N., Deore, S.L. 2016. Emulsion Micro Emulsion and Nano Emulsion: A Review. Systematic Reviews in Pharmacy, 8(1), 39-47.
51. Mcclements, D.J. 2012. Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. Soft Matter, 8(6), 1719-1729.
52. Xue, J., Zhong, Q. 2014. Thyme oil nanoemulsions coemulsified by sodium caseinate and lecithin. Journal of agricultural and food chemistry, 62(40), 9900-9907.
53. Qian, C., McClements, D.J. 2011. Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: factors affecting particle size. Food hydrocolloids, 25(5), 1000-1008.
54. Sayed H.S.S., Chizzola, R., Ramadan, A.A., Edris, A.E. 2017. Chemical composition and antimicrobial activity of garlic essential oils evaluated in organic solvent, emulsifying, and self-microemulsifying water based delivery systems. Food Chemistry, 221, 196-204.
55. McClements D.J., Li, Y. Structured emulsion-based delivery systems: controlling the digestion and release of lipophilic food components. Advances in colloid and interface science, 159(2), 213-28.
56. Helal, A., Tagliazucchi, D., Conte, A., Desobry, S. 2012. Antioxidant properties of polyphenols incorporated in casein/sodium caseinate films. International dairy journal, 25(1), 10-15.
57. Firoozi, M., Jahani, R.S., Shahvegharasl, Z., Anarjan, N. 2020. Ginger essential oil nanoemulsions: Preparation and physicochemical characterization and antibacterial activities evaluation. Journal of Food Process Engineering, 43(8), 13434.
58. Moghimi, R., Ghaderi, L., Rafati, H., Aliahmadi, A., McClements, D.J. 2016. Superior antibacterial activity of nanoemulsion of Thymus daenensis essential oil against E. coli. Food chemistry, 194, 410-5.
59. Walstra, P. 1993. Principles of emulsion formation. Chemical engineering science, 48(2), 333-349.
60. Jafari, S.M., Assadpoor, E., He, Y., Bhandari, B. 2008. Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. Food hydrocolloids, 22(7),1191-1202.
61. Singh, I.R., Pulikkal, A.K. 2022, Preparation, stability and biological activity of essential oil-based nano emulsions: A comprehensive review, 8, 100066.
62.McClements, D.J., Rao, J. 2011. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. Critical reviews in food science and nutrition, 51(4), 285-330.
63. Mertens, M., Buettner, A., Kirchhoff, E. 2009. The volatile constituents of frankincense - A review, Flavour and Fragrance Journal, 24(6), 279–300.
64. Dziri, S., Casabianca, H., Hanchi, B., Hosni, K.2014. Composition of garlic essential oil (Allium sativum L.) as influenced by drying method. Journal of Essential Oil Research, 26(2), 91-96.
65. Ghahramanloo, K.H., Kamalidehghan, B., Javar, H.A., Widodo, R.T., Majidzadeh, K., Noordin, M.E. 2017. Comparative analysis of essential oil composition of Iranian and Indian Nigella sativa L. extracted using supercritical fluid extraction and solvent extraction. Drug Design, Development, and Therapy, 11, 2221–2226.
66. Capitani, C.D., Carvalho, A.C., Botelho, P.B., Carrapeiro, M.M. Castro IA. 2009. Synergism on antioxidant activity between natural compounds optimized by response surface methodology. European journal of lipid science and technology, 111(11),1100-1110.
67. Maqtari, Q.A.A., Rehman, A., Mahdi, A.A., Ansi, W.A., Wei, M., Yanyu, Z., Phyo, M.H., Galeboe, O. 2022. Application of essential oils as preservatives in food systems: challenges and future prospectives – a review. Phytochemistry Reviews 21(9), 1209-1246.

68. García-Díez, J., Alheiro, J., Pinto, A.L, Falco, V., Fraqueza, M.J., Patarata, L. 2017. Synergistic activity of essential oils from herbs and spices used on meat products against food-borne pathogens. Natural product communications,12(2): 281-286.
69. Cho, T.J., Park, S.M., Yu, H., Seo, G.H., Kim, H.W., Kim, S. 2020. Recent advances in the application of antibacterial complexes using essential oils. Molecules, 25(7),1752.
70. Harrasi, A. A., Saidi, S. A. 2008. Phytochemical analysis of the essential oil from botanically certified oleogum resin of Boswellia sacra (Omani Luban). Molecules,13(9), 2181-2189.
71. Soltan, H., Ahmed, S., Emam, D. 2016. Comparative antibacterial activity of garlic essential oil extracted by hydro-distillation and diethyl ether extraction methods on four pathogenic bacteria. Advances in plants & agriculture research, 4(2),0013.2.
72. Katata-Seru, L., Lebepe, T.C., Aremu, O.S., Bahadur, I. 2017. Application of Taguchi method to optimize garlic essential oil nanoemulsions. Journal of molecular liquids.244:279-84.
73.Van Vuuren, S.F., Kamatou, G.P., Viljoen, A.M. 2010. Volatile composition and antimicrobial activity of twenty commercial frankincense essential oil samples. South african journal of botany.76(4):686-691.
74. Hanafy, M., Hatem, M. 1991. Studies on the antimicrobial activity of Nigella sativa seed (black cumin). Journal of ethnopharmacology,34(2-3),275-278.
75. Periasamy, V.S., Athinarayanan, J., Alshatwi A.A. 2016. Anticancer activity of an ultrasonic nanoemulsion formulation of Nigella sativa L. essential oil on human breast cancer cells. Ultrasonics sonochemistry, 31, 449-455.
76. Basavegowda, N., Baek, K.H. 2021. Synergistic antioxidant and antibacterial advantages of essential oils for food packaging applications, Biomolecules 11(9), 1267-1284.
77. Angane, M., Swift, S., Huang. K, Perera, J., Chen, X., Christine A. Butts, C.A., Quek, S.Y. 2024. Synergistic antimicrobial interaction of plant essential oils and extracts against foodborne pathogens, Food Science Nutrition. 12(2), 1189–1206.