(مقاله پژوهشی)

تولید نانوامولسیون عصاره هیدروالکلی بره موم به روش‌خشک‌کردن انجمادی و ارزیابی‌خواص فیزیکی- شیمیایی‌آن به عنوان نگهدارنده مواد غذایی

فرحان احدی[۱]، افشین جوادی[۲*]، هدا جعفری زاده -مالمیری[۳]، نویده انرجان[۴]، حمید میرزایی[۵]

۱- دانش‌آموخته دکتری، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۲- استاد، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۳- دانشیار، گروه مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی سهند، تبریز، ایران.

۴- استادیار،گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۵- دانشیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

تاریخ دریافت:۱۴۰۱/۰۹/۰۸ تاریخ پذیرش:۱۴۰۱/۱۰/۲۰

DOI: 10.30495/jfst.2023.1973945.1836

چکیده

بره موم به عنوان فرآورده جانبی حاصل از فعالیت زنبور عسل به عنوان یک محصول با ویژگی‌های بیولوژیکی برجسته مانند خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی در برابر طیف وسیعی از میکروب‌ها شناخته شده است. در تحقیق حاضر، ابتدا عصاره هیدروالکلی (نسبت الکل به آب۸۰ به۲۰) بره موم تهیه گردید و با استفاده از تبخیرکننده دوار تحت خلاء، حلال جدا شد. سپس با استفاده از خشک‌کن انجمادی در دمای ۷۰°C- و به مدت۴۰ ساعت، به‌صورت پودر درآورده شد و نهایتاً از پودر حاصله، نانوامولسیون تهیه گردید. نتایج کروماتوگرافی‌گازی نشان داد که پودر حاصله دارای محتوای فنولی، فلاونوئیدی و خاصیت آنتی اکسیدانی به ترتیب ۸۶/۹۳ و ۳۴/۲۱ (میلی‌گرم برگرم بر حسب اسیدگالیک)، و ۹۷/۶۸ درصد بود. اندازه ذرات، شاخص پراکندگی و پتانسیل زتا در نانوامولسیون تولید شده به ترتیب ۸۶ نانومتر، ۰/۲۹۹ و ۲۳/۳۴- میلی ولت بود. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره هیدروالکلی و پودر تولیدشده بره موم توسط دستگاه خشک‌کن انجمادی دارای محتوای فنولی و فلاونوئیدی، و خاصیت آنتی اکسیدانی بالایی می‌باشند. هرچند این خواص در داخل پودر، بالاتر از خواص در عصاره هیدروالکلی بره موم بود. از این رو استفاده از پودر این عصاره به عنوان یک ماده نگهدارنده در صنایع غذایی پیشنهاد می‌شود. با توجه به یافته‌های این تحقیق، با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی، قابلیت تولید پودر عصاره هیدروالکلی بره موم با ذرات کروی شکل و در ابعاد نانو وجود دارد که می توان از محصولات به دست آمده به عنوان نگهدارنده در صنایع مواد غذایی به راحتی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: بره موم، خشک کن انجمادی، خواص فیزیکی - شیمیایی ، عصاره هیدروالکلی.

* مسئول مکاتبات: Javadi@iaut.ac.ir

۱-مقدمه

بره‌موم یک محصول طبیعی مشتق شده از رزین (صمغ) گیاهان مختلف بوده که زنبورهای عسل پس از جمع‌آوری، به آن ترشحاتی‌اضافه نموده و پس از عمل آوری نهایی، برای مقاصد مختلفی‌از جمله‌پوشش دیواره داخلی کندو، پوشاندن سطح بدن حیوانات نفوذی به کندو و محافظت از خود استفاده میکنند (۱۵). بیش از ۳۰۰ ترکیب مختلف نظیر پلی‌فنول‌ها (فلاونوئیدها واسیدهای‌فنول)،استرها،مونوترپن‌ها،اسیدهای‌آمینه، استروئیده‌ا، اسیدکافئیک، روغن‌های ضروری و ترکیبات غیرآلی در بره موم یافت شده است(۵). بره موم از زمان‌های بسیار دور به عنوان یک داروی سنتی در درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌شد. این ماده دارای فعالیت بیولوژیکی متنوعی است که مهم‌ترین آن‌هاشامل‌خواص‌ضدالتهابی،آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی، ضد سرطانی، تنظیم‌کننده سیستم ایمنی، ترمیم سوختگی و محافظت‌کننده کبدی می‌باشد (۱۵). همچنین بره موم حاوی حدود۵۰درصدصمغ یا رزین‌گیاهی، ۳۰ درصد موم، ۱۰ درصد اسیدهای‌چرب‌ضروری،۵درصد گرده گل و ۵ درصد ترکیبات آلی، ویتامین‌ها و عناصرمعدنی مانند نقره، سدیم، جیوه، مس، منگنز، آهن، کلسیم، وانادیم و سیلیس است (۱). مقدار و نوع ترکیبات بره موم بسته به مکان، زمان جمع‌آوری و روش تولید آن متفاوت است (۲). رنگ بره موم از زرد تا قهوه‌ای تیره بسته به منشاء رزین‌های‌آن متغیر است. بره موم در دماهای ۴۵ °C تا ۲۵۰ به شکل ماده‌ای نرم، انعطاف‌پذیر و بسیار چسبنده است. در دماهای پایین و به خصوص در حالت منجمد یا نزدیک به انجماد، بره موم به شدت سفت و شکننده می‌شود. در واقع، هرچه دما از ۴۵°C بالاتر رود، بره موم به‌طور فزآینده‌ای خاصیت چسبندگی به خودمی‌گیرد (۳). بره موم به طور معمول در دماهای ۶۰°C تا ۷۰ مایع است، اما برای برخی از نمونه‌ها، دمای ذوب بالاتر از ۱۰۰ °C نیز گزارش شده‌است (۴). اتانول، اتر، گلیکول و آب از جمله حلال‌های متداول برای استخراج بره موم در مقیاس تجاری هستند. ولی به منظور آنالیز شیمیایی و استخراج طیف گسترده‌ای از اجزای آن، از انواع مختلفی از حلال‌ها،استفاده‌می‌شود. بسیاری‌ازاجزای‌آنتی باکتریال موجود در بره موم در الکل یا آب قابل انحلال می‌باشند (۷). فعالیتهای آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی بره موم زمینه استفاده از این ماده را درصنایع‌غذایی فراهم می‌کند. یک مزیت ویژه‌آن، این است که به نظر می‌رسد بر خلاف برخی از نگهدارنده‌های معمولی، بره موم اثرات مفیدی بر روی سلامتی انسان می‌گذارد. با این حال، مطالعات‌اندکی‌درخصوص اثرات جانبی احتمالی افزایش مصرف بره موم انجام شده است (۸). در سال‌های اخیر استفاده از بره موم‌به‌عنوان ماده نگهدارنده دربسته‌بندی‌های مواد غذایی و به عنوان نگهدارنده موادغذایی(مانند افزایش طول مدت نگهداری ماهی‌منجمدشده تا حدود ۲ الی ۳ برابر) و یا به عنوان مکمل‌خوراکی‌درجیره‌غذایی‌مرغ‌های‌تخم‌گذار(موجب افزایش تولیدتخم‌مرغ و نیزافزایش وزن مرغ‌ها) مطرح شده است (۲۴). خشک‌کردن مواد حساس به حرارت با روش‌های معمول مانند گرم‌کردن، ممکن نیست. خارج‌کردن حلال و به ویژه آب از ساختمان پلیمرها، ترکیبات‌زیستی وغیرآلی، از مهم‌ترین مسایل صنایع‌داروسازی، غذایی، پزشکی، پتروشیمی، بیوشیمی و فناوری‌نانو به شمار می‌رود. از میان روش‌های موجود، خشک-کردن انجمادی نقش مهمی را در این صنایع و به ویژه در فناوری نانو به‌دست آورده‌است. استفاده از این روش، کاربرد فراوانی‌درتولید نانوذرات در صنایع الکتروشیمی، محیط‌زیست، مهندسی مواد و صنایع دارویی پیدا کرده‌است (۲۳). هدف از انجام این پژوهش حاضر، تولید پودر عصاره هیدروالکلی بره موم‌توسط‌خشک‌کن‌انجمادی و سنتز نانومولسیون پودر حاصله و ارزیابی خواص فیزیکی و شیمیایی آن بود.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

۲،۲-دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل و۲ و۴ و۶- تریس-۲-پیریدیل‌اس‌تریازین‌ازشرکت‌سیگماآلدریچ[1](آمریکا)خریداری

1- Sigma-Aldrich

شد. بره موم خام نیز از بازار تبریز خریداری شد. محیط‌های کشت پلیت کانت آگار[1] و سابرو دکستروز آگار[2] نیز از شرکت مرک[3] (آلمان) تهیه شد.

۲-۲- روش‌ها

۲-۲-۱- تهیه عصاره بره موم

ابتدا بره موم به لایه‌های نازک با ضخامت ۳ تا ۵ میلی‌متر برش داده شد و به مدت یک شبانه روز در فریزر خانگی نگهداری شد. سپس با استفاده از آسیاب برقی (نیما-NM-8300-نقره ، ژاپن) بره موم تبدیل به پودر شد. این کار موجب کاهش اندازه ذرات و افزایش نسبت سطح به حجم ذرات شده و راندمان استخراج را افزایش می‌دهد. جهت تهیه عصاره اتانولی بره موم، ۱۰۰ گرم از بره موم آسیاب‌شده به مخلوط ۴۰ میلی لیتر آب و ۱۶۰ میلی لیتر اتانول ۹۶٪ افزوده شده و مخلوط حاصله با استفاده از یک همزن مغناطیسی با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط هم زده شد. سپس قسمت نامحلول توسط فیلتراسیون جدا گردید و قسمت محلول قبل از فیلترمجدد، جهت سهولت جدا شدن موم‌ها و صمغ‌های باقی مانده‌درعصاره،به‌مدت‌یک‌شبانه‌روزدرفریزر$-۱۰^{\circ}C$ قرارگرفت. در ادامه جهت تبخیر حلال، نمونه به یک تبخیرکننده تحت خلاء (TAT-Rdig, Iran) با دمای$۴۵^{\circ}C$ منتقل‌گردید. در نهایت عصاره عاری از الکل که به صورت خمیر چسبنده بود، حاصل‌گردیدکه تا زمان مصرف در ظروف شیشه‌ای تیره در بسته در دمای $۴^{\circ}C$ نگهداری شد (۹).

۲-۲-۲- تهیه پودر عصاره بره موم

به منظور تولید پودر عصاره بره موم، ابتدا ۱۰۰ گرم از عصاره تهیه‌شده در ظرف پلاستیکی درب‌دار، پهن گردید و در فریزر در دمای$-۲۰^{\circ}C$ به مدت۲۴ساعت‌قرارداده شد تا کاملاً منجمد گردد. پس‌ازآن‌نمونه‌منجمدشده‌دردستگاه خشک‌کن انجمادی به مدت ۴۰ ساعت دردمای$-۷۰^{\circ}C$ قرار گرفت. نهایتاً با استفاده از آسیاب، ورقه های خشک شده عصاره بره موم به صورت پودر بدست آمد (۱۹).

۲-۲-۳- تولید نانوامولسیون عصاره وپودربره موم در آب با استفاده از تکنیک آب مادون بحرانی

جهت‌تولیدنانوامولسیون‌عصاره‌وپودربره موم، براساس مطالعات قوامی و همکاران (۲۰۱۸)، ۰/۵گرم‌ساپونین به ۴۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شده و محلول‌ها با استفاده از همزن مغناطیسی در دمای $۶۰^{\circ}C$ با سرعت۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط‌گردید. پس ازحل‌شدن‌کامل امولسیفایر، ۰/۵ گرم پودر بره موم تولیدشده به محلول‌های تهیه شده اضافه و نمونه‌ها تحت شرایط مشابه به مدت ۵ دقیقه هم زده شدند. در نهایت، محلول‌ها پس ازاختلاط‌کامل در آون (شرکت تولیدی پزشکی بهداد، SP88، تهران، ایران) در دمای $۱۲۰^{\circ}C$ و فشار ۱/۵ اتمسفر، به مدت ۲ ساعت حرارت داده شدند (۱۹، ۲۶ و ۲۷).

۲-۲-٤- اندازه گیری شاخص بریکس[4] و pH

ضریب‌شکست نورعصاره، به عنوان شاخصی از کل مواد جامد محلول‌آن‌توسط‌دستگاه‌رفراکتومتر(NAR- Atago, ABBE, 1T, Tokyo, Japan) اندازه‌گیری شد. از آب مقطر برای تنظیم دستگاه استفاده گردید و برای اندازه گیری pH نمونه از دستگاه pH متر (pH lab 827-Swiss) استفاده شد.

۲-۲-۵- اندازه گیری میزان کدورت

جهت اندازه‌گیری میزان کدورت عصاره بره موم از دستگاه اسپکتروفوتومترمرئی‌فرابنفش(Pharmacia Biotech Co.، انگلستان،مدل00-802106)در طول موج ۶۲۵ نانومتراستفاده گردید (۱۱).

1- Plate Count Agar
2- Sabouraud's Dextrose Agar
3- Merck

4 -Brix

۲-۲-٦- شناسایی کیفی ترکیبات موثر بره موم

ازدستگاه کروماتوگرافی گازی/طیف‌سنجی‌جرمی، جهت تعیین ترکیبات شیمیایی پودر عصاره بره موم استفاده گردید. ابتدا نمونه‌به‌وسیله یک‌میلی‌لیتر n- هگزان رقیق شد. پس از مخلوط کردن کامل نمونه‌باحلال و آماده سازی عصاره، یک میکرولیتر از آن، به‌ستون‌دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی(GC/MS)[1] تزریق گردید. دستگاه کروماتوگرافی (Agilent 7890 A، ساخت‌آمریکا)، مجهز به‌آشکارساز جرمی‌با ستون موبینه به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت ۰/۲۵میکرومتر و ستون از نوع(HP-5 M) بود. برنامه‌دمایی‌ستون شامل دمای‌اولیه‌آون ۸۰°C به مدت سه دقیقه بود. سپس با سرعت ۸°C بر دقیقه تا ۱۸۰° C افزایش یافت و توقف در این دما به مدت ۳ دقیقه بود. دمای دریچه تزریق در ۲۵۰°C تنظیم شد. از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل استفاده گردید. سرعت جریان (فلوو) گاز حامل یک میلی‌لیتر بر دقیقه وروش‌یونیزاسیون (EI) با ولتاژ ۷۰ الکترون ولت بود. محدوده اسکن‌جرمی ۵۰تا۵۵۰تنظیم گردید. به منظور شناسایی ترکیبات از کتابخانه جرمی Wily 2007 و NIST 2005 استفاده شد. پردازش‌داده‌های‌دستگاه‌بااستفاده از نرم افزار Chemstation در محیط ویندوز انجام شد (۱۲).

۲-۲-۷- اندازه‌گیری ترکیبات فنلی

میزان‌ترکیبات‌فنلی کل‌براساس‌روش‌رنگ‌سنجی‌فولین‌سیوکالچیو و برحسب اسیدگالیک اندازه‌گیری شد. برای این منظور، ابتدا محلول‌های‌استانداردداسیدگالیک‌دراتانول ۷۰درصدباغلظت های (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم برگرم) تهیه و ۰/۵ میلی‌لیترازآن‌هابا۲/۵ میلی لیتر معرف فولین- سیوکالتو[2] مخلوط شد و طی مدت ۰/۵ تا ۸ دقیقه، ۲ میلی لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد (وزنی/حجمی) به آن اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد و سپس جذب نوری آن‌ها به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر(DR5000،Hach ،ساخت آمریکا) درطول‌موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد و نمودار استاندارد رسم‌گردید. برای تعیین مقدارفنل تام نمونه‌های بره موم، مقدار ۰/۰۵ گرم از عصاره بره موم در ۱۰ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد حل‌شد. در مرحله بعد، ۱ میلی‌لیتر از محلول تهیه شده تا حجم ۱۰ میلی‌لیتر رقیق سازی شد. سپس ۰/۵ میلی لیتر از این محلول با۲میلی‌لیترکربنات‌سدیم و ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین-سیکالتو مخلوط شد و به مدت ۱ تا ۸ دقیقه در تاریکی نگهداری شد. سپس میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد و مقدار ترکیبات فنلی برحسب میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره خشک محاسبه گردید (۱۳).

۲-۲-۸- اندازه گیری ترکیبات فلاونوئیدی

سنجش‌فلاونوئیدهابراساس‌آزمون رنگ سنجی صورت گرفت. بدین ترتیب که ابتدا ۰/۵ میلی لیتر از عصاره هیدروالکلی بره موم تهیه‌شده نهایی در قسمت ترکیبات فنلی کل، به ۱ میلی‌لیتر از محلول ۲ درصدکلریدآلومینیوم ($AlCl_3.6H_2O$) اضافه شد و پس از ۱۵ دقیقه نگهداری در محل تاریک، جذب آن در طول موج ۴۳۰ نانومتر اندازه‌گیری‌گردید. در این روش از کوئرستین (محلول‌آبی‌کوئرستین با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم برگرم) به عنوان استاندارد استفاده شد. منحنی استاندارد رسم و نتایج براساس میلی گرم کوئرستین در گرم عصاره بیان گردید (۶).

۲-۲-۹- اندازه گیری خاصیت آنتی اکسیدانی

به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره بره موم از ۲،۲ دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) استفاده گردید. یکی از روش‌های معمول برای ارزیابی پتانسیل مهار رادیکال آزادمولکول‌های‌آنتی‌اکسیدان،استفاده ازرادیکال‌آزاد DPPH است. اساس این روش بر مبنای احیای رادیکال آزاد DPPH به وسیله آنتی‌اکسیدان‌ها در غیاب سایر رادیکال‌های آزاد در محیط می‌باشدکه نتیجه این عمل موجب ایجاد رنگ در محیط می‌گردد که شدت آن با استفاده از دستگاه طیف سنجی قابل

1- Gas Chromatography / Mass Spectrometry
2- Folin–Ciocâlteu Reagent

اندازگیری است. در این روش ۰/۱ میلی لیتر از نمونه به ۳/۹ میلی‌لیترمحلول رادیکال DPPH (۰/۰۳۹گرم در۱ لیتر متانول) اضافه و به شدت مخلوط شد. پس از۳۰ دقیقه انکوباسیون در محیط تاریک در دمای اتاق، مقادیر جذب آنها در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. A_{sample}جذب‌عصاره‌بره‌موم و $A_{control}$ جذب محلول DPPH درمتانول است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه ها بر اساس درصد توانایی مهار ، با استفاده از (معادله ۱) محاسبه شد (۱۷) .

معادله (۱)

$$\%\ \text{Radical scavenging activity} = \frac{A_{sample} - A_{control}}{A_{control}} \times 100$$

۲-۲-۱۰- پراکندگی نور دینامیکی (DLS)[1]

برای تعیین میانگین اندازه ذرات، شاخص پراکندگی ذرات (PDI)[2] و همچنین مقدار پتانسیل زتای نانومولسیون های سنتز شده، از روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS) با استفاده از دستگاه (Malvern instruments, Zetasizer Nano ZS, UK) استفاده گردید. داده ها به صورت میانگین سه قرائت در قالب z-average (متوسط‌اندازه ذرات)، پتانسیل‌زتا وPDI به عنوان شاخص بدون بعد پراکندگی، در محدوده ۰ تا ۱ و مقادیر پایین‌ترثبت گردیدندکه نشان دهنده همگنی بیشتر سیستم از نظر اندازه ذرات فاز پراکنده است(۱۰). این روش که روشی فیزیکی برای تعیین توزیع ذرات موجود در محلول ها و سوسپانسیون‌هاست به برهمکنش نور با ذره بستگی دارد. در این روش، حرکت براونی ذرات که وابسته به اندازه آن هاست اندازه‌گیری می‌گردد، به این ترتیب که ذرات توسط نور لیزر تابش‌داده می‌شوند و شدت نوسانات نور پراکنده شده مورد آنالیز قرار می‌گیرد (۴).

۲-۲-۱۱- آنالیز آماری

آزمایشات‌فیزیکی‌وشیمیایی‌باسه‌تکرار انجام پذیرفتند و میانگین داده‌ها توسط آنالیزواریانس‌یک‌طرفه (One-way Anova) با سطح اطمینان ۹۵ درصد (P-value $\leq$0.05) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۳- نتایج و بحث

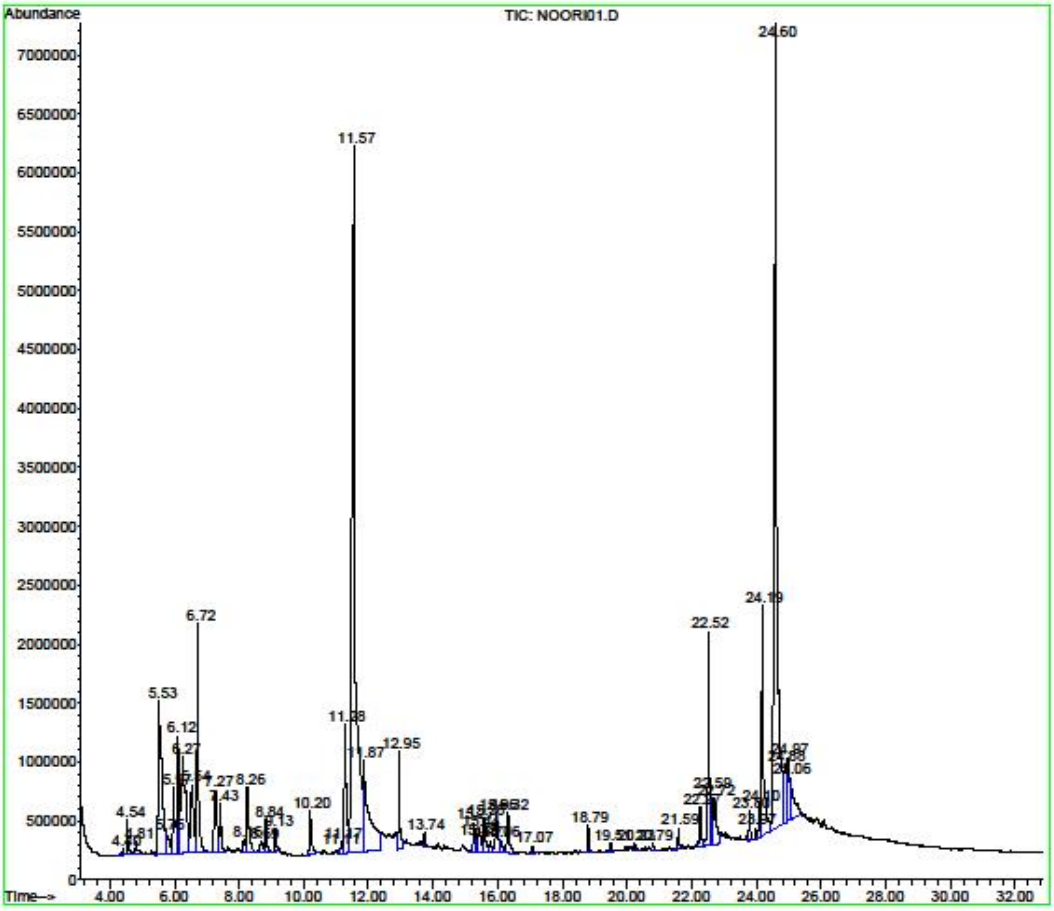
۳-۱- ویژگی‌های عصاره هیدروالکلی

عصاره هیدروالکلی با رنگ قهوه‌ای تیره پس از جداسازی حلال در دستگاه تبخیرکننده تحت خلاء حاصل گردید و نتایج نشان داد که میزان pH، بریکس و کدورت عصاره به ترتیب ۵، ۲۱ (Bx^o) و ۱/۷۵ درصد واحد جذب (a.u. %) می‌باشد.

۳-۲- نتایج شناسایی کیفی ترکیبات موثر بره موم

کروماتوگرام مربوط به آنالیز GC-MS برای پودر عصاره هیدروالکلی بره موم تهیه شده با استفاده ازخشک‌کن انجمادی در شکل (۱) آورده شده است. همانگونه که نتایج نشان می-دهد بیش از۵۰ ماده فعال، به صورت پیک های مجزا در پودر عصاره بره موم در مدت زمان ۳۲ دقیقه مشخص گردید که Dimethyl ،p-Methoxycinnamic acid ،Coumaran،Alpha-Terpinne caffeic acid و Pinostrobin chalcone پنج ماده مهم موجود در بره موم بودند که به ترتیب در زمان‌های۶/۷۲، ۱۱/۵۷، ۲۲/۵۲، ۲۴/۱۹و۲۴/۵۰دقیقه از دستگاه خارج گردید. Pinostrobin chalcone مهم‌ترین ماده موجود در بره موم بود که از دسته فلاونوئیدها می‌باشد و خواص آنتی اکسیدانی و بیولوژیکی بره موم، عمدتاً مربوط به این ماده می‌باشد (۲۰).

1 -Dynamic light Scattering
2 -Polydispersity Index



شکل ۱- کروماتوگرام GC-MS پودر عصاره بره موم

۳-۳-محتوای فنولی و فلاونوئیدی و خاصیت آنتی اکسیدانی پودر بره موم

نتایج آنالیزهای شیمیایی عصاره بره موم و پودر آن در جدول(۱) آورده‌شده‌است. یافته‌های مطالعه حاضر نشان دادند که ویژگی شیمیایی پودر بره موم (فنول کل، فلاونوئید وآنتی اکسیدان) از ویژگی‌های مشابه عصاره هیدروالکلی آن بیشتر است. آهنگری و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که ۷۰-۵۰ درصد بره موم را رزین، ۵۰-۳۰ درصد را موم، ۱۰-۵ درصد را گرده و مابقی آن را ترکیباتی نظیر اسیدهای آمینه، قندها، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی، موادمعدنی و ویتامین‌های B، C و E تشکیل داده و در حدود ۵درصدآن‌رطوبت‌می‌باشد. ترکیبات فنلی، گروهی از متابولیت های ثانویهٔ معطر (آروماتیک) گیاهی هستند که به صورت گسترده در سراسرگیاه، پخش شده‌اند و اثرات بیولوژیکی متعددی از قبیل فعالیت آنتی اکسیدانی و فعالیت ضدباکتریایی دارند. ترکیبات فنلی به دو دستهٔ چربی دوست و آبدوست‌تقسیم‌می‌شود.فلاونوئیدهابه شکل‌آزاد و گلیکوزیدی یافت می‌شوند و بزرگترین گروه فنل‌های موجود در طبیعت را تشکیل‌می‌دهند. فلاونوئیدها از مشتقات فنیل پروپانویید با ساختمان ۱۵کربنه هستند. این ترکیبات باعث افزایش مقاومت به عوامل بیماری زا در گیاهان می‌شوند. همچنین جذب‌کنندهٔ قوی اشعهٔ ماورای بنفش در محدوده (۳۴۰-۲۵۰) نانومتر می‌باشند. فلاونوئیدها از طریق مهار عنصرهای‌کاتالیز شده از اکسایش(اکسیداسیون)جلوگیری‌می‌نمایند.فلاونوئیدها مهارکنندهٔ

یاخته‌های‌سرطانی از راه بیان ژن، تقویت سیستم ایمنی بدن (آنتی‌اکسیدان، ضدویروس، ضدباکتری، ضدالتهاب، ضد آلرژی‌و ضدموتاسیون)، کاهش‌دهندهٔ نفوذپذیری و شکنندگی مویرگ‌ها می‌باشند (۱ و ۲۵). ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود در بره موم عامل اصلی خاصیت آنتی‌اکسیدانی بره موم می‌باشند. طی تحقیقی که روی بره موم انجام شد، میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی به ترتیب از ۵۹ تا ۴۹۳ و۱۳ تا ۳۷۹ میلی‌گرم برگرم (اسید گالیک) متغیر می‌باشد. همچنین عصاره هیدروالکلی بره موم دارای۷۰ میلی‌گرم برگرم اسید گالیک، محتوای فنولی می‌باشد (۱۸).

جدول ۱- آنالیز شیمیایی عصاره و پودر عصاره بره موم

ویژگی	عصاره بره موم	پودر بره موم
فنول کل (میلی‌گرم بر گرم بر حسب اسید گالیک)	۸۲/۵۲	۸٦/۹۳
فلاونوئید (میلی‌گرم بر گرم بر حسب اسید گالیک)	۳۰/۲۵	۳٤/۲۱
آنتی اکسیدان	۹۳/۳۲	۹۷/٦۸

۳-٤- ویژگیهای نانو امولسیون روغن درآب پودر بره موم

نانو امولسیون تهیه شده با استفاده از پودر بره موم و ساپونین (به عنوان امولسیفایر)، تحت شرایط آب مادون بحرانی در شکل (۲) نشان داده شده است.

شکل ۲- نانوامولسیون پودر بره موم

شفافیت نانوامواسیون تولید شده، نشان‌دهنده کوچک بودن اندازه ذرات بره موم پراکنده شده در سیستم آبی می‌باشد. نتایج نشان داد که نانو امولسیون تولید شده دارای اندازه ذره، شاخص‌پراکندگی و پتانسیل زتای به ترتیب ۸۶ نانومتر، ۰/۲۹۹ و ۲۳/۳۴- میلی‌ولت بود. در تحقیق مشابهی‌که قوامی و همکاران (۲۰۱۸) انجام دادند، نانوامولسیون روغن در آب عصاره الکلی بره موم در شرایط مشابه و نسبت‌های عصاره و ساپونین یکسان با تحقیق حاضر، تولید نمودند و نتایج نشان داد که‌نانوامولسیون‌تولیدشده‌دارای‌اندازه‌ذرات، شاخص پراکندگی و پتانسیل‌زتای به ترتیب۱۴۴/۶ نانومتر، ۰/۲۸۶ و ۲۱/۷۱ –

میلی‌ولت‌می‌باشد.پتانسیل زتا نیز از پارامترهای مهم و تاثیرگذار درخواص نهایی بوده و در تعیین پایداری نانومولسیون نیز نقش مهمی دارد. نانومولسیون پودر بره موم در آب، با توجه به اینکه ذرات چرب پودر در فاز پیوسته آب به صورت معلق می‌باشند، دارای بار سطحی بوده و همواره در اطراف سطح این ذرات، افزایش غلظت یون‌های با بار مخالف سطح ذره، دیده می‌شود. بنابراین یک لایه اضافی از این یون‌ها، سطح ذره را احاطه می‌کند و یک لایه اضافی را در دور ذره بوجود می‌آورد. وقتی ذره درون سیال حرکت می‌کند، لایه اطراف آن نیز به همراه ذره جابه جا می‌شوند و با ذره حرکت می‌کنند و می‌توان یک فاصله فرضی بین ذره و محیط سیال تصور کرد که این فاصله فرضی همان لایه مضاعفی است که ذره را احاطه کرده است. این فاصله را اصطلاحاً فاصله هیدرودینامیکی می‌نامند و پتانسیلی را که در این فاصله وجود دارد، به نام پتانسیل زتا می‌شناسند. در واقع پتانسیل زتا یک پارامتر برای ثبات بالقوه سیستم کلوئیدی می‌باشد. اگر همه ذرات داخل محلول دارای بار منفی و یا مثبت باشند، ذرات تمایل به دفع یکدیگر داشته و تمایلی به هم‌انباشتگی از خود نشان نمی‌دهند که این معیاری از پایداری محصول تولید شده می‌باشد. در واقع، هرچقدر مقدار عددی پتانسیل زتا بالاتر باشد، نانو امولسیون تولید شده از پایداری بالاتر برخوردار می‌باشد و بالعکس(۲۱ و۲۶). اندازه ذره، پراکندگی و یکنواختی نانو ذرات محصول تولید شده از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است، هر چه اندازه ذرات کوچک‌تر و یکنواختی ذرات تولید شده بالاتر باشد، محصول تولید شده خواص مطلوب‌تری داشته ودارای پایداری بیشتری خواهند بود. شاخص پراکندگی (PDI)، مرتبط با یکنواختی اندازه نانوذرات شکل‌گرفته در امولسیون می‌باشد و مقدار آن در محدوده ۰ تا ۱ قابل تغییر می‌باشد. هرچقدر عدد شاخص پراکنگی کوچکتر باشد، اندازه نانوذرات یکنواخت تر بوده و مطلوب می‌باشد (۲۱ و ۲۲).

٤- نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که با استفاده از خشک‌کن انجمادی می‌توان پودر عصاره بره موم از عصاره هیدروالکلی تولید نمود و آن را به مدت زمان طولانی در شرایط محیطی، با کیفیت بالا نگهداری‌نمود.آلکالوئیدها،اسیدهای‌آمینه،اسیدهای‌آروماتیک واسترهای‌آن‌ها، اسید های چرب و استرهای آن‌ها، فلاونوئیدها وترپن‌هامواد اصلی موجود در پودر بره موم تولیدشده می‌باشند که به راحتی‌می‌توان با استفاده از اتانول آن‌ها را استخراج نمود. به طور مشخص، Alpha-Terpinne، Coumaran، p-Methoxycinnamic acid، Dimethyl caffeic acid و Pinostrobin chalcone پنج ماده مهم موجود در پودر بره موم می‌باشند که چالکن‌ها مهم‌ترین ماده در بین آنها بوده و از دسته فلاونوئیدها می‌باشد و غالب خواص بیولوژیکی بره موم ازاین‌ماده ناشی می‌شود. نتایج نشان داد که عصاره هیدروالکلی و پودر تولیدشده آن توسط دستگاه خشک‌کن انجمادی دارای محتوای فنولی و فلاونوئیدی، و خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی می‌باشند. هرچند این خواص در داخل پودر، بالاتر از خواص درعصاره هیدروالکلی بره موم است. علت این موضوع‌می‌تواند به‌دلیل‌اثرات‌منفی‌حرارت‌برروی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی، در مرحله حذف حلال اشاره نمود.

٥-سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله، مراتب تشکر و قدردانی خود را ازکارشناسان دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز بابت همکاری ایشان در اجرای این مطالعه، اعلام می‌دارند.

٦-منابع

1. Ahangari Z, Naseri M, Vatandoost F. Propolis: chemical composition and its applications in endodontics. *Iranian Endodontic Journal*, 2018;13(3): 285.
2. Ahdno H Jafarizadeh-Malmiri H. Development of a sequenced enzymatically pre-treatment and filter

using clove hydroalcoholic extract and optimization of the process. *Green Processing and Synthesis*. 2020; 9(1): 375-385.
10. Azhdarzadeh F, Hojjati M. Chemical composition and antimicrobial activity of leaf, ripe and unripe peel of bitter orange (*Citrus aurantium*) essential oils. *Nutrition and Food Sciences Research*. 2016; 3(1): 43-50.
11. Azmir J, Zaidul I. S. M,, Rahman M. M, Sharif K. M, Mohamed A, Sahena F, Omar A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*. 2013; 117(4): 426-436.
12. Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005; 100(1-2): 114-117.
13. Bankova V. S, de Castro S. L, Marcucci, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*. 2000; 31(1): 3-15.
14. Banskota A. H, Tezuka Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research*. 2001; 15(7): 561-571.
15. Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. 2002; 73: 1-6.
16. Eskandari-Nojehdehi M, Jafarizadeh-Malmiri H, Rahbar-Shahrouzi J. Optimization of processing parameters in green synthesis of gold nanoparticles using microwave and edible mushroom (*Agaricus bisporus*) extract and evaluation of their antibacterial activity. *Nanotechnology Reviews*. 2016; 5(6): 537-548.
17. Ezazi A, Javadi A, Jafarizadeh-Malmiri H, Mirzaei H. Development of a chitosan-propolis extract edible coating formulation based on physico-chemical attributes of hens' eggs: Optimization and characteristics edible coating of egg using chitosan and pre-coating process to clarify date syrup. *Food and Bioproducts Processing*, 2017;101. 193-204.
3. Ahmadi O Jafarizadeh-Malmiri H. Green approach in food nanotechnology based on subcritical water: effects of thyme oil and saponin on characteristics of the prepared oil in water nanoemulsions. *Food Science and Biotechnology*. 2020; 29(6):783-792.
4. Ahmadi O, Jafarizadeh-Malmiri H, Jodeiri N. Eco-friendly microwave-enhanced green synthesis of silver nanoparticles using Aloe vera leaf extract and their physico-chemical and antibacterial studies. *Green Processing and Synthesis*. 2018; 7(3): 231-240.
5. Akca A. E, Akca G, Topçu F. T, Macit E, Pikdöken L, Özgen, I. Ş. The comparative evaluation of the antimicrobial effect of propolis with chlorhexidine against oral pathogens: An in vitro study. *BioMed Research International*, 2016; 2016-2120.
6. Alami M, Ghorbani M. Evaluation of total phenolic, flavonoid, anthocyanin compounds, antibacterial and antioxidant activity of hawthorn (*Crataegus Elbursensis*) fruit acetonic extract. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*. 2014; 13(1): 53-66.
7. Alencar S. M, Oldoni T. C, Castro M. L, Cabral I. S. R, Costa-Neto C. M, Cury J. A Ikegaki M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007; 113(2): 278-283.
8. Anarjan N, Jaberi N, Yeganeh-Zare S, Banafshehchin, E, Rahimirad A, Jafarizadeh- Malmiri H. Optimization of mixing parameters for α-tocopherol nanodispersions prepared using solvent displacement method. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 2014; 91(8):1397-405.
9. Anvarinezhad M, Javadi A, Jafarizadeh-Malmiri H. Green approach in fabrication of photocatalytic, antimicrobial, and antioxidant zinc oxide nanoparticles–hydrothermal synthesis

propolis. *Food Bioscience*. 2021; 40: 100894.

18. Galeotti F, Maccari F, Fachini A, Volpi N. Chemical composition and antioxidant activity of propolis prepared in different forms and in different solvents useful for finished products. *Foods*. 2018; 7(3): 41.
19. Ghavami-Lahiji M, Behroozibakhsh M, Kashi T. S. J. A review of applications of fourier transform infrared spectroscopy in dental research. *Journal of Dental Medicine*. 2018; 30(4): 243-253.
20. González-Martín M. I, Revilla I, Betances-Salcedo E. V, Vivar-Quintana A. M. Pesticide residues and heavy metals in commercially processed propolis. *Microchemical Journal*. 2018; 143: 423-429.
21. Jaberi N, Anarjan N, Jafarizadeh-Malmiri H. Optimization the formulation parameters in preparation of α-tocopherol nanodispersions using low-energy solvent displacement technique. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 2019;16(1): 201-241.
22. Jafari A, Anarjan N, Jafarizadeh-Malmiri H. Effects of rotation speed and time, as solvent removal parameters, on the physico-chemical properties of prepared α-tocopherol nanoemulsions using solvent-displacement technique. *Food Science and Biotechnology*. 2019; 1-8.
23. Oyinloye T. M Yoon W. B. Effect of freeze-drying on quality and grinding process of food produce: A review. *Processes*. 2020; 8(3):354.
24. Pobiega K, Kraśniewska K, Gniewosz M. Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality–A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2019; 83: 53-62.
25. Pourazadi L, Nehzati G. A, Ghaziani F, Abbasai S. Evaluation the quality and quantity of phenolic compound and antioxidant activity of propolis in the vicinity of Karaj. *Iranian Journal of Animal Science*. 2017; 47(4): 499-506.
26. Sayyar Z, Jafarizadeh-Malmiri H. Process intensification for curcumin nanodispersion preparation using subcritical water—Optimization and characterization. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*. 2020; 153: 107938.
27. Sayyar Z, Jafarizadeh-Malmiri H. Preparation of Curcumin Nanodispersions Using Subcritical Water–Screening of Different Emulsifiers. *Chemical Engineering & Technology*. 2020; 43(2):263-272.

(Original Research Paper)

Preparation of Propolis Hydroalcoholic Extract Nanoemulsion by Freeze Drying Technique and Evaluation of Its Physicochemical Properties as a Food Preservative

Farhan Ahadi[1], Afshin Javadi[1]*, Hoda Jafarizadeh-Malmiri[3], Navideh Anarjan[4], Hamid Mirzaie[5]

Ph.D Graduated of Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
Associate Professor, Faculty of Chemical Engineering, Sahand University of Technology, Tabriz, Iran.
Assistant Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
Associate professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

Received:29/11/2022 Accepted:10/01/2023

Abstract

Propolis as a by-product of bee activity has been known for its unique antioxidant properties and antimicrobial activity against broad range of microorganisms. In the present study, hydroalcoholic extract of propolis was prepared (the ratio of ethanol to the water was 80:20). After removing the solvent from the extract using a vacuum rotary evaporator, the dried powder of propolis was produced using a freeze dryer at -70 ºC after 40 h. Also, the nanoemulsion of propolis was synthesized using the powder. GC-MS analyses of samples showed numerous phenolic and flavonoid compounds in the produced powder. Total phenolic and flavonoid contents, and antioxidant activity of the produced nanoemulsion were 86.93, 34.21 (mg/ g gallic acid), and 97.68 %, respectively. The particle size, polydipersity index and zeta potential in the nanoemulsion were 86 nm, 0.299 and -23.34 mV, respectively. The results of this study showed that the hydroalcoholic extract and powder of propolis prepared by the freeze drying method had high phenolic and flavonoid content and antioxidant properties. However, these properties in the powder were higher than that was detected for the hydroalcoholic extract. According to the findings of this study, using a freeze dryer, it is possible to produce the powder of propolis hydroalcoholic extract with spherical and nano-sized particles, which can easily be applicable as a preservative in the food industry.

Keywords: Freeze Dryer, Hydroalcoholic Extract, Physicochemical Properties, Propolis.

*Corresponding Author: Javadi@jaut.ac.ir