

بررسی فعالیت ضد میکروبی ماکرومولسیون و نانومولسیون اسانس گیاه *Salvia chorassanica* علیه میکروارگانسیم‌های بیماری‌زا و عامل فساد غذایی در شرایط آزمایشگاهی

اعظم مهربان^۱، محسن وظیفه دوست^{۱*}، زهره دیدار^۱، محمد حسین حدادخداپرست^۲، معصومه مهربان سنگ آتش^۳

۱. گروه علوم و صنایع غذایی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران.

۲. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۳. گروه پژوهشی کیفیت و ایمنی مواد غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی، جهاد دانشگاهی مشهد، مشهد، ایران.

* نویسنده مسئول: m.vazifedoost@iau-neyshabur.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۲۴

چکیده

در این مطالعه شناسایی ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس گیاه *Salvia chorassanica* به روش GC-MS انجام گرفت. سپس نانومولسیون اسانس به روش اولتراسوند تهیه شد و پایداری اندازه ذرات آن در طی دو هفته نگهداری در دمای محیط توسط DLS مورد ارزیابی قرار گرفت. فعالیت ضد میکروبی ماکرومولسیون و نانومولسیون اسانس *S. chorassanica* علیه شش باکتری بیماری‌زا و سه کپک عامل فساد غذایی به روش میکروداپلوشن بررسی شد. نتایج نشان داد اسانس مذکور دارای ۲۰ ترکیب شیمیایی مختلف بود. اندازه ذرات نانومولسیون در طی دو هفته از ۹۱/۸۳ به ۱۹۳/۶۱ نانومتر افزایش یافت. فرم نانومولسیون اسانس اثر ضد میکروبی بیشتری در مقایسه با ماکرومولسیون آن علیه همه میکروارگانسیم‌های مورد مطالعه داشت. همچنین اثر ضد میکروبی ماکرومولسیون و نانومولسیون اسانس بر باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از گرم منفی بود. در بین باکتری‌های بیماری‌زا، باکتری گرم مثبت *Bacillus cereus* بیشترین حساسیت را به نانومولسیون اسانس نشان داد و دارای کمترین MIC، ۳/۱۲۵ µl/ml بود. به علاوه، MIC و MFC نانومولسیون اسانس علیه هر سه کپک به ترتیب ۶/۲۵ µl/ml و ۱۲/۵ µl/ml تعیین شد. بدین ترتیب غلظت موثره کمتری از اسانس در فرم نانومولسیون برای کنترل میکروارگانسیم‌های مواد غذایی مورد نیاز خواهد بود و از اثرات سوء به کارگیری غلظت‌های بالای اسانس جلوگیری می‌شود.

کلید واژه‌ها: *Salvia chorassanica*، اسانس، نانومولسیون، فعالیت ضد باکتریایی، فعالیت ضد کپکی.

مقدمه

از نگهدارنده‌های شیمیایی در مواد غذایی است. در دهه‌های اخیر با توجه به افزایش آگاهی مصرف کنندگان از اثرات سوء نگهدارنده‌های شیمیایی از جمله سرطان‌زایی آن‌ها، تمایل به مصرف مواد غذایی حاوی نگهدارنده‌های طبیعی افزایش یافته است (Skandamis et al., 2001). اسانس‌های گیاهی از جمله نگهدارنده‌های طبیعی که در صنایع مختلف دارویی، بهداشتی، آرایشی و غذا کاربرد گسترده‌ای پیدا کرده‌اند. اسانس‌ها ترکیبات روغنی حاوی مخلوطی از هزاران ترکیب معطر مختلف هستند که از اندام‌های مختلف گیاهی به عنوان متابولیت ثانویه استخراج می‌شوند (Monu

بر طبق آمارهای منتشر شده از سوی سازمان جهانی بهداشت (WHO) سالانه افراد بسیاری در سراسر جهان جان خود را در اثر بیماری‌های ناشی از غذا از دست می‌دهند. همچنین مصرف بی رویه آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به ظهور گونه‌های میکروبی مقاوم شده‌است. از سویی دیگر فساد مواد غذایی علاوه بر تهدید سلامت مصرف کنندگان، ضررهای اقتصادی بسیاری را بر کشورها تحمیل می‌کند (Burt, 2004). یکی از دغدغه‌های اصلی کشورهای مختلف همواره تولید و عرضه غذای سالم می‌باشد. یکی از روش‌های مقابله با میکروارگانسیم‌های بیماری‌زا و عامل فساد استفاده

عصاره گونه‌های مختلف سالویا در مطالعات پیشین گزارش شده است (سلیم پور و همکاران، ۱۳۹۲، نجفی و همکاران، ۱۳۹۳، مهربان و همکاران، ۱۳۹۵، قره نقده و همکاران، ۱۳۹۶).

استفاده از اسانس در مواد غذایی با مشکلاتی مواجه است که از آن جمله می‌توان به حلالیت پایین آن‌ها در آب، فراریت بالا و خواص ارگانولپتیک ناخوشایند اشاره کرد. انکیپسولاسیون اسانس‌ها به فرم امولسیون روغن در آب راه کار پیشنهادی برای غلبه بر مشکلات مذکور است. براساس نتایج حاصل از مطالعات قبلی تغییر شکل اسانس‌ها به فرم نانومولسیون، فعالیت ضد میکروبی آن‌ها را افزایش می‌دهد که این موضوع در مورد تقاضای مصرف‌کنندگان برای استفاده از مواد غذایی حاوی مواد نگهدارنده کمتر، حائز اهمیت خواهد بود (Otoni et al., 2014). نانومولسیون‌ها دارای ذراتی با قطر ۱۰ تا ۲۰۰ نانومتر یکی از موفق‌ترین سیستم‌هایی هستند که به عنوان حامل ترکیبات لیپوفیل مانند داروها، طعم‌دهنده‌ها، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Rao et al., 2008; McClements., 2011). نانومولسیون‌ها از یک فاز روغنی که در فاز آبی پراکنده می‌گردد تشکیل می‌شوند که قطره روغن توسط لایه میانی نازکی از مولکول‌های سورفاکتانت یا آمفلیک احاطه می‌شود که به پایداری نانومولسیون کمک می‌نماید (Borin et al., 2016). کوچک شدن اندازه فاز روغنی اسانس در ساختار نانومولسیون و افزایش سطح آن موجب افزایش کارایی آن شده است به طوری که مطالعه ناصر زاده و همکاران (۲۰۱۹) نشان داد که فعالیت ضدکپکی نانومولسیون اسانس دارچین در بازداری از رشد کپک‌های عامل فساد توت فرنگی (*B. cinerea* و *R. stolonifera*) در سطح محیط کشت بیشتر از ماکرومولسیون آن بود (Naserzadeh et al., 2019). قره نقده و همکاران (۱۳۹۶) نیز فعالیت

(et al., 2016). خواص ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی اسانس‌های گیاهی مختلف در مطالعات بسیاری در گذشته گزارش شده است. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که اثر ضد میکروبی اسانس‌ها بسته به گونه گیاهی که استخراج می‌شوند، متفاوت بوده و به ترکیبات تشکیل دهنده آن‌ها بستگی دارد. خواص بیولوژیک اسانس‌ها به گونه گیاهی، شرایط اقلیمی، محل رویش، زمان برداشت و نوع اندام گیاهی شامل گل، برگ و ساقه بستگی دارد (Stević et al., 2014).

گیاه مریم گلی با نام علمی سالویا (*Salvia*) متعلق به تیره نعناعیان است که اغلب در مناطق گرم و معتدل می‌روید. جنس سالویا دارای ۹۰۰ گونه مختلف در جهان می‌باشد که ۱۷ گونه آن بومی ایران است. گونه *Salvia chorassanica* یکی از گونه‌های گیاهی بومی ایران است که تنها در خراسان رضوی رشد می‌کند. این گیاه از لحاظ گیاه شناسی، گیاهی علفی چند ساله با قاعده چوبی، به ارتفاع ۴۵ تا ۶۰ سانتی-متر، با ساقه‌های متعدد افراشته ساده و یا منشعب پوشیده از کرک‌های کوتاه غده‌دار می‌باشد. *Salvia chorassanica* در ناحیه گل آذین دارای کرک‌های بلند چند سلولی است. زمان گل‌دهی این گیاه در بهار بوده و رویشگاه آن در دامنه‌های صخره‌ای و سنگی می‌باشد. پراکندگی جغرافیایی این گیاه منحصر در شمال شرق ایران در خراسان می‌باشد که بیشتر در مشهد در منطقه بالای ده زشک، در نیشابور در قسمت شیب جنوبی و شمالی کوه بینالود و در درگز در ارتفاعات شمالی گردنه الله اکبر یافت می‌شود (Weiss and Fintelmann, 2000). ارزیابی شیمیایی گونه‌های مختلف سالویا نشان داده‌است که حضور فلاونوئیدها، تری-ترپنوئیدها و اسانس‌های روغنی در این گیاه دلیل ایجاد خواص ضدتوموری، ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، سیتوتوکسیک و ضد التهابی آن می‌باشند (Tayarani et al., 2011). خواص ضد میکروبی اسانس و

با استفاده از دستگاه کلونجر، اسانس روغنی و فرار گیاه به روش تقطیر با آب استخراج شد. اسانس به دست آمده به کمک سولفات سدیم خشک، آبگیری و پس از عبور از میکروفیلتر ۰/۴۵ میکرومتر در ظرف شیشه‌ای تیره به دور از نور خورشید در دمای ۴ درجه‌ی سلسیوس تا زمان آزمون-های بعدی نگهداری گردید. پس از اسانس گیری بازده اسانس نسبت به وزن گیاه خشک از فرمول زیر محاسبه شد (سلیم پور و همکاران، ۱۳۹۲).

$100 \times \text{وزن گیاه خشک} / \text{وزن اسانس} = \text{بازده اسانس}$

شناسایی ترکیبات اسانس گیاه *S. chorassanica* جهت شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس از دستگاه گاز کروماتوگرافی جفت شده با طیف سنج جرمی (GC/MS) استفاده شد. ابتدا نمونه‌ی اسانس به دستگاه کروماتوگرافی گازی جفت شده با دستگاه طیف سنج جرمی (GC/MS¹) مدل HP-5MS با ستون موبینه‌ی به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه‌ی نازک داخلی ۰/۲۵ میکرومتر تزریق شد. گاز هلیوم با درصد خلوص ۹۹/۹۹ و با سرعت جریان یک میلی‌متر بر دقیقه و انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت انتخاب گردید. در این مطالعه برنامه‌ی دمایی ستون در ابتدا به صورت ۷۰ درجه‌ی سلسیوس با توقف دو دقیقه در این دما، سپس افزایش دما تا ۲۲۰ درجه‌ی سلسیوس با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه و افزایش دمای ستون تا ۳۰۰ درجه‌ی سلسیوس به مدت دو دقیقه تنظیم گردید. نسبت اسپلیت نیز ۱ به ۳۰ بود. زمان کل آزمون ۲۵ دقیقه بود (Adams., 2007).

تهیه نانوامولسیون اسانس گیاه *S. chorassanica* به منظور تهیه نانوامولسیون روغن در آب اسانس *S. chorassanica*، نسبت‌های مختلف از اسانس (۱۰ درصد وزنی)، امولسی‌فایر توئین ۸۰ (۱۰ درصد وزنی) و آب مقطر

ضدباکتریایی بیشتر نانوامولسیون اسانس گیاه *hydrangea* S. را در مقایسه با فرم آزاد آن را علیه چهار باکتری بیماری-زا و عامل فساد غذایی گزارش کردند. با توجه به این که در زمینه ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضد میکروبی اسانس گونه گیاهی *Salvia chorassanica* اطلاعاتی موجود نمی‌باشد. هدف از این مطالعه استخراج و شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس *S. chorassanica* و همچنین تولید نانوامولسیون آن با استفاده از اولتراسوند و مقایسه فعالیت ضدباکتریایی و ضدکپکی ماکرومولسیون و نانوامولسیون اسانس علیه میکروارگانسیم‌های بیماری‌زا و عامل فساد مواد غذایی است.

مواد و روش کار

مواد

سورفاکتانت توئین ۸۰، محیط کشت‌های Muller Hinton Nutrient Agar، broth، Potato Dextrose broth و Potato Dextrose Agar از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. گیاه *S. chorassanica* از ارتفاعات منطقه زشک شهرستان مشهد، استان خراسان رضوی جمع آوری و با همکاری آزمایشگاه سیستماتیک گیاهی دانشکده علوم پایه و پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد توسط جوهرچی با شماره هرباریوم ۱۱۲۸۹ مورد شناسایی قرار گرفت. اندام هوایی این گیاه در شرایط مناسب و در سایه خشک شدند. باکتری‌ها و کپک‌های مورد استفاده در این پژوهش از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی مشهد تهیه شدند.

استخراج اسانس گیاه *S. chorassanica* جهت تهیه اسانس گیاه *S. chorassanica*، ابتدا گیاه پس از مرحله گل‌دهی در نیمه تیرماه ۹۸ از کوه‌های زشک حوالی مشهد جمع‌آوری شده و در سایه خشک گردید. سپس ۲۰۰ گرم گیاه خشک را خرد و آسیاب کرده و سپس

¹ Gas chromatography-mass spectrometry

در این معادله $d(V, 10)$ ، $d(V, 50)$ و $d(V, 90)$ قطر ذرات به ترتیب در ۱۰، ۵۰ و ۹۰ درصد حجم تجمعی می‌باشد (Sadeghian et al., 2013).

ارزیابی پایداری نانومولسیون اسانس *S. chorassanica* به منظور تعیین پایداری ذاتی نانومولسیون تولیدی پس از دو هفته نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، اندازه ذرات نانومولسیون در روزهای صفر، سه، شش، نه، ۱۲، ۱۵ توسط دستگاه DLS یا سنجش‌گر اندازه ذرات مشخص گردید (Robledo et al., 2018). تعیین خواص ضد میکروبی اسانس و نانومولسیون اسانس *S. chorassanica* به روش میکرودایلوشن

تعیین خواص ضدباکتریایی

در مطالعه حاضر فعالیت ضد میکروبی ماکرومولسیون و نانومولسیون اسانس *S. chorassanica* علیه سویه‌های باکتریایی شامل *Bacillus cereus* (ATCC 11778)، *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433)، *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)، *Escherichia coli* (ATCC 25922)، *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352) و *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) به عنوان باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بیماری‌زا مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت فعالسازی اولیه باکتری‌های مذکور ابتدا از کشت ذخیره آن‌ها در محیط کشت Nutrient Broth تلقیح شد سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. جهت فعالسازی مجدد هریک از باکتری‌ها نیز ۱۰۰ میکرولیتر از کشت فعال ۲۴ ساعته آن‌ها به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت تازه استریل تلقیح شده و در گرمخانه به مدت یک شب قرار گرفت. سپس جهت تعیین حداقل غلظت بازاری و حداقل غلظت کشندگی از میکروپلیت ۹۶ خانه استفاده شد. ابتدا استوک ماکرومولسیون و نانومولسیون اسانس در محیط کشت مایع

(۸۰ درصد وزنی) تحت شرایط همزدن مداوم در دمای اتاق با سرعت بالا توسط همزن مغناطیسی به مدت ۵ دقیقه مخلوط شدند. سپس از هموژنایزر اولتراتوراکس با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت سه دقیقه جهت هموژن کردن استفاده شد. جهت کوچک‌تر شدن اندازه ذرات مولسیون حاصل به مدت پنج دقیقه تحت اولتراسوند (توان اسمی ۷۵۰ وات و فرکانس ۲۰ کیلوهرتز) قرار گرفت. انتقال امواج فراصوت توسط یک مولد پیژوالکتریک با قطر ۱۹ میلی‌متر در عمق دو سانتی‌متری زیر سطح نمونه انجام گرفت. همچنین برای کنترل دما در طول مدت مولسیون-سازی از یک حمام یخ استفاده گردید. مولسیون تهیه شده در ظروف در پیچ‌دار تا زمان آزمون‌های بعدی در یخچال نگهداری شد (Li et al., 2018).

تعیین اندازه ذرات نانومولسیون

از جمله عوامل موثر در پایداری مولسیون‌ها، اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات مولسیون می‌باشد. اندازه‌گیری متوسط قطر (D_{43}) و توزیع اندازه ذرات مولسیون توسط دستگاه DLS یا سنجش‌گر اندازه ذرات که پراکنش و شکست نور لیزر را بر مبنای مدل لورنز-می و تئوری فرانیهوفر به اندازه ذرات مربوط می‌سازد، صورت گرفت. جهت محاسبه میانگین اندازه ذرات از رابطه زیر استفاده شد:

$$D_{43} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3}$$

در عبارت فوق n_i تعداد ذرات

با قطر d_i است. توزیع اندازه ذرات نیز از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{Span} = \frac{[d(V, 90) - d(V, 10)]}{d(V, 50)}$$

در هر میلی‌لیتر آب مقطر توسط لام هموسایتومتر در زیر میکروسکوپ شمارش گردید. سپس جهت تعیین حداقل غلظت بازاری و حداقل غلظت کشندگی از میکروپلیت ۹۶ خانه استفاده شد. میزان ۲۰ ماکرولیترا از سوسپانسیون اسپور هر کپک با غلظت 10^5 spore/ml به هر چاهک دارای محیط کشت مایع Potato Dextrose حاوی غلظت‌های مختلف ماکرومولسیون و نانومولسیون اسانس ($1/10^5$ ، $1/10^4$ ، $1/10^3$ ، $1/10^2$ ، $1/10^1$) تلقیح شد. حجم نهایی هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد. از چاهک‌های حاوی محیط کشت PDB و اسپور کپک به عنوان کنترل مثبت جهت تایید رشد کپک استفاده شد. از چاهک‌های حاوی محیط کشت و اسانس فاقد اسپور کپک نیز به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. سپس میکروپلیت در اینکوباتور ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت. کمترین غلظت اسانس که مانع رشد کپک شد و کدورتی در آن مشاهده نگردید به عنوان MIC در نظر گرفته شد. جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی یا MFC نیز مقدار ۱۰ ماکرولیترا از هر یک از چاهک‌هایی که رشد کپک مشاهده نگردید بر روی محیط کشت PDA منتقل شد و رشد کپک در طول ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس بررسی گردید. غلظتی از اسانس که هیچ گونه رشد کپکی مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد (Bedoya-Serna et al., 2018).

روش آماری

تمامی آزمون‌ها در این مطالعه با سه تکرار براساس طرح کاملاً تصادفی انجام شدند. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون واریانس یک طرفه و جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح معنادار پنج درصد استفاده شد. تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام گرفت.

Muller Hinton حاوی ۵ درصد دی متیل سولفوکسید (DMSO) با غلظت مشخص تهیه گردید. سپس آماده سازی بقیه غلظت‌های ماکرومولسیون و نانومولسیون اسانس ($1/10^5$ ، $1/10^4$ ، $1/10^3$ ، $1/10^2$ ، $1/10^1$) از طریق رقت سازی سریالی در چاهک‌های میکروپلیت حاوی محیط کشت مایع Muller Hinton انجام شد. در نهایت میزان ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی با غلظت معادل 10^8 CFU/ml به هریک از چاهک‌ها اضافه شد. حجم نهایی هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد. چاهک‌های حاوی محیط کشت و باکتری و فاقد اسانس به عنوان کنترل مثبت و چاهک‌های حاوی محیط کشت و اسانس فاقد باکتری به عنوان کنترل منفی استفاده شد. میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. پس از طی زمان مذکور کدورت چاهک‌ها مورد بررسی قرار گرفت، اولین چاهک فاقد کدورت به عنوان کمترین غلظت مهارکننده رشد (MIC) تعیین شد. سپس برای تعیین حداقل غلظت کشندگی میزان پنج میکرولیتر از چاهک MIC و غلظت‌های بالاتر آن به سطح محیط کشت Nutrient Agar موجود در پلیت منتقل شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه قرار گرفت. اولین غلظتی که در آن کلنی حاصل از رشد باکتری مشاهده نشد به عنوان MBC تعیین شد (نجفی و همکاران، ۱۳۹۴).

تعیین خواص ضدکپکی

در این پژوهش کپک‌های *Aspergillus niger*، *Botrytis cinerea* و *Rhizopus stolonifer* از مرکز کلکسیون میکروبی جهاد کشاورزی تهران، ایران تهیه شدند. جهت تعیین خواص ضدکپکی ماکرومولسیون و نانومولسیون اسانس، ابتدا سوسپانسیون اسپور کپک‌ها در لوله حاوی آب مقطر استریل دارای توئین ۸۰ ($0/05$ درصد) آماده شده و در نهایت پس از شیک نمودن تعداد اسپورها

نتایج

MS انجام گرفت. جدول ۱، نام ترکیبات موجود در اسانس، زمان بازداری و درصد آنها را به ترتیب خروج از دستگاه GC-MS نشان می‌دهد. در مجموع ۲۰ ترکیب مختلف در اسانس *S. chorassanica* شناسایی شد. آنالیز ترکیبات مختلف موجود در اسانس نشان داد که Caryophyllene (۳۷/۶ درصد)، Germacrene D (۱۵/۶۳ درصد)، Bicyclogermacrene (۱۱/۸۱ درصد)، Caryophyllene oxide (۷/۸۸ درصد)، Spathulenol (۷/۵۷ درصد) و Terpinolene (۳/۴۹ درصد) به ترتیب بیشترین ترکیبات اسانس *S. chorassanica* را تشکیل می‌دهند.

شناسایی ترکیبات اسانس *S. chorassanica* استخراج اسانس گیاه *S. chorassanica* پس از گل‌دهی به وسیله دستگاه کلونجر انجام گرفت. در این پژوهش از ۲۰۰ گرم برگ خشک شده گیاه *S. chorassanica* میزان ۰/۷ گرم اسانس تهیه شد، بنابراین بر طبق فرمول مربوطه بازده اسانس ۰/۳۵ درصد (w/w) تعیین شد. اسانس استخراج شده در دمای چهار درجه سلسیوس و به دور از نور در ظروف تیره تا زمان انجام آزمون‌های بعدی نگهداری شد. شناسایی ترکیبات اسانس *S. chorassanica* توسط دستگاه GC-

جدول ۱- ترکیبات شناسایی شده در اسانس گیاه *S. chorassanica* با دستگاه GC/MS

ردیف	نام ترکیب	زمان بازداری	درصد
۱	Terpinolene	۷/۲۹	۳/۴۹
۲	Linalool	۷/۶۲	۱/۰۵
۳	p-Cymen-8-ol	۹/۸۸	۰/۴۸
۴	β -Cyclocitral	۱۱/۲۲	۰/۳۸
۵	Elemene isomer	۱۳/۶۸	۱/۳۱
۶	Copaene	۱۴/۸۱	۱/۰۵
۷	(-)- β -Bourbonene	۱۵/۰۲	۰/۹۵
۸	Isogermacrene D	۱۵/۱۵	۱/۵۶
۹	Caryophyllene	۱۵/۹۳	۳۷/۶۰
۱۰	Humulene	۱۶/۸	۱/۴۲
۱۱	Germacrene D	۱۷/۴۳	۱۵/۶۳
۱۲	Bicyclogermacrene	۱۷/۷۹	۱۱/۸۱
۱۳	β -Cadinene	۱۸/۳۲	۰/۹۸
۱۴	Dihydroagarofuran	۱۸/۴۴	۰/۷۱
۱۵	Spathulenol	۱۹/۷	۷/۵۷
۱۶	Caryophyllene oxide	۱۹/۸۲	۷/۸۸
۱۷	Epiglobulol	۲۰/۱۲	۰/۶۶
۱۸	(-)-Spathulenol	۲۰/۹۸	۰/۹۰
۱۹	β -Eudesmol	۲۱/۴۹	۲/۰۱
۲۰	Isoaromadendrene epoxide	۲۱/۸۳	۰/۵۲
	Total		۹۷/۹۵

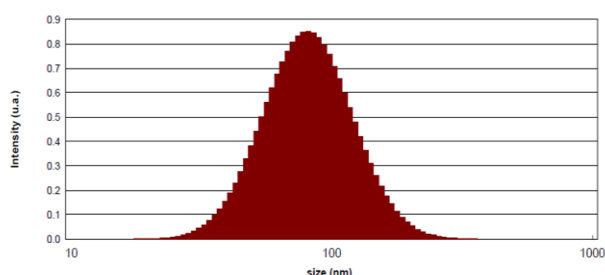
اندازه ذرات نانومولسیون اسانس و پایداری آن

بیشتر باشد ناپایداری است. شکل ۱ (الف و ب) نمودار توزیع اندازه ذرات نانوامولسیون در روز اول و پس از ۱۵ روز را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، منحنی توزیع اندازه ذرات به صورت تک قله بوده که نشان‌دهنده یکنواختی توزیع اندازه ذرات می‌باشد. با این حال پهنای منحنی‌ها تا حدودی متفاوت است و بیشترین گستردگی در منحنی روز پانزدهم مشاهده می‌شود که موید پراکندگی وسیع‌تر اندازه ذرات در نانوامولسیون در پایان دو هفته نگهداری در یخچال می‌باشد. اصولاً کاهش پهنای منحنی توزیع اندازه ذرات به معنای کوچک بودن دامنه نوسان ذرات و نزدیکی اندازه آن‌ها به هم است و از شاخص‌های مهم در تعیین پایداری امولسیون محسوب می‌شود. علاوه بر این منحنی روز پانزدهم به سمت راست کشیده شده که نشان‌دهنده افزایش اندازه ذرات نانوامولسیون با گذشت زمان است

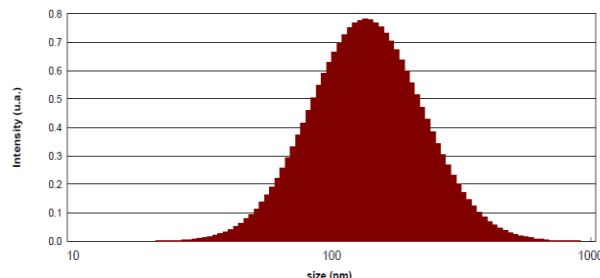
در این مطالعه به منظور پایش پایداری فیزیکی نانوامولسیون اسانس *S. chorassanica* اندازه ذرات نانوامولسیون توسط دستگاه DLS در طی دو هفته اندازه‌گیری شد. بر طبق جدول ۲، میانگین اندازه ذرات نانوامولسیون تولیدی در این مطالعه در روز اول برابر با $8/31 \pm 91/83$ نانومتر بود. نتایج نشان داد که زمان نگهداری در پایداری نانوامولسیون تاثیر گذار است. با افزایش زمان نگهداری نانوامولسیون اسانس *S. chorassanica* در یخچال اندازه ذرات آن افزایش یافت، به طوری که پس از دو هفته میانگین اندازه ذرات نانوامولسیون به $191/61 \pm 6/51$ نانومتر افزایش یافت. علاوه بر این محدوده توزیع نانوامولسیون اسانس *S. chorassanica* در طول زمان نگهداری بین $1/08 \pm 0/43$ و $2/28 \pm 0/36$ متفاوت بود. هرچه محدوده توزیع اندازه ذرات نانوامولسیونی

جدول ۲- میانگین اندازه ذرات و عدد اسپان نانوامولسیون اسانس *S. chorassanica* در طی دو هفته نگهداری دمای ۲۵ درجه سلسیوس.

روز						
۱۵	۱۲	۹	۶	۳	۰	
$193/9 \pm 61/75$	$174/9 \pm 19/3$	$143/8 \pm 26/8$	$131/9 \pm 66/47$	$108/8 \pm 39/06$	$91/8 \pm 83/81$	اندازه ذرات (نانومتر)
$2/0 \pm 28/36$	$2/0 \pm 21/21$	$2/0 \pm 11/3$	$1/0 \pm 58/32$	$1/0 \pm 23/36$	$1/0 \pm 08/43$	عدد اسپان



الف



ب

شکل ۱- نمودار توزیع اندازه ذرات نانوامولسیون اسانس *S. chorassanica* در طی نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس. روز اول (الف) و روز پانزدهم (ب).

نانومولسیون اسانس در برابر باکتری *B. cereus* با حداقل غلظت مهارکنندگی $3/125 \mu\text{l/ml}$ مشاهده شد.

فعالیت ضدکپکی

در مطالعه حاضر نتایج بررسی اثر ضدکپکی ماکرومولسیون و نانومولسیون اسانس در آزمون میکرودايلوشن نشان داد که با کاهش اندازه ذرات اسانس *S. chorassanica* خواص ضدکپکی آن علیه سه کپک عامل فساد غذایی افزایش می‌یابد. به طوری که حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MFC) نانومولسیون اسانس نسبت به اسانس به نصف کاهش یافت. حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس *S. chorassanica* علیه کپک *R. stolonifer* و *B. cinere* به ترتیب $12/5$ و $25 \mu\text{l/ml}$ و $25/61$ و $12/5 \mu\text{l/ml}$ بود. به طور کلی در بین اثر ضدکپکی اسانس *S. chorassanica* علیه سه کپک مورد آزمون تفاوتی مشاهده نشد، اما کپک *A. niger* در مقایسه با دو کپک دیگر بیشترین MFC و مقاومت در مقابل نانومولسیون اسانس *S. chorassanica* را نشان داد.

فعالیت ضد میکروبی ماکرومولسیون و نانومولسیون اسانس *S. chorassanica* فعالیت ضدباکتریایی

جهت مقایسه فعالیت ضد میکروبی ماکرومولسیون و نانومولسیون اسانس *S. chorassanica* از روش میکرودايلوشن استفاده شد. نتایج ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی و ضدکپکی آن‌ها به ترتیب در جدول ۳ و ۴ مشاهده می‌گردد. بر این اساس افزایش فعالیت ضد میکروبی با کاهش حداقل غلظت بازدارندگی نانومولسیون در مقایسه با فرم ماکرومولسیون اسانس در برابر تمام میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه مشاهده گردید. به طوری که میزان حداقل غلظت بازدارندگی یا MIC نانومولسیون اسانس در بسیاری از موارد نصف میزان ماکرومولسیون اسانس بود. علاوه بر این باکتری‌های گرم مثبت شامل *B. cereus*، *E. faecalis* و *S. aureus* در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی شامل *E. coli*، *K. pneumoniae* و *S. typhimurium* از حساسیت بیشتری در برابر هر دو فرم اسانس *S. chorassanica* برخوردار بودند. بیشترین اثر ضدباکتریایی

جدول ۳- حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) ماکرومولسیون و نانومولسیون اسانس *S. chorassanica* علیه باکتری‌های بیماری‌زا.

نانومولسیون اسانس ($\mu\text{l/ml}$)		اسانس ($\mu\text{l/ml}$)		باکتری
MBC	MIC	MBC	MIC	
12/5	3/125	25	12/5	<i>Bacillus cereus</i>
12/5	6/25	25	12/5	<i>Enterococcus faecalis</i>
25	12/5	25	25	<i>Staphylococcus aureus</i>
50	25	50	50	<i>Escherichia coli</i>
50	25	50	50	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
25	12/5	50	50	<i>Salmonella typhimurium</i>

جدول ۴- حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MFC) ماکرومولسیون و نانومولسیون اسانس *S. chorasunica* علیه کپک‌های عامل فساد مواد غذایی.

نانومولسیون اسانس (µl/ml)		اسانس (µl/ml)		کپک
MFC	MIC	MFC	MIC	
۲۵	۶/۲۵	۲۵	۱۲/۵	<i>A. niger</i>
۱۲/۵	۶/۲۵	۲۵	۱۲/۵	<i>R. stolonifer</i>
۱۲/۵	۶/۲۵	۲۵	۱۲/۵	<i>B. cinere</i>

بحث

هوایی محل رشد گیاه، روش استخراج اسانس و همچنین مرحله رشد گیاه بستگی دارد (Shahbazi et al., 2016). اسانس‌ها به دلیل حلالیت پایین و ایجاد بو و مزه شدید در سیستم‌های غذایی کاربرد اندکی دارند و تغییر شکل آن‌ها به فرم نانومولسیون منجر به افزایش کارایی آن‌ها و غلبه بر مشکلات مذکور می‌گردد. نانومولسیون‌ها همانند امولسیون‌های متداول، سیستم‌های نسبتاً پایدار هستند و در اثر فرایندهای فیزیکی شیمیایی مختلف مانند تفکیک گرانشی (Gravitational Separation)، انبوهش (Coalescence)، ادغام (Flocculation) و رسیدگی استوالد (Ostwald Ripening) دچار ناپایداری می‌شوند. برخلاف سایر سیستم‌های امولسیونی نانومولسیون‌ها در برابر پدیده‌های انبوهش و تفکیک گرانشی قطرات پایدارتر بوده ولی به دلیل کوچکی اندازه ذرات مستعد شکست در اثر رسیدگی استوالد هستند (McClements & Rao et al., 2011). استفاده از سورفاکتانت‌هایی مانند توئین ۸۰ با کاهش سرعت انتشار مولکول‌های فاز پراکنده، رسیدگی استوالد را کاهش می‌دهد (Schramm., 2006). در این پژوهش طی دو هفته نگهداری نانومولسیون در دمای محیط اندازه ذرات آن افزایش یافت. به طور مشابه در مطالعه‌ای دیگر قره نقده و همکارانش (۱۳۹۶) از روش اولتراسوند و غلظت‌های مختلف سورفاکتانت‌های توئین ۸۰ و اسپن ۸۰ جهت تهیه نانومولسیون‌های اسانس *S. hypoleuca* استفاده کردند.

در دهه‌های اخیر با توجه به اطلاع از اثرات سوء نگهدارنده-های شیمیایی تمایل به مصرف نگهدارنده‌های طبیعی از جمله عصاره اسانس‌های حاصل از گیاهان دارویی در مواد غذایی گسترش یافته است. بنابراین شناسایی ترکیبات موثره در گیاهان بومی که به فراوانی در دسترس هستند ضروری است. گیاه سالویا یکی از گیاهان بومی ایران است که گونه‌های مختلفی دارد. در این مطالعه ۲۰ نوع ترکیب شیمیایی مختلف در اسانس گونه *S. chorasunica* جمع آوری شده از ارتفاعات خراسان رضوی شناسایی شد. سه ترکیب Caryophyllene (۳۷/۶ درصد)، Germacrene D (۱۵/۶۳ درصد) و Bicyclogermacrene (۱۱/۸۱ درصد) بیشترین فراوانی را در اسانس داشتند. به طور مشابه صالحی و بزاز (۲۰۰۵)، ۲۷ ترکیب مختلف را در اسانس حاصل از گونه‌ای دیگر به نام *S. xanthocheila* جمع آوری شده از منطقه دماوند را شناسایی نمودند. بیشترین ترکیبات موجود در اسانس این گیاه نیز به ترتیب شامل Germacrene D (۴۴ درصد)، α -copaene (۱۱/۹ درصد) و β -caryophyllene (۶/۷ درصد) بود. در مقابل، ترکیبات اصلی سایر گونه‌های سالویا که در برخی تحقیقات گزارش شده با مطالعه حاضر متفاوت بود (قره نقده و همکاران، Yousefzadi et al., 2007; Khedher et al., ۱۳۹۶، 2017). به طور کلی، ترکیبات شیمیایی اصلی اسانس‌های گیاهی به جنس و گونه گیاه، شرایط جغرافیایی و آب و

لیپوپلی ساکاریدهای آب دوست است، که می تواند از نفوذ ترکیبات آبریز به غشای سلول هدف جلوگیری کند (Shakeri et al., 2014). با تبدیل اسانس به فرم نانومولسیون و افزایش پراکندگی اسانس در محلول آبی و همچنین کاهش اندازه ذرات آن‌ها امکان نفوذ به سلول میکروبی و همچنین نشت ترکیبات سلولی و در نهایت مرگ سلول میکروبی افزایش می‌یابد (Li et al., 2018). مطابق با مطالعه حاضر قره نقده و همکاران (۱۳۹۶) فعالیت ضدباکتریایی اسانس و نانومولسیون اسانس گیاه *S. hypoleuca* را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که باکتری‌های گرم مثبت از حساسیت بیشتری در برابر اسانس و نانومولسیون آن برخوردار بودند. به علاوه فعالیت ضد میکروبی نانومولسیون اسانس *S. hypoleuca* در مقایسه با نانومولسیون مطالعه حاضر کمتر بود و حداقل غلظت بازداری به دست آمده در برابر باکتری‌های مشابه بیشتر از مطالعه حاضر بود. ساندری و همکاران (۲۰۰۷) نیز فعالیت ضد میکروبی اسانس و نانومولسیون اسانس میخک را مورد مقایسه قرار دادند. نتایج مطالعه آن‌ها نیز فعالیت ضد میکروبی بیشتر اسانس به فرم نانومولسیون را تایید نمود (Sandri et al., 2007). در مطالعه‌ای مشابه حسن و مجتبی (۲۰۱۹) فعالیت ضدباکتریایی بیشتر نانومولسیون اسانس سیر را علیه باکتری گرم مثبت *S. aureus* در مقایسه با باکتری گرم منفی *E. coli* گزارش نمودند (Hassan & Mujtaba., 2019). لی و همکاران (۲۰۱۸) افزایش فعالیت ضد میکروبی اسانس لیمو پس از کاهش اندازه ذرات آن و تبدیل به فرم نانومولسیون را مشاهده کردند. همچنین MIC یا حداقل غلظت بازداری نانومولسیون اسانس لیمو در برابر باکتری‌ها کمتر از کپک‌ها تعیین شد (Li et al., 2018). در مطالعه‌ای دیگر اثر ضدکپکی امولسیون و نانومولسیون اسانس مختلف مرزه خوزستانی، نعنای فلفلی، آویشن دناپی و

نتایج بررسی پایداری نانومولسیون نشان داد که اندازه ذرات در طول یک ماه نگهداری در دمای محیط از ۸۰ به ۱۶۰ نانومتر در تمام تیمارها افزایش یافت. در این پژوهش عمده فعالیت ضد میکروبی اسانس *S. chorassanica* در برابر باکتری‌ها و کپک‌ها ناشی از حضور ترکیبات Caryophyllene (۳۷/۶ درصد) و Germacrene D (۱۵/۶۳ درصد) است که بیشترین فراوانی را دارند. بر طبق گزارشات پیشین منتشر شده در مقالات مختلف عمده ترین ها و ترپنوئیدهایی که معمولاً در اسانس‌های گیاهی یافت می شوند شامل α -pinene، limonene، linalool، Germacrene D و β -caryophyllene هستند. β -caryophyllene سیکلو ترپنوئیدی با یک حلقه سیکلوبوتان است که در اسانس گیاهانی مانند پونه کوهی، میخک، فلفل سیاه و دارچین نیز یافت می‌شود (Gertsch et al., 2008). پژوهش‌های مختلفی فعالیت ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی دارای β -caryophyllene را تایید کرده‌اند (Pieri et al., 2020; Moo et al., 2016). علاوه بر این Germacrene D ترکیب سیکلو ترپنوئیدی دیگری است که به طور عمده در میان ترکیبات شیمیایی موجود در بسیاری از گیاهان معطر یافت می‌شود و فعالیت ضد میکروبی آن علیه بسیاری از باکتری‌ها و کپک‌ها در مطالعات بسیاری گزارش شده است (Montanari et al., 2011; Zarai et al., 2011; Sitarek et al., 2017). نتایج نشان داد که با کاهش اندازه ذرات امولسیون اسانس و تبدیل آن به فرم نانومولسیون خواص ضد میکروبی اسانس افزایش یافت. علاوه بر این حساسیت بیشتر باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی مشاهده شد. باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت در برابر ترکیبات ضد میکروبی مانند اسانس‌ها مقاوم تر هستند که علت آن وجود لایه غشای خارجی قرار گرفته بر روی دیواره سلولی آن‌ها است. غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی غنی از

کنترل میکروارگانیسم‌های مواد غذایی مورد نیاز خواهد بود و از اثرات سو به کارگیری غلظت‌های بالای اسانس جلوگیری می‌شود. از سوی دیگر با افزایش حلالیت نانوامولسیون‌های اسانس به کارگیری آن‌ها در سیستم‌های غذایی آسان‌تر شده و مقبولیت مواد غذایی از نظر طعم و مزه نیز بیشتر می‌گردد. با این حال مطالعات بیشتری در مورد سمیت نانوامولسیون اسانس در مقایسه با ماکروامولسیون اسانس در برابر سلول‌های یوکاریوت جانوری برای پژوهش‌های آتی پیشنهاد می‌گردد.

منابع

۱. سلیم پور، فهیمه، مازوجی، علی، مظهر، سیده فلور و برزین، گیتی. (۱۳۹۲). مقایسه خواص ضد باکتریایی اسانس چهار گونه گیاه دارویی مریم گلی. مجله پژوهش در پزشکی، دوره ۳۷، شماره ۴، صفحه ۲۱۰-۲۰۵.
۲. سیفی، فرزانه. (۱۳۹۳). بررسی تأثیر نانو امولسیون اسانس برخی گیاهان دارویی در کنترل کپک‌ها و کیفیت پس از برداشت میوه توت فرنگی. پایان نامه دوره کارشناسی ارشد در رشته علوم باغبانی، دانشگاه شهید بهشتی، ۱۱۵ صفحه.
۳. قره نقده، ساسان، صمدلوئی، حمیدرضا، صوتی خیابانی، محمود و قره نقده، سامان. (۱۳۹۶). فرمولاسیون نانوامولسیون از اسانس مریم گلی (*Salvia hypoleuca*) و بررسی خواص فیزیکی‌شیمیایی و ضد میکروبی آن. مجله علوم و صنایع غذایی، دوره ۱۴، شماره ۷۰، صفحه ۳۴۸-۳۳۷.
۴. مهربان، اعظم، عدالتیان دوم، محمدرضا، حدادخداپرست، محمدحسین و مهربان سنگ آتش، معصومه. (۱۳۹۵). ارزیابی اثرات مهارکنندگی و کشندگی عصاره های آبی، اتانولی و هیدروالکلی اندام های هوایی گیاه سالویا خراسانیکا علیه برخی باکتری

دارچین علیه کپک‌های عامل فساد توت فرنگی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که فعالیت ضدکپکی با توجه به نوع اسانس و نوع کپک متفاوت بود و کپک *B. cinerea* در مقایسه با کپک *R. stolonifera* حساسیت بیشتری در برابر اسانس‌های مذکور داشت. همچنین کمترین فعالیت ضدکپکی به امولسیون و نانوامولسیون اسانس نعنای فلفلی تعلق داشت و حداقل غلظت بازدارندگی آن علیه کپک *Botrytis cinerea* بیش از $1000 \mu\text{g/ml}$ تعیین شد. در حالی که حداقل غلظت بازدارندگی برای سایر اسانس‌ها $500 \mu\text{g/ml}$ بود (سیفی، ۱۳۹۳). لی و همکاران (۲۰۱۸) حداقل غلظت بازدارندگی یا MIC تیمارهای مختلف نانوامولسیون اسانس لیمو دارای مخلوطی از سورفاکتانت‌های مختلف علیه دو کپک *A. niger* و *P. citrinum* را به ترتیب $40 \mu\text{g/ml}$ و $20 \mu\text{g/ml}$ تعیین کردند که بیشتر از نانوامولسیون تهیه شده در مطالعه حاضر بود.

نتیجه گیری کلی

گیاه سالویا پراکندگی بسیاری در کشورهای مختلف جهان از جمله ایران دارد. علاوه بر این خواص ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی اسانس و عصاره‌های حاصل از گونه‌های مختلف این گیاه به واسطه حضور ترکیبات شیمیایی مختلف در پژوهش‌های گذشته مورد تایید قرار گرفته است. در این پژوهش نیز ۲۰ ترکیب شیمیایی مختلف در اسانس حاصل از گونه *S. chorasana* جمع‌آوری شده از ناحیه خراسان، شناسایی شد. اسانس *S. chorasana* از فعالیت ضد میکروبی خوبی علیه تمامی باکتری‌های بیماری‌زا و کپک‌های عامل فساد مورد مطالعه برخوردار بود. همچنین نتایج بررسی آزمون ضد میکروبی نشان داد با کاهش اندازه ذرات اسانس و تبدیل آن به فرم نانوامولسیون حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس در آزمون میکروداپلوشن کاهش یافت. بدین ترتیب غلظت موثره کمتری از اسانس برای

ضدباکتریایی گیاه دارویی *Salvia sharifii* به روش میکروداپلوشن. فصلنامه بیماری‌های عفونی و گرمسیری ایران، دوره ۲۰، شماره ۷۱، صفحه ۳۹-۳۳.

های گرم منفی و گرم مثبت در شرایط آزمایشگاهی. مجله دانشگاه علوم پزشکی قم، دوره ۱۰، شماره ۲، صفحه ۱۱-۲.

۵. نجفی، شهلا، موسوی، سید محمد و شفقت، مهدیه. (۱۳۹۴). بررسی خواص فیتوشیمیایی، آنتی اکسیدانی و

- loaded nanoemulsion and its antimicrobial activity. Food Control. 94: 317-323.
13. McClements, D. J., & Rao, J. (2011). Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. Crit Rev Food Sci Nutr. 51(4): 285-330.
14. Montanari, R. M., Barbosa, L. C., Demuner, A. J., Silva, C. J., Carvalho, L. S., & Andrade, N. J. (2011). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from Verbenaceae species: Alternative sources of (E)-caryophyllene and germacrene-D. Química Nova. 34(9): 1550-1555.
15. Monu, E. A., Techathuvanan, C., Wallis, A., Critzer, F. J., & Davidson, P. M. 2016. Plant essential oils and components on growth of spoilage yeasts in microbiological media and a model salad dressing. Food Control. 65: 73-77.
16. Moo, C. L., Yang, S. K., Osman, M. A., Yuswan, M. H., Loh, J. Y., Lim, W. M., & Lai, K. S. (2020). Antibacterial Activity and Mode of Action of β -caryophyllene on *Bacillus cereus*. Polish J Microbiol. 69(1): 49.
17. Naserzadeh, Y., Mahmoudi, N., Pakina, E. 2019. Antipathogenic effects of emulsion and nanoemulsion of cinnamon essential oil against *Rhizopus* rot and grey mold on strawberry fruits. Foods and Raw Materials. 7 (1): 210-216.
18. Otoni, C. G., de Moura, M. R., Aouada, F. A., Camilloto, G. P., Cruz, R. S., Lorevice, M. V., et al. 2014. Antimicrobial and physical-mechanical properties of
6. Adams, RP. 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry. 4th Edition Allured Publishing Corporation, Carol Stream.
7. Bedoya-Serna, C. M., Dacanal, G. C., Fernandes, A. M., & Pinho, S. C. (2018). Antifungal activity of nanoemulsions encapsulating oregano (*Origanum vulgare*) essential oil: *in vitro* study and application in Minas Padrão cheese. Brazilian J Microbiol. 49(4): 929-935.
8. Borrin, T. R., GEOrges, E. L., Moraes, I. C. F., & Pinho, S. C. 2016. Curcumin loaded nanoemulsions produced by the emulsion inversion point (EIP) method: An evaluation of process parameters and physicochemical stability. J Food Eng. 169: 1-9.
9. Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International J Food Microbiol. 94(3): 223-253.
10. Hassan, K. A., & Mujtaba, M. A. (2019). Antibacterial efficacy of garlic oil nano-emulsion. AIMS Agriculture Food. 4(1): 194-211.
11. Khedher, M. R. B., Khedher, S. B., Chaieb, I., Tounsi, S., & Hammami, M. (2017). Chemical composition and biological activities of *Salvia officinalis* essential oil from Tunisia. EXCLI J. 16:160-175.
12. Li, Z. H., Cai, M., Liu, Y. S., & Sun, P. L. (2018). Development of finger citron (*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis*) essential oil

- pectin/papaya puree/cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films. Food Hydrocolloids. 41: 188–194.
19. Pieri, F. A., de Castro Souza, M. C., Vermelho, L. L. R., Vermelho, M. L. R., Perciano, P. G., Vargas, F. S., & Moreira, M. A. S. (2016). Use of β -caryophyllene to combat bacterial dental plaque formation in dogs. BMC veterinary research. 12(1): 1-8.
 20. Rao, J., & McClements, D. J. 2011. Food-grade microemulsions, nanoemulsions and emulsions: Fabrication from sucrose monopalmitate & lemon oil. Food Hydrocolloids. 25: 1413–1423.
 21. Robledo, N., Vera, P., López, L., Yazdani-Pedram, M., Tapia, C., & Abugoch, L. 2018. Thymol nanoemulsions incorporated in quinoa protein/chitosan edible films; antifungal effect in cherry tomatoes. Food Chem. 246: 211-219.
 22. Sadeghian, A. Kadkhodae, R. Farhoosh, R. Koocheki, A., and Najaf Najafi, M. 2013. Investigating the effect of whey protein – starch conjugate on quality attributes of oil – in – water emulsion. J Rifst. 2(2): 139- 152.
 23. Sandri, I. G., Zacaria, J., Fracaro, F., Delamare, A. P. L., & Echeverrigaray, S. (2007). Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Cunila* against foodborne pathogens and spoiling bacteria. Food Chem. 103(3): 823-828.
 24. Schramm, L. L. (2006). Emulsions, foams, and suspensions: fundamentals and applications. John Wiley & Sons. 215-220.
 25. Shahbazi, Y., Shavisi, N., & Mohebi, E. (2016). Potential application of *Ziziphora clinopodioides* essential oil and nisin as natural preservatives against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli* O157: H7 in commercial barley soup. J Food Safety. 36(4): 435-441.
 26. Shakeri, A., Khakdan, F., Soheili, V., Sahebkar, A., Rassam, G., & Asili, J. (2014). Chemical composition, antibacterial activity, and cytotoxicity of essential oil from *Nepeta ucrainica* L. spp. *kopetdaghensis*. Industrial Crops and Products. 58: 315-321.
 27. Sitarek, P., Rijo, P., Garcia, C., Skala, E., Kalemba, D., Białas, A. J. & Śliwiński, T. (2017). Antibacterial, anti-inflammatory, antioxidant, and antiproliferative properties of essential oils from hairy and normal roots of *Leonurus sibiricus* L. and their chemical composition. Oxid Med Cell Longev. 32(2): 1-12.
 28. Skandamis, P., Koutsoumanis, K., Nychas, G. J. E., & Fasseas, K. 2001. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157: H7. Italian J Food Sci. 13(1): 65-75.
 29. Stević, T., Berić, T., Šavikin, K., Soković, M., Gođevac, D., Dimkić, I., & Stanković, S. (2014). Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant. Industrial Crops and Products. 55: 116-122.
 30. Tayarani-Najaran, Z., Emami, S. A., Asili, J., Mirzaei, A., & Mousavi, S. H. 2011. Analyzing cytotoxic and apoptogenic properties of *Scutellaria litwinowii* root extract on cancer cell lines. Evid Based Complemen Altern Med, 2011.
 31. Weiss R. Fintelmann R. Herbal Medicine, 2nd ed. Stuttgart: Thieme Pub; 2000. p. 36-7.
 32. Weiss, J., Decker, E., McClements, D., Kristbergsson, K., Helgason, T., & Awad, T. 2008. Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components. Food Biophys. 3(2): 146–154.
 33. Yousefzadi, M., Sonboli, A., Karimi, F., Ebrahimi, S. N., Asghari, B., & Zeinali, A. (2007). Antimicrobial activity of some

- Salvia species essential oils from Iran. Zeitschrift für Naturforschung C. 62(7-8): 514-518.
34. Zarai, Z., Kadri, A., Chobba, I. B., Mansour, R. B., Bekir, A., Mejdoub, H., & Gharsallah, N. (2011). The in-vitro evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of *Marrubium vulgare* L. essential oil grown in Tunisia. Lipids Health Dis: 10(1), 161.

Evaluation of antimicrobial activity of macroemulsion and nanoemulsion of *Salvia chorassanica* essential oil against pathogenic and food spoilage microorganisms

Mehraban A¹, Vazifehdooost M^{1*}, Didar Z¹, Haddadkhodaparast MH², Mehraban Sang Atash M³

1. Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Neyshabur Branch, Neyshabur, Iran.
2. Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
3. Food Quality and Safety Research Department, Food Science and Technology Research Institute, ACECR Khorasan Razavi Branch, Mashhad, Iran.

*Corresponding author: m.vazifedoost@iau-neyshabur.ac.ir

Received: 14 August 2020

Accepted: 14 November 2020

Abstract

In this study, the GC-MS method identified chemical compounds of *Salvia chorasana* essential oil. Then, a nanoemulsions of essential oil was prepared by ultrasound method, and DLS evaluated the stability of its particle size during two weeks of storage at room temperature. The microdilution method investigated the antimicrobial activity of macroemulsion and nanoemulsion of *S. chorasana* essential oil against six pathogenic bacteria and three food spoilage molds. The results showed that the essential oil had 20 different chemical compositions. The particle size of the nanoemulsion increased from 91.83 to 193.61 nm during two weeks. The nanoemulsion form of the essential oil had a higher antimicrobial effect than its macroemulsion against all the studied microorganisms. Also, the antimicrobial activity of macroemulsion and nanoemulsion of essential oil on gram-positive bacteria was more than on gram-negative. Among the pathogenic bacteria, the gram-positive bacterium *Bacillus cereus* indicated the highest sensitivity to the nanoemulsion of essential oil and had the lowest MIC, 3.125 μ l/ml. In addition, MIC and MFC of essential oil nanoemulsion against all three molds were determined to be 6.25 μ l/ml and 12.5 μ l/ml, respectively. Thus, a lower effective concentration of essential oil in the form of nanoemulsion will be required to control food microorganisms and prevent the effects of high concentrations of essential oil.

Keywords: *Salvia chorassanica*, essential oil, nanoemulsion, antibacterial activity, antifungal activity.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited

Copyright © 2021 Shahrekord Branch, Islamic Azad University.