

مقاله پژوهشی

تهیه و بررسی نانو امولسیون عصاره نعناع با استفاده از پایدارکننده‌های ترکیبی ژلاتین - توئین ۲۰ به عنوان نگهدارنده سیستم غذایی

میلاد اشرفی اصل^۱، صونا جمشیدی^{۲*}، نویده انرجان کوچه‌باغ^۳

۱. کارشناس ارشد مهندسی شیمی، گروه مهندسی شیمی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۲. دکتری تخصصی مهندسی شیمی، استادیار، گروه مهندسی شیمی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۳. دکتری تخصصی مهندسی صنایع غذایی، استادیار، گروه بهداشت مواد غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۸/۱۱/۱۴، تاریخ آخرین بازنگری: ۹۹/۳/۲۱، تاریخ پذیرش: ۹۹/۶/۲۴)

چکیده:

در این پژوهش، نانوامولسیون‌های اسانس گیاه نعناع با استفاده از پایدارکننده‌های ترکیبی توئین ۲۰ - ژلاتین، به عنوان نگهدارنده سیستم غذایی تهیه شدند. از روش‌شناسی سطح پاسخ به منظور بررسی اثرهای اصلی و برهم کنش دوتایی برای متغیرهای ژلاتین (g تا ۱۰) و توئین ۲۰ (g تا ۱۰) روی خواص فیزیکی شیمیایی نانوامولسیون‌های حاصل از قبیل میانگین اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات، هدایت، کدورت و زتا پتانسیل استفاده شد. نتایج نشان داد که مدل‌های ارائه شده توسط سطح پاسخ به طور معنادار ($P < 0/05$) با متغیرهای پاسخ همبسته شده و به خوبی قادر به پیش‌بینی تغییرات خواص مطالعه شده بودند ($R^2 > 0/90$). ترکیب درصد بهینه انتخابی با هدف حداقل میانگین اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات، هدایت و کدورت و حداکثر زتا پتانسیل، با استفاده از پایدارکننده‌های ترکیبی شامل ۸ g توئین ۲۰ و ۲ g ژلاتین به دست آمد. نانو امولسیون بهینه به دست آمده خاصیت ضدباکتریایی خوبی بر علیه باکتری‌های *E.coli* و *S.areus* چه به تنهایی و چه در فرمولاسیون پوشش خوراکی نشان داد. بیشترین هاله بازدارندگی در پوشش‌های خوراکی حاوی ۱٪ کربوکسی متیل، ۰/۵ درصد گلیسرول و ۵٪ نانو امولسیون بهینه حاصل شد.

کلیدواژه‌ها: روش‌شناسی سطح پاسخ، نانوامولسیون، اسانس گیاه نعناع، توئین ۲۰، ژلاتین.

۱. مقدمه

افزایش تمایل بشر به استفاده از مواد غذایی طبیعی، شرکت‌های فعال در این زمینه را مجاب کرد تا از مواد افزودنی شیمیایی، کمتر استفاده کنند. اسانس‌ها ترکیبات طبیعی هستند که به دلیل برخورداری از خاصیت قوی ضد قارچی، ضد ویروسی و ضد باکتری، می‌توان به عنوان مواد نگهدارنده در صنایع غذایی از آن‌ها استفاده کرد. اسانس‌ها علاوه بر خاصیت ضد میکروبی، خواص سودمند دیگری از جمله خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد دیابت نیز دارند [۱-۲].

نعناع^۱ دارای گونه‌های مختلف بوده و جزو گیاهان خوراکی است. مطالعات پیشین نشان داده که خواص فیزیکی - شیمیایی و بیولوژیکی اسانس یا عصاره نعناع، از جمله اثر آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریایی آن، وابستگی زیادی به ترکیب درصد اجزای سازنده آن‌ها دارد که بسته به گونه گیاه و فرایند اسانس‌گیری متفاوت است. به عنوان مثال، نتایج تحقیقی نشان داده است که عصاره‌های کلروفرمی و اتیل استاتی نعناع خاصیت آنتی‌اکسیدانی مؤثرتری نسبت به عصاره‌های الکلی و آبی آن داشته‌اند به طوری که درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH^۲ عصاره‌های کلروفرمی، اتیل استاتی، الکلی و آبی نعناع، به ترتیب ۹۱.۲، ۸۷.۸، ۷۶.۲ و ۶۹.۸٪ بوده است. همچنین عصاره‌های مطالعه شده، خاصیت ضد باکتریایی بیشتری در مقابل باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با گرم منفی نشان دادند که این خاصیت برای عصاره اتیل استاتی بیشترین و برای عصاره آبی کمترین است [۳]. در تحقیقی دیگر، امولسیون آب در روغن اسانس نعناع با استفاده از امولسیفایرهای توئین ۴۰ و توئین ۸۰ تهیه شده و خواص آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریایی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود که امولسیون روغن نعناع تهیه شده، دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی بالایی است که می‌تواند گزینه مناسبی به عنوان نگهدارنده‌های مواد غذایی باشد [۴]. نتایج تحقیقی دیگر نشان داد که عصاره الکلی استخراج شده از برگ و غدد داخلی گیاه نعناع، دارای عملکرد ضد باکتری قابل ملاحظه‌ای روی انواع

گونه‌های سالمونلا، استرپتوکوکوس و باسیلوس بوده و از پتانسیل خوبی برای درمان برخی عفونت‌ها برخوردار است [۵]. در تحقیقی دیگر، اسانس نعناع در فرمولاسیون مواد بسته بندی ماهی ساردین فریز شده وارد شده و تأثیر قابل توجه آن در کاهش ترکیبات آمین‌های زیستی در محصول گوشت ماهی به اثبات رسیده است [۶]. همچنین تأثیر افزودن اسانس نعناع در اکسیداسیون سوسیس‌های پخته شده نیز مورد ارزیابی قرار گرفته و نتایج حاصله نشان داده است که اسانس نعناع، موجب کاهش اکسید شدن چربی در بافت سوسیس می‌شود [۷].

گرچه اسانس‌ها جایگزین بسیار مناسبی برای نگهدارنده‌های شیمیایی در فرمولاسیون‌های غذایی هستند و قادر به افزایش ماندگاری مواد غذایی، به عنوان نگهدارنده طبیعی هستند، اما حلالیت کم در آب، فراریت بالا و بوی قوی آن‌ها، باعث محدود شدن استفاده از آن‌ها شده است. وارد کردن اسانس‌ها در سیستم‌های حامل نانو ساختار مانند نانوامولسیون‌ها که موجب کاهش اندازه آن‌ها تا محدوده نانومتری می‌شود، می‌تواند مشکلات مذکور را حل کرده و استفاده از اسانس به عنوان نگهدارنده را میسر سازد؛ لذا نانوامولسیون‌های اسانس‌ها می‌تواند یک انتخاب عالی برای مصارف غذایی باشد. به منظور تشکیل نانو امولسیون پایدار با قابلیت پخش قطرات بالا، اغلب از پایدارکننده‌ها و امولسیفایرهای مختلف ریز ملکولی یا بیوپلیمری و درشت ملکولی مانند پروتئین‌ها استفاده می‌شود [۸]. ژلاتین یکی از مهم‌ترین پایدارکننده‌های پروتئینی است که قابلیت‌های زیادی از جمله توانایی اتصال به آب، تشکیل ژل، افزایش گرانش‌روزی (ویسکوزیته)، تشکیل لفاف و نقش امولسیون‌کنندگی دارد [۹]. ژلاتین تقریباً از مقاومت یونی متأثر نمی‌شود و در یک بازه pH خاص پایدار می‌ماند. ژلاتین به دلیل شفافیت و مزه مطلوبی که دارد، بیشتر مورد توجه و استفاده قرار گرفته است [۱۰].

توئین‌ها افزودنی‌های مجاز مواد غذایی هستند که به عنوان امولسیفایر و تثبیت‌کننده‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. توئین‌ها ردیفی از عناصر فعال سطحی را تشکیل می‌دهند که

1. Mentha
2. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

بررسی فرار گرفت.

جدول (۱) آزمایشات انجام گرفته بر اساس طراحی آزمایش
Table 1. Experiments performed based on design of expert

توئین ۲۰ (g) Tween 20 (g)	ژلاتین (g) Gelatin (g)	ردیف Run
5	0	1
0	5	2
8.5	8.5	3
5	5	4
1.5	8.5	5
5	5	6
5	5	7
5	10	8
10	5	9
8.5	1.5	10

برای تهیه امولسیون نعناع بر پایه آبی، از روش جایگزین حلال^۲ استفاده شد. شروع کار با حل کردن ۱ g اسانس نعناع در ۵ g استون در تمامی نمونه ها بود. سپس مقادیر مختلف توئین ۲۰ را در ۹۵ g آب با استفاده از بن ماری حل نموده و با حل کردن ژلاتین در آب، تمامی این مواد به قیف بوختر منتقل شد. همزمان با همزدن و اعمال فشار در قیف بوختر، حلال (استون) از سیستم تبخیر شده و جدا شد. برای اندازه گیری شفافیت نمونه ها، جذب آن ها توسط اسپکتروفوتومتر UV در طول موج ۶۰۰ nm بساخت انگلستان اندازه گیری شد. به منظور تعیین توزیع ذرات^۳، پتانسیل زتا و تعیین میزان هدایت نمونه ها از دستگاه زتا سایزر ساخت انگلستان^۴ استفاده شد.

سویه های میکروبی مورد استفاده برای بررسی خاصیت ضد میکروبی نانو امولسیون بهینه انتخاب شده بر اساس طراحی آزمایش شامل اشریشیا کُلی و استافیلوکوک اورئوس بود. برای انجام تست میکروبی، ابتدا باکتری گرم مثبت

از واکنش های سوربیتال، اسیدهای چرب و اتیل اکسید حاصل می شود.

آن ها به صورت ادغامی از استرهای تکی و دیان هیدریک ها به همراه اسیدهای چرب خوراکی و تجاری معرفی می شوند که با اتیلین اکسید غلظت می یابد. توئین ۲۰ متشکل از پلی اکسی تین ۲۰- سوربیتان مونولوریت و آب است. به دلیل تنش زیاد بین فاز آلی و آب، استفاده از امولسیفایری مانند توئین ۲۰، برای جلوگیری از چسبندگی ذرات تشکیل شده ضروری است [۱۱].

بررسی ها حاکی از آن است که استفاده از سیستم های ترکیبی در فرمولاسیون نانوامولسیون ها در نهایت محصول مطلوب تری تولید می کند؛ لذا در این تحقیق اسانس نعناع وارد سیستم نانوامولسیون شده و تبدیل به نانوذرات دیسپرس در آب می شود. در تهیه نانوامولسیون های مذکور، توئین ۲۰ که تحت عنوان پلی سوربات ۲۰ می شناسیم، به عنوان امولسیفایر و ژلاتین به عنوان پایدارکننده استفاده می شود. تأثیر غلظت امولسیفایرهای استفاده شده (ژلاتین و توئین ۲۰) روی خواص فیزیکی نانوامولسیون تهیه شده بررسی خواهد شد. در نهایت تأثیر بازدارندگی پوشش نانوامولسیون بهینه بر سویه های میکروبی شامل اشریشیا کُلی و استافیلوکوک اورئوس مورد بررسی قرار می گیرد.

۲. مراحل آزمایشگاهی

در این تحقیق، از اسانس گیاه نعناع به عنوان ماده اصلی، توئین ۲۰ (فلوکا، سوئیس)^۱ و ژلاتین نوع A (فلوکا، سوئیس) به عنوان تثبیت کننده های امولسیفایری استفاده شده است. همچنین استون (Merck، آلمان) به عنوان حلال به کار گرفته شد. روش رویه سطح پاسخ برای بررسی و مطالعه اثرات ناشی از مقدار توئین ۲۰ و ژلاتین بر روی متوسط اندازه سایز ذرات، توزیع اندازه ذرات، پتانسیل زتا، هدایت، میزان کدورت انجام گرفت. نتایج حاصل از طراحی آزمایش در جدول (۱) ارائه شده است. به منظور تجزیه و تحلیل نتایج، معادله چندجمله ای و نمودارهای گرافیکی برای اهداف مشخص شده با استفاده از نرم افزار مینی تب نسخه ۱۷.۳.۱ مورد

2. Solvent displacement
3. PDI (polydispersity index)
4. 3600 Nano-ZS ZEN

1. Fluka

که در رابطه با A_{sample} جذب DPPH محلول متانولی حاوی نانوامولسیون بهینه است که در جدول (۲-۱) آورده شده است. A_{blank} جذب DPPH محلول متانولی است که برابر با ۱/۵۳۷ است.

۳. نتایج و بحث

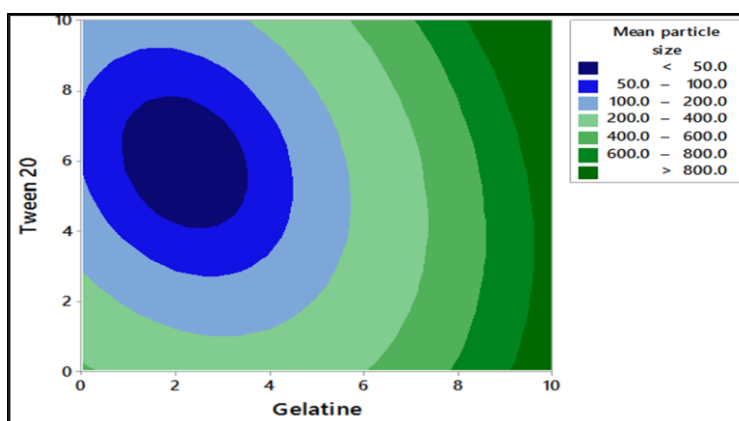
۱.۳. میانگین اندازه ذرات

تأثیر مقادیر مختلف توئین ۲۰ و ژلاتین بر روی اندازه امولسیون‌های نعنای در شکل (۱) نشان داده شده است. چنانچه در شکل (۱) مشاهده می‌شود، افزایش توئین ۲۰ ابتدا باعث کاهش اندازه ذرات می‌شود، ولی از یک غلظتی بالاتر، روند معکوس شده و اندازه ذرات افزایش می‌یابد. افزایش غلظت ژلاتین نیز باعث افزایش اندازه ذرات در سیستم‌های حاصل گردیده است. به نظر می‌رسد در غلظت‌های پایین توئین ۲۰، پایدارسازی ذرات به درستی انجام نشده و پوشش ممانعتی که ایجاد پایدارسازی فضایی می‌کند، ناکافی بوده و ذرات بهم چسبیده و نانوامولسیون حاصل دارای ذرات بزرگ تر می‌شود. در حالی‌که با افزایش میزان امولسیفایر این لایه پوششی کامل تر و محکم تر شده و اجازه پیوستن ذرات نانساختار ایجاد شده در مرحله هسته‌زایی فرآیند جایگزینی حلال به هم را نمی‌دهد.

(استافیلوکوک اورئوس)^۱ و باکتری گرم منفی (سالمونلا انتریک)^۲ که به صورت آمپول‌های لیوفلیزه بودند، در ۵۰ mL محلول مغذی برین هارت اینفوشن براث حل شدند و با توجه محلول استاندارد ۰/۵ مک فارلند با سرم نرمال سالین رقیق شد. نمونه‌های باکتری رقیق شده با استفاده از سواب پنبه استریل بر روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شد. در انکوباتور در دمای ۳۷ °C، به مدت ۲۴-۴۸ h، تحت شرایط هوای انکوبه شد و بعد از رشد باکتری‌ها به داخل محیط کشت جامد نوترینت آگار منتقل شدند. مقدار ۳۰ μL از هر نمونه آزمایشی (پوشش خالص (کربوکسی متیل سلولز)، پوشش پلاستی سایزر (گلیسرول)، پوشش عصاره خالص (نانوامولسیون بهینه) و ترکیبی از سه پوشش مذکور) به چاهک‌ها اضافه شد. تمام پلیت‌ها قبل از بررسی قطر مناطق مهار شد، در دمای ۳۷ °C، به مدت ۲۴ h انکوبه شدند. خاصیت آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون بهینه تعیین شده به روش DPPH اندازه‌گیری شد. در این روش ۰/۲ mL از نانو امولسیون تهیه شده، به ۴ mL محلول DPPH متانولی افزوده شده و به مدت ۶۰ min در دمای محیط نگهداری شد. سپس جذب محلول با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر درج شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون بهینه از رابطه زیر محاسبه شد:

$$DPPH = \frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}} \times 100 \quad (1)$$

درصد به دام اندازه رادیکال DPPH



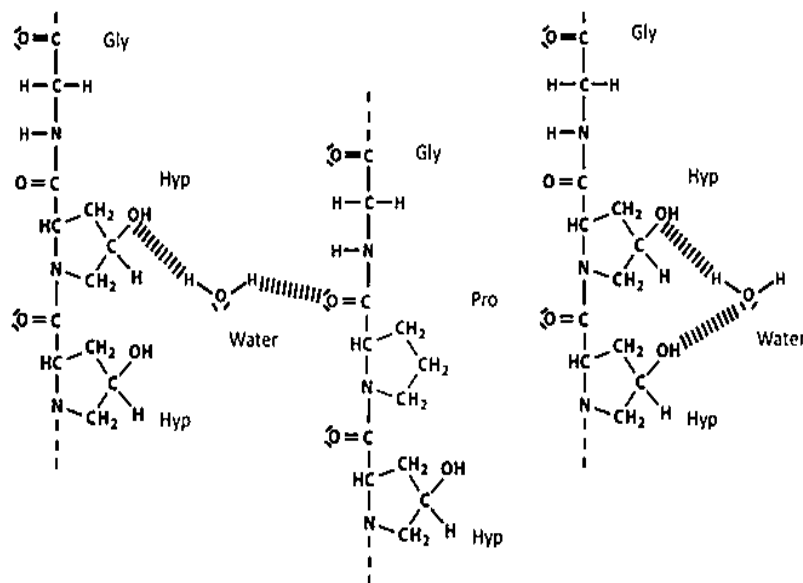
شکل (۱) نمودار دوبعدی تغییرات میانگین اندازه ذرات (بر حسب نانومتر) نانوامولسیون‌های اسانس گیاه نعنای تابعی از میزان توئین ۲۰ و ژلاتین.

Fig 1. Response-surface plots for mean particle size (nm) of Mentha nanoemulsion as function of gelatin and tween 20.

1. PTCC-1112, Staphylococcus Aureus
2. PT CC-1709, Salmonella Enteric

ادغام شدن قطرات روغنی می‌شود. زنجیره‌های بسیار زیاد آب‌گریز ژلاتین و زنجیره کم آب دوست آن مانع از عملکرد مناسب امولسیفایری ژلاتین در مقادیر بالا می‌شود؛ لذا می‌توان گفت که با افزایش درصد ژلاتین، اندازه ذرات نیز افزایش می‌یابد. این در حالی است توئین ۲۰ به عنوان امولسیفایر غیریونی منجر به ایجاد بار سطحی منفی می‌شود. در این امولسیفایرها، به دلیل جذب یون هیدروکسیل در محلول آبی بر روی زنجیره‌های پلی اکسی اتیلن آب دوست، بار منفی ایجاد می‌شود. حضور زنجیره‌های پلی اکسی اتیلن در ساختار توئین ۲۰ می‌تواند به عنوان ممانعت کننده ساختار در سطح مشترک روغن/ آب عمل کرده و از آمیختگی آن‌ها جلوگیری به عمل آورد؛ در نتیجه حضور توئین ۲۰ حتی در مقادیر بالا نیز باعث کاهش اندازه ذرات می‌شود. چنین روند مشابهی در تحقیقات دیگر نیز مشاهده شده است [۱۲-۱۴].

با توجه به روند تغییرات ژلاتین با اندازه ذرات سیستم، افزایش ژلاتین باعث افزایش اندازه ذرات شده است. نانو ذرات موجود در نانوامولسیون‌های تولیدی، عمدتاً توسط توئین ۲۰ پایدار شده و ژلاتین نقش پایدارکنندگی چندانی اعمال نکرده است. خصوصاً این که احتمالاً یک لایه محافظ دوم روی ذرات پایدار شده با توئین ۲۰ ایجاد کرده و با افزایش غلظت ژلاتین این لایه ضخیم تر شده و در نهایت منجر به افزایش اندازه ذرات شده است. افزایش اندازه ذرات را می‌توان به حضور زنجیره‌های آب دوستی و آب‌گریزی ژلاتین ارتباط داد. در واقع ژلاتین بیوپلیمری است که از زنجیره‌های پلیمری تشکیل شده است. بخشی از این زنجیره‌ها که آب‌گریز هستند، قطرات روغن نعناع را احاطه می‌کند. زنجیره‌های آب دوست ژلاتین نیز جذب آب می‌شود (شکل ۲)؛ در نتیجه یک غشای پروتئینی در بیرون قطرات روغنی ایجاد می‌شود که باعث ایجاد امولسیون پایدار با جلوگیری از



شکل (۲) نمونه‌ای از پیوند هیدروژنی ژلاتین با آب.

Fig2. Examples of hydrogen bond between gelatin chains and water molecules.

است. بر طبق این رابطه، حدود $99/50\%$ (R^2) و $(R^2\text{-adj})$ $99/16\%$ تغییرات اندازه ذرات توسط ژلاتین و توئین ۲۰ در رابطه (۲) پیش بینی شدند که نشان از قابلیت بالای مدل ارائه شده است.

آنالیز تحلیل واریانس در جدول (۲) ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، هر دو پارامتر ژلاتین و توئین ۲۰ بر اندازه ذرات امولسیونی نعناع تأثیر معنی‌داری دارد. مدل پیشنهادی بر اساس هدف اندازه ذرات بر حسب دو متغیر توئین ۲۰ و ژلاتین نیز در جدول (۳) نشان داده شده

جدول (۲) جدول آنالیز تحلیل واریانس برای میانگین اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات، زتا پتانسیل، هدایت و کدورت نانومولسیون نعناع بر حسب متغیرهای ژلاتین و توئین ۲۰.

Table 2. Analysis of variance (p-value and F-ratio) for mean particle size, PDI, zeta potential, conductivity and Turbidity of Mentha nanoemulsion as function of gelatin and tween 20.

Source	میانگین اندازه ذرات Mean Particle size		توزیع اندازه ذرات PDI		زتا پتانسیل Zeta Potential	
	F-Value	P-Value	F-Value	P-Value	F-Value	-Value
Model	236.46	0.000	10.26	0.012	9.80	0.013
Linear	437.40	0.000	6.02	0.047	18.11	0.005
Gelatin	847.73	0.000	1.84	0.033	31.26	0.003
Tween 20	0.07	0.001	10.20	0.024	4.95	0.077
Square	143.38	0.000	13.91	0.009	6.30	0.043
Gelatin× Gelatin	274.33	0.000	6.121	0.055	12.50	0.017
Tween 20×Tween 20	70.21	0.000	26.90	0.004	0.59	0.477
2 Way Interaction	20.76	0.006	11.40	0.020	0.19	0.680
Tween 20×Gelatin	20.76	0.006	11.40	0.020	0.19	0.680

Source	هدایت Conductivity		کدورت Turbidity	
	F-Value	P-Value	F-Value	P-Value
Model	263.66	0.000	10.23	0.012
Linear	651.10	0.000	21.19	0.004
Gelatin	1277.75	0.070	37.39	0.002
Tween 20	24.45	0.040	5.00	0.076
Square	2.98	0.141	4.18	0.086
Gelatin× Gelatin	5.94	0.059	0.21	0.006
Tween 20×Tween 20	0.68	0.447	6.67	0.079
2 Way Interaction	25.01	0.041	0.41	0.549
Tween 20×Gelatin	25.01	0.041	0.41	0.549

جدول (۳) مدل پیشنهادی بر اساس هدف میانگین اندازه ذرات محصول، توزیع اندازه ذرات، زتا پتانسیل، هدایت و کدورت بر حسب دو متغیر توئین ۲۰ و ژلاتین.

Table 3. Modeling purposes based mean particle size, PDI, zeta potential, conductivity and Turbidity of Mentha nanoemulsion as function of gelatin and tween 20.

$$\text{Mean Particle size} = 426.5 - 94.1 \text{ Gelatin} - 100.1 \text{ Tween 20} + 14.803 \text{ Gelatin} \times \text{Gelatin} + 7.489 \text{ Tween 20} \times \text{Tween 20} + 4.91 \text{ Gelatin} \times \text{Tween 20} \quad (R^2=99.58\%, R^2\text{-adj}=99.16\%)$$

$$\text{PDI} = 0.285 + 0.0293 \text{ Gelatin} + 0.1397 \text{ Tween 20} - 0.00849 \text{ Gelatin} \times \text{Gelatin} - 0.01767 \text{ Tween 20} \times \text{Tween 20} + 0.01386 \text{ Gelatin} \times \text{Tween 20} \quad (R^2=91.12\%, R^2\text{-adj}=90.23\%)$$

$$\text{Zeta potential} = 15.91 - 3.050 \text{ Gelatin} - 0.720 \text{ Tween 20} + 0.2187 \text{ Gelatin} \times \text{Gelatin} + 0.0475 \text{ Tween 20} \times \text{Tween 20} - 0.0327 \text{ Gelatin} \times \text{Tween 20} \quad (R^2=92.74\%, R^2\text{-adj}=90.48\%)$$

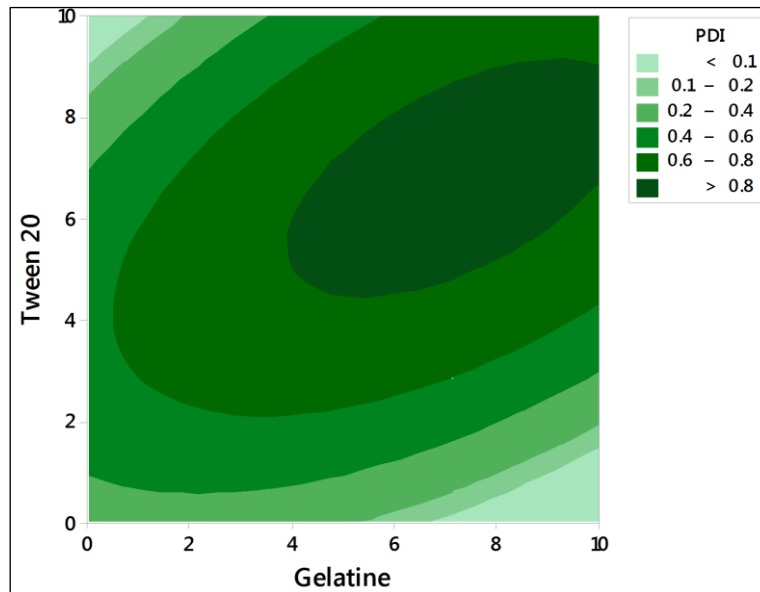
$$\text{Conductivity} = 0.0694 + 0.07238 \text{ Gelatin} + 0.02038 \text{ Tween 20} - 0.001179 \text{ Gelatin} \times \text{Gelatin} - 0.000399 \text{ Tween 20} \times \text{Tween 20} - 0.001857 \text{ Gelatin} \times \text{Tween 20} \quad (R^2=99.62\%, R^2\text{-adj}=99.28\%)$$

$$\text{Turbidity} = 0.149 + 0.0749 \text{ Gelatin} + 0.0186 \text{ Tween 20} + 0.0354 \text{ Gelatin} \times \text{Gelatin} - 0.01998 \text{ Tween 20} \times \text{Tween 20} + 0.00598 \text{ Gelatin} \times \text{Tween 20} \quad (R^2=99.62\%, R^2\text{-adj}=99.28\%)$$

ذرات پایدار شده با ژلاتین تنها، ذرات پایدار شده با نسبت های مختلف توئین ژلاتین، تشکیل مایسل های آزاد توئین، تشکیل مایسل های آزاد ژلاتین، تشکیل مایسل های مرکب ژلاتین - توئین در سیستم مربوطه گردد که هر کدام دارای اندازه متفاوت بوده و در کل توزیع اندازه ذرات در سیستم را به شدت افزایش می دهند. لذا استفاده از پایدار کننده های تک جزئی (تنها توئین ۲۰ یا تنها ژلاتین)، خصوصاً در غلظت های بالا، باعث ایجاد نانوامولسیون های همگن تری می شود.

۲.۳. توزیع اندازه ذرات

در شکل (۳) تأثیر میزان ژلاتین و توئین ۲۰ در میزان توزیع اندازه ذرات نشان داده شده است. چنانچه قابل مشاهده است در غلظت های کم توئین ۲۰، افزایش میزان ژلاتین باعث کاهش قابل توجه پلی دیسپرسیته یا توزیع اندازه ذرات سیستم شده است. استفاده از غلظت های یکسان هر دو ترکیب، منجر به کاهش قابل توجه همگن بودن سیستم شده است. افزایش میزان پایدار کننده ها در سیستم باعث افزایش توزیع ذرات شده است. این مشاهده می تواند به تشکیل ذرات نامتجانس ذرات پایدار شده با توئین ۲۰ تنها،



شکل (۳) نمودار دویعدی تغییرات توزیع اندازه ذرات نانوامولسیون های اسانس گیاه نعناع تابعی از میزان توئین ۲۰ و ژلاتین.

Fig 3. Response-surface plots for PDI of Mentha nanoemulsion as function of gelatin and tween 20.

ترکیب پیش بینی شدند که نشان از قابلیت بالای رابطه ارائه شده بود.

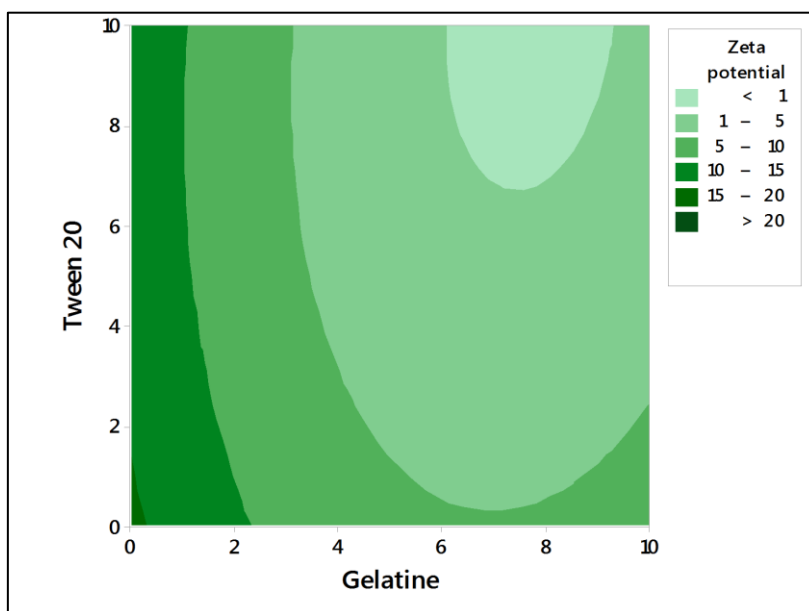
۳.۳. پتانسیل زتا

پتانسیل زتا، معیار بسیار خوبی برای بررسی پایداری فیزیکی نانوامولسیون هایی است که از طریق مکانیسم الکترواستاتیک، پایدار می شوند. هر چقدر مطلق پتانسیل زتای سیستم های کلوئیدی بیشتر باشد، آن سیستم از نظر فیزیکی پایدارتر است. نتایج این تحقیق نشان داد که

آنالیز تحلیل واریانس در جدول (۲) نشان داده شده است. طبق مطالعات انجام شده و نتایج به دست آمده، مشخص است که پارامترهای متغیرهای انتخابی به صورت انفرادی، توان دوم و برهم کنش بین دو متغیر در سطح اطمینان ۹۵٪ اثر معناداری روی همگنی سیستم یا توزیع اندازه ذرات نانوامولسیون ها دارند؛ بنابراین توزیع اندازه ذرات می تواند تابعی از نسبت ژلاتین و توئین ۲۰ را پیش بینی کند (جدول ۳). بر طبق رابطه پیشنهادی حدود ۹۱/۱۲٪ (R^2) تغییرات توزیع اندازه ذرات توسط ژلاتین و میزان توئین ۲۰ در مرحله

نانوذرات حاصل دارای پتانسیل زتا مطلوب و بیشتری است، ولی همانطور که در شکل مشاهده می‌شود، مقادیر مختلف توئین ۲۰ تأثیر قابل توجهی بر مقادیر زتا پتانسیل ندارد، زیرا توئین ۲۰ دارای اثر الکترواستاتیک نبوده و روی توازن باری نانو ذرات ایجاد شده بی‌تأثیر است. کاهش پتانسیل زتا با افزایش ژلاتین، می‌تواند به بار مثبت ژلاتین در محیط خنثی مربوط باشد؛ به طوری که افزایش آن باعث خنثی شدن بارهای منفی اسیدهای چرب اسانس و نیز گروه‌های عاملی هیدروکسیل توئین ۲۰ شده و در مجموع قدر مطلق پتانسیل زتا کاهش می‌یابد.

نمونه‌های نانوامولسیون تولید شده، دارای قدر مطلق پتانسیل زتای کم هستند. تحقیقات قبلی نشان داده‌اند که سیستم‌های امولسیون زمانی از طریق مکانیسم الکترواستاتیک پایدار می‌شوند که حداقل دارای قدر مطلق پتانسیل زتای ۲۰ mV باشند؛ لذا نانوذرات تولید شده عمدتاً از طریق مکانیسم مانع فضایی پایدار شده‌اند. عوامل مختلفی، از جمله قدرت یونی، نوع و غلظت نانو ذرات مورد استفاده و نسبت بین آن‌ها بر روی میزان بار سطحی، تحریک الکتروفوریک و پتانسیل زتای حاصل مؤثر است. با توجه به شکل (۴) معلوم می‌شود که در مقادیر پایین ژلاتین،



شکل (۴) نمودار دویعدی تغییرات زتا پتانسیل نانوامولسیون‌های اسانس گیاه نعناع تابعی از میزان توئین ۲۰ و ژلاتین.
Fig 4. Response-surface plots for Zeta potential of Mentha nanoemulsion as function of gelatin and tween 20.

ترکیب درصدی توئین ۲۰ و ژلاتین در رسیدن به پتانسیل زتای مناسب است. به طور کلی برطبق شکل (۴) با کاهش ژلاتین و افزایش ترکیب توئین ۲۰ بهینه‌ترین و بیشترین سطح پتانسیل زتا حاصل می‌شود؛ زیرا ژلاتین دارای برآیند بار منفی بوده و با افزایش آن، بار منفی بیومولکولی نیز افزایش یافته و سبب خنثی شدن و کاهش بار پتانسیل زتا می‌شود. همین امر موجب می‌شود که با کاهش ترکیب ژلاتین، گروه‌های عاملی اطراف ذره جمع شده و پتانسیل زتا افزایش یابد؛ در نتیجه به میزان بهینه نزدیک شود. براین

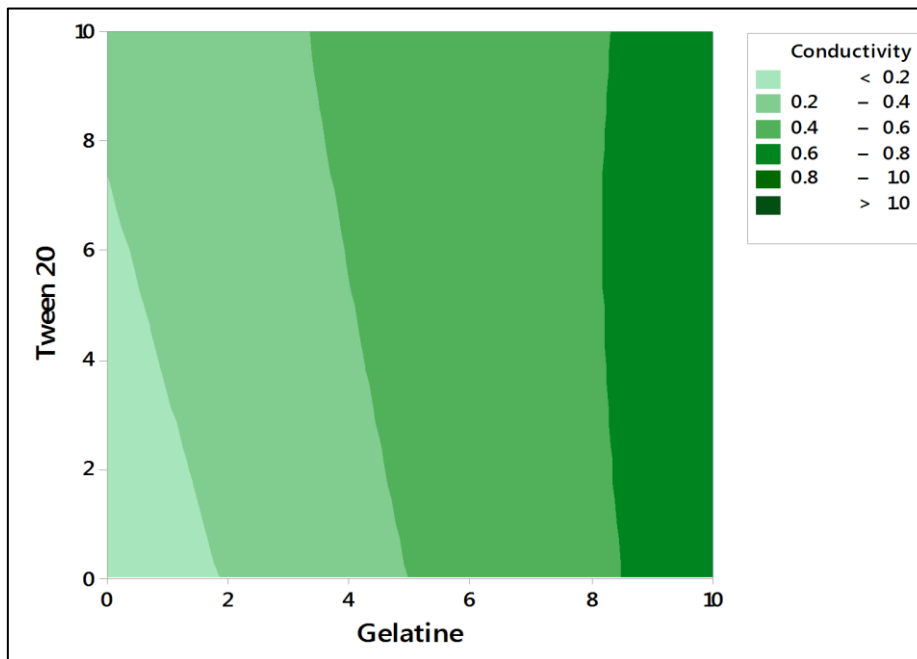
آنالیز تحلیل واریانس نیز مؤید شکل (۴) است و نشان‌دهنده نداشتن تأثیر توئین ۲۰ (P-value بزرگ‌تر از ۰/۰۵) است. جدول (۲) به‌دست آمده از نتایج پتانسیل زتا، تأثیر معنی‌دار ترم‌های خطی، ترم مرتبه اول، ترم‌های درجه دوم را با میزان پایین از ۰/۰۵ P-value، نشان می‌دهد؛ اما مقادیر حاصل از ترم مرتبه دوم و ترم برهم‌کنش، به دلیل بالا بودن از سطح بهینه ۰/۰۵ P-value، عدم تأثیرگذاری این پارامترها در رسیدن به پتانسیل زتای مطلوب را مشخص می‌کند. معنی‌داری ترم‌های درجه دوم نشان از تأثیر مطلوب

توئین ۲۰ است. با افزایش غلظت ژلاتین، هدایت سیستم افزایش می‌یابد. این امر به دلیل ماهیت یونی ژلاتین خصوصاً ژلاتین‌های آزاد موجود در سیستم، در pH های خنثی است. نانونمولسیون با هدایت بالاتر مطلوب تر است یا هدایت الکتریکی کمتر، بستگی به کاربرد آنها دارد. اغلب هدایت بالا، منجر به سهولت پدیده وارونگی فازی شده و می‌تواند پایداری فیزیکی سیستم را کاهش دهد. از طرفی نانونمولسیون‌های دارای هدایت بالا، راحت تر تحت فرایندهایی مثل گرمایش قرار می‌گیرند.

اساس، مهم‌ترین پارامتر مؤثر در تعیین زتا پتانسیل نانو امولسیون تهیه شده، ژلاتین است. در مدل ارائه شده هم پایین بودن مقادیر ضرایب مربوط به توئین ۲۰ مؤید شکل (۴) و جدول (۲) است.

۴.۳. هدایت

در شکل (۵)، تأثیر مقادیر مختلف امولسیفایر ژلاتین و توئین ۲۰ بر هدایت نانو امولسیون‌های تهیه شده نشان داده شده است. همان طور که در شکل مشاهده می‌شود، تأثیر غلظت ژلاتین روی هدایت نمونه‌ها بیشتر از تأثیر غلظت

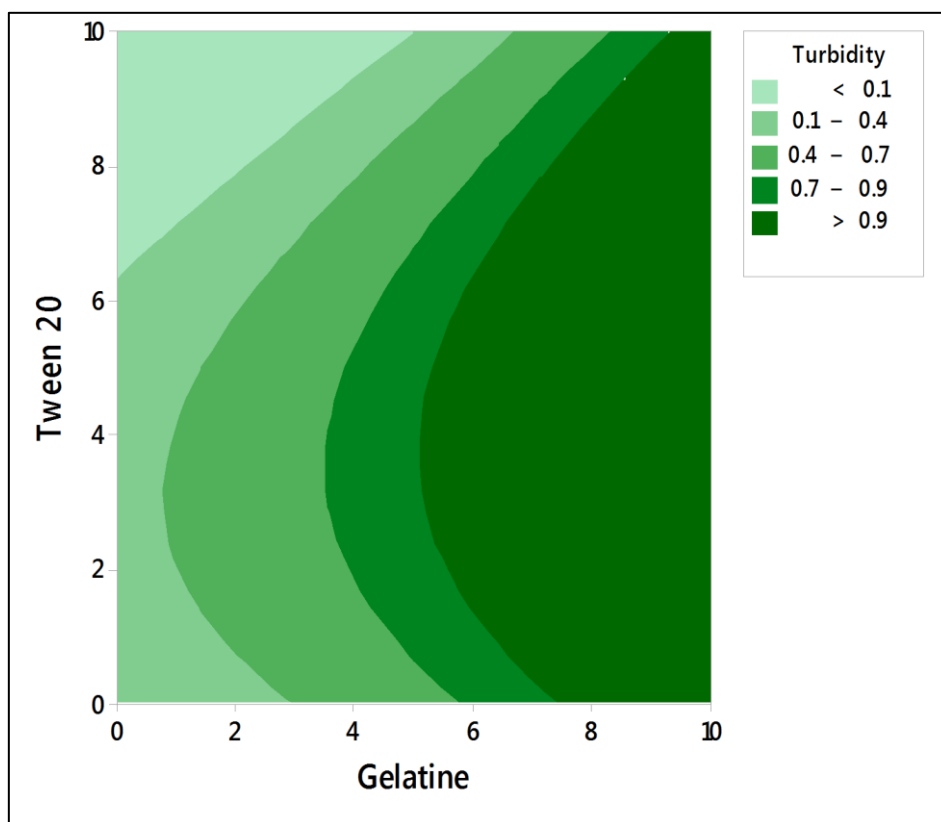


شکل (۵) نمودار دوبعدی تغییرات هدایت نانونمولسیون‌های سانس گیاه نعناع تابعی از میزان توئین ۲۰ و ژلاتین.
Fig 5. Response-surface plots for conductivity of Mentha nanoemulsion as function of gelatin and tween 20.

۵.۳. میزان کدورت

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که افزایش غلظت ژلاتین منجر به افزایش میزان کدورت سیستم می‌شود. افزایش میزان توئین ۲۰ نیز ابتدا باعث افزایش و سپس کاهش کدورت نانو قطرات می‌شود. افزایش کدورت نانو قطرات، عمدتاً به افزایش اندازه قطرات آنها مربوط می‌شود. حذف ناکامل حلال از سیستم هم باعث افزایش کدورت سیستم می‌گردد (شکل ۶).

برطبق جدول (۲) برای ترم‌های خطی، ترم مرتبه اول و ترم مرتبه دوم و ترم‌های برهم کنش کمتر از مقدار ۰/۰۵ برای P-value بوده و در نتیجه امکان استناد بالایی برای مؤثر بودن هدایت در این دو نوع ترکیب درصدی ارائه می‌دهد. سطح اطمینان به دست آمده در جدول (۳)، با R^2 برابر ۹۹/۶۲٪ است که قابل ملاحظه و قابل اعتماد است.



شکل (۶) نمودار دوبعدی تغییرات کدورت نانوامولسیون‌های اسانس گیاه نعناع تابعی از میزان توئین ۲۰ و ژلاتین.

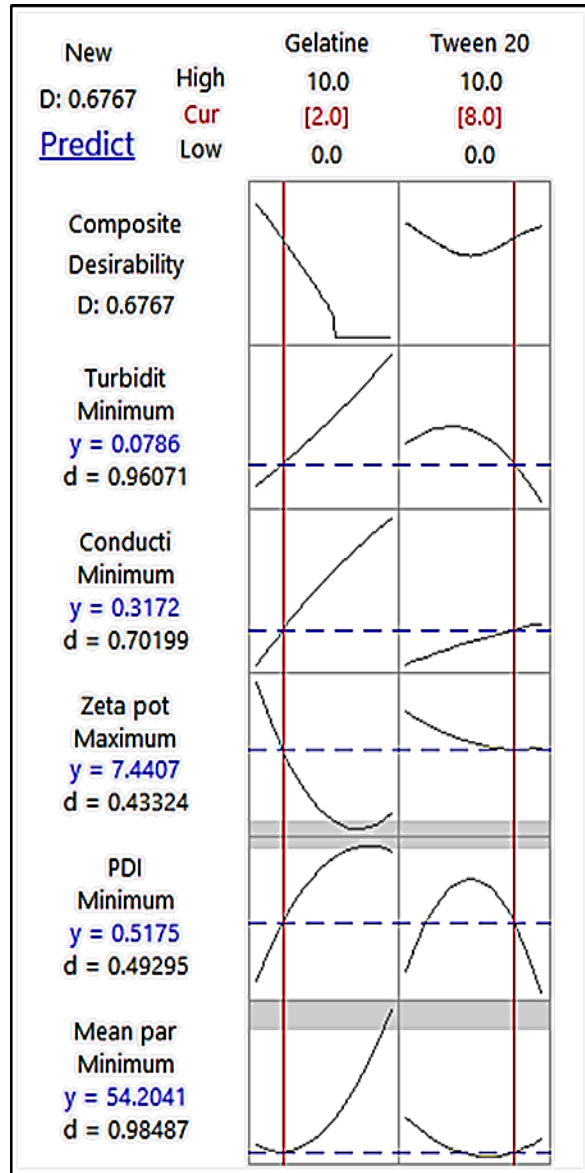
Fig 6. Response-surface plots for turbidity of Mentha nanoemulsion as function of gelatin and tween 20.

۶.۳. تعیین مقادیر بهینه

همان‌طور که اشاره شد، هدف اصلی از بهینه‌سازی شرایط و مواد برای تهیه نانو امولسیون‌های عصاره گیاه نعناع، دست یافتن به نانو قطرات با کمترین متوسط سایز ذرات و درجه توزیع اندازه ذرات، بیشترین میزان پتانسیل زتا، کمترین میزان کدورت و میزان هدایت است. برای ارزیابی اثرات معنادار متغیرهای فرایند، روی هر یک از پاسخ‌ها، تجزیه و تحلیل واریانس انجام شد. با آنالیز رگرسیون چند متغیره به منظور پیش‌بینی تغییرات میانگین اندازه ذرات سیستم، توزیع اندازه ذرات، پتانسیل زتا، هدایت و میزان کدورت مدل‌های چندجمله‌ای مرتبه دوم اولیه به دست آمد. شکل (۷) نتیجه بهینه‌سازی عددی نرم‌افزار است که مقادیر بهینه براساس میزان ترکیب درصد توئین ۲۰ و ژلاتین را نشان می‌دهد.

جدول (۲) برطبق مؤلفه میزان P-value مشخص می‌کند که مقادیر به دست آمده برحسب میزان ترم‌های خطی، ترم مرتبه اول، ترم‌های درجه دوم ژلاتین تأثیر معنی‌داری بر کدورت نانو امولسیون‌های تشکیل شده دارد. ولی ترم‌های خطی و درجه دوم توئین ۲۰ و همچنین ترم‌های ترکیبی مرتبه دوم ژلاتین و توئین ۲۰ تأثیر معنی‌داری برای حصول به کدورت سنجی مناسب از خود نشان نداد. مقادیر حاصل از این پارامترها کمتر از حد بحرانی ۰/۰۵ برای P-value بوده و از این نظر قابل استناد هستند. با توجه به مقدار R^2 به دست آمده در جدول (۳)، می‌توان نتیجه گرفت که رابطه چندجمله‌ای مرتبه دوم قادر به پیش‌بینی ۹۹/۶۲٪ از تغییرات نانو امولسیون‌های تولید شده است که نشان دهنده کیفیت و صحت قابل قبول آن است.

شده و شعاع بازدارندگی آن‌ها در جدول (۴) آورده شده است. لازم به ذکر است که شعاع بازدارندگی بیشتر بیانگر خاصیت ضد باکتریایی بیشتر آن‌ها است. چنانچه نتایج نشان می‌دهند، کلیه پوشش‌های خوراکی فرموله شده دارای خاصیت بازدارندگی رشد باکتریایی هستند. این مشاهده در حالی است که پوشش خالص (ردیف ۵ جدول ۴) و پوشش پلاستی سایزر (ردیف ۶ جدول ۴) عمدتاً فاقد اثر بازدارندگی یا دارای بازدارندگی کم هستند. پوشش عصاره خالص و پوشش‌های ترکیبی حاوی نانوامولسیون بهینه (ردیف‌های ۱ تا ۴ جدول (۴)) اثر بازدارندگی در مقابل هر دو باکتری نشان دادند. خاصیت آنتی باکتریال نانوامولسیون نعناع مربوط به ترکیبات موجود در آن، از جمله ترکیبات فنولی و خاصیت هیدروفوبیک آن است. این ترکیبات فرآر آروماتیکی دارای خاصیت ضد اکسایشی و ضد میکروبی ذاتی هستند و نقش مهمی در سیستم دفاعی گیاهان در مقابل بیماری‌ها، در اثر میکروارگانسیم‌ها، ایفا می‌کنند. در واقع اثر ضد باکتریایی ترکیبات فنولی به دلیل نفوذپذیر نمودن غشای سلول باکتری می‌توانند با کاتیون‌های غشا کلاته شده و فعالیت حیاتی باکتری‌ها را مختل کند. از بین پوشش‌های خوراکی تهیه شده، نمونه سوم با میزان نانوامولسیون بیشتر، دارای بیشترین بازدارندگی خصوصاً در برابر باکتری گرم مثبت است. در تحقیق حاضر تفاوت معناداری بین اثر ضد باکتریایی پوشش‌های حاوی نانوامولسیون‌های اسانس نعناع در مقابل باکتری‌های انتخابی گرم مثبت و منفی مشاهده نشد؛ لذا نانوامولسیون‌های تهیه شده، با موفقیت می‌توانند به عنوان ترکیب ضد باکتریایی در فرمولاسیون‌های مواد غذایی به کار روند. هر چند اسانس ماکروساختار نیز دارای اثر ضد باکتریایی است، با این وجود اسانس نانو ساختار یا نانوامولسیون‌های حاوی اسانس با توجه به مزایایی چون محلولیت بیشتر در آب، نامحسوس تر شدن آروما و پایداری شیمیایی بیشتر برای استفاده‌های مختلف در فرمولاسیون‌های پایه آبی ترجیح داده می‌شوند.



شکل (۷) بهینه‌سازی ترکیب درصد ژلاتین - توئین ۲۰ جهت دستیابی به امولسیون اسانس نعناع بر اساس روش رویه پاسخ سطح
 Fig7. Optimum condition process for optimum mentha nanoemulsion based on response surface methodology.

۷.۲. خاصیت آنتی میکروبی

خاصیت ضد باکتریایی پوشش‌ها شامل پوشش خالص (کربوکسی متیل سلولز)، پوشش پلاستی سایزر (گلیسرول)، پوشش عصاره خالص (نانوامولسیون بهینه) و ترکیبی از سه پوشش مذکور بر علیه باکتری‌های *E. coli* و *S. aureus* به عنوان شاخص باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت بررسی

جدول (۴) تعیین حاله بازدارندگی نهایی نانوامولسیون بهینه‌شده اسانس گیاه نعناع بر علیه *E. coli* و *S. areus*Table 4. Inhibition zone diameter for optimum mentha nanoemulsion against *E. coli* and *S. areus*.

هاله بازدارندگی (mm)		نانوامولسیون بهینه (%)	گلیسرول (%)	کربوکسی متیل سلولوز (%)	ردیف
Inhibition zone (mm)					
<i>S. areus</i>	<i>E. coli</i>	Optimized Nanoemulsion (%)	Glycerol (%)	Carboxy methyl cellulose (%)	Number
19±1.8	16±3.5	5	0.5	0.5	1
20±4.1	15±2.7	5	0.5	1	2
26±1.5	22±1.8	10	0.5	1	3
25±2.8	20±1.5	5	0	0	4
1±0.5	0±0	0	0	1	5
2±1.5	1±1.3	0	0.5	0	6

طراحی آزمایش - روش رویه پاسخ استفاده شد. نتایج تأثیر مقادیر مختلف توئین ۲۰ و ژلاتین بر روی اندازه امولسیون‌های نعناع نشان دهنده آن بود که نانوامولسیون‌های مطلوب در غلظت‌های نسبتاً بالای توئین ۲۰ و نسبتاً کم ژلاتین حاصل می‌شود. تأثیر میزان ژلاتین و توئین ۲۰ در میزان توزیع اندازه قطرات نانوامولسیونی نشان داد که در غلظت‌های کم توئین ۲۰، افزایش میزان ژلاتین باعث کاهش قابل توجه توزیع اندازه قطرات سیستم شده است. در مقادیر پایین ژلاتین، نانو قطرات حاصل دارای پتانسیل زتا مطلوب و بالایی است، ولی مقادیر مختلف توئین ۲۰ تأثیر قابل توجهی بر مقادیر زتا پتانسیل ندارد. همانند پتانسیل زتا، تأثیر غلظت ژلاتین روی هدایت نمونه‌ها بیشتر از تأثیر غلظت توئین ۲۰ است. با افزایش غلظت ژلاتین، هدایت سیستم افزایش می‌یابد. افزایش غلظت ژلاتین منجر به افزایش میزان کدورت سیستم می‌شود. افزایش میزان توئین ۲۰ نیز ابتدا باعث افزایش و سپس کاهش کدورت نانو ذرات می‌شود. با هدف اصلی رسیدن به نانو قطرات با کمترین متوسط سایز ذرات و توزیع اندازه ذرات، بیشترین میزان پتانسیل زتا، کمترین میزان کدورت و میزان هدایت، آنالیز رگرسیون به دست آمد که مقادیر بهینه براساس میزان ترکیب درصد توئین ۲۰ و ژلاتین را نشان می‌دهد که به ترتیب ۸ و ۲٪ هستند. خاصیت ضد باکتریایی پوشش‌های خوراکی حاوی نانوامولسیون‌های اسانس نعناع بر علیه باکتری‌های *E. coli* و *S. areus* به

۸.۳. خاصیت آنتی‌اکسیدانی

ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی از مهم‌ترین ویژگی‌های کیفی محسوب می‌شود و ارتباط نزدیکی با میزان اسانس بارگزاری شده در نانوامولسیون‌ها و در نتیجه میزان پایداری شیمیایی محصول دارد. به طوری که نانوامولسیون‌های دارای بارگزاری، بیشتر اسانس یا پایداری شیمیایی بالاتر، عمدتاً خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نشان می‌دهند. نتایج آنالیز آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون بهینه انتخاب شده نشان داد که در حدود ۷۵٪ رادیکال‌ها مهار می‌شوند که این مقدار برای استفاده به عنوان سیستم نگهدارنده غذایی مقدار قابل قبولی است. نانوامولسیون بهینه نعناع باعث کاهش قابل توجه پایداری رادیکال‌های DPPH شده است. دلیل این را می‌توان این گونه توجیه کرد که متابولیت‌های فنولی موجود در نعناع می‌توانند یک هیدروژن از گروه هیدروکسیل موجود در حلقه آروماتیک خود رها کرده و باعث اکسیداسیون رادیکال‌های آزاد چربی‌ها و دیگر بیومولکول‌های غشا سلولی و تخریب آن شوند. به این صورت خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود را اعمال کنند.

۴. نتیجه‌گیری

در این تحقیق، از ترکیب دوتایی ژلاتین و توئین ۲۰، به عنوان امولسیفایر و تثبیت‌کننده اسانس نعناع در محلول‌های آبی استفاده شد. به منظور تعیین ترکیب درصد بهینه از

دادند. نتایج آنالیز آنتی‌اکسیدانی نمونه بهینه انتخاب شده نیز نشان داد که در حدود ۷۵٪ رادیکال‌ها مهار می‌شوند که این مقدار برای استفاده به عنوان سیستم نگهدارنده غذایی، مقدار قابل قبولی است.

عنوان شاخص باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت بررسی شده و شعاع بازدارندگی آن‌ها که بیانگر خاصیت ضد باکتریایی بیشتر آن‌ها است، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود که نانوامولسیون و پوشش‌های حاوی نانوامولسیون اثر بازدارندگی در مقابل هر دو باکتری نشان

منابع

- [1] Panahi, M., Barzegar, H., & Hojjati, M. (2017). Effect of Pistacia atlantica gum oil on antimicrobial and antioxidant properties of edible starch film. *Innov. Food Technol.*, 5, 77-89. [In Persian].
- [2] Prakash, A., Baskaran, R., Paramasivam, N., & Vadivel, V. (2018). Essential oil based nanoemulsions to improve the microbial quality of minimally processed fruits and vegetables: A review. *Food. Res. Int.*, 111, 509-523.
- [3] Iqbal, T., Ijaz Hussain, A., Shahzad Chatha, A., Naqvi, A. R., & Bokhari, T. H. (2013). Antioxidant Activity and Volatile and Phenolic Profiles of Essential Oil and Different Extracts of Wild Mint (*Mentha longifolia*) from the Pakistani Flora. *J. Anal. Methods. Chem.*, 1, 1-6.
- [4] Beyki, M., & Zhavah, S. (2014). Encapsulation of Mentha piperita essential oil in chitosan- cinnamon acid nano gel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *Ind. Crop. Prod.*, 54, 310-319.
- [5] Johnson, M., Wesely, E. G. & Uma, V. (2011). Antibacterial activity of leaves and inter-nodal callus extract of Mentha arvensis. *Asian. Pac. J. Trop. Dis.*, 4, 196-200.
- [6] Houicher, A., Kuley, E., & Ozogul, F. (2015). Effect of natural extracts mentha spicata L. and Artemisia campestris) on biogenic amine formation of sardine vacuum- packed and refrigerated (*Sardina pilchardus*) fillets. *J. Food Process. Preserv.*, 39, 2393-2403.
- [7] Latoch, A., & Dariusz, M. S. (2015). Effect of Mentha piperita on oxidative stability and sensory characteristics of cooked pork sausage. *J. Food Process. Preserv.*, 39, 1566-1573.
- [8] Aswathanarayan, J. B., & Vittal, R. R., (2019). Nanoemulsions and Their Potential Applications in Food Industry. *Front. Sustain. Food Syst.*, 3, 1-21.
- [9] Zhao, J., Wei, F., Xu, W., & Han, X. (2020). Enhanced antibacterial performance of gelatin/chitosan film containing capsaicin loaded MOFs for food packaging. *Appl. Surf. Sci.*, 510, 145418.
- [10] Schrieber, R., & Careis, H. (2007). Gelatin Handbook-Theory and industrial Practice, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- [11] Tan, C. P., & Nakajima. M. (2005). β -Carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. *Food Chem.*, 92, 661-671.
- [12] Anarjan. N., Imededdine, N., & Tan. Ch. P. (2013). Influence of astaxanthin, emulsifier and organic phase concentration on physicochemical properties of astaxanthin nanodispersions. *Chem. Cent. J.*, 7, 1-11.
- [13] Alizadeh Asl, S., Mousav, M., & Labbafi, M. (2017). Synthesis and Characterization of Carboxymethyl Cellulose from Sugarcane Bagasse. *J. Food Processing Techno.*, 8, 1-6.
- [14] Tian, H., Li, D., Xu, T., Hu, J., Rong, Y., & Zhao, B. (2017). Citral stabilization and characterization of nanoemulsions stabilized by a mixture of gelatin and Tween 20 in an acidic system. *J. Sci. Food Agric.*, 97, 2991-2998.

*Research Article***Preparation and characterization of Mentha nanoemulsions using gelatin-polysorbate 20 based multicomponent stabilizer system as food Preservative****Milad Ashrafi Asl¹, Sona Jamshidi^{2*}, Navideh Anarjan³****1. MSC, Department of Chemical Engineering, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz.****2. PhD, Department of Chemical Engineering, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz.****3. PhD, Department of Food Hygiene, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz.****Abstract:**

In this work, the mentha essential oil nanoemulsions were prepared using Tween 20-gelatin multicomponent stabilizing system as food preservative. The response surface methodology (RSM) was applied in order to study the main and interaction effects of the stabilizer components' proportions, namely, Tween 20 (0-10 gr) and gelatin (0-10 gr) on physicochemical characteristics of obtained nanoemulsions such as average particle size, polydispersity index (PDI), turbidity, conductivity and zeta potential. It was resulted that the response-surface models were significantly ($p < 0.05$) fitted for studied response variables and could precisely predict all response changes with high coefficients of determination ($R^2 > 0.90$). The overall optimum region with minimum z-average, PDI, turbidity, conductivity and maximum range of zeta-potential was achieved at 8 gr of tween 20 and 2 gr of Gelatin. The optimum mentha essential oil nanoemulsion showed good antibacterial activity against both *E. coli* and *S. aureus*, alone as well as incorporated in edible coating formulations. The maximum inhibition zone was observed using 1% carboxymethyl, 0.5% glycerol and 5% optimized nanoemulsion.

Keywords: Resopnse surface methodology, Mentha essential oil, nanoemulsion, Tween 20, Gelatin.

* Corresponding author: S_jamshidi@iaut.ac.ir