# بررسی خصوصیات ضداکسایشی و ضدمیکروبی اسانس پونه کوهی و تأثیر آن بر پایداری اکسایشی روغن ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichtys molitrix*) در آب

رضا فرهمندفر[1*]، رضا اسماعیل زاده کناری[2]، مریم اثنی عشری[3]

۱- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران
* مسئول مکاتبات: گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران
۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران
۳- دانشجوی دکتری گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران
**(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۰۲ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۳/۲۹)**

## چکیده

روغن ماهی، منبع غنی از اسیدهای چرب امگا ۳ است که مصرف مداوم آن به دلیل آثار مفید تغذیه‌ای و جلوگیری از بیماری‌ها و اختلالات قلبی توصیه می‌گردد. اما سیرناشدگی بالای این روغن، آن را مستعد اکسایش می‌نماید. در پژوهش حاضر، قدرت ضداکسایشی اسانس پونه کوهی با قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH و ضدمیکروبی آن با اندازه‌گیری حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) باکتری‌های *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *سودوموناس آئروژینوزا* مورد بررسی قرار گرفت. سپس از اسانس پونه کوهی به عنوان ضداکساینده طبیعی و جایگزین انواع سنتزی آن، در پایداری امولسیون روغن ماهی فیتوفاگ در آب استفاده شد، به طوری که پس از تعیین ساختار اسید چرب روغن، غلظت-های مختلف اسانس پونه کوهی به امولسیون اضافه و در دمای ٤ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد از نظر تولید هیدروپراکسیدها، دی‌ان مزدوج، تری‌ان مزدوج و اسید تیوباربیتوریک مورد پایش قرار گرفت. نتایج نشان داد که ۲٤۰۰ پی‌پی‌ام اسانس پونه کوهی با ۵۳/۳۳ درصد بیشترین قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH را داشت و مقدار MIC و MBC اسانس پونه کوهی در باکتری‌های گرم منفی بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت بود. همچنین، اسانس پونه کوهی در سطوح غلظتی مختلف توانست از اکسایش لیپیدی در امولسیون روغن ماهی در آب ممانعت کند به طوری که در غلظت ۲٤۰۰ پی‌پی‌ام حتی از ضداکساینده سنتزی TBHQ عملکرد بهتری داشت. لذا اسانس طبیعی پونه کوهی به دلیل خاصیت ضداکسایشی و ضدمیکروبی، می‌تواند به عنوان جایگزین انواع ضداکساینده-های سنتزی در سیستم‌های غذایی مختلف مورد استفاده قرار گیرد.

**کلید واژگان**: امولسیون روغن ماهی، پایداری اکسایشی، پونه کوهی، فعالیت ضداکسایشی، فعالیت ضدمیکروبی

*مسئول مکاتبات: r.farahmandfar@sanru.ac.ir

## ۱- مقدمه

آثار سلامتی بخش روغن ماهی در کاهش خطر بیماری‌های قلبی-عروقی و بیماری‌های خودایمنی از جمله التهاب مفاصل[1] و لوپوس[2]، پیش‌گیری از بیماری‌های کبدی و بهبود عملکرد سیستم ایمنی، دانشمندان را به استفاده از آن در مواد غذایی مختلف از جمله نان، ماست و سیستم‌های امولسیونی مانند سس‌های سالاد ترغیب نموده است [٤-١]. روغن ماهی به دلیل وجود ترکیبات منحصر به فرد غیراشباع (امگا ۳) دارای تفاوت‌های زیادی با سایر روغن‌ها و چربی‌های خوراکی است. از جمله این ترکیبات خاص، اسید ایکوزاپنتانوئیک[3] (C20:5 n-3، EPA) و اسید دوکوزاهگزانوئیک[4] (C22:6 n-3، DHA) هستند که برای سلامت انسان بسیار مفید می‌باشند [٥]. اما سیرناشدگی بالای روغن ماهی سبب حساسیت بالای این روغن به اکسایش و به تبع آن تغییر طعم روغن و کاهش کیفیت کلی و ماندگاری آن می‌شود. پایداری اکسایشی روغن ماهی علاوه بر عواملی همچون ساختار شیمیایی، غلظت اکسیژن، حضور ضداکساینده، دما و سطح تماس تحت تأثیر برهم کنش‌های فازی در سیستم‌های امولسیونی نیز قرار می‌گیرد. مطالعات نشان می‌دهد پایداری اکسایشی اسیدهای چرب چند غیراشباع با افزایش درجه سیرناشدگی در محلول آبی افزایش می‌یابد؛ زیرا نحوه آرایش مولکولی اسیدهای چرب در میسل‌ها به گونه‌ای است که با افزایش درجه سیرناشدگی، اسیدهای چرب بیشتر به عمق میسل نفوذ کرده، از اکسایش لیپیدی مصون‌تر می‌مانند [٦].

استفاده از ضداکساینده‌ها از جمله روش‌های موثر برای بهبود پایداری اکسایشی روغن ماهی محسوب می‌شود. ضداکساینده-های سنتزی مانند بوتیل هیدروکسی آنیزول[5] (BHA)، بوتیل هیدروکسی تولوئن[6] (BHT)، پروپیل گالات[7] (PG) و تریشو بوتیل هیدروکینون[8] (TBHQ) به طور متداول در روغن ماهی استفاده می‌شوند، اما این ضداکساینده‌ها باعث بروز علائم پاتوژنیک مثل بزرگ شدن کبد، افزایش فعالیت آنزیم میکروزومال کبد و تبدیل مواد مصرف شده به ترکیبات سمی و سرطان‌زا می-گردند. در حال حاضر، کاربرد ترکیبات طبیعی در این خصوص بیشتر مد نظر قرار می‌گیرند [٧]. یکی از این ترکیبات طبیعی، پونه کوهی (*Origanum vulgare* L.) است که به طور گسترده در سراسر نواحی مدیترانه‌ای وجود دارد [٨]. اسانس[9] (EO) پونه کوهی عمدتاً از کارواکرول و تیمول تشکیل شده است که دارای خاصیت ضدمیکروبی، ضدقارچی و خواص ضداکسایشی هستند [٩]. فعالیت پونه کوهی به طور عمده به تیمول و کارواکرول (که سبب تغییر در تراوایی غشاء سلول باکتری می‌شود) نسبت داده می‌شود و از آنجایی که با چربی و رادیکال‌های هیدروکسیل واکنش نشان می‌دهد، سبب پایداری محصول می‌گردد [١٠]. اسانس پونه کوهی نسبت به انواع میکروارگانیسم‌ها واکنش نشان می‌دهد و به علت مقدار متغیر ترکیبات ضدمیکروبی آن، به عنوان عامل طبیعی جهت محافظت و نگهداری مواد غذایی به کار می‌رود [١١]. خاصیت آبگریزی اسانس پونه کوهی، در لیپیدهای غشاء سلولی میکروارگانیسم‌ها و میتوکندری نقش داشته و آنها را تراوا می‌سازد و موجب تراوش محتویات سلولی می‌شود. میکروارگانسیم‌های گرم مثبت در مقایسه با میکروارگانیسم‌های گرم منفی حساسیت بیشتری نسبت به این اسانس دارند [١٢].

برخی از محققین به تأثیر اثر ضداکساینده‌های طبیعی بر روغن و یا امولسیون‌های روغن در آب پرداختند. اثر اسانس‌های پونه کوهی و جعفری، پساب روغن‌کشی زیتون، ترولوکس[10] و EDTA[11] بر اکسایش امولسیون‌های روغن در آب حاوی ٥ درصد روغن ماهی به کمک آزمون‌های پراکسید، هگزانال و ترانس-ترانس-۲و٤- هپتادی‌انال در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد طی ١٤ روز پایش گردید. بهترین عملکرد در بین ترکیبات مزبور به پساب روغن‌کشی زیتون و EDTA اختصاص داشت [١٣]. افزودن هیدروکسی تیروزول آسیله به روغن ماهی و امولسیون آن در آب سبب بهبود پایداری اکسایشی روغن و به خصوص امولسیون آن شد. قدرت ضداکسایشی با آزمون‌های ۲و۲-دی

1. Arthritis
2. Lupus
3. Eicosapentaenoic acid
4. Docosahexaneoic acid
5. Butylated hydroxyanisole
6. Butylated hydroxytoluene
7. Propyl gallate
8. Tertiary butylhydroquinone
9. Essential oil
10 .Trolox
11 .Ethylenediaminetetraacetic acid

فنیل-۱-پیکریل هیدرازین[1] (DPPH)، قدرت احیاکنندگی آهن[2] (FRAP) و ظرفیت ضداکسایشی معادل ترولوکس[3] (TEAC) تعیین شد و اکسایش روغن با اندازه‌گیری ترکیبات دی‌ان مزدوج و فلوئورسانس بررسی گردید. نتایج نشان داد که بیشترین قابلیت ضداکسایشی زمانی ظاهر می‌شود که مشتقات هیدوکسی تیروزول به صورت ۸ کربنه باشد [۱٤]. Wang و همکاران (۲۰۱۱) پایداری اکسایشی روغن ماهی را در حضور اسید کارنوسیک و ضداکساینده سنتزی TBHQ مورد بررسی قرار دادند. غلظت-های مختلف اسید کارنوسیک (۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ میلی‌گرم در گرم روغن) و TBHQ به مدت ٦٦ روز در دماهای ٤ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد با انجام آزمون‌های پراکسید، دی‌ان مزدوج و اسید تیوباربیتوریک پایش گردید. بیشترین عملکرد ضداکسایشی اسید کارنوسیک در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در گرم روغن ظاهر شد، گرچه TBHQ در جلوگیری از اکسایش روغن ماهی از عملکرد بهتری برخوردار بود [۱۵].

از آنجایی که این امولسیون به موجب ساختار روغن ماهی پایداری کمی دارد، از اسانس پونه کوهی در پنج سطح غلظتی (صفر، ۳۰۰، ٦۰۰، ۱۲۰۰ و ۲٤۰۰ پی‌پی‌ام) به عنوان ضداکساینده طبیعی استفاده شد و با ضداکساینده سنتزی TBHQ (۲۰۰ پی-پی‌ام) در دو سطح دمایی (٤ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد) در آون از طریق پایش شاخص‌های اکسایشی عدد پراکسید، دی‌ان مزدوج، تری‌ان مزدوج و اسید تیوباربیتوریک[4] (TBA) مقایسه گردید.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مواد اولیه

ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichtys molitrix*) و گیاه پونه کوهی از بازار محلی شهرستان بابلسر تهیه شد. حلال‌های کلروفرم، متانول، هگزان، معرف DPPH، تیوسیانات آمونیوم، کلرید باریم دو آبه، سولفات آهن هفت آبه، اسید کلریدریک، استات سدیم سه آبه، اسید استیک، کلرید آهن III شش آبه، از شرکت‌های مرک و سیگما و ایزوله پروتئین سویا از شرکت پرتودانه سویا خریداری شد.

### ۲-۲- استخراج اسانس

مقدار ۵۰ گرم پودر برگ پونه کوهی را به همراه ۵۰۰ سی‌سی آب مقطر در بالن ته گرد قرار داده و این بالن به دستگاه تقطیر کلونجر[5] متصل شد و اسانس‌گیری به مدت ۳ ساعت ادامه یافت. محل جمع شدن اسانس در دستگاه، با فویل آلومینیومی پوشانده شد تا از تغییر کیفیت اسانس در اثر تابش نور جلوگیری شود و دمای دستگاه طوری تنظیم شد تا آب داخل آن در حال جوش ملایم باشد. اسانس بدست آمده با استفاده از سولفات سدیم خشک آبگیری و تا قبل از استفاده در ظرف شیشه‌ای تیره با (درب کاملاً بسته) در یخچال نگهداری شد [۱٦].

### ۲-۳- آنالیز اسانس با GC-MS

ترکیبات موجود در اسانس با دستگاه کروماتوگرافی گازی ( Palo Alto, CA) Agilent-7890A مجهز به آشکارساز طیف سنج جرمی 5975 و ستون‌های مویینه HP-5 MS (۳۰ متر طول، ۰/۲۵ میلی‌متر قطر داخلی، ۰/۲۵ میکرومتر ضخامت لایه داخلی) شناسایی گردیدند. گاز حامل عبارت از هلیم با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه بود. دمای اولیه آون به مدت ۲ دقیقه در ۵۰ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد، سپس با سرعت ٤ درجه سانتی-گراد بر دقیقه تا دمای ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد افزایش داده شد. سیستم به مدت ۵ دقیقه در این دما ثابت بود و سپس با سرعت ۲۰ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه به دمای ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد رسانده و به مدت ۲ دقیقه نیز در این دما ثابت نگه داشته شد. دمای بخش تزریق و بخش حد واسط در ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. دمای محفظه یونش و چهار قطبی آشکارساز طیف سنج جرمی به ترتیب ۲۳۰ و ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد بود. تزریق نمونه به صورت انشعابی دو بخشی و با نسبت انشعاب ۱۵:۱ انجام گرفت [۱۷].

1. 2,2- Diphenyl-1-picrylhydrazyl
2. Ferric reducing antioxidant power
3. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
4. Thiobarbituric acid
5. Clevenger

## ۲-٤- اندازه‌گیری قدرت مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH

سپس به لوله‌های آزمایش حامل یک میلی‌لیتر محلول متانولی نمونه با غلظت‌های مختلف (بسته به قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد)، یک میلی‌لیتر از محلول فوق اضافه گردید. لوله‌های آزمایش بعد از همزدن به مدت یک ساعت در جای تاریک نگهداری شدند و سپس جذب آنها در طول موج ۵۱۷ نانومتر در برابر شاهد (بدون ضداکساینده) قرائت گردید. درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد بر حسب معادله زیر محاسبه شد [۵].

$$A\% = \frac{(A_C - A_S)}{A_C} \times 100$$ معادله (۱)

که A% درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH، $A_c$ جذب شاهد و $A_s$ جذب نمونه است.

## ۲-۵- اندازه‌گیری حداقل غلظت بازدارندگی[1] (MIC) و حداقل غلظت کشندگی[2] (MBC)

باکتری‌های مورد مطالعه شامل *اشریشیا کلی*[3] (ATCC 35218)، *استافیلوکوکوس اورئوس*[4] (ATCC 25923)، *لیستریا مونوسیتوژنز*[5] (ATCC 19115) و *سودوموناس آئروژینوزا*[6] (ATCC 9027) بودند که به صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. در ادامه، با استفاده از استاندارد ۰/۵ مک فارلند سوسپانسیون میکروبی با دانسیته سلولی تقریباً معادل CFU/ml $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ حاصل شد. سپس، غلظت اسانس از ٦۰ تا ۰/۱۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. برای تعیین MIC، در میکروتیتر پلیت‌های ۹٦ خانه-ای، به ترتیب ۲۰ میکرولیتر اسانس، ۱٦۰ میکرولیتر محیط کشت و ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی اضافه گردید. جذب صفر نمونه‌ها (قبل از گرمخانه گذاری) و جذب نمونه‌ها پس از ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در طول موج٦۳۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا میکروپلیت ریدر[7] (BioTek، آلمان) قرائت گردید. پس از طی زمان انکوباسیون، لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری تلقیح شده، مورد بررسی قرار گرفتند. پایین‌ترین غلظتی که در آن هیچ گونه رشد باکتری مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) گزارش شد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)، ۵ میکرولیتر از چاهک‌هایی که عدم رشد باکتری را نشان می دادند را روی محیط کشت نوترینت آگار ریخته و با سوآپ استریل روی آن پخش گردید. بعد از گرمخانه گذاری مجدد در دمای ۳۷ °C به مدت ۲٤ ساعت، پلیت‌های کشت داده شده از نظر وجود رشد میکروبی مورد بررسی قرار گرفت. در این حالت، پایین‌ترین غلظت اسانس که در پلیت مربوطه عدم رشد باکتری مشاهده گردید، به عنوان MBC اسانس در نظر گرفته شد [۱۸-۲۰].

## ۲-٦- ساختار اسیدهای چرب روغن ماهی

روغن ماهی به روش آب داغ (۱۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد) استخراج [۲۱] و ترکیب اسید چربی نمونه روغن به وسیله کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی (GC-MS) تعیین و بر اساس درصد نسبی سطوح گزارش شد. اسیدهای چرب استری شده با استرهای متیل اسیدهای چرب[8] (FAME) همخوانی داشت که از تکان دادن شدید محلول‌های روغن در هگزان (۰/۳ گرم در ۷ میلی لیتر) با ۲ میلی لیتر هیدراکسید پتاسیم متانولی در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت۱۰ دقیقه ایجاد شد. FAME با استفاده از کروماتوگراف اچپی ۵۸۹۰ (هیولت – پاکارد، اس‌سی امریکا[9]) مجهز به ستون‌های مویینه سی‌پی- اف‌آی‌ال[10] ۸۸ شیشه-ای سیلیکا، ٦۰ متر طول در ۰/۲۲ میلی متر قطر داخلی، ۰/۲ میکرومتر ضخامت فیلم و شناساگر یونی شعله‌ای[11] شناسایی شد. گاز نیتروژن به عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۰/۷۵ میلی‌لیتر در دقیقه مورد استفاده قرار گرفت. آون در دمای ۱۹۸ درجه سانتیگراد و تزریق کننده و شناساگر در دمای ۲۵۰ درجه سانتیگراد حفظ گردید.

1. Minimum inhibitory concentration
2. Minimum bactericidal concentration
3. Escherichia coli
4. Aureus Staphylococcus
5. Listeria monocytogenes
6 . Pseudomonas aeruginosa
7. ELISA Microplate Reader

8. Fatty acids methyl esters
9. HP-5890 (Hewlett-Packard, CA,USA)
10. CP-FIL88
11. Flame ion detector

## ۲-۷- تهیه امولسیون روغن ماهی در آب

امولسیون روغن ماهی فیتوفاگ در آب با ۱۰ درصد روغن ماهی در ۸۵ درصد آب و پنج درصد ایزوله پروتئین سویا تهیه شد. ابتدا مخلوط آب و پروتئین تهیه شد و سپس روغن به آرامی به آن اضافه گردید. امولسیون به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰۰ دور در دقیقه معادل دستگاه اولترا تراکس ( Ika. T25 digital ultra_turrax، آلمان) و سپس چهار دقیقه توسط سونیکاتور XL 2020تحت فراصوت قرار گرفت.

## ۲-۸- جداسازی روغن از امولسیون

ابتدا به نسبت ۱:۱ محلول کلروفرم:متانول به امولسیون اضافه شد. سپس به مدت یک دقیقه با دور ۵۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ (Heraeus Sepetech Gmbh، آلمان) گردید. فاز حاوی روغن جدا شده و مجدداً در لوله سانتریفوژ دیگری به مدت یک دقیقه با دور ۵۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ صورت گرفت. فاز حاوی روغن با سمپلر جدا و درون پلیت ریخته شد. سپس به کمک تزریق گاز ازت، حلال آن تبخیر و نمونه روغن برای اندازه‌گیری عدد پراکسید، دی‌ان مزدوج، تری‌ان مزدوج و اسید تیوبابیتوریک آماده گردید.

## ۲-۹- اندازه‌گیری عدد پراکسید

۰/۱ تا ۰/۲ گرم نمونه روغن، بسته به میزان پراکسایش آن، در لوله‌های آزمایش ۱۵ میلی‌لیتری وزن شد و با ۹/۸ میلی‌لیتر حلال کلروفرم:متانول (به نسبت ۳:۷) مخلوط و به مدت ۲ تا ٤ ثانیه هم زده شد. سپس به ترتیب ۵۰ میکرولیتر محلول تیوسیونات آمونیوم و محلول آهن II اضافه و بعد از اضافه کردن هر کدام، به مدت ۲ تا ٤ ثانیه محلول هم زده شد. پس از ۵ دقیقه گرمخانه گذاری در دمای اتاق، جذب نمونه در طول موج ۵۰۰ نانومتر در برابر شاهد (بدون ضداکساینده) تعیین شد. تمامی مراحل این روش زیر نور ملایم و به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. عدد پراکسید از فرمول زیر محاسبه شد:

$$PV = \frac{(As - Ab) \times m}{55/84 \times W \times 2}$$ معادله (۲)

که $A_s$، جذب نمونه و $A_b$ جذب شاهد در طول موج ۵۰۰ نانومتر است. m شیب به دست آمده از منحنی کالیبراسیون (٤۰/۸٦ با ضریب تبیین ۰/۹۹) و W وزن نمونه روغن می‌باشد [۷].

## ۲-۱۰- اندازه‌گیری عدد دی‌ان مزدوج و تری‌ان مزدوج

نمونه روغن به نسبت ۱:٦۰۰ با هگزان (گرم به میلی‌لیتر) رقیق و سپس جذب نمونه رقیق شده برای ترکیبات دی‌ان مزدوج و تری‌ان مزدوج به ترتیب در طول موج ۲۳٤ نانومتر و ۲٦۸ نانومتر خوانده شد [۲۲].

## ۲-۱۱- تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌ها در قالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی در پنج سطح غلظتی و دو سطح دمایی (٤ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد) انجام شد. میانگین‌ها با نرم افزار SAS و بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد ($P<0/05$) مقایسه شد. نمودارها با نرم افزار Microsoft Excel ترسیم گردید.

# ۳- نتایج و بحث

## ۳-۱- ترکیبات شیمیایی اسانس

مطابق جدول شماره ۱، نتایج حاصل از آنالیز GC-MS اسانس پونه کوهی نشان دهنده آن است که ۲۰ ترکیب شیمیایی در مجموع ۹۸/۰۷ درصد اسانس را تشکیل می‌دهند. در بین ترکیبات مختلف اسانس پونه کوهی به ترتیب کارواکرل[1] (۸۱/۷۸ درصد)، تیمول[2] (۵/۰۳ درصد) و پی-سیمن[3] (٤/۸۷ درصد) بیشترین مقدار را به خود اختصاص دادند. محققین مختلف بیان کردند که کارواکرل، تیمول و پی-سیمن دارای خاصیت ضداکسایشی و ضدمیکروبی هستند [۷ و ۲۵-۲۳]. پژوهش Meshkibaf و همکاران (۲۰۱۰) که به بررسی اثرات و ضدباکتریایی اسانس هیدروالکلی پونه کوهی، مروه تلخ، زرشک وحشی چای کوهی پرداخته بود، نشان داد که اسانس متانولی پونه کوهی به سبب ترکیبات مذکور بر تعدادی از باکتری‌های گرم منفی و مثبت اثرات ممانعت کنندگی دارد [۲٦]. همچنین، Paparella و همکاران (۲۰۱٦) به بررسی اثر اسانس پونه و کیتوزان در ماندگاری گوشت خوک پرداختند. نتایج نشان داد که در بسته بندی گوشت خوک حاوی اسانس پونه به علت فعالیت

1. Carvacrol
2. Thymol
3. P-cymene

ضداکسایشی بالا همراه با کیتوزان به عنوان عوامل تأثیر گذار بر کاهش رشد باکتری و فساد اکسایشی استفاده می‌گردد [۲۷].

**Table 1** *Origanum vulgare* L. essential oil components identified by GC-MS

| Constituent | Concentration (%) |
|---|---|
| α-Thujene | 0.14 |
| α-Pinene | 0.38 |
| Camphene | 0.08 |
| 1-Octen-3-ol | 0.28 |
| β-myrcene | 071 |
| α-Phellandrene | 0.15 |
| α-Terpinene | 0.63 |
| P-cymene | 4.87 |
| Limonene | 0.35 |
| γ-Terpinene | 0.78 |
| Terpinolene | 0.13 |
| Borneol | 0.38 |
| Terpinen-4-ol | 0.48 |
| Methyl-thymol-ether | 0.17 |
| Thymol | 5.03 |
| Carvacrol | 81.78 |
| Caryophyllene | 0.64 |
| α-humulene | 0.15 |
| β-Bisabolene | 0.43 |
| Caryophyllene oxide | 0.51 |
| Total (%) | 98.07 |

## ۳-۲- قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

در پژوهش حاضر، سطوح غلظتی مختلف اسانس پونه کوهی (صفر تا ۲٤۰۰ پی‌پی‌ام) به عنوان ضداکسایندههای طبیعی و TBHQ به عنوان ضداکسایندهٔ شاهد برای پایدارسازی روغن ماهی استفاده شد. مقادیر عددی درصد مهار رادیکال آزاد DPPH در غلظت‌های مختلف اسانس پونه کوهی در شکل ۱ نشان داده شده است. در این آزمون بیشترین درصد مهار رادیکال آزاد DPPH اسانس پونه کوهی، مربوط به غلظت ۲٤۰۰ پی‌پی‌ام (۵۳/۳۳ درصد) و کمترین آن مربوط به غلظت ۳۰۰ پی‌پی‌ام (۲۵/۵۷ درصد) بود که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری باهم داشتند ($P<۰/۰۵$). با توجه به نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها می‌توان گفت که با افزایش غلظت اسانس پونه کوهی، قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH نیز افزایش می‌یابد. Asnaashari و همکاران (۲۰۱٤) به بررسی اثر آنتی اکسیدانی اسید گالیک و متیل گالات و آلفا توکوفرول در امولسیون روغن ماهی کیلکا در آب پرداختند. نتایج نشان داد با اینکه اسید گالیک با کمترین آب‌گریزی، بیشترین فعالیت ضداکسایشی را در آزمون ۲و۲–دی فنیل–۱–پیکریل هیدرازین داشت، در سیستم امولسیونی متیل گالات از اسید گالیک عملکرد بهتری داشت و آلفاتوکوفرول به سبب زنجیره آب‌گریز خود، بهترین نقش حفاظتی را در امولسیون روغن در آب از خود نشان داد [۵]. در واقع، توانایی ضداکسایندهٔ در متوقف کردن مرحله انتشار در فرآیند اکسایش به معنای واکنش سریعتر آن با رادیکال‌های آزاد نسبت به اسیدهای چرب چند غیراشباع است [۷ و ۲۵–۲۳].

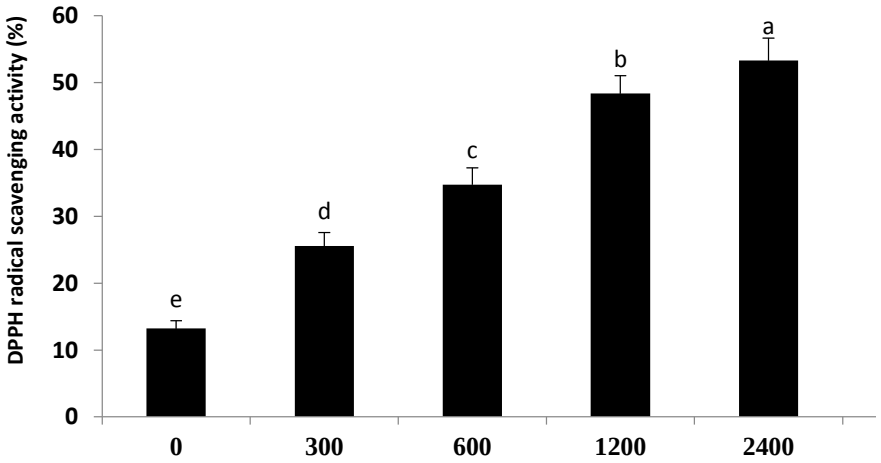



**Fig 1** Antioxidant activity of *Origanum vulgare* L.essential oil by DPPH radical scavenging assay

## ۳-۳- فعالیت ضدمیکروبی اسانس

حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) به کمترین غلظت از یک ترکیب اطلاق می‌شود که می‌تواند به میزان قابل توجهی رشد یک میکروارگانیسم را پس از گذشت یک دوره انکوباسیون مشخص (۱۶ تا ۲٤ ساعت بسته به گونه باکتری) مهار نماید. حداقل غلظت کشندگی (MBC) کمترین غلظت از یک ترکیب است که پس از گذشت یک دوره انکوباسیون مشخص، منجر به مرگ میکروارگانیسم می‌گردد [۱۰ و ۲۵-۲۳]. مقادیر MIC و MBC اسانس پونه کوهی در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *اشرشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* در جدول ۲ نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود، در مورد *اشرشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* (باکتری‌های گرم منفی) مقادیر MIC به ترتیب معادل ۱۵ و ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* (باکتری‌های گرم مثبت) معادل ۳/۷۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. از طرف دیگر، مقادیر MBC برای *اشرشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* به ترتیب معادل ۳۰ و ٦۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و برای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* به ترتیب معادل ۷/۵ و ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش شد. اثر ضدمیکروبی اسانس پونه کوهی را می‌توان به ترکیباتی همچون کارواکرل، تیمول و پی-سیمن (جدول ۱) نسبت داد [۱۰ و ۲۵-۲۳]. نتایج نشان داد که MIC و MBC اسانس پونه کوهی در باکتری‌های گرم منفی بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت بود. به عبارت دیگر، مقاومت باکتری‌های گرم منفی در برابر اسانس پونه کوهی بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت گزارش شد که علت این امر را می‌توان به وجود لایه محافظتی ضخیم لیپوپروتئین-لیپوپلی ساکاریدی موجود در دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی نسبت داد [۱۲ و ۳۱-۲۸]. از طرف دیگر، مقدار کمتر MIC نسبت به MBC در اسانس پونه کوهی نشان داد که این اسانس در غلظت‌های پایین-تر دارای خاصیت بازدارندگی و در غلظت بالاتر دارای خاصیت کشندگی است که با نتایج سایر محققین مطابقت دارد [۱۲ و ۳۱-۲۸].

**Table 2** Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of *Origanum vulgare* L.essential oil

| Bacteria | Type of gram | MIC (mg/ml) | MBC (mg/ml) |
|---|---|---|---|
| *Staphylococcus aureus* | Gram Positive | 3.75 | 7.5 |
| *Listeria monocytogenes* | Gram Positive | 3.75 | 15 |
| *Escherichia coli* | Gram Negative | 15 | 30 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | Gram Negative | 30 | 60 |

## ۳-٤- ساختار اسید چربی روغن ماهی

ساختار اسید چربی روغن ماهی در جدول ۳ نشان داده شده است و عمدتاً به ترتیب حاوی انواع غیراشباع (MUFA[1]، به خصوص اسید اولئیک، C18:1)، اشباع (SFA[2]، به خصوص اسید پالمتیک، C16:0) و چند غیراشباع (PUFA[3]، عمدتاً اسیدهای لینولئیک، C18:2 $\omega_3$، ایکوزاپنتانوئیک، C22:5، و دوکوزاهگزانوئیک، C22:6) بود. میزان اسیدهای چرب اشباع در روغن ماهی ۲۹/۷۱ درصد گزارش شد. میزان اسیدهای چرب تک غیراشباع روغن ماهی ٤٦/۵ درصد و اسیدهای چرب چند غیراشباع (که جزء اسیدهای چرب ضروری می‌باشند) در روغن ماهی ۲۳/۰٦ درصد تعیین شد. مقادیر به دست آمده در محدوده رایج روغن‌های ماهی قرار داشتند [۳۵]. اندیس پلی‌ان (EPA+DHA/ C16:0) و نسبت PUFA به SFA نیز نشان می‌دهد روغن ماهی فیتوفاگ دارای ارزش تغذیه‌ای فوق العاده‌ای است و طبعاً باید در رژیم غذایی گنجانده شود. از اندیس پلی‌ان می‌توان برای پایش میزان اکسایش‌پذیری اسیدهای چرب چند

1. Monounsaturated fatty acids
2. Saturated fatty acids
3. Polyunsaturated fatty acids

غیراشباع نیز استفاده نمود. درجه بالا غیراشباعیت روغن، آن را نسبت به فساد اکسایشی حساس‌تر می‌کند. از طرف دیگر، داده-های معتبری وجود دارد که توصیه به کاهش اسیدهای چرب اشباع و افزایش ملایم اسیدهای چرب تک غیراشباع و چند غیراشباع n-3 و n-6 در رژیم غذایی انسان‌ها می‌کنند تا از بیماری‌های قلبی و غیره جلوگیری کنند [۳٦].

**Table 3** Fatty acid profile of silver carp fish oi

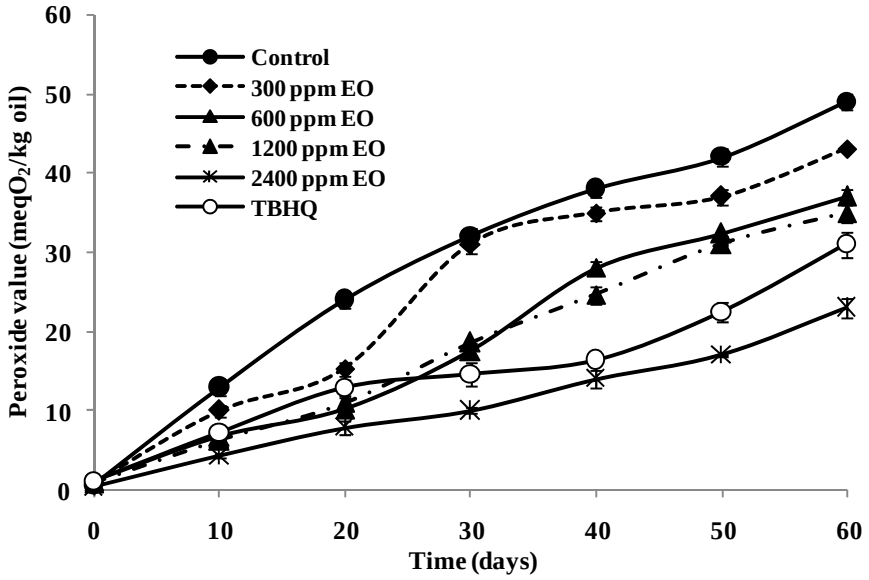
| Fatty acids | Percent (%)* |
|---|---|
| Myristic acid (C14:0) | 5.215±0.049[f] |
| Palmitic acid (C16:0) | 17.41±0.014[b] |
| Palmitoleic acid (C16:1) | 15.01±0.071[d] |
| Stearic acid (C18:0) | 4.225±0.035[g] |
| Oleic acid (C18:1) | 31.5±0.064[a] |
| Linoleic acid (C18:2) | 16.32±0.01[c] |
| α-Linolenic acid (C18:3) | 2.1±0.092[h] |
| Arachidic acid (C20:0) | 1.36±0.057[i] |
| Arachidonic acid (C20:4) | 0.21±0.028[j] |
| Eicosapentaenoic acid (C20:5) | 6.45±0.049[e] |
| Docosahexaenoic acid (C22:6) | 5.80±0.028[f] |
| Others | 2.23±0.064[g] |
| Saturated fatty acids (SFA) | 29.71±0.120 |
| Monounsaturated fatty acids (MUFA) | 46.5±0.007 |
| Polyunsaturated fatty acids (PUFA) | 23.06 ±0.64 |
| PUFA / SFA | 0.77±0.08 |
| Unsaturated fatty acids (USFA) | 69.56±0.54 |
| (EPA+DHA)/C16:0 | 12.25±0.47 |

* Means± SD

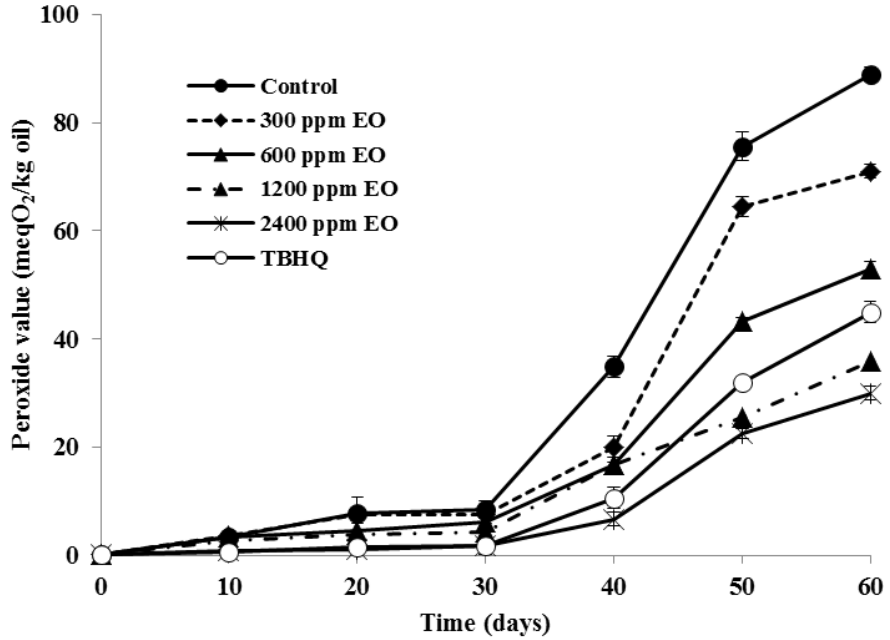
## ۳-۵- بررسی روند اکسایشی در امولسیون روغن ماهی در آب

شکل ۲، تغییرات عدد پراکسید در سطوح غلظتی مختلف از اسانس پونه کوهی در امولسیون روغن ماهی در آب را طی ٦۰ روز نگهداری در دمای ٤ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد نشان می‌دهد. به طور کلی، عدد پراکسید نمونه‌های امولسیون روغن ماهی در آب با افزایش مدت زمان انبارداری در دمای ٤ و ۲۵ درجه سانتی-گراد، روند صعودی به خود گرفت (P<۰/۰۵). در کلیه دماها (٤ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد)، بیشترین مقدار عدد پراکسید مربوط به نمونه شاهد و کمترین مقدار متعلق به نمونه ۲٤۰۰ پی‌پی‌ام اسانس بود که از لحاظ آماری با یگدیکر اختلاف معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵) لذا با افزایش غلظت اسانس از صفر تا ۲٤۰۰ پی‌پی‌ام اسانس پونه کوهی، عدد پراکسید روند نزولی به خود گرفت به طوری که حتی نمونه حاوی ۲٤۰۰ پی‌پی‌ام اسانس خصوصاً با افزایش مدت زمان انبارداری، قدرت ضداکسایشی بالاتری نسبت به ضداکساینده سنتزی TBHQ داشت. از طرف دیگر، داده‌های عدد پراکسید در دو دمای مختلف ٤ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد نشان داد که افزایش دما می‌تواند موجب افزایش قابل توجه عدد پراکسید گردد. از آنجایی که پدیده اکسایش در فصل مشترک آب-روغن اتفاق می‌افتد، ترکیب ضداکسایشی که بتواند خود را به چنین موضعی برساند، عملکرد بهتری در امولسیون دارد و از اکسایش لیپیدی ممانعت خواهد کرد.

نتایج تولید دی‌ان مزدوج و تری‌ان مزدوج در امولسیون روغن ماهی در آب حاوی سطوح غلظتی صفر تا ۲٤۰۰ پی‌پی‌ام از اسانس پونه کوهی در دمای ٤ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد طی انبارداری ٦۰ روزه در جدول ٤ آورده شده است. به طور کلی با افزایش اسانس پونه کوهی از صفر تا ۲٤۰۰ پی‌پی‌ام، مقدار دی‌ان مزدوج و تری‌ان مزدوج (در کلیه دماها) کاهش چشمگیری داشت (P<۰/۰۵) به طوری که در امولسیون روغن ماهی در آب حاوی ۲٤۰۰ پی‌پی‌ام اسانس پونه کوهی نسبت به TBHQ، مقدار عدد دی‌ان مزدوج کمتری از خود نشان داد که این امر نشان دهنده قدرت بالای ضداکسایشی اسانس پونه کوهی است. از طرف دیگر، افزایش دما مقدار مقدار دی‌ان مزدوج و تری‌ان مزدوج را به طور معنی‌داری افزایش داد (P<۰/۰۵). درحقیقت، عملکرد ضداکساینده‌ها در امولسیون به عوامل مختلفی از جمله فازهای آب‌دوست و آب‌گریز، فصل مشترک آب-روغن، نوع و غلظت ضداکساینده و خواص گیرندگی رادیکال آزاد بستگی دارد.




A)




B)

**Fig 2** Hydroperoxide formation changes of fish oil in water emulsion containing different concentration of *Origanum vulgare* L.essential oil during storage time at 4°C (A) and 25°C (B)

پروتئین‌ها نیز در فاز پیوسته و جذب شده در سطح می‌توانند به طور قابل توجهی ترکیبات ضداکسایشی را از طریق برهم‌کنش-های خاص و نامشخص تغییر دهند [۳۷]. Donnelly و همکاران (۱۹۹۸) گزارش کردند که توبین ۲۰ یا پروتئین ایزوله آب پنیر تسهیل کننده اکسایش می‌باشد، اما ترکیب آنها در فاز آبی، خاصیت ضداکسایشی دارد و توانایی ترکیبات دارای فعالیت سطحی در تغییر آرایش فضایی پروتئین سبب افزایش مهار رادیکال‌های آزاد می‌شود [۳۸].

**Table 4** The conjugated diene and triene changes to the initial contents which were calculated from the linear relationship between the conjugated diene and triene of fish oil in water emulsion containing different concentrations of *Origanum vulgare* L. essential oil during the storage time at 4°C and 25°C

| Treatments | Conjugated diene | | Conjugated triene | |
|---|---|---|---|---|
| | 4ºC | 25ºC | 4ºC | 25ºC |
| Control | 16.36 ± 0.27[a] | 35.6 ± 0.3[a] | 13.1 ± 0.04[a] | 33.2 ± 0.03[a] |
| 300 ppm EO | 9.54 ± 0.14[b] | 29.31 ± 0.61[b] | 10.94 ± 0.09[b] | 26.6 ± 0.24[b] |
| 600 ppm EO | 5.61 ± 0.25[c] | 23.24 ± 0.08[c] | 6.27 ± 0.5[c] | 19.98 ± 0.07[c] |
| 1200 ppm EO | 4.41 ± 0.05[e] | 21.2 ± 0.03[d] | 4.37 ± 0.08[d] | 17.9 ± 0.05[d] |
| 2400 ppm EO | 3.31 ± 0.03[f] | 18.41 ± 0.2[f] | 3.36 ± 0.07[f] | 17.7 ± 0.04[e] |
| TBHQ | 4.8 ± 0.07[d] | 20.30 ± 0.06[e] | 3.97 ± 0.05[e] | 17.95 ± 0.37[de] |

EO= Essential oil

Means ± SD (standard deviation) within a column with the same lowercase letters are not significantly different at $p < 0.05$.

Faraji و همکاران (۲۰۰٤) گزارش کردند پروتئین در فاز پیوسته امولسیون روغن در آب از اکسایش لیپیدی به کمک گیرندگی رادیکال آزاد و مهار فلزات جلوگیری می‌کند. در امولسیون‌های روغن در آب، موقعیت فیزیکی ضداکسایندهها نیز ممکن است بر عملکرد آنها موثر باشد. در حقیقت، استفاده از ضداکسایندهها در امولسیون‌های غذایی اغلب به بروز نتایج غیرمنتظره به سبب پیچیدگی سیستم‌ها می‌انجامد [۳۹].

**Table 5** The TBA changes to the initial TBA which were calculated from the linear relationship between the TBA of fish oil in water emulsion containing different concentrations of *Origanum vulgare* L.essential oil during the storage time at 4 and 25°C

| Treatments | TBA value | |
|---|---|---|
| | 4ºC | 25ºC |
| Control | 11.6±0.25[a] | 29.37±0.4[a] |
| 300 ppm EO | 7.52±0.1[b] | 23.13±0.31[b] |
| 600 ppm EO | 4.81±0.5[c] | 19.4±0.28[c] |
| 1200 ppm EO | 3.13±0.02[e] | 12.2±0.01[d] |
| 2400 ppm EO | 2.1±0.04[f] | 8.18±0.15[f] |
| TBHQ | 3.81±0.04[d] | 11.57±0.07[e] |

Means ± SD (standard deviation) within a column with the same lowercase letters are not significantly different at $p < 0.05$.

جدول ۵ تغییرات عدد اسید تیوباربیتوریک (TBA) در سطوح غلظتی مختلف (صفر تا ۲٤۰۰ پی‌پی‌ام) اسانس پونه کوهی در امولسیون روغن ماهی در آب (در دمای ٤ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد) را طی انبارداری ٦۰ روزه گزارش می‌دهد. در دمای ٤ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد، مقدار اسید تیوباربیتوریک نمونه‌های حاوی صفر تا ۲٤۰۰ پی‌پی‌ام اسانس پونه کوهی به ترتیب در محدوده ۱۱/٦ الی ۲/۱ و ۲۹/۳۷ الی ۸/۱۸ قرار داشت و این در حالی است که TBA ضداکسایندهٔ سنتزی TBHQ در دو دمای مذکور به ترتیب ۳/۸۱ و ۱۱/۵۷ گزارش شد. نتایج نشان داد که با افزایش مقدار اسانس پونه کوهی، عدد TBA نمونه‌ها کاهش معنی‌داری به خود گرفت (P<۰/۰۵) لذا نمونه حاوی ۲٤۰۰ پی-پی‌ام اسانس پونه کوهی کمترین مقدار را داشت. لازم به ذکر است که با تغییر دما از ٤ به ۲۵ درجه سانتی‌گراد، افزایش معنی-داری در عدد TBA مشاهده شد (P<۰/۰۵). آلدئیدها محصول عمده تجزیه پراکسیدها می‌باشند. معمولاً آلدئیدها نسبت به کتون‌ها دارای آستانه بویایی پائین‌تری هستند لذا از لحاظ ایجاد طعم و بوی نامطلوب نسبت به کتون‌ها مهمترند و عامل اصلی بدطعمی اکسایشی محسوب می‌شوند. مالون آلدئید از محصولات ثانویه اکسیداسیون اسیدهای چرب چند غیراشباعی به شمار می-رود و مقدار آن بر اساس آزمون اسید تیوباربیتوریک تعیین می-گردد [٤۰]. برخی محققین نشان دادند که با افزایش مدت زمان و یا دمای انبارداری امولسیون روغن در آب، مقدار پراکسیدها (محصولات اولیه اکسیداسیون) افزایش می‌یابد و به مقدار ماکزیمم می‌رسد و سپس با افزایش مدت (یا دمای) انبارداری، محصولات ثانویه اکسیداسیون مثل آلدئیدها و کتون‌ها تشکیل می‌شوند لذا با افزایش آلدئیدها (خصوصاً مالون دی آلدئیدها) مقدار عدد TBA افزایش می‌یابد [٤۳-٤۰].

## ٤- نتیجه گیری

روغن ماهی، منبعی غنی از اسیدهای چرب امگا ۳ به ویژه اسیدهای ایکوزانوئیک و دوکزاهگزانوئیک می‌باشد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که اسانس پونه کوهی دارای خاصیت ضداکسایشی و ضدمیکروبی است. اسانس پونه کوهی دارای اثرات ضدمیکروبی قابل توجهی بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی است و می‌تواند به عنوان یکی از منابع داروهای ضدمیکروبی تلقی گردد. از طرف دیگر، اسانس پونه کوهی به عنوان ضداکساینده طبیعی به خوبی می‌تواند از اکسایش امولسیون روغن ماهی فیتوفاگ در آب جلوگیری کرده و جایگزین انواع سنتزی آن شود. لذا جداسازی ترکیبات موثره، خالص سازی، بررسی اثرات ضداکسایشی و ضدمیکروبی پونه کوهی برای تهیه ترکیبات افزودنی در مواد غذایی پیشنهاد می‌گردد.

## ٥- تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری به دلیل پشتیبانی مالی از این پژوهش در قالب طرح تحقیقاتی مصوب با شماره طرح ۰۹-۱۳۹۵-۰۲ تشکر و قدردانی به عمل آورند.

## ٦- منابع

[1] Gura, K.M., Lee, S., Valim, C., Zhou, J., Kim, S., Modi, B.P., Arsenault, D.A., Strijbosch, R.A., Lopes, S., Duggan, C. and Puder, M. 2008. Safety and efficacy of a fish-oil–based fat emulsion in the treatment of parenteral nutrition–associated liver disease. Pediatrics, 121(3), 678-686.

[2] Colussi, G., Catena, C., Novello, M., Bertin, N. and Sechi, L.A. 2017. Impact of omega-3 polyunsaturated fatty acids on vascular function and blood pressure: relevance for cardiovascular outcomes. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 27(3), 191-200.

[3] Glenn, J.O.H. and Wischmeyer, P.E. 2014. Enteral fish oil in critical illness: perspectives and systematic review. Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care, 17(2), 116-123.

[4] Chen, W.J. and Yeh, S.L. 2003. Effects of fish oil in parenteral nutrition. Nutrition, 19(3), 275-279.

[5] Asnaashari, M., Farhoosh, R. and Sharif, A. 2014. Antioxidant activity of gallic acid and methyl gallate in triacylglycerols of Kilka fish oil and its oil-in-water emulsion. Food chemistry, 159, 439-444.

[6] Sun, Y.E., Wang, W.D., Chen, H.W. and Li, C. 2011. Autoxidation of unsaturated lipids in food emulsion. Critical reviews in food science and nutrition, 51(5), 453-466.

[7] Farahmandfar, R., Asnaashari, M. and Sayyad, R. 2015. Comparison antioxidant activity of Tarom Mahali rice bran extracted from different extraction methods and its effect on canola oil stabilization. Journal of food science and technology, 52(10), 6385-6394.

[8] Kokkini, S., Karousou, R., Hanlidou, E. and Lanaras, T. 2004. Essential oil composition of Greek (Origanum vulgare ssp. hirtum) and Turkish (O. onites) oregano: a tool for their distinction. Journal of Essential Oil Research, 16(4), 334-338.

[9] Cervato, G., Carabelli, M., Gervasio, S., Cittera, A., Cazzola, R. and Cestaro, B. 2000. Antioxbdant properties of oregano (Origanum vulgare) leaf extracts. Journal of Food Biochemistry, 24(6), 453-465.

[10] Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J. and Nychas, G.J. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of applied microbiology, 91(3), 453-462.

[11] Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J. and Pérez-Álvarez, J. 2008. Antifungal activity of lemon (Citrus lemon L.), mandarin (Citrus reticulata L.), grapefruit (Citrus paradisi L.) and orange (Citrus sinensis L.) essential oils. Food control, 19(12), 1130-1138.

[12] Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International journal of food microbiology, 94(3), 223-253.

[13] Jimenez-Alvarez, D., Giuffrida, F., Golay, P.A., Cotting, C., Lardeau, A. and Keely, B.J. 2008. Antioxidant activity of oregano, parsley,

and olive mill wastewaters in bulk oils and oil-in-water emulsions enriched in fish oil. Journal of agricultural and food chemistry, 56(16), 7151-7159.

[14] Medina, I., Lois, S., Alcántara, D., Lucas, R. and Morales, J.C. 2009. Effect of lipophilization of hydroxytyrosol on its antioxidant activity in fish oils and fish oil-in-water emulsions. Journal of agricultural and food chemistry, 57(20), pp.9773-9779.

[15] Wang, H., Liu, F., Yang, L., Zu, Y., Wang, H., Qu, S. and Zhang, Y. 2011. Oxidative stability of fish oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during long-term storage. Food Chemistry, 128(1), 93-99.

[16] Bagheri, H., Manap, M.Y.B.A. and Solati, Z. 2014. Antioxidant activity of Piper nigrum L. essential oil extracted by supercritical CO 2 extraction and hydro-distillation. Talanta, 121, 220-228.

[17] Sparkman, O.D. 2005. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy Robert P. Adams. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 16(11), 1902-1903.

[18] Bektas, E., Serdar, G., Sokmen, M. and Sokmen, A. 2016. Biological Activities of Extracts and Essential Oil of Thymus transcaucasicus Ronniger. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 19(2), 444-453.

[19] Jordán, M.J., Lax, V., Rota, M.C., Lorán, S. and Sotomayor, J.A. 2013. Effect of the phenological stage on the chemical composition, and antimicrobial and antioxidant properties of Rosmarinus officinalis L essential oil and its polyphenolic extract. Industrial Crops and Products, 48, 144-152.

[20] Bubonja-Sonje, M., Giacometti, J. and Abram, M. 2011. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. Food Chemistry, 127(4), 1821-1827.

[21] Sathivel, S. and Prinyawiwatkul, W. 2004. Adsorption of FFA in crude catfish oil onto chitosan, activated carbon, and activated earth: A kinetics study. Journal of the American Oil Chemists' Society, 81(5), 493-496.

[22] Urbančič, S., Kolar, M.H., Dimitrijević, D., Demšar, L. and Vidrih, R. 2014. Stabilisation of sunflower oil and reduction of acrylamide formation of potato with rosemary extract during deep-fat frying. LWT-Food Science and Technology, 57(2), 671-678.

[23] Gavaric, N., Mozina, S.S., Kladar, N. and Bozin, B. 2015. Chemical Profile, Antioxidant and Antibacterial Activity of Thyme and Oregano Essential Oils, Thymol and Carvacrol and Their Possible Synergism. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 18(4), 1013-1021.

[24] Ramos, M., Beltrán, A., Peltzer, M., Valente, A.J. and del Carmen Garrigós, M. 2014. Release and antioxidant activity of carvacrol and thymol from polypropylene active packaging films. LWT-Food Science and Technology, 58(2), 470-477.

[25] Rodriguez□Garcia, I., Cruz□Valenzuela, M.R., Silva□Espinoza, B.A., Gonzalez□Aguilar, G.A., Moctezuma, E., Gutierrez□Pacheco, M.M., Tapia□Rodriguez, M.R., Ortega□Ramirez, L.A. and Ayala□Zavala, J.F. 2016. Oregano (Lippia graveolens) essential oil added within pectin edible coatings prevents fungal decay and increases the antioxidant capacity of treated tomatoes. Journal of the Science of Food and Agriculture. 96(11), 3772–3778.

[26] Meshkibaf, M.H., Abdollahi, A, Fasihi Ramandi, M., Adnani Sadati, S.J, Moravvej, A, Hatami, S. 2010. Antibacterial effects of hydro-alcoholic extracts of Ziziphora tenuior, Teucrium polium, Barberis corcorde and Stachys inflate. Koomesh Journal, 11 (4), 240-244.

[27] Paparella, A., Mazzarrino, G., Chaves-López, C., Rossi, C., Sacchetti, G., Guerrieri, O. and Serio, A. 2016. Chitosan boosts the antimicrobial activity of Origanum vulgare essential oil in modified atmosphere packaged pork. Food Microbiology, 59, 23-31.

[28] Cherrat, L., Espina, L., Bakkali, M., García–Gonzalo, D., Pagán, R. and Laglaoui, A. 2014. Chemical composition and antioxidant properties of Laurus nobilis L. and Myrtus communis L. essential oils from Morocco and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes for food preservation. Journal of the Science of Food and Agriculture, 94(6), 1197-1204.

[29] Khan, R., Islam, B., Akram, M., Shakil, S., Ahmad, A.A., Ali, S.M., Siddiqui, M. and Khan, A.U. 2009. Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. Molecules, 14(2), 586-597.

[30] Xu, Y., Burton, S., Kim, C. and Sismour, E. 2016. Phenolic compounds, antioxidant, and antibacterial properties of pomace extracts from four Virginia□grown grape varieties. Food science & nutrition, 4(1), 125-133.

[31] Farahmandfar, R., Shokooh Saremi, E., Shahiri Tabarestani, H., Azizkhani, M. 2014. Fundamental comprehensive microbiology of food technology, Sahra press, Iran.

[32] Almadiy, A.A., Nenaah, G.E., Al Assiuty, B.A., Moussa, E.A. and Mira, N.M. 2016. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils and major fractions of four Achillea species and their nanoemulsions against foodborne bacteria. LWT-Food Science and Technology, 69, 529-537.

[33] Diao, W.R., Hu, Q.P., Zhang, H. and Xu, J.G. 2014. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (Foeniculum vulgare Mill.). Food Control, 35(1), 109-116.

[34] Zhang, Y., Liu, X., Wang, Y., Jiang, P. and Quek, S. 2016. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Food Control, 59, 282-289.

[35] Frankel, E.N., Satué-Gracia, T., Meyer, A.S. and German, J.B. 2002. Oxidative stability of fish and algae oils containing long-chain polyunsaturated fatty acids in bulk and in oil-in-water emulsions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(7), 2094-2099.

[36] Clandinin, M.T., Van Aerde, J.E., Merkel, K.L., Harris, C.L., Springer, M.A., Hansen, J.W. and Diersen-Schade, D.A. 2005. Growth and development of preterm infants fed infant formulas containing docosahexaenoic acid and arachidonic acid. The Journal of pediatrics, 146(4), 461-468.

[37] Bartolomé, B., Estrella, I. and Hernandez, M.T. 2000. Interaction of low molecular weight phenolics with proteins (BSA). Journal of Food Science, 65(4), 617-621.

[38] Donnelly, J.L., Decker, E.A. and McClements, D.J. 1998. Iron□Catalyzed Oxidation of Menhaden Oil as Affected by Emulsifiers. Journal of food science, 63(6), 997-1000.

[39] Faraji, H., McClements, D.J. and Decker, E.A. 2004. Role of continuous phase protein on the oxidative stability of fish oil-in-water emulsions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(14), 4558-4564.

[40] Farahmandfar, R. 2012. Comprehensive chemistry and technology of edible oils. Sahra press, Iran.

[41] Qiu, C., Zhao, M., Decker, E.A. and McClements, D.J. 2015. Influence of protein type on oxidation and digestibility of fish oil-in-water emulsions: Gliadin, caseinate, and whey protein. Food chemistry, 175, 249-257.

[42] Thanonkaew, A., Wongyai, S., Decker, E.A. and McClements, D.J. 2015. Formation, antioxidant property and oxidative stability of cold pressed rice bran oil emulsion. Journal of food science and technology, 52(10), 6520-6528.

[43] Zhu, X., Ye, A., Teo, H.J., Lim, S.J. and Singh, H. 2014. Oxidative stability of fish oil in water emulsions under high pressure treatment. International Journal of Food Science & Technology, 49(6), 1441-1448.

# Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of Oregano essential oil and its effect on oxidative stability of silver carp (*Hypophthalmichtys molitrix*) fish oil in water emulsion

**Farahmandfar, R. [1*], Esmaeilzadeh Kenari, R. [2], Asnaashari, M. [3]**

1. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Iran
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Iran
3. PhD Student, Department of Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Iran

**(Received: 2017/02/20 Accepted:2017/06/19)**

Fish oil is a rich source of omega-3 fatty acids, which is recommended for prolonged use due to beneficial nutritional effects and the prevention of heart disease and disorders. However, high unsaturation of this oil makes it susceptible to oxidation**.** In the present study, antioxidant activity of *Origanum vulgare* L. essential oil was evaluated by DPPH assay and its antimicrobial activity was determined by measuring the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa*. Then, *Origanum vulgare* L. essential oil as natural antioxidant and alternative of synthesis ones, for stabilizing silver carp fish oil in water emulsion was used. So, after determining the fatty acid profile of the oil, different concentrations of the essential oil added to emulsion and stored at 4°C and 25°C and monitored in term of hydroperoxides, conjugated diene, conjugated triene and thiobarbituric acid. The results showed that 2400 ppm of *Origanum vulgare* L. had the most DPPH inhibitory power with 53.33% and MIC and MBC values of *Origanum vulgare* L. essential oil in gram-negative bacteria were more than gram-positive bacteria. Moreover, various concentrations of the essential oil prevented lipid oxidation of fish oil in water emulsions. So that, at 2400 ppm, had even better performance than synthetic antioxidant, TBHQ. Therefore, the natural *Origanum vulgare* L. essential oil due to its antioxidant and antimicrobial properties can be used as an alternative to synthetic types in various food systems.

**Keywords:** Fish oil emulsion, Oxidative stability, Oregano, Antioxidant activity, Antimicrobial activity

* Corresponding Author E-Mail Address: r.farahmandfar@sanru.ac.ir