



مقاله پژوهشی

بررسی ویژگی‌های شیمیایی، آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره‌های آبی و الکلی کلاله و گلبرگ زعفران (*Crocus Sativus L.*)

مریم مدامیان فرشباغی^۱، آسیه احمدی دستگردی^{۲*}، جواد طباطبائی‌ان نیم آورد^۲

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردستان، اردستان، ایران

۲- گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردستان، اردستان، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۱۱/۱۵

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۹/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: زعفران گران‌بهارترین ادویه دنیا است و عصاره حاصل از این گیاه ارزشمند، نه تنها دارای خواص ارزشمند تغذیه‌ای است، بلکه دارای کاربردهای گوناگونی در فرمولاسیون محصولات غذایی است. در سال‌های اخیر تمایل برای استفاده از منابع گیاهی به علت نقش ترکیبات فیتوشیمیایی و اکسیدان‌ها در حفظ سلامت انسان، افزایش یافته است. هدف از این مطالعه ارزیابی و مقایسه ویژگی‌های شیمیایی، آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره‌های آبی و الکلی کلاله و گلبرگ زعفران (*Crocus Sativus L.*) است.

مواد و روش‌ها: پس از استخراج عصاره به روش پراکولاسیون (خیساندن)، میزان ترکیبات فنولی و فلاوونوئید کل به ترتیب با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو و روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم انجام شد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نیز به روش احیای رادیکال آزاد اندازه‌گیری شد. اثرات ضد میکروبی عصاره‌ها (قطر هاله، حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی) علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تایفی موروم*، *باسیلوس سرئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنس* و *شرشیاکلی* به روش انتشار دیسک بررسی شد.

نتایج: مقایسه ترکیبات شیمیایی بین اندام‌های مختلف نشان داد که محتوای این ترکیبات و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسته به اندام می‌تواند متفاوت باشد. بر طبق نتایج، کلاله دارای بالاترین میزان ترکیبات فنولی کل و فلاوونوئید است. همچنین کلاله دارای بالاترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نسبت به گلبرگ است. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر کلاله نسبت به گلبرگ می‌تواند به دلیل محتوای بالای ترکیبات فنولیک در کلاله باشد. نتایج نشان داد که باکتری‌های فوق در برابر عصاره‌های متانولی و اتانولی زعفران بسیار حساس هستند درحالی‌که نسبت به عصاره آبی مقاومت نشان دادند. **نتیجه‌گیری:** می‌توان زعفران را به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان و نگه‌دارنده طبیعی در صنایع غذایی جهت جلوگیری از اکسیداسیون مواد غذایی و کنترل پاتوژن‌های غذایی پیشنهاد نمود.

کلمات کلیدی: آنتی‌اکسیدانی، زعفران (*Crocus sativus*)، ضد میکروبی، عصاره

مقدمه

بیماری‌های حاصل از مصرف غذاهای آلوده به باکتری‌های بیماری‌زا از اهمیت فراوانی در بهداشت عمومی برخوردار بوده و سالانه خسارات مالی و جانی فراوانی را به جوامع تحمیل می‌نماید. از این رو کاهش تعداد میکروارگانیسم‌ها در مواد غذایی هم از نظر کنترل کیفیت و هم از نظر بهداشت و سلامت عمومی حائز اهمیت فراوان است. یکی از راه‌های کنترل رشد باکتری‌های بیماری‌زا در مواد غذایی استفاده از نگه‌دارنده‌ها و ترکیبات ضد میکروبی است. با توجه به نگرانی‌های عمومی در خصوص

حضور بالای رادیکال‌های آزاد مخصوصاً پراکسیدها نقش کلیدی در بیماری‌زایی تعدادی از بیماری‌ها مانند سرطان، دیابت، پیری، بیماری‌های قلبی عروقی، انواع بیماری‌های عصبی و ریبوی دارند (۱). آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که به‌طور مؤثر و به روش‌های مختلف از واکنش رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کنند.

*نویسنده مسئول: آسیه احمدی دستگردی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردستان، اردستان، ایران
Email: as.ahmadi17@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-3986-1866

(۵). در راستای این هدف در این پژوهش ویژگی‌های شیمیایی، آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره‌های آبی و الکلی کلاله و گلبرگ زعفران (*Crocus Sativus L*) طی مراحل ذیل موردبررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و آماده‌سازی زعفران

گیاه زعفران از شرکت امید واقع در تهران که از مشهد خریداری شده است در سال ۱۳۹۷ تهیه و خشک شد. زعفران‌های خشک‌شده تا زمان انجام آزمایش‌ها در ظروف درب بسته در یخچال نگهداری شدند.

بررسی ویژگی‌های شیمیایی گیاه زعفران

لیپید، پروتئین و کربوهیدرات طبق روش AOAC اندازه‌گیری شد (۱۲). اندازه‌گیری رطوبت، کروسین، پیکروکروسین و سافرانال طبق استاندارد شماره ۲۵۹-۲ خاکستر طبق استاندارد شماره ۱۱۹۷ انجام شد (۱۳، ۱۴).

استخراج عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی زعفران

به‌منظور استخراج عصاره گلبرگ و کلاله زعفران از روش پرکولاسیون (خیساندن) استفاده شد. کلاله و گلبرگ زعفران آسیاب شده و از الک عبور داده شد. جهت تهیه عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی، ۵۰ گرم از کلاله خشک‌شده با ۴۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر در مورد عصاره آبی و الککل ۸۰ درصد در مورد عصاره‌های اتانولی و متانولی با استفاده از شیکر به مدت ۲۴ ساعت عصاره‌گیری شد. عصاره استخراج‌شده با دستگاه روتاری اواپراتور تغلیظ و در فور ۴۰ درجه خشک و باقیمانده حلال تبخیر می‌شود. عصاره خشک‌شده تا زمان مصرف در شیشه‌های رنگی و در یخچال نگهداری شد (۷، ۱۵).

بررسی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های زعفران، با استفاده از روش مهار تولید رادیکال آزاد (DPPH) اندازه‌گیری شد. ابتدا غلظت‌های مختلف عصاره (۰، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر گرم) تهیه شد. سپس عصاره‌ها با DPPH مخلوط و برای مدت زمان ۳۰ دقیقه در تاریکی توسط دستگاه شیکر تکان داده شدند. جذب نمونه‌های حاوی عصاره و شاهد در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu, Japan) خوانده شد. اسیدآسکوربیک به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. درصد

عوارض نگه‌دارنده‌های شیمیایی تمایل به مصرف محصولاتی است که فاقد نگه‌دارنده بوده و یا در آن‌ها از نگه‌دارنده طبیعی استفاده شده است. به همین دلیل در سال‌های اخیر مطالعات زیادی پیرامون نگه‌دارنده طبیعی صورت گرفته است. ازجمله این نگه‌دارنده‌ها اسانس و عصاره زعفران است (۱). ایران با تولید ۳۳۶ تن زعفران، بیش از ۸۸/۸ درصد تولید جهانی زعفران را به عهده داشته و به‌عنوان بزرگ‌ترین تولیدکننده و صادرکننده زعفران در جهان به شمار می‌آید (۲). درصد وزنی اجزای تشکیل‌دهنده شامل: گل تازه ۸۶/۴۲ درصد گلبرگ و کاسبرگ، ۵/۹۳۵ درصد پرچم و ۷/۶۴۵ درصد کلاله و خامه است که طی جداسازی کلاله از گل زعفران، کلاله از سایر اجزا جدا شده خشک و به بازارهای داخلی و خارجی ارسال می‌گردد (۳)؛ اما باقیمانده گل زعفران شامل کاسبرگ، گلبرگ، خامه و پرچم زعفران محصولات جانبی زعفران هستند. این مواد اگرچه حاوی مقادیر قابل‌ملاحظه‌ای ترکیبات باارزش می‌باشند اما در حال حاضر بلااستفاده بوده و تنها به مصرف خوراک دام می‌رسند یا در محیط‌زیست رها می‌شوند. چنانچه بتوان از این ضایعات محصولات جانبی باارزش افزوده ازجمله انواع رنگ‌های خوراکی طبیعی و یا ترکیبات نگه‌دارنده تهیه نمود، علاوه بر جلوگیری از آلودگی محیط‌زیست، مواد تولیدشده دارای ارزش افزوده بالاتری خواهند بود (۴).

زعفران (*Crocus sativus*) از تیره زنبق‌سانان (Iridaceae) گیاهی است علفی، چندساله، دارای کورم سفیدرنگ و قسمت خوراکی و تجاری زعفران کلاله قرمز رنگ است که محصول زعفران را تشکیل می‌دهد. بسیاری از تحقیقات اثرات فارموکولوژیکی زعفران و ترکیبات آن شامل فعالیت آنتی-اکسیدانی، ضد تومور، افزایش‌دهنده حافظه و یادگیری، درمان بی‌نظمی‌های هیپاتیک، ضدالتهاب، ضدافسردگی و کاهش مقاومت انسولین را به اثبات رسانده‌اند (۵). در سال ۲۰۱۶، هوشیار و همکاران ترکیبات زیست فعال زعفران و ویژگی‌های فارموکولوژی آن را بررسی کرده و بیان کرد مصرف زعفران به دلیل وجود ترکیبات زیست فعال مانند کروسین، کروسین و سافرانال انواع بیماری‌ها ازجمله سرطان را کاهش می‌دهد (۶). پژوهش‌های بسیاری به ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی اندام‌های زعفران پرداختند (۷-۱۱).

با توجه به تولید فراوان زعفران در ایران و تأثیرات نامطلوب نگه‌دارنده‌های سنتزی بر سلامتی مصرف‌کنندگان، استفاده از ترکیباتی با مضرات کمتر یک ضرورت جدی به حساب می‌آید

بررسی ویژگی‌های ضد میکروبی عصاره

سویه‌های استاندارد شامل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تایفی موروم*، *باسیلوس سرئوس*، *لستریا مونوسی‌توژنس* و *شرشیاکلی* از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. تعیین حساسیت باکتری‌های مورد مطالعه به عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی گلبرگ زعفران به روش انتشار دیسک بررسی و قطر هاله مهار رشد اندازه‌گیری شد. برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) از روش آگار دایلو شدن و براث دایلو شدن استفاده شد. ابتدا کشت‌های لیوفیلیزه در محیط آبگوشت BHI در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸-۱۶ ساعت حداقل دو بار متوالی تجدید شده و سپس از کشت دوم به نسبت ۵ به ۱ با گلیسرین استریل مخلوط و در حجم‌های ۵۰۰ میکرولیتری در میکروتیوب‌های اپندرف در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۷).

تعیین حساسیت باکتری‌های مورد مطالعه به روش

انتشار دیسک

ابتدا کشت‌های نگهداری شده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد به محیط آبگوشت BHI منتقل شد و ۱۸-۱۶ ساعت تجدید شد. سپس در محیط کشت شیب‌دار تجدید شد و جهت استفاده در طول آزمایش در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای تهیه دوز تلقیح باکتری‌ها از روش سنجش جذب نوری با استفاده از اسپکتروفتومتر استفاده شد. باکتری‌ها به محیط براث منتقل و به مدت ۱۸-۱۶ ساعت گرمخانه گذاری شدند. سپس از باکتری‌های مورد مطالعه، سوسپانسیون باکتریایی با جذب نوری ۰/۱ تهیه‌شده و سپس با استفاده از سواب سطح پلیت‌های حاوی محیط آگار BHI با باکتری‌های مورد نظر تلقیح شد. بعد از اینکه سطح پلیت خشک شد، دیسک‌های کاغذی ۶ میلی‌متری حاوی ۶۰ میلی‌گرم از عصاره به پلیت منتقل شده و به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد و بعد از گرمخانه گذاری قطر هاله مهار رشد اندازه‌گیری شد (۷).

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) به روش

آگار دایلو شدن

ابتدا محیط کشت BHI آگار را آماده نموده و حجم‌های ۱۹ میلی‌لیتری از محیط کشت حاوی ۱۰٪ دی متیل سولفوکساید در لوله‌های یونیورسال توزیع شد. بعد از استریل نمودن محیط کشت و سرد شدن محیط تا دمای ۵۰ درجه، ۱ میلی‌لیتر از

مهار DPPH توسط رابطه زیر محاسبه‌شده و نمودار آن در مقابل غلظت اسانس رسم شد (۱۶، ۱۷).

$$\text{DPPH درصد مهار} = \left[1 - \frac{A_A}{A_B} \right] \times 100\%$$

A_A = جذب نمونه

A_B = جذب شاهد = جذب اولیه DPPH به تنهایی

اندازه‌گیری فنل تام عصاره

مقادیر فنل تام در نمونه‌های عصاره‌های زعفران توسط روش فولین سیوکالتیو اندازه‌گیری گردید. بر طبق این روش، ابتدا محلول‌های استاندارد از اسیدگالیک در محلول ۶۰٪ متانول تهیه شد. از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر به لوله‌آزمایش منتقل و به آن‌ها ۵۰۰ میکرولیتر از محلول ۱۰ درصد واکنشگر فولین سیوکالتیو اضافه شد. پس از ۳ الی ۸ دقیقه به آن ۴۰۰ میکرولیتر از محلول کربنات سدیم ۷/۵ درصد اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. نهایتاً میزان جذب به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری و نمودار استاندارد رسم شد ($y = 0.1098x - 2/5$ و $R^2 = 0.9973$). سپس ۱۰ تا ۲۰ میلی‌گرم از عصاره در متانول ۶۰٪ حل شد و به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسید. سایر مراحل طبق روش مذکور انجام شد با این تفاوت که به جای محلول استاندارد ۱۰۰ میکرولیتر از محلول عصاره اضافه شد. مقادیر فنل تام در نمونه‌های عصاره با استفاده از منحنی استاندارد برحسب میلی-گرم اسید گالیک در گرم عصاره بیان گردید (۱۶، ۱۷).

اندازه‌گیری ترکیبات فلاونوئیدی عصاره

محتوای فلاونوئید بر اساس روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید انجام شد. طبق این روش محلول‌های استاندارد از کوئرستین در متانول ۶۰٪ تهیه شد. آنگاه ۵۰۰ میکرولیتر از رقت‌ها به لوله‌های آزمایش منتقل و ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۱۰۰ میکرولیتر محلول کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد، ۱۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. میزان جذب پس از ۳۰ دقیقه در طول موج ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری و نمودار استاندارد رسم شد ($y = 0.0064x - 0.1$ و $R^2 = 0.999$). سپس ۱۰ تا ۲۰ میلی‌گرم از عصاره در متانول ۶۰٪ حل شد و به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسید. سایر مراحل طبق روش مذکور انجام شد با این تفاوت که به جای محلول استاندارد ۵۰۰ میکرولیتر از محلول عصاره اضافه شد. محتوای فلاونوئید به صورت اکی والان‌های کوئرستین بر گرم عصاره بیان شد (۱۷).

رشد ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی ۵٪ دی‌متیل‌سولفوکساید و ۱٪ اتانول به همراه باکتری تلقیح شد. محتویات هر چاهک به مدت ۲ دقیقه با استفاده از پلیت شیکر مخلوط شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شده و بعد از اتمام گرمخانه گذاری کدورت یا عدم کدورت در چاهک‌ها به صورت چشمی مشاهده گردید (۷).

تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)

پس از تعیین MIC از تمامی لوله‌هایی که در آن‌ها عدم رشد باکتری مشاهده شد ۱۰۰ µl نمونه‌برداری شد و از طریق کشت در پلیت حاوی مولر هینتون آگار و سابوراد دکستروز آگار، MBC تعیین شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شده، پلیت حاوی کمترین غلظت اسانس که در آن عدم رشد باکتری قابل مشاهده است به عنوان MBC در نظر گرفته شد (۱۸).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

کلیه آزمایش‌ها در سه تکرار انجام گرفت و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن در سطح (۰/۰۵) انجام گرفت. رسم منحنی‌ها با نرم‌افزار اکسل انجام شد. تحلیل و ارزیابی آنالیز واریانس (ANOVA) توسط نرم‌افزار SPSS (version 20, SPSS Inc., Woking, Surrey, UK) انجام گرفت.

نتایج

بررسی خواص شیمیایی کلالة و گلبرگ زعفران

ترکیبات شیمیایی کلالة و گلبرگ زعفران در جدول ۱ آورده شده است. این جدول میزان رطوبت، خاکستر، پروتئین، لیپید و

محلول عصاره‌های فیلتر شده با فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر را اضافه نموده با استفاده از ورتکس به مدت ۱۰ ثانیه مخلوط کرده و در پلیت پخش شد. غلظت‌های مورد استفاده عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی ۰، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم در گرم بود. پلیت کنترل حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی ۱۰٪ دی‌متیل‌سولفوکساید بود. بعد از پخش کردن محیط، سطح پلیت‌ها زیر هود میکروبیولوژیک به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه به خوبی خشک شد. سپس مقدار ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری‌های مورد نظر توسط سمپار به صورت نقطه‌ای تلقیح شد (به نحوی که در هر ۵ میکرولیتر ۱۰^۲ باکتری موجود باشد). سپس پلیت‌ها در انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد. غلظت‌هایی از عصاره که بیشتر از ۹۹٪ سبب ممانعت از رشد شود تحت عنوان MIC نامیده می‌شود (۷).

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) به روش براث میکرودایلوشن

در این روش از پلیت‌های ۹۶ چاهکی ته گرد با حجم ۳۰۰ میکرولیتر استفاده شد. ابتدا مقدار مناسبی از عصاره‌ها در محلول حاوی ۱۰٪ اتانول و ۴۰٪ دی‌متیل‌سولفوکساید حل شد و سپس توسط فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر استریل شد و سپس غلظت‌های لازم از آن توسط آبگوش BHI تهیه شد (غلظت نهایی اتانول در محیط کشت ۱٪ و غلظت نهایی دی‌متیل‌سولفوکساید ۵٪ بود). ۲۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره‌ها به هر چاهک انتقال داده شد. سپس به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری اضافه شد. غلظت نهایی باکتری در هر چاهک برابر ۱۰^۴ بود (تعداد دقیق باکتری از طریق کشت سطحی و شمارش کلونی تأیید شد). در چاهک کنترل

جدول ۱- خواص شیمیایی کلالة و گلبرگ زعفران

اندام گیاه	رطوبت	خاکستر	پروتئین	لیپید	کربوهیدرات
کلالة	۹۱/۷۵ ± ۱/۲۸ ^a	۶/۹۸ ± ۰/۴ ^a	۷/۱۴ ± ۰/۱۳ ^a	۵/۱۶ ± ۰/۲ ^a	۷۴/۸۱ ± ۱/۱ ^a
گلبرگ	۹۱/۳۶ ± ۱/۳ ^a	۶/۲۱ ± ۰/۳ ^b	۶/۱۸ ± ۰/۰۳ ^b	۴/۱۶ ± ۰/۳ ^b	۷۱/۱۶ ± ۱/۴ ^b

حروف متفاوت در یک ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است (P < ۰/۰۵).



جدول ۲- میزان کروسین، پیکروکروسین و ساfranال در کلاله و گلبرگ زعفران

اندام گیاه	کروسین	پیکروکروسین	ساfranال
کلاله	$224/75 \pm 0/18^a$	$85/98 \pm 0/4^a$	$49/14 \pm 0/23^a$
گلبرگ	$214/37 \pm 0/13^b$	$69/42 \pm 0/3^b$	$36/18 \pm 0/43^b$

حروف متفاوت در یک ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($p < 0/05$).

جدول ۳- راندمان استخراج عصاره‌های به‌دست‌آمده توسط سه حلال آبی، اتانولی و متانولی کلاله و گلبرگ زعفران

اندام گیاه	عصاره	متانولی	اتانولی	آبی
کلاله	Aa	$12/45$	Ab	$12/02$
گلبرگ	Ba	$11/90$	Bb	$11/40$

حروف متفاوت بزرگ در ستون و حروف متفاوت کوچک در سطر نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($p < 0/05$).

جدول ۴- مقایسه درصد قدرت بازدارندگی عصاره‌های مختلف زعفران و اسید آسکوربیک بر اساس مهار DPPH

اندام گیاه	نوع عصاره	غلظت (میکروگرم بر گرم)	۵۰۰	۲۵۰	۱۲۵	۰
کلاله	آبی	-	-	-	-	-
	اتانولی	-	-	-	-	-
	متانولی	-	-	-	-	-
گلبرگ	آبی	-	-	-	-	-
	اتانولی	-	-	-	-	-
	متانولی	-	-	-	-	-
اسید آسکوربیک						

حروف متفاوت در یک ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($p < 0/05$).

تعیین راندمان استخراج عصاره‌ها

راندمان استخراج عصاره‌های به‌دست‌آمده توسط سه حلال آبی، اتانولی و متانولی در جدول ۳ آورده شده است.

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها

جدول ۴ فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف زعفران را در غلظت‌های مختلف (۵۰۰-۰ میکروگرم بر گرم) با مهار و به دام انداختن رادیکال‌های DPPH و مقایسه با اسید آسکوربیک

کربوهیدرات را در کلاله و گلبرگ نشان می‌دهد. کلاله در مقایسه با گلبرگ دارای پروتئین، لیپید و کربوهیدرات بیشتری است.

کروسین، پیکروکروسین و ساfranال

جدول ۲ میزان کروسین، پیکروکروسین و ساfranال را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است کلاله در مقایسه با گلبرگ دارای کروسین، پیکروکروسین و ساfranال بیشتری است ($p < 0/05$).

جدول ۵- میزان ترکیبات فنولی کل (میکروگرم معادل اسید گالیک در گرم) و ترکیبات فلاونوئیدی (میکروگرم معادل کوئرستین در گرم) در عصاره‌های مختلف زعفران

اندام گیاه	نوع عصاره	غلظت (میکروگرم بر گرم)
کلاله	آبی	فنونل $15/0 \pm 2/4^c$
	اتانولی	$10/0 \pm 2/2^d$
	متانولی	$15/0 \pm 2/6^e$
گلبرگ	آبی	$30/0 \pm 28/5^e$
	اتانولی	$2/0 \pm 33/0^a$
	متانولی	$6/0 \pm 2/1^b$
		$8/0 \pm 19/1^c$

حروف متفاوت در یک ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($p < 0/05$).

جدول ۶- قطر هاله مهار رشد باکتری‌های مورد مطالعه تحت اثر عصاره‌های مختلف زعفران

قطر هاله رشد (میلی‌متر)						
گلبرگ			کلاله			
عصاره متانولی	عصاره اتانولی	عصاره آبی	عصاره متانولی	عصاره اتانولی	عصاره آبی	باکتری‌ها
۴	-	-	۱۳	۱۰	۸	استافیلوکوکوس اورئوس
۹	۷	۲	۱۸	۱۳	۱۲	سالمونلا تایفی موریوم
-	-	-	۱۵	۹	۸	اشرشیاکلی
۶	-	-	۷	۳	۲	لستریا مونوسیتوزنس
۱۲	-	-	۱۲	۱۰	۷	باسیلوس سرئوس

فنولی است. عصاره‌های متانولی نسبت به عصاره‌های اتانولی میزان ترکیبات فنولی بیشتری دارند ولی هر دو عصاره ترکیبات فنولی بیشتری با اختلاف معنی‌دار نسبت به عصاره آبی دارند ($p < 0/05$).

نتایج حاصل از سنجش محتوای فلاونوئید عصاره‌ها نیز بر اساس روش رنگ‌سنجی آلومینیوم نشان داد کلاله بالاترین محتوای فلاونوئیدی را دارا بود ($19/43$ میکروگرم بر گرم کوئرستین).

تعیین حساسیت باکتری‌های مورد مطالعه به عصاره‌های زعفران به روش انتشار دیسک

نتایج اثر عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی گلبرگ زعفران علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلاتیفی موریوم*،

DPPH نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود در تمامی عصاره‌ها با افزایش غلظت عصاره، مهار رادیکالی با قدرت بیشتری صورت می‌گیرد. به‌طوری‌که غلظت‌های مختلف در سطح ۵٪ تفاوت معنی‌داری دارند. همان‌گونه که مشخص است بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به کلاله است و اثر مهار رادیکالی عصاره متانولی قوی‌تر از عصاره اتانولی است و عصاره آبی اثر ضعیف‌تری نسبت به هر دو دارد.

تعیین میزان ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدی

مقایسه میانگین داده‌های فنل کل و فلاونوئید کل عصاره گیاه حاکی از تفاوت معنی‌دار این ترکیبات در اندام‌های مختلف است. همان‌طور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود کلاله با میزان $30/28$ میکروگرم بر گرم اسیدگالیک دارای بیشترین میزان ترکیبات



برای تمامی باکتری‌های فوق برابر ۱۲۵ میکروگرم بر گرم و در گلبرگ ۲۵۰ میکروگرم بر گرم به دست آمد. در گلبرگ غلظت‌های پایین‌تر از ۲۵۰ میکروگرم بر گرم یعنی ۱۲۵ میکروگرم بر گرم فقط در عصاره متانولی و بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* اثر داشتند.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) به روش برات میکرودايلوشن

نتایج MIC عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی کلالة و گلبرگ زعفران علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی*، *موریوم*، *اشرشیاکلی*، *لیستریا مونوسیتوژنس* و *باسیلوس سرئوس* در روش میکرودايلوشن در جدول ۷ آمده است. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده در کلالة MIC هر سه عصاره در برابر تمام باکتری-های مورد مطالعه ۲۵۰ میکروگرم بر گرم و در مورد *سالمونلا تیفی* موریوم ۱۲۵ میکروگرم بر گرم محاسبه شد. درحالی‌که

اشرشیاکلی، *لیستریا مونوسیتوژنس* و *باسیلوس سرئوس* در روش انتشار دیسک در جدول ۶ آمده است. در مورد کلالة، هر سه عصاره مورد مطالعه سبب مهار رشد باکتری‌ها گردیده و قطر هاله رشد بین ۱۸-۲ میلی‌متر محاسبه شد. در مورد گلبرگ، هیچ‌یک از عصاره‌های مورد مطالعه نتوانست رشد باکتری *اشرشیاکلی* را مهار کند و در رابطه با سایر باکتری‌ها، تنها عصاره متانولی باعث مهار رشد با قطر هاله برابر ۱۲-۴ میلی‌متر شد.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) به روش آگاردايلوشن

نتایج تعیین MIC عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی کلالة و گلبرگ زعفران علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی*، *موریوم*، *اشرشیاکلی*، *لیستریا مونوسیتوژنس* و *باسیلوس سرئوس* در روش آگار دایلویشن در جدول ۷ آمده است. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده میزان MIC هر سه عصاره در کلالة

جدول ۷- حداقل غلظت بازدارنده رشد عصاره‌های مختلف زعفران به روش آگاردايلوشن

حداقل غلظت بازدارنده رشد (میکروگرم بر گرم)						
روش	کلاله					
	گلبرگ					
	عصاره اتانولی	عصاره آبی	عصاره متانولی	عصاره اتانولی	عصاره آبی	باکتری‌ها
آگار دایلوشن	۱۲۵	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	استافیلوکوکوس اورئوس
	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	سالمونلا تایفی موریوم
	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	اشرشیاکلی
	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	لستریا مونوسیتوژنس
	۱۲۵	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	باسیلوس سرئوس
برات دایلوشن	۱۲۵	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	استافیلوکوکوس اورئوس
	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	سالمونلا تایفی موریوم
	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	اشرشیاکلی
	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	لستریا مونوسیتوژنس
	۱۲۵	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	باسیلوس سرئوس

راندمن عصاره‌های آبی و متانولی با نتایج دیگر پژوهشگران هم‌خوانی دارد. عوامل مختلفی در افزایش راندمن عصاره‌ها اثر دارد که از آن جمله مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به روش استخراج (سرد، گرم) و نوع حلال اشاره کرد (۸).

اساس روش DPPH بر پایه بی‌رنگ شدن محلول DPPH است که به وسیله آنتی‌اکسیدان‌های موجود در عصاره انجام می‌شود و این عمل از طریق مهار رادیکال‌های آزاد صورت می‌پذیرد. مدل به دام اندازی رادیکال DPPH به‌طور گسترده برای ارزیابی توانایی به دام انداختن رادیکال‌های آزاد در نمونه‌های مختلف به کار می‌رود (۱۹).

در این پژوهش عصاره متانولی بیشترین و عصاره آبی کمترین اثر بازدارنده را از خود نشان داد. همان‌طور که مشخص است رابطه مستقیمی بین غلظت عصاره و اثر مهارکنندگی رادیکالی آن

میزان MIC عصاره‌های گلبرگ برای باکتری‌ها ۵۰۰ میکروگرم بر گرم و در مورد سالمونلا تایفی موریوم ۲۵۰ میکروگرم بر گرم محاسبه شد.

تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)

نتایج تعیین MBC عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی کلاله و گلبرگ زعفران علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلاتیفی موریوم*، *اشرشیاکلی*، *لیستریا مونوسیتوژنس* و *باسیلوس سرئوس* در روش آگار دایلوژن در جدول ۸ آمده است. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده میزان MBC هر سه عصاره کلاله برای تمامی باکتری‌های فوق برابر ۲۵۰ میکروگرم بر گرم و در گلبرگ ۵۰۰ میکروگرم بر گرم به دست آمد. در عصاره متانولی کلاله و گلبرگ غلظت‌های پایین‌تر فقط بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* اثر داشتند.

جدول ۸- حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌های مختلف زعفران

حداقل غلظت کشندگی (میکروگرم بر گرم)						
باکتری‌ها	کلاله			گلبرگ		
	عصاره آبی	عصاره اتانولی	عصاره متانولی	عصاره آبی	عصاره اتانولی	عصاره متانولی
استافیلوکوکوس اورئوس	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰
سالمونلا تایفی موریوم	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵	۵۰۰	۵۰۰	۲۵۰
اشرشیاکلی	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰
لیستریا مونوسیتوژنس	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰
باسیلوس سرئوس	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰

برقرار است و با افزایش غلظت عصاره، اثر ضد رادیکالی و آنتی‌اکسیدانی آن افزایش می‌یابد. در این مطالعه توانایی بالای آنتی‌اکسیدانی کلاله نسبت به گلبرگ می‌تواند به دلیل میزان بالای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در این اندام باشد. همان‌طور که نتایج حاصل از مطالعه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کلاله زعفران وجود ارتباط بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی این اندام را با ترکیبات فنولی موجود در آن بیان کرد (۲۰، ۲۱). محققان دیگر نیز با مطالعه بر روی خواص آنتی‌اکسیدانی سه اندام کلاله، برگ و کورم با روش مهار رادیکال DPPH نشان دادند کلاله بالاترین

بحث و نتیجه‌گیری

همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود عصاره آبی کلاله با ۱۳/۱ درصد بیش‌ترین بازده استخراج را داشته است. دلیل آن‌هم قطبی بودن آب است (۸). متانول و اتانول در رتبه‌های بعدی قرار دارند. پس نوع حلال بر راندمن استخراج تأثیر می‌گذارد و راندمن عصاره‌گیری با افزایش قطبیت حلال افزایش می‌یابد؛ اما تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد در هر دو حلال اتانولی و متانولی وجود دارد. یافته‌های به‌دست‌آمده از نظر بالا بودن

اتانول و آب است که شامل زمان استخراج، سرعت اختلاط و اندازه ذرات پودر کلاله و گلبرگ زعفران است. تناقض در نتایج به دست آمده در تحقیقات مختلف می تواند در ارتباط با تنوع ترکیبات شیمیایی موجود در گیاهان، مکانیسم مختلف واکنش آن ها و سینتیک متفاوت واکنش های مهاری آن ها در روش های انتخابی باشد. ظرفیت آنتی اکسیدانی اندازه گیری شده یک نمونه با روش مورد استفاده و منبع تولید رادیکال آزاد یا عامل اکسیدکننده در ارتباط است (۸). انتخاب نوع حلال تأثیر زیادی بر میزان استخراج ترکیب های فنلی و فلاونوئیدی دارد و از طرفی، فعالیت های آنتی اکسیدانی به میزان زیادی تحت تأثیر ماهیت حلال، زمان استخراج و تعامل این دو عامل است. با این حال، قدرت استخراج حلال مهم ترین فاکتور مؤثر بر ظرفیت آنتی اکسیدانی محصول است و بین حلال های مختلف به کار رفته، حلال متانولی عملکرد بهتری در ارتباط با استخراج فنل، فلاونوئید و میزان مهار رادیکال های آزاد داشت، در حالی که حلال آبی عملکرد ضعیف تری نسبت به بقیه حلال ها نشان داد (۲۵).

فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهان را به حضور ترکیبات فنلی در آن ها نسبت دادند (۲۶). با افزایش غلظت ترکیبات فنلی، به دلیل افزایش گروه های هیدروکسیل موجود در محیط، احتمال اهداء هیدروژن به رادیکال های آزاد و به دنبال آن قدرت مهارکنندگی اسانس افزایش می یابد. شایان ذکر است که همه ترکیبات فنلی ممکن است توانایی مهار رادیکال های آزاد یا به عبارتی فعالیت ضد اکسایشی نداشته باشند. قدرت مهارکنندگی رادیکال های آزاد به تعداد و موقعیت گروه های هیدروکسیل و وزن مولکولی ترکیبات فنلی بستگی زیادی دارد. در ترکیبات فنلی با وزن مولکولی پایین تر، گروه های هیدروکسیل راحت تر در دسترس قرار می گیرند. ترکیبات فنلی شامل فنل های ساده با یک حلقه آروماتیک دارای حداقل یک گروه هیدروکسی که فلاونوئیدها را تشکیل می دهند (۳۷).

روند استخراج ترکیبات فنلی فاکتوری مهم در تعیین ویژگی های آنتی اکسیدانی عصاره است. دما، حلال، زمان عصاره گیری، قدرت استخراج و روش استخراج تأثیر بارزی در محتویات عصاره خواهد گذاشت. این تفاوت ها به تمایل این ترکیبات به حلال مورد نظر برای عصاره گیری و مخصوصاً قطبیت آن وابسته است. همچنین، نتایج این تحقیق، نتایج مطالعات قبلی را مبنی بر این که متانول برای استخراج مواد ضد میکروبی از گیاهان دارویی در مقایسه با دیگر حلال ها از جمله آب، اتانول و هگزان

ظرفیت آنتی اکسیدانی را دارد (۲۲). در پژوهشی دیگر ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره کلاله زعفران حتی بالاتر از گیاهان گوجه فرنگی و هویج گزارش شده است (۲۳). همچنین نشان داده شد که گلبرگ زعفران یک منبع آنتی اکسیدان طبیعی و سهل الوصول است و در غلظت ۵۰۰ ppm دارای فعالیت آنتی اکسیدانی برابر با TBHQ در غلظت ۱۰۰ ppm است (۱۶). نکته قابل ذکر آن است که وجود تفاوت در ظرفیت آنتی اکسیدانی این اندام ها در مطالعات مختلف می تواند به دلایل ژنوتیپ، تفاوت های محیطی که گونه در آن حضور دارد و اندام های مورد مطالعه و زمان نمونه برداری نسبت داده شود (۲۴).

بالا بودن ترکیبات فنلی دلیل اصلی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها است، زیرا بر اساس شواهد موجود، ارتباط مثبتی بین ترکیبات فنلی و قدرت آنتی اکسیدانی گیاهان وجود دارد (۵، ۲۵، ۲۶). تفاوت فعالیت آنتی اکسیدانی و میزان ترکیبات موجود در کلاله زعفران در مکان های مختلف را عمدتاً ناشی از تفاوت محیطی، ژنتیک (واریته) و فعالیت های کشاورزی دانسته اند (۲۷).

ترکیبات اصلی کلاله شامل کروسین، پیکروکروسین و سافرانال که به ترتیب مسئول رنگ، طعم و عطر زعفران می باشند دارای خاصیت آنتی اکسیدانی هستند (۲۱، ۳۲-۲۸). توان آنتی اکسیدانی بالای زعفران را بیش از هر چیز به کروسین که رنگیزه اصلی زعفران است ارتباط داده اند (۵، ۳۳، ۳۴). توان آنتی اکسیدانی بالای کلاله زعفران می تواند نتیجه اثرات سینرژسم ترکیبات فعال موجود در آن باشد (۲۴، ۳۵، ۳۶).

یافته های این پژوهش در توافق با گزارش های قبلی مبنی بر ارتباط مستقیم اجزاء فنولیک با فعالیت آنتی اکسیدانی است و با افزایش غلظت، میزان درصد مهارکنندگی نیز افزایش یافت (۸، ۱۱، ۲۵). همچنین اختلاف معنی داری در محتوای ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی، همچنین خصوصیات آنتی اکسیدانی کلاله در مقایسه با گلبرگ گزارش شد. از بین عصاره های مختلف متانولی، اتانولی و آبی عصاره آبی عملکرد ضعیف تری در ارتباط با مهار رادیکال های آزاد داشت.

محتوای پلی فنول ها در گیاهان به عوامل مختلفی بستگی دارد و بسته به عملکرد گونه، واریته، اندام و مرحله فیزیولوژیک می تواند متفاوت باشد. در واقع برخی اختلافات احتمالاً به علت تفاوت در شرایط کشت، منطقه جغرافیایی و زمان برداشت نمونه و همچنین شرایط استخراج عصاره با استفاده از حلال متانول،

بهتر است، تأیید می‌کند (۲۵). در صورت استفاده از متانول به‌عنوان حلال استخراجی، در میزان استخراج ترکیب‌های فنلی تأثیر معنی‌داری مشاهده خواهد شد. محققان تفاوت‌های مشاهده‌شده بین عصاره‌های مختلف را به تفاوت در قطبیت حلال‌های به‌کاررفته مرتبط می‌دانند. استخراج ترکیبات فنلی از مواد گیاهی به حلالیت این ترکیبات در حلال‌های مختلف بستگی دارد. به‌علاوه قطبیت حلال‌های به‌کاررفته در افزایش حلالیت این ترکیبات نقش کلیدی دارد (۸).

بیماری‌های قابل انتقال از مواد غذایی از اهمیت فراوانی در بهداشت عمومی برخوردار بوده و سالانه خسارات مالی و جانی فراوانی را به جوامع تحمیل می‌کند (۳۸). در این مطالعه اثر عصاره‌های متانولی، اتانولی و آبی کلالة و گلبرگ زعفران بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلاتیفی موربوم*، *اشرشیاکلی*، *لیستریا مونوسیتوژنس* و *باسیلوس سرئوس* مورد بررسی قرار گرفت. تأثیر عصاره‌های مختلف قسمت‌های مختلف زعفران بر باکتری‌های فوق با پژوهش سایر محققین مطابقت دارد (۷، ۴۵-۳۸).

کروسین و ترکیبات شیمیایی وابسته به آن‌ها در فعالیت ضد میکروبی زعفران نقش دارند (۴۶). سافرانال موجود در زعفران باعث بازدارندگی رشد سویه‌های *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌شود (۴۳). حساسیت باکتری‌های مختلف نسبت به عصاره‌های مختلف زعفران متفاوت است و اثر عصاره بر باکتری‌های گرم مثبت مورد مطالعه بیشتر از باکتری‌های گرم منفی است که شاید یکی از علت‌های آن ساختار متفاوت دیواره سلولی باشد (۹، ۴۷). باکتری‌های گرم منفی به علت وجود لایه چربی در لایه بیرونی نفوذناپذیرتر هستند (۴۸، ۴۹). تحقیقات نشان می‌دهد ترکیبات آروماتیک و فنولیک در فرآورده‌های گیاهی منجر به گراندول شدن سیتوپلاسم، گسیختگی غشای سیتوپلاسمی، غیرفعال شدن یا ممانعت از فعالیت آنزیم‌های درون‌سلولی و برون‌سلولی مؤثر در رشد میکروارگانیسم‌ها و متلاشی شدن دیواره سلولی می‌شوند. این ترکیبات نفوذپذیری غشا را افزایش می‌دهند و بانفوذ در غشا منجر به متورم شدن غشا گردیده و فعالیت آن را تحت تأثیر قرار می‌دهند و در نهایت منجر به مرگ سلول خواهند شد (۵۰-۴۸).

استافیلوکوکوس اورئوس عمدتاً از طریق مصرف شیر گاوهای آلوده به ورم پستان به مواد غذایی راه پیدا می‌کند. با توجه به اثر

مهاری مشاهده‌شده از زعفران بر *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌توان از آن به‌عنوان یک نگه‌دارنده طبیعی و طعم‌دهنده در محصولات لبنی استفاده کرد (۳۹). *لیستریا مونوسیتوژنس* از دیگر پاتوژن‌هایی است که از طریق منابع غذایی با منشأ دامی به‌خصوص پنیر به انسان منتقل می‌شود. در این تحقیق عصاره‌های زعفران تأثیر قابل توجهی در مهار رشد این باکتری نشان داد؛ بنابراین به‌عنوان یک نگه‌دارنده طبیعی برای افزایش کیفیت و ماندگاری پنیر قابل استفاده است (۳۹). همچنان که لیگون و همکاران (۲۰۱۲) اثر افزودن زعفران بر ویژگی‌های میکروبی، رنگ، قوام و ویژگی‌های حسی پنیر تهیه‌شده از شیر میش را مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند افزودن زعفران باعث کندتر کردن رشد باکتری‌های کلی فرم و باکتری‌های اسیدلاکتیک در پنیر می‌شود (۵۱). اثر ضد باکتریایی مشاهده‌شده در تحقیق حاضر علیه *باسیلوس سرئوس* قابل توجه است. این باکتری عامل مسمومیت غذایی ناشی از برنج است؛ بنابراین استفاده از زعفران به‌عنوان چاشنی برنج علاوه بر ایجاد عطر و رنگ می‌تواند از رشد باکتری و مسمومیت حاصل از آن جلوگیری کند (۳۹).

تفاوت‌های موجود در روش‌های ارزیابی بررسی خواص ضد باکتریایی عصاره‌ها می‌تواند سبب نتایج متفاوت در میزان MIC محاسبه‌شده در تحقیقات مختلف شود. روش انتشار دیسک یک روش غربالگری تعیین حساسیت میکروارگانیسم‌ها نسبت به مواد بازدارنده است و این روش تحت اثر میزان و سرعت انتشار مواد بازدارنده در محیط کشت قرار دارد و بنابراین برای اندازه‌گیری دقیق فعالیت ضد میکروبی مناسب نیست. روش آگار دایلوشن روش مناسبی در تست‌های ضد میکروبی است که نتایج قابل‌اعتمادی را به همراه دارد. اما به علت سختی روش، روش معمولی در آزمایشگاه‌ها نیست و بیشتر روش برات دایلوشن مورد استفاده قرار می‌گیرد (۷).

نتایج این مطالعه نشان‌دهنده اثرات ضد میکروبی عصاره‌های متانولی، اتانولی و آبی کلالة و گلبرگ زعفران بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلاتیفی موربوم*، *اشرشیاکلی*، *لیستریا مونوسیتوژنس* و *باسیلوس سرئوس* است. همچنین در این تحقیق نشان داده شد که در بین اندام‌های مختلف زعفران، عصاره متانولی کلالة اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی‌تر و میزان فنل و فلاونوئید بیشتری نسبت به اندام گلبرگ دارد. اگرچه خصوصیت



نگهداری مواد غذایی و بالا بردن سطح ایمنی مواد غذایی از هدر رفتن یک محصول جانبی جلوگیری نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردستان (کد ثبت پایان نامه: ۳۱۹۰-۶-۱۳-۰۵) است. همچنین نویسندگان بر خود واجب می دانند که از بخش تحقیقات مواد غذایی تشکر و قدردانی به عمل آورند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را اعلام نکرده اند.

آنتی اکسیدانی کلالة زعفران که به عنوان ادویه مورد استفاده قرار می گیرد حائز اهمیت است، اما در این مطالعه، مقایسه خواص آنتی اکسیدانی کلالة با گلبرگ مشخص کرد که گلبرگ نیز که هر ساله به میزان زیادی طی فراوری زعفران به اتلاف می رود، نیز دارای خواص آنتی اکسیدانی قابل توجهی است. از طرفی به دلیل طعم و عطر مناسب گلبرگ زعفران امکان استفاده از غلظت های بالاتر وجود دارد. همچنین از آنجایی که گلبرگ به عنوان یک محصول جانبی در تولید زعفران است که در حال حاضر به عنوان ضایعات دور ریخته می شود؛ بنابراین با عملی نمودن استفاده از این ماده در صنعت غذایی می توان علاوه بر برآورده کردن خواسته مصرف کنندگان برای نگه دارنده های طبیعی و افزایش عمر

References

- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Journal of Food Microbiology*. 2004; 94: 223-253.
- Ahmadi K, Gholizade H, Ebadzade H, Kazemian A, Hoseinpour A, Rafiei M, et al. Agricultural statistics of crops. Ministry of Agriculture, Deputy of Planning and Economy, Information and Communication Technology Center. 2016; 1. [In Persian]
- Hemmati Kakhki A. Optimization of effective parameters on production of food color from saffron petals. *Agricultural Sciences and Technology*. 2001; 15: 13-20. [In Persian]
- Khanipour E, Kerama J, Shokrani R. Determination of optimum conditions for carotenoid extraction from tomatoes. *JWSS - Journal of Water and Soil Science*. 2007; 11 (40):289-297. [In Persian]
- Rahaiee S, Moini S, Hashemi M, Shojaosadati SA. Evaluation of antioxidant activities of bioactive compounds and various extracts obtained from saffron (*Crocus sativus* L.): a review. *Journal of Food Science and Technology*. 2013; 52 (4):1881-1888.
- Hoshyar R, Mostafavinia SE, Bathaie SZ. Anticancer effects of saffron stigma (*Crocus Sativus*): a review study. *Razi Journal of Medical Sciences*. 2016; 22(140):69-78. [In Persian]
- Gandomi Nasr Abadi H, Azami Sarokelaei L, Misaghi A, Abbaszadeh S, Shariatifar N, Tayyar Hashtjin N. Antibacterial Effect of Aqueous and Alcoholic Extracts from Petal of Saffron (*Crocus Sativus* L.) On Some Foodborne Bacterial Pathogens. *Journal of Medicinal Plants*. 2012; 11:189 -196.
- Afrazee Z, Bolandi M, Khorshidi M, Mohammadi Nafchi A. Evaluation of antioxidant activity of aqueous and alcoholic extracts (methanol, ethanol) saffron petals. *Saffron Agronomy and Technology*. 2014; 2(3): 231-236. [In Persian]
- Afshar Mohammedan M, Kordi S, Mashhadi Nejad A. Antibacterial activity of stigma and petal of different species of saffron (*Crocus* Spp.). *Journal of Molecular and Cellular Research*. 2016; 29 (3): 265-273. [In Persian]
- Azami L, Babapour A, Garechahi M. Antimicrobial Effect of aqueous extract of saffron petals on some of food-borne bacterial pathogen. *Journal of Food Hygiene*. 2013; 1(5): 63-73. [In Persian]
- Zarinkamar F, Tajik S. Evaluation of antioxidant activity and phenolic content from saffron organs (*Crocus sativus* L.). *JMBS*. 2017; 8 (2):160-170. [In Persian]
- AOAC. Associat. Offici. Analyt. Chemists. 1995; Arlington, VA, USA, ISBN: 0935584544. 16th ed.

13. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (ISIRI), Saffron- Specification. ISIRI No. 2013; 259-1. 5nd.Revision. [In Persian]
14. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (ISIRI). Spices and condiments – Determination of total ash. 2012; ISIRI No.1197. 1nd Revision. [In Persian]
15. Lahmass I, Lamkami T, Delporte C, Sikdar S, Antwerpen PV, Saalaoui E, Megalizzi V. The waste of saffron crop, a cheap source of bioactive compounds. *Journal of Functional Foods*. 2017; 35: 341–351.
16. Goli SMH, Mokhtari M, Rahimmalek M. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity from Saffron (*Crocus sativus* L.) Petal. *Journal of Agricultural Science*. 2012; 4(10):175-181.
17. Jadouali SM, Atifi H, Bouzoubaa Z, Majourhat K, Gharby S, F, Elmoslih A, et al. Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activity of Moroccan *Crocus sativus* L petals and leaves. *Journal of Materials and Environmental Sciences*. 2018; 9(1): 113-118
18. Hajifattahi F, Taheri M, Taheri M, Mahboubi A, Kamlinejad M. Antibacterial Effects of Different Extracts of *Crocus Sativus* Linn Stigma on Several Oral Microorganisms. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2016; 8(12):173-179
19. Lee SE, Hwang HJ, Ha JS, Jeong HS, Kim JH. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life Science*. 2003; 73: 167-179.
20. Asadi M. Antioxidant and antimicrobial activities in the different extracts of Caspian saffron, *Crocus caspius* Fisch & C. A. Mey. Ex Hohen. *Caspian Journal of Environtal Science*. 2016; 14(4): 331-338.
21. Karimi E, Oskoueian E, Hendra R, Jaafar HZE. Evaluation of *Crocus sativus* L. stigma phenolic and flavonoid compounds and its antioxidant activity. *Molecules*. 2010; 15: 6244-625
22. Ahmad BS, Malik AH, Wani ZA, Mohiuddin T, Shah Z, Abbas N, et al. Phytochemical analysis and antioxidant activity of different tissue types of *Crocus sativus* and oxidative stress alleviating potential of saffron extract in plants, bacteria, and yeast. *South African Journal of Botany*. 2015; 99: 80–87.
23. Abdullaev FI. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). *Experimental Biology and Medicine*. 2002; 227: 20-25.
24. Zarinkamar F, Tajik S, Soleimanpour S. Effects of altitude on anatomy and concentration of crocin, picrocrocin and safranal in *Crocus sativus* L. *Australian Journal of crop Science*. 2011; 5 (7): 831-838.
25. Mazaraie A, Mousavi-Nik SM, Fahmideh L. Assessments of phenolic, flavonoid and antioxidant activity of aqueous, alcoholic, methanol and acetone extracts of thirteen medicinal plants. *Nova Biologica Reperta*. 2018; .4 (4):299-309. [In Persian]
26. Ouahhoud S, Elmansuri M, Sabouni A, Elyoubi M, Benabbas R, Choukri M, et al. Determination of Antioxidant Properties of Six By-Products of *Crocus sativus* L. (Saffron) Plant Products Iliass Lahmass1· Waste Biomass Valor. 2017; 9(5): 1-10.
27. Vakili-ghartavol M, Alizadeh Salteh S. Comparison between metabolites ant antioxidant activity of saffron (*Crocus sativus* L.) from Kashmar and Marand regions. *Saffron Agronomy and Technology*. 2016; 4(3): 215-224
28. Amin A, Hamza AA, Bajbouj K, Ashraf S, Daoud S. Saffron: a potential candidate for a novel anti cancer drug against hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2011; 54(3):857–867
29. Kanakis CD, Tarantilis PA, Tajmir-Riahi HA, Polissiou MG. Crocetin, dimethylcrocetin, and safranal bind human serum albumin: Stability and antioxidative properties. *Jornal of Agriculture Food Chemistry*. 2007; 55: 970-977.
30. Magesh V, Singh JPV, Selvendiran K, Ekambaram G, Sakthisekaran D. Antitumor activity of crocetin in accordance to tumor incidence, antioxidant status, drug methabolizing enzymes and histopathological studies. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2006; 287:127–135
31. Ochiai T, Ohno SH, Soedo SH, Tanaka H, Shoyama Y, Shimeno H. Crocin prevents the death ofrat pheochromyctoma (PC-12) cells by its antioxidant effect stonger than those of α -tocopherol. *Neurosci Lett*. 2004; 362: 61–64
32. Selim K, Tsimidou M, Biliaderis CG. Kinetic studies of degradation of saffron carotenoids encapsulated in amorphous polymer matrices. *Food Chemistry*. 2000; 71:199–206
33. Akhondzadeh BA, Ghoreishi SA, Noorbala AA, Akhondzadeh SH, Rezazadeh SH. Petal and stigma of *Crocus sativus* L. in the treatment of depression: A pilot double-blind randomized trial. *Journal of Medicinal Plants*. 2008; 7: 29-36.



34. Chen Y, Zhang H, Tian X, Zha C, Cai L, Liu Y, et al. Antioxidant potential of crocins and ethanol extracts of *Gardenia jasminoides* ELLIS and *Crocus sativus* L. A relationship investigation between antioxidant activity and crocin contents. *Food Chemistry*. 2008; 109: 484-492.
35. Assimopoulou AN, Sinakos Z, Papageorgiou VP. Radical scavenging activity of *Crocus sativus* L. extract and its bioactive constituents. *Phytotherapy Research*. 2005; 19: 997-1000.
36. Mashmoul M, Azlan A, Khazaai Mohd Yusof BN, Mohd NS. Saffron: a natural potent antioxidant as a promising antiobesity drug. *Antioxidant*. 2013; 2: 293-308.
37. Soleimanifar M, Niazmand R, Shahidi Noghabi M. Study and comparison of inhibitory and antioxidant activity of water-methanol extracts of black cumin, coriander and dill seeds. *Food Science and Technology*. 2014; 12: 105-118.
38. Azami L, Babapour A, Garechahi M. Antimicrobial Effect of aqueous extract of saffron petals on some of food-borne bacterial pathogen. *Journal of Food Hygiene*. 2013; 1(5): 63-73. [In Persian]
39. Motamedi H, Seyednejad M. A study on the antibacterial effects of ethanolic and methanolic extracts of Saffron (*Crocus sativus* L.) on some food borne pathogens. *Journal of Food Microbiology*. 2016; 2 (4) : 15-27. [In Persian]
40. Mudasir A, Mir Rajesh TS, Rameashkannan MV, Riyaz A, Muthu Balaji R. A Comparative study of phytochemical analysis and antimicrobial properties of stigmas and stamens of saffron (*Crocus sativus* L.) found in Kashmir. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. 2011; 11(6): 35-38.
41. Vahidi H, Kamalinejad M, Sedaghati N. Antimicrobial Properties of *Crocus sativus* L. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2002; 1: 33-5.
42. Kyanbakh, SA. A systematic review on pharmacology of saffron and its active constituents. *Journal of Medicinal Plants*. 2008; 7(28): 1-27.
43. Razzaghi R, Nourbakhsh R, Hemmati Kakhaki A, Saberi Najafi M. Antimicrobial effect of saffron. 3rd national congress on saffron, Iran. 2003.
44. Rafieian-kopaei M, Bahmani M, Abaszadeh A, Hassanzadazar H, Soroush S, Kazemzadeh F. Salmonellosis Phytotherapy: A review on Iranian most important medicinal plants affecting on *Salmonella*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*. 2016; 9(3): 1313-1321.
45. Parray J, Kamili A, Hamid R, Reshi Z, Qadri R. Antibacterial and antioxidant activity of methanol extracts of *Crocus sativus* L. C.V. Kashmirianus. *Frontiers in Life Science*. 2014; 8(1): 40-46.
46. Pintado C, Miguel A, Acevedo O, Nozal L, Novella JL, Rotger R. Bactericidal effect of saffron (*Crocus sativus* L.) on *Salmonella enterica* during storage. *Food Control*. 2011; 22: 638-642.
47. Asgarpanaha J, Darabi-Mahboubia E, Mahboubib A, Mehrabb R Hakemivala M. In-Vitro Evaluation of *Crocus Sativus* L. Petals and Stamens as Natural Antibacterial Agents Against Food-Borne Bacterial Strains. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013; 9 (4): 69-82.
48. Fisher K, Phillips K. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends in Food Science & Technology*. 2008; 19 (3): 156-164.
49. Holley RA Patel D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*. 2005. 22 (4): 273-292.
50. Özbek H, Güvenalp Z, Kuruüzüm-Uz A, Kazaz C, Demirezer LO. Phenylpropanoids, Sesquiterpenoids and Flavonoids from *Pimpinellatragium* Vill. Subsp. *Lithophila* (Schischkin) Tutin, Record of Natural Products *Journal*. 2016; 10(2): 207-213.
51. Licón CC, Carmona M, Molina A, Berruga MI. Chemical, microbiological, textural, color, and sensory characteristics of pressed ewe milk cheeses with saffron (*Crocus sativus* L.) during ripening. *Journal of Dairy Science*. 2012; 95: 4263-4274.



Original Article

Chemical, Antioxidant and Microbial Properties of Aqueous and Alcoholic Extracts from Stigma and Petal of Saffron (*Crocus Sativus L.*)

Modamian Farshbafi M¹, Ahmadi Dastgerdi A^{1*}, Tabatabaieian Nimavard J²

1. Department of Food Science and Technology, Ardestan Branch, Islamic Azad University, Ardestan, Iran

2. Department of Animal Science, Ardestan Branch, Islamic Azad University, Ardestan, Iran

Received: 08 Dec 2020

Accepted: 03 Feb 2021

Abstract

Background & Objective: Saffron is the most expensive spice in the world and the extract of this valuable spice not only has valuable nutritional properties but also has various applications in food formulation. In recent years, there has been a great need for the creation of resources from medicinal plants due to the role of phytochemicals and oxidants in human health. The purpose of this study is to evaluate the chemical properties, antioxidant and antimicrobial properties of stigma and petal extracts.

Materials & Methods: After extract preparation with percolation method, the total phenol content of the extract was measured by Folin-Ciocalteu and the total flavonoid content was determined by aluminum chloride method. Antioxidant activity was evaluated by DPPH method. The in vitro antimicrobial activity test (zone of inhibition, Minimum inhibitory concentration, Minimum bactericidal concentration) against *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* and *E. coli* was carried out by disk diffusion assay.

Results: Comparison of chemical composition between different organs showed that the content and antioxidant activity of these compounds can vary depending on the organ. Regarding total phenolic and flavonoid contents, concerning stigma for *Crocus sativus* stigma were higher than petals. The antioxidant capacities of stigma were higher than petals assessed by DPPH methods. The highest antioxidant activity may be due to high phenolic contents in the stigma. The results showed that these microorganisms were highly sensitive to methanol and ethanolic extracts of saffron while they were resistant to aqueous extract.

Conclusion: Our findings suggest the potential of *Crocus sativus* as a natural antioxidant and preservative in the food industry to prevent food oxidation and control of food pathogens.

Keywords: Antioxidant, Saffron (*Crocus sativus*), Antimicrobial, Extract

***Corresponding Author:** Ahmadi Dastgerdi Asiyeh, Department of Food Science and Technology, Ardestan Branch, Islamic Azad University, Ardestan, Iran
Email: as.ahmadi17@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-3986-1866>