مقاله پژوهشی

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

مریم مدامیان فرشبافی[۱]، آسیه احمدی دستگردی[۱*]، 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 دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۹/۱۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۱۱/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: زعفران گران‌بهاترین ادویه دنیا است و عصاره حاصل از این گیاه ارزشمند، نه‌تنها 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، افزایش‌یافته 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 پرکولاسیون (خیساندن)، میزان ترکیبات فنولی و فلاوونویید 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 موروییم*، *باسیلوس سرئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنس* و *اشرشیاکلی 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

حضور بالای رادیکال‌های آزاد مخصوصاً پراکسیدها نقش کلیدی در بیماری‌زایی تعدادی از بیماری‌ها مانند سرطان، دیابت، پیری، بیماری‌های قلبی عروقی، انواع بیماری‌های عصبی و ریوی 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

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. ازاین‌رو کاهش تعداد میکروارگانیسم‌ها در مواد غذایی هم ازنظر کنترل کیفیت و هم ازنظر بهداشت و سلامت عمومی حائز اهمیت فراوان است. یکی از راه‌های کنترل رشد باکتری‌های بیماری‌زا در مواد غذایی استفاده از نگه‌دارنده‌ها و ترکیبات ضدمیکروبی است. با توجه به نگرانی‌های عمومی در خصوص

عوارض نگه‌دارنده‌های شیمیایی تمایل به مصرف محصولاتی است که فاقد نگه‌دارنده بوده و یا در آن‌ها از نگه‌دارنده طبیعی استفاده‌شده 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 جداشده 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 ارزش‌افزوده 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 قرمزرنگ است که محصول زعفران را تشکیل می‌دهد. بسیاری از تحقیقات اثرات فارموکولوژیکی زعفران و ترکیبات آن شامل فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد تومور، افزایش‌دهنده حافظه و یادگیری، درمان بی‌نظمی‌های هپاتیک، 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، کروستین و سافرانال انواع بیماری‌ها ازجمله سرطان را کاهش می‌دهد (۶). پژوهش‌های بسیاری به ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی اندام‌های زعفران پرداختند (۱۱-۷).

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 به‌حساب می‌آید (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 قرارگرفته است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و آماده‌سازی زعفران

گیاه زعفران از شرکت امید واقع در تهران که از مشهد خریداری‌شده 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 الکل 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 مدت‌زمان ۳۰ دقیقه در تاریکی توسط دستگاه شیکر تکان داده شدند. جذب نمونه‌های حاوی عصاره و شاهد در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu, Japan) خوانده شد. اسیدآسکوربیک به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. درصد

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

درصد مهار DPPH [$\frac{AA}{AB}$ - ۱۰۰] × ۱(%) =

A_A =جذب نمونه

A_B =جذب شاهد = جذب اولیه DPPH به‌تنهایی

اندازه‌گیری فنول 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 به‌وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول‌موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری و نمودار استاندارد رسم شد (y=۰/۱۰۹۸ x-۲/۵ و R^2=۰/۹۹۷۳). 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 به‌جای 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 فلاوونوئیدی عصاره

محتوای فلاوونوئید 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 طول‌موج ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری و نمودار استاندارد رسم شد (y=۰/۰۰۶۴ x-۰/۰۱ و R^2=۰/۹۹۹). 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 به‌جای محلول استاندارد ۵۰۰ میکرولیتر از محلول عصاره اضافه شد. محتوای فلاوونوئید به‌صورت اکی والان‌های کوئرستین بر گرم عصاره بیان شد (۱۷).

بررسی ویژگی‌های ضدمیکروبی عصاره

سویه‌های استاندارد شامل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تایفی موروییم*، *باسیلوس سرئوس*، *لستریا مونوسیتوژنس* و *اشرشیاکلی* از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. تعیین حساسیت باکتری‌های موردمطالعه 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 دایلوشن و براث دایلوشن 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 گلیسیرین استریل مخلوط و در حجم‌های ۵۰۰ میکرولیتری در میکروتیوب‌های اپندرف در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۷).

تعیین حساسیت باکتری‌های موردمطالعه 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 موردمطالعه، سوسپانسیون باکتریایی با جذب نوری ۰/۱ تهیه‌شده و سپس با استفاده از سوآب سطح پلیت‌های حاوی محیط آگار BHI با باکتری‌های موردنظر تلقیح شد. بعدازاینکه سطح پلیت خشک شد، دیسک‌های کاغذی ۶ میلی‌متری حاوی ۶۰ میلی‌گرم از عصاره به پلیت منتقل‌شده 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 آگاردایلوشن

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

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 مورداستفاده عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی ۰، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم در گرم بود). پلیت کنترل حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی ۱۰٪ دی متیل سولفوکساید بود. بعد از پخش کردن محیط، سطح پلیت‌ها زیر هود میکروبیولوژیک به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه به‌خوبی خشک شد. سپس مقدار ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری‌های موردنظر توسط سمپلر به‌صورت نقطه‌ای تلقیح شد (به‌نحوی‌که در هر ۵ میکرولیتر 10^3 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٪ دی متیل سولفوکساید حل شد و سپس توسط فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر استریل شد و سپس غلظت‌های لازم از آن توسط آبگوشت BHI تهیه شد (غلظت نهایی اتانول در محیط کشت ۱٪ و غلظت نهایی دی متیل سولفوکساید 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 10^4 بود (تعداد دقیق باکتری از طریق کشت سطحی و شمارش کلونی تأیید شد). در چاهک کنترل 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 به‌صورت چشمی مشاهده گردید (۷).

تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)

پس از تعیین MIC از تمامی لوله‌هایی که در آن‌ها عدم رشد باکتری مشاهده شد ۱۰۰µl 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 قابل‌مشاهده است به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد (۱۸).

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

کلیه آزمایش‌ها در سه تکرار انجام گرفت و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن در سطح ($p<0/05$) انجام گرفت. رسم منحنی‌ها با نرم‌افزار اکسل انجام شد. تحلیل و ارزیابی آنالیز واریانس (ANOVA) توسط نرم‌افزار SPSS (SPSS version 20, Inc., Woking, Surrey, UK) انجام گرفت.

نتایج

بررسی خواص شیمیایی کلاله و گلبرگ زعفران

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

جدول ۱- خواص شیمیایی کلاله و گلبرگ زعفران

اندام گیاه	رطوبت	خاکستر	پروتئین	لیپید	کربوهیدرات
کلاله	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 ($p<0/05$).

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

اندام گیاه	کروسین	پیکروکروسین	سافرانال
کلاله	۲۲۴/۷۵ ±۰/۱۸ [a]	۸۵/۹۸ ±۰/۴[a]	۴۹/۱۴ ±۰/۲۳[a]
گلبرگ	۲۱۴/۳۷ ±۰/۱۳ [b]	۶۹/۴۲ ±۰/۳[b]	۳۶/۱۸ ±۰/۴۳[b]

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

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

اندام گیاه	عصاره		
	متانولی	اتانولی	آبی
کلاله	۱۲/۴۵ Aa	۱۲/۰۲ Ab	۱۳/۱ Ac
گلبرگ	۱۱/۹۰ Ba	۱۱/۴۰ Bb	۱۲/۵ Bc

حروف متفاوت بزرگ در ستون و حروف متفاوت کوچک در سطر نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($p<۰/۰۵$).

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

اندام گیاه	نوع عصاره	غلظت (میکروگرم بر گرم)			
		۰	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰
کلاله	آبی	-	۴/۸ ± ۲/۹[a]	۱۲/۱±۳/۴[ab]	۲۱/۱±۹/۸[b]
	اتانولی	-	۱۵/۱۶ ± ۱/۳[a]	۱۹/۱±۲/۸[c]	۴۰/۲±۲/۶[d]
	متانولی	-	۲۰/۱±۶۶/۳ [d]	۴۶/۱±۶۳/۷[e]	۸۰/۴±۲۶/۱۲[f]
گلبرگ	آبی	-	۲/۶ ± ۱/۴ [a]	۹/۱±۲/۸ [a]	۱۱/۲±۸/۳ [a]
	اتانولی	-	۱۲/۱±۲/۱[b]	۱۸/۱±۲/۶ [bc]	۳۰/۲±۲/ ۶[c]
	متانولی	-	۱۷/۲±۲/۳۱[d]	۳۵/۱±۸/۸۵[d]	۶۰/۲±۴/۷۰[e]
اسید آسکوربیک		-	۳۰/۰±۳/۵۵[e]	۶۰/۱±۲/۱[f]	۹۰/۱±۲/ ۷[g]

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

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

کروسین، پیکروکروسین و سافرانال

جدول ۲ میزان کروسین، پیکروکروسین و سافرانال را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است کلاله در مقایسه با گلبرگ دارای کروسین، پیکروکروسین و سافرانال بیشتری است ($p<۰/۰۵$).

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

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)	
		فنول	فلاوونوئید
کلاله	آبی	۱۵/۰±۲/۴^{c}	۱۰/۰±۲/۲^{d}
	اتانولی	۲۲/۰±۲۴/۶^{d}	۱۵/۰±۲۶/۱^{e}
	متانولی	۳۰/۰±۲۸/۵^{e}	۱۹/۰±۴۳/۲^{f}
گلبرگ	آبی	۶/۰±۲/۴^{a}	۲/۰±۳۳/۰۶^{a}
	اتانولی	۱۰/۰±۱۴/۵^{b}	۶/۰±۲/۱^{b}
	متانولی	۱۲/۰±۴۱/۵^{b}	۸/۰±۱۹/۱^{c}

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

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

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

DPPH نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود در تمامی عصاره‌ها با فزایش غلظت عصاره، مهار رادیکالی باقدرت 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 فلاوونوئیدی

مقایسه میانگین داده‌های فنل کل و فلاونویید کل عصاره گیاه حاکی از تفاوت معنی‌دار این ترکیبات در اندام‌های مختلف است. همان‌طور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود کلاله با میزان ۳۰/۲۸ میکروگرم بر گرم اسیدگالیک دارای بیشترین میزان ترکیبات 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 ($p<۰/۰۵$).

نتایج حاصل از سنجش محتوای فلاونوئید عصاره‌ها نیز بر اساس روش رنگ‌سنجی آلومینیوم نشان داد کلاله بالاترین محتوای فلاوونوئیدی را دارا بود (۱۹/۴۳ میکروگرم بر گرم کوئرستین).

تعیین حساسیت باکتری‌های موردمطالعه به عصاره‌های زعفران به روش انتشار دیسک

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

اشرشیاکلی، *لیستریا مونوسیتوژنس* و *باسیلوس سرئوس* درروش انتشار دیسک در جدول ۶ آمده است. در مورد کلاله، هر سه عصاره موردمطالعه سبب مهار رشد باکتری‌ها گردیده و قطر هاله رشد بین ۱۸-۲ میلی‌متر محاسبه شد. در مورد گلبرگ، هیچ‌یک از عصاره‌های موردمطالعه 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 آگاردایلوشن

نتایج تعیین MIC عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی کلاله و گلبرگ زعفران علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلاتیفی موریوم*، *اشرشیاکلی*، *لیستریا مونوسیتوژنس* و *باسیلوس سرئوس* درروش آگار دایلوشن در جدول ۷ آمده است. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده میزان MIC هر سه عصاره در کلاله 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 براث میکرودایلوشن

نتایج MIC عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی کلاله و گلبرگ زعفران علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *اشرشیاکلی*، *لیستریا مونوسیتوژنس* و *باسیلوس سرئوس* درروش میکرودایلوشن در جدول ۷ آمده است. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده در کلاله MIC هر سه عصاره در برابر تمام باکتری‌های موردمطالعه ۲۵۰ میکروگرم بر گرم و در مورد *سالمونلا تایفی موریوم* ۱۲۵ میکروگرم بر گرم محاسبه شد. درحالی‌که

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

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

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* درروش آگار دایلوشن 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

باکتری‌ها	حداقل غلظت کشندگی (میکروگرم بر گرم)					
	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
لستریا مونوسیتوژنس	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰
باسیلوس سرئوس	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰

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 راندمان استخراج تأثیر می‌گذارد و راندمان عصاره گیری با افزایش قطبیت حلال افزایش می‌یابد؛ اما تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد در هر دو حلال اتانولی و متانولی وجود دارد. یافته‌های به‌دست‌آمده ازنظر بالا بودن راندمان عصاره‌های آبی و متانولی با نتایج دیگر پژوهشگران هم‌خوانی دارد. عوامل مختلفی در افزایش راندمان 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 پایهٔ بی‌رنگ‌شدن محلول DPPH است که به‌وسیله 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 بازداری را از خود نشان داد. همان‌طور که مشخص است رابطه مستقیمی بین غلظت عصاره و اثر مهارکنندگی رادیکالی آن 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 فلاونوییدی 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 بامطالعه بر روی خواص آنتی‌اکسیدانی سه اندام کلاله، برگ و کورم با روش مهار رادیکال DPPH نشان دادند کلاله بالاترین

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را دارد (۲۲). در پژوهشی دیگر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره کلاله زعفران حتی بالاتر از گیاهان گوجه‌فرنگی و هویج گزارش‌شده است (۲۳). همچنین نشان داده شد که گلبرگ زعفران یک منبع آنتی‌اکسیدان طبیعی و سهل‌الوصول است و در غلظت ۵۰۰ ppm دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی برابر با TBHQ در غلظت ۱۰۰ ppm است (۱۶). نکته قابل‌ذکر آن است که وجود تفاوت در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی این اندام‌ها در مطالعات مختلف می‌تواند به دلایل ژنوتیپ، تفاوت‌های محیطی که گونه در آن حضور دارد و اندام‌های موردمطالعه و زمان نمونه‌برداری نسبت داده شود (۲۴).

بالا بودن ترکیبات فنلی دلیل اصلی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها است، زیرا بر اساس شواهد موجود، ارتباط مثبتی بین ترکیبات فنلی و قدرت آنتی‌اکسیدانی گیاهان وجود دارد (۵، ۲۵، ۲۶). تفاوت فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان ترکیبات موجود در کلاله زعفران در مکان‌های مختلف را عمدتاً ناشی از تفاوت محیطی، ژنتیک (واریته) و فعالیت‌های کشاورزی دانسته‌اند (۲۷).

ترکیبات اصلی کلاله شامل کروسین، پیکروکروسین و سافرانال که به ترتیب مسئول رنگ، طعم و عطر زعفران می‌باشند دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند (۲۱، ۳۲-۲۸). توان آنتی‌اکسیدانی بالای زعفران را بیش از هر چیز به کروسین که رنگیزه اصلی زعفران است ارتباط داده‌اند (۵، ۳۳، ۳۴). توان آنتی‌اکسیدانی بالای کلاله زعفران می‌تواند نتیجه اثرات سینرژیسم ترکیبات فعال موجود در آن باشد (۲۴، ۳۵، ۳۶).

یافته‌های این پژوهش در توافق با گزارش‌های قبلی مبنی بر ارتباط مستقیم اجزاء فنولیک با فعالیت آنتی‌اکسیدانی است و با افزایش غلظت، میزان درصد مهارکنندگی نیز افزایش یافت (۸، ۱۱، ۲۵). همچنین اختلاف معنی‌داری در محتوای ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی، همچنین خصوصیات آنتی‌اکسیدانی کلاله در مقایسه با گلبرگ گزارش شد. از بین عصاره‌های مختلف متانولی، اتانولی و آبی عصاره آبی عملکرد ضعیف‌تری در ارتباط با مهار رادیکال‌های آزاد داشت.

محتوای پلی فنول‌ها در گیاهان به عوامل مختلفی بستگی دارد و بسته به عملکرد گونه، واریته، اندام و مرحله فیزیولوژیک می‌تواند متفاوت باشد. درواقع 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، اتانول و آب است که شامل زمان استخراج، سرعت اختلاط و اندازه ذرات پودر کلاله و گلبرگ زعفران است. تناقض در نتایج به‌دست‌آمده در تحقیقات مختلف می‌تواند در ارتباط با تنوع ترکیبات شیمیایی موجود در گیاهان، مکانیسم مختلف واکنش آن‌ها و سینتیک متفاوت واکنش‌های مهاری آن‌ها در روش‌های انتخابی باشد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اندازه‌گیری شده یک نمونه با روش مورداستفاده و منبع تولید رادیکال آزاد یا عامل اکسیدکننده در ارتباط است (۸). انتخاب نوع حلال تأثیر زیادی بر میزان استخراج ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدی دارد و از طرفی، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی به میزان زیادی تحت تأثیر ماهیت حلال، زمان استخراج و تعامل این دو عامل است. بااین‌حال، قدرت استخراج حلال مهم‌ترین فاکتور مؤثر بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی محصول است و بین حلال‌های مختلف به‌کاررفته، حلال متانولی عملکرد بهتری در ارتباط با استخراج فنل، فلاونوئید و میزان مهار رادیکال‌های آزاد داشت، درحالی‌که حلال آبی عملکرد ضعیف‌تری نسبت به بقیهٔ حلال‌ها نشان داد (۲۵).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان را به حضور ترکیبات فنلی در آن‌ها نسبت دادند (۲۶). با افزایش غلظت ترکیبات فنلی، به دلیل افزایش گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط، احتمال اهداء هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن قدرت مهارکنندگی اسانس افزایش می‌یابد. شایان‌ذکر است که همه ترکیبات فنلی ممکن است توانایی مهار رادیکال‌های آزاد یا به عبارتی فعالیت ضد اکسایشی نداشته باشند. قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد به تعداد و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل و وزن مولکولی ترکیبات فنلی بستگی زیادی دارد. در ترکیبات فنلی با وزن مولکولی پایین‌تر، گروه‌های هیدروکسیل راحت‌تر در دسترس قرار می‌گیرند. ترکیبات فنلی شامل فنل‌های ساده با یک حلقهٔ آروماتیک دارای حداقل یک گروه هیدروکسی که فلاونوئیدها را تشکیل می‌دهند (۳۷).

روند استخراج ترکیبات فنلی فاکتوری مهم در تعیین ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره است. دما، حلال، زمان عصاره گیری، قدرت استخراج و روش استخراج تأثیر بارزی در محتویات عصاره خواهد گذاشت. این تفاوت‌ها به تمایل این ترکیبات به حلال موردنظر برای عصاره گیری و مخصوصاً قطبیت آن وابسته است. همچنین، نتایج این تحقیق، نتایج مطالعات قبلی را مبنی بر این‌که متانول برای استخراج مواد ضدمیکروبی از گیاهان دارویی در مقایسه با دیگر حلال‌ها ازجمله آب، اتانول و هگزان

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 حلالت این ترکیبات نقش کلیدی دارد (۸).

بیماری‌های قابل‌انتقال از مواد غذایی از اهمیت فراوانی در بهداشت عمومی برخوردار بوده و سالانه خسارات مالی و جانی فراوانی را بـه جوامع تحمیل می‌کند (۳۸). در این مطالعه اثر عصاره‌های متانولی، اتانولی و آبی کلاله و گلبرگ زعفران بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلاتیفی موریوم*، *اشرشیاکلی*، *لیستریا مونوسیتوژنس* و *باسیلوس سرئوس* موردبررسی 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 موردمطالعه 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 گرانوله‌شدن سیتوپلاسم، گسیختگی غشای سیتوپلاسمی، غیرفعال شدن یا ممانعت از فعالیت آنزیم‌های درون‌سلولی و برون سلولی 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 درنهایت 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 قابل‌توجهی در مهار رشد این باکتری نشان داد؛ بنابراین به‌عنوان یک نگه‌دارنده طبیعی برای افزایش کیفیت و ماندگاری پنیر قابل‌استفاده است (۳۹). همچنان که لیکون و همکاران (۲۰۱۲) اثر افزودن زعفران بر ویژگی‌های میکروبی، رنگ، قوام و ویژگی‌های حسی پنیر تهیه‌شده از شیر میش را موردبررسی قراردادند 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* قابل‌توجه 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 براث دایلوشن مورداستفاده قرار می‌گیرد (۷).

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

آنتی‌اکسیدانی کلاله زعفران که به‌عنوان ادویه مورداستفاده قرار می‌گیرد حائز اهمیت است، اما در این مطالعه، مقایسه خواص آنتی‌اکسیدانی کلاله با گلبرگ مشخص کرد که گلبرگ نیز که هرساله به میزان زیادی طی فرآوری زعفران به اتلاف می‌رود، نیز دارای خواص آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجهی است. از طرفی به دلیل طعم و عطر مناسب گلبرگ زعفران امکان استفاده از غلظت‌های بالاتر وجود دارد. هم‌چنین ازآنجایی‌که گلبرگ به‌عنوان یک محصول جانبی در تولید زعفران است که در حال حاضر به‌عنوان ضایعات دور ریخته می‌شود؛ بنابراین با عملی نمودن استفاده از این ماده در صنعت غذایی می‌توان علاوه بر برآورده کردن خواسته مصرف‌کنندگان برای نگه‌دارنده‌های طبیعی و افزایش عمر 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 پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردستان (کد ثبت پایان‌نامه: ۰۵-۱۳-۶-۳۱۹۰) است. همچنین نویسندگان بر خود واجب می‌دانند که از بخش تحقیقات مواد غذایی تشکر و قدردانی به عمل‌آورند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده‌اند.

References

1. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. Journal of Food Microbiology. 2004; 94: 223–253.
2. 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]
3. 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]
4. 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]
5. 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.
6. 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]
7. 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.
8. Afraze 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]
9. 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]
10. 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]
11. 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]
12. 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 Croccus 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-Mahbouba 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 PimpinellatragiumVill. 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 M[1], Ahmadi Dastgerdi A[1*], Tabatabeian Nimavard J[2]

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 perculation method, the total phenol content of the extract was measured by Folin-Ciocalteo 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