Saffron Agronomy & Technology
Vol. 9, No. 3, Fall 2021, P. 269-284

نشریه زراعت و فناوری زعفران
جلد ۹، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۰ ص. ۲۸۴-۲۶۹

مقاله پژوهشی

ارزیابی روش‌های مختلف استخراج برخواص آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره بنه زعفران

مژگان اسماعیلیان[۱]، جواد فیضی[۲]، مسلم جهانی[۳*]و سودابه عین افشار[۴]

تاریخ دریافت: ۳۰ اردیبهشت ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: ۷ دی ۱۳۹۹

اسماعیلیان، م.، فیضی، ج.، جهانی، م.، و عین افشار، س. ۱۴۰۰. ارزیابی روش‌های مختلف استخراج برخواص آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره بنه زعفران. زراعت و فناوری زعفران، ۹(۳): ۲۸۴-۲۶۹.

چکیده

در این مطالعه، روش استخراج با حلال (CSE) با استخراج به کمک امواج فراصوت (UAE) و استخراج با آب مادون بحرانی (SWE) برای استخراج ترکیبات مؤثره بنه زعفران (*Crocus sativus*) مقایسه شد و برای بهینه‌یابی پارامترها از روش سطح پاسخ (RSM) و طرح مرکب‌مرکزی (CCD) استفاده شد. در روش CSE, دمای ۴۸°C، زمان ۶۰ دقیقه و اتانول ۸۰٪، و در روش UAE دمای ۳۷°C، زمان ۴۵ دقیقه، فرکانس ۳۷ کیلوهرتز و اتانول ۸۰٪ و در روش SWE نیز دمای ۱۸۰°C و زمان ۲۲ دقیقه به عنوان مقادیر بهینه انتخاب شدند. روش استخراج با آب مادون بحرانی بیشترین راندمان استخراج را داشته و بالاترین محتوای فنولی کل (۸۰۷/۶ میلی‌گرم معادل اسید گالیک در ۱۰۰ گرم بنه زعفران) و فلاونوئید کل (۱۲/۲ میلی‌گرم معادل کوئرستین در ۱۰۰ گرم بنه زعفران) در عصاره SWE اندازه‌گیری شد. مقدار محتوای فنولی و فلاونوئیدی عصاره SWE به ترتیب ۸ و ۱۲ برابر دو روش دیگر است. بالاترین و پایین‌ترین فعالیت آنتی اکسیدانی نیز به ترتیب در نمونه استخراج شده به روش SWE و CSE مشاهده شد. اثر ضدباکتریایی عصاره‌ها به روش ریزرقت‌سازی ارزیابی شد و حداقل غلظت کشندگی هر سه عصاره بهینه، نسبت به باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* به ترتیب ۳۰۰ و ۶۰۰ $mg.mL^{-1}$ بدست آمد.

کلمات کلیدی: ترکیبات فلاونوئیدی، استخراج حلالی، امواج فراصوت، آب مادون بحرانی.

۱- دانشجوی دکترای شیمی مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
۲- استادیار گروه ایمنی و کنترل کیفیت مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
۳- استادیار گروه شیمی مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
۴- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، AREEO، مشهد، ایران.
* نویسنده مسئول (پست الکترونیک: m.jahani@rifst.ac.ir)

Doi: 10.22048/jsat.2021.231960.1396

مقدمه

زعفران (*Crocus sativus* L.) یکی از گرانترین و بی‌نظیرترین ادویه‌های جهان و احتمالاً حاصل جهش گیاه وحشی*Crocus cartwrightiamus* و از تیره زنبقیان[۱] می‌باشد (Bagri et al., 2017). این گیاه در مناطق خشک و نیمه‌خشک که زمستان‌های سرد و تابستان‌های گرم و خشک دارند (D'Agostino et al., 2007) و در اقلیم‌های معتدل و نیمه‌استوایی[۲] قابلیت رشد دارد (Lage & Cantrell, 2009). این گیاه رنگی و گران‌بهای چندساله فاقد بذر بوده و تولید مثل آن از طریق تکثیر ساقه زیرزمینی یا بُنه[۳] صورت می‌گیرد. در طول هر فصل زراعی، زعفران مراحل رشد خود را پس از گل‌دهی، با تولید بنه‌های جدید (بنه دختری[۴]) بر روی بنه قدیمی (بنه مادری[۵]) طی می‌کند (Gresta et al., 2008). دوره تولید زعفران در ایران در منابع مختلف ۷ تا ۸ سال بیان شده که تا ۱۰ سال نیز امکان بهره‌برداری وجود دارد. به طور معمول عملکرد این گیاه در سال اول پایین است و در سال‌های چهارم تا ششم به حداکثر مقدار خود می‌رسد و سپس به دلیل افزایش تراکم بنه‌های دختری، تشدید رقابت بین بنه‌ها در جذب آب و مواد غذایی و همچنین نامساعدتر شدن شرایط فیزیکی و شیمیایی خاک مجدداً رو به کاهش می‌گذارد. در این زمان لازم است تا بنه‌های زعفران برای کشت در مزرعه جدید از زمین خارج شوند. بنه‌های با وزن کمتر از ۶ گرم، در سال اول توان گلدهی ندارند (Saeidirad et al., 2016) و مطالعات نشان داده که درصد سبز شدن، تعداد برگ‌ها و درصد گل‌های تولیدی تابع قطر بنه‌ها است. با توجه به سمی بودن بنه‌ها برای حیوانات جوان نمی‌توان از آنها به عنوان خوراک دام استفاده کرد (Srivastava et al., 2010). ایران تولیدکننده و صادرکننده حدود ۹۰ تا ۹۳ درصد زعفران دنیا است (Ghorbani, 2008) و با توجه به سطح وسیع زیرکشت زعفران در استان خراسان، در آینده‌ای نه چندان دور با افزایش تولید بنه زعفران مواجه خواهیم بود. بنابراین سالانه مقدار زیادی از بنه‌های ریز با وزن کم تولید می‌شوند که جزء ضایعات محسوب شده و عدم اتخاذ رویکرد مناسب در این زمینه سبب هدر رفت سرمایه زیادی خواهد شد و ضروری است تا از هم اکنون به صورت ویژه در اولویت پژوهش و سرمایه گذاری قرار گیرد.

گیاهان حاوی ترکیبات ثانویه متعدد در بخش‌های مختلف خود هستند که اغلب دارای فعالیت زیستی می‌باشند. تکنیک عصاره‌گیری مرحله کلیدی در استخراج ترکیبات موثره از یک گیاه است زیرا میزان و نوع ترکیب استخراج شده تحت تأثیر سیستم حلالی و نوع روش استخراج قرار دارد (Enayati et al., 2017). به همین دلیل، تقاضای زیادی برای روش‌های عصاره‌گیری جدید با زمان کوتاه‌تر، میزان مصرف حلال کمتر و مشکلات زیست محیطی کمتر وجود دارد. تحقیقات نشان می‌دهد عصاره‌گیری با آب مادون بحرانی (SWE)[۶] و نیز با استفاده از امواج فراصوت (UAE)[۷] برای استخراج مواد موثره گیاهی بسیار سریع و موثر عمل می‌کنند (Gong et al., 2015). استخراج به کمک امواج فراصوت به هزینه زیادی نیاز نداشته و می‌تواند با حلال‌های مختلف برای استخراج دامنه وسیعی از ترکیبات طبیعی استفاده شود (Vinatoru, 2001). انتشار امواج فراصوت درون مایع حباب‌هایی در مجاورت مرز جامد ایجاد می‌کند که رشد کرده و در نهایت فرو می‌پاشند (Luque-Garcia & Castro, 2003). فروپاشی این حباب‌ها سبب آزادسازی

۱- Iriduceae
۲- Subtropical
۳- Corm
۴- Replacement (daughter) corm
۵- Mother corm
۶- Subcritical-water extraction
۷- Ultrasound-assisted extraction

انرژی بسیار زیادی در فضایی کوچک می‌شود که با تخریب دیواره سلولی و نفوذ حلال به درون بافت، انتقال جرم سریع‌تر مواد به فاز حلال و افزایش بازده استخراج را به دنبال دارد (Gabaldón-Leyva et al., 2007). از سوی دیگر، استفاده از آب مادون بحرانی یک روش استخراج سبز است که آب جایگزین حلال‌های آلی می‌شود. این روش ارزان و ایمن است و کارایی بالایی نیز دارد (He et al., 2012).

مطالعات متعدد کارآمد بودن این روش‌ها برای استخراج مواد موثره از نمونه‌های گیاهی را نشان داده است. در پژوهشی برای استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی گلبرگ زعفران از روش SWE استفاده شده است. بهینه‌یابی پارامترها با روش باکس-بنکن[۱] صورت گرفته و شرایط بهینه شامل دمای ۱۵۹°C در زمان ۵۴ دقیقه و با نسبت ۳۶ میلی لیتر آب بر هر گرم نمونه بدست آمده است. در عصاره بهینه مقدار ترکیبات فنولی کل و فلانوئید کل به ترتیب ۱۶۱۶ و ۲۳۹ میلی گرم در هر ۱۰۰ گرم نمونه گزارش شده است (Ahmadian-Kouchaksaraie et al., 2016). در مطالعه دیگری از روش UAE برای استخراج ترکیبات فرار زعفران و از طرح مرکب مرکزی (CCD)[۲] برای بهینه یابی پارامترها استفاده شده است. نتایج نشان می‌دهد که مقدار نمونه، نوع حلال، نسبت حلال و زمان استخراج به عنوان پارامترهای اصلی و موثر بر پاسخ‌ها هستند (Jalali-Heravi et al., 2009). هدف از این پژوهش یافتن کاربردهای احتمالی برای ضایعات بنه زعفران بوده است. به این منظور ترکیب شیمیایی بنه زعفران در زمان خواب تعیین گردید. همچنین، روش‌های مختلف برای عصاره گیری از بنه زعفران مورد ارزیابی قرار گرفته و از نظر بازده استخراج، میزان فنول کل، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و اثر ضدمیکروبی عصاره مقایسه شدند. متغیرهای تأثیرگذار بر استخراج شامل نوع حلال، دما، زمان و فرکانس در روش‌های CSE و UAE و نیز دما و زمان استخراج در روش SWE بررسی و بهینه‌یابی شدند. تا کنون گزارشی مبنی بر استفاده از روش SWE برای عصاره گیری بنه زعفران و مقایسه آن با سایر روش‌های استخراج ارائه نشده است.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و معرف‌ها

معرف فولین سیوکالتیو، ۳و۵- دی‌نیتروسالیسیلیک اسید (DNS)[۳]، کربنات سدیم، استات پتاسیم، کلراید آلومینیوم شش‌آبه، کلراید آهن (II) شش‌آبه، اسید گالیک تک‌آبه، ۲،۴،۶-تریس (۲-پریدیل)-اس- تری آزین (TPTZ)[۴] و ۱و۱-دی-فنیل-۲-پیکریل-هیدرازیل-هیدرات (DPPH)[۵] از شرکت سیگما آلدریچ[۶] تهیه شدند. سایر ترکیبات شیمیایی نیز از درجه آزمایشگاهی بوده و بدون هرگونه خالص‌سازی مورد استفاده قرار گرفتند.

آماده‌سازی نمونه

بنه زعفران در زمان خواب و در خردادماه سال ۱۳۹۷ به صورت تصادفی از یکی از مزارع شهرستان زاوه استان خراسان رضوی برداشت و سپس با آب مقطر شستشو داده شد. پس از جدا کردن الیاف، بنه‌ها به قطعات کوچک خرد شده و در سایه خشک گردید. در نهایت نمونه خشک‌شده با آسیاب به پودری نرم تبدیل شده و از الک مش ۳۵ عبور داده شد و برای آزمون‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌ها در بسته‌های پلی اتیلنی و درون دسیکاتور نگهداری شدند.

۱- Box-Behnken
۲- Central Composite Design
۳- 3,5-Dinitrosalicylic acid
۴- 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine
۵- 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl-hydrate
۶- Sigma-Aldrich

عصاره‌گیری

شرایط نهایی ذکر شده جهت عصاره‌گیری در واقع شرایط بهینه حاصل از مدلسازی داده‌ها به روش سطح پاسخ (RSM)[۱] در شرایط دمایی، حلالی و زمانی مختلف بوده که در اینجا ذکر نشده‌اند. در عصاره‌گیری متداول با حلال (CSE)[۲]، دما (°C ۶۰-۲۰)، زمان (۳۰۰-۶۰ دقیقه) و نوع حلال (اتانول ۸۰٪، متانول ۸۰٪ و استون)، در روش عصاره‌گیری به کمک فراصوت نیز دما (°C ۶۰-۳۰)، زمان (۴۵-۱۵ دقیقه)، فرکانس (۳۷ و ۸۰ کیلوهرتز) و نوع حلال (اتانول ۸۰٪، متانول ۸۰٪ و استون) و در روش عصاره‌گیری با آب مادون بحرانی نیز دما (°C ۱۸۰-۱۰۰) و زمان (۳۰-۱۰ دقیقه) به عنوان متغیرهای مستقل در نظر گرفته شدند. پاسخ‌ها شامل مقدار ترکیبات فنولی کل[۳] (TPC، به صورت میلی‌گرم معادل اسید گالیک در ۱۰۰ گرم وزن خشک بنه زعفران)، درصد بازدارندگی رادیکال DPPH و قدرت احیاء کنندگی آهن[۴] (FRAP، به صورت میلی‌مول بر لیتر آهن II در ۱۰۰ گرم وزن خشک بنه زعفران) بوده اند. جهت عصاره‌گیری، پودر بنه زعفران به نسبت ۱ به ۱۰ با حلال مخلوط شد. در هر روش پس از اتمام زمان استخراج، نمونه‌ها صاف شدند و محلول زیر صافی برای آنالیزهای شیمیایی مورد استفاده قرار گرفت.

آزمون‌های فیزیکوشیمیایی

رطوبت نمونه به روش معمول آون گذاری تا رسیدن به وزن ثابت تعیین شد. برای تعیین خاکستر از روش کوره‌گذاری در دمای °C ۶۰۰ تا رسیدن به وزن ثابت استفاده شد (AOAC, 2000). میزان پروتئین به روش کجلدال (Magomya et al., 2014) و مقدار چربی به روش سوکسله و با استفاده از هگزان به عنوان حلال اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری کربوهیدرات کل

کربوهیدرات کل به روش فنل-سولفوریک اسید اندازه‌گیری شد (Jain et al., 2017). به این منظور ۱۰۰ میلی‌گرم گلوکز به همراه ۵ میلی‌لیتر هیدروکلریک اسید (۲/۵ نرمال) به یک لوله محتوی آب منتقل شده و به مدت سه ساعت در آب در حال جوش حرارت داده شد. پس از سرد شدن تا دمای اتاق، این نمونه با استفاده از کربنات سدیم جامد خنثی شده و تا حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رقیق شد و سپس سانتریفیوژ گردید. مقادیر ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی‌لیتر از این استاندارد به یک سری لوله آزمایش منتقل شده و با آب مقطر تا حجم یک میلی‌لیتر رقیق گردید. نمونه شاهد یک میلی‌لیتر آب مقطر است. به هر لوله ۱ میلی‌لیتر محلول آبی فنول (۵ درصد وزنی/حجمی) و ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک (۹۶ درصد وزنی) افزوده شده و بخوبی تکان داده شد. پس از ۱۰ دقیقه نمونه‌ها به حمام آب منتقل شدند و به مدت ۲۰ دقیقه در °C ۳۰-۲۵ نگهداری شدند. در نهایت جذب محلول‌ها در طول موج ۴۹۰ نانومتر قرائت شده و بر اساس رگرسیون خطی میزان کربوهیدرات کل بر حسب گلوکز محاسبه شد.

اندازه‌گیری قند کل محلول

جهت استخراج قند کل محلول، ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه با ۵ میلی‌لیتر اتانول (۸۰ درصد) داغ و درون حمام آب (°C ۹۵) به مدت ۱۰ دقیقه استخراج شد. این عمل ۳ مرتبه تکرار گردید و پس از هر استخراج، لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در rpm ۲۵۰۰ سانتریفیوژ شدند و مایع رویی آنها جدا و با هم مخلوط شد و در نهایت درون حمام آب °C ۸۰ تبخیر گردید. به این نمونه مقدار ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. سپس حجم‌های مختلف (۰/۲ تا ۱ میلی لیتر) از آن به لوله‌های آزمایش منتقل و حجم هر لوله با آب مقطر به یک میلی‌لیتر رسانده شده و قند کل محلول، به روش فنول-سولفوریک اسید بر مبنای گلوکز اندازه‌گیری شد.

۱- Response surface methodology (RSM)
۲- Conventional solvent extraction
۳- Total-phenolic compounds
۴- Ferric reducing antioxidant power

اندازه‌گیری قند احیا محلول

قند احیاء محلول به روش دی‌نیتروسالیسیلیک اسید و در نمونه استخراج شده در بند قبل اندازه‌گیری شد (Gusakov et al., 2011). به منظور تهیه معرف دی نیتروسالیسیلیک اسید ۱ درصد، ۱۰ گرم DNS، ۲ گرم فنول کریستالی، ۰/۵ گرم سولفیت سدیم و ۱۰ گرم هیدروکساید سدیم در آب مقطر حل شده و تا حجم یک لیتر رقیق گردید. سپس ۳ میلی‌لیتر معرف DNS به ۳ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف گلوکز و نمونه افزوده شده و مخلوط به مدت ۱۵–۵ دقیقه در ۹۰°C حرارت داده شد تا رنگ قرمز– قهوه‌ای ایجاد گردد. یک میلی‌لیتر پتاسیم سدیم تارتارات ۴۰ درصد به محلول افزوده شد تا رنگ آن تثبیت گردد. پس از سرد شدن تا دمای اتاق، جذب محلول در طول موج ۵۷۵ نانومتر قرائت شد.

تعیین بازده استخراج

حجم مشخصی از عصاره بهینه (۵ میلی‌لیتر) در ۴۰°C خشک شده (۲۴ ساعت) و سپس به آون با دمای ۱۰۴°C منتقل شده و پس از رسیدن به وزن ثابت به دقت توزین گردید. در نهایت با توجه به نسبت اولیه پودر بنه زعفران به حلال در هر روش استخراج، بازده کل به صورت گرم عصاره در هر ۱۰۰ گرم بنه زعفران خشک گزارش شد (Zeković et al., 2016).

تعیین فنول کل

برای تعیین محتوای فنولی کل، ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره بنه زعفران به ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین–سیوکالتیو ۱۰ درصد اضافه شد. پس از ۵ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد نیز افزوده شد و نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و مکان تاریک نگهداری شدند. در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. به عنوان استاندارد از اسید گالیک استفاده شده و نتایج به صورت میلی‌گرم معادل اسید گالیک (mg GAE)[1] در هر ۱۰۰ گرم پودر بنه زعفران خشک بیان شدند (Fu et al., 2011).

تعیین فلاونوئید کل

میزان فلاونوئید کل (TFC)[2] در عصاره‌های بهینه به روش رنگ سنجی با کلراید آلومینیوم تعیین شده است (Lin & Tang, 2007). به طور خلاصه، ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره با ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول، ۰/۱ میلی‌لیتر کلراید آلومینیوم شش آبه (۱۰ درصد)، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم (یک مولار) و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر یونزدایی شده مخلوط گردید. پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای محیط، جذب مخلوط در طول موج ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. از کوئرستین به عنوان استاندارد استفاده شده و نتایج به صورت معادل میلی‌گرم کوئرستین (mg QE)[3] در هر ۱۰۰ گرم بنه زعفران خشک بیان شدند.

ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی با روش DPPH

ابتدا یک میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره به ۲ میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH (۰/۰۰۴ درصد وزنی/حجمی) افزوده شد. نمونه‌ها به طور کامل مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس جذب محلول‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر در مقابل حلال خالص اندازه‌گیری شد (Sánchez-Vioque et al., 2012). در مورد نمونه‌های استخراج شده با آب مادون بحرانی، رقیق‌سازی با متانول انجام شده و نمونه‌ها پیش از آزمایش سانتریفیوژ شدند تا کدورت ایجاد شده هنگام افزودن متانول از بین برود. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها به صورت درصد بازدارندگی رادیکال DPPH مطابق رابطه ۱ محاسبه شد.

۱- Gallic acid equivalents
۲- Total flavonoids content
۳- Quercetin equivalents

(۱)

$$\text{درصد بازدارندگی} = \frac{(\text{جذب نمونه}) - (\text{جذب شاهد})}{\text{جذب شاهد}} \times 100$$

در نهایت غلظتی از نمونه که تعیین کننده ۵۰٪ بازدارندگی رادیکال DPPH است (IC_{50}) از طریق آنالیز رگرسیون تعیین شد.

ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با روش FRAP

معرف FRAP مخلوطی از بافر استات سدیم (۳۰۰ میلی-مولار با pH ۳/۶)، محلول TPTZ (۱۰ میلی‌مولار و تهیه شده در اسید کلریدریک ۴۰ میلی‌مولار)، محلول ۲۰ میلی‌مولار از کلراید آهن (III) و آب مقطر به ترتیب به نسبت ۱۰:۱:۱: ۱/۲ است که به صورت روزانه تهیه می‌شود. برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی، ۰/۲ میلی‌لیتر از نمونه به ۱/۸ میلی‌لیتر معرف FRAP اضافه شده و جذب مخلوط پس از ۱۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری در ۳۷°C، در طول موج ۵۹۳ نانومتر اندازه‌گیری شد (Fu et al., 2011). منحنی استاندارد با استفاده از محلول سولفات آهن (II) رسم شده و نتایج به صورت میلی‌مولار آهن (II) در هر ۱۰۰ گرم پودر بنه زعفران محاسبه شدند.

بررسی خاصیت ضدباکتریایی عصاره بهینه

جهت اجرای آزمون به روش ریزرقت‌سازی[۱]، از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استفاده شده و خاصیت ضدباکتریایی عصاره‌های بهینه بر روی سوش‌های باکتریایی *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*)[۲] و *اشریشیاکلی* (*Escherichia coli*)[۳] بررسی شد. ابتدا ۹۵ میکرولیتر محیط کشت (مولر هینتون براث[۴]) به تمام چاهک‌ها اضافه شد. عصاره‌های بهینه پیش از تهیه رقت، در ۴۰°C به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند.

۱- Microdilution
۲- Staphylococcus aureus PTCC 1764
۳- Escherichia coli PTCC 1330
۴- Mueller Hinton Broth

سپس از آنها محلول پایه به غلظت $mg.mL^{-1}$ ۶۰۰ تهیه شده و از فیلتر سرسرنگی (۰/۴۵ میکرومتر) استریل عبور داده شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره فیلتر شده به ردیف اول پلیت منتقل شده و رقت‌های سریالی به همین ترتیب در ردیف‌های دیگر نیز اجرا شدند. در آخرین ردیف، ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره و محیط کشت دور ریخته شد. در نهایت، ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی با غلظت $cfu.mL^{-1}$ 10^6 به هریک از چاهک‌ها به جز چاهک‌های شاهد اضافه شد. از آنتی بیوتیک جنتامایسین مایع به عنوان شاهد برای بررسی حساسیت سوش‌های باکتریایی استفاده شد. پلیت‌ها به مدت ۱۸ ساعت در ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شدند. در نهایت، فعالیت ضدباکتریایی از طریق ارزیابی کدورت چاهک‌ها توسط دستگاه الایزاریدر[۵] در طول موج ۶۲۰ نانومتر ارزیابی شد. با مقایسه کدورت چاهک‌های حاوی باکتری و چاهک‌های شاهد، کمترین غلظتی که در آن هیچ گونه رشدی مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)[۶] رشد باکتری در نظر گرفته شد. مقدار ۵ میکرولیتر از هر یک از چاهک‌های MIC به پلیت‌های حاوی محیط کشت مولرهینتون آگار منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شد تا تعیین شود آیا عصاره بنه زعفران خاصیت کشندگی داشته یا صرفاً مهارکننده رشد بوده است.

تجزیه و تحلیل آماری

برای طراحی آزمایش‌ها از نرم افزار دیزاین اکسپرت[۷] نسخه ۷ و برای بررسی آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS استفاده شد. یک دسته‌بندی فاکتوریل به صورت طرح کاملاً تصادفی برای این مطالعه انتخاب شد. داده‌ها با آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. در

۵- ELISA Reader
۶- Minimum inhibitory concentration
۷- Design expert

صورت معنی‌دار بودن تفاوت، مقایسه بین تک تک میانگین تیمارها با استفاده از آزمون دانکن انجام شد. بررسی‌های آماری در سطح اطمینان ۹۵ درصد (p<۰/۰۵) صورت گرفته و همه آزمون‌ها سه بار تکرار شدند.

نتایج و بحث

نتایج نشان داد که بیش از نیمی از ترکیب بنه زعفران را رطوبت تشکیل می‌دهد (۱/۰۵۲±۵۹/۰۰۰ درصد) و کربوهیدرات نیز مهمترین جزء تشکیل دهنده بنه زعفران خشک است (جدول ۱). در پژوهش‌های گذشته تغییرات محتوای قند کل محلول و پروتئین محلول بنه زعفران خشک در طول دوره خواب بررسی شده است. بر همین اساس، میزان قند کل محلول از حدود ۶ گرم در صد گرم در ماه اردیبهشت تا حدود ۱۳ گرم در صد گرم در مردادماه متفاوت است. میزان پروتئین محلول نیز از حدود ۰/۲ گرم در صد گرم بر مبنای وزن تر در اردیبهشت ماه تا حدود ۱/۲ گرم در صد گرم بر مبنای وزن تر در مردادماه متفاوت بوده است (Chrungoo & Farooq, 1985). مقدار قند محلول اندازه‌گیری شده در این پژوهش نیز در این محدوده قرار داشت. در پژوهشی دیگر مقدار رطوبت، چربی و کربوهیدرات کل بنه زعفران به ترتیب ۶/۵، ۳/۸۲ و ۷۹ درصد گزارش شده (Einafshar & Sharayei, 2020) که تطابق خوبی با نتایج بدست آمده در این پژوهش دارد.

جدول ۱- ترکیب شیمیایی پودر بنه زعفران

Table 1- Chemical composition of the saffron corm dry powder

ردیف No.	آزمون Test	نتیجه آزمون* Result (%)
1	رطوبت Humidity	10.987±0.032
2	پروتئین Protein	3.751±0.114
3	خاکستر Ash	1.723±0.013
4	چربی Fat	3.169±0.052
5	کربوهیدرات کل Total carbohydrate	79.232±2.026
6	قند محلول Soluble sugar (glucose)	9.753±1.174
7	قند احیاء Reducing sugar (glucose)	8.931±1.222

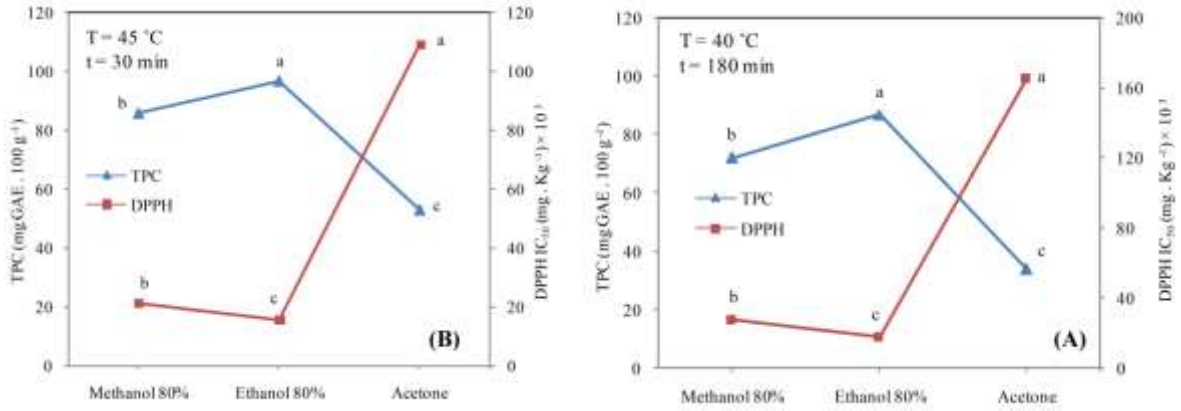
* نتایج بصورت انحراف استاندارد ± میانگین و با سه تکرار بیان شده‌اند.

* Results are mean ± standard deviation (n=3).

اثر شرایط استخراج بر مقدار ترکیبات فنولی و قدرت آنتی اکسیدانی عصاره بنه زعفران

در دو روش CSE و UAE از سه حلال متفاوت استفاده شد و نتایج نشان داد که اتانول ۸۰٪ بهترین کارآیی را در استخراج ترکیبات فنولی داشته و عصاره بدست آمده بالاترین خاصیت آنتی اکسیدانی را دارد (شکل ۱). دیگر مطالعات نیز به تأثیر قابل توجه حلال در استخراج ترکیبات فنولی اشاره نموده‌اند. به عنوان مثال محلول اتانول ۸۰٪ نشان داده که بهترین گزینه برای استخراج ترکیبات فنولی از سبوس گندم است (Verma et al., 2008). در مطالعه مشابه دیگری نیز اتانول ۸۰٪ کارایی بهتری نسبت به متانول ۸۰٪ برای استخراج ترکیبات فنولی از

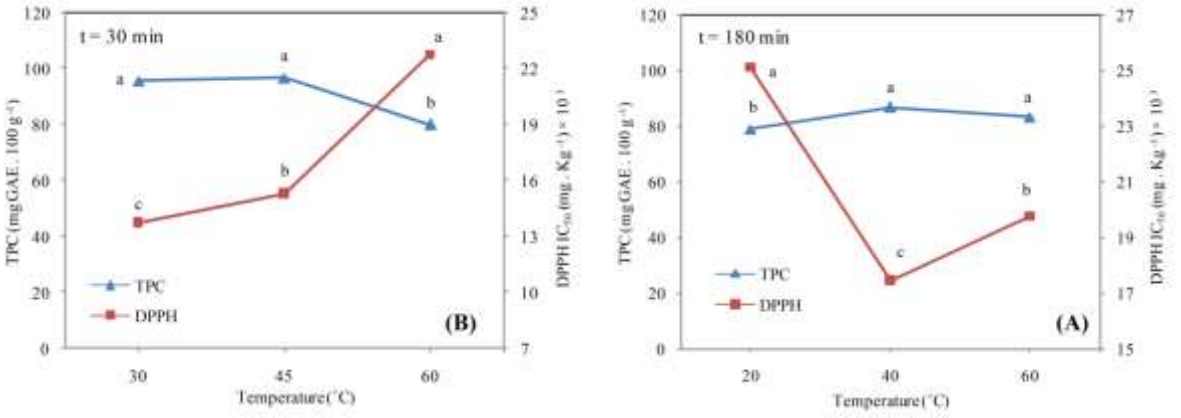
بخش‌های هـوایی گیـاه *Potentilla atrosanguinea* داشـته است (Kalia et al., 2008).



شکل ۱- تأثیر نوع حلال بر میزان ترکیبات فنولی کل و بازدارندگی رادیکال DPPH عصاره بنه زعفران در روش (A) CSE و (B) UAE (حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵٪ است).

Figure 1- The effect of solvent on the total phenolic compounds and DPPH radical scavenging activity of saffron corm extract in CSE (A) and UAE (B) method (Different letters indicate statistically significant differences (p≤ 0.05)).

دما نیز از جمله پارامترهای مهم در هر فرآیند استخراج است. افزایش دما سبب افزایش انتقال جرم از ماتریکس جامد بـه فـاز حلال می‌شود ضمن اینکه حلالیت آنالیت‌ها هم افزایش مـی‌یابـد (Galviz-Quezada et al., 2019). نتـایج نشـان داد کـه در روش CSE افزایش دما تا ۴۰°C سبب افـزایش TPC و قـدرت آنتی اکسیدانی عصاره می‌شود. در دماهای بالاتر مقـدار ترکیبـات فنولی کمی کاهش یافت (تغییرات معنی دار نیست) اما از قـدرت آنتی اکسیدانی عصاره کاسته شد (شکل ۲).



شکل ۲- تأثیر دما بر میزان ترکیبات فنولی کل و بازدارندگی رادیکال DPPH عصاره بنه زعفران در روش (A) CSE و (B) UAE (حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵٪ است)

Figure 2- The effect of temperature on the total phenolic compounds and DPPH radical scavenging activity of saffron corm extract in CSE (A) and UAE (B) method (Different letters indicate statistically significant differences (p≤ 0.05)).

در روش UAE، مقدار ترکیبات فنولی در دمای استخراج ۳۰ و ۴۵°C تفاوت معنی دار نشان نداد اما دمای بالاتر سبب کـاهش

TPC شد. بالاترین قدرت آنتی اکسیدانی عصاره بنه زعفران نیز در دمای ۳۰°C اندازه‌گیری شد. همانگونه که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، در دمای مشابه (۴۰°C) روش UAE کارایی بالاتری در استخراج ترکیبات فنولی دارد که متاثر از اثرات مکانیکی و پدیده حفره‌زایی[۱] است که در نتیجه عبور امواج فراصوت از حلال ایجاد می‌شود. این پدیده فروپاشی مواد جامد، شکست سلول‌ها، نفوذ بالاتر حلال و انتقال جرم بهتر را به دنبال دارد (Kumari et al., 2017).

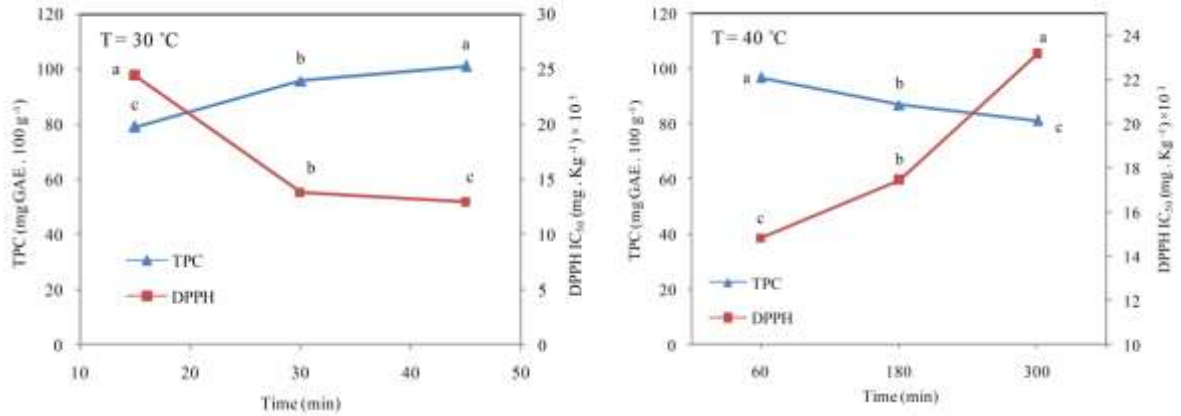
در روش CSE طولانی شدن زمان استخراج به شدت سبب کاهش TPC و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره شد (شکل ۳). زمان استخراج طولانی در این روش سبب می‌شود تا نمونه زمان بیشتری دمای بالا را تجربه نمایند و کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره بنه زعفران می‌تواند به دلیل تخریب ترکیبات شیمیایی و یا افزایش واکنش‌های جانبی در زمانی‌های استخراج طولانی‌تر و یا دماهای بالا باشد. ضمن اینکه هزینه فرآیند استخراج و مقدار مصرف انرژی را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد (Chemat et al., 2017). اما در روش UAE با افزایش زمان، کارآیی استخراج ترکیبات فنولی هم بهبود یافت. در زمان‌های استخراج کوتاه، فرصت کافی وجود ندارد تا امواج فراصوت شکست دیواره‌های سلولی را موجب شوند و لذا ماده اولیه می‌تواند بخش قابل توجهی از ترکیبات موثره را در خود نگه دارد (Galviz-Quezada et al., 2019). نسبت به استخراج با حلال معمول، روش UAE زمان‌های استخراج کوتاه‌تر و راندمان استخراج بالاتری دارد (شکل ۳).

در روش UAE فرکانس امواج فراصوت نیز از مهمترین پارامترهایی است که بر حفره‌زایی و کارآیی استخراج تأثیر دارد. با این حال در یک استخراج همیشه هدف دستیابی به راندمان استخراج بالاتر نیست و زمان کوتاه‌تر، مصرف انرژی کمتر، هزینه پایین‌تر و نیز ظرفیت آنتی اکسیدانی/آنتی باکتریال عصاره بدست آمده نیز اهمیت دارند. در این مطالعه استخراج در دو فرکانس ۳۷ و ۸۰ کیلوهرتز انجام گرفت و نتایج نشان داد که فرکانس پایین‌تر کارایی بهتری در استخراج ترکیبات فنولی دارد. مطالعات پیشین نیز این نتیجه را تایید می‌کند. بهبود راندمان استخراج در فرکانس پایین‌تر می تواند متاثر از تشکیل حباب‌های بزرگتر با تعداد کمتر در محیط باشد که در زمان متلاشی شدن انرژی بالاتری را آزاد می‌کنند و سبب تخریب بیشتر دیواره‌های سلولی می‌شوند (Chemat et al., 2017).

در روش SWE دما و زمان استخراج به عنوان دو پارامتر اصلی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که با افزایش زمان استخراج مقدار ترکیبات فنولی و خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره افزایش می‌یابد اما در زمان‌های طولانی تر از ۲۰ دقیقه، کاهش در TPC و قدرت آنتی اکسیدانی عصاره بنه زعفران مشاهده شد (شکل ۴). سایر پژوهشگران نیز نتایج مشابهی از تأثیر زمان استخراج در این روش گزارش نموده‌اند. به عنوان مثال در استخراج ترکیبات فنولی از پوست انبه مشاهده شد که با افزایش زمان تا ۶۰ دقیقه (دما ۱۸۰°C) مقدار TPC افزایش می‌یابد اما پس از آن (تا ۱۲۰ دقیقه) کاهش در مقدار ترکیبات فنولی گزارش شده که به دلیل تخریب اجزاء موثره است (Tunchaiyaphum et al., 2013).

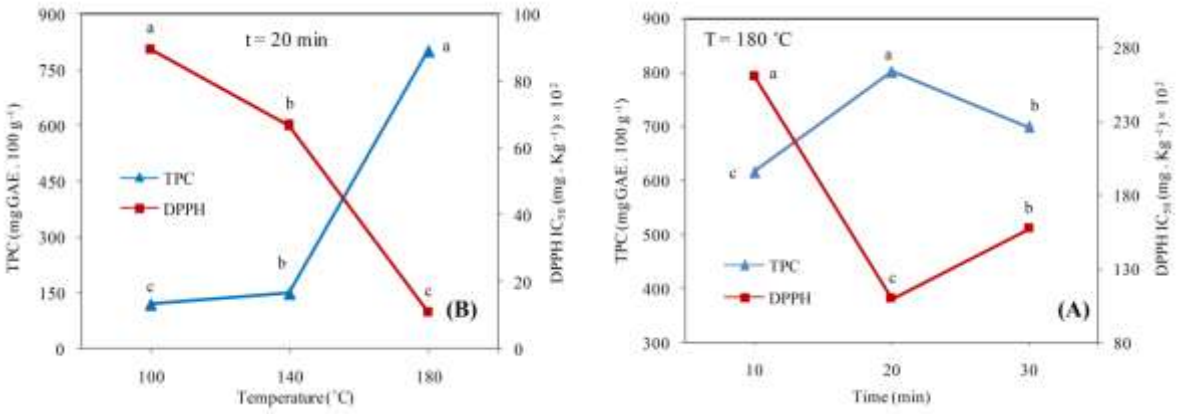
در دماهای بالا از قطبیت آب به عنوان حلال استخراج کاسته شده و قابلیت آن برای انحلال ترکیبات غیرقطبی افزایش می‌یابد. همچنین افزایش دما با کاهش ویسکوزیته و کشش سطحی حلال سبب بهبود نفوذ و انتقال جرم می‌گردد. دماهای بالا بافت گیاهی را نرم‌تر کرده و از برهمکنش‌های میان اجزاء می‌کاهد.

۱- Cavitation



شکل ۳- تأثیر زمان بر میزان ترکیبات فنولی کل و بازدارندگی رادیکال DPPH عصاره بنه زعفران در روش CSE (A) و UAE (B) (حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵٪ است)

Figure 3- The effect of time on the total phenolic compounds and DPPH radical scavenging activity of saffron corm extract in CSE (A) and UAE (B) method (Different letters indicate statistically significant differences (p≤ 0.05)).



شکل ۴- تأثیر (A) زمان و (B) دما بر میزان ترکیبات فنولی کل و بازدارندگی رادیکال DPPH عصاره بنه زعفران در روش SWE (حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵٪ است)

Figure 4- The effect of time (A) and temperature (B) on the total phenolic compounds and DPPH radical scavenging activity of saffron corm extract in SWE method (Different letters indicate statistically significant differences (p≤ 0.05)).

با این حالا دماهای خیلی بالا می‌تواند تخریب ترکیبات شیمیایی عصاره را به دنبال داشته باشد و لذا ضرورت دارد تا دمای استخراج به دقت بهینه شود (Rodríguez-Meizoso et al., 2006). در بررسی دمای استخراج، بیشترین مقدار ترکیبات فنولی و بالاترین قدرت آنتی اکسیدانی عصاره در ۱۸۰°C حاصل شد. در مطالعات مشابه دیگر نیز به کارآیی بالاتر استخراج ترکیبات فنولی در دماهای بالاتر اشاره شده است. به عنوان مثال در استخراج جلبک قهوه‌ای به روش SWE افزایش TPC با افزایش دمای استخراج از ۱۰۰ تا ۲۲۵°C مشاهده شد اما در دماهای بالاتر کاهش ترکیبات فنولی عصاره گزارش شده است (Vo Dinh et al., 2018).

خاصیت آنتی‌اکسیدانی، فنول کل و فلاونوئید کل در عصاره بنه زعفران

با توجه به نتایج بدست آمده در هر روش، پارامترهای

استخراج بهینه‌یابی شدند و در روش CSE, دمای ۴۸°C، زمان ۶۰ دقیقه و اتانول ۸۰٪، در روش UAE دمای ۳۷°C، زمان ۴۵ دقیقه، فرکانس ۳۷ کیلوهرتز و اتانول ۸۰٪ و در روش SWE نیز دمای ۱۸۰°C و زمان ۲۲ دقیقه به عنوان مقادیر بهینه انتخاب شدند. بازده استخراج، میزان فنول کل، فلاونوئید کل و خاصیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره‌های استخراج شده از بنه زعفران تحت شرایط استخراج بهینه در جدول ۲ مقایسه شده‌است.

جدول ۲- فعالیت آنتی اکسیدانی، ترکیبات فنولی کل، فلاونوئید کل و بازده استخراج بنه زعفران

Table 2- Antioxidant activity, total phenolic compounds, total flavonoid content, and extraction yield of saffron corm

روش Method	قدرت مهار رادیکال DPPH Radical scavenging power of DPPH	قدرت احیاء کنندگی آهن Ferric reducing antioxidant power	ترکیبات فنولی کل Total phenolic compounds	محتوای فلاونوئید کل Total flavonoid content	بازده استخراج Extraction yield
	DPPH IC_{50} ($mg.kg^{-1}$)	FRAP ($mmol.L^{-1}$)	TPC (mg GAE in 100 g dry saffron corm powder)	TFC (mg QE in 100 g dry saffron corm powder)	(%)
CSE	15833.79±4.82[a]	4.98±0.04[b]	89.280±0.88[c]	0.912±0.001[c]	17.763±0.01[c]
UAE	12403.2±18.21[b]	6.11±.01[b]	100.396±0.58[b]	1.558±0.001[b]	18.216±0.04[b]
SWE	1132.29±1530[c]	58.60±4.56[a]	807.624±6.49[a]	12.221±0.008[a]	43.420±0.18[a]

* استخراج با حلال (CSE)، استخراج با امواج فراصوت (UAE)، استخراج با آب مادون بحرانی (SEW)

* نتایج بصورت انحراف استاندارد ± میانگین و با سه تکرار بیان شده‌اند.

* حروف متفاوت نشان دهنده این است که تفاوت در سطح اطمینان ۹۵٪ معنی‌دار است.

* Conventional solvent extraction (CSE), Ultrasound-assisted extraction (UAE), Subcritical water extraction (SWE).

* Results are mean ± standard deviation (n=3).

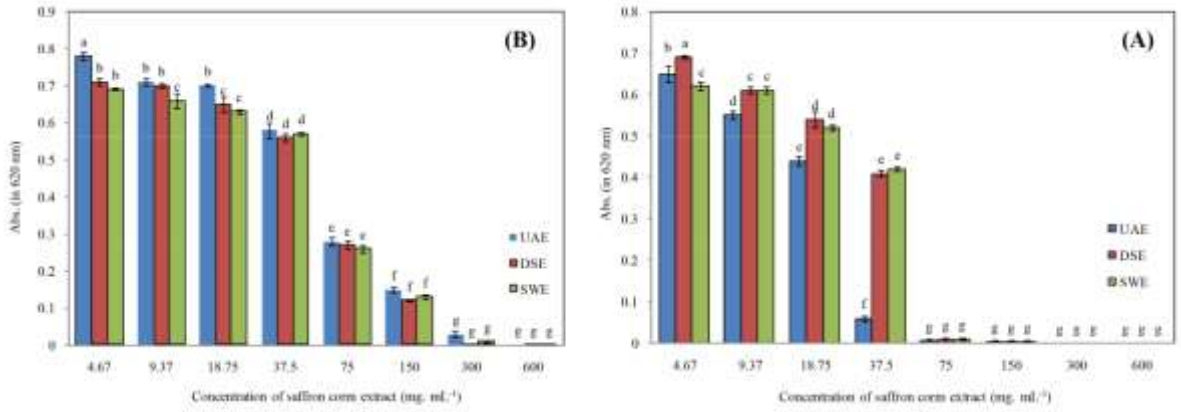
* Different letters in columns indicate statistically significant differences ($p \leq 0.05$).

داده‌های جدول (۲) نشان می‌دهد که بالاترین میزان فنول و فلاونوئید کل متعلق به عصاره استخراج شده به روش آب مادون بحرانی است و عصاره‌های بدست آمده در روش‌های UAE و CSE در رتبه‌های بعد قرار دارند. از نظر خاصیت آنتی‌اکسیدانی نیز عصاره تهیه شده با روش SWE بالاترین خاصیت آنتی-اکسیدانی را نشان داد. کوتاه‌ترین زمان و بیشترین میزان بازده استخراج مربوط به روش استخراج با آب مادون بحرانی است. در این روش زمان استخراج نسبت به دو روش دیگر به حدود یک سوم کاهش یافته و بازده استخراج بیش از دو برابر افزایش می‌یابد. همچنین در صورت استفاده از امواج فراصوت نسبت به روش استخراج حلالی متداول، زمان و دمای استخراج کمتر و بازده استخراج بیشتر می‌شود. سایر پژوهشگران نیز به بازده بالاتر در استخراج با روش فراصوت اشاره نموده‌اند (Rajaei et al., 2010; Bashi et al., 2012). امواج فراصوت از طریق ایجاد تخلخل و منافذ در دیواره سلول‌ها به جذب حلال و نیز انتقال ترکیبات موثره از بافت به حلال کمک کرده و انتقال جرم را تسریع می‌کنند (Vinatoru, 2001). نتایج سایر پژوهش‌ها نیز نشان دادند که استخراج با آب مادون بحرانی در دمای ۱۹۰°C موجب افزایش ۱۱/۷۷ برابری بازده استخراج فنول کل و افزایش ۱۲/۲۱ برابری بازده استخراج فلاونوئید نسبت به استخراج با آب یا اتانول در دمای ۸۰°C از سبوس برنج سیاه می‌گردد (Cheigh et al., 2010). همانطور که پیش از این نیز بیان شد، در شرایط مادون بحرانی، دماهای بالاتر موجب کاهش قطبیت آب می‌شود؛ بدین ترتیب ترکیبات غیرقطبی نیز می‌توانند در آب حل شوند (García-Marino et al., 2006).

بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره به روش ریزرقت سازی

شکل‌های ۵ و ۶ به ترتیب نتایج تأثیر ضدمیکروبی عصاره‌های استخراج شده از بنه زعفران و کشت نقطه‌ای این عصاره‌ها بر روی محیط کشت مولرهینتون آگار را نشان می‌دهد.

تجزیه و تحلیل آماری مشخص کرد که هر سه نوع عصاره اثر ضدباکتریایی بر روی هر دو سوش باکتریایی دارند. همانطور که در شکل (۵) مشخص است، میزان سیگنال جذب در ۶۲۰ نانومتر با کاهش غلظت عصاره افزایش یافت که به معنای افزایش کدورت و رشد بیشتر باکتری می‌باشد. این امر نشان می‌دهد که بازدارندگی عصاره وابسته به غلظت است. برای هر سه عصاره بهینه، مقدار جذب اندازه‌گیری شده در غلظت‌های ۷۵، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ $mg.mL^{-1}$ برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* حدود صفر است ($p<0/05$) اما در مورد باکتری *اشریشیاکلی* تنها در غلظت‌های ۳۰۰ و ۶۰۰ $mg.mL^{-1}$ مقدار جذب صفر مشاهده شد. کشت نقطه‌ای غلظت‌های مختلف عصاره استخراج شده به روش CSE حاوی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که در غلظت‌های ۳۰۰ و ۶۰۰ $mg.mL^{-1}$ از عصاره هیچ باکتری زنده نمانده است.



شکل ۵- اثر ضدباکتریایی عصاره بنه زعفران روی باکتری (A) *استافیلوکوکوس اورئوس* و (B) *اشریشیاکلی* به روش ریزرقت‌سازی (حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵٪ است)

Figure 5- The antibacterial effect of saffron corm extract on the (A) *Staphylococcus aureus* and (B) *Escherichia coli* assayed by the microdilution method (Different letters indicate statistically significant differences ($p\leq 0.05$)).

شکل ۶- کشت نقطه‌ای حاوی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (S) و *اشریشیاکلی* (E) بر روی محیط کشت مولرهینتون آگار در غلظت های ۶۰۰ (A)، ۳۰۰ (B)، ۱۵۰ (C) و ۷۵ (D) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره بنه زعفران

(a) استخراج با حلال متداول (b) استخراج به کمک امواج فراصوت و (c) استخراج با آب مادون بحرانی

Figure 6- The microbial culture of *Staphylococcus aureus* (S) and *Escherichia coli* (E) on the Mueller Hinton agar at 600 (A), 300 (B), 150 (C), and 75 (D) $mg.mL^{-1}$ of the saffron corm extract.

Conventional solvent extraction (a), ultrasound-assisted solvent extraction (b), and subcritical water extraction (c).

یعنی ۳۰۰ $mg.mL^{-1}$ را می‌توان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفت. در غلظت های ۷۵ و ۱۵۰ $mg.mL^{-1}$ تعدادی کلنی

جدا از هم مشاهده شد و به همین دلیل غلظت $mg.mL^{-1}$ ۷۵ را می‌توان غلظت مهارکنندگی رشد در نظر گرفت (شکل ۶). در غلظت‌های کمتر از عصاره، باکتری‌ها رشد کامل را نشان دادند. در مورد باکتری *اشریشیاکلی* نیز غلظت‌های ۶۰۰ و $mg.mL^{-1}$ ۳۰۰ به ترتیب حداقل غلظت کشندگی و حداقل غلظت مهارکنندگی رشد می‌باشد.

علت حساسیت بیشتر سوش‌های گرم مثبت نسبت به سوش‌های گرم منفی به تفاوت در ساختار دیواره سلولی آنها مربوط می‌شود. دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی با یک لایه خارجی پوشیده شده که از نفوذ ترکیبات ضدمیکروبی به دیواره جلوگیری می‌کند (Safdar et al., 2017). اثر ضدمیکروبی عصاره‌های گیاهی عمدتا به حضور پلی‌فنول‌ها نسبت داده می‌شود به طوری که با افزایش میزان پلی‌فنول‌ها در عصاره فعالیت ضدمیکروبی افزایش می‌یابد (Sanhueza et al., 2014). همچنین اثر ضدمیکروبی آنها به نوع پلی‌فنول از قبیل اسیدهای فنولی، فلاونوئیدها و تانن‌ها بستگی دارد. فعالیت ضدمیکروبی تحت تأثیر موقعیت و تعداد گروه‌های هیدروکسیل نیز قرار می‌گیرد چرا که این گروه‌ها می‌توانند با دیواره سلولی باکتریایی برهم‌کنش کرده و با ایجاد اختلال در ساختار آن موجب نشت ترکیبات سلولی شوند (Xue et al., 2013).

در پژوهشی اثر ضدقارچی عصاره بخش داخلی و خارجی بنه زعفران و همچنین ساپونین استخراج شده از آن مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج نشان داده حداقل غلظت مهارکنندگی پس از ۳۰ روز در تیمار عصاره بخش بیرونی بنه برای *Aspergillus niger* برابر با ۵/۴ درصد، برای *Bipolaris spicifera*، *Fusarium oxysporum* و *Penicillium raistriicki* برابر با ۳/۹ درصد و در مقابل *Rhizopus nigricans* برابر با ۲/۳ درصد بود. بخش داخلی بنه در برابر *Aspergillus niger* و *Bipolaris spicifera* هیچگونه فعالیت مهارکنندگی نشان نداد و موجب مهار ۷ درصدی *Fusarium oxysporum* و *Penicillium raistriicki* و همچنین مهار ۳/۹ درصدی در مقابل *Rhizopus nigricans* شد. مخلوط ساپونین‌های تری‌ترپینوئید در غلظت $mg.mL^{-1}$ ۱۰۰ موجب مهار ۱۰۰درصدی تمام قارچ‌های مورد بررسی شد. این ترکیب در غلظت‌های کمتر، بیشترین تأثیر را بر *F. oxysporum* نشان داد. سمیت بالاتر پوست نسبت به قارچ به تأثیر ساپونین‌های بنه که بیشتر در بخش خارجی آن تجمع یافته‌اند، نسبت داده می شود البته گزارش شده که نقش ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها در بروز اثرات ضدقارچی را نیز نمی‌توان نادیده گرفت (Rubio-Moraga et al., 2013).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه مشخص شد که بنه‌های زعفران (با وزن کمتر از ۵ گرم) منبع ترکیبات فنولی دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی هستند. روش استخراج تأثیر مهمی بر میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره و بازده استخراج داشت. در استخراج با آب مادون بحرانی بازده استخراج بیش از دو برابر نسبت به دو روش دیگر افزایش یافت. میزان فلاونوئید کل در عصاره بهینه استخراج شده به روش آب مادون بحرانی نیز حدود ۱۲ برابر دو روش دیگر بود. با توجه به استفاده از آب به عنوان حلال، روش SWE یک روش سبز و دوست‌دار محیط زیست است و در مقایسه با دو روش دیگر سریع‌تر است. مطابق با نتایج آزمون میکروبی به روش ریزرقت‌سازی، غلظت $mg.mL^{-1}$ ۳۰۰ هر سه عصاره بهینه حداقل غلظت مهارکنندگی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بود. حداقل غلظت مهارکنندگی باکتری *اشریشیاکلی* در هر سه عصاره بهینه $mg.mL^{-1}$ ۶۰۰ بود.

منابع

Ahmadian-Kouchaksaraie, Z., Niazmand, R., and Najaf Najafi, M. 2016. Optimization of the subcritical water extraction of phenolic antioxidants from *Crocus sativus* petals of saffron industry residues: Box-Behnken design and principal component analysis. Innovative Food Science and Emerging Technologies 36: 234-244.

AOAC, 2000. Official methods of analysis. Method 990.20, Determination of solids by direct forced air oven drying method. The association of official analytical chemists (AOAC), Washington, DC.

Bagri, J., Yadav, A., Anwar, K., Dkhar, J., and Pareek, A. 2017. Metabolic shift in sugars and amino acids regulates sprouting in Saffron corm. Scientific Reports 7: 1-10.

Bashi, D.S., Mortazavi, S.A., Rezaei, K., Rajaei, A., and Karimkhani, M.M. 2012. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from yarrow (*Achillea beibrestinii*) by response surface methodology. Food Science and Biotechnology 21: 1005-1011.

Cheigh, C., Chung, E., Ko, M., Cho, S., Chang, P., Park, Y., Lee, K., Paik, H., Kim, K., and Hong, S. 2010. Effect of subcritical water for the enhanced extraction efficiency of polyphenols and flavonoids from black rice bran. Food Engineering Progress 14: 335-341.

Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.S., and Abert-Vian, M. 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. Ultrasonics Sonochemistry 34: 540-560.

Chrungoo, N.K., and Farooq, S. 1985. Correlative changes in carbohydrate content and starch hydrolysing enzymes in corms of saffron crocus (*Crocus sativus* L.) during dormancy and sprouting. Biochemie und Physiologie der Pflanzen 180: 55-61.

D'Agostino, N., Pizzichini, D., Chiusano, M.L., and Giuliano, G. 2007. An EST database from saffron stigmas. BMC Plant Biology 7: 1-8.

Einafshar, S., and Sharayei, P. 2020. The effects of extraction conditions on bioactive compounds of saffron corm extract. Saffron Agronomy and Technology 8: 89-98. (In Persian with English Summary).

Enayati, N., Ghafarzadegan, R., Hajiaghaee, R., and Vazirian, M. 2017. Comparison of different methods in sennoside extraction from *Senna alexandrina*. Journal of Medicinal Plants 4: 160-169. (In Persian with English Summary).

Fu, L., Xu, B.T., Xu, X.R., Gan, R.Y., Zhang, Y., Xia, E.Q., and Li, H.B. 2011. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. Food Chemistry 129: 345-350.

Gabaldón-Leyva, C.A., Quintero-Ramos, A., Barnard, J., Balandrán-Quintana, R.R., Talamás-Abbud, R., and Jiménez-Castro, J. 2007. Effect of ultrasound on the mass transfer and physical changes in brine bell pepper at different temperatures. Journal of Food Engineering 81: 374-379.

Galviz-Quezada, A., Ochoa-Aristizábal, A.M., Arias Zabala, M.E., Ochoa, S., and Osorio-Tobón, J.F. 2019. Valorization of iraca (*Carludovica palmata, Ruiz & Pav.*) infructescence by ultrasound-assisted extraction: An economic evaluation. Food and Bioproducts Processing 118: 91-102.

García-Marino, M., Rivas-Gonzalo, J.C., Ibáñez, E., García-Moreno, C. 2006. Recovery of

catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction. Analytica Chimica Acta 563: 44-50.

Ghorbani, M. 2008. The Efficiency of saffron's marketing channel in Iran. World Applied Sciences Journal 4: 523-527.

Gong, Y., Zhang, X., He, L., Yan, Q., Yuan, F., and Gao, Y. 2015. Optimization of subcritical water extraction parameters of antioxidant polyphenols from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) seed residue. Journal of Food Science and Technology 52: 1534-1542.

Gresta, F., Lombardo, G.M., Siracusa, L., and Ruberto, G. 2008. Effect of mother corm dimension and sowing time on stigma yield, daughter corms and qualitative aspects of saffron (*Crocus sativus* L.) in a mediterranean environment. Journal of the Science of Food and Agriculture 88: 1144-1150.

Gusakov, A.V., Kondratyeva, E.G., and Sinitsyn, A.P. 2011. Comparison of two methods for assaying reducing sugars in the determination of carbohydrase activities. International Journal of Analytical Chemistry 2011: 283658-283658.

Jain, V.M., Karibasappa, G.N., Dodamani, A.S., and Mali, G.V. 2017. Estimating the carbohydrate content of various forms of tobacco by phenol-sulfuric acid method. Journal of Education and Health Promotion 6: 1-6.

Jalali-Heravi, M., Parastar, H., and Ebrahimi-Najafabadi, H. 2009. Characterization of volatile components of Iranian saffron using factorial-based response surface modeling of ultrasonic extraction combined with gas chromatography–mass spectrometry analysis. Journal of Chromatography A 1216: 6088-6097.

Kalia, K., Sharma, K., Singh, H.P., and Singh, B. 2008. Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla atrosanguinea* lodd. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56: 10129-10134.

Kumari, B., Tiwari, B.K., Hossain, M.B., Rai, D.K., and Brunton, N.P. 2017. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from potato peels: profiling and kinetic modelling. International Journal of Food Science and Technology 52: 1432-1439.

Lage, M., and Cantrell, C.L. 2009. Quantification of saffron (*Crocus sativus* L.) metabolites crocins, picrocrocin and safranal for quality determination of the spice grown under different environmental Moroccan conditions. Scientia Horticulturae 121: 366-373.

Lin, J.Y., and Tang, C.Y. 2007. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. Food Chemistry 101: 140-147.

Luque-Garcia, J., and Castro, M. 2003. Where is microwave-based analytical equipment for solid sample pretreatment going? TrAC Trends in Analytical Chemistry 22: 90-98.

Magomya, A., Kubmarawa, D., Ndahi, J.A., and Yebpella, G.G. 2014. Determination of plant proteins via the Kjeldahl method and amino acid analysis: A comparative study. International Journal of Scientific and Technology Research 3: 68-72.

Rajaei, A., Barzegar, M., Hamidi Esfahani, Z., and Sahari, M.A. 2010. Optimization of extraction conditions of phenolic compounds from pistachio (*Pistachia vera*) green hull through response surface method. Journal of Agricultural Science and Technology 12: 605-615.

Rodríguez-Meizoso, I., Marin, F.R., Herrero, M., Señorans, F.J., Reglero, G., Cifuentes, A., and Ibáñez, E. 2006. Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano. Chemical and functional characterization. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 41: 1560-1565.

Rubio-Moraga, Á., Gómez-Gómez, L., Trapero, A ,.Castro-Díaz, N., and Ahrazem, O. 2013. Saffron corm as a natural source of fungicides: The role of saponins in the underground. Industrial Crops and Products 49: 915-921.

Saeidirad, M.H., Sharayei, P., and Zarifneshat, S. 2016. Effect of packing, storage temperature and period on mechanical and physical properties and saffron (*Crocus sativus L.*) corms waste. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 32: 14-22. (In Persian with English Summary).

Safdar, M.N., Kausar, T., Jabbar, S., Mumtaz, A., Ahad, K., and Saddozai, A.A. 2017. Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulate* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. Journal of Food and Drug Analysis 25: 488-500.

Sánchez-Vioque, R., Rodríguez-Conde, M.F., Reina-Ureña, J.V., Escolano-Tercero, M.A., Herraiz-Peñalver, D., and Santana-Méridas, O. 2012. In vitro antioxidant and metal chelating properties of corm, tepal and leaf from saffron (*Crocus sativus* L.). Industrial Crops and Products 39: 149-153.

Sanhueza, L., Tello, M., Marcela, V., Mendoza, L., and Wilkens, M. 2014. Relation between antibacterial activity against food transmitted pathogens and total phenolic compounds in grape pomace extracts from cabernet sauvignon and syrah varieties. Advances in Microbiology 4: 225-232.

Srivastava, R., Ahmed, H., Dixit, R.K., and Saraf, S.A. 2010. *Crocus sativus* L.: A comprehensive review. Pharmacognosy Reviews 4: 200-208.

Tunchaiyaphum, S., Eshtiaghi, M., and Yoswathana, N. 2013. Extraction of bioactive compounds from mango peels using green technology. International Journal of Chemical Engineering and Applications 4: 194-198.

Verma, B., Hucl, P., and Chibbar, R.N. 2008. Phenolic content and antioxidant properties of bran in 51 wheat cultivars. Cereal Chemistry 85: 544-549.

Vinatoru, M. 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. Ultrasonics Sonochemistry 8: 303-313.

Vo Dinh, T., Saravana, P.S., Woo, H.C., and Chun, B.S. 2018. Ionic liquid-assisted subcritical water enhances the extraction of phenolics from brown seaweed and its antioxidant activity. Separation and Purification Technology 196: 287-299.

Xue, J., Davidson, P.M., and Zhong, Q. 2013. Thymol nanoemulsified by whey protein-maltodextrin conjugates: the enhanced emulsifying capacity and antilisterial properties in milk by propylene glycol. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61: 12720-12726.

Zeković, Z., Kaplan, M., Pavlić, B., Olgun, E.O., Vladić, J., Canlı, O., and Vidović, S. 2016. Chemical characterization of polyphenols and volatile fraction of coriander (*Coriandrum sativum* L.) extracts obtained by subcritical water extraction. Industrial Crops and Products 87: 54-63.

Evaluation of Different Extraction Methods on the Antioxidant and Ntibacterial Properties of the Saffron Corm Extract

Mozhgan Esmaeelian[1], Javad Feizy[2], Moslem Jahani[3] and Soodabeh Einafshar[4]*

Submitted: 19 May 2020 **Accepted:** 27 December 2020

Esmaeelian, M., Feizy, J., Jahani, M., and Einafshar, S. 1400. Evaluation of Different Extraction Methods on the Antioxidant and Ntibacterial Properties of the Saffron Corm Extract. Saffron Agronomy & Technology, 9(3): 269-284.

Abstract

In the present study, the conventional solvent extraction (CSE) was compared with ultrasound-assisted extraction (UAE) and subcritical water extraction (SWE) methods for the extraction of bioactive constituents from *Crocus sativus* corms. The response surface methodology (RSM) based on a central composite face-centred design (CCD) was used to optimize the extraction parameters. The optimum conditions of extraction were estimated to be ethanol 80%, 48˚C and 60 min in CSE, ethanol 80%, 37˚C, 45 min, and 37 kHz in the UAE, and 180˚C and 22 min in SWE. The subcritical water extraction showed the maximum extraction yield, and the highest value of total phenolic compounds (807.6 mg gallic acid equivalent in 100 g saffron corm) and total flavonoid (12.2 mg Quercetin equivalent in 100 g saffron corm) was determined in the SWE extract. The phenolic and flavonoid content of the SWE extract is 8 and 12 times higher than the other two methods, respectively. CSE and SWE extracts also showed the least and the highest antioxidant activities, respectively. The antibacterial activity of the optimized extracts was evaluated by the microdilution method. The results showed the minimum bactericidal concentrations of 300 and 600 mg mL^{-1} against Staphylococcus aureus and Escherichia coli bacteria, respectively.

Keywords: Flavonoid content; Solvent extraction; Ultrasound; Sub-critical water

1 - PhD candidate, Department of Food Chemistry, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran
2 - Assistant professor, Department of food safety and quality control, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran
3 - Assistant professor, Department of Food Chemistry, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran
4 - Assistant professor, Agricultural Engineering Research Department, Khorasan Razavi, Agricultural and Natural Resourses Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran.
(*-Corresponding author. Email: m.jahani@rifst.ac.ir)
Doi: 10.22048/jsat.2021.231960.1396