Saffron Agronomy & Technology
Vol. 7, No. 4, Winter 2020, P. 425-439

نشریه زراعت و فناوری زعفران
جلد ۷، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۸ ص. ۴۳۹-۴۲۵

بررسی اثر پلاسمای سرد بر ویژگی‌های میکروبی و شیمیایی زعفران

مریم اکبریان[۱]، فخری شهیدی[۲]*، محمد جواد وریدی[۳]، آرش کوچکی[۲] و سحر روشنک[۴]

تاریخ دریافت: ۸ دی ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: ۲٤ اردیبهشت ۱۳۹۸

اکبریان، م.، شهیدی، ف.، وریدی، م.ج.، کوچکی، آ.، و روشنک، س. ۱۳۹۸. بررسی اثر پلاسمای سرد بر ویژگی‌های میکروبی و شیمیایی زعفران. زراعت و فناوری زعفران، ۷(۴): ۴۳۹-۴۲۵.

چکیده

زعفران گران‌ترین محصول کشاورزی جهان می‌باشد و ایران بزرگترین تولیدکننده زعفران در جهان است، آلوده‌شدن زعفران در مراحل مختلف فرایند تولید، علاوه بر کاهش کیفیت منجر به کاهش اعتبار در بازار جهانی و صادرات می‌شود. لذا انتخاب یک روش مناسب جهت غیرفعال‌سازی فلور میکروبی زعفران ضرورت دارد. در بین روش‌های مختلفی که برای غیرفعال کردن میکروب‌ها استفاده می‌شوند، پلاسمای سرد به علت وجود مزایای بالقوه بی‌شمار از قبیل طبیعت غیرسمی، هزینه‌های عملیاتی پایین، کاهش قابل توجه مصرف آب طی فرایندهای ضد عفونی، و امکان کاربرد آن برای محصولات غذایی متنوع، توجه زیادی را به خود جلب کرده است. پلاسما حالتی از گاز یونیزه شده شامل یون‌ها، الکترون، اشعه ماورابنفش و گونه‌های واکنش مانند رادیکال‌ها، اتم‌ها و مولکول‌های بر انگیخته است که قادر به غیرفعال‌سازی میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. در این پژوهش پلاسمای سرد با استفاده از دو نوع گاز شامل نیتروژن و هوا تولید و اثر تابش پلاسما در مدت زمان های صفر، ۳، ۶، ۹ و ۱۲ دقیقه بر ویژگی‌های شیمیایی و میکروبی (باکتری *اشرشیاکلی*، *انتروکوکوس فکالیس*، کپک و مخمر) زعفران بررسی گردید. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد اثر میکروب کشی پلاسمای نیتروژن نسبت به پلاسما هوا کمتر بوده و با افزایش زمان تابش پلاسما میزان غیرفعال سازی میکروارگانیسم‌ها افزایش یافت. حداکثر کاهش بار میکروبی در زمان ۱۲ دقیقه در ولتاژ ۱۸ کیلوولت مشاهده شد و جمعیت باکتری *اشرشیاکلی*، *انتروکوکوس فکالیس*، کپک و مخمر به ترتیب به میزان ۲/۶۹، ۲/۴۸، ۱/۹۵ سیکل لگاریتمی کاهش یافت. نتایج همچنین نشان داد که افزایش زمان تابش پلاسما، میزان کروسین، پیکروکروسین و سافرانال را به طور معنی‌دار ($p<0/05$) کاهش داد. میزان کاهش کروسین، سافرانال و پیکروکروسین در زمان ۱۲ دقیقه به ترتیب ۶/۰۱، ۴/۰۴، ۵/۴۴ درصد بود.

کلمات کلیدی: آلودگی میکروبی زعفران، پلاسمای سرد، پیکروکروسین، سافرانال، کروسین.

۱ – دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲ - استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳ – دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۴ – دانشجوی دکتری گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*-نویسنده مسئول: fshahidi@um.ac.ir)

DOI: 10.22048/jsat.2019.112244.1276

مقدمه

گیاه زعفران با نام علمی (*Crocus sativus* L.) به عنوان ادویه به طور گسترده ای در جهان استفاده می شود. بر اساس پژوهش‌های انجام شده زعفران دارای خواص درمانی فراوان از جمله خاصیت ضد تشنج، ضد افسردگی، ضد التهاب، ضد تومور، کاهش کلسترول و سلامت قلب و عروق می‌باشد (Rodriguez-Ruiz et al., 2016). نام زعفران مشتق شده از کلمه عربی زرد منعکس کننده غلظت بالای رنگدانه‌های کارتینوئیدی است (Melnyk et al., 2010). سه ترکیب اصلی فعال شناخته شده در زعفران کروسین، پیکروکروسین و سافرانال هستند (Rajabi et al., 2015). ترکیبات شیمیایی زعفران‌های مناطق مختلف تابع شرایط اقلیمی است (Melnyk et al., 2010). زعفران گیاهی است که در مناطق خشک و نیمه خشک مانند استان‌های خراسان شمالی، فارس، کرمان و یزد کشت می‌شود. با توجه به آب و هوای ایران، که آب در آن یک عامل محدود کننده در توسعه کشاورزی است، کشت زعفران می‌تواند یک مزیت باشد. تقریباً ۱۰۰ هزار خانواده در کاشت و برداشت زعفران در ایران دخیل هستند (Aghdaie et al., 2015). زعفران از نظر صادرات غیرنفتی ایران بسیار حائز اهمیت است و در میان گیاهان با توجه به مزایای شغلی و سودآوری آن بسیار مورد توجه قرار گرفته است. زعفران یکی از رایج‌ترین و مهم‌ترین ادویه‌های مصرفی در صنایع غذایی می‌باشد. اغلب به فرم پودر برای بهبود رنگ، عطر و طعم غذا استفاده می‌شود. با وجود گران بودن، مصرف آن در صنایع دارویی در حال توسعه است. تولید سالانه زعفران در جهان۱۹۰ تن می‌باشد که ۹۰ درصد از آن مربوط به ایران است (Jafari et al., 2018). اگر چه ایران بزرگترین تولید کننده زعفران در جهان است، ولی مشکلات زیادی در صادرات این گیاه با ارزش وجود دارد (Aghdaie et al., 2015).

در کدکس مواد غذایی زعفران به عنوان ادویه تعریف شده است، زعفران مانند سایر ادویه‌ها و گیاهان یک محصول کشاورزی است که به دلیل تماس مستقیم با خاک در معرض آلودگی میکروبی متناسب با فلور طبیعی آب و خاک می‌باشد. علاوه بر این باکتری‌های بیماری‌زا از طریق کارگران به زعفران منتقل می‌شود. اگر چه پس از خشک کردن زعفران به علت کاهش رطوبت، رشد میکروارگانیسم‌ها کاهش می‌یابد. با توجه به اینکه هنوز خشک‌کن‌های صنعتی در مناطق روستایی وارد نشده است (Ghoddusi & Glatz, 2003) و زعفران در ایران به روش سنتی و در شرایط محیط خشک می‌گردد، که این امر سبب می‌شود زعفران در این مرحله هم در معرض آلودگی میکروبی باشد (Torki-Harchegani et al., 2017). عاطفی و همکاران (Atefi et al., 2004) در بررسی اثر خشک کردن بر بار میکروبی زعفران نشان داد تعداد کلی فرم شمارش شده در نمونه کلاله تازه چندین برابر حد استاندارد بود که پس از خشک کردن به روش‌های مختلف کاهش یافته اما هنوز از حد استاندارد بالاتر بود. همچنین تعداد کپک و مخمر در خشک کردن سنتی افزایش یافت. آلوده شدن زعفران در مراحل مختلف برداشت، جمع آوری، انتقال و خشک کردن علاوه بر کاهش کیفیت منجر به کاهش اعتبار در بازار جهانی و صادرات می‌شود، لذا انتخاب یک روش مناسب جهت کاهش یا حذف آلودگی‌ها ضرورت دارد (Jouki et al., 2011). استفاده از روش‌های حرارتی جهت غیرفعال سازی فلور میکروبی زعفران به دلیل اثر بر رنگ، طعم و عطر زعفران پیشنهاد نمی‌شود. روش‌های میکروب‌زدایی غیر حرارتی مانند اشعه گاما و فومیگاسون با اکسیداتیلن می تواند در غیرفعال‌سازی فلور میکروبی زعفران مفید باشد. اگر چه اخیرا کاهش گلیکوزیدهای زعفران و تخریب رنگدانه‌های زعفران در

طی میکروب زدایی با اشعه گاما گزارش شـده اسـت (Gohari et al., 2013). همچنین استفاده از اکسید اتیلن در اتحادیه اروپـا با توجه به اثر سرطان زایی آن ممنوع می‌باشد. با توجه به معایب مذکور، یک فرایند جایگزین لازم اسـت (Hertwig et al., 2015).

خطرات مرتبط بـا انتقـال میکروارگانیسـم‌هـای بیمـاری‌زای ناشی از مواد غذایی، به یـک مسـئله نگـران کننـده جهـانی در صنایع غذایی، تبدیل شده است. در سال ۲۰۱۱، اتحادیه اروپا بـه تنهایی در مجموع ۵۶۴۸ شـیوع بیمـاری ناشـی از مـواد غـذایی گزارش کرده است که از ۶۹۵۵۳ مورد، ۷۱۲۵ مورد بـه بسـتری شدن در بیمارستان، و ۹۳ مورد منجر به مـرگ شـده‌انـد. شـیوع بیماری‌های مرتبط با شرایط بهداشتی، که با مصرف محصـولات غذایی در ارتباط هستند، نیازمند تحقیق و پژوهش برای دستیابی به تکنیک‌های آلودگی‌زدایـی کارآمـدتـر مـی‌باشـد (Jayasena et al., 2015).

در بین روش‌های میکروب‌زدایی غیر حرارتی، پلاسمای سرد به علت وجود مزایای بالقوه بـی‌شـمار ماننـد طبیعـت غیرسـمی، هزینه‌های عملیاتی پایین، کاهش قابل توجـه مصـرف آب طـی فرایندهای ضد عفونی، و امکان استفاده آن برای طیف وسیعی از محصولات غذایی، توجه زیـادی را بـه خـود جلـب کـرده اسـت (Korachi et al., 2010). پلاسـما توسـط اعمـال میـدان الکتریکی به یک گاز خنثی تولید می‌شود و حالتی از گـاز یـونیزه شده شامل یـون‌هـا، الکتـرون، اشـعه مـاورابنفش و گونـه‌هـای واکنش‌گر مانند رادیکال‌ها، اتم‌ها و مولکول‌های بر انگیخته است که قادر به غیرفعال سازی میکروارگانیسم‌ها می‌باشند (Calvo et al., 2016). گونه‌های واکنش‌گـر تولیـد شـده اهـداف سـلولی متعددی را مورد حمله قرار می‌دهند که پلاسمای سـرد را جهـت میکروب‌زدایی بسیار مـؤثر مـی‌سـازد (Mogul et al., 2003). مطالعات زیادی با هدف بررسی خاصیت ضدمیکروبی پلاسـمای سرد و پتانسیل کـاربرد آن در صـنایع غـذایی، دارویـی، زیسـت پزشکی انجام شده است.

اخیرا پلاسمای سرد در فشار اتمسفر به عنـوان ضـد عفـونی کننده مواد غذایی مورد توجه قـرار گرفتـه اسـت (Misra et al., 2011). از مزایای این روش نسـبت بـه سـایر روش‌هـا جهـت غیرفعال سازی میکروارگانیسم‌های زعفران مـی‌تـوان بـه انجـام فرایند در دمای پایین و عملیات در زمان کوتاه‌تر نسبت به سـایر روش‌ها اشاره نمود (Min et al., 2017). عوامل مؤثر بر فعالیت ضد میکروبی پلاسما توسط نـوع منبـع پلاسـما و ویژگـی‌هـای پلاسما تعیین می‌شوند، که این ویژگی‌ها بسته بـه پـارامترهـای پلاسما، منجر به نتـایج مختلـف در میکـروب‌زدایـی مـی‌شـوند. پارامترهای مختلف پلاسما شامل ولتاژ مورد اسـتفاده، چگـونگی قرار گرفتن در معرض پلاسما، نوع گـاز، زمـان تیمـار و رطوبـت نسبی بر انواع گونه‌های واکنش‌گر تولید شده طی فرایند پلاسما، مؤثر هستند (Deng et al., 2006). حضور گونه‌های واکنش‌گر نیتـروژن و اکسـیژن در پلاسـما سـبب اکسیداسـیون لیپیـدهای غشـایی، و اکسیداسـیون اسـیدهای آمینـه و نوکلئیـک اسـید میکروارگانیسم‌ها می‌شود کـه ایـن امـر سـبب غیرفعـال‌سـازی میکروارگانیسم‌ها مـی‌گـردد (Tappi et al., 2016). همچنـین اشعه ماوراءبنفش سبب آسیب به تیمین و سیتوزین رشته DNA می‌شود که این امر مانع از تکثیر و همانندسازی باکتری‌ها مـی‌شود (Liao et al., 2017).

غیرفعال کردن میکروارگانیسم‌هـا توسـط روش‌هـای غیـر-حرارتی مانند ازون و اشعه ماوراءبنفش بـه ۶۰-۲۰ دقیقـه زمـان نیاز دارد. در حالی که ترکیب ازون و اشعه ماوراءبنفش موجود در پلاسما به طور قابل توجهی اثر گـذاری بیشـتری در غیـرفعـال-سازی میکروارگانیسم‌ها نسبت به استفاده هـر یـک بـه تنهـایی دارد، که این نشان دهنده اثر سینرژتیک این دو با یکدیگر اسـت (Lacombe et al., 2015).

پژوهش‌های انجام شده در رابطه با خاصیت میکروب‌زدایـی پلاسمای سرد بر مواد غذایی بیشتر بر آلودگی‌زدایی آن متمرکـز

شده است، و پژوهش‌های انجام شده در رابطه با اثـر پلاسـمای سـرد بـر کیفیـت مـواد غـذایی محـدود اسـت (Pankaj et al., 2018). اثر پلاسمای سرد بر فلور میکروبی سه نـوع مختلـف ادویه شامل دانه فلفل، پونه کوهی خـرد شـده و پـودر فلفـل در مـدت ۹۰ دقیقـه توسـط هرتویـگ و همکـاران (Hertwig et al., 2015)، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد پلاسـما سبب کاهش ۱/۶ سیکل لگاریتمی فلور میکروبی پونـه کـوهی و بیش از ۳ سیکل لگاریتمی فلور میکروبی دانه فلفل و پودر فلفل قرمز پس از ۶۰ دقیقه شد. سولیس-پـاچکو و همکـاران (Solís-Pacheco et al., 2013)، اثر پلاسما به مدت صفر، ۱، ۳، ۵، ۷ و ۱۰ دقیقه در ۶۵۰، ۷۵۰ و۸۵۰ ولت بر میزان مخمرها و کپک-ها در نمونه پودر دارچین و بابونه را بررسی کردند. نتـایج نشـان داد، فراینـد پلاسـما در ۸۵۰ ولـت بـه مـدت ۱۰ دقیقـه میـزان مخمرها و کپک‌هـای پـودر دارچـین و بابونـه را بـه طـور قابـل توجهی کـاهش داد. امینـی و همکـاران (Amini et al., 2016)، بـرای اولـین بـار اثـر پلاسـمای سـرد را در دو ولتـاژ (۸ و ۱۲ کیلوولت) و سه نوع گـاز (گـاز آرگـون، آرگـون+۵٪ اکسـیژن و آرگون+۱۰٪ اکسـیژن) بـر اسـترهای کروسـین و اسـانس فـرار زعفران بررسی کردند. نتایج نشـان داد افـزایش ولتـاژ ورودی و افزایش میزان اکسیژن اضافه شده به گاز آرگون سـبب کـاهش بیشتر استرهای کروسین و سافرانال شد.

مطابق با استاندارد ملی ایـران ISIRI 5689 بـاکتری هـای اشرشیاکلی، انتروکوک و کپک‌ها از مهم تـرین عوامـل آلـودگی زعفـران بـه شـمار مـی‌آینـد. و طبـق اسـتاندارد بـاکتری‌هـای *اشرشیاکلی* و انتروکوک نباید در زعفران وجـود داشـته و میـزان کپک نیز باید کمتر از $۱۰^{۳}$ باشد. لذا با توجه به اهمیت زعفران، هدف از این پژوهش بررسی اثر پلاسـمای سـرد تولیـد شـده بـا استفاده از دو نـوع گـاز متفـاوت و اثـر آن در مـدت زمـان‌هـای مختلف بر بار میکروبی و ویژگـی‌هـای شـیمیایی زعفـران بـوده است.

مواد و روش‌ها

تهیه زعفران

پودر زعفران مورد استفاده از شرکت زعفران کیان توس تهیه و میزان بار میکروبی آن تعیین گردید. لازم به توضیح است کـه عمداً از نمونه‌ای که آزمون کپک و مخمر آن مثبت بود اسـتفاده شد. نتایج آزمون میکروبی نشان داد نمونه زعفران حاوی کپک و مخمر و فاقد میکروارگانیسم‌های شاخص *انتروکوکوس فکـالیس* و *اشرشیا کلی* بود. نمونه‌های زعفران به دو گروه شاهد و نمونه-های تحت تابش پلاسما تقسیم شدند. هر گروه از نمونه‌ها به دو گروه جهت انجام آزمایش‌های شیمیایی و آزمایش‌های میکروبی تقسیم گردید. سپس به منظور حفـظ کیفیـت پـودر زعفـران تـا هنگام انجام آزمایش‌های شیمیایی و میکروبی درون شیشه‌هـای تیره رنگ و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

آماده‌سازی باکتری *اشرشیا کلی* و *انتروکوکوس فکالیس* و تلقیح آن

میکروارگانیسم‌های شاخص به کـار رفتـه در ایـن پـژوهش *اشرشیاکلی* و *انتروکوکوس فکالیس* بودند. باکتری‌هـای *اشرشـیا کلی* و *انتروکوکوس فکالیس* بـه صـورت لیـوفیلیزه تهیـه و بـه صورت خطی در محیط کشت اختصاصی کشت، و در دمـای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت گرم خانـه‌گـذاری شـدند. شرایط گرم‌خانه گذاری برای هر دو باکتری یکسان بـود. سـپس در دو دوره متوالی به طور جداگانه به محیط کشت نوترینت براث تلقیح و در دمای ۳۷ درجه سـانتی‌گـراد و بـه مـدت ۲۴ سـاعت انکوباسیون انجام پذیرفت. محیط کشت نوترینت براث با سرعت ۴ هزار دور بر دقیقـه بـه مـدت ۱۵ دقیقـه در دمـای ۲۲ درجـه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید (جهت جداسازی میکروارگانیسم‌های *اشرشیاکلی* و *انتروکوکوس فکـالیس* از محـیط کشـت نوتریـنت

براث). رسوب باکتریایی حاصل در سه مرحله با آب پپتـون (۰/۱ گرم پپتون در ۱۰۰ میلی لیتر) شستشو و در نهایت بـا سـرعت ۴ هزار دور بر دقیقه به مـدت ۱۵ دقیقـه سـانتریفوژ شـدند. تعـداد باکتری از طریق سنجش وکدورت حاصل از آن توسـط دسـتگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۷۰ نـانومتر بـه دسـت آمـد؛ بـه طـوری کـه جـذب نـوری ۰/۰۸ الـی ۰/۱ تقریبـاً معـادل ۱×۱۰۸cfu/ml از هر باکتری به دست آید (Lee et al., 2015; Kim et al., 2017). جهت تلقیح، نمونه های پودر زعفران کـه قبلا عدم وجود فلور میکروبی آن تأیید گردیده بـود (بـر اسـاس آزمایش‌های قبلی)، در ظروف پتری دیـش هـای اسـتریل قـرار گرفتنـد و ۱۵۰ میکرولیتـر از هـر یـک از میکروارگانیسـم هـای شاخص در شرایط کاملا سترون و در زیر هود لامینـار بـه پـودر زعفران تلقیح گردید. پودر تلقیح شده به مـدت یـک سـاعت در دمای ۲۲ ± ۲ °C خشک شد.

تیمار با پلاسمای سرد

نمونه‌های زعفران در دستگاه پلاسمای سرد مـدل mp516 ساخت شرکت نیک فناوران پلاسما کشـور ایـران قـرار گرفـت. پلاسمای سرد به روش تخلیه سد دی الکتریک با ایجاد اختلاف پتانسیل و جریان گاز ایجاد شد. در این پژوهش ولتاژ بـه میـزان ۱۸ کیلوولت تنظیم شد و تابش پلاسما در مدت زمان‌های صفر، ۳، ۶، ۹ و ۱۲ دقیقه با استفاده از دو نوع گاز شامل نیتروژن و هوا انجام شد. جهت استفاده از نیتروژن به عنوان گاز ورودی دستگاه پلاسمای سرد، جریان گاز نیتروژن به مدت سـه دقیقـه قبـل از تابش‌دهی نمونه‌های زعفران در دستگاه ایجاد گردید.

آزمون های شیمیایی

اندازه‌گیری مقـدار کروسـین، پیکروکروسـین و سـافرانال بـا استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر طبق استاندارد جهانی زعفران ISO3632- 2 انجام گرفت. ابتدا میزان ۰/۵ گرم پـودر زعفـران با ترازو با دقت ۰/۰۰۱ وزن شده و نمونه داخل بالن ژوژه ۱۰۰۰ میلی لیتری پوشانده شده با فویل آلومینیوم قرار داده شد و حدود ۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضـافه گردیـد. محلـول زعفـران حدود یک ساعت توسط همزن مغناطیسی دور از نور همزده شد. سپس بالن‌ها با آب مقطر به حجم رسانده و یکنواخت شدند. ۲۰ میلی‌لیتر از محلول به وسیله پیپت بـه بـالن ژوژه‌ی ۲۰۰ میلـی-لیتری پوشانده شده با فویل آلومینیوم انتقـال داده شـد و بـا آب مقطر تا خط نشانه به حجـم رسـانده شـد. سـپس تغییـر جـذب محلول صاف شده با استفاده از آب مقطر به عنوان مایع شاهد با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ثبت شد. مقدار پیکروکروسـین، سافرانال و کروسین با E%1 به ترتیب در طول مـوج مـاکزیمم جذب ۲۵۷، ۳۳۰ و ۴۴۰ نانومتر و با استفاده از فرمول ۱محاسـبه گردید:

$$(A\times10000)/(0/5(100-H)) = E^{\%1} \qquad (۱)$$

A: میزان جذب هر یک از موارد ذکر شده

H: میزان رطوبت نمونه

آزمایش های میکروبی

به منظور تخمین بار میکروبی یک گرم پـودر زعفـران بـا ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل مخلوط و رقـت سـازی انجـام شد. جهت شمارش *اشرشیاکلی* از محیط کشـت EMB اسـتفاده گردید، به این ترتیب که جهت کشـت میکروبـی از هـر یـک از رقت‌های تهیه شده مقدار ۰/۱ میلی لیتر برداشـته و بـه صـورت سطحی کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجـه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری انجام پذیرفت و پـس از آن کلنـی‌هـا شمارش شدند. شمارش انتروکوک طبق روش اسـتاندارد ISIRI 2198 در محیط کشت KF آگار حاوی تـی تـی سـی ۱ درصـد انجام پذیرفت سپس پلیت‌هـا در دمـای ۳۷ درجـه سـانتی‌گـراد گرمخانه‌گذاری شدند و بعد از گذشت ۴۸-۲۴ ساعت کلنی‌هـای قرمز و صورتی شمارش گردید. تعداد معینی از کلنی‌های قرمـز و

صورتی جهت انجام آزمایش‌های تأییدی روی محیط کشت صفرا اسکولین آزاید آگار با دمای حدود ۴۴ درجه سانتی‌گراد منتقل و به مدت ۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. جهت شمارش کپک و مخمر مطابق روش استاندارد ISO 7954 از محیط کشت YGC استفاده گردید. سپس پلیت‌های کشت‌شده به صورت وارونه در انکوباتور با دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ روز قرار گرفتند و بعد از گذشت ۵-۳ روز، کلنی‌ها بررسی و شمارش شدند.

آنالیز آماری

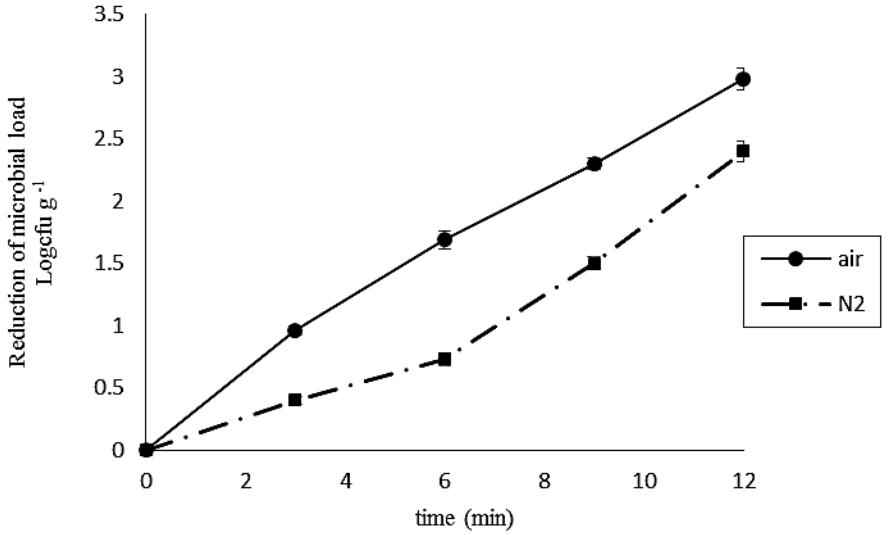
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزار SPSS در سطح اطمینان ۹۵ درصد و مقایسه میانگین‌ها نیز با آزمون دانکن انجام شد. رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

تأثیر نوع گاز و مدت زمان تابش پلاسمای سرد بر شمارش اشرشیا کلی، انتروکوکوس فکالیس، کپک و مخمر

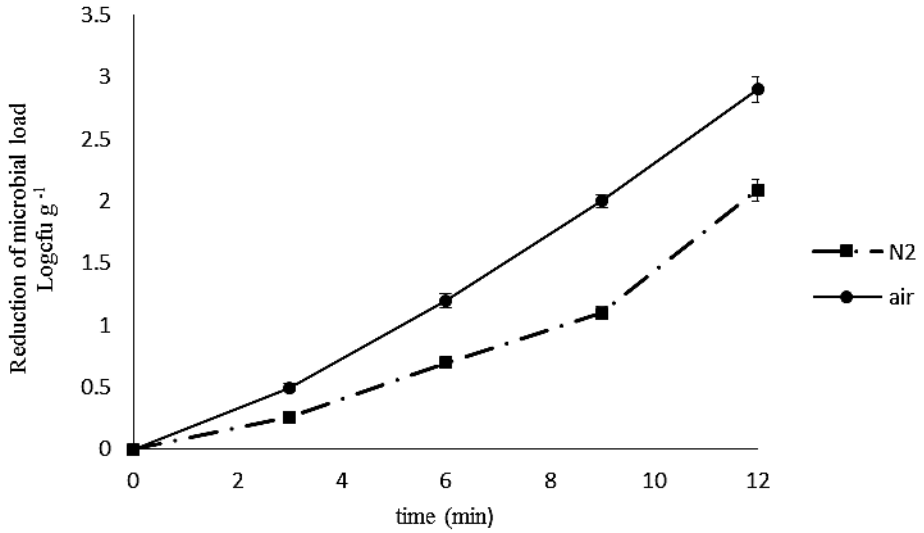
در (شکل ۱، ۲و ۳) تأثیر نوع گاز (نیتروژن و هوا) و مدت زمان (صفر، ۳، ۶، ۹و۱۲ دقیقه) تابش پلاسمای سرد بر کاهش لگاریتمی *اشرشیاکلی*، *انتروکوکوس فکالیس*،کپک و مخمر نمایش داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش زمان تابش‌دهی، اثر ضد میکروبی هر دو نوع گاز نیتروژن و هوا افزایش یافت ($p<0/05$). بیشترین تأثیر تابش پلاسما بر کاهش بار میکروبی در مدت زمان ۱۲ دقیقه مشاهده گردید. گونه‌های واکنش‌گر پلاسما سبب پراکسیداسیون لیپید، غیر فعال‌سازی آنزیم و تجزیه DNA میکروارگانیسم شده که در نهایت منجر به غیرفعال کردن میکروارگانیسم‌ها می‌شود (Pankaj et al., 2017). افزایش زمان تابش‌دهی منجر به افزایش سطح گونه-های واکنش‌گر و افزایش زمان تماس بین میکروارگانیسم‌ها و گونه‌های واکنش‌پذیر می‌گردد. بنابراین افزایش زمان تابش‌دهی سبب افزایش غیر فعال‌سازی میکروارگانیسم‌ها می‌شود (Wan et al., 2017). زایزینا و همکاران (Ziuzina et al., 2014) تأثیر افزایش مدت زمان تابش پلاسما بر کاهش سالمونلا، اشرشیاکلی و لیستریا را بررسی نمودند نتایج نشان داد افزایش زمان فرایند منجر به افزایش اثرات ضد میکروبی پلاسمای سرد علیه سالمونلا، اشرشیاکلی و لیستریا می‌گردد. تأثیر افزایش مدت زمان تابش پلاسما بر مهار پنسیلیوم ایتالیکوم توسط وون و همکاران (Won et al., 2017) مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد مهار پنسیلیوم ایتالیکوم با افزایش زمان تابش پلاسما افزایش یافت. محققان دیگر نیز به نتایج مشابهی دست یافتند که نشان داد افزایش زمان منجر به افزایش اثرات ضد میکروبی پلاسمای سرد می‌شود (Pasquali et al., 2016; Lee et al., 2015). اگر چه نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که پلاسمای نیتروژن نسبت به هوا (هوا دارای ۸۰ درصد نیتروژن +۲۰ درصد اکسیژن است) اثر میکروب‌کشی کمتری در طی زمان تابش دهی داشته است. یکی از پارامترهای مؤثر بر میزان غیرفعال‌سازی میکروارگانیسم‌ها توسط پلاسمای سرد، نوع گاز است که می‌تواند به دلیل ایجاد تفاوت در ترکیب و غلظت گونه-های واکنش‌گر تولید شده باشد (Calvo et al., 2016). ترکیب اکسیژن با گاز نیتروژن می‌تواند سبب افزایش قدرت میکروب کشی به دلیل افزایش تولید O2 و ازون در پلاسمای سرد شود (Lee et al., 2011). بنابراین هوا (۸۰درصد نیتروژن +۲۰ درصد اکسیژن) به‌دلیل تولید بیشتر ازون و گونه‌های واکنش‌گر نیتروژن می‌تواند اثر بیشتری در غیرفعال‌سازی میکروارگانیسم‌ها داشته باشد (Chiang et al., 2010). در پژوهشی اثر ترکیبات مختلف گاز پلاسما بر غیرفعال شدن سالمونلا اینتریدیس بر سطح بادام بررسی شد. نتایج نشان داد غیرفعال‌سازی بستگی به نوع گاز به دلیل تفاوت در ترکیب و شدت گونه‌های واکنش‌گر تولید شده دارد. در این پژوهش پس از ۱۵ دقیقه، گاز هوا و

نیتروژن به ترتیب منجر به غیرفعال‌سازی بیش از ۵ و ۲ سیکل لگاریتمی بار میکروبی شد (Hertwig et al., 2017). سورش کومار و همکاران (Sureshkumar et al., 2010)، در بررسی اثر زمان با استفاده از دو نوع گاز شامل نیتروژن و ترکیب نیتروژن با اکسیژن بر غیرفعال‌سازی باکتری استافیلوکوکوس به نتایج مشابهی دست یافتند نتایج تحقیقات آن‌ها نشان داد که افزایش زمان سبب افزایش اثر هر دو نوع گاز شد و در طی زمان تابش‌دهی ترکیب نیتروژن با اکسیژن اثر میکروب‌کشی بیشتری نسبت به نیتروژن خالص نشان داد.



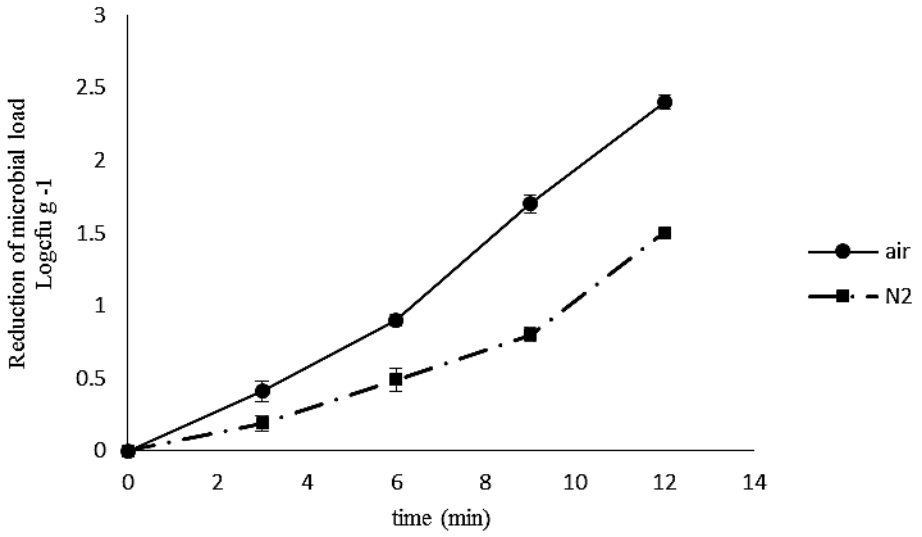
شکل ۱- تأثیر نوع گاز و مدت زمان تابش پلاسما بر باکتری *اشرشیاکلی*

Figure 1- Effect of gas type and exposure of plasma irradiation on *Escherichia coli* bacteria.



شکل ۲ - تأثیر نوع گاز و مدت زمان تابش پلاسما بر باکتری *انتروکوکوس فکالیس*

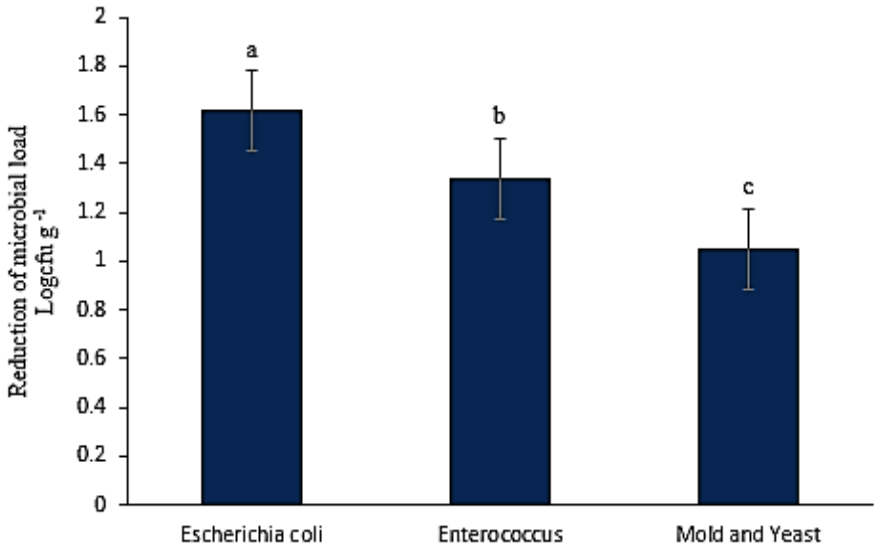
Figure 2- Effect of gas type and exposure of plasma irradiation on *Enterococcus faecalis* bacteria.



شکل ۳- تأثیر نوع گاز و مدت زمان تابش پلاسما بر کپک و مخمر
Figure 3- Effect of gas type and exposure of plasma irradiation on Mold and Yeast.

مقایسه تأثیر تابش پلاسمای سرد بر باکتری گرم منفی *اشرشیاکلی*، باکتری گرم مثبت *انتروکوکوس فکالیس*، کپک و مخمر

شکل ۴ اثر پلاسما سرد را بر شمارش باکتری گرم منفی *اشرشیاکلی*، باکتری گرم مثبت *انتروکوکوس فکالیس*، کپک و مخمر نشان می‌دهد. بررسی میانگین داده‌ها نیز نشان داد، بیشترین مقاومت را کپک و مخمر نسبت به تابش پلاسما از خود نشان داد. قارچ‌ها نسبت به باکتری‌ها دارای دیواره‌ی سلولی ضخیم و سختی هستند که به میزان قابل توجهی به مقاومت آن‌ها در برابر تابش پلاسما کمک می‌کند (Nishime et al., 2017). همچنین در شکل ۴ مشاهده می‌شود، میزان کاهش باکتری گرم منفی اشرشیاکلی نسبت به باکتری گرم مثبت انتروکوکوس فکالیس در طی تابش‌دهی و با هر دو نوع گاز بیشتر بود. چنین حالتی می‌تواند به واکنش بیشتر ازون با پروتئین نسبت به لیپید مربوط باشد، بر اساس این فرضیه مقدار بیشتر پروتئین در دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی، سبب حساسیت بیشتر باکتری‌های گرم منفی نسبت به تابش پلاسما در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت می‌شود (Polata et al., 2015). پلاسمای سرد سبب تولید یون‌های واکنش‌گر مانند گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن، گونه‌های واکنش‌گر نیتروژن و اشعه ماوراءبنفش می‌شود. این ترکیبات از نظر شیمیایی و فیزیکی بافت و سطح سلول‌های باکتری و قارچ را تغییر می‌دهند. این گونه‌ها بر دیواره سلول و غشاء میکروارگانیسم اثر گذاشته و پس از تخریب دیواره سلولی، گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن به داخل سلول منتقل می‌شود و سبب اکسیداسیون، آسیب سلولی و در نهایت منجر به مرگ سلول می‌شود. بنابراین تفاوت در ضخامت لایه پپتیدوگلیکان باکتری‌های گرم مثبت (۳۰-۲۰ نانومتر) نسبت به باکتری‌های گرم منفی (۶ الی ۷ نانومتر) سبب اثر متفاوت پلاسما بر دیواره سلولی و در نتیجه تفاوت در سرعت غیرفعال‌سازی باکتری‌ها می‌شود (Cahill al., et 2014). اگر چه مقاومت میکروارگانیسم‌ها نه تنها به خواص ذاتی میکروراگانیسم‌ها، بلکه به سطح یا بستر ماده‌ی غذایی که فرایند بر آن اعمال می‌شود بستگی دارد. در محصول خشکی مانند زعفران به دلیل رطوبت پایین، مقاومت میکروارگانیسم‌ها ممکن است بالا باشد (Ghoddusi & Glatz, 2003).



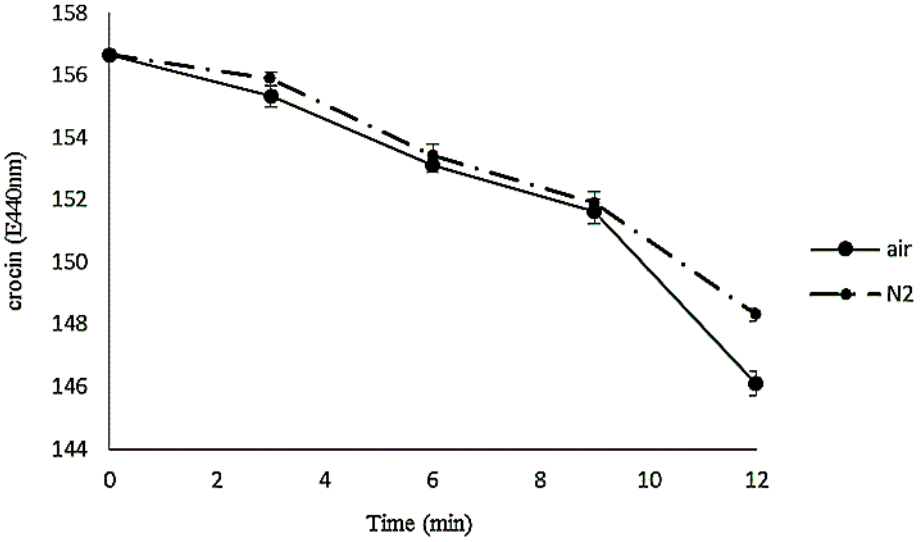
شکل ٤- مقایسه اثر پلاسمای سرد بر کاهش باکتری *اشرشیاکلی*، انتروکوکوس، کپک و مخمر

Figure 4- Comparison of the effect of cold plasma on the reduction of *Escherichia coli*, *Enterococcus* bacteria, Mold and Yeast.

تأثیر نوع گاز و مدت زمان تابش پلاسمای سرد بر میزان کروسین، پیکروکروسین و سافرانال

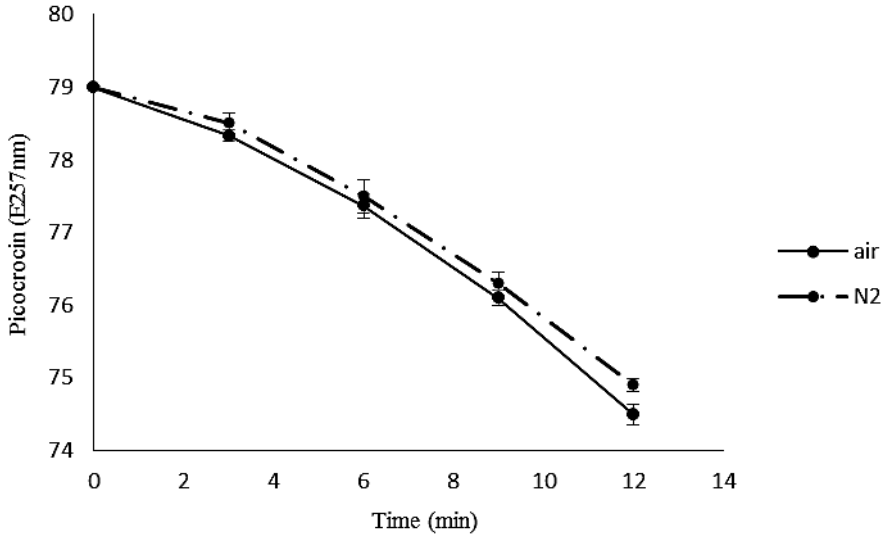
تأثیر نوع گاز (نیتروژن و هوا) و مدت زمان (صفر، ۳، ۶، ۹و۱۲ دقیقه) تابش پلاسمای سرد بر میزان کروسین، پیکروکروسین و سافرانال در (شکل ۵،۶ و ۷) نمایش داده شده است. بررسی میانگین داده‌ها نیز نشان داد که با افزایش زمان میزان ترکیبات کروسین، پیکروکروسین و سافرانال کاهش یافت (p<۰/۰۵). پژوهش‌های مربوط به اثر پلاسمای سرد بر ویژگی-های شیمیایی مواد غذایی نادر است (Kovačević et al., 2016). یکی از مکانیسم‌های غیرفعال‌سازی میکروارگانیسم‌ها توسط پلاسما اشعه UV تولید شده درطول موج ۳۰۰-۲۰۰ نانومتر است که سبب آسیب به DNA میکروارگانیسم‌ها می‌گردد (Fernández & Thompson, 2012). از طرفی ترکیبات کروسین، پیکروکروسین و سافرانال نسبت به نور حساس هستند، و هنگامی که در معرض نور و اشعه ماوراء بنفش قرار می‌گیرند تخریب می‌شوند. علاوه بر اشعه ماوراءبنفش، این ترکیبات در حضور اکسیژن اکسیده شده و مقدار آن ها کاهش می‌یابد (Rajabi et al., 2015). اکبری و همکاران (Akbari et al., 2009)، اثر گاز ازون را بر بار میکروبی، رنگ، طعم و آرومای زعفران بررسی کردند. نتایج نشان داد گاز ازون میزان کروسین، سافرانال و پیکروکروسین را به‌ترتیب ۱۴/۹ ٪ ، ۱۰/۴۶ ٪ و ۱۳/۸۵٪ کاهش داد. اگر چه در پژوهش ما میزان کاهش کروسین، سافرانال و پیکروکروسین به‌ترتیب ۶/۰۱، ۴/۰۴، ۵/۴۴ درصد بوده است که دلیل آن را می‌توان به میزان کمتر ازون موجود در پلاسما نسبت به ازون خالص نسبت داد. ازون اکسیدکننده‌ای قوی است و باعث اکسیداسیون کروسین، سافرانال و پیکروکروسین می‌گردد. امینی و همکاران (Amini et al., 2017)، در بررسی اثر پلاسمای سرد بر کروسین و سافرانال زعفران، علت کاهش کروسین را تخریب پیوندهای گلیکوزید کروسین توسط رادیکال‌های آزاد تولید شده و افزایش اکسیداسیون سافرانال توسط پلاسما و در نتیجه تجزیه آن دانستند. بنابراین ممکن است اشعه UV، ازون، گونه‌های واکنش‌گر و رادیکال‌های تولید شده توسط پلاسما

نقش مهمی در تخریب کروسین، پیکروکروسین و سافرانال داشته باشند. همچنین با توجه به اینکه غلظت تولید گونه‌های واکنش‌گر پلاسما در اثر افزایش مدت زمان تابش پلاسما افزایش می‌یابد (Rodríguez et al., 2017). بنابراین ممکن است افزایش سطح گونه‌های واکنش‌گر با افزایش زمان نقش مهمی در تخریب کروسین، پیکروکروسین وسافرانال داشته باشند.



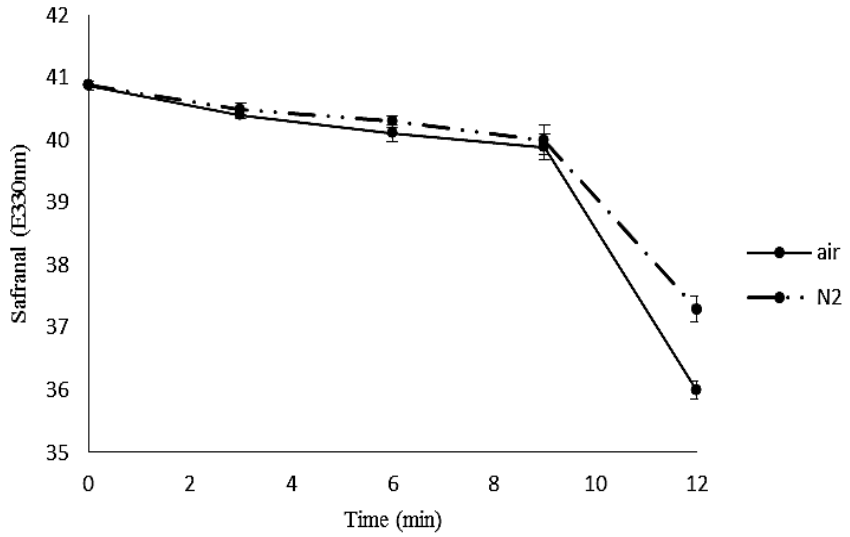
شکل ۵- تأثیر نوع گاز و مدت زمان تابش پلاسما بر میزان کروسین

Figure 5- Effect of gas type and exposure of plasma irradiation on Crocin.



شکل ٦- تأثیر نوع گاز و مدت زمان تابش پلاسما بر میزان پیکروکروسین

Figure 6- Effect of gas type and exposure of plasma irradiation on Picocrocin.



شکل ۷- تأثیر نوع گاز و مدت زمان تابش پلاسما بر میزان سافرانال
Figure 7- Effect of gas type and exposure of plasma irradiation on safranal.

همانطور که در (شکل ۵،۶ و ۷) مشاهده می‌گردد، روند کاهش در نمونه‌های تحت تابش با پلاسمای نیتروژن نسبت به نمونه‌های تحت تابش با پلاسمای هوا (هوا دارای ۸۰ درصد نیتروژن +۲۰ درصد اکسیژن است) به میزان جزئی کمتر بود، ولی این تفاوت به لحاظ آماری معنی‌دار نبود (p>۰/۰۵). امینی و همکاران (Amini et al., 2017)، در بررسی پلاسمای سرد و اثر افزودن ۵ و ۱۰ درصد اکسیژن به گاز آرگون بر میزان کروسین و سافرانال زعفران مشاهده نمودند که ترکیب گازی حاوی بیشترین میزان اکسیژن سبب تخریب بیشتر پیوندهای گلیکوزید کروسین، افزایش اکسیداتیو سافرانال و کاهش بیشتر کروسین و سافرانال می‌گردد. احتمالاً کاهش بیشتر کروسین، سافرانال و پیکروکروسین نمونه‌های تحت تابش با پلاسمای هوا نسبت به پلاسمای نیتروژن به درصد بیشتر اکسیژن موجود در آن مرتبط است.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش اثر دو نوع گاز نیتروژن و هوا در زمان‌های مختلف بر ویژگی‌های میکروبی (باکتری *اشرشیاکلی*، *انتروکوکوس فکالیس*، کپک و مخمر) و شیمیایی (کروسین، پیکروکروسین و سافرانال) زعفران مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد پلاسمای سرد قادر به کاهش میکروارگانیسم‌ها بود. اگر چه اثر تابش پلاسمای سرد بر کاهش میکروارگانیسم‌ها یکسان نبوده و باکتری گرم منفی *اشرشیاکلی* بیشترین حساسیت و کپک‌ها و مخمرها کمترین حساسیت را نسبت به تابش پلاسما نشان دادند. استفاده از هوا به عنوان گاز ورودی نسبت به گاز نیتروژن در طی تابش‌دهی بر کاهش بارمیکروبی مؤثرتر بوده است. افزایش زمان موجب کاهش بیشتر بار میکروبی شد، به‌طوری‌که در مدت زمان ۱۲ دقیقه بیشترین کاهش بار میکروبی مشاهده شد. اگر چه افزایش زمان، اثر منفی بر ترکیبات فعال زعفران داشت. به‌طوری‌که حداکثر کاهش میزان کروسین، پیکروکروسین و سافرانال در زمان ۱۲ دقیقه مشاهده شد. پلاسمای نیتروژن مقدار کروسین، پیکروکروسین و سافرانال بیشتری نسبت به پلاسمای تولید شده با گاز هوا داشت، هر چند این تفاوت به لحاظ آماری معنی‌دار نبود. لذا با توجه به حساس بودن ترکیبات مؤثر زعفران پیشنهاد می‌شود قبل از استفاده از دستگاه پلاسمای سرد ابتدا بار

میکروبی زعفران مشخص گردد و با توجه به بار میکروبی زعفران و با در نظر گرفتن کاهش ترکیبات زعفران، زمان مورد نیاز جهت غیرفعال‌سازی میکروارگانیسم‌های زعفران توسط پلاسمای سرد تنظیم گردد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی شرکت زعفران کیان توس انجام پذیرفت. بدین وسیله ازمدیرعامل محترم این شرکت جناب آقای مهندس مسعود صباغ زاده و نیز مدیر داخلی سرکار خانم مهندس رویا رضایی سپاسگزاری می‌شود.

منابع

Aghdaie, S.F.A., and Roshan, J. 2015. Investigating effective factors on Iran's saffron exportation. International Review of Management and Business Research 4 (2): 590-600.

Akbari, M., Haddad Khadaparast, M.H., and Hemati Kakhki, A. 2009. Effects of ozone treatment on microflora of dried saffron and its living larvae. In III International Symposium on Saffron: Forthcoming Challenges in Cultivation. Research and Economics 850: 231-234.

Amini, M., and Ghoranneviss, M. 2016. Effects of cold plasma treatment on antioxidants activity, phenolic contents and shelf life of fresh and dried walnut (*Juglans regia* L.) cultivars during storage. LWT-Food Science and Technology 73: 178-184.

Amini, M., Ghoranneviss, M., and Abdijadid, S. 2017. Effect of cold plasma on crocin esters and volatile compounds of saffron. Food Chemistry 235: 290-293.

Atefi, M., Taslimi, A., Hassas, M.R., and Mazloumi, M.T. 2004. Effects of freeze-drying processes on the qualitative characteristics of Iranian saffron. Iranian Journal of Food Sciences Technology 1 (2): 41-49.

Cahill, C., Claro, T., O'Connor, N.A., Cafolla, A.T., Stevens, N., Daniels, S., and Humphreys, H. 2014. Cold air plasma to decontaminate inanimate surfaces of the hospital environment. Applied and Environmental Microbiology 80 (6): 2004-2010.

Calvo, T., Álvarez-Ordóñez, A., Prieto, M., González-Raurich, M., and López, M. 2016. Influence of processing parameters and stress adaptation on the inactivation of *Listeria monocytogenes* by Non-Thermal Atmospheric Plasma (NTAP). Food Research International 89: 631-637.

Chiang, M.H., Wu, J.Y., Li, Y.H., Wu, J.S., Chen, S.H., and Chang, C.L. 2010. Inactivation of *E. coli* and *B. subtilis* by a parallel-plate dielectric barrier discharge jet. Surface and Coatings Technology 204 (21): 3729-3737.

Deng, X.T., Shi, J.J., and Kong, M.G. 2006. Physical mechanisms of inactivation of *Bacillus subtilis* spores using cold atmospheric plasmas. Plasma Science 34 (4): 1310–1316.

Fernández, A., and Thompson, A. 2012. The inactivation of *Salmonella* by cold atmospheric plasma treatment. Food Research International 45 (2): 678-684.

Ghoddusi, H.B., and Glatz, B. 2003. Decontamination of saffron (*Crocus sativus* L.) by electron beam irradiation. In I International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology 650: 339-344.

Gohari, A.R., Saeidnia, S., and Mahmoodabadi, M.K. 2013. An overview on saffron, phytochemicals, and medicinal properties. Pharmacognosy Reviews 7 (13): 61-67.

Hertwig, C., Leslie, A., Meneses, N., Reineke, K., Rauh, C., and Schlüter, O. 2017. Inactivation of *Salmonella enteritidis* PT30 on the surface of unpeeled almonds by cold plasma. Innovative Food Science and Emerging Technologies 44: 242-248.

Hertwig, C., Reineke, K., Ehlbeck, J., Erdoğdu, B., Rauh, C., and Schlüter, O. 2015. Impact of remote plasma treatment on natural microbial load and quality parameters of selected herbs and spices. Journal of Food Engineering 167: 12-17.

ISO 7954, 1987. Microbiology- General guidance for enumeration of yeasts and moulds- Colony count technique at 25 °C. International Organization for Standardization, Geneva.

ISO. 2010. Spices-saffron (*Crocus sativus* L.), ISO 3632-2, Part 2: Test methods, International. Organization for Standardization.

Jafari, S.M., Bahrami, I., Dehnad, D., and Shahidi, S.A. 2018. The influence of nanocellulose coating on saffron quality during storage. Carbohydrate Polymers 181: 536-542.

Jayasena, D.D., Kim, H.J., Yong, H.I., Park, S., Kim, K., Choe, W., and Jo, C. 2015. Flexible thin-layer dielectric barrier discharge plasma treatment of pork butt and beef loin: effects on pathogen inactivation and meat-quality attributes. Food Microbiology 46: 51–57.

Jouki, M., Khazaei, N., Kalbasi, A., Tavakolipour, H., Rajabifar, S., Sedeh, F.M., and Jouki, A. 2011. Study of γ irradiation and storage time on microbial load and chemical quality of persian saffron. World Academy of Science, Engineering and Technology 53 (7): 1154-1157.

Kim, J.E., Oh, Y.J., Won, M.Y., Lee, K.S., and Min, S.C. 2017. Microbial decontamination of onion powder using microwave-powered cold plasma treatments. Food Microbiology 62: 112-123.

Korachi, M., Gurol, C., and Aslan, N. 2010. Atmospheric plasma discharge sterilization effects on whole cell fatty acid profiles of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Electrostatics 68 (6): 508–512.

Kovačević, D.B., Putnik, P., Dragović-Uzelac, V., Pedisić, S., Jambrak, A.R., and Herceg, Z. 2016. Effects of cold atmospheric gas phase plasma on anthocyanins and color in pomegranate juice. Food Chemistry 190: 317-323.

Lacombe, A., Niemira, B.A., Gurtler, J.B., Fan, X., Sites, J., Boyd, G., and Chen, H. 2015. Atmospheric cold plasma inactivation of aerobic microorganisms on blueberries and effects on quality attributes. Food Microbiology 46: 479-484.

Lee, H.J., Jung, H., Choe, W., Ham, J.S., Lee, J.H., and Jo, C. 2011. Inactivation of *Listeria monocytogenes* on agar and processed meat surfaces by atmospheric pressure plasma jets. Food Microbiology 28 (8): 1468-1471.

Lee, H., Kim, J.E., Chung, M.S., and Min, S.C. 2015. Cold plasma treatment for the microbiological safety of cabbage, lettuce, and dried figs. Food Microbiology 51:74-80.

Liao, X., Liu, D., Xiang, Q., Ahn, J., Chen, S., Ye, X., and Ding, T. 2017. Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: A review. Food Control 75: 83-91.

Melnyk, J.P., Wang, S., and Marcone, M.F. 2010. Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron. Food Research International 43 (8): 1981-1989.

Min, S.C., Roh, S.H., Niemira, B.A., Boyd, G., Sites, J.E., Uknalis, J., and Fan, X. 2017. In-package inhibition of *E. coli* O157: H7 on bulk Romaine lettuce using cold plasma. Food Microbiology 65: 1-6.

Misra, N.N., Tiwari, B.K., Raghavarao, K.S.M.S., and Cullen, P.J. 2011. Nonthermal plasma inactivation of food-borne pathogens. Food Engineering Reviews 3 (3-4): 159-170.

Mogul, R., Bol'shakov, A.A., Chan, S.L., Stevens, R.M., Khare, B.N., Meyyappan, M., and Trent, J.D. 2003. Impact of low-temperature plasmas on Deinococcus radiodurans and biomolecules. Biotechnol 19 (3): 776–783.

Nishime, T.M.C., Borges, A.C., Koga-Ito, C.Y., Machida, M., Hein, L.R.O., and Kostov, K.G. 2017. Non-thermal atmospheric pressure plasma jet applied to inactivation of different microorganisms. Surface and Coatings Technology 312: 19-24.

Pankaj, S.K., Wan, Z., and Keener, K.M. 2018. Effects of Cold Plasma on Food Quality: A Review. Foods 7 (1): 4-21.

Pankaj, S.K., Wan, Z., Colonna, W., and Keener, K.M. 2017. Effect of high voltage atmospheric cold plasma on white grape juice quality. Journal of the Science of Food and Agriculture 97 (12): 4016-4021.

Pasquali, F., Stratakos, A.C., Koidis, A., Berardinelli, A., Cevoli, C., Ragni, L., Mancusi, R,. Manfreda, G., and Trevisani, M. 2016. Atmospheric cold plasma process for vegetable leaf decontamination: A feasibility study on radicchio (red chicory, *Cichorium intybus* L.). Food Control 60: 552-559.

Polata, A., Motrescu, I., Nastuta, A., Creanga, D., and Popa, G. 2015. Plasma Jet impact on bacterial cultures. Romanian Journal of Biophysics 25 (4): 259-265.

Rajabi, H., Ghorbani, M., Jafari, S.M., Mahoonak, A.S., and Rajabzadeh, G. 2015. Retention of saffron bioactive components by spray drying encapsulation using maltodextrin, gum Arabic and gelatin as wall materials. Food Hydrocolloids 51: 327-337.

Rodríguez, Ó., Gomes, W.F., Rodrigues, S., and Fernandes, F.A. 2017. Effect of indirect cold plasma treatment on cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.). LWT-Food Science and Technology 84: 457-463.

Rodriguez-Ruiz, V., Barzegari, A., Zuluaga, M., Zunooni-Vahed, S., Rahbar-Saadat, Y., Letourneur, D., and Pavon-Djavid, G. 2016. Potential of aqueous extract of saffron (*Crocus sativus* L.) in blocking the oxidative stress by modulation of signal transduction in human vascular endothelial cells. Journal of Functional Foods 26: 123-134.

Solís-Pacheco, J.R., Villanueva-Tiburcio, J.E., Peña-Eguiluz, R., González-Reynoso, O., Cabrera-Díaz, E., González-Álvarez, V., and Aguilar-Uscanga, B.R. 2013. Effect of plasma energy on the antioxidant activity, total polyphenols and fungal viability in chamomile (*Matricaria chamomilla*) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*). The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences 2 (5): 2318 -2322.

Sureshkumar, A., Sankar, R., Mandal, M., and Neogi, S. 2010. Effective bacterial inactivation using low temperature radio frequency plasma. International Journal of Pharmaceutics 396 (1): 17-22.

Tappi, S., Gozzi, G., Vannini, L., Berardinelli, A., Romani, S., Ragni, L., and Rocculi, P. 2016. Cold plasma treatment for fresh-cut melon stabilization. Innovative Food Science and Emerging Technologies 33: 225-233.

Torki-Harchegani, M., Ghanbarian, D., Maghsoodi, V., and Moheb, A. 2017. Infrared thin layer drying of saffron (*Crocus sativus* L.) stigmas: Mass transfer parameters and quality assessment. Chinese Journal of Chemical Engineering 25 (4): 426-432.

Wan, Z., Chen, Y., Pankaj, S.K., and Keener, K.M. 2017. High voltage atmospheric cold plasma treatment of refrigerated chicken eggs for control of *Salmonella enteritidis* contamination on egg shell. LWT-Food Science and Technology 76 (A): 124-130.

Won, M.Y., Lee, S.J., and Min, S.C. 2017. Mandarin preservation by microwave-powered cold plasma treatment. Innovative Food

Science and Emerging Technologies 39: 25-32.
Ziuzina, D., Patil, S., Cullen, P.J., Keener, K.M., and Bourke, P. 2014. Atmospheric cold plasma inactivation of Escherichia coli, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes* inoculated on fresh produce. Food Microbiology 42: 109-116.

Effect of Cold Plasma on Microbial and Chemical Properties of Saffron

Maryam Akbarian[1], Fakhri Shahidi[2], Mohammad Javad varidi[3], Arash Koocheki[2] and Sahar Roshanak[4]*

Submitted: 29 December 2017 **Accepted:** 14 May 2019

Akbarian, M., Shahidi, F., Varidi, M.J., Koocheki, A., Roshanak, S. 2020. Effect of Cold Plasma on Microbial and Chemical Properties of Saffron. Saffron Agronomy & Technology, 7(4): 425-439.

Abstract

Saffron is the most expensive agricultural product in the world and Iran is the largest saffron producer in the world. Saffron contamination in different stages of its production process leads to loss of credibility in export and the global market in addition to loss of quality. Therefore, it is necessary to select an appropriate method for inactivation of the microbial flora of saffron. Among the common methods that are used for inactivation of microorganisms, cold plasma has attracted much attention due to potential benefits such as its non-toxic nature, low operational costs, significant reduction in water consumption for decontamination, and possibility of its use for a variety of food products. Plasma is a state of ionized gas including ions, electrons, ultraviolet rays, and reactive species such as radicals, atoms and molecules which can ignite and inactivate microorganisms. In this research study, cold plasma was produced using two types of gas including nitrogen and air, and the effect of plasma radiation at 0, 3, 6, 9 and 12 minutes on the chemical and microbial (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, Mold and Yeast) properties of saffron were investigated. The results of this study showed that germicidal effects of nitrogen plasma is lower than air plasma and exposure time to plasma has a significant effect on reduction of microbial load. It was also seen that inactivation of microorganisms increases with increased time of exposure to plasma exposure. Maximum microbial reduction was observed in 12 minutes. Maximum reduction in microbial load was observed at 12 minutes and 18 kilovolt voltage, which reduced the population of *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, mold and yeast by 2.69, 2.48, and 1.95 log cycles, respectively, However, with increasing radiation time, the amount of crocin, picocrocin and safranal decreased ($p<0.05$). Reduction of crocin, safranal and picocrocin in 12 minutes was 6.01, 4.04, and 5.44%, respectively.

Keywords: Microbial contamination of saffron, cold plasma, picocrocin, safranal, crocin.

1 - MSc Student, Department of Food Science & Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2 - Professor, Department of Food Science & Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3 - Associate Professor,Department of Food Science & Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
4 - Ph.D Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
(*- Corresponding author. Email: fshahidi@um.ac.ir)
DOI: 10.22048/jsat.2019.112244.1276