نشریه زراعت و فناوری زعفران
جلد ۸، شماره ۱، بهار ۱۳۹۹ ص. ۹۸-۸۹

Saffron Agronomy & Technology
Vol. 8, No. 1, Spring 2020, P. 89-98

مقاله پژوهشی

بررسی تأثیر شرایط استخراج بر میزان ترکیبات زیست فعال عصاره پیاز زعفران

سودابه عین افشار[۱*] و پروین شرایعی[۱]

تاریخ دریافت: ۱۶ بهمن ۱۳۹۷ **تاریخ پذیرش:** ۲۴ اردیبهشت ۱۳۹۸

عین افشار، س.، و شرایعی، پ. ۱۳۹۹. بررسی تأثیر شرایط استخراج بر میزان ترکیبات زیست فعال عصاره پیاز زعفران. زراعت و فناوری زعفران، ۸(۱): ۹۸-۸۹.

چکیده

زعفران محصول منحصر به فرد ایران است و پیاز زعفران از جمله مواد جانبی تولید زعفران است که همه ساله در حجم بالایی در کشور تولید می شود لذا به منظور تولید مواد با ارزش افزوده بالا ازپیاز زعفران ضایعاتی، این تحقیق صورت گرفت. ابتدا پیاز زعفران به مقدار لازم تهیه، خشک و کاملا آسیاب گردید. عملیات استخراج عصاره با استفاده از حلال (متانول ۸۰٪، اتانول ۸۰٪ و آب) و دستگاه فراصوت (صوت‌دهی با شدت ۱۰۰ درصد به مدت، ۰، ۲۰ و ۴۰ دقیقه در دمای اتاق) انجام شد. سپس عصاره‌های حاصل، حلال‌زدایی و خشک شدند. در هر مورد حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)، میزان ترکیبات فنلی، قدرت احیاکنندگی آهن III و قدرت گیرندگی رادیکال آزاد تعیین شدند. به منظور بررسی اثر مستقل (نوع حلال، شدت فراصوت) و اثر متقابل (نوع حلال و شدت فراصوت) بر ترکیبات زیست فعال عصاره پیاز زعفران از طرح فاکتوریل ۲متغیره با پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار استفاده شد و مقایسات میانگین به روش دانکن انجام شد. نتایج نشان دادند حلال اتانول با استخراج $mg.ml^{-1}$ ۸۵/۸۴ ترکیبات فنلی و دارا بودن بیشترین قدرت مهارکنندگی آهن ($۵۹۴/۷۴\mu mol.ml^{-1}$) و گیرندگی رادیکال (۵۹/۴۲ درصد) بود و فرایند فراصوت درشدت ۱۰۰ درصد به مدت ۴۰ دقیقه بالاترین میزان ترکیبات فنلی ($۸۲/۲۳ mg.ml^{-1}$) را استخراج نمود.

کلمات کلیدی: پیاز زعفران، قدرت آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، قدرت احیاکنندگی آهن.

۱- استادیار پژوهش بخش تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران.
(*- نویسنده مسئول: soodabeheyn@yahoo.com)

DOI: 10.22048/jsat.2019.170014.1336

مقدمه

زعفران (*Crocus sativus* L.) یکی از گرانترین و بی‌نظیرترین ادویه‌های جهان (Bagri et al., 2017) و احتمالاً حاصل جهش گیاه وحشی *Crocus cartwrightiamus* و از تیره زنبقیان می‌باشد.

سالانه مقادیر زیادی پیاز زعفران در کشور تولید می شود بخشی از آن به مصرف کشت می رسد و بخش عمده آن به صورت بلا استفاده هدر می‌رود یا به مصرف دام می‌رسد. در سال ۱۳۹۵ سطح زیر کشت محصول زعفران در ایران بالغ بر ۱۰۵.۰۰۰ هکتار(۳۳۶ تن کلاله خشک زعفران) بودکه از این میان ۲۵۷/۶ تن در استان خراسان‌رضوی و ۵۱/۱ تن در استان خراسان‌جنوبی کشت شده است (Anonymous, 2016). هر ۸ سال زمین زراعت زعفران جایگزین می‌گردد لذا پیاز زعفران موجود در ۱۳۱۲۵ هکتارهمه ساله از زمین خارج می‌گردد چنانچه از هر هکتار ۲۰ تن پیاز زعفران حاصل گردد ۲۶۲.۵۰۰ تن محصول پیاز زعفران حاصل می‌شود که حدود یک هفتم آن (۳۷۵۰۰ تن) به مصرف کشت مجدد و بخشی (۲۸۰۰۰ تن) نیز به مصرف توسعه کشت (۳تا ۴۰۰۰ هکتار در سال) می‌رسد. لذا در سال ۱۳۹۵ حدود ۲۰۰.۰۰۰ تن (۱۹۶.۵۰۰ تن) پیاز زعفران کاملا مازاد و ضایعاتی در کشور وجود داشت. با توجه به تغییر اقلیم و مشکلات ناشی از بحران آب در کشور و روی آوردن کشاورزان به کشت زعفران این رقم در سال جاری و سال‌های پیش رو به طور تصاعدی افزایش خواهد یافت. چنانچه کاربردهایی از این حجم بالای پیاز زعفران یافت شود می توان از یک ماده ضایعاتی، مواد با ارزش افزوده بالا تولید نمود.

یکی از خواص عملگرای بخش‌های هوایی و ریشه گیاهان، اثر آنتی‌اکسیدانی آن‌هاست. گیاهان حاوی ترکیبات ثانویه وسیعی هستند که اغلب دارای فعالیت زیستی مهمی هستند. اولین مرحله‌ی کلیدی در استخراج ترکیبات موثره از یک گیاه نحوه‌ی عصاره‌گیری از آن است. چرا که نوع ترکیب استخراج شده، کیفیت و کمیت آن به شدت تحت تأثیر اندام گیاهی و سیستم‌های حلالی انتخاب شده قرار دارد. به همین دلیل، تقاضای زیادی برای روش‌های عصاره‌گیری جدید با زمان کوتاه‌تر، میزان مصرف حلال کمتر و محافظ محیط زیست وجود دارد. روش‌های جدید عصاره‌گیری همراه با امواج فراصوت (Altemimi et al., 2016) یا همراه با آب مادون بحرانی (Gong et al., 2015) برای استخراج ترکیب‌هایی از گیاهان بسیار سریع و موثر عمل می‌کنند.

چرانگو و فاروق (Chrungoo & Farooq, 1985) تغییرات همبسته در محتوای کربوهیدرات و نشاسته و فعالیت آنزیم‌های هیدرولیز کننده نشاسته از قبیل آمیلاز و نشاسته فسفوریلاز را در بنه زعفران در طول دوره خواب و جوانه‌زنی بررسی کردند. با پیشرفت جوانه‌زنی، محتوای نشاسته کاهش و میزان قند کل به‌طور پیوسته افزایش یافت. در طول دوره خواب، غلظت پروتئین محلول بافت با تغییر چشمگیری مواجه نشد، اما در دوره رشد و نمو جوانه‌ها میزان پروتئین و همچنین فعالیت آمیلاز به‌طور پیوسته افزایش یافت. فعالیت خاص فسفریلاز نشاسته محلول در طول دوره نمو بین اوایل ماه‌های خرداد و آبان تغییر قابل توجهی نشان نداد اما فعالیت آنزیم فسفریلاز نشاسته متصل به گرانول در همین دوره به طور قابل توجهی کاهش یافت. بدین ترتیب حداکثر میزان نشاسته در اوایل خرداد ماه حدود ۵۰٪ و حداقل میزان آن در اوایل آبان به میزان حدود ۱۸٪ بر مبنای وزن خشک ارزیابی شد. میزان قند کل نیز از ۶٪ در اواخر اوایل خرداد ماه می به حدود ۱۴٪ بر مبنای وزن خشک در اواخر ماه اکتبر رسید.

بگری و همکاران (Bagri et al., 2017) تغییرات متابولیک

قندها و اسیدهای‌آمینه تنظیم‌کننده جوانه‌زنی در بنه زعفران را مورد ارزیابی قرار دادند. برای شناسایی و تجزیه و تحلیل متابولیت‌های مرتبط با فرآیند خواب- جوانه‌زنی از کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنج جرمی[1] غیر هدفمند استفاده شد. تجزیه و تحلیل همبستگی از وابستگی متقابل میان مسیر متابولیکی و متابولیت‌های منحصر به فرد حکایت داشت. در شروع مرحله دوم زندگی که با تمایز اولیه برگ مشخص می‌شود، تغییر از مرحله خواب عمیق به متابولیسم فعال رخ می‌دهد. این تغییر در نتیجه افزایش میزان قندها و سایر متابولیت‌های درگیر در چرخه تری‌کربوکسیلیک‌اسید، مسیرهای گلیکولیتیک، اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب است. این تغییرات در جوانه‌زنی و رشد رویشی بنه زعفران نقش دارند.

اسماعیلی و همکاران (Esmaeili et al., 2013) به تعیین برخی از ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بنه زعفران در دو دوره خواب و بیداری پرداختند. ۱۱ ترکیب فنلی در عصاره بنه زعفران شناسایی شد. در بنه بیدار جنتیسیک اسید با میزان حدود ۵/۷ میکروگرم/گرم بیشترین و گالیک اسید با میزان ۰/۴۱ میکروگرم/گرم کمترین میزان ترکیبات فنلی را به خود اختصاص داد. در بنه خواب نیز همین دو ترکیب به ترتیب با میزان ۰/۹۲ و ۰/۰۱۷ میکروگرم/گرم کمترین و بیشترین مقدار ترکیبات فنلی را تشکیل دادند. بررسی با GC-MS نشان داد که غلظت ترکیبات فنلی در بنه در حالت بیداری بیشتر از حالت خواب است.

سانچز- ویوک[2] وهمکاران (Sánchez-Vioque et al., 2012) خاصیت آنتی‌اکسیدانی و مهار کنندگی فلز بنه، برگ و گلبرگ زعفران (*Crocus sativus* L.) را بررسی کردند. آنها بیان کردند که بنه، برگ و گلبرگ فرآورده‌های جانبی تولید شده در فرآیند تشکیل کلاله‌های گل (یا همان بخش خوراکی زعفران) است، بنابراین به منظور افزایش سودآوری کلی این گیاه، این فرآورده‌های جانبی به عنوان منابع بالقوه خاصیت آنتی‌اکسیدانی مورد ارزیابی قرار گرفتند. اسکریبانو و همکاران (Escribano et al., 1999) به جداسازی و تعیین خصوصیات سمی یک گلیکوکونژوگه[3] از بنه زعفران پرداختند. این گلیکوکونژوگه فعالیت سیتوتوکسیک قابل توجهی بر روی سلول‌های سرطانی کشت شده انسان (HeLa) نشان داد. بخش پلی‌ساکاریدی این گلیکوکونژوگه ۹۴/۵ درصد از مولکول را تشکیل داده و قند عمده آن رامنوز با میزان ۳۶/۴ درصد بود. زنجیره پروتئینی عمدتا از آسپارتیک اسید/ آسپاراژین، آلانین، گلوتامیک اسید/ گلوتامین، گلیسین و سرین تشکیل شده بود. هنگامی که سلول‌های HeLa در معرض این گلیکوکونژوگه قرار گرفتند، تورم و کشیدگی غشاء پلاسمایی در آنها به چشم خورد که نشان دهنده سمیت سلولی از طریق جذب مایع خارج سلولی بود.

هدف از این پژوهش بررسی خواص آنتی اکسیدانی عصاره استخراج شده از بنه زعفران در زمان خواب به منظور یافتن کاربردهای احتمالی و بررسی امکان تولید فرآورده‌های با ارزش افزوده بالا از پسماندهای بنه زعفران است.

مواد و روش‌ها

در تیرماه سال ۱۳۹۷پیاز زعفران در حالت خواب از منطقه جنوب خراسان به مقدار لازم تهیه، خشک، کاملا آسیاب و تحت نیتروژن در ظروف شیشه ای درب دار کاملا تیره در فریزر تا زمان انجام آزمایش نگهداری شد.

اندازه گیری رطوبت به روش معمولی آون گذاری تا رسیدن به وزن ثابت انجام گرفت (AOAC, 2000a).

اندازه گیری پروتئین: به روش کلدال صورت گرفت

اندازه گیری میزان خاکستر: به روش کوره‌گذاری در دمای

1-Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS)
2-Sánchez-Vioque
3-glycoconjugate

۶۰۰ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به وزن ثابت صورت گرفت (AOAC, 2000b).

اندازه‌گیری میزان چربی: به روش سوکسله با استفاده از حلال دی اتیل اتر انجام شد.

اندازه‌گیری میزان فیبر: میزان فیبر خام به روش وینده[1] اندازه‌گیری شد (ISO, 1981).

استخراج عصاره

عصاره‌گیری مستقیم با حلال

جهت عصاره‌گیری مستقیم با حلال، حلال‌های مختلف (اتانول ۸۰٪، متانول ۸۰٪ و آب) با نسبت ۱۰ به ۱ به پودر بنه زعفران اضافه شد. نمونه‌ها پس از آماده‌سازی در ارلن با فویل آلومینیوم پوشانیده شد و در دمای آزمایشگاه به مدت ۲۴ ساعت هم زده شد حاصل صاف شد و روی صافی مجدداً به همراه حلال ۲۴ ساعت دیگر عصاره گیری شد.

عصاره‌گیری به کمک فراصوت: بدین منظور، حلال‌های مختلف (اتانول ۸۰٪، متانول ۸۰٪ و آب) با نسبت ۱۰ به ۱ به پودر پیاز زعفران اضافه شد. نمونه‌ها پس از آماده‌سازی در ارلن با فویل آلومینیوم پوشانیده شد و در دمای آزمایشگاه در شدت ۱۰۰ درصد و سه زمان (۰، ۲۰ و ۴۰ دقیقه) در فراصوت قرار گرفتند سپس فرایند همانند عصاره‌گیری به روش حلال ادامه یافت.

محاسبه بازده استخراج: اختلاف وزن اولیه پلیت و وزن نهایی آن بازده استخراج محاسبه،و به صورت درصد بیان شد.

اندازه‌گیری ترکیبات فنلی کل: به روش فولین سیوکالچو (Capannesi et al., 2000) محلول‌های استاندارد اسید گالیک در متانل با غلظت‌های مختلف در دامنه ۰/۰۴ تا ۰/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آماده شد. سپس به بالن‌های حجم سنجی ۵۰ میلی‌لیتر، یک میلی‌لیتر محلول استاندارد اسید گالیک، ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالچو (برای تهیه این معرف، معرف فولین سیوکالچو غلیظ با آب مقطر به نسبت یک به ده رقیق میشود) و ۵ میلی-لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد اضافه و با آب خالص به حجم نهایی رسانده شد. محلول در طول شب نگهداری و سپس جذب آن در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. منحنی میزان جذب در برابر غلظت اسید گالیک (میلی‌گرم به میلی‌لیتر) رسم شد و رابطه ۱ با ضریب تبیین ۰/۹۹ به دست آمد:

$$Y = 0.0776X^2 + 0.2644X + 0.0099 \quad (۱)$$

اندازه‌گیری قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH[2]: برای اندازه‌گیری قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد آنتی‌اکسیدان‌ها از رادیکال‌های آزاد مختلفی مثل رادیکال‌های DPPH، پراکسی، هیدروکسیل و سوپراکسی استفاده می‌شود (Wanasundara & Shahidi, 2005).

اندازه‌گیری قدرت احیاءکنندگی آهن III: برای ارزیابی قدرت احیاکنندگی آنتی‌اکسیدان‌ها از روش‌های FRAP[3] و تیوسانات استفاده می‌شود (Benzie & Strain, 1996).

طرح به روش فاکتوریل ۲ متغیره با پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. میانگین‌ها با نرم‌افزار MStatC و بر اساس آزمون دانکن در سطح پنج درصد (p<۰/۰۵) مقایسه شدند. به منظور برازش‌دهی منحنی‌ها از نرم‌افزار SigmaPlot استفاده شد. نمودارها با نرم افزارMicrosoft Excel ترسیم گردیدند.

نتایج و بحث

پیاز زعفران از نظر نوع و میزان درصد ترکیبات شیمیایی مورد تجزیه قرار گرفت. ترکیبات شیمایی پیاز زعفران در جدول ۱ نشان داده شده است.

1-Weende

2 -1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl

3 -Ferric Reducing Activity of Plasma

جدول ۱- درصد ترکیبات شیمیایی پیاز زعفران
Table 1- Percentage of chemical composition of saffron corm

ترکیبات فنلی Phenolic compounds ($mg.ml^{-1}$)	فیبر خام Crude Fiber (%)	چربی Fat (%)	خاکستر Ash (%)	پروتئین Protein (%)	کربوهیدرات Carnohydrate (%)	رطوبت Moisture (%)
11.08	3.12	3.82	0.15	8.08	19.2	6.5

جدول شماره ۱ نشان می‌دهد بخش اعظم ترکیبات موجود در پیاز زعفران را کربوهیدرات (۷۹/۲ درصد) تشکیل می‌دهد. اسماعیلی و همکاران (Esmaeili et al., 2013) مقدار ترکیبات فنلی استخراج شده با حلال‌های مختلف در دوره خواب را ۲/۲- ۱/۳ میلی‌گرم در گرم پیاز زعفران تازه اعلام نمودند. چرانگو و فاروق (Chrungoo & Farooq, 1985) نشان دادند مقدار نشاسته و قندهای محلول طی دوره خواب پیاز زعفران از اردیبهشت تا مرداد به ترتیب ۵۲-۱۹ و ۵۲-۲۲ درصد ماده خشک بود. تفاوت مقادیر بدست آمده با نتایج این تحقیق احتمالاً به دلیل تفاوت در منطقه تولید و شرایط اکولوژیک دو محل آزمایش باشد. روبیو- موراگا و همکاران (Rubio-Moraga et al., 2011) مقدار ترکیبات فنلی موجود در بخش‌های داخلی پیاز زعفران را بر اساس مقدار اسید گالیک ۴۳ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم پیاز زعفران تازه گزارش کردند. در پیاز زعفران بیشترین و کمترین ترکیبات فنلی را به ترتیب جنتیسیک اسید و گالیک اسید تشکیل می‌دهند (Esmaeili et al., 2013).

اثر حلال بر راندمان استخراج و خواص آنتی اکسیدانی عصاره پیاز زعفران

تجریه واریانس اثر حلال بر خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره پیاز زعفران نشان داد نوع حلال اثر معنی‌داری بر کلیه ویژگی-های مورد آزمون داشت (نتایج نشان داده نشدند). جدول ۲ مقایسات میانگین اثر حلال بر خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره پیاز زعفران را نشان می‌دهد. جدول ۲ نشان می‌دهد حلال‌های متانول و اتانول در مقایسه با آب مقدار ترکیبات فنلی بیشتری را از پیاز زعفران استخراج نمودند و عصاره‌های حاصل قدرت گیرندگی رادیکال آزاد و مهارکنندگی آهن بیشتر و راندمان بالاتری داشت. افزایش در فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مقدار ترکیبات فنلی عصاره اتانولی در مقایسه با متانولی و آبی احتمالاً به دلیل اختلاف در قطبیت و ویسکوزیته حلال‌ها می‌باشد حلالی مانند متانول یا اتانول به راحتی به داخل منافذ مواد گیاهی رسوخ می‌کند و موجب خروج ترکیبات زیست فعال (مانند آنتی‌اکسیدان‌ها) می‌گردد (Hemwimol et al., 2012; Naczk & Shahidi, 2006).

همچنین عصاره اتانولی در مقایسه با عصاره متانولی قدرت گیرندگی رادیکال آزاد بیشتری از خود نشان داد. بیشترین ترکیبات فنلی در عصاره اتانولی پیاز زعفران (۸۵/۸۴ $mg.ml^{-1}$) مشاهده شد. اسماعیلی و همکاران (Esmaeili et al., 2013) بیان کردند ترکیبات فنلی در اواخر دوره بیداری پیاز زعفران افزایش می‌یابند تا دوره خواب در پیاز زعفران القا گردد تا از آن در مقابل استرس‌ها محافظت نماید و مقدار آن را درعصاره آبی، اتانولی و متانولی پیاز زعفران به ترتیب۲/۲۲، ۱/۹۸ و ۱/۳۱ میلی‌گرم در گرم پیاز زعفران تازه گزارش کردند.

قدرت گیرندگی رادیکال آزاد و مهادکنندگی آهن نیز در عصاره اتانولی به ترتیب با ۵۹/۴۲ درصد و ۵۹۴ /۷۴ $\mu mol.ml^{-1}$) ([1] در مقایسه با سایر عصاره ها بیشتر بود ($p<0/05$).

جدول ۲- مقایسات میانگین اثر حلال بر راندمان استخراج و خواص آنتی اکسیدانی عصاره پیاز زعفران

Table 2- Compare means of solvent effect on yield extraction and Antioxidant abilities of saffron corm extract

حلال Solvent	قدرت گیرندگی رادیکال Radical scavenging power of DPPH (Inhibition %)	قدرت احیاکنندگی آهن Reducing power of FeIII ($\mu mol.ml^{-1}$)	ترکیبات فنلی Total phenolic compounds ($mg.ml^{-1}$)	راندمان استخراج عصاره Extraction yield (%)
آب Water	42.24^{c}	351.3^{a}	42.54^{b}	0.46^{b}
متانول Methanol (80%)	56.5^{b}	572.51^{a}	77.6^{a}	1.07^{a}
اتانول Ethanol (80%)	59.42^{a}	594.74^{a}	85.84^{a}	1.17^{a}

*At each column the numbers with common letters don't have statistical significant different (Dunken $p<0.05$).

*اعداد دارای حروف مشترک در هر ستون از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند (آزمون دانکن، $p<۰/۰۵$).

اثر فراصوت بر راندمان استخراج و خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره پیاز زعفران

تجریه واریانس اثر فراصوت در شدت ۱۰۰ درصد بر خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره پیاز زعفران نشان داد فراصوت اثر معنی-داری بر کلیه ویژگی‌های مورد آزمون داشت (نتایج نشان داده نشدند). جدول ۳ مقایسات میانگین اثر فراصوت بر خواص آنتی اکسیدانی عصاره پیاز زعفران را نشان می‌دهد. جدول ۳ نشان می‌دهد امواج فراصوت در شدت ۱۰۰ درصد در مقایسه با نمونه شاهد به طور معنی‌داری مقدار ترکیبات فنلی کل، قدرت مهارکنندگی آهن III و قدرت گیرندگی رادیکال آزاد بیشتری داشت اما از نظر راندمان استخراج تیمارها تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند ($p<۰/۰۵$).

جدول ۳- مقایسات میانگین اثر فراصوت بر راندمان استخراج و خواص آنتی اکسیدانی عصاره پیاز زعفران

Table 3- Compare means of ultrasonic effect on yield extraction and Antioxidant abilities of saffron corm extract

زمان فراصوت Ultrasonic time (minute)	قدرت گیرندگی رادیکال Radical scavenging power of DPPH (Inhibition %)	قدرت احیاکنندگی آهن Reducing power of FeIII ($\mu mol.ml^{-1}$)	ترکیبات فنلی Total phenolic compounds ($mg.ml^{-1}$)	راندمان استخراج عصاره Extraction yield (%)
0	57.7^{c}	459.71^{c}	69.98^{c}	0.98^{a}
20	59.53^{b}	527.32^{b}	75.33^{b}	0.82^{a}
45	64.37^{a}	643.51^{a}	82.33^{a}	0.90^{a}

*At each column the numbers with common letters don't have statistical significant different (Dunken $p<0.05$).

*اعداد دارای حروف مشترک در هر ستون از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند (آزمون دانکن، $p<۰/۰۵$).

شدت صوت بر میزان راندمان عصاره‌گیری، احتمالاً به دلیل نیروی برشی ایجاد شده ومحتوای انرژی بالای این امواج و تأثیر آن‌ها درشکستن و متلاشیکردن دیواره‌های سلولی و افزایش احتمال رهایش محتویات آن‌ها به محیط استخراج و بهبود انتقال جرم باشد، امواج فراصوت همچنین سببکاهش اندازه ذرات می-شوند که سطح تماس را افزایش داده و در نتیجه انتشار حلال

افزایش می‌یابد (Lee et al., 2007). حیدری مجد و همکاران (Heidary et al., 2006) بیان کردند که روش فراصوت ترکیبات فنولیک بیشتری را از گیاه پونه گاوی نسبت به روش غرقابی استخراج کرد و دلیل آن را استرس برشی حاصل از امواج فراصوت بر روی ترکیبات فنولیک بیان نمودند.در پژوهش انجام شده بر روی پوست نارگیل جهت بهینه‌سازی استخراج ترکیبات فنولیک با استفاده از اولتراسونیک نیز چنین نتیجه‌ای مشاهده شد (Rodrigues et al., 2008).

اثر متقابل نوع حلال و فراصوت بر راندمان استخراج و خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره پیاز زعفران

تجریه واریانس اثر متقابل حلال و فراصوت بر راندمان استخراج و خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره پیاز زعفران نشان داد نوع حلال اثر معنی‌داری بر کلیه ویژگی‌های مورد آزمون داشت (نتایج نشان داده نشدند).

مقایسات میانگین اثر متقابل نوع حلال و فراصوت بر راندمان استخراج و خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره پیاز زعفران در جدول ۴ نشان داده شده است. جدول ۴ نشان می‌دهد بیشترین راندمان استخراج عصاره در تیمارهای متانول و اتانول مشاهده شد و کمترین میزان راندمان در عصاره آبی. میزان ترکیبات فنلی در عصاره اتانولی بیشرین مقدار بود و انجام فرایند فراصوت تا ۴۰ دقیقه موجب افزایش مقدار استخراج ترکیبات فنلی گردید.

انجام فرایند اولتراسونیک در نمونه های استخراج شده به وسیله حلال آب تأثیر منفی بر میزان ترکیبات فنلی داشت زیرا پیاز زعفران ماده ای با حدود ۸۰ درصد نشاسته است و با افزایش زمان فراصوت و ژلاتینی‌زه شدن نشاسته خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره پیاز زعفران نیز تغییر می‌کند. امواج فراصوت به طرق مختلف بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نشاسته تأثیر می‌گذارد که عبارتنداز ایجاد حفره در گرانول‌های نشاسته، تخریب مولکول‌های نشاسته، تخریب شیمیایی با رادیکال‌های هیدروکسیل و محلول شدن گرانول‌های نشاسته. امواج فراصوت پیوند C-C نشاسته را تخریب می‌کند و منافذ و سوراخ-های مخروطی شکلی روی سطح یا درون گرانول نشاسته ایجاد می‌کند و با افزایش مدت زمان اعمال فرآیندشدت صدمات وارده به گرانول افزایش می یابد.دراثر ایجاد این شکاف ها و منافذ سطح ویژه گرانول‌های نشاسته نیز زیاد می‌شود ویسکوزیته و پایداری حرارتی نشاسته تیمار شده با امواج فراصوت نیز به طور معنی‌داری زیاد می‌شود که احتمالاً به علت تشکیل گروه‌های جدید و ایجاد اتصالات عرضی در طی تجزیه ماکرومولکول-هاست (Zhu et al., 2012).

همانطور که در جدول ۴ نمایان است عصاره‌های اتانولی و متانولی در مقایسه با آبی به طور معنی‌داری مقدار ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری را استخراج نمودند. حلالیت ترکیبات زیست فعال در حلال‌های مختلف که برای استخراج به کار می‌روند مقدار بازیافت پلی فنل‌ها و آنتی‌اکسیدان از مواد گیاهی را تحت تأثیر قرار می‌دهند و مقدار حلالیت این ترکیبات به قطبیت حلال بستگی دارد (Naczk & Shahidi, 2006; Annegowda et al., 2011). یک نوع ماده گیاهی ممکن است در حلال‌های مختلف از نظر فعالیت آنتی اکسیدانی نتایج متفاوتی را نشان دهد. این موضوع اساساً به علت خصوصیات شیمیایی مختلف ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در حلال‌های مختلف با قطبیت‌های مختلف است.

جدول ۴ نشان میدهد تیمار اولتراسونیک با حلال‌هایی مانند متانول و اتانول میزان استخراج ترکیبات زیست فعال را افزایش داد. که اساساً به علت تأثیر القایی امواج فراصوت بر ساختمان سلولی است که با ایجاد کاویتاسیون و ترکیدن حبابها موجب افزایش انتقال جرم می‌شوند و دیواره‌های سلولی شکسته شده و واکنش داخلی بین حلال و مواد گیاهی را افزایش می‌دهد. به-علاوه امواج فراصوت، قابلیت استخراج مواد در دماهای پایین را

بهبود مـی بخشـد (Albu et al., 2004). معمـولا در فراینـدهای استخراج معمول ترکیبات فنلی دارای قابلیـت آنتـی‌اکسـیدانی در اثر حرارت ازبین می‌روند و در نتیجه رانـدمان مناسـبی را ندارنـد استخراج به کمک فراصوت در دمای پـایین رانـدمان بـالاتری را موجب می‌گردد (Paniwnyk et al., 2009).

جدول ٤- مقایسات میانگین اثر متقابل حلال و فراصوت بر راندمان استخراج و خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره پیاز زعفران

Table 4- Compare means of ultrasonic effect on yield extraction and antioxidant abilities of saffron corm extract

حلال Solvent	زمان اولتراسونیک Ultrasonic time (minute)	قدرت گیرندگی رادیکال Radical scavenging power of DPPH (Inhibition %)	قدرت احیاکنندگی آهن Reducing power of FeIII (µmol.ml^{-1})	ترکیبات فنلی Total phenolic compounds (mg.ml^{-1})	راندمان استخراج عصاره extraction yield (%)
آب	0	67.97^{a}	538.5^{cd}	59.34^{d}	0.72^{bc}
water	20	15.33^{e}	94.14^{e}	10.43^{e}	0.39^{cd}
	45	16.337^{e}	52.56^{e}	10.08^{e}	0.26^{d}
متانول ۸۰٪	0	62.66^{b}	486.78^{d}	62.27^{d}	0.98^{ab}
Methanol 80%	20	42.24^{d}	603.8^{ab}	71.06^{c}	1.01^{ab}
	45	58.60^{bc}	626.96^{a}	77.33^{b}	1.22^{a}
اتانول ۸۰٪	0	42.47^{d}	544.4^{cd}	77.07^{b}	1.24^{a}
Ethanol 80%	20	54.92^{c}	529.64^{cd}	73.76^{c}	1.2^{ab}
	45	41.58^{d}	562.22^{c}	88.87^{a}	1.22^{a}

*At each column the numbers with common letters don't have statistical significant different (Dunken p<0.05).

*اعداد دارای حروف مشترک در هر ستون از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند (آزمون دانکن، p<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری

این تحقیق نشان داد پیـاز زعفـران حـاوی ترکیبـاتی ماننـد کربوهیدرات (۷۹/۲ درصد)، پروتئین، و ترکیبات فنلـی مـی‌باشـد که مقدار آن‌ها در واحد وزن پیاز قابـل توجـه مـی‌باشـد. حـلال متانول و اتانول در مقایسه با آب راندمان استخراج عصاره بیشـتر و مقدار ترکیبات فنلی بیشتری را از پیاز زعفران استخراج نمودنـد و عصاره‌های حاصل قدرت گیرندگی رادیکال آزاد و مهارکنندگی آهن بیشتر و راندمان بالاتری داشـتند بـا افـزایش زمـان اعمـال فراصوت تا ۴۵ دقیقه بدون داشـتن تـأثیر معنـی‌دار بـر رانـدمان استخراج، مقدار ترکیبات فنلی، و قـدرت آنتـی‌اکسـیدانی عصـاره پیاز زعفران افزایش یافت. امواج فراصوت در شـدت ۱۰۰ درصـد در حلال آب، کاهش چشـمگیری در رانـدمان اسـتخراج، نـوع و میزان ترکیبات زیست فعال داشت به طوریکـه رانـدمان از ۰/۷۲ در نمونه شاهد به ۰/۳۹ درصد و ۰/۲۶ درصد در ۲۰ و ۴۵ دقیقه اعمال فراصوت کاهش یافـت. در مـورد سـایر حـلال‌هـا امـواج فراصوت به مدت ۴۵ دقیقـه بیشـترین ترکیبـات فنلـی و قـدرت مهارکنندگی آهن III را به ترتیب در حلال‌های اتانول و متـانول نشان داد و در مقایسه با نمونه شاهد به طـور معنـی‌داری مقـدار ترکیبات فنلی کل و قدرت مهارکنندگی آهن III بیشتری داشـت (P<۰/۰۵).

منابع

Anonymous. 2016. Agricultural Statistics. Gardening products. Ministry of Jihad-e-Agriculture. Tehran. (In Persian).

Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J.P., and Mason, T.J. 2004. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. Ulrasonic Sonochemistry 11 (3-4): 261-265.

Altemimi, A., Watson, D., Choudhary, R., and Dasari, M. 2016. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from peaches and pumpkins. Plus One 11 (2): 1-20.

Annegowda, H.V., Bhat, R., Tze, L.M., Karim, A.A., and Mansor, S.M. 2011. The free radical scavenging and antioxidant activities of pod and seed extract of *Clitoria fairchildiana* (Howard) - an underutilized legume. Journal of Food Science Technology June 50 (3): 535–541.

AOAC, 2000a. Official methods of analysis. Method 990.20. Determination of solids by direct forced air oven drying method. Washington, DC: AOAC.

AOAC, 2000b. Official methods of analysis. Method 990.20. Determination of ash by gravimetric method. Washington, DC: AOAC

Bagri, J., Yadav, A., Anwar, Kh.,Dkhar, J., Singla-Pareek, S.L., and Pareek, A. 2017. Metabolic shift in sugars and amino acids regulates sprouting in Saffron corm. Scientific Reports 7 (1) 11904: 1-10.

Benzie, I.F.F., and Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical Biochemistry 239V (1): 70-76.

Capannesi, C., Palchetti, I., Mascini, M., and Parenti, A. 2000. Electrochemical sensor and biosensor for polyphenols detection in olive oils. Food Chemistry 71 (4): 553–562.

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. Biochemistry Physiology Pflanzen 180 (1): 55-61.

Escribano, J., Rios, I., and Fernandez, J.A. 1999. Isolation and cytotoxic properties of a novel glycoconjugate from corms of saffron plant (*Crocus sativus* L.). Biochimica et Biophysica Acta 1426: 217-222.

Esmaeili, N., Ebrahimzadeh, H., Abdi, K., Mirmasoumi, M., Lamei, N., and AziziShamami, M. 2013. Determination of metal content in *Crocus sativus* L. corms in dormancy and waking stages. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 12 (1): 31-36. (In Persion with English Summary).

Gong, Y., Zhang, X., Li, H., Yan, Q., Yuan, F., and Gao, Y. 2015. Optimization of subcritical water extraction parameters of antioxidant polyphenols from sea buckthorn (*Hippophaër hamnoides* L.) seed residue. Journal of Food Science and Technology 52 (3):1534-1542.

Heidary, M., Mortazavi, A., Asili, J., Bolourian, SH., Armin, M., and Abdalshahi, A. 2012. Ultrasonic assisted extraction improvement of phenolic compound from *Flomido schemaparviflora*. Journal of Herbal Drugs 3 (1): 7-13. (In Persion with English Summary).

Hemwimol, S. Pavasant, P., and Shotipruk, A. 2006. Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. Ultrasonic Sonochemistry 13 (6): 543–548.

ISO. 1981. Agricultural foodproducts: determination of crude fibre generalmethod (Weende, ISO 5498) International Organization for Standardization. Geneve.

Lee, E., Wylie, E., and Metcalf, C. 2007. Ultrasound imaging features of radial scars of the breast. Journal of Australasian Radiology 51

(3): 240–245.

Naczk, M., and Shahidi, F. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. Journal of Pharmacology Biomed Analitical 41 (5): 1523–1542.

Paniwnyk, L., Cai, H., Albu, S., Mason, TJ., and Cole, R. 2009. The enhancementand scale up of the extraction of antioxidant from *Rosmarius officinalis* using ultrasound. Ultrasond Sonochemistry 16 (2): 287–292.

Rodrigues, S., Pinto, G.A.S., and Fernandes, F.A.N. 2008. Optimization of ultrasound extraction of phenoliccompounds from coconut (*Cocosnu cifera*) shellpowder by response surface methodology. Journal Ultrasonics Sonochemistry 15 (1): 95-100.

Rubio-Moraga, A., Gerwig, G.J., Castro-Diaz, N., Luisa Jimeno, M., Escribano, J., Fernandwz, J.A., and Kamerling, J.P. 2011. Triterpenoidsaponins from corms of *Crocus sativus*: Localization, extraction and characterization. Industrial Crops and Products 34 (2011): 1401-1409.

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

Wanasundara, P.K., and Shahidi, F. 2005. Antioxidants: Science, Technology, and Applications. In Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Shahidi, F. (Eds). John Wiley & Sons, Inc. New Jersey.

Zhu, J., Li, L., Chen, L., and Li, X. 2012. Study on supramolecular structural changes of ultrasonic treated potatostarch granules. Food Hydrocolloids 29 (1):116–122.

The Effects of Extraction Conditions on Bioactive Compounds of Saffron Corm Extract

Soodabeh Einafshar[1*] and Parvin Sharayei[1]

Submitted: 5 February 2019 **Accepted:** 14 May 2019

Einafshar, S., and Sharayei, P. 2020. The Effects of Extraction Conditions on Bioactive Compounds of Saffron Corm Extract. Saffron Agronomy & Technology, 8(1): 89-98.

Abstract

Saffron is a unique product of Iran and Saffron corm is one of the saffron producing ingredients that is produced annually in a high volume in the country. It is shown that saffron corm is a low-cost material which contains some extractable bioactive compounds. The extraction method affects the kind and amount of bioactive material extracted from the saffron corm. Therefore, this research study was carried out in order to produce high value-added materials from the waste saffron corm. First, the saffron onion was prepared, dried and completely ground. Extracting was performed using a solvent (80% methanol, 80% ethanol and water) and ultrasound (100% intensity, 0, 20 and 40 minutes at room temperature). The extracts were dried by rotary evaporation. In each case, extraction efficiency, determination of minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), phenolic compounds, iron regeneration strength III, and free radical receptivity were determined. In order to investigate the independent effect (the type of solvent, ultrasound intensity) and interaction (solvent type and ultrasound intensity) on bioactive compounds of saffron onion extract, a factorial arrangement of 2 variables with completely randomized design was used in three replications. Mean comparison was done by the Duncan method. The results showed that Ethanol solvent extracted 85.84 $mg.ml^{-1}$ of phenolic compounds with the highest reducing power of FeIII (594.7 $\mu mol.ml^{-1}$), radical receptivity (59.42%), and ultrasound process at 100% for 40 minutes extracted the highest amount of phenolic compounds (82.23 $mg.ml^{-1}$).

Keywords: Antioxidative ability, antimicrobial power, reducing power of FeIII, saffron corm.

1 - Agricultural Engineering Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, IRAN.
(*- Corresponding author. Email: soodabeheyn@yahoo.com)
DOI: 10.22048/jsat.2019.170014.1336