مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

بررسی خاصیت ضد باکتریایی عصاره قسمت‌های مختلف زعفران و کاربرد آن در خامه

درنوش جعفرپور[۱*]، سید محمدباقر هاشمی[۲]، اعظم قائدی[۳]

۱ استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد فسا، دانشگاه آزاد اسلامی، فسا، ایران

۲ دانشیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فسا، فسا، ایران

۳ دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد فسا، دانشگاه آزاد اسلامی، فسا، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۹۹ /۰۳/۰۸

تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۲/۱۷

کلمات کلیدی:

ضد میکروبی،

زعفران،

عصاره،

خامه.

DOI: 10.29252/fsct.18.06.27

* مسئول مکاتبات:

d.jafarpour84@yahoo.com

چکیده

یکی از راه‌های کنترل رشد باکتری‌های بیماریزا، استفاده از نگهدارنده‌ها و ترکیبات ضد میکروبی است. با توجه به نگرانی‌های عمومی در خصوص عوارض نگهدارنده‌های شیمیایی، تمایل به مصرف محصولاتی است که از نگهدارنده طبیعی استفاده شده است. در این تحقیق، عصاره اتانولی شش قسمت از زعفران (کلاله، ریشه، گلبرگ، ساقه، پیاز و پرچم) تهیه شد و میزان ترکیبات فنولی عصاره قسمت‌های مختلف زعفران، خاصیت ضد میکروبی، حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) آن‌ها بر روی باکتری‌های گرم منفی (*اشرشیاکلای و سالمونلاتیفی*) و باکتری‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس*) مورد ارزیابی قرار گرفت. هم-چنین، عصاره‌ای که بیشترین خاصیت ضد میکروبی نشان داد، انتخاب شده و اثرات ضد میکروبی آن در سه سطح غلظت ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ ٪ (w/v) بر روی خامه مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد از بین عصاره قسمت‌های مختلف زعفران، عصاره گلبرگ دارای بیشترین مقدار ترکیبات فنولی و اثر ضد میکروبی می‌باشد. بیشترین اثر عصاره اتانولی گلبرگ بر روی باکتری‌های گرم مثبت *باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس* مشخص شد. کمترین مقدار MIC و MBC برای گلبرگ به ترتیب در غلظت ۳/۱۲ و ۶/۲۵ (میلی گرم/ میلی لیتر) بدست آمد. در خامه تیمار شده با ۰/۷۵٪ عصاره گلبرگ، شمارش کلی باکتری‌ها به طور معنی‌داری کمتر از دو غلظت دیگر بود. هم‌چنین نتایج ارزیابی حسی خامه‌های تیمار شده نشان داد که غلظت ۰/۵ درصد به عنوان بهترین نمونه توسط افراد ارزیاب حسی امتیازدهی شد. بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده عصاره گلبرگ زعفران می‌تواند به عنوان گیاهی ارزشمند در جهت مقابله با بیماری‌های عفونی در نظر گرفته شود و از آن جهت جایگزین نگهدارنده‌های شیمیایی به عنوان یک منبع ضد میکروبی طبیعی در خامه استفاده کرد.

۱- مقدمه

خامه نوعی امولسیون روغن در آب است که توسط فرایند خامه زنی از شیر بدست می‌آید. این فرآورده همانند شیر نوعی امولسیون روغن در آب است که چربی فاز پراکنده و آب فاز پیوسته است. خامه به دلیل فعالیت آبی بالا بسیار مستعد آلودگی و فساد است. فرآورده‌های لبنی در طی مراحل تولید، عرضه و نگهداری تا انقضای مصرف در اثر عدم رعایت اصول بهداشتی توسط میکروارگانیسم‌ها آلوده می‌شوند. در صورت نگهداری طولانی مدت لبنیات اهمیت بررسی فساد میکروبی بیشتر آشکار می‌شود [۱]. کنترل رشد باکتری‌های بیماریزا در مواد غذایی از نظر قوانین استاندارد کیفی مواد غذایی و هم چنین از نظر بهداشت و سلامت عمومی حائز اهمیت فراوان است. یکی از راههای کنترل رشد باکتری‌های بیماریزای مواد غذایی، استفاده از نگهدارنده‌ها و ترکیبات ضد میکروبی است. با توجه به نگرانی‌های عمومی در خصوص عوارض نگهدارنده‌های شیمیایی، تمایل به مصرف محصولاتی است که فاقد نگهدارنده بوده و یا از نگهدارنده طبیعی استفاده شده است. به همین دلیل در سال‌های اخیر، مطالعات زیادی پیرامون نگهدارنده‌های طبیعی صورت گرفته است. عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی و اجزای تشکیل دهنده آنها دارای اثرات شناخته شده ضد باکتریایی هستند [۲].

زعفران با نام علمی *Crocus sativus*، گیاهی چند ساله از خانواده زنبقیان (Iridaceae)، با جام گلی مشتمل بر سه گلبرگ و سه کاسبرگ به رنگ های بنفش یا بنفش روشن مایل به ارغوانی بوده که دارای سه پرچم زرد و کلاله سه‌شاخه‌ای به رنگ قرمز پررنگ است. زراعت و تکثیر گیاهان زعفران به وسیله پیاز آن صورت می‌گیرد. پیاز زعفران، سفیدرنگ، به‌اندازه فندق یا گردو با پوششی از الیاف ظریف قهوه‌ای خاکی‌رنگ است [۳]. گیاه زعفران متداولا به عنوان ماده افزودنی و رنگ آمیزی مواد غذایی مورد استفاده قرار می گیرد. اخیراً ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در بخش‌های گل این گیاه، به خاطر پتانسیل کاربرد در بخش سلامت و صنایع غذایی، مورد توجه جامعه‌ی علمی قرارگرفته است. تاکنون مقادیر مختلفی از کربوهیدرات‌ها (ازجمله مالتوز، اینوزیتول، سوربیتول و متانیتول)، عناصر معدنی (فسفر، منیزیم، کلسیم، آهن، پتاسیم) [٤]، مشتقات کاروتنویید (کروستین، کروسین‌ها و لوتئین دی استرها) [٥]، پیکروکروسین و کروکوساتین و ترکیبات فنولیک (بنزوییک اسید، هیدروکسی سینامیک اسید) [٦]، آنتوسیانین‌ها و فلاونوییدها [٧] در گلبرگ زعفران گزارش شده است. Azami و همکاران (۲۰۱۲)، اثر ضد باکتری عصاره‌های آبی گلبرگ زعفران بر برخی از باکتری‌های بیماری‌زای غذایی را بررسی و گزارش کردند که عصاره‌های گلبرگ زعفران می‌تواند به‌عنوان نگه‌دارنده طبیعی بر ضد برخی باکتری‌ها مورد استفاده قرار گیرد و استفاده از این عصاره را در مواد غذایی پیشنهاد کردند [٨]. Afshar Mohammedan و همکاران (۲۰۱٦)، با استفاده از حلال متانل اسیدی عصاره کلاله و گلبرگ سه گونه مختلف زعفران را استخراج و خاصیت ضد باکتریایی خوبی برای آن‌ها مشاهده کردند [۹].

تا کنون اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی قسمت‌های مختلف زعفران و کاربرد آن در خامه گزارش نشده است، از این‌رو هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره الکلی قسمت‌های مختلف گیاه زعفران بوده و از بین عصاره ها، بهترین عصاره از لحاظ خصوصیات ضد میکروبی انتخاب و در خامه مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد

سوش‌های استاندارد باکتری‌های *Bacillus cereus* (PTTC 1015)، *Staphylococcus aureus* (PTCC 1784)، *Salmonella* Typhi (PTCC 1609) و *Escherichia coli* (PTCC 1399) به صورت لیوفیلیزه از کلکسیون میکروبی مؤسسه تحقیقات صنعتی ایران تهیه شدند.گیاه زعفران مورد استفاده در این پژوهش، از مزرعه‌ای واقع در یکی از روستاهای نزدیک مشهد جمع آوری و پس از جداسازی قسمت‌های مختلف، در سایه به دور از نور آفتاب خشک گردید. خامه پاستوریزه از شرکت پگاه فارس، تمامی محیط کشت‌های مصرفی و ترکیبات اتانول، فولین-سیوکالتو و کربنات سدیم از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

۲-۲- استخراج عصاره الکلی قسمت‌های مختلف زعفران

جهت تهیه عصاره الکلی، ٤٠ گرم از قسمت‌های مختلف زعفران (کلاله[1]، گلبرگ[1]، ساقه[2]، پرچم[3]، ریشه[4] و پیاز[5]) توسط

1. Stigma

ترازوی دیجیتال وزن و با آسیاب خانگی (بوش، آلمان) پودر شدند. سپس ۴۰۰ میلی‌لیتر اتانول به پودرها اضافه و با استفاده از شیکر به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق عصاره گیری انجام شد. جهت حذف رسوبات سوسپانسیون، به کمک سانتریفیوژ (مدل ۵۸۱۰، آلمان) رسوب‌گذاری انجام و با کاغذ صافی ۰/۴۵ میکرون صاف و فاز بالایی به درون بشر انتقال داده شد. به منظور حذف کامل حلال از عصاره‌های بدست آمده، از دستگاه تبخیر کننده دوار (مدل R-1005، شرکت LabTech، ایتالیا) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد و در نهایت عصاره‌های خالص به‌دست‌آمده در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد برای استفاده در مراحل بعدی آزمایش نگهداری شدند.

۲-۳- اندازه‌گیری میزان فنول کل عصاره‌های خام (TPC[6])

میزان ترکیبات فنولی موجود در عصاره‌ها به روش فولین- سیوکالتو[7] اندازه‌گیری شد. این روش رنگ سنجی بر اساس احیا کمپلکس فسفو تنگستات در شرایط قلیایی توسط ترکیبات فنولی به محصولات آبی‌رنگ است. بر طبق این روش به‌طور خلاصه، ۴۰۰ میکرو لیتر از عصاره به همراه ۲۰۰ میکرو لیتر از معرف فولین-سیوکالتو با آب مقطر به همراه ۱۶۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم مخلوط شدند و به مدت ۱۵ ثانیه هم زده، بعد از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد (جهت توسعه رنگ)، جذب نوری آن توسط اسپکتروفوتومتر در طول‌موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. مقادیر فنول تام در نمونه‌های عصاره با استفاده از منحنی استاندارد برحسب میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره بیان گردید [۱۰].

۲-۴- ارزیابی خصوصیت باکتریایی عصاره‌های خام به روش انتشار چاهک

برای تجزیه و تحلیل فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها از روش انتشار چاهک استفاده شد. نمونه‌های میکروبی بر اساس روش توصیه شده فعال‌سازی گردیدند. به منظور تهیه سوسپانسیون میکروبی از کشت تازه و جوان باکتری چند کلونی به محیط کشت نوترینت براث[8] منتقل و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جهت رشد قرار داده شدند. پس از گرمخانه گذاری، سوسپانسیون باکتری معادل استاندارد نیم مک فارلند در محلول سرم فیزیولوژی استریل تهیه و بعد از رقت سازی مقدار 10^6 CFU/mL از سوسپانسیون باکتری تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری تهیه شده در سطح پلیت‌های حاوی محیط کشت نوترینت آگار[9] منتقل و با سوآپ استریل کشت داده شد. پس از ایجاد چاهک، ۶۰ میکرولیتر از محلول حاوی عصاره‌ی فیلترشده (با غلظت ۱۵۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به صورت کاملاً استریل به چاهک‌ها انتقال داده و پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. پس از طی این مدت کشت‌های باکتریایی ازنظر تشکیل یا تشکیل نشدن هاله عدم رشد، بررسی و قطر هاله عدم رشد برحسب میلی‌متر توسط کولیس اندازه‌گیری شد [۱۱].

۲-۵- حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره‌ها

برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی[10] (MIC) و حداقل غلظت کشندگی[11] (MBC) عصاره قسمت‌های مختلف زعفران، از روش میکرودایلوشن[12] با استفاده از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای استریل انجام شد. باکتری‌های مذکور به مدت ۲۴ ساعت پیش از انجام آزمایش، در محیط‌کشت نوترینت براث کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. محلول اصلی عصاره‌ها با رقت ۱۵۰میلی‌گرم بر میلی-لیتر توسط دی‌متیل سولفوکساید[13] تهیه شد. ابتدا در هر چاهک میکروپلیت ۱۰۰ میکرو لیتر محیط کشت نوتریتنت براث ریخته شد. سپس در چاهک اول و دوم ۱۰۰میکرولیتر از هر کدام عصاره ها ریخته و سپس از چاهک دوم ۱۰۰ میکرولیتر برداشته به چاهک سوم و از سوم به چهارم الی چاهک ۹ انتقال داده شد. از چاهک ۹ مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره خارج گردید. به چاهک شاهد باکتری، عصاره اضافه نشد. پس از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌های مورد نظر، رقت 10^6 CFU/mL تهیه شد و در تمامی چاهک‌ها به جز شاهد عصاره، ۱۰۰

1. Petal
2. Stem
3. Stamen
4. Style
5. Corm
6. Total Phenolic Compounds
7. Folinciocalteu

8. Nutrient broth
9. Nutrient agar
10. Minimum Inhibitory Concentration
11. Minimum Bactericidal Concentration
12. Microdilution
13. Dimethyl Sulfoxide

میکرولیتر از سوسپانسیون ریخته شد. پس از طی زمان انکوباسیون چاهک ها از نظر کدورت و رشد باکتری بررسی شدند. کمترین رقت عصاره که در آن کدورت مشاهده نشد (عدم رشد) به عنوان MIC در نظر گرفته شد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره ها از چاهک هایی که در آن ها عدم رشد مشاهده شده بود، ۵ میکرولیتر برداشته در سطح محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شد. محیط‌های کشت تلقیح شده به مدت ٢٤ ساعت در دمای ٣٧ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. پلیت مربوط به چاهکی که حاوی کمترین غلظت عصاره بود که در آن رشد باکتری مشاهده نگردید به عنوان MBC عصاره در نظر گرفته شد.

٢-٦- بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره انتخابی در خامه

بعد از ارزیابی عصاره‌ها، عصاره‌ای که بیشترین خاصیت ضدمیکروبی داشت به عنوان بهترین عصاره انتخاب و به خامه جهت بررسی خواص ضد میکروبی (در محیط نمونه غذایی) افزوده شد. بدین منظور ابتدا عصاره انتخابی با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد به خامه پاستوریزه افزوده شد و شمارش کلی باکتری خامه‌های تیمار شده با استفاده از روش پورپلیت و محیط کشت پلیت کانت آگار[1] انجام پذیرفت و با خامه شاهد (فاقد عصاره) مورد مقایسه قرار گرفت. دمای نگهداری خامه ها ٤ درجه سانتی‌گراد بود و بررسی در طول دو هفته در بازه های زمانی ١، ٧ و ١٤ روز پس از تیمار صورت گرفت. سپس جهت مشخص شدن اثر ضدمیکروبی عصاره انتخابی بر باکتری‌های مورد آزمایش، به ١٠٠ گرم خامه پاستوریزه از هر کدام از باکتری‌ها به طور جداگانه تلقیح شد به نحوی که غلظت نهایی باکتری‌ها 10^6 CFU/g باشد و عصاره انتخابی نیز با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد افزوده شد. تمامی نمونه‌ها در دمای ٤ و ٢٥ درجه سانتی‌گراد به مدت ١٤ روز نگهداری شدند و پس از مدت زمان نگهداری، درصد بازدارندگی هر کدام از عصاره‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

٢-٧- ارزیابی حسی

ارزیابی حسی نمونه‌های خامه تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره، مطابق روش هدونیک ۵ نقطه‌ای، از بسیار مطلوب (۵) تا بسیار نامطلوب (۱) انجام پذیرفت. در طی این آزمون، صفات رنگ، بو، طعم و مزه، ظاهر و مطلوبیت کلی نمونه‌ها توسط ١٢ نفر ارزیاب بدون محدودیت سنی و جنس مورد ارزیابی قرار گرفتند [١٢].

٢-٨- تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌ها در سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شدند. نتایج ابتدا در معرض تجزیه واریانس یک‌طرفه قرار گرفته و سپس برای مقایسه میانگین‌ها و بررسی اختلاف معنی‌داری بین تیمارها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری ٩۵٪ استفاده گردید. تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ٢٠ انجام شد. منحنی‌های مربوطه در محیط EXCEL توسط نرم‌افزار OFFICE 2016 رسم شدند.

٣- نتایج و بحث

٣-١- میزان ترکیبات فنولی عصاره قسمت‌های مختلف زعفران

نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنولیک کل مربوط به عصاره اتانولی قسمت‌های مختلف زعفران در نمودار ١ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهند که از بین عصاره اتانولی قسمت‌های مختلف زعفران، عصاره گلبرگ و عصاره ریشه و پیاز به ترتیب دارای بیشترین و کمترین مقدار ترکیبات فنولی هستند. Sariri و همکاران (٢٠١١)، میزان فنل کل عصاره متانولی از ضایعات گل *C. sativus* را ٨٦/٦٥ (میلی گرم گالیک اسید در ١ گرم عصاره) گزارش کردند [١٣]. Fallah Shojaee و همکاران (٢٠١٧)، فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره متانولی استویا در دسر لبنی را مورد ارزیابی قرار دادند و گزارش نمودند میانگین کل ترکیبات فنولیک استویا ١٠/٦٤ (گرم تانیک اسید در ١٠٠ گرم استویا) می باشد [١٤]. تحقیقات نشان داده‌اند که ترکیبات فنولی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی خوبی هستند و هر چه ترکیبات فنولی موجود در یک عصاره بیشتر باشد خاصیت ضد میکروبی آن نیز بیشتر است [١٥]. نتایج بدست آمده از این تحقیق و سایرین نشان می دهد که عوامل متعددی مقدار ترکیبات فنولی موجود در بافت‌های گیاهی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. که از آن جمله می‌توان به فاکتورهای ژنتیکی، گونه و واریته، میزان تابش نور خورشید، شرایط خاک، شرایط محیطی و آب‌وهوا

1. Plate count agar

اشاره کرد. هم‌چنین pH، حلال، دما، زمان و قطبیت حلال در استخراج ترکیبات فنولی مؤثر می‌باشند. ترکیبات فنولیک موجود در عصاره که ساختار پیچیده دارند، در اتانول بهتر حل می‌شوند که این ترکیبات فنولیک ممکن است گروه‌های فنول بیشتر یا وزن مولکولی بالاتر نسبت به ترکیبات فنولیک موجود در آب داشته باشند [۱۶].

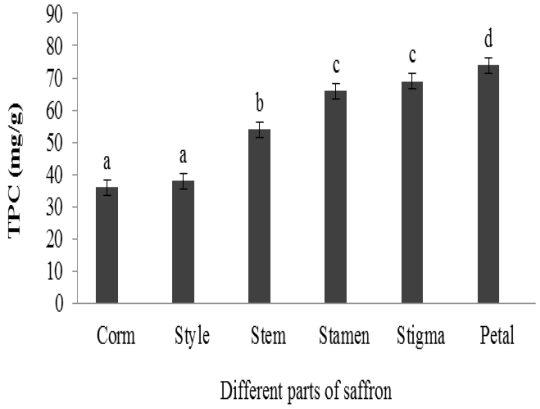

Fig 1 Total phenolic content of ethanolic extract of different parts of saffron. Values represent means ± standard deviations. Each column with the same lowercase letters is not significantly different at $P < 0.05$.

۳-۲- بررسی اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی قسمت‌های مختلف زعفران به روش انتشار چاهک

نتایج آزمون ضد میکروبی بر اساس قطر هاله در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهند که اختلاف معنی‌داری بین عصاره اتانولی گلبرگ زعفران با سایر عصاره‌ها در اثرگذاری روی باکتری‌ها وجود دارد. در بین باکتری‌های گرم مثبت حساس‌ترین باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و در بین باکتری‌های گرم منفی *اشریشیاکلی* می باشد و با توجه به نتایج، باکتری های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی نسبت به عصاره‌ها حساس‌تر هستند. احتمالاً تفاوت حساسیت میکروارگانیسم‌های گوناگون به مواد ضد میکروبی به علت ساختار متفاوت میکروارگانیسم‌هاست. باکتری‌های گرم مثبت بر خلاف باکتری های گرم منفی، فاقد غشای خارجی در دیواره هستند که این خود می‌تواند سبب شود که ترکیبات فعال در آن نفوذ بهتری داشته باشند. باکتری‌های گرم منفی به علت وجود لایه چربی در لایه بیرونی نفوذناپذیرتر هستند [۱۷]. در مطالعه حاضر نیز باکتری‌های گرم منفی *E. coli* و *S.* Typhi بیشترین مقاومت را از خود نشان دادند که شاید یکی از علت‌های آن ساختار دیواره سلولی آن‌ها باشد. Tayel و همکاران (۲۰۰۹)، در بررسی خود فعالیت ضدباکتریایی زعفران را بر باکتری‌های بیماریزای غذایی ازجمله *B. subtilis*، *S. aureus*، *P. aeruginosa*، *E. coli* به روش انتشار دیسک مورد بررسی قرار دادند [۱۸]. نتایج آنها نشان داد که *B. subtilis* بیشترین حساسیت را به عصاره مورد بررسی داشت. در مطالعه‌ای توسط Razzaghi و همکاران (۲۰۰۳)، اثرات ضد میکروبی کلاله زعفران بر روی سه سویه میکروبی *E. coli*، *S. aureus* و *P. aeruginosa* مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به دست آمده نشان داد که سافرانال موجود در زعفران باعث بازدارندگی رشد سویه‌های میکروبی شده است [۱۹]. سافرانال، کروسین و ترکیبات شیمیایی وابسته به آن‌ها در فعالیت ضد میکروبی زعفران نقش دارند [۲۰].

Table 1 Antimicrobial activity of different parts of saffron extracts against some food borne bacteria measured as the diameter of growth inhibition zones (mm)

Bacteria / Extract	*S. aureus*	*B. cereus*	*S.* Typhi	*E. coli*
Stigma	29.00 ± 3.61^{cC}	17.20 ± 1.71^{bB}	10.67 ± 1.15^{bA}	11.67 ± 0.58^{bA}
Corm	24.00 ± 3.06^{aC}	17.77 ± 1.16^{bB}	11.67 ± 0.58^{bA}	10.67 ± 0.58^{bA}
Style	30.10 ± 3.00^{dC}	21.77 ± 1.57^{cB}	13.33 ± 0.58^{cA}	16.33 ± 1.15^{cA}
Stamen	26.33 ± 1.53^{bC}	13.00 ± 2.00^{aB}	8.00 ± 0.00^{aA}	9.00 ± 0.00^{aA}
Stem	28.01 ± 2.00^{cC}	17.03 ± 1.15^{bA}	17.67 ± 0.58^{dA}	23.33 ± 2.16^{dB}
Petal	30.78 ± 1.15^{dD}	28.53 ± 1.71^{dC}	21.70 ± 1.54^{eA}	24.87 ± 2.42^{dB}

Values are expressed as mean±standard error. Different uppercase letters indicate significant difference at $p < 0.05$ level between data in each row and lowercase letters indicate significant difference at $p < 0.05$ level between data in each column.

۳-۳- حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره‌ها

نتایج MIC و MBC عصاره اتانولی قسمت‌های مختلف زعفران علیه باکتری‌های مورد مطالعه در جدول ۲ نشان داده شده است. عصاره قسمت‌های مختلف زعفران از حداقل غلظت بازدارنده رشد و حداقل غلظت کشندگی متفاوتی برخوردار هستند، به‌طوریکه کمترین مقدار MIC برای گلبرگ و ساقه زعفران و MBC برای گلبرگ و پرچم به ترتیب در غلظت ۳/۱۲ و ٦/۲۵ (میلی گرم/ میلی لیتر) مربوط به باکتری *B. cereus* بود. همچنین بیشترین مقدار MIC برای عصاره پیاز زعفران مربوط به باکتری *E.coli* که غلظت بیشتر از ۱۰۰ (میلی گرم/ میلی لیتر) بدست آمد. عصاره حاصل از پیاز زعفران بیشترین مقدار MBC را در برابر باکتری های *E.coli* و *S.* Typhi نشان داد. Afshar Mohammedan و همکاران (۲۰۱٦)، به بررسی فعالیت ضد باکتریایی عصاره کلاله و گلبرگ گونه‌های مختلف زعفران پرداختند و گزارش کردند که حداقل غلظت بازدارنده رشد برای عصاره گونه *C. caspius* بود که در غلظت ۱۰/۳۱ml/mg به دست آمد [۹]. یکی از دلایل تفاوت در میزان MIC محاسبه شده در مطالعات مختلف، اختلاف ترکیب عصاره‌هاست. ترکیبات عصاره‌های حاصل از یک گونه گیاهی می‌تواند بر اساس جغرافیای منطقه، سن گیاه، فصل برداشت، مرحله رشد و روش خشک کردن و استخراج متفاوت باشد. Wei و همکاران (۲۰۰۷)، گزارش دادند که ترکیبات عصاره‌های به دست آمده از بخش های مختلف یک گیاه خاص نیز فعالیت ضدمیکروبی متفاوتی دارند [۲۱].

Table 2 Minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum bactericidal concentration (MBC) of ethanolic extract of different parts of saffron

Extract / Bacteria	petal		stamen		stem		stigma		corm		style	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
S. aureus	6.25*	12.5	12.5	25	12.5	12.5	25	25	50	100	25	50
B. cereus	3.12	6.25	6.25	6.25	3.12	12.5	25	50	50	100	12.5	12.5
S. Typhi	12.5	12.5	12.5	25	25	50	50	50	100	>100	50	100
E.coli	6.25	25	12.5	25	12.5	25	50	100	>100	>100	25	50

*mg/ml

۳-٤- اثرات ضد میکروبی عصاره در مدل غذایی (خامه)

شمارش کلی میکروبی در طی مدت زمان ١٤ روز بر روی خامه انجام شد. نتایج حاصل از انجام شمارش میکروبی (در بازه ۳۰۰-۳۰ میکروب) در خامه تیمار شده در چهار غلظت ۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد (w/v) از عصاره گلبرگ زعفران در نمودار ۲ نشان داده شده است.

داده‌ها نشان می‌دهند کلیه غلظت‌های مورد استفاده عصاره گلبرگ زعفران با نمونه کنترل اختلاف معنی‌داری داشته و بیشترین اختلاف مربوط به نمونه حاوی غلظت ۰/۷۵٪ از عصاره گلبرگ می باشد ($p>0/05$). در این بین، غلظت‌های به کار رفته عصاره گلبرگ با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشته، به طوری که کمترین شمارش میکروبی در تیمار ۰/۷۵٪ از عصاره گلبرگ مشاهده شد.

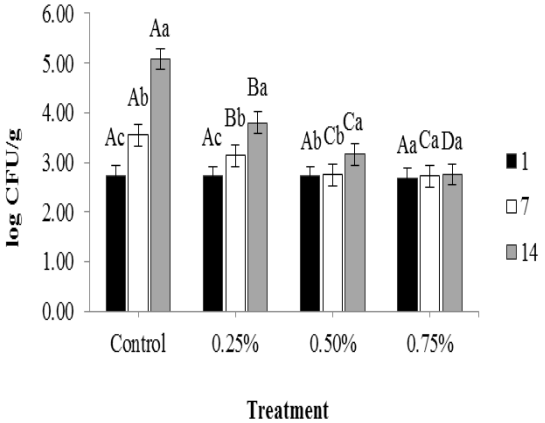

Fig 2 Total microbial count in creams treated with different concentrations of saffron petal extract. The same lowercase letters are not significantly different between different days for each treatment ($P > 0.05$). Values of the same day, followed by the same uppercase letter, are not statistically different ($P > 0.05$).
Control: without extract (0%)

در تیمار کنترل، ۰/۲۵ و ۰/۵ ٪ با گذشت زمان شمارش کلی به طور معنی‌داری ($p<0/05$) افزایش پیدا کرده است اما تیمار ۰/۷۵٪ به خوبی جلوی رشد میکروب‌ها را گرفته است و با گذشت زمان اختلاف معنی داری در شمارش میکروبی مشاهده نشد ($p>0/05$). Noorbakhsh و همکاران (۲۰۱۵)، گزارش کردند که غلظت های مختلف اسانس و پودر عصاره آبی گیاه مرزه بختیاری در روند کاهش رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* در طول مدت زمان نگهداری پنیر خامه ای اختلاف معنی دار داشتند [۲۲]. Razmjoo و همکاران (۲۰۱۶)، اثرات ضد میکروبی عصاره متانولی پوست پرتقال بر ماندگاری شیر طعم دار را بررسی کردند [۲۳]. آنها دریافتند عصاره متانولی پوست پرتقال دارای اثرات ضد میکروبی بر روی *استافیلکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* بود. تحقیقات نشان داده است که زعفران دارای اثرات ضد میکروبی بر روی باکتری‌ها می‌باشد که این خاصیت به دلیل وجود سافرانال می‌باشد [۱۹]. بنابراین می توان گفت که استفاده از عصاره گلبرگ زعفران در خامه به عنوان یک ماده نگهدارنده طبیعی در کاهش سرعت رشد باکتری‌ها مؤثر می باشد.

اثر عصاره گلبرگ زعفران بر روی باکتری های مورد آزمون در نمودار ۳ آورده شده است. همان طور که در نمودار مشخص است، نتایج بدست آمده از اثر ضد میکروبی عصاره در مدل غذایی با نتایج بدست آمده از محیط آزمایشگاهی مطابقت دارد. بیشترین درصد بازدارندگی در مورد تیمار ۰/۷۵٪ مشاهده شد و به دنبال آن ۰/۵ ٪ و ۰/۲۵ ٪ قرار دارند. در بین باکتری ها، بیشترین اثر بازدارندگی عصاره ها بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و کمترین اثر بر روی باکتری *سالمونلا تایفی* مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد که اثر بازدارندگی عصاره گلبرگ زعفران در دمای ٤ °C بیشتر از دمای ۲۵ °C بوده است. نتایج تحقیق حاضر با نتایج تحقیقات Razmjoo و همکاران (۲۰۱٦) و Beuchat و همکاران (۱۹۹٤)، مطابقت دارد [۲۳و۲٤]. آن ها در مطالعه خود گزارش کردند که دمای پایین باعث تسهیل خاصیت ضد میکروبی عصاره گیاهان می‌گردد. به نظر می‌رسد کاهش دما باعث افزایش خاصیت ضدمیکروبی گلبرگ زعفران می‌شود که این نتایج در مورد باکتری‌های مورد آزمون در مطالعه ما مشاهده شد. در اصل کاهش دما باعث می‌شود چربی غشا سلولی بیشتر به صورت غیراشباع بوده و در نتیجه منجر به اغتشاش دیواره سلولی شده و در نهایت منجر به افزایش فعالیت ضدمیکروبی عصاره می‌شود [۲۵].

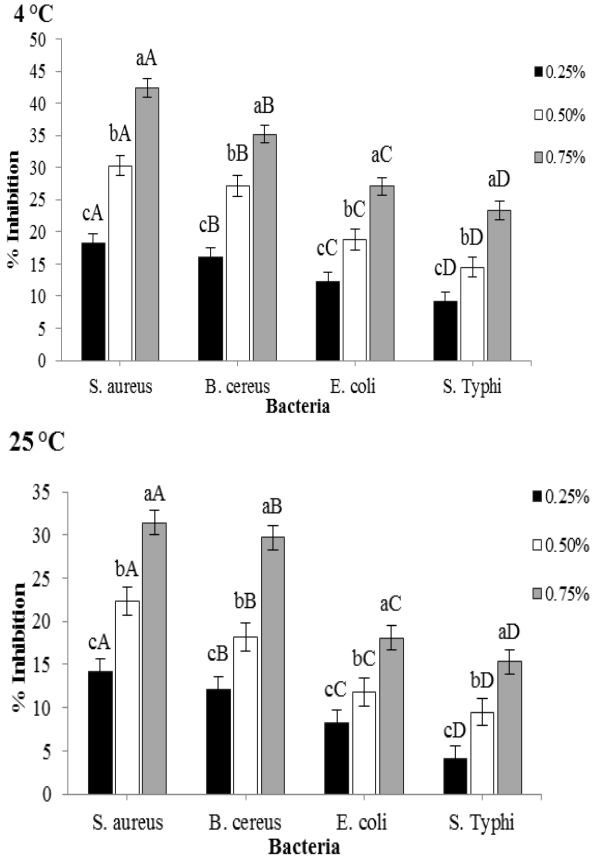

Fig 3 The antibacterial activity of different concentration of saffron petal extract against pathogenic bacteria in cream at 4 and 25 °C. The same lowercase letters are not significantly different between different treatments for each bacteria strains (P > 0.05). Values of the same treatment, followed by the same uppercase letter, are not statistically different (P > 0.05).

۳-۵- ارزیابی حسی

نتایج ارزیابی حسی خامه‌های تیمار شده با عصاره گلبرگ زعفران در نمودار ۳ آورده شده است. در مورد فاکتور رنگ و بو کمترین امتیاز مربوط به نمونه حاوی ۰/۷۵ درصد عصاره بود و بین سایر غلظت ها با نمونه شاهد تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($p>0/05$). در مورد طعم و بو نیز کمترین امتیاز مربوط به نمونه های حاوی ۰/۷۵ و ۰/۵ درصد بود و بین نمونه ۰/۲۵ درصد و شاهد تفاوت معنی داری مشخص نشد. در کل از نظر مطلوبیت کلی، افراد ارزیاب به نمونه حاوی ۰/۷۵ درصد عصاره گلبرگ زعفران کمترین امتیاز داده ولی بین نمونه های ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد با نمونه شاهد تفاوت معنی‌داری قائل نشدند ($p>0/05$). Razmjoo و همکاران (۲۰۱٦)،

اثرات ضد میکروبی عصاره متانولی پوست پرتقال بر ماندگاری شیر طعم دار بررسی کردند [۲۳]. نتایج نشان داد شیر حاوی عصاره نسبت به شیر بدون عصاره دارای اختلاف معنی داری بوده و از نظر حسی مورد قبول واقع نشد. Ghaleh Mosiyani و همکاران (۲۰۱۹)، به بررسی اثر عصاره‌های اتانولی زوفا و رازک در جلوگیری از رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در دوغ پرداختند [۲۶]. نتایج حاصل از ارزیابی حسی نشان داد با افزایش درصد عصاره های گیاهی به دوغ، ارزیاب‌ها طعم عصاره بیشتری را تشخیص داده و در نتیجه از نظر پذیرش کلی، امتیاز کمتری را نسبت به نمونه شاهد اختصاص دادند ($p<۰/۰۵$).

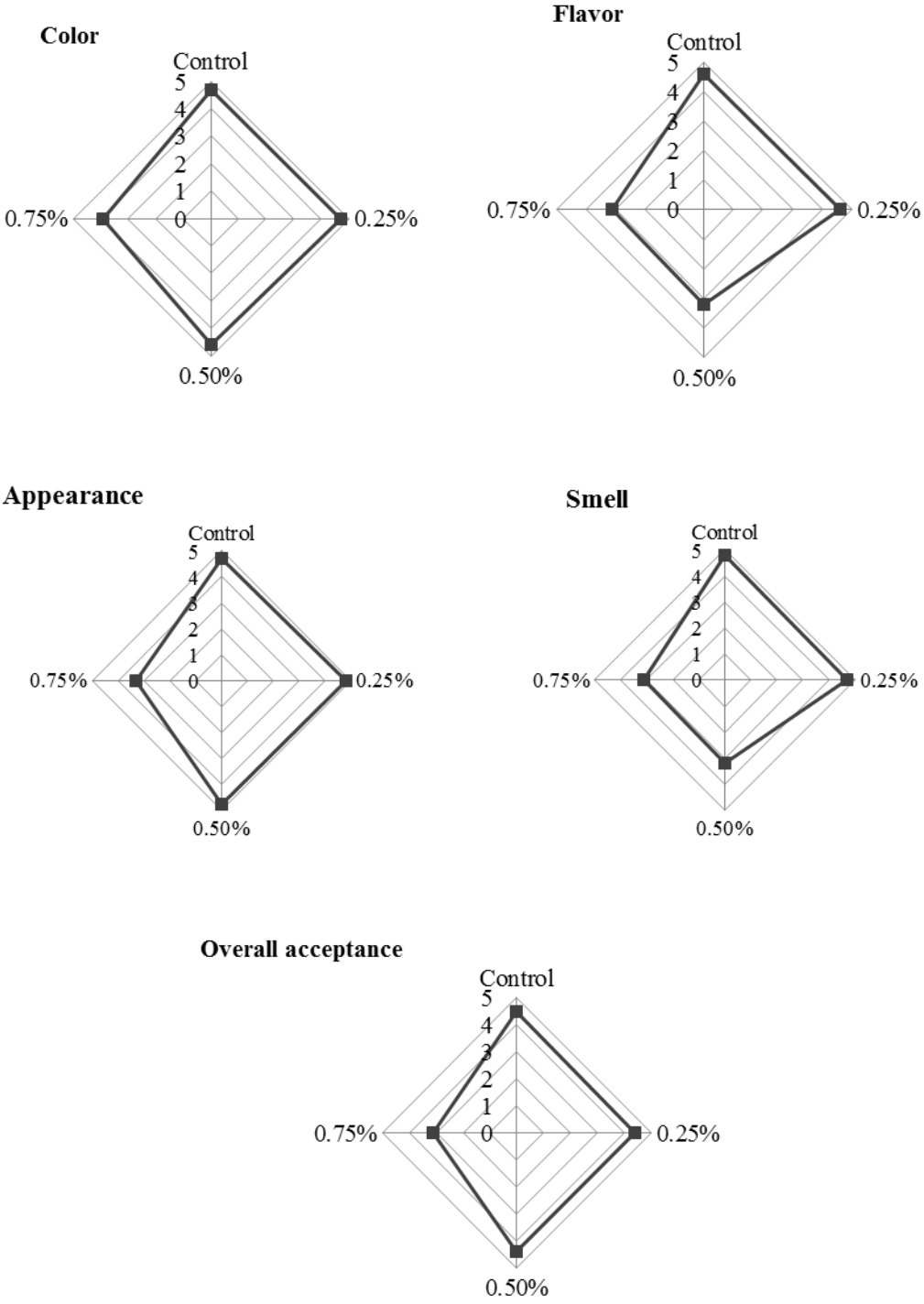

Fig 3 Sensory evaluation of cream samples treated with saffron petal extract at concentrations of 0.25, 0.5 and 0.75%. Control: without extract (0%)

٤- نتیجه‌گیری

در ایـن پـژوهش، خـصوصیات ضـد میکروبـی عـصاره خـام قسمت‌های مختلف زعفران مورد ارزیابی قرار گرفت و از بین عصاره‌ها بهترین عصاره از لحاظ ویژگی‌های مذکور انتخاب و در خامه مورد استفاده قرار گرفت. داده‌ها نشان دادند که میزان ترکیبات فنول کل و خصوصیات ضدمیکروبی عصاره اتـانولی گلبرگ زعفران نسبت بـه سـایر قـسمت‌هـای زعفـران بـسیار چشمگیرتر بود. از مقایسه عصاره اتانولی شش قسمت مختلف زعفران مشاهده شد که بیشترین میزان ترکیبات فنـول کـل بـه ترتیب مربوط به گلبرگ، کلاله، پرچم، ساقه، ریشه و پیاز بود. علاوه بر این، اثر ضد میکروبی عصاره گلبرگ زعفران نسبت به دیگر عصاره‌ها بالاتر بود. از این رو، عصاره اتانولی گلبرگ بـه عنوان کارامدترین عصاره در خامه مورد استفاده قـرار گرفـت. نتایج نشان داد با افزایش غلظت عصاره، میزان رشد باکتری‌هـا در خامه به شدت کاهش پیدا می‌کند. غلظـت ۰/۷۵ ٪ عـصاره گلبرگ زعفران بیشترین اثرات ضدمیکروبی از خـود نـشان داد اما از دید ارزیابان حسی، غلظت ۰/۵ ٪ به عنوان بهترین نمونه گزارش شد چرا که در غلظت بالاتر ظاهر، رنگ و طعم خامـه تحت تاثیرقرار گرفته و بـرای ارزیابـان حـسی مطلـوب نبـود. بنابراین با توجه به نتایج می‌تـوان گفـت کـه عـصاره گلبـرگ زعفران می‌تواند به عنوان گیاهی ارزشمند در جهت مقابلـه بـا بیماری‌های عفونی در نظر گرفته شود و از آن جهت جایگزین نگهدارنده‌های شیمیایی به عنوان یک منبع ضد میکروبی طبیعی در خامه استفاده کرد.

٥- منابع

[1] Fernandes, R. (2009). Microbiology handbook dairy products, Biddles Ltd., King's Lynn, 37-39.

[2] Canillac, N. & Mourey, A. (2001). Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeri*a, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. Food Microbiology, 18(3), 261-268.

[3] Soeda, S., Ochiai, T., Shimeno, H., Saito, H., Abe, K., Tanaka, H. & Shoyama, Y. (2007). Pharmacological activities of crocin in saffron. Journal of Natural Medicines, 61, 102-111.

[4] Serrano-Díaz, J., Sánchez, A. M., Martínez-Tomé, M., Winterhalter, P. & Alonso, G. L. (2013). A contribution to nutritional studies on *Crocus sativus* flowers and their value as food. Journal of Food Composition and Analysis, 31, 101-108.

[5] Goupy, P., Vian, M.A., Chemat, F. & Caris- Veyrat, C. (2013). Identification and quantification of flavonols, anthocyanins and lutein diesters in tepals of *Crocus sativus* by ultra performance liquid chromatography coupled to diode array and ion trap mass spectrometry detections. Industrial Crops and Products, 44, 496-510.

[6] Li, C. Y., Lee, E. J. & Wu, T. S. (2004). Antityrosinase principles and constituents of the petals of *Crocus sativus*. Journal of Natural Products, 67, 437–440.

[7] Serrano-Díaz, J., Sánchez, A.M., Martínez-Tomé, M., Winterhalter, P. & Alonso, G. L. (2014). Flavonoid determination in the quality control of floral bioresidues from *Crocus sativus* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62, 3125-3133.

[8] Azami, L., Babapour, A. & Garechahi, M. (2012). Antimicrobial effect of aqueous extract of saffron petals on some of food-borne bacterial pathogen, Journal of Food Hygiene, 2(1), 63–73 [In Persian].

[9] Afshar Mohammedan, M., Kordi, Sh. & Mashhadi Nejad, A. (2016). Antibacterial activity of stigma and petal of different species of saffron (*Crocus Spp*.). Journal of Molecular and Cellular Research, 29(3), 265–273 [In Persian].

[10] Kahkonen, M. P., Hopia, A. I. & Vuorela, H. J. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 3954–396.

[11] Cockerill, F.R. (2006). Clinical, Institute LS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing: approved standard, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 29(1), 1-76.

[12] Watts, B. M., Ylimaki, G. L., Jeffery, L. E. & Elias, L. G. (1989). Basic Sensory Methods for Food Evaluation. The Centre, University of Minnesota, 1 -160.

[13] Sariri, R., Sabbaghzadeh, R. & Poumohamad, F. (2011). In-vitro antioxidant and anti-tyrosinase activity of methanol extracts from *Crocus sativus* flowers. Pharmacologyonline, 3, 1–11.

[14] Fallah Shojaee, M., Sadeghi Mahoonak, A. R., Khomeiri, M. & Ghorbani, M. (2017). Evaluation of antioxidant activity of

methanol extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni and investigation of this properties in dairy dessert, Electronic Journal of Food Processing and Preservation, 8(2), 69 – 90 [In Persian].

[15] Bahri-Sahloul, R., Ben Fredj, R., Boughalleb, N., Shriaa, J., Saguem, S., Hilbert, J. L., & Harzallah-Skhiri, F. (2014). Phenolic composition and antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained from Crataegus azarolus L. var. aronia (Willd.) Batt. ovaries calli. Journal of Botany, 2014, 1-11.

[16] Parker, T. D., Adams, D. A., Zhou, K., Harris, M. & Yu, L. (2003). Fatty acid composition and oxidative stability of cold□pressed edible seed oils. Journal of food science, 68(4), 1240-1243.

[17] Okmen, G., Kardas, S., Bayrak, D., Arslan, A. & Cakar, H. (2016). The antibacterial activities of Crocus sativus against mastitis pathogens and its antioxidant activities. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 5(3), 146-156.

[18] Tayel, A. & El-Tras, W. F. (2009). Possibility of fighting food borne bacteria by Egyptian folk medicinal herbs and spices extracts. Journal of the Egyptian Public Health Association, 84 (1), 21- 32.

[19] Razzaghi, R., Nourbakhsh, R., Hemmati, Kakhaki, A. & Saberi Najafi, M. (2003). Antimicrobial effect of saffron. 3rd national congress on saffron, Iran.

[20] Pintado, C., Miguel, A., Acevedo, O., Nozal, L., Novella, J. L. & Rotger, R. (2011). Bactericidal effect of saffron (Crocus sativus L.) on Salmonella enterica during storage. Food Control, 22, 638-642.

[21] Wei, L. S., Musa, N., Wee, W., Musa, N. & Seng, C. T. (2007). Antimicrobial property of 12 spices and methanol extract of ornamental sea anemone (Radianthus ritteri) against Edwardsiellosis agent and other bacteria. Advanced Biomedical Research, 1(5–6), 164-166.

[22] Noorbakhsh, A., Shakerian, A. & Hojatoleslami, M. (2015). Comparison of the effect of essential oil and powder of aqueous extract of Marzeh Bakhtiari plant in preventing staphylococcus aureus growth in cream cheese. 23rd National Congress of Food Science and Technology of Iran, Quchan, Islamic Azad University, Quchan Branch [In Persian].

[23] Razmjoo, M., Khaki, P., Faghih Nasiri, M. & Rezaei, K. (2016). Possibility Study of Multilayer Encapsulation by External Gelation Procedure on the Survival of Probiotic Bacteria Undergoing Orange Juice Pasteurization. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology, 11 (1), 59-66 [In Persian].

[24] Beuchat, L. R., Brackett, R. E. & Doyle, M. P. (1994). Lethality of carrot juice to Listeria monocytogenes as affected by pH, sodium chloride and temperature. Journal of food protection, 57(6), 470-474.

[25] Cava-Roda, R. M., Taboada-Rodríguez, A., Valverde-Franco, M. T. & Marín-Iniesta, F. (2012). Antimicrobial activity of vanillin and mixtures with cinnamon and clove essential oils in controlling Listeria monocytogenes and Escherichia coli O157: H7 in milk. Food and Bioprocess Technology, 5(6), 2120-2131.

[26] Ghaleh Mosiyani, Z., Pourahmad, R. & Rajaei, P. (2019). Investigation of the Effect of Hop (Hyssoupus officinalis L.) and Hyssop (Humulus lupulus L.) Ethanolic Extracts on the Prevention of Staphylococcus aureus Growth in Doogh. Journal of Food Technology and Nutrition, 16(3), 45-58 [In Persian].

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Study the antibacterial properties of different parts of saffron extract and their application in cream

Jafarpour, D.[1*], Hashemi, S. M. B. [2], Ghaedi, A.[3]

1. Assistant professor of the Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Fasa Branch, Islamic Azad University, Fasa, Iran
2. Associate professor of the Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Fasa University, Fasa, Iran
3. M. Sc. Graduated of the Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Fasa Branch, Islamic Azad University, Fasa, Iran

ARTICIE INFO

Article History:

Received 2020/ 05/ 28
Accepted 2021/ 03/ 07

Keywords:

Antibacterial,
Saffron,
Extract,
Cream.

DOI: 10.29252/fsct.18.06.27

*Corresponding Author E-Mail:
d.jafarpour84@yahoo.com

ABSTRACT

One way to control the growth of pathogenic bacteria is to use preservatives and antimicrobial compounds. Due to the general concerns about the side effects of chemical preservatives, there is a tendency to consume products that use natural preservatives. In this study, six parts of saffron (Petal, Stigma, Stamen, Corm, Stale, Stem) were prepared and the amount of phenolic compounds, antimicrobial properties, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of extracts against gram-negative bacteria (*Escherichia coli* and *Salmonella* Typhi) and gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*) were evaluated. Also, the extract that showed the highest antimicrobial properties was selected and its effects were evaluated on the cream at 0.25, 0.5 and 0.75% (w/v) concentrations. The results showed that among the extracts of different parts of saffron, petal extract has the highest amount of phenolic compounds and antimicrobial effect. The highest effect of ethanolic extract of petal was achieved against gram positive bacteria such as *B. cereus* and *S. aureus*, respectively. The lowest amount of MIC and MBC were obtained for petals at concentration of 3.12 and 6.25 (mg / ml), respectively. In cream with 0.75% extract concentration, the total bacterial count was significantly lower than the other two concentrations. . Also, the results of sensory evaluation of treated cream showed that 0.5% petal extract was chosen as the best treatment since it was rated the highest by the panelist compared to other samples. Therefore, according to the results, saffron petal extract can be considered as a valuable plant for overcoming infectious diseases and it can be used as a natural antimicrobial source in cream to replace chemical preservatives.