بررسی اثر ذرات نانو نقره فیلم بسته بندی بر خواص میکروبی، شیمیایی و حسی زعفران خراسان

الهام حمیدثالث[۱،*]، فرحناز معتمدی سده[۲]، سعید رجبی فر[۳] ، کاوه زرگری[۴]، هادی فتح الهی[۵]

۱- کارشناس ارشد صنایع غذایی، گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین- پیشوا
۲- مربی میکروبیولوژی، بخش کشاورزی هسته‌ای، مرکزتحقیقات کشاورزی و پزشکی هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران
۳- استادیار بیوشیمی، بخش کشاورزی هسته‌ای، مرکزتحقیقات کشاورزی و پزشکی هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران
۴- استادیار اصلاح نباتات، گروه زراعت، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین- پیشوا
۵- کارشناس گروه کشاورزی هسته‌ای، مرکزتحقیقات کشاورزی و پزشکی هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران

مکان انجام تحقیق: بخش کشاورزی هسته‌ای، مرکزتحقیقات کشاورزی و پزشکی هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران

* **مسئول مکاتبات:** الهام حمیدثالث، گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی،دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین- پیشوا، تهران، صندوق پستی: ۶۱۷-۱۶۵۳۵، تلفن: ۷۶۴۸۵۹۰ – ۰۹۱۲، پست الکترونیکی: elhsal20@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۱۸ تاریخ پذیرش: ۸۹/۴/۱۵

چکیده

زعفران، کلاله‌های خشک شده گیاه *Crocus sativus*، گران‌بهاترین ادویه دنیاست که به عنوان افزودنی موادغذایی و عامل عطر و طعم دهنده، مورد استفاده قرار می‌گیرد. ذرات نانو نقره، اثرات مثبتی بر جلوگیری از فساد میکروبی از طریق ممانعت از رشد میکروارگانیسم‌ها و بهبود ایمنی مواد غذایی دارد و به همین دلیل کاربرد آن‌ها در دنیا به تدریج در حال افزایش است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر بسته بندی با فیلم‌های حاوی ذرات نانو نقره بر ویژگی‌های میکروبی، شیمیایی و حسی زعفران بوده است که برای این منظور، نمونه‌های زعفران، با فیلم‌های پلی-اتیلنی حاوی حداکثر ppm ۳۰۰ ذرات نانو نقره، به عنوان عامل ضد میکروب، بسته‌بندی شدند. بار میکروبی نمونه-های بسته‌بندی شده با فیلم‌های حاوی ذرات نانو نقره، به طور قابل توجهی کاهش یافت و اگر چه داده‌های شیمیایی حاصل از اسپکتروفتومتر، حاکی از کاهش عطر و طعم و رنگ نمونه‌های زعفران بود، ولی ارزیابی حسی، تفاوت بارزی نشان نداد.

واژه‌های کلیدی: زعفران، ذرات نانونقره، کروسین، سافرانال

مقدمه

زعفران، کلاله‌های خشک شده گیاه *Crocus sativus*، گران‌بهاترین ادویه دنیاست که به عنوان افزودنی موادغذایی و عامل عطر و طعم دهنده، مورد استفاده قرار می‌گیرد. عامل عطر و طعم‌دهنده در زعفران، ترکیبات شیمیایی ویژه این گیاه است که عمدتاً مشتقات کاروتنوئیدی هستند و مهم‌ترین آن-ها، پیکروکروسین، کروسین و سافرانال است. پیکروکروسین با فرمول $C_{16}H_{26}O_7$، ماده تلخ زعفران است که با اثر تجزیه، به ماده دیگری به نام سافرانال تبدیل می‌شود و سافرانال ($C_{10}H_{14}O$) عمده‌ترین روغن فرار مسئول آروما (عطر) است (۳-۱).

در حال حاضر، به دلیل گسترش بیماری‌های عفونی و مقاومت میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها، محققین به دنبال عوامل میکروب‌کش جدیدی هستند و در همین راستا طی سال‌های اخیر، افزودن ذرات نانونقره به فیلم‌های بسته‌بندی به عنوان عوامل ضد میکروب جدید با

خواص شیمیایی و فیزیکی بی‌نظیر، توسعه یافته است. فیلم‌های دارای فعالیت ضدمیکروبی می‌توانند به کنترل رشد میکروارگانیسم‌های پاتوژن کمک نمایند. یک هدف اساسی از بسته‌بندی نانو، طولانی‌تر نمودن عمر انباری با بهبود عملکردهای ممانعتی بسته‌بندی مواد غذایی است. بسته بندی نانو می‌تواند برای آزاد کردن ضد میکروب‌ها، ضد اکسیدان‌ها، آنزیم‌ها و طعم‌ها و مواد مغذی جهت توسعه عمر انباری نیز طراحی شود .

یکی از گسترده‌ترین کاربردها، ایجاد انواع پلیمر ضد باکتری است. پلیمرهایی که ضد باکتری، ضد قارچ و ضد ویروس هستند و ضرری برای محیط زیست ندارند، می‌توانند با انواع پلیمر، مانند پلی-اتیلن، پلی پروپیلن و... اختلاط پیدا کنند (۷-۴). یونهای نقره و ترکیبات بر پایه نقره، برای میکروارگانیسم‌ها بسیار سمی بوده و اثرات میکروب-کشی شدید آن‌ها بر روی ۱۶ گونه باکتریایی، از جمله اشریشیاکلی نشان داده شده است. اگرچه این فناوری به تازگی مورد توجه زیادی قرار گرفته و رونق بسیاری پیدا کرده است، اما از آن، در طب قدیم هم استفاده می‌شده است و عملکرد اجمالی مکانیسم اثر آن را می‌توان به چهار شکل زیر عنوان نمود:

الف) تولید اکسیژن فعال توسط نقره که باعث تخریب غشای سلولی میکرو ارگانیسم می‌شود.

ب) از بین بردن میکروارگانیسم با متلاشی کردن غشاهای سلولی و تبدیل پیوندهای گوگردی در غشاهای پروتئینی میکرو ارگانیسم‌ها.

ج) افزایش تمایلات بار مثبت نقره در ابعاد نانو موجب متصل شدن با میکروارگانیسم‌های دارای بار منفی می‌شود که این مکانیسم باعث تخریب غشاء سلولی میکروارگانیسم می‌شود.

د) در بعضی از میکرو ارگانیسم‌هایی که تنفس آنها توسط آنزیم‌ها صورت می‌گیرد، نانو نقره با از بین بردن آن آنزیم‌ها مکانیسم تنفسی میکرو ارگانیسم را مختل نموده و باعث مرگ آن می‌شود (۸ ، ۹).

در این بررسی اثر بسته‌بندی حاوی ذرات نانو نقره بر آلودگی‌های میکروبی زعفران مطالعه شده و نیز ترکیبات مهم شیمیایی زعفران کروسین، پیکروکروسین و سافرانال که به ترتیب مسئول رنگ، طعم و بوی زعفران هستند مقایسه گردیدند.

مواد و روش‌ها

آماده سازی نمونه

نمونه‌های زعفران با فیلم‌های پلی‌اتیلنی که حاوی حداکثر ppm ۳۰۰ ذرات نانو نقره می‌باشند، جهت انجام آزمایش و فیلم‌های پلی اتیلنی بدون ذرات نانو نقره به عنوان گروه‌های شاهد بسته‌بندی شدند (وزن هر نمونه یک گرم در نظر گرفته شد).

فیلم‌های بسته‌بندی حاوی ذرات نانو نقره و نمونه‌های شاهد در شرکت نرمین شیمی (تهران، ایران) تولید گردید و طی تهیه این فیلم‌ها، ذرات نانو نقره در لایه میانی فیلم سه لایه‌ای از پلی‌اتیلن به کار برده شده که در عین داشتن خواص ضدمیکروبی سمی نباشند.

آزمایشات میکروبی

محیط کشت‌های ائوزین متیلن بلو (*EMB*)، سولفادیازین پلی میکسین سولفیت آگار (*SPS*)، پلیت کانت آگار (*PCA*) و لاکتوز براث (*LB*) به ترتیب برای شمارش اشریشیاکلی، کلستریدیوم پرفرینجنس، کل باکتریهای هوازی و انتروباکتریاسه مطابق با استانداردهای ملی ایران مورد استفاده قرار گرفت. بطور خلاصه، روش بیشترین تعداد احتمالی (*MPN*) برای تعیین انتروباکتریاسه، شرایط بی-هوازی و محیط کشت *SPS* برای تعیین کلستریدیوم پرفرینجنس، رقت‌های متوالی نمونه‌های زعفران در آب پپتونه ۰/۹ درصد و محیط کشت *PCA* برای شمارش کل باکتری‌های مزوفیل هوازی و کشت *EMB* برای اشریشیاکلی استفاده شدند (۱۰، ۱۱).

بدین منظور، مقدار ۰/۵ گرم از نمونه پودر شده زعفران، تحت شرایط استریل، توزیع و در ۴/۵ میلی-لیتر آب پپتونه استریل شده، مخلوط گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در شیکر قرار گرفت تا کاملا همگن شود و سپس از رقت 10^{-1} ، رقت‌های 10^{-2} تا 10^{-5} تهیه گردید. پس از آماده‌سازی محیط کشت‌ها با روش‌های استاندارد و استریل کردن آن در اتوکلاو با

دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر، کشت نمونه در محیط کشت با دو روش سطحی و پورپلیت در پلیت‌ها و تلقیح در لوله‌های آزمایش انجام شد و سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، گرمخانه گذاری صورت گرفت و سپس نتایج بررسی و کشت‌ها شمارش گردید.

آزمایش‌های شیمیایی

۵۰ میلی‌گرم از نمونه‌های زعفران در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر جهت آزمایش‌های شیمیایی در دستگاه اسپکتروفتومتر uv-vis به کار رفت که داده-های به دست آمده در فرمول زیر قرار داده شد:

$$E_{1cm} = \frac{A \times 100}{m} \times \frac{100}{100 - H}$$

در این فرمول، A داده حاصل از اسپکتروفتومتر، H میزان رطوبت که عموماً در نمونه‌های زعفران خشک شده، ۱۰درصد است، m جرم نمونه مورد نظر و E میزان جذب نمونه صاف شده در محدوده طول موج ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر است (۱۲).

ارزیابی حسی

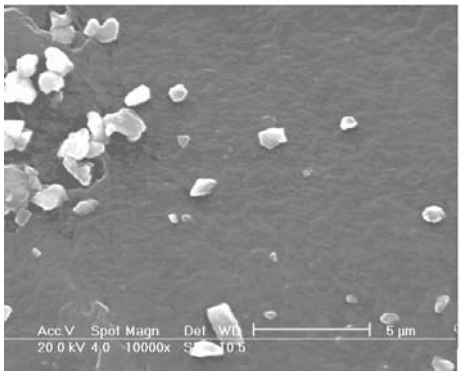
قابلیت حسی فیلم‌های بسته بندی حاوی ذرات نانو نقره و بدون ذرات نانو نقره، توسط ۶ داور متخصص آموزش دیده انجام شد. ارزیاب‌ها، ویژگی-های عطر و طعم نمونه‌های زعفران را با تست هدونیک و انتخاب امتیاز ۱ تا ۴، از نامطلوب تا عالی، تعیین نمودند. حدود ۵۰ میلی‌لیتر آب زعفرانی به هر ارزیاب داده شد و یک کد سه شماره‌ای برای هر نمونه استفاده گردید.

آنالیزآماری

آزمایش‌ها با سه تکرار، انجام و میانگین‌ها و خطاهای استاندارد با استفاده از نرم افزار SAS (نسخه ۹) محاسبه شدند.

نتایج

عکس میکروسکوپ الکترونی فیلم بسته‌بندی حاوی ذرات نانونقره، با قابلیت نشان دادن ذرات نقره در اندازه نانو، در تصویر ۱ نشان داده شده است.



تصویر ۱- عکس میکروسکوپ الکترونی scanning electron microscopy از فیلم بسته‌بندی پلی‌اتیلنی حاوی ذرات نانو نقره.

اثر بسته‌بندی حاوی ذرات نانو نقره بر روی کل باکتری هوازی، انتروباکتریاسه، اشریشیاکلی و کلاستریدیوم پرفرینجنس در زعفران در جدول ۱ به ترتیب نشان داده شده است. طبق نتایج حاصل، کاهش بار میکروبی نمونه‌های زعفران در بسته-بندی‌های با ذرات نانو نقره و بدون ذرات نانو نقره، مشاهده گردید.

جدول ۱- محاسبه میانگین بار میکروبی نمونه‌های زعفران در بسته بندی‌های با ذرات نانونقره و بدون ذرات نانونقره.

میانگین بار میکروبی± خطای استاندارد فیلم بسته‌بندی	شمارش کلی باکتری‌ها	انتروباکتریاسه	اشریشیاکلی	کلاستریدیوم پرفرینجنس
بدون ذرات نانونقره	$۲ \times ۱۰^{۵} \pm ۵/۰۳ \times ۱۰^{۴}$	$۱/۱ \times ۱۰^{۳} \pm ۰$	$۱ \times ۱۰^{۳} \pm ۱ \times ۱۰^{۲}$	$۶ \times ۱۰^{۳} \pm ۳/۰۵۵ \times ۱۰^{۲}$
حاوی ذرات نانونقره	$۱ \times ۱۰^{۳} \pm ۱/۱۵ \times ۱۰^{۲}$	$۴/۶ \times ۱۰^{۲} \pm ۰$	$۴ \times ۱۰^{۲} \pm ۱/۱۵ \times ۱۰^{۲}$	$۳ \times ۱۰^{۳} \pm ۲ \times ۱۰^{۲}$

در جدول ۲، نتایج شیمیایی نمونه‌های زعفران شامل پیکروکروسین، کروسین و سافرانال نشان داده شده که نمونه‌های حاوی ذرات نانو نقره افزایش اندکی را در مورد پیکروکروسین نشان می‌دهند و کروسین و سافرانال کاهش اندکی یافته‌اند.

در جدول ۳، ارزیابی حسی نمونه‌های زعفران به وسیله ارزیاب‌ها، کاهش کمی را نشان داده که طبق

نتایج حاصله، کاهش کیفیت نمونه‌های زعفران در بسته‌بندی‌های با ذرات نانونقره و بدون ذرات نانونقره، مشاهده نگردید.

جدول ۲- مقایسه میانگین نتایج شیمیایی نمونه‌های زعفران در بسته‌بندی‌های با ذرات نانونقره و بدون ذرات نانونقره.

میانگین داده‌های شیمیایی± خطای استاندارد فیلم بسته‌بندی	پیکروکروسین، عامل طعم (جذب در ۲۵۷ نانومتر)	کروسین، عامل رنگ (جذب در ۴۴۰ نانومتر)	سافرانال، عامل عطر (جذب در ۳۳۰ نانومتر)
بدون ذرات نانونقره	۴۸/۸۶±۴/۲۷	۱۱۵/۴±۱۲/۷۲	۳۵/۸۲±۴/۲۵
حاوی ذرات نانونقره	۵۸/۸۳±۹/۱۲	۱۱۲/۰۸±۱۱/۵۶	۲۶/۶۵±۱/۲۲

جدول ۳- ارزیابی حسی نمونه‌های زعفران در بسته‌بندی‌های با ذرات نانونقره و بدون ذرات نانونقره

میانگین داده‌های شیمیایی± خطای استاندارد فیلم بسته‌بندی	عطر	طعم
بدون ذرات نانونقره	۲/۵±۰/۵۴	۲/۶۶±۰/۸۱
حاوی ذرات نانونقره	۲/۳۳±۰/۸۱	۲/۵±۱/۰۴

بحث

در تحقیقی توسط Nathalie Stampfli و همکارانش در سال ۲۰۰۶ در کشور کره که به منظور مطالعه اثرات موادغذایی حاوی ذرات نانو و بسته-بندی‌های حاوی ذرات نانو انجام شد، محققین پی بردند که بسته‌بندی حاوی ذرات نانو، مفیدتر و مطلوب‌تر از کاربرد ذرات نانو در مواد غذایی است. به همین دلیل، در بررسی حاضر، از ذرات نانونقره در فیلم‌های بسته‌بندی استفاده گردید.

در سال ۲۰۰۴ در کشور کرواسی، اثر ذرات نانونقره (به عنوان عامل ضد میکروب) بر روی اشریشیاکلی که نمونه‌ای از باکتری گرم منفی است، توسط Sondi و Salopek مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که عامل باکتری‌کش موثری بوده و با ایجاد حفراتی سبب نابودی باکتری شده و می‌توان در حالت کلی در صورت مقرون به صرفه بودن آن را جایگزین سایر باکتری‌کش‌ها قرار داد (۱۰). در مطالعه حاضر نیز، بسته‌بندی با فیلم حاوی ذرات نانو نقره برای کاهش بار میکروبی در زعفران به عنوان یک ادویه مهم به کار گرفته شد. همان گونه که جدول ۱ نشان می‌دهد، زمانی که فیلم پلی‌اتیلنی حاوی ذرات نانونقره استفاده شد، در مقایسه با نمونه-های بسته‌بندی شده با فیلم‌های بدون ذرات نانونقره، بار میکروبی نمونه‌های زعفران بسیار کاهش یافت.

Chi-Fai Chau و همکاران در سال ۲۰۰۷ در کشور تایوان به مطالعه توسعه قوانین در جهت کاربرد فناوری نانو در مواد غذایی و اثرات مصرف مواد در بدن انسان پرداختند. نتایج تا حدودی مشخص کرد که اثرات نانوذرات در بدن، بستگی به ویژگی‌هایی مثل اندازه ذره، توده، ترکیب شیمیایی، ویژگی‌های سطحی و چگونگی تشکیل توده توسط ذرات نانوی مجزا، دارد (۶). در کشور ما نیز پیشرفت‌های بسیاری در این زمینه به دست آمده که اثرات این مواد در حال بررسی است. در بررسی حاضر نیز اثرات مثبت این بسته‌بندی تایید گردید.

در یک بررسی دیگر توسط Mounira Lage و Charles L. Cantrell در سال ۲۰۰۹ در کشور مراکش تعیین کیفیت زعفران (کروسین، پیکرو-کروکروسین و سافرانال) در شرایط مختلف آب و هوایی مراکش مورد بررسی قرار گرفت که برای این منظور از روش HPLC (کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا) استفاده شده و نتایج نشان داد که کروسین و پیکروکروسین، ثابت باقی ماندند، اما تغییرات عمده-ای در سافرانال رویت گردید (۸). می‌توان چنین استدلال نمود که ترکیبات شیمیایی این گیاه تا

حدی حساس بوده و با کوچک‌ترین تغییراتی، تفاوت معنی‌دار خواهد داشت که در مورد نتایج شیمیایی حاصل از دستگاه اسپکتروفتومتر، هر چند تفاوت معنی‌داری از نظر آماری در سطح ۵ درصد مشاهده شد، ولی در ارزیابی‌های حسی، تفاوت محسوسی وجود نداشت. در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که کاربرد این فیلم‌ها از نظر کاهش بار میکروبی، بسیار مطلوب بوده و می‌تواند به عنوان روش مناسبی در کاهش بار میکروبی مواد غذایی و بالاخص برای ادویه‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از همکاری بخش کشاورزی هسته‌ای مرکز تحقیقات کشاورزی و پزشکی هسته‌ای سازمان انرژی اتمی ایران تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

1. Anon 1, Iran national standard, 2009. Saffron-Harvest and applying process before packing 5230: 8-15.
2. Anon2, Iran national standard, 2009. Microbiology of saffron Specification 5689: 5-8.
3. Anon 3, Iran national standard, 2009. Saffron-Test methods, 259:7-24.
4. Board, N, 2004. Food Flavors' Technology Hand Book, National Institute of Industrial Research Delhi, 12: 235-237.
5. Bouwmeester, H., Dekkers, S., Heer, C., 2009. Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. Regulatory Toxicology and Pharmacology 53: 52-62.
6. Chau, C., Wu, S., Yen. G., 2007. The development of regulations for food nanotechnology. Trends in Food Science & Technology 18: 269-280.
7. Kathiresan, K., Manivannan, S., Nabeel, M., Dhivya, B., 2009. Studies on silver nanoparticles synthesized by a marine fungus, *Penicillium fellutanum* isolated from coastal mangrove sediment. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 71: 133-137.
8. Lage, M., Cantrell, C., 2009. Quantification of saffron metabolites crocins, picrocrocin and safranal for quality determination of the spice grown under different environmental Moroccan conditions. Scientia Horticulturae 121: 366-373.
9. Rai, M., Yadav, A., Gade, A., 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Biotechnology Advances 27**:** 76-83.
10. Sondi, I., Salopek, B., 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E.coli* as a model for Gram-negative bacteria. Journal of Colloid and Interface Science 275: 177-182.
11. Stampfli, N., Siegrist, M., Kastenhol, H., Keller, C., 2008. Perceived risks and perceived benefits of different nanotechnology foods and nanotechnology food packaging. Appetite 51: 283–290.
12. Zhang, H., Zeng, Y., Yan, F., Chen, F., 2004. Semi-Preparative Isolation of Crocins from Saffron. Chromatographia 59: 691-696.