

ارزیابی شرایط استخراج عصاره زعفران در سیستم‌های حلال دوتایی و سه تایی و تعیین شرایط بهینه

بهرروز قرآنی^{a*}، رسول کدخدایی^b، بهاره عمادزاده^a، علیرضا صادقیان^c

^a استادیار گروه نانوفناوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

^b دانشیار گروه نانوفناوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

^c استادیار گروه فرآوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۱۱/۱۰

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۵/۱۱

۶۲

چکیده

مقدمه: زعفران گرانبهاترین ادویه دنیا است و عصاره حاصل از این ادویه ارزشمند نه تنها دارای خواص ارزشمند تغذیه ای بلکه دارای کاربردهای گوناگون در فرمولاسیون محصولات غذایی می باشد. ارایه روش مناسب در استخراج ترکیبات موثره آن، با توجه به کاربرد آن در محصولات غذایی و به گونه ای که بالاترین بازده اقتصادی را ایجاد کند امری مهم تلقی می شود. هدف از مطالعه حاضر، دستیابی به اقتصادی ترین روش استخراج ترکیبات مؤثره زعفران می باشد.

مواد و روش‌ها: در این بررسی، شرایط استخراج کروسین، سافرانال و پیکروکروسین در سیستم‌های حلال دوتایی (آب- استن و آب- اتانل) و سه تایی (آب- استن- اتانل) و در نسبت‌های مختلف حلال‌ها به هم و نسبت‌های متفاوت از حلال به زعفران بررسی گردید.

یافته‌ها: استفاده از سیستم حلال دوتایی اتانل- آب به نسبت ۲:۳ و با نسبت ۱۲ به ۱ حجمی/وزنی زعفران و بکارگیری سیستم حلال سه تایی آب - استن- اتانل به نسبت‌های ۴۰، ۴۵ و ۱۵ به ازای هر گرم زعفران در دمای ۲۵°C و زمان ۱۶ ساعت به عنوان بهترین شرایط در استخراج ترکیبات موثره زعفران بدست آمدند. مقادیر کروسین، سافرانال و پیکروکروسین برای حلال دوتایی به ترتیب ۲۲۹/۰۵، ۳۵/۱۷ و ۷۵/۵۳ و برای حلال سه تایی به ترتیب برابر ۲۷۲/۹۶، ۴۰/۰۳ و ۱۳/۶ در عصاره آبی زعفران اندازه گیری شد.

نتیجه‌گیری: در فرمول‌های غذایی، بر مبنای نیاز به رنگ، عطر و طعم مطلوب و با توجه به مسائل اقتصادی از هریک از روش‌های استخراج پیشنهادی می‌توان استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: استخراج، پیکروکروسین، زعفران، سافرانال، کروسین

مقدمه

زعفران به دلیل برخورداری از رنگ، عطر و ترکیبات شناخته شده سودمند، در صنایع غذایی و دارویی مصارف زیادی دارد و تا کنون تحقیقات متعددی به ویژه در خصوص اثرات سلامتی بخش و دارویی آن صورت گرفته است (رزاقی و همکاران، ۱۳۸۲؛ جانپان زاده و همکاران، ۱۳۸۸؛ یگانه و همکاران، ۱۳۸۹؛ آخوند زاده و همکاران، ۱۳۸۲؛ کریمی و همکاران، ۱۳۸۳).

در حال حاضر به دلیل مشکلات مرتبط با توزیع زعفران به شکل عصاره و نیز ناپایداری آن در شرایط محیطی و یا دمای یخچال، تجارت این محصول به صورت رشته ای و یا پودر انجام می‌شود. تاکنون روش‌های مختلفی جهت استحصال عصاره زعفران توسط محققین بررسی گردیده اند که بسیاری به دلیل راندمان پایین استخراج و هزینه‌های بالا جهت کاربردهای تجاری مقبول نبوده و اغلب به منظور بررسی خواص فارماکولوژیک عصاره زعفران تهیه شده‌اند (یگانه و همکاران، ۱۳۸۹).

یکی از ترکیبات مهم موجود در زعفران، کروسین می‌باشد که عامل ایجاد رنگ زرد در زعفران است. پیکروکروسین جزء عمده دیگری است که همزمان با بیوسنتز کروسین از زیرانتین تولید شده و در ایجاد طعم تلخ زعفران مؤثر است. این ترکیب در اثر هیدرولیز آنزیمی به سافرانال تبدیل می‌شود که آرومای اصلی زعفران می‌باشد (Raina et al., 1996).

بهینه سازی شرایط استخراج ترکیبات تشکیل دهنده یکی از زمینه‌های اصلی و مهم در تحقیقات مربوط به زعفران است. راندمان نهایی تحت تأثیر شرایطی از جمله نسبت زعفران به حلال و نوع حلال قرار می‌گیرد. در مطالعات مختلف، انواع روش‌های استخراج ترکیبات فعال زعفران همانند روش خیساندن در حلال آب مقطر (Selim et al., 2000)، اتانول (Hadizadeh et al., 2010)، حلال‌های هیدروالکلی (Fernandez et al., 2002) و حلال‌های آلی (رجب‌زاده و همکاران، ۱۳۸۷)، پرکولاسیون (آخوندزاده و همکاران، ۱۳۸۲)، فراصوت (Kadkhodaei & Hemmati Kakhki, 2006) مورد مطالعه قرار گرفته است.

همتی کاخکی پس از بهینه‌سازی عوامل مؤثر بر تولید رنگ خوراکی از گلبرگ‌های زعفران پیشنهاد بکارگیری

آنتوسیانین استخراج شده از گلبرگ زعفران به عنوان رنگ قرمز خوراکی در نوشیدنی‌ها و آشامیدنی‌های دارای pH اسیدی (کمتر از ۴/۵) را مطرح نمود (همتی کاخکی، ۱۳۸۰).

در مطالعه دیگری تعدادی از محققین به بررسی تأثیر نوع حلال و روش استخراج بر میزان اولئورزین زعفران پرداختند. در این پژوهش استخراج زعفران با استفاده از حلال‌های متانول، اتانول، ایزوپروپانول، استن، اتیل استات، اتر نفت و با روش‌های استخراج سرد و سوکسله انجام و نتایج حاصله با یکدیگر مقایسه شدند. ارزیابی نتایج بدست آمده از نظر بازده استخراج و نیز میزان محتوای پیکروکروسین، کروسین و سافرانال نشان داد که این مقادیر در روش استخراج سوکسله با حلال استن در مقایسه با روش سرد و حلال‌های دیگر از سطح بالاتری برخوردار می‌باشد. زمان بهینه برای فرایند استخراج در روش سوکسله با حلال استن برابر ۲ ساعت و بازده این روش برابر ۳۶/۵٪ گزارش شد (رجب‌زاده و همکاران، ۱۳۸۷).

حیدری در تحقیق جامعی به بررسی روش‌های مختلف استخراج ترکیبات فعال از نمونه‌های زعفران پرداخت. مقایسه روش‌های استخراج سرد و سوکسله نشان داد که استخراج با سوکسله به لحاظ زمان و راندمان استخراج، بخصوص برای کروسین‌ها و سافرانال به عنوان روشی مؤثر مطرح است. از سوی دیگر، حرارت اعمال شده طی روش سوکسله موجب تبدیل بخشی از سافرانال شده که از این لحاظ نکته‌ای منفی به شمار می‌رود. این نویسنده نشان داد استفاده از حلال‌های استن و متانول در مقایسه با سایر حلال‌ها دارای توانایی بیشتری در استخراج مواد مؤثره زعفران می‌باشد (حیدری، ۱۳۹۱).

در بررسی استخراج آنتوسیانین‌های گلبرگ زعفران به کمک امواج مایکروویو، فاکتورهای نسبت حلال به نمونه (۱:۱ تا ۱:۱۰)، دمای فرایند (۳۵-۷۵ °C) و زمان استخراج (۵ تا ۱۵ دقیقه) به عنوان تیمارهای فرایند منظور شده است. مطالعه صورت گرفته نشان داد که اثر دما بر روی راندمان استخراج، نسبت به دو متغیر مستقل دیگر برجسته‌تر بوده است. شرایط مطلوب استخراج جهت دستیابی به بیشترین میزان آنتوسیانین استحصالی عبارت از نسبت حلال به نمونه برابر ۵۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر، دمای C ۲۴/۴۸ و زمان استخراج ۷/۵۸ دقیقه گزارش

فرایند تا حصول نمونه هایی کاملاً یکنواخت و هم اندازه تکرار شد (بی نام، ۱۳۸۹).

- تعیین میزان رطوبت

مقدار رطوبت نمونه ها با استفاده از روش استاندارد ملی ایران به شماره ۱-۲۵۹ (بی نام، ۱۳۸۹) اندازه گیری گردید. ۰/۵ گرم زعفران ساییده در یک ظرف شیشه‌ای با وزن مشخص توزین گردید. ظرف حاوی نمونه در داخل آون (FP53-Binder Germany) با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد ($2 \pm 103^\circ C$) به مدت ۱۶ ساعت قرار داده شده و سپس وزن باقی مانده ماده خشک (وزن ظرف به همراه نمونه کاملاً خشک) پس از سرد شدن اندازه گیری گردید. میزان رطوبت نمونه با استفاده از معادله ۱ محاسبه شد:

$$H\% = [1 - (W_L) / (W_S)] \times 100 \quad (\text{معادله ۱})$$

که W_S و W_L به ترتیب وزن از دست رفته و وزن نمونه می‌باشد. وزن از دست رفته از طریق محاسبه اختلاف مقادیر وزن اولیه و ثانویه مجموع وزن ظرف و نمونه به دست آمد. درصد رطوبت موجود در نمونه ۹/۶٪ محاسبه گردید.

- تعیین مقدار مواد مؤثره زعفران

مقدار کروستین، سافرانال و پیکروکروسین بر مبنای ثبت چگالی نوری در طول موج ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر، با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل DR 5000 - شرکت HACH آمریکا) و از طریق معادله ۲ محاسبه گردید (بی نام، ۱۳۸۹).

$$A_{1cm}^{1\%}(\lambda_{max}) = \frac{A * 10000}{0.5 \times (100 - H)} \quad (\text{معادله ۲})$$

که در این معادله $A_{1cm}^{1\%}(440 \text{ nm})$: جذب در حدود ۴۴۰ nm (λ_{MAX} کروستین)، $A_{1cm}^{1\%}(330 \text{ nm})$: جذب در حدود ۳۳۰ nm (λ_{MAX} سافرانال)، $A_{1cm}^{1\%}(257 \text{ nm})$: جذب در حدود ۲۵۷ nm (λ_{MAX} پیکروکروسین). $A =$ جذب خوانده شده و $H =$ رطوبت ۰/۵ گرم زعفران می باشد.

شدند. بکارگیری این روش به استحصال بسیار بیشتر آنتوسیانین (برابر ۱۳۲۲/۵۳ mg/100 ml) در مقایسه با روش استخراج سنتی منتهی شد (مهدوی خزاعی و همکاران، ۱۳۹۱).

Agarwal و همکاران جهت استحصال عصاره زعفران، استفاده از ۲۰ میلی لیتر حلال (آب و اتانول به نسبت ۱:۱) به ازای هر گرم زعفران را گزارش نمودند. دمای مورد استفاده حین فرایند استخراج ۶۰ درجه سانتیگراد و زمان ۴ ساعت در نظر گرفته شد. در این روش غلظت رنگدانه کروستین در عصاره حاصل ۲۳٪ گزارش گردید (Agrawal *et al.*, 2006).

همانطور که مشاهده می شود استفاده از سیستم حلال سه تایی در استخراج ترکیبات مؤثره زعفران تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است. با توجه به اهمیت بعد اقتصادی فرایندهای مورد استفاده در صنعت و لزوم توجه به این مهم در انجام پژوهش‌های کاربردی، هدف از این بررسی ارزیابی عملکرد سیستم‌های حلال دوتایی و سه تایی در استخراج ترکیبات مؤثره زعفران می‌باشد. در تمامی مراحل تلاش بر آن بوده است که شرایط استخراج به صورت مقرون به صرفه همراه با بالاترین کارایی منظور گردد.

مواد و روش‌ها

- مواد

زعفران درجه یک سرگل از شرکت بازرگانی زعفران اسفدان (مشهد- ایران) تهیه گردید. مقادیر کروستین، سافرانال و پیکروکروسین برای نمونه‌های با کیفیت ممتاز به ترتیب بیش از ۲۲۰، ۵۰ و ۸۵ واحد تعیین شده است (بی نام، ۱۳۸۹). زعفران مورد مطالعه در این پژوهش دارای کیفیت ممتاز و مقادیر کروستین، سافرانال و پیکروکروسین به ترتیب ۲۴۷/۵۶، ۳۴/۴۹ و ۸۵/۱۶ بود. حلال‌های آلی و دیگر مواد شیمیایی با درجه تجزیه ای از شرکت‌های سیگما و مرک خریداری شد.

- تهیه پودر زعفران

زعفران سرگل صادراتی با دقت بسیار در یک هاون چینی کوبیده شد تا به صورت پودری یکنواخت در آید. پودر زعفران تهیه شده به نحوی الک شد که ۹۵ درصد آن از الک آزمایشگاهی با مش ۵۰ میکرومتر عبور کند. این

- طراحی آزمایش

روش سطح پاسخ (RSM¹)

هنگامی که عوامل و روابط زیادی روی متغیر پاسخ تأثیر داشته باشند روش‌شناسی سطح پاسخ یکی از ابزارهای مؤثر برای بهینه‌سازی فرایند به شمار می‌رود. RSM روش آماری موثری است که با کمترین منابع و داده‌های کمی و با طرح آزمایشی مناسب هم‌زمان به بررسی اثر چندین متغیر می‌پردازد (جاهد و همکاران، ۱۳۹۱).

با توجه به نتایج حاصل از تحقیقات پیشین، حلال‌های آلی استن و اتانول جهت استخراج عصاره زعفران در نظر گرفته شد (رجب زاده و همکاران، ۱۳۸۷). از آنجا که هدف اصلی در این قسمت، بررسی آثار اصلی و متقابل نسبت حلال‌های استن و اتانول به آب و نسبت حلال به زعفران در دمای محیطی و زمان ثابت طی فرایند استخراج بود، از روش سطح پاسخ برای انجام مطالعات استفاده شد. از این رو نخست بر اساس تعداد فاکتورها و سطوح آنها مطابق جدول ۱، ۹ مورد شرایط استخراج با ۶ تکرار در نقطه مرکزی و دو نوبت انجام آزمایش (۲۶ نمونه) برای هریک از حلال‌های استن و اتانول به طور جداگانه تعیین گردیدند.

جدول ۱- تیمارهای به کار گرفته شده در استخراج با روش سرد

تیمار	نسبت آب در حلال (میلی لیتر)	نسبت حلال به زعفران (میلی لیتر به گرم زعفران / نسبت حجمی /وزنی)
۱	۸۰	۱۰
۲	۲۰	۱۰
۳	۸۰	۲۰
۴	۲۰	۲۰
۵	۸۰	۱۵
۶	۲۰	۱۵
۷	۵۰	۱۰
۸	۵۰	۲۰
۹	۵۰	۱۵
۱۰	۵۰	۱۵
۱۱	۵۰	۱۵
۱۲	۵۰	۱۵
۱۳	۵۰	۱۵

میانگین مقادیر کروسین، سافرانال و پیکروکروسین به دست آمده از دومرتبه تکرار هر آزمایش به عنوان پاسخ (Y) در نظر گرفته شد. مدل چند متغیره زیر (معادله ۳) جهت پیش بینی ارتباط میان پاسخ و متغیرهای مستقل (نسبت حلال به آب (X₁) و نسبت حلال به زعفران (X₂)) استفاده شد:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \varepsilon \quad (\text{معادله ۳})$$

در معادله فوق Y پاسخ پیش بینی شده، β_0 ضریب ثابت، β_1 ، β_2 اثرات خطی، β_{11} ، β_{22} اثر مربعات (اثرات درجه دوم / کوادراتیک) و β_{12} اثرات متقابل می‌باشد. به منظور تجزیه و تحلیل و رسم نمودارهای مربوط به روش سطح پاسخ از نرم‌افزار Minitab15 (سال ۲۰۰۷ - آمریکا) استفاده شد. معنی دار بودن هر یک از جملات در معادله رگرسیونی مورد بررسی قرار گرفت و کارایی مدل با استفاده از آماره‌های R² و R²_{adjusted} بررسی شد. منحنی‌های سطح پاسخ نیز توسط همین نرم افزار ترسیم شدند.

- استخراج عصاره زعفران در حلال‌های هیدروالکلی

عصاره حاصل از یک گرم پودر زعفران تحت تیمارهای مورد اشاره در جدول ۱ و در دما و زمان مشخص استخراج گردید. یک میلی‌لیتر از عصاره حاصله پس از فیلتراسیون به حجم ۱۰۰۰ رسانده شد و جهت اندازه‌گیری مقادیر کروسین، سافرانال و پیکروکروسین به کار رفت (بی‌نام، ۱۳۸۹).

یافته‌ها

- گزینش مدل مناسب و تجزیه مدل برازش یافته

جهت تعیین روند تغییرات در فرایند استخراج و بررسی هر یک از فاکتورهای نسبت حلال به آب و نسبت حلال به زعفران در ابتدا نیاز به تعیین مناسب ترین مدل جهت برازش داده‌های آزمون می‌باشد.

نتایج این بررسی نشان داد که افزودن ضرایب به مدل تا رسیدن به مدل درجه دوم به طور معنی دار باعث بهبود مدل گردیده است. نتایج نقصان برازش و ضرایب رگرسیونی مدل چند جمله‌ای درجه دوم (R² و R²_{adjusted}) برای متغیرهای وابسته در جدول ۲ آورده شده است. R²

¹ Response Surface Methodology (RSM)

نتایج جدول ۳ نشان می دهد که نسبت استن به آب و نسبت حلال به زعفران به صورت خطی اثرات مشابه و معنی دار ($P < 0.05$) بر روی سافرانال داشته اند، به طوری که حتی اثر متقابل آنها بر روی سافرانال نیز معنی دار بوده، ولی برای حلال اتانول تنها نسبت حلال به زعفران در سطح ۵ درصد معنی دار می باشد.

جهت بررسی اثر متغیرهای مستقل بر صفات مورد آزمایش، از نمودارهای سطح پاسخ استفاده شد. شکل ۱، اثر نسبت آب به حلال و میزان حلال به زعفران ((الف). حلال استن و آب و (ب). حلال اتانول و آب) بر مقدار عطر زعفران (سافرانال) را نشان می دهد. شکل ۱ - الف نشان می دهد که با افزایش نسبت آب به استن از مقدار عطر (سافرانال) به طور قابل توجهی کاسته شده است. این اثر در نسبت‌های پایین‌تر میزان حلال به وزن نمونه شکل ۱ - الف به طور مشخص‌تری قابل ملاحظه است. (شکل ۱ - ب) نشان می‌دهد مقدار سافرانال استخراج شده در نقاط مرکزی متغیرهای تعریف شده از مقدار بیشتری برخوردار می باشد (بین ۴۰ تا ۶۰ میلی لیتر آب در حلال هیدروالکلی و نسبت حجم حلال به وزن زعفران برابر ۱۵).

برای مقادیر سافرانال، کروسین و پیکروکروسین در تیمارهای استن/ آب به ترتیب برابر ۰/۸۳، ۰/۹۲ و ۰/۶۵ و برای تیمارهای اتانول به آب برابر ۰/۶۲، ۰/۸۵ و ۰/۶۶ محاسبه شد (جدول ۲).

همانطور که نتایج ارائه شده در جدول ۲ نشان می دهد تنها نتایج مربوط به سافرانال ($P = 0.034$) در تیمارهای حلال استن/ آب و کروسین ($P = 0.011$) در تیمارهای حلال (اتانول/ آب) معنی دار گردیده است؛ ولی با توجه به مقادیر بالای R^2 و عدم منفی بودن $R^2_{\text{Predicted}}$ مدل ارایه شده برای تخمین پاسخ‌های مربوطه مناسب می باشد. از آنجا که بالا بودن مقدار R^2 همیشه نشان دهنده تناسب برازش مدل نمی باشد (Koochaki et al., 2009) به همین دلیل مقادیر R^2_{adjusted} نیز مورد بررسی قرار گرفت. R^2_{adjusted} برای مقادیر سافرانال، کروسین و پیکروکروسین در حلال استن/ آب به ترتیب ۰/۷۸، ۰/۸۹ و ۰/۵۶ و در خصوص حلال اتانول/ آب به ترتیب ۰/۵۲، ۰/۸۱ و ۰/۵۸ به دست آمد (جدول ۲).

- بررسی اثر متغیرها بر عطر زعفران (سافرانال)

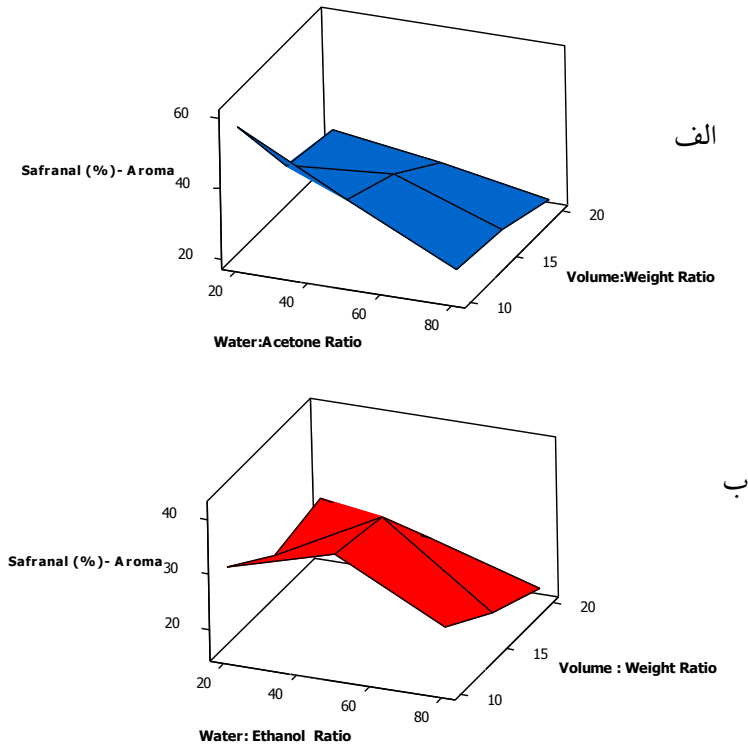
جدول ۲- ضرایب پیش بینی شده و ضرایب تعیین (R^2) از برازش مدل مربع کامل بر روی نسبت حلال و $\frac{\text{استن}}{\text{آب}}$ و $\frac{\text{اتانول}}{\text{آب}}$

نوع حلال	پارامترهای مورد بررسی	ثابت	A	B	A ²	B ²	AB	R ²	R ² -adj	R ² predicted	p-value	Lack of fit
استن/ آب	سافرانال	۹۳/۹۷	-۰/۳۹	-۴/۶۵	-۰/۰۰۴	-۰/۰۴۲	۰/۰۳۴	۸۲/۵۷	۷۸/۱۱	۶۶/۰۷	۰/۰۳۴	۱۵۶/۳۲
	کروسین	۲۸۰/۶۲	۳/۲۲	-۳/۹۵	-۰/۰۶۰	-۰/۱۳	۰/۰۲۱	۹۱/۹۷	۸۹/۳۶	۸۳/۶۱	۰/۰۳۶	۱۴۸/۲
	پیکروکروسین	۱۰/۵۷	-۰/۱۹۷۵	۰/۱۷۴	-۰/۰۲۶	-۰/۰۳۵	-۰/۰۱۷	۶۵/۰۵	۵۶/۳۲	۲۵/۶۷	۰/۲۱۱	۱۸۳/۳۳
اتانول/ آب	سافرانال	۸/۹۷	-۰/۹۵	۱/۳۴	-۰/۰۰۹	-۰/۰۰۶	-۰/۰۰۹	۶۲/۰۳	۵۱/۶۴	۳۳/۴۹	۰/۲۳۰	۱۲۲/۳۷
	کروسین	-۳۴۲/۰۵	۸/۵۶	۴۹/۶۲	-۰/۱۱	-۱/۷۶	-۰/۰۵	۸۴/۶۲	۸۰/۸۷	۷۵/۵۹	۰/۰۱۱	۳۹۰/۴۶
	پیکروکروسین	-۱۲۶/۶۲۵	۱/۸۹	۲۲/۱۶	-۰/۰۲۷	-۰/۰۸۶	۰/۰۴۵	۶۶/۶۵	۵۸/۳۱	۳۸/۴۹	۰/۱۵۹	۱۳۴۹/۶

جدول ۳- p-value حاصل از آنالیز مدل سطح پاسخ درجه دوم مربوط به اثر نسبت حلال به زعفران (B) و نسبت حلال آلی (استن یا اتانول) به آب بر روی ترکیبات مؤثره زعفران

منبع	حلال اتانول- آب			حلال استن- آب		
	سافرانال	کروسین	پیکروکروسین	سافرانال	کروسین	پیکروکروسین
A	۰/۰۵۵	۰/۰۰۱	۰/۴۶۶	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
B	۰/۰۰۶	۰/۷۷۸	۰/۱۴۷	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۱۳
A ²	۰/۰۰۱	۰/۰۰	۰/۰۰۲	۰/۰۶۹	۰/۰۰	۰/۰۱۳
B ²	۰/۵۱۰	۰/۰۰۳	۰/۰۰۵	۰/۵۷۹	۰/۷۱۸	۰/۶۹۵
AB	۰/۴۶۹	۰/۴۶۵	۰/۲۴۶	۰/۰۰۴	۰/۶۷۲	۰/۷۲۹

ارزیابی شرایط استخراج عصاره زعفران در سیستم‌های حلال



شکل ۱- نمودار سطح پاسخ اثر نسبت حلال به زعفران و آب به حلال (الف- استن و ب- اتانل) بر مقدار عطر زعفران (سافراناال)

در سیستم‌های حلال آب/اتانول و استن/آب به ترتیب برابر با ۲۴۰ و ۳۰۰ و این مقادیر برای سافراناال به ترتیب برابر ۴۰ و ۶۰ می‌باشد. مقدار کروسین، همانند سافراناال استخراج شده در نواحی مرکزی متغیرهای تعریف شده (نسبت آب به اتانول برابر ۵۰ و نسبت حلال به نمونه برابر ۱۵)، از بالاترین مقدار برخوردار می‌باشد (برابر ۲۴۰).

بررسی اثر متغیرها بر طعم زعفران (پیکروکروسین)
اثر نسبت آب به حلال و حلال به زعفران بر مقدار طعم زعفران (پیکروکروسین) با استفاده از منحنی سطح پاسخ برازش شده در شکل ۳ نشان داده شده است. نکته قابل توجه در شکل ۳ افزایش قابل توجه پیکروکروسین (طعم) زعفران در عصاره آبی استخراج شده با استفاده از حلال‌های اتانول/آب نسبت به استن/آب است (حداکثر میزان استخراج پیکروکروسین با استفاده از حلال آب/اتانول برابر با ۸۰ و این مقدار در مورد حلال استن/آب برابر ۱۵ می‌باشد).

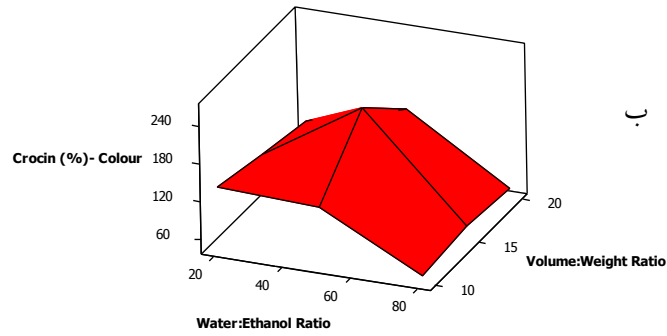
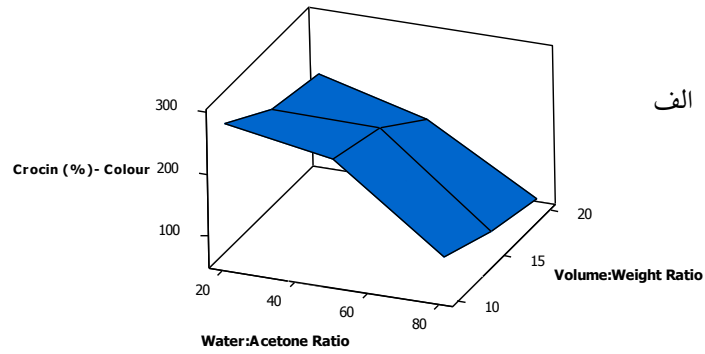
تنها اثر خطی تغییرات حجم استن/آب بر روی پیکروکروسین استخراجی معنی دار است ($P < 0.005$). به

۶۸ - بررسی اثر متغیرها بر رنگ زعفران (کروسین)

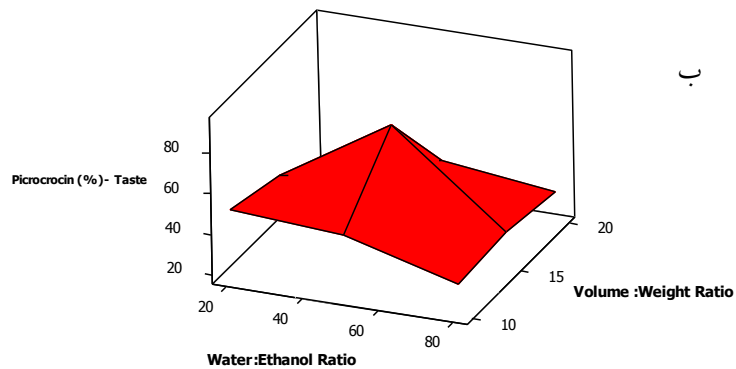
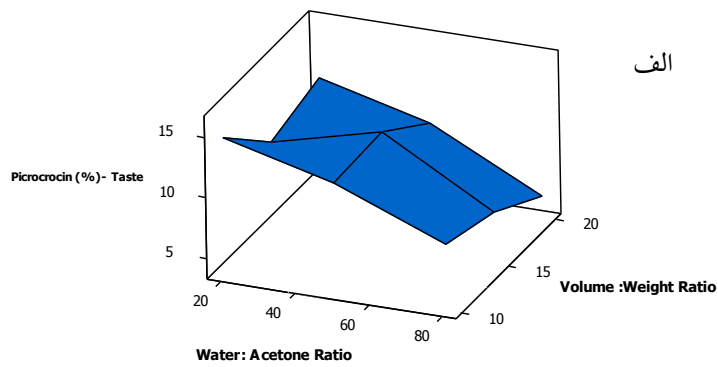
نسبت استن به آب و مقدار حجمی آن به وزن زعفران اثری معنی‌دار و مشابه سافراناال بر روی کروسین استخراجی داشتند. نکته قابل توجه اینکه تغییرات نسبت حلال به زعفران، دارای اثری معنی‌دار بر کروسین استخراجی نمی‌باشد. این موضوع در حالی است که تغییرات نسبت اتانل به آب باعث ایجاد اثری مشخص بر مقدار کروسین استخراجی گردیده است.

اثر نسبت‌های آب به حلال‌های استن و اتانول و همچنین مقدار حجمی حلال به وزن زعفران و تاثیر آن‌ها بر رنگ زعفران (کروسین) استخراج شده در شکل ۲ نشان داده شده است. همانند نتایج قبل، با کاهش مقدار نسبت آب به استن از ۸۰ به ۲۰ مقدار جذب رنگ از ۱۰۰ به حدود ۲۹۰ افزایش چشمگیر نشان می‌دهد؛ به طوری که این روند افزایشی در تمام نسبت‌های حلال به وزن زعفران دیده می‌شود (شکل ۲- الف). نتایج نشان داده شده در شکل‌های ۱ و ۲ بیانگر آن است که مقدار سافراناال (عطر) و کروسین (رنگ) استخراج شده در حلال استن بسیار بیشتر از اتانول بوده است، به طوری که حداکثر میزان استخراج کروسین

عبارت دیگر، نتایج آماری نشان می دهد که پیکروکروسین مطالعه قرار دارد. استخراجی به میزان کمتری تحت تاثیر متغیرهای مورد



شکل ۲- نمودار سطح پاسخ اثر نسبت حلال به زعفران و آب به حلال (الف- استن و ب- اتانل) بر مقدار رنگ زعفران (کروسین)



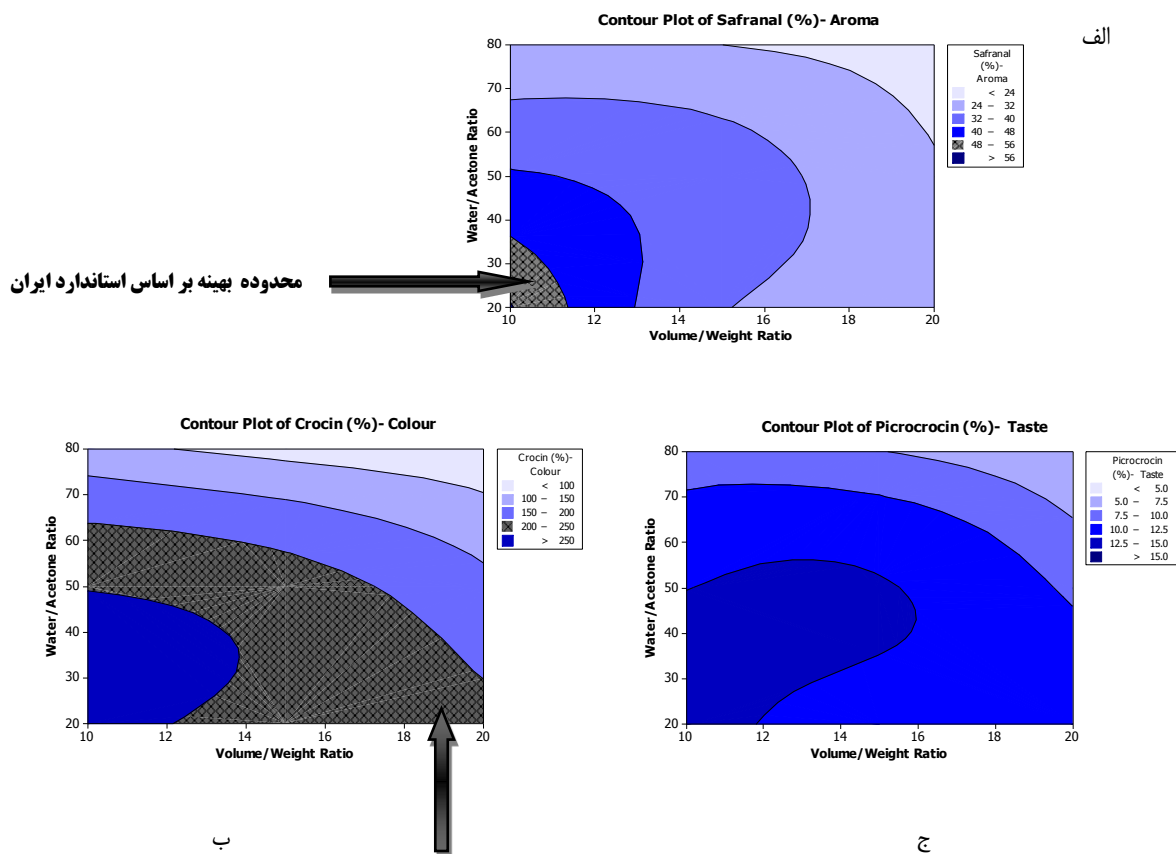
شکل ۳- نمودار سطح پاسخ اثر نسبت حلال به زعفران و آب به حلال (الف- استن و ب- اتانل) بر مقدار طعم زعفران (پیکروکروسین)

- بهینه سازی شرایط استخراج زعفران

شرایط بهینه برای استخراج ترکیبات مؤثره زعفران بر اساس استانداردهای ملی ایران تعیین گردید. مقادیر کروسین، سافراناال و پیکروکروسین برای نمونه‌های با کیفیت ممتاز به ترتیب در دامنه ۲۲۰-۵۰، ۱۵۰-۲۰ و ۸۵-۷۰ واحد قرار دارد (بی نام، ۱۳۸۹). بر این مبنای شرایط بهینه برای استخراج ترکیبات مؤثره زعفران برابر ۱۰ میلی‌لیتر حلال استن- آب (۲۰:۸۰ برای استن: آب) و ۱۳/۵ میلی‌لیتر حلال اتانل- آب (۴۵:۵۵ برای اتانل: آب) به نسبت هر گرم زعفران در دمای محیطی (۲۵°C) و مدت زمان ۱۶ ساعت محاسبه شد.

مقایسه نتایج استخراج تحت شرایط بهینه با نتایج پیش بینی شده توسط مدل درجه دوم بیانگر همخوانی مناسب میان نتایج به دست آمده با روش تجربی و مقادیر پیش بینی شده با استفاده از روش آماری می‌باشد (جدول ۴).

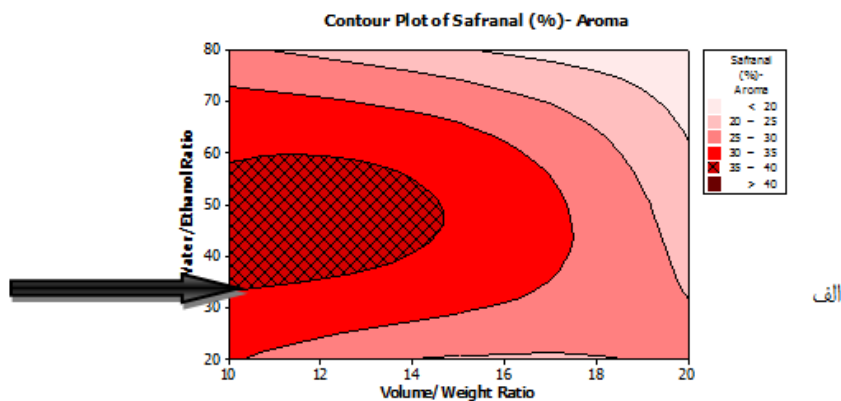
محدوده بهینه استخراج نیز از طریق منحنی‌های کنتور پاسخ‌ها برای هر یک از متغیرها مشخص شد. همانطور که پیش از این اشاره شد بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۱-۲۵۹، تجدید نظر سوم مقادیر کروسین، سافراناال و پیکروکروسین برای نمونه‌های با کیفیت ممتاز به ترتیب بیش از ۲۲۰، ۵۰ و ۸۵ واحد تعیین شده است (بی‌نام، ۱۳۸۹)، بدین ترتیب محدوده بهینه بر اساس استانداردهای ملی زعفران ایران در شکل ۴ با هاشور نشان داده شده است. مقایسه نمودارهای کنتور بیانگر آن است که مقدار پیکروکروسین در عصاره آبی زعفران استخراج شده توسط حلال آب- استن بسیار پایین‌تر از حد استاندارد معمول می‌باشد، به طوری که نمودار کنتور مربوطه، نتوانسته است محدوده بهینه‌ای را به‌طور خاص مشخص نماید (شکل ۴-ج).



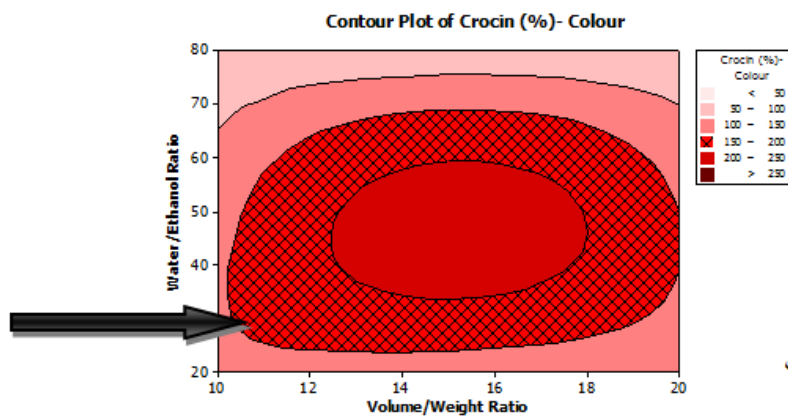
شکل ۴- تعیین محدوده بهینه در استخراج سافراناال (الف)، کروسین (ب) و پیکروکروسین (ج) به عنوان تابعی از نسبت آب به استن و نسبت حلال به زعفران

جدول ۴- مقادیر اندازه گیری شده ترکیبات موثره زعفران (پیکروکروسین، کروسین و سافرانال) در مقایسه با مقادیر پیش بینی شده حاصل از شرایط بهینه

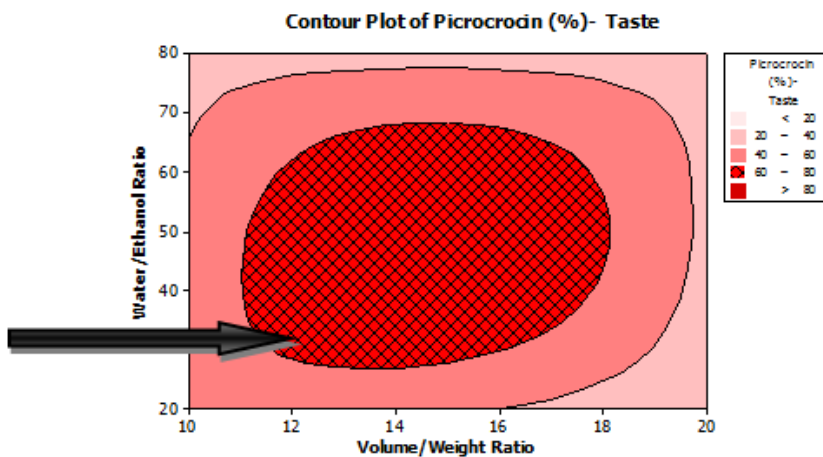
فاکتور	پیکروکروسین اندازه گیری شده	پیکروکروسین پیش بینی شده	کروسین اندازه گیری شده	کروسین پیش بینی شده	سافرانال اندازه گیری شده	سافرانال پیش بینی شده
حلال استن- آب	۱۰/۸۳	۱۳/۵۳	۲۵۵/۲۷	۲۷۲/۷۲	۴۵/۴۶	۵۳/۰۴
حلال اتانل- آب	۷۰/۳۴	۷۳/۵۰	۲۰۲/۹۵	۱۹۹/۸۵	۳۱/۷۴	۳۵/۱۹



الف



ب



ج

شکل ۵- تعیین محدوده بهینه در استخراج سافرانال (الف)، کروسین (ب) و پیکروکروسین (ج) به عنوان تابعی از نسبت آب به اتانل و نسبت حلال به زعفران

جدول ۵- نسبت حلال‌های ترکیب شده جهت مقایسه ترکیبات موثره استخراج شده زعفران در سیستم‌های دو

تایی و سه تایی			
نمونه	اتانول	استن	آب میلی لیتر
۱	۶۰	-	۴۰
۲	۳۰	۳۰	۴۰
۳	۴۵	۱۵	۴۰
۴	۱۵	۴۵	۴۰
۵	-	۶۰	۴۰

درصد سافرانال استخراجی در حلال‌های استنی دوتایی و حتی سه تایی که مقدار استن بیشتر از اتانول موجود بود به مراتب بیشتر از سیستم‌های حلال آب- اتانول شد (شکل ۷) و در تمامی مقادیر استخراجی، درصد سافرانال در دامنه استاندارد قرار گرفته بود (بالاتر از ۳۰٪).

درصد کروسین استخراجی نیز همانند سافرانال در حلال‌های حاوی مقادیر بالاتر استن در مقایسه با سایر سیستم‌ها بیشتر است به طوری که در سیستم سه تایی (سه فازی) آب، استن و اتانول به نسبت‌های ۴۰، ۴۵ و ۱۵ بیشترین مقدار رنگ استخراجی (برابر ۲۷۱) مشاهده گردید (شکل ۸). در اینجا نیز تمامی مقادیر اندازه گیری شده در محدوده قابل قبولی قرار گرفته‌اند به طوری که در برخی از نمونه‌ها درصد استخراج شده به مراتب بیشتر از حد استاندارد نیز می‌باشد (بالاتر از ۲۲۰- شکل ۸).

بحث

- **گزینش مدل مناسب و تجزیه مدل برازش یافته**
بررسی مدل بهبود یافته نشان می‌دهد مدل درجه دوم بهترین مدل برای بررسی اثر فاکتورها بر روند تغییرات متغیرهای سطح پاسخ می‌باشد. به طور متداول جهت بررسی صحت مدل از ضریب تبیین R^2 و نقصان برازش^۱ استفاده می‌شود. ضریب تبیین (R^2) به عنوان نسبت تغییرات توصیف شده توسط مدل به تغییرات کل بیان می‌شود که معیاری از درجه تناسب برازش می‌باشد. معنی دار بودن نقصان برازش در یک مدل بیانگر این است که نقاط به خوبی اطراف مدل قرار نگرفته‌اند و در نتیجه نمی‌توان از مدل برای پیش‌گویی مقادیر متغیرهای تابع

شکل ۵ محدود بهینه شرایط استخراج که از طریق کنتور پاسخ‌های اندازه‌گیری شده برای سافرانال (الف)، کروسین (ب) و پیکروکروسین (ج) به عنوان تابعی از نسبت آب به حلال (اتانول) و نسبت آن به وزن زعفران تعیین شده است. محدوده بهینه بر اساس استانداردهای ملی زعفران ایران با هاشور نشان داده شده است.

بررسی دقیق تر نمودارهای کنتور (شکل‌های ۴ و ۵) نشان می‌دهد که محدوده مناسب جهت داشتن استخراجی بهینه، دارا بودن ۲۰-۴۰ میلی لیتر آب / ۶۰-۸۰ میلی لیتر استن و میزان ۱۰-۱۲ میلی لیتر حلال به ازای هر گرم زعفران برای ترکیب حلال استن- آب و در مورد حلال آب- اتانول، نسبت ۳۰-۶۰ میلی لیتر آب به ۱۶-۱۲ میلی لیتر اتانول به هر گرم زعفران می‌باشد.

- مقایسه استخراج ترکیبات موثره زعفران در حلال‌های دو تایی و سه تایی

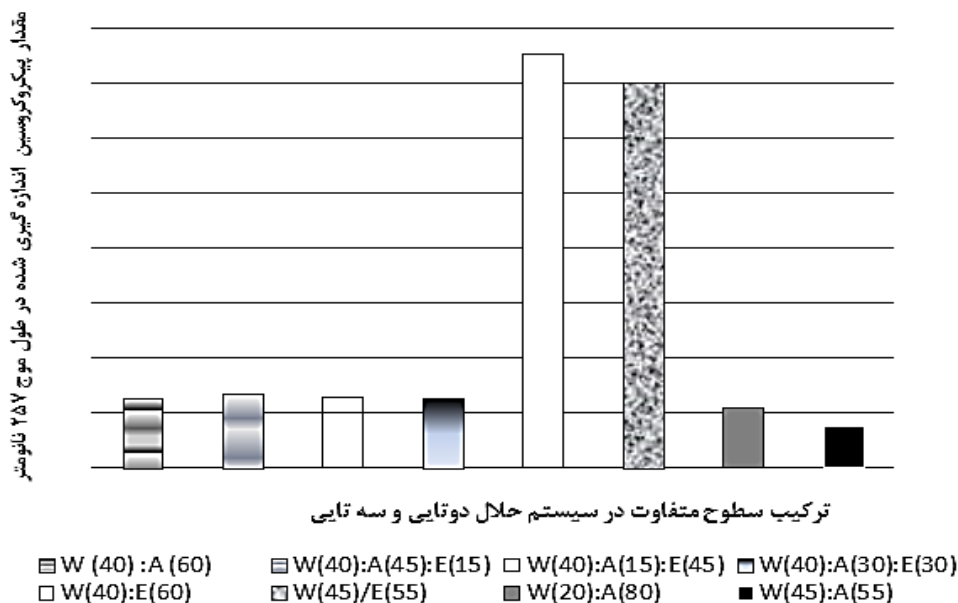
با توجه به نمودارهای کنتور مورد اشاره در شکل‌های ۴ و ۵، حداقل میزان آب در فرایند استخراج ترکیبات موثره ۴۰ میلی لیتر می‌باشد که با توجه به مسائل اقتصادی، حداقل میزان آب مورد نیاز به عنوان پایه در فرایند استخراج سه تایی نیز در نظر گرفته شد. حجم مربوط به فازهای استن و اتانول موجود در سیستم طبق شرایط جدول ۵ تغییر پیدا کرد (سیتم‌های حلال دوتایی و سه تایی). مقدار حجم محلول برای هر گرم زعفران برای تمام نمونه‌ها ۱۲ میلی لیتر، زمان استخراج ۱۶ ساعت در دمای محیطی 25°C انجام شد. همچنین مقادیر اندازه‌گیری شده برای ترکیبات موثره زعفران در عصاره‌های آبی حاصل از سیستم سه تایی نتایج مربوط به شرایط بهینه در سامانه دوتایی مقایسه گردید.

مقدار پیکروکروسین استخراج شده در عصاره‌های آبی مختلف در شکل ۶ نشان داده شده است. بر خلاف انتظار، ترکیب استن و اتانول با یکدیگر در سیستم‌های سه تایی (سه فازی) تاثیر زیادی در افزایش پیکروکروسین (طعم) زعفران در عصاره‌های آبی حاصله نشان نداد و در تمامی تیمارهای مورد بررسی مقدار پیکروکروسین برابر 1 ± 10 اندازه‌گیری شد.

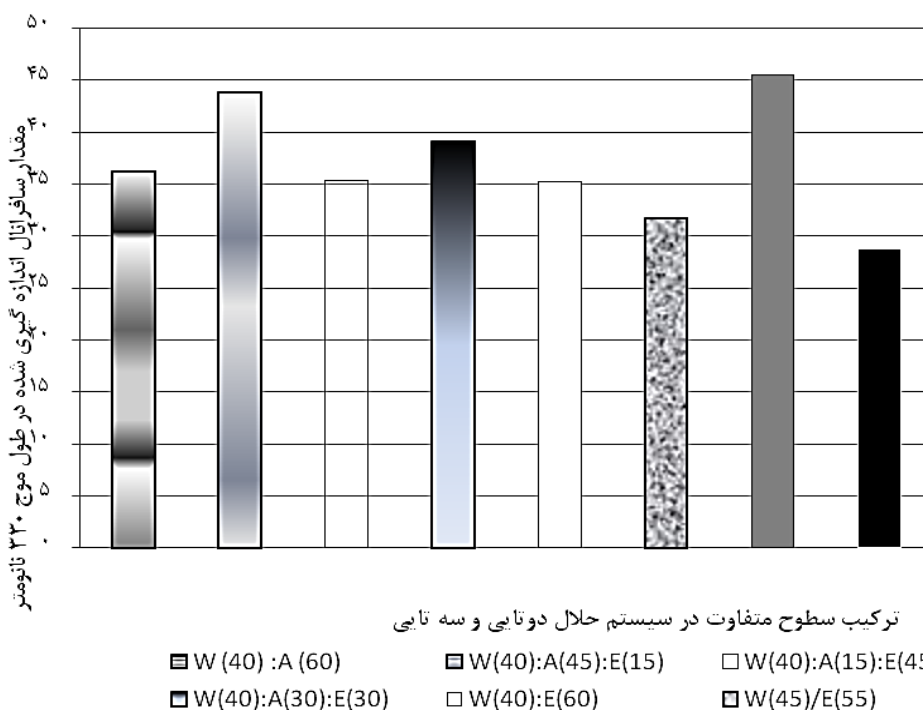
¹ Lack of Fit

از آنجا که R^2 و $R^2_{adjusted}$ مدل مورد بررسی تفاوت چندانی با یکدیگر نداشتند می‌توان نتیجه گرفت که متغیرهای غیرمعنی دار بی جهت به مدل اضافه نشده اند.

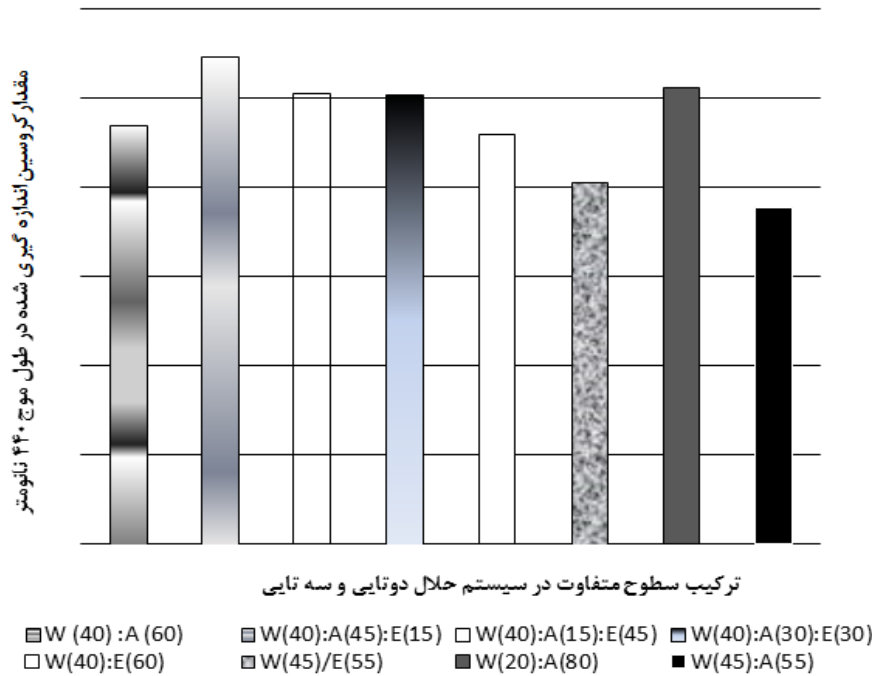
استفاده نمود. بنابراین معنی دار نبودن آزمون نقصان برازش بدین معنی است که مدل توانسته است به خوبی بر داده‌های مورد بررسی برازش یابد (کوچکی، ۱۳۸۷).



شکل ۶- مقایسه مقادیر بی‌کروکوسین اندازه گیری شده در سیستم های حلالی دوتایی و سه تایی، W(آب)، A(استن) و E(اتانول)



شکل ۷- مقایسه مقادیر سافرانال اندازه گیری شده در سیستم های حلالی دوتایی و سه تایی، W(آب)، A(استن) و E(اتانول)



شکل ۸- مقایسه مقادیر کروسیین اندازه گیری شده در سیستم های حلالی دوتایی و سه تایی، W (آب)، A (استن) و E (اتانول)

سطوح حجم حلال به وزن نمونه، مقدار کروسیین به ترتیب کمتر از ۱۰۰ و ۶۰ می باشد.

Agarwal و همکاران استفاده از ۲۰ میلی لیتر حلال (آب و اتانول به نسبت ۱:۱) را به ازای هر گرم زعفران جهت استحصال عصاره زعفران مفید و مطلوب گزارش کردند (Agrawal et al., 2006). در بررسی دیگری کل کروسیین زعفران با استفاده از روش کریستالیزاسیون استخراج شده است. در این بررسی اتانول ۸۰٪ به عنوان بهترین حلال انتخاب و به عنوان بستر کریستالیزاسیون استفاده گردید (Hadizadeh et al., 2010).

- بررسی اثر متغیرها بر طعم زعفران (پیکروکروسیین) در تحقیقات بسیاری نشان داده شده است که با گذشت زمان میزان کروسیین و پیکروکروسیین در دما و رطوبت نسبی محیط کاهش و میزان سافرانال افزایش می یابد (Morimoto et al., 1994; Alonso et al., 1990).

کاهش میزان کروسیین به دلیل هیدرولیز آن و تبدیل آن به کروسیتین آزاد می باشد. سافرانال از گروه ترین ها می باشد که در زعفران تازه به صورت پیکروکروسیین غیر فرار است ولی در اثر گذشت زمان تجزیه شده و آلدئید فرار سافرانال آزاد می گردد. بنابراین، بین میزان پیکروکروسیین و سافرانال، رابطه ی معکوس وجود دارد (سالاری و همکاران، ۱۳۸۹)

- بررسی اثر متغیرها بر عطر زعفران (سافرانال)

نسبت آب و حلال و همچنین نسبت حلال به وزن زعفران به عنوان پارامترهای مهم جهت استخراج زعفران مطرح می باشند. نتایج ارائه شده در جدول ۳ نشان می دهد که اثر استن بر روی سافرانال استخراجی به مراتب بیشتر از اتانول می باشد.

کاهش مقدار سافرانال با افزایش نسبت آب به استن بیانگر آن است که استن اثر قابل ملاحظه ای بر روی استخراج و آزاد سازی عطر زعفران داشته است. نتایج ارائه شده در تحقیقات پیشین نشان داد که میزان محتوای پیکروکروسیین، کروسیین و سافرانال در روش استخراج سوکسله و حلال استن در مقایسه با روش سرد از مقادیر مناسب تری برخوردار می باشند (رجب زاده و همکاران، ۱۳۸۷).

- بررسی اثر متغیرها بر رنگ زعفران (کروسیین)

بررسی نمودارهای سطح پاسخ نشان می دهد که آب به تنهایی حلال مناسبی جهت استخراج رنگ (کروسیین) در زعفران نمی باشد. نتایج نشان می دهد افزایش نسبت آب در سیستم های حلالی به کار رفته موجب کاهش میزان کروسیین تا کمتر از حد استاندارد (برابر ۲۲۰) می گردد. در بالاترین نسبت آب به استن و آب به اتانول، در تمامی

که این نتایج با پژوهش انجام شده کاملاً همخوانی دارد.

- بهینه سازی شرایط استخراج زعفران

با توجه به نتایج ارائه شده در جدول ۴ مقدار رنگ (کروسین) و عطر (سافرانال) استخراج شده در عصاره آبی زعفران توسط حلال استن-آب به طور قابل توجهی بیشتر از ترکیب اتانول-آب بوده ولی مشکل اصلی مقدار تلخی و طعم (پیکروکروسین) آن می باشد که به هیچ عنوان قابل مقایسه با ترکیب استخراج شده توسط حلال اتانول-آب نمی باشد. با توجه به نتایج حاصله، جهت دستیابی به نتایج مطلوبتر، استفاده از سیستم حلال سه تایی استن-اتانول-آب جهت پوشش دهی استخراج سافرانال-کروسین که استفاده از سیستم حلال دوتایی استن-آب در آنها مناسب دیده شد و پیکروکروسین که در استخراج آن استفاده از سیستم دوتایی اتانول-آب مطلوب گزارش شد پیشنهاد گردید.

رنگ (کروسین) و عطر (سافرانال) در عصاره آبی به صورت استفاده از حلال سه تایی (سه فازی) آب، استن و اتانول به نسبت‌های ۴۰، ۴۵ و ۱۵ به نسبت ۱۲ میلی لیتر برای هر گرم زعفران در دمای محیطی (۲۵°C) و زمان استخراج ۱۶ ساعت تعیین گردید. در این شرایط مقدار کروسین، سافرانال و پیکروکروسین به ترتیب برابر ۲۲۹/۰۵، ۳۵/۱۷ و ۷۵/۵۳ در عصاره آبی زعفران اندازه‌گیری شد. جهت دستیابی به حداکثر طعم (پیکروکروسین) بکارگیری سیستم حلال دوتایی اتانول و آب با نسبت ۲:۳ و به نسبت ۱۲ به ۱ حجمی /وزنی در دمای محیطی (۲۵°C) و زمان استخراج ۱۶ ساعت پیشنهاد می شود. بدون شک شناخت محصول می تواند دیدگاه روشنی در خصوص پارامتر کیفی مورد نیاز (عطر، طعم و رنگ) و به تبع آن انتخاب شرایط استخراج مناسب فراهم آورد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از جناب آقای علی سالاری ریاست محترم شرکت بازرگانی زعفران اسفندان که با حمایت‌های معنوی و مادی خود و فراهم ساختن زیر ساخت‌های لازم، انجام این پروژه را تسهیل نمودند تشکر و قدردانی به عمل می آید.

منابع

آخوند زاده، ش.، محمدی، م.، خانی، م.، جمشیدی، الف.، دلیری همپا، ع. و باستانی، ش. (۱۳۸۲). عصاره‌گیری، فرمولاسیون و اثر بخشی گیاه زعفران به عنوان یک داروی ضد افسردگی در مقایسه با ایمی پرامین، گیاهان دارویی، دوره ۲، شماره ۸، صفحات ۵۵-۶۲.

بی نام. (۱۳۸۹). زعفران - ویژگی‌ها، استاندارد ملی ایران، شماره ۱-۲۵۹، تجدید نظر سوم.

جانیان زاده، م. و زارعی جلیانی، ح. (۱۳۸۸). اثرات رنگیزه کاروتنوئیدی زعفران بر پلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها و رشد سلول‌های Hela؛ دانش زیستی ایران، دوره ۴، شماره ۱، صفحات ۳۹-۳۱.

جاهد، ع.، حداد خدا پرست، م. ح.، بهزاد، خ.، الهی، م. و کوچکی، آ. (۱۳۹۱). بهینه یابی شرایط تصفیه شربت خام چغندر قند با استفاده از بنتونیت با روش سطح پاسخ (RSM)، نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، جلد ۸، شماره ۱، صفحات ۷۲-۶۰.

- مقایسه استخراج ترکیبات مؤثره زعفران در حلال‌های دو تایی و سه تایی

از لحاظ میزان قطبیت، به ترتیب، آب، اتانول و استن قرار دارند که همین امر باعث کاهش میزان استخراج پیکروکروسین در سیستم‌های حلال سه تایی محتوی استن شده است. در مقابل با توجه به ماهیت غیر قطبی سافرانال، همانطور که نتایج نشان می‌دهند، با افزایش سهم اتانول در سیستم حلال سه تایی، از میزان استخراج سافرانال کاسته شده است.

درصد سافرانال و کروسین استخراجی در سیستم سه تایی آب، استن، اتانول به نسبت‌های ۴۰، ۴۵ و ۱۵ بیشترین میزان را از خود نشان دادند که این امر می‌تواند به محققین و صنایعی که بدنبال استخراج مقادیر بالاتری از رنگ زعفران باشند کمک شایانی نماید.

نتیجه گیری

ارائه شرایط مناسب در استخراج ترکیبات مؤثره گیاهی باید به گونه ای صورت گیرد که ضمن ایجاد بالاترین بازده، نیاز صنعت را از بعد صرفه جویی در مصرف انرژی نیز مد نظر قرار دهد. با این دیدگاه، در بررسی حاضر شرایط استخراج ترکیبات مؤثره زعفران با حصول حداکثر درصد

یگانه، م.، خانفاری، آ.، فلاحیان، م. و شریفان، الف. (۱۳۸۹). بررسی نقش بیولوژیک عصاره ی زعفران در تحریک فعالیت ضد میکروبی انتروکوکوس هایرائی، فصلنامه علوم و فناوری غذایی واحد سبزوار، سال دوم، شماره ۲، صفحات ۳۵-۲۵.

Agarwal, S. G., Agnihotri, V. K., Qazi, G. N., Suri, O. P. & Thappa, R. K. (2004). Method for the extraction of Saffron pigments and flavor concentrate. U.S. Patent. 7, 070,823.

Alonso, G. L., Varoan, R., Goamez, R., Navarro, F. & Salinas, M. R. (1990). Auto-oxidation in saffron at 40° C and 75% relative humidity. *Journal of Food Science*, 55(2), 595-596.

Fernandez, E. G. (2002). Process for obtaining an extract of Saffron. U.S. Patent. 6, 458,399.

Hadizadeh, F., Mohajeri, S. A. & Seifi, M. (2010). Extraction and purification of crocin from saffron stigmas employing a simple and efficient crystallization method. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 13 (14), 691-698.

Kadkhodae, R. & Hemmati Kakhki, A. (2006). Ultrasonic extraction of active compounds of saffron. *Acta Horticulture*, 739, 417-425.

Koocheki, A., Taherian, A. R., Razavi, S. M. A. & Bostan, A. (2009). Response surface methodology for optimization of extraction yield, viscosity, hue and emulsion stability of mucilage extracted from *Lepidium perfoliatum* seeds. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2369-2379.

Morimoto, S., Umezaki, Y., Shoyama, Y., Saito, H., Nishi, K., & Irino, N. (1994). Post-harvest degradation of carotenoid glucose ester in saffron. *Planta Medica*, 60(5), 438-440.

Raina, B. L., Agarwal, S. G., Bhatia, A. K. & Gaur, G. S. (1996). Changes in pigments and volatiles of saffron (*Crocus sativus* L.) during processing and storage. *Science of Food and Agriculture*, 71(1), 27-32.

Selim, K., Tsimidou, M. & Biliaderis, C. G. (2000). Kinetic studies of degradation of saffron carotenoids encapsulated in amorphous polymer matrices. *Food Chemistry*, 71(2), 199-206.

حیدری، س. (۱۳۹۱). بررسی روش‌های مختلف استخراج ترکیبات فعال از نمونه‌های زعفران؛ اولین همایش ملی آخرین دستاوردهای پژوهشی زعفران ایران، تربت حیدریه .

رزاقی، ر. و نوربخش، ر. (۱۳۸۲). بررسی اثرات ضد میکروبی ترکیبات کلالة زعفران. مجموعه مقالات سومین همایش ملی زعفران ایران، مشهد. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، صفحات ۲۴۰-۲۳۹ .

رجب زاده، ق.، ملک زاده، غ. و شریف، ع. (۱۳۸۷). بررسی تأثیر نوع حلال و روش استخراج بر میزان اولئورزین به دست آمده از زعفران. مجله پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، سال سوم، شماره اول، صفحات ۶۴-۵۷.

سالاری، ر.، حبیبی نجفی، م. ب.، کاراژیان، ح. و وزیرزاده، ب. (۱۳۸۹). ارزیابی تغییرات فیزیکوشیمیایی و میکروبی زعفران طی دوره ی نگه داری یکساله، نوآوری در علوم و فناوری غذایی، سال دوم، شماره اول، صفحات ۴۳-۳۵.

کریمی، غ.، طیبی، ن.، حسین زاده، ح. و شیرزاد، ف. (۱۳۸۳). بررسی سمیت تحت حاد عصاره آبی کلالة و گلبرگ زعفران در موش صحرایی، گیاهان دارویی، سال سوم، شماره ۱۲، صفحات ۳۶-۲۹.

کوچکی، الف. (۱۳۸۷). بررسی برخی خواص رئولوژیکی و کارکردی صمغ قدومه شیرازی (*Alyssum homalocarpum*) و تأثیر آن بر کیفیت نان، پایان نامه دکتری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد .

مهدوی خزاعی، ک.، همتی کاخکی، ع.، قربانی، م. و جعفری، س. م. (۱۳۹۱). بهینه سازی فرایند استخراج به کمک امواج مایکروویو آنتوسیانین های گلبرگ گل زعفران. اولین همایش ملی آخرین دستاوردهای پژوهشی زعفران ایران، تربت حیدریه، ۱۵ آذر ۱۳۹۱.

همتی کاخکی، ع. (۱۳۸۰). بهینه سازی عوامل موثر بر تولید رنگ خوراکی از گلبرگ زعفران، علوم و صنایع کشاورزی، دوره ۱۵، شماره ۲، صفحات ۲۰-۱۳.