

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده فیزیک و مهندسی هسته‌ای

پایان‌نامه کارشناسی ارشد فیزیک اتمی و مولکولی

بررسی تاثیر پارامترهای پلاسمای سرد بر خواص فیزیکی، شیمیایی و

ضد میکروبی زعفران

نگارنده:

الهه ابراهیمی

استاد راهنما:

دکتر سید ایمان حسینی

مهر ۱۳۹۹

تقدیم بہ

شما کہ ہر لمحہ از زندگی کم را سگر گزارا بودنتان، ہستم

پدر و مادر عزیزم

حمد و سپاس معبود یکجاہ را کہ پر تو الطاف بیکرانش بر ماسطع و آشکارا است، ادای شکرش را ہیج زبان و دیامی فضلش را ہیج کران نیست، و اگر در این وادی، ہستم؛ ہمہ محبت اوست.

بر خود لازم می دانم تا از ہمہ بزرگوارانی کہ در بہ تیجہ رسیدن این پایان نامہ نقش موثری داشتند، شکر و قدردانی کنم؛ از استاد ارجمندم جناب آقای دکتر سیدایمان حسینی کہ در کمال سعہ صدر با حسن خلق و فروتنی، از ہیج گلی در این عرصہ بر من دیغ ننمودند و زحمت راہنمایی این پایان نامہ را بر عمدہ کر قند و بہچنین جناب آقای دکتر حمید رضا صد لونی کہ با یاری ما و راہنمایی های بی چشمداشتستان، ہموارہ مرا مورد لطف و محبت خود قرار دادہ اند.

از دوستان کران یارم کہ مرا صمیمانہ و شفقتانہ یاری دادند و بہچنین مسئولین محترم دانشکدہ و... صمیمانہ شکر می نمایم.

تهدنامه

اینجانب الهه ابراهیمی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته فیزیک پلاسما دانشکده فیزیک و مهندسی هسته‌ای دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان‌نامه بررسی تاثیر پارامترهای پلاسمای سرد بر خواص فیزیکی، شیمیایی و ضد میکروبی زعفران تحت راهنمایی جناب دکتر سید ایمان حسینی متعهد می‌شوم.

- تحقیقات در این پایان‌نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهش‌های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان‌نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان‌نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان‌نامه رعایت می‌گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان‌نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافت‌های آن‌ها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان‌نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم‌افزارها و تجهیزات ساخته شده‌است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود. استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان‌نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی‌باشد.

زعفران محصولی با ارزش غذایی و اثرات دارویی بالا می‌باشد. آسپرژیلوس یکی از میکروارگانیسم‌های مهم زعفران به شمار می‌رود، که با تولید سم آفلاتوکسین می‌تواند سلامتی مصرف‌کنندگان را به خطر بیندازد. از این رو روش‌های میکروبزدایی این محصول از اهمیت بالایی برخوردار است. در این پژوهش محصول زعفران به کمک پلاسمای سرد که روشی مناسب برای ضدعفونی محصولات حساس به حرارت می‌باشد، میکروبزدایی گردید. اثر پلاسمای سرد با ولتاژ ۳/۲ کیلوولت و در مدت زمان ۲ دقیقه بر ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و میکروبی رشته‌های خشک زعفران بررسی گردید. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که پلاسمای هوا تأثیر قابل توجهی بر کاهش بار میکروبی زعفران داشته است. به کمک آنالیز طیف‌سنجی گسیل اپتیکی اثر عوامل و گونه‌های فعال پلاسما بر تغییرات شیمیایی و فیزیکی به وجود آمده در زعفران، مشخص گردید که پلاسما بدون آثار مخرب بر محصول توانسته است، میکروارگانیسم‌های آن را به صورت کامل از بین ببرد. تأثیر پردازش پلاسما بر ریخت شناسی، فعالیت آن‌تی‌اکسیدانی، ترکیبات شیمیایی اصلی، رنگ، طعم و عطر زعفران نیز به ترتیب توسط تصویربرداری FESEM، روش DPPH، اسپکتروفتومتری UV-Vis و رنگ سنجی بررسی شد. به‌طور کلی می‌توان بیان کرد که روش مذکور نه تنها آثار مخربی بر زعفران نداشته است، بلکه سبب افزایش برخی از شاخص‌های کیفیت سنجی آن شده است. از مزایای بالقوه این روش می‌توان به این مورد اشاره نمود که پردازش پلاسمایی در آخرین مرحله بسته‌بندی زعفران انجام می‌پذیرد. در این صورت تمامی آلودگی‌های محصول در طی برداشت، نگهداری، حمل و نقل و بسته‌بندی از طریق پردازش پلاسما از بین می‌رود.

واژه‌های کلیدی: پلاسمای سرد، ضدعفونی کردن زعفران در بسته‌بندی، متابولیت‌های اصلی، آسپرژیلوس نایجر.

فهرست مطالب

۱ فصل اول: معرفی زعفران، عوامل آلودگی و روش های ضد عفونی آن و همچنین توضیح پلاسماد کاربردش

- ۱-۱ مقدمه..... ۲
- ۲-۱ مشخصات گیاه شناسی زعفران ۳
- ۳-۱ شرایط آب و هوایی کشت زعفران ۴
- ۴-۱ تولید و صادرات زعفران ۴
- ۵-۱ ارزش غذایی و ترکیبات اصلی زعفران ۵
- ۶-۱ آلودگی های زعفران ۷
- ۷-۱ لزوم آلودگی زدایی زعفران ۹
- ۸-۱ روش های نگهداری مواد غذایی ۹
- ۹-۱ روش های ضد عفونی مواد غذایی ۱۰
- ۱-۹-۱ سالم سازی حرارتی ۱۱
- ۲-۹-۱ سالم سازی غیر حرارتی ۱۲
- ۱-۲-۹-۱ فشار هیدرواستاتیک بالا..... ۱۲
- ۲-۲-۹-۱ میدان های الکتریکی پالسی قوی ۱۴
- ۳-۲-۹-۱ اشعه های پرنرژی..... ۱۶

- ۱-۹-۲-۴ روش نوین استریل کردن ۱۷
- ۱-۱۰-۱ روش‌های ضدعفونی ادویه‌ها ۱۷
- ۱-۱۰-۱ روش‌های شیمیایی ضدعفونی ادویه‌ها ۱۸
- ۱-۱۰-۱-۱ متیل بروماید ۱۸
- ۱-۱۰-۱-۲ فرمالدهید ۱۸
- ۱-۱۰-۱-۳ اتیلن اکساید ۱۸
- ۱-۱۰-۱-۴ ازن ۱۹
- ۱-۱۰-۲ روش‌های فیزیکی ضدعفونی ادویه‌ها ۱۹
- ۱-۱۱-۱ مزایای استفاده از فناوری پلاسما ۲۰
- ۱-۱۲-۱ تعریف پلاسما ۲۰
- ۱-۱۳-۱ تولید پلاسما ۲۲
- ۱-۱۴-۱ دسته‌بندی پلاسما ۲۴
- ۱-۱۴-۱ دسته‌بندی پلاسما براساس فشار ۲۵
- ۱-۱۴-۲ دسته‌بندی پلاسما براساس دما ۲۵
- ۱-۱۵-۱ ساختار و منابع تولید پلاسمای غیر حرارتی ۲۷
- ۱-۱۵-۱ تخلیه کرونا ۲۷
- ۱-۱۵-۲ تخلیه ماکروویو ۲۸

- ۱-۱۵-۳ قوس لغزان ۳۰
- ۱-۱۵-۴ جت پلاسما ۳۱
- ۱-۱۵-۵ تخلیه سد دی الکتریک ۳۲
- ۱-۱۶ مکانیسم غیر فعال سازی میکروارگانیزم ها توسط پلاسما ۳۴

۲ فصل دوم: روش ها و ابزار تجزیه و تحلیل زعفران

- ۲-۱ مقدمه ۳۸
- ۲-۲ رنگ سنجی با دستگاه هانترب ۳۸
- ۲-۲-۱ روش کار با دستگاه هانترب ۳۹
- ۲-۳ طیف سنجی گسیل اپتیکی ۴۱
- ۲-۴ میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی ۴۲
- ۲-۵ اندازه گیری ترکیبات اصلی زعفران ۴۴
- ۲-۶ اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی ۴۵

۳ فصل سوم: جزئیات مراحل و چیدمان آزمایشگاهی

- ۳-۱ مقدمه ۴۸
- ۳-۲ آماده سازی زعفران ۴۸
- ۳-۳ آماده سازی قارچ اسپرژیلوس نایجر و تلقیح آن ۴۸

۴-۳	شمارش قارچ آسپرژیلوس نایجر	۴۹
۵-۳	شرایط پردازش با پلاسمای سرد	۵۱
۶-۳	اندازه‌گیری پارامترهای پلاسما	۵۶
۷-۳	آماده‌سازی نمونه‌ها برای تصویربرداری FESEM	۵۸
۸-۳	عصاره‌گیری زعفران برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی	۵۹
۹-۳	آماده‌سازی زعفران برای اندازه‌گیری ترکیبات اصلی	۵۹

۴ فصل چهارم: بحث و نتیجه مربوط به بررسی خواص فیزیکی، شیمیایی و ضد میکروبی زعفران

۱-۴	مقدمه	۶۲
۲-۴	بررسی اثر گونه‌های تولید شده بر زعفران	۶۲
۳-۴	دما و چگالی الکترونی در دستگاه تخلیه سد دی‌الکتریک	۶۴
۴-۴	بررسی اثر تابش پلاسما در نابودی میکروارگانیسم‌های زعفران	۶۵
۵-۴	بررسی تابش پلاسما بر خصوصیات ریخت شناسی زعفران	۷۰
۶-۴	بررسی اثر تابش پلاسما بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی زعفران	۷۲
۷-۴	بررسی اثر تابش پلاسما بر شاخص‌های رنگ زعفران	۷۳
۸-۴	بررسی اثر تابش پلاسما بر ترکیبات شیمیایی اصلی زعفران	۷۶

۵ فصل پنجم: نتیجه‌گیری و پیشنهادها برای پژوهش‌های آینده

۵-۱ نتیجه‌گیری..... ۸۲

۵-۲ پیشنهادات برای پژوهش‌های آینده ۸۴

فهرست اشکال

شکل ۱-۱: اجزای مختلف زعفران..... ۳

شکل ۲-۱: ساختار متابولیت‌های زعفران ۵

شکل ۳-۱: (a) اجزای مختلف قارچ آسپرژیلوس (b) کشت قارچ بر روی آگار ۸

شکل ۴-۱: نمایی از دستگاه فشار هیدرواستاتیک بالا..... ۱۳

شکل ۵-۱: تصویری از اجزای مختلف دستگاه میدان الکتریکی پالسی قوی ۱۵

شکل ۶-۱: فرآیند تشکیل پلاسما..... ۲۱

شکل ۷-۱: منحنی پاشن، نمایش ولتاژ شکست (V_{br}) به عنوان تابعی از pd برای گازهای مختلف ۲۴

شکل ۸-۱: نمایی از دستگاه تخلیه کرونا..... ۲۸

شکل ۹-۱: تصویری شماتیک از دستگاه تخلیه ماکروویو ۲۹

شکل ۱۰-۱: تصویری شماتیک از اجزای دستگاه گلایدینگ آرک ۳۰

شکل ۱۱-۱: اجزای دستگاه جت پلاسما به همراه شعله آن..... ۳۱

شکل ۱۲-۱: انواع مختلف دستگاه تخلیه سد دی‌الکتریک..... ۳۳

- شکل ۲-۱: نمایی از دستگاه هانتربل واقع در دانشگاه تربیت مدرس ۴۰
- شکل ۲-۲: دستگاه طیف‌سنج گسیل نوری واقع در دانشگاه صنعتی شاهرود ۴۲
- شکل ۲-۳: تصویری از دستگاه FESEM واقع در آزمایشگاه دانشگاه صنعتی شاهرود ۴۳
- شکل ۲-۴: دستگاه اسپکتروفتومتر واقع در دانشگاه فردوسی مشهد ۴۵
- شکل ۳-۱: تلقیح قارچ اسپرژیلوس نایجر بر روی رشته‌های زعفران ۴۹
- شکل ۳-۲: نمایی شماتیک از لام نئوبار ۵۰
- شکل ۳-۳: تصویری از محفظه لام نئوبار ۵۱
- شکل ۳-۴: تصویری شماتیک از انواع الکتروود و نحوه قرارگیری دی‌الکتریک در ساختار تخلیه سد دی‌الکتریک ۵۴
- شکل ۳-۵: دستگاه اسیلوسکوپ و پروب ولتاژ بالا ۵۵
- شکل ۳-۶: تصویری شماتیک از دستگاه تخلیه سد دی‌الکتریک ۵۶
- شکل ۳-۷: (a) نمونه‌ها قبل از لایه‌نشانی طلا (b) نمونه‌ها پس از لایه‌نشانی طلا ۵۸
- شکل ۴-۱: طیف گسیل اپتیکی پلاسمای تخلیه سد دی‌الکتریک با گاز هوا ۶۳
- شکل ۴-۲: منحنی بولتزمن جهت محاسبه دما الکترونی ۶۴
- شکل ۴-۳: (a) نمونه شاهد (b) نمونه پس از ۱ دقیقه تیمار (c) نمونه پس از ۲ دقیقه تیمار ۶۶
- شکل ۴-۴: تصاویر FESEM (a) نمونه کنترلی (b) نمونه پردازش‌شده ۷۱
- شکل ۴-۵: تغییرات شاخص‌های رنگ بین نمونه شاهد و پردازش‌شده ۷۵

فهرست جداول

- جدول ۳-۱: اطلاعات گونه‌های نیتروژن جهت اندازه‌گیری دما ۵۷
- جدول ۴-۱: چگالی الکترونی عناصر موجود در طیف سنجی گسیل اپتیکی ۶۵
- جدول ۴-۲: مقادیر درصد مهار رادیکال DPPH در سه بار تکرار و میانگین مقادیر ۷۳
- جدول ۴-۳: مقادیر ترکیبات شیمیایی اصلی زعفران در دو نمونه شاهد و پردازش شده ۷۷
- جدول ۴-۴: دسته‌بندی زعفران بر اساس مقادیر ترکیبات شیمیایی اصلی ۷۸

فصل اول

معرفی زعفران، عوامل آلودگی و روش های از بین بردن آن و همچنین توضیح پلاسما و

کاربردهایش

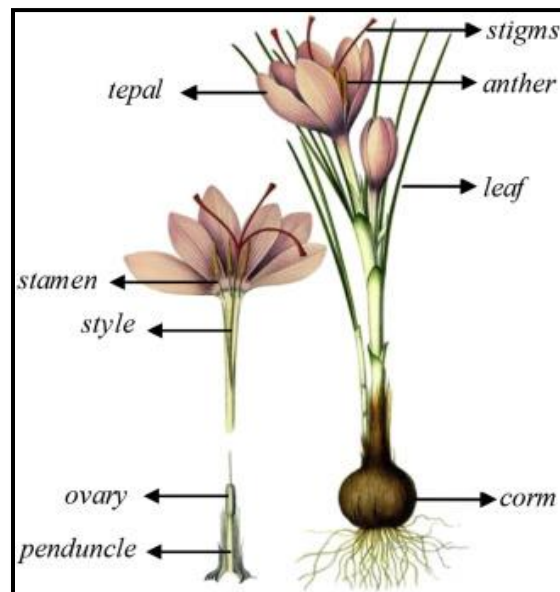
۱-۱ مقدمه

ایمونی مواد غذایی یک نگرانی بزرگ برای صنعت غذا، سازمان‌های نظارتی و مصرف‌کنندگان محسوب می‌شود. در واقع غذا یکی از ضروریات ادامه حیات انسان است و در صورتی می‌تواند برای انسان مفید و نیازش را برطرف کند که عاری از هرگونه آلودگی باشد؛ در غیر این صورت باعث بروز انواع مسمومیت‌ها و عفونت‌های غذایی و در نتیجه بیماری مصرف‌کننده می‌شود. عوامل فساد و آلودگی، گاهی مستقیماً و گاهی نیز به طور غیر مستقیم موجب تغییرات نامطلوب و بیماری‌زای مواد غذایی می‌شوند. در جهان امروز با افزایش روز افزون جمعیت و تولید بیش‌تر، ایمونی مواد غذایی خصوصاً بیماری‌های ناشی از غذا به یکی از بخش‌های مهم سلامت جامعه بدل شده است. دولت‌ها به دلیل افزایش مشکلات ناشی از بیماری‌های قابل انتقال از غذا به منظور ارتقای سطح کیفی محصولات در تلاش برای افزایش سطح ایمونی مواد غذایی هستند [۱].

مصرف، آماده‌سازی و ذخیره مواد غذایی به صورت ایمن و فاقد آلودگی‌های زیان‌بخش با حفظ مواد مغذی یکی از مهم‌ترین حیطه‌ها در زمینه حفظ سلامتی و بهداشت می‌باشد. از این‌رو اهمیت توسعه روش‌های مطمئن و کارآمد در پردازش، نگهداری، بسته‌بندی و توزیع مواد غذایی رو به افزایش است. یکی از محصولات با ارزش غذایی و همچنین اثر دارویی بالا، زعفران می‌باشد. با توجه به مصارف دارویی زعفران، ضرورت استریل‌سازی و نابودی میکروارگانیسم‌های آن دو چندان می‌شود. با توجه به اینکه زعفران محصولی با ارزش از نظر اقتصادی است و پتانسیل صادراتی بالایی در قالب محصولات غیر نفتی دارد، پاکسازی آن از هرگونه آلودگی می‌تواند به مثبت شدن تراز تجاری کشور کمک کند. در ادامه به معرفی زعفران و روش‌های مختلف ضدعفونی آن از جمله روش نوین پلاسمای سرد و انواع مختلف آن می‌پردازیم.

۲-۱ مشخصات گیاه‌شناسی زعفران

زعفران^۱ یک گونه گیاهی عقیم تریپلوئید متعلق به خانواده Iridaceae می‌باشد که اجزای داخلی آن در شکل ۱-۱ مشخص شده است. کلاله‌های آن به عنوان معروف‌ترین گونه Crocus یکی از گران‌ترین و با ارزش‌ترین ادویه‌ها است، که با نام "طلای سرخ" از آن یاد می‌شود [۲،۳]. کلاله‌های خشک‌شده این گونه اغلب به صورت پودر برای بهبود رنگ، عطر و طعم غذا استفاده می‌شود. علاوه بر مصرف غذایی زعفران که تا به حال بیش‌تر به آن توجه شده است، از نظر دارویی نیز بسیار حائز اهمیت می‌باشد. از گذشته به دلیل فعالیت‌های ضداسپاسم و مسکن شناخته شده است و به عنوان محرک معده نیز استفاده می‌گردید. در دهه‌های اخیر تحقیقات بر روی خصوصیات ضدسرطانی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی زعفران، متمرکز شده است. از زعفران بطور گسترده به عنوان عامل ضد افسردگی، ضد تومور و ضد تشنج استفاده می‌شود. همچنین می‌تواند با از بین بردن رادیکال‌های آزاد توانایی حافظه را بهبود بخشد [۴].



شکل ۱-۱: اجزای مختلف زعفران [۳]

¹ Crocus sativus. L

۳-۱ شرایط آب و هوایی کشت زعفران

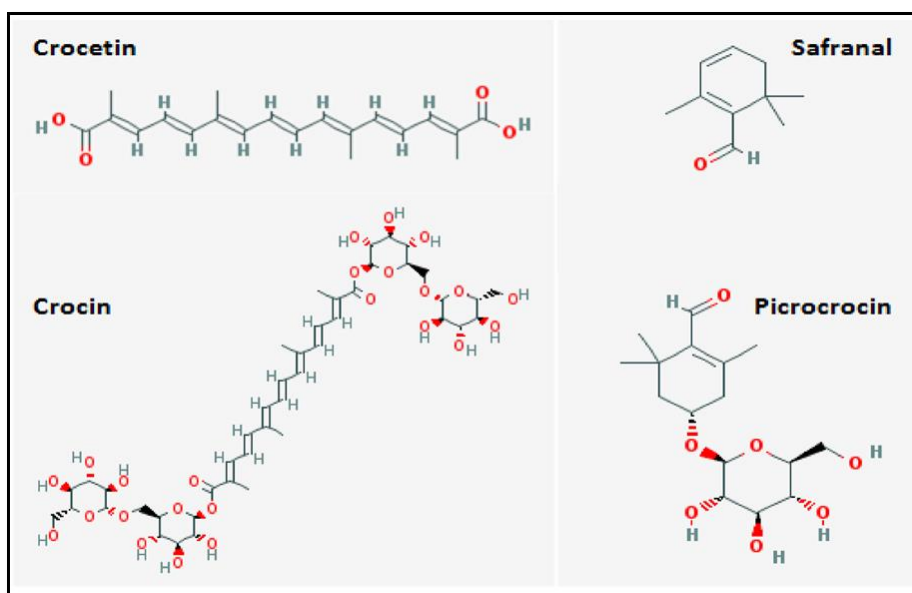
زعفران یکی از محصولات کشاورزی سازگار با شرایط آب و هوایی منطقه خاورمیانه، مرکز آسیا و قسمتی از اروپا می‌باشد که در کشورهای ایران، یونان، هند، اسپانیا و مراکش کشت می‌شود. گیاه زعفران در ایران در مناطق خشک و نیمه خشک مانند استان‌های خراسان شمالی، فارس، کرمان و یزد کشت می‌شود. با توجه به آب و هوای ایران، که آب در آن یک عامل محدود کننده در توسعه کشاورزی است، کشت زعفران به عنوان محصولی که به آب فراوان نیاز ندارد، می‌تواند یک مزیت باشد [۵].

۴-۱ تولید و صادرات زعفران

در میان گیاهان گوناگون، زعفران با توجه به مزایای شغلی و سودآوری آن بسیار مورد توجه کشاورزان قرار گرفته است. تولید سالانه زعفران در جهان ۱۹۰ تن می‌باشد که ۹۰ درصد از آن مربوط به ایران است. مهم‌ترین کشور تولید کننده زعفران در جهان، ایران می‌باشد و پس از آن یونان، مراکش، هند، اسپانیا و ایتالیا به ترتیب در رده‌های بعدی قرار می‌گیرند. تقریباً ۱۰۰ هزار خانواده در کاشت و برداشت زعفران در ایران دخیل هستند. اگرچه ایران بزرگ‌ترین تولید کننده زعفران در جهان است، ولی مشکلات زیادی در صادرات این گیاه با ارزش وجود دارد و متأسفانه زعفران ایرانی نتوانسته به جایگاه مناسبی در بازار جهانی دست یابد [۵]. زعفران از نظر صادرات غیر نفتی برای ایران بسیار حائز اهمیت است. اما یکی از علل کاهش روند صادرات زعفران در ایران، فقدان تولید و فرآوری منطبق بر استانداردهای جهانی است. متأسفانه هنوز برای برداشت این محصول از روش‌های سنتی استفاده می‌شود، که سبب می‌گردد محصول در طول جمع‌آوری و پردازش در معرض آلودگی‌های میکروبی مختلف قرار گیرد. ضرورت توجه به فرآیند تولید و فرآوری آن به گونه‌ای که بتواند منجر به اخذ استانداردهای بین‌المللی مانند *Global G.A.P* شود، لازم است که دقت کافی صورت گیرد.

۵-۱ ارزش غذایی و ترکیبات اصلی زعفران

متابولیت‌های ثانویه عامل رنگ، طعم و عطر زعفران می‌باشند، که در شکل ۱-۲ ساختارشان نشان داده شده است. عمده‌ترین ترکیب ایجاد کننده رنگ در زعفران کاروتنوئیدی^۱ به نام کروستین^۲ با فرمول بسته $C_{44}H_{64}O_{24}$ می‌باشد. کروستین‌ها مشتقات گلیکوزیدی^۳ کروسیتین^۴ هستند [۶]. در بین گلیکوزیل استرهای کروسیتین، کروسین بیش‌ترین مقدار را دارا می‌باشد و به همین علت به عنوان شاخص رنگ زعفران معرفی شده است. کروسین یک کاروتنوئید ۲۰ کربنه است که در صورت حل شدن در آب حدود ۶ الی ۱۶ درصد وزن خشک زعفران، تولید رنگ نارنجی قرمز می‌کند و به نور و اکسیژن حساس می‌باشد. کروسین‌ها به علت وجود بخش قندی در ساختارشان، محلول در آب می‌باشند [۲].



شکل ۱-۲: ساختار متابولیت‌های زعفران [۶]

¹ Carotenoid

² Crocin

³ Glycoside

⁴ Crocetin

کروسین به دلیل انحلال سریع آن در آب و ایجاد رنگ نارنجی به طور گسترده به عنوان رنگ طبیعی غذا مورد استفاده قرار می‌گیرد. در زعفران‌های با کیفیت بالا، استرهای کروسین ۳۰ درصد از وزن خشک را در بر می‌گیرند، که بسته به شرایط رشد و فرآیند نگهداری متفاوت می‌باشند. در طی مدت نگهداری زعفران گلیکوزیل استرهای کروسین در اثر عواملی مانند گرما، رطوبت، اکسیژن و نور تجزیه می‌شوند و مقدار آن‌ها در زعفران کاهش می‌یابد. طعم تلخ زعفران مربوط به پیکروکروسین^۱ با فرمول بسته $C_{16}H_{26}O_6$ می‌باشد، که یک منوترپن آلدهید^۲ فاقد رنگ است. میزان پیکروکروسین در برخی موارد پس از فرآیندهای اعمال شده روی کلاله‌ی تازه زعفران که همراه با تجزیه‌ی پیکروکروسین است، کاهش می‌یابد. در زعفران با کیفیت بالا، پیکروکروسین ۳۰ درصد از وزن خشک را در بر می‌گیرد [۷].

بیش‌ترین ترکیب حسی در زعفران مربوط به سافرانا^۳ با فرمول بسته $C_{10}H_{14}O$ می‌باشد. سافرانا^۳ حدود ۷۲٪ از کل ماده فرار زعفران را شامل می‌شود. عطر و بوی مشخص کننده زعفران به روغن‌های فرار آن وابسته است. ترکیبات معطر و یا به عبارت دیگر اسانس‌های روغنی زعفران از رده‌ی ترپن‌ها^۴ هستند. سافرانا^۳ ترکیبی است که بیش‌ترین مسئولیت عطر ادویه زعفران را برعهده دارد و به همراه مجموعه رنگدانه‌های کروسین عامل اصلی تعیین کننده کیفیت محصول می‌باشد. بیش از ۱۶۰ ترکیب فرار شناسایی شده است که از این تعداد سافرانا^۳ حدود ۳۰-۷۰ درصد از اسانس و ۰/۰۰۱ الی ۰/۰۰۶ درصد از وزن خشک زعفران را تشکیل می‌دهد. همانند دیگر ترپنوئیدها، سافرانا^۳ از پیش‌ساز گلیکوزیدی خود یعنی پیکروکروسین در زعفران به وجود می‌آید. محتوای سافرانا^۳ همانند سایر ترکیبات معطر در کلاله‌ی تازه زعفران بسیار ناچیز است، اما پس از اعمال فرآیندهای مختلف بر روی

^۱ Picrocrocin

^۲ Monoterpene Aldehyde

^۳ Safranal

^۴ Terpene

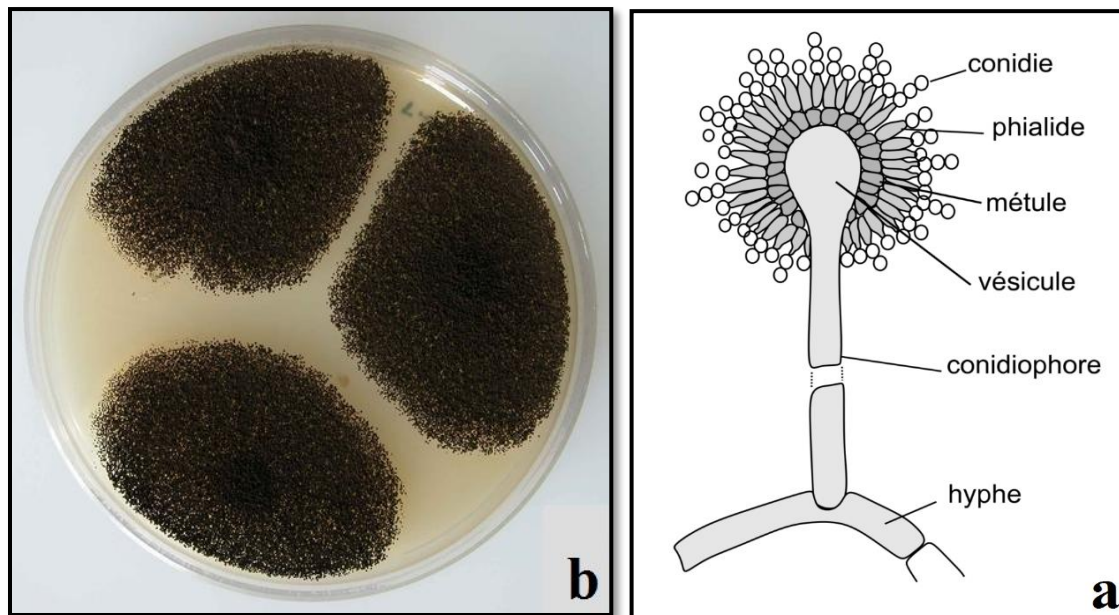
کلایه‌ی تازه، مقدار آن افزایش می‌یابد. در حقیقت میزان سافرانال به فرآورده‌های پس از برداشت بستگی دارد[۸].

۱-۶ آلودگی‌های زعفران

زعفران مانند سایر ادویه‌ها بر سطح خاک رشد می‌کند، بنابراین در معرض آلودگی میکروبی با فلور خاک و آب می‌باشد. اسپور و ریشه‌ی قارچ‌های موجود در خاک، قادرند به گل‌های برداشت شده منتقل شوند. با وجود آن که در منابع علمی مختلف بر خاصیت ضد قارچی و باکتریایی زعفران تاکید شده است، ولی آلودگی این گیاه و محصول آن به قارچ‌های مولد توکسین^۱، که یک تهدید جدی برای سلامتی بشمار می‌آید، از خطراتی است که تولید این محصول با ارزش را تحت تأثیر قرار می‌دهد. کیفیت و ترکیبات زعفران تحت تأثیر شرایط برداشت و پس از برداشت این محصول می‌باشد. زمان ماندگاری گل زعفران در مزرعه کوتاه بوده و گل‌ها قبل از باز شدن، برداشت می‌گردند. در طی فرآورده‌های برداشت، جمع‌آوری، نگهداری، جداسازی کلایه و خشک کردن ممکن است بار میکروبی زعفران افزایش یابد. در مراحل پس از برداشت، به دلیل رطوبت موجود در گل‌ها، به تأخیر افتادن حذف گلبرگ‌ها و روش‌های نامناسب خشک کردن و نگهداری بافت‌ها، اسپورهای قارچ آسپرژیلوس^۲ (شکل ۱-۳) جوانه زده و بافت گیاهی را آلوده می‌نماید. این قارچ تعداد زیادی توکسین تولید می‌کند که مهم‌ترین آن‌ها، آفلاتوکسین B1 است. آفلاتوکسین‌ها نسبت به سایر سموم قارچی به علت اثرات سرطان‌زایی و ایجاد مسمومیت حاد از اهمیت بیشتری برخوردار هستند[۹].

¹ Toxin

² Aspergillus



شکل ۱-۳: (a) اجزای مختلف قارچ آسپرژیلوس (b) کشت قارچ بر روی آگار [۹۴]

آفلاتوکسین‌های B1 و B2, G1, G2 توسط آژانس بین المللی پژوهش‌های سرطان^۱ در گروه A عوامل سرطان‌زا دسته‌بندی شده‌اند. آفلاتوکسین‌ها همچنین می‌توانند سبب بروز بیماری در حیوانات اهلی و انسان‌ها شوند [۱۰]. وجود آفلاتوکسین در نمونه‌های زعفران عرضه شده در فروشگاه‌های مواد غذایی و دارویی توسط محققین مختلفی به اثبات رسیده است. در مطالعه‌ای که روی محصولات خشکبار و ادویه‌ای لهستان انجام داده‌اند، وجود ۱-۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم آفلاتوکسین B1 را در زعفران‌های بسته‌بندی شده موجود در فروشگاه‌های لیسبون مشاهده کردند [۱۱]. در پژوهشی در داخل کشور، تعداد ۳۷ نمونه زعفران بسته‌بندی شده از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفت و گونه‌های آسپرژیلوس مولد آفلاتوکسین در آن‌ها مشاهده شد [۱۲].

¹ International Agency For Reserch Cancer (IARC)

۷-۱ لزوم آلودگی زدایی زعفران

امروزه افزایش آگاهی مصرف کنندگان منجر به روی آوردن آن ها به مصرف غذاهای سالم با حداقل مقدار مواد نگهدارنده شیمیایی و کم تر فرآوری شده افزایش یافته است. پیشگیری از عفونت های منتقل شده از طریق مواد غذایی مستلزم مراقبت پایدار از مواد خام مورد مصرف در غذای مصرف کنندگان می باشد. پاتوژن های با منشأ غذایی و میکروارگانیسم های عامل فساد، میکروب های مشکل ساز در صنعت غذا می باشند، که تأثیر منفی بر سلامت عمومی و اقتصاد دارند. از این رو حفظ سلامت مصرف کنندگان و پاک سازی محصول غذایی از هرگونه میکروارگانیسم اهمیت بسیاری دارد [۱۳]. زعفران نیز به عنوان یک محصول پرکاربرد از این قاعده مستثنی نیست، و لزوم استفاده از روش های میکروب زدایی زعفران بی شک از اهمیت بالایی برخوردار است. اما توجه به این نکته که غیر فعال سازی میکروارگانیسم ها سبب کاهش کیفیت و از دست رفتن رنگ، طعم و عطر زعفران نشود، حائز اهمیت می باشد. برای حفظ محصولات غذایی از جمله زعفران از هرگونه آلودگی روش های نگهداری و همچنین استریل سازی متفاوتی وجود دارد که در ادامه به بیان آن ها می پردازیم.

۸-۱ روش های نگهداری مواد غذایی

جلوگیری از فساد و ایجاد تغییرات نامطلوب در مواد غذایی، بشر را به فکر ابداع شیوه های مختلف نگهداری محصولات غذایی انداخت و این نیز یکی از بزرگ ترین مشکلات اکولوژیکی انسان بوده است، زیرا بشر به منظور نگهداری مواد غذایی برای سایر فصول همواره با مشکلات مختلفی مواجه بوده است. از این رو انسان برای مراقبت از سلامتی خود که در گرو مواد غذایی سالم و عاری از هرگونه آلودگی است، به دنبال روش های محافظت از غذا می باشد. اصول نگهداری مواد غذایی در واقع به معنی انجام فرآیندهای محافظتی در مقابل عوامل فسادزا می باشد. مواد غذایی توسط عوامل بیولوژیکی، واکنش های شیمیایی و فیزیکی دچار فساد می شوند. با شناسایی عوامل فساد

و آلودگی، تدابیری که برای حذف و کنترل آن‌ها به کار گرفته می‌شود، می‌تواند سبب نگهداری یا تأخیر در فساد مواد غذایی شود. در تمام روش‌های مورد استفاده، نگهداری غذا بر سه اصل کلی استوار است:

الف) از بین بردن میکروب‌ها و جلوگیری از فعالیت آن‌ها.

ب) از بین بردن عوامل مؤثر در فعل و انفعالات شیمیایی مانند، آنزیم‌ها، اکسیژن و جلوگیری از ایجاد ترکیبات شیمیایی.

ج) بسته‌بندی برای جلوگیری از آلودگی مجدد غذا با میکروب‌ها و عوامل مؤثر در فعل و انفعالات شیمیایی.

علاوه بر تأثیر روش‌های نگهداری مواد غذایی بر سلامت آن‌ها، استریل و ضدعفونی آن‌ها از اهمیت بسیاری برخوردار است، زیرا مواد غذایی به هر ترتیب در طی آماده‌سازی، حمل و نگهداری با میکروارگانیسم‌های مختلف آلوده می‌شود به همین خاطر باید با روش‌های مناسب پاکسازی گردد [۱].

۹-۱ روش‌های ضدعفونی مواد غذایی

طی دو دهه اخیر تقاضا برای محصولات غذایی تازه و آماده برای مصرف با ارزش غذایی بالا و عاری از مواد افزودنی رو به افزایش بوده است. بیشتر مواد غذایی تازه یا فرآوری شده در معرض آلودگی میکروبی قرار دارند. محصولات کشاورزی خام بارها عامل شیوع بیماری‌ها بوده‌اند. بنابراین، استفاده از روش‌های مؤثر برای حذف آلودگی میکروبی محصولات غذایی، از اهمیت خاصی برخوردار است. صنایع غذایی و مصرف‌کنندگان به دنبال مواد غذایی با کیفیت و مغذی با حداقل فرآوری هستند. روش‌های مرسوم برای ضدعفونی محصولات غذایی و نابودی میکروارگانیسم‌های موجود را می‌توان به دو دسته حرارتی و غیر حرارتی طبقه‌بندی نمود [۱۳].

۱-۹-۱ سالم سازی حرارتی

حرارت دادن مواد غذایی با هدف سالم سازی محصول از طریق نابودی میکروارگانیسم ها از روش های مرسوم مورد استفاده صنایع غذایی می باشد. فرآیندهای ضد عفونی بر پایه حرارت با روش های مختلفی صورت می گیرند، که بسته به نوع محصول، هدف فرآیند، میکروارگانیسم موجود و طول عمر نگهداری محصول مورد نظر از فرآیندهای ملایم تا شدید متفاوت هستند. مدت زمان مورد نیاز برای فرآیندهای حرارتی مواد غذایی به عواملی نظیر مقاومت حرارتی میکروارگانیسم ها، آنزیم های موجود در ماده غذایی، شرایط حرارت دهی، PH ماده، اندازه ظرف و وضعیت فیزیکی ماده غذایی بستگی دارد. طی فرآیند و در حین نگهداری، تغییرات فیزیکی و شیمیایی در محصول به وجود می آیند که روی کیفیت آن از نظر خصوصیات حسی و ارزش تغذیه ای، نقش تعیین کننده ای دارند. واکنش های فیزیکی و شیمیایی رخ داده طی فرآیند حرارتی، می توانند مطلوب و یا نامطلوب باشند. از مزایای عمده روش های استریل حرارتی مواد غذایی می توان به کنترل نسبتاً آسان فرآیند، تولید محصولات پایدار که نیاز به نگهداری در شرایط سرد ندارند، اثرات مفید تغذیه ای شامل تخریب فاکتورهای ضد تغذیه ای و یا تخریب ترکیبات مضر اشاره کرد.

فرآیندهای استریل کردن بر پایه گرما برای بسیاری از مواد غذایی حساس به حرارت نامناسب است. همچنین بسته به نوع محصول، می تواند اثرات نامطلوب بر روی ویژگی های مختلف مواد غذایی از جمله طعم، بو، بافت و مواد مغذی (پروتئین، ویتامین، کربوهیدرات و مواد معدنی) داشته باشد. در نتیجه، تقاضای مصرف کننده برای محصول با کیفیت و همین طور معایب تکنولوژی های موجود، سبب توسعه روش های جایگزین و ترجیحاً غیر حرارتی شده است [۱۴].

۱-۹-۲ سالم سازی غیر حرارتی

در طول فرآیند غیر حرارتی دمای ماده غذایی کمتر از دمایی است که به طور متداول در فرآیند حرارتی استفاده می شود. بنابراین کاهش کیفیتی که در نتیجه استفاده از دماهای بالا به وجود می آید، در این فرآیندها به حداقل می رسد. انتظار می رود که ویتامین ها، مواد مغذی ضروری و ترکیبات ایجاد کننده عطر و طعم در حین فرآیندهای غیر حرارتی بدون تغییر باقی مانده و یا حداقل تغییرات را متحمل شوند. علاوه بر این فرآیندهای غیر حرارتی در مقایسه با فرآیندهای حرارتی به انرژی کمتری نیاز دارند [۱۵]. مواد غذایی را می توان با روش های غیر حرارتی نظیر استفاده از فشار هیدرواستاتیک بالا^۱، میدان های الکتریکی پالسی^۲، استفاده از اشعه های پر انرژی و در نهایت روش نوین پلاسمایی پردازش نمود. در ادامه به معرفی و همچنین بیان برخی از مزایا و معایب این روش ها و توضیحات تکمیلی پردازش توسط پلاسما می پردازیم.

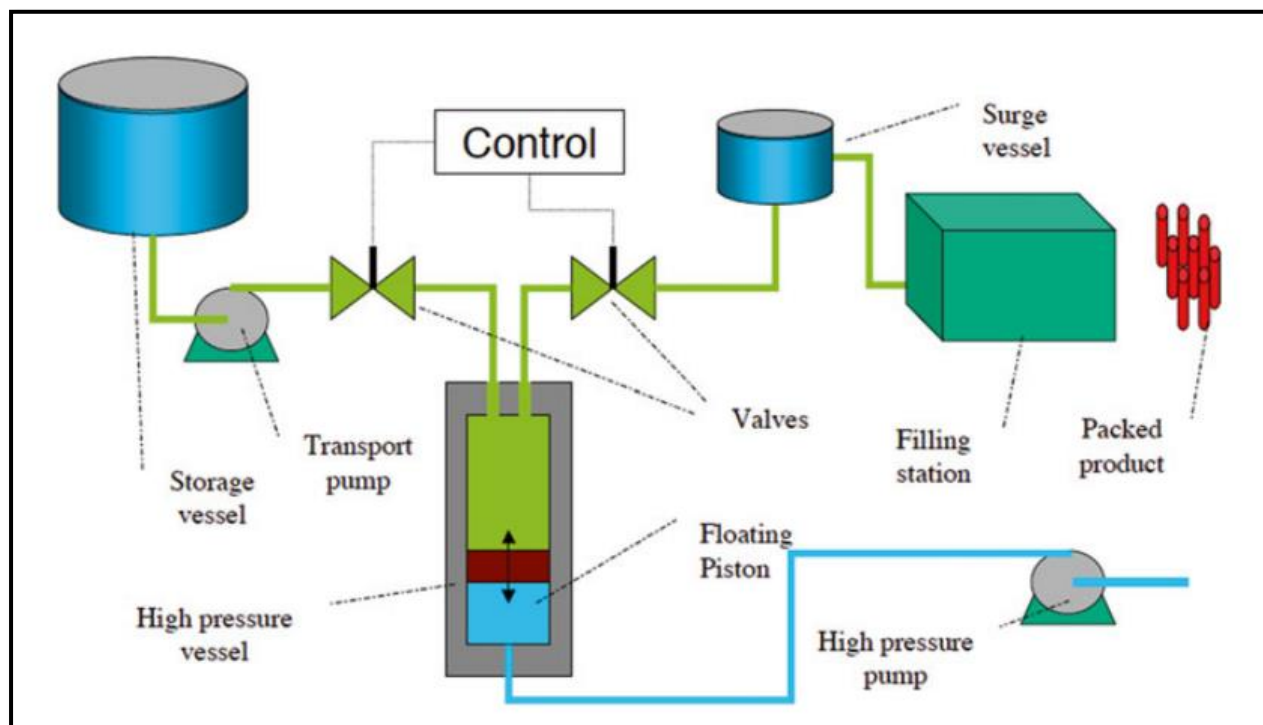
۱-۹-۲-۱ فشار هیدرواستاتیک بالا

فناوری فشار هیدرواستاتیک بالا جزء فرآیندهای غیر حرارتی در نگهداری مواد غذایی محسوب می شود. در این فناوری، مواد غذایی با هدف غیر فعال کردن میکروارگانیسم ها و همچنین افزایش کیفیت محصول در معرض فشار بالا (معمولاً بین ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ مگا پاسکال) قرار می گیرند. سازوکار این روش همان طور که در شکل ۱-۴ مشخص شده است، ابتدا ماده غذایی در یک ظرف استریل پر می شود و پس از محکم شدن درب آن در مخزن فشار قرار می گیرد تا فشار مورد نظر اعمال گردد. از آنجا که اثر فشار بالا بر کلیه قسمت های ماده غذایی یکسان است، لذا ماده غذایی به طور یکنواخت سالم سازی می شود و بسته بندی تغییر شکل پیدا نمی کند. پوششی که برای

¹ High Pressure Processing (HPP)

² Pulsed electric fields (PEF)

بسته‌بندی مواد غذایی فراوری شده در فشار بالا توصیه می‌شود، کوپلیمر اتیلن وینیل الکل^۱ و پلی وینیل الکل^۲ می‌باشد [۱۶].



شکل ۱-۴: نمایی از دستگاه فشار هیدرواستاتیک بالا [۱۶]

پس از آنکه مخزن از مواد غذایی بسته‌بندی شده، پر شد و درب آن مسدود گردید، ماده ناقل فشار به داخل آن تزریق می‌شود. در اغلب سیستم‌های متداول این ماده آب می‌باشد که به منظور ایجاد حالت لغزندگی و ضد خوردگی آن را با مقدار کمی روغن مخلوط می‌کنند. در این روش ماده غذایی به مدت مشخصی تحت فشار بالا قرار می‌گیرد. زمان نگهداری محصول در مخزن تحت فشار به نوع ماده غذایی و درجه حرارت فرایند بستگی دارد.

¹ Ethylene-vinyl alcohol copolymer (EVOH)

² PolyVinyl Alcohol (PVA)

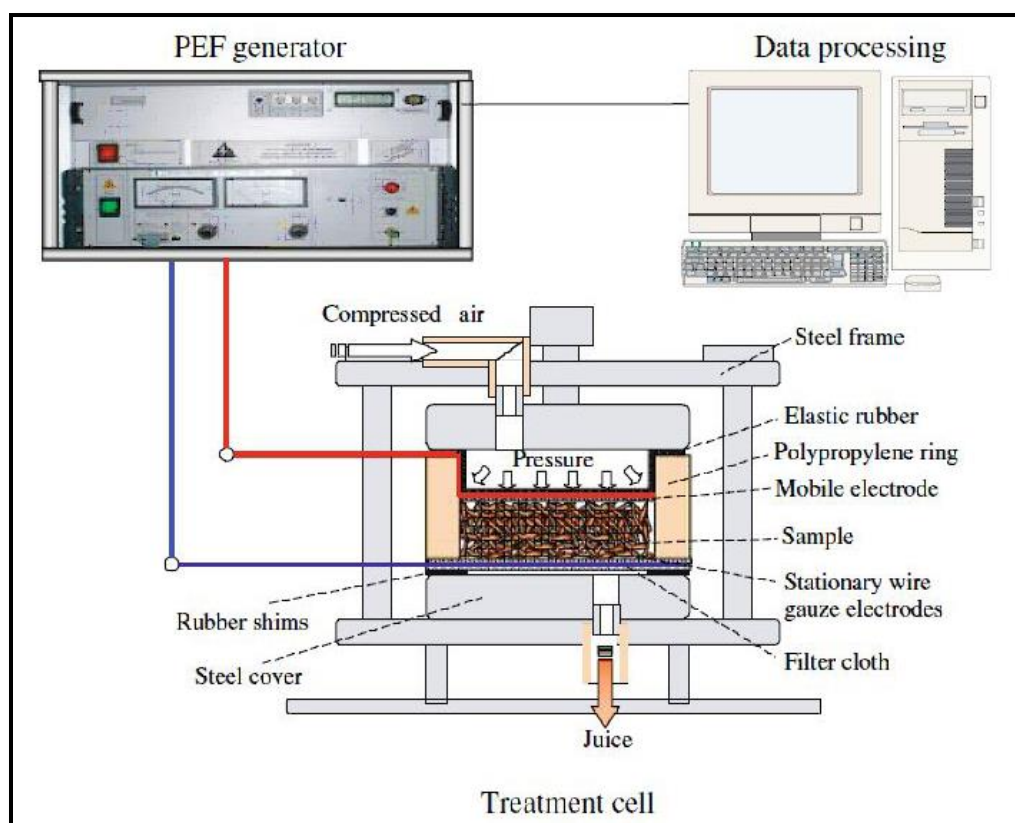
فشارهای نسبتاً بالا سرعت رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌ها را نیز کاهش داده و فشارهای بسیار بالا آن‌ها را غیر فعال می‌کند. در پایان زمان فرآوری، فشار داخل مخزن حذف می‌شود تا مواد فرآوری شده خارج گردند. فشار بالا تغییرات زیادی در سیستم‌های بیولوژیکی، غشاء سلولی و دیواره سلولی میکروارگانیسم‌ها به وجود می‌آورد. مزیت عمده این روش، غیر فعال شدن آنزیم‌ها بدون تخریب مواد مغذی، تغییر طعم و بافت ماده غذایی می‌باشد. از لحاظ مهندسی، معایب استفاده از فشار بالا در صنایع غذایی به طور عمده مربوط به ساخت مخازن تحت فشار جهت فرآوری مقادیر زیاد مواد غذایی و نیز تحمل فشار بالا می‌باشد. همچنین این فرآیند نیاز به سرمایه گذاری بالایی دارد و عدم کفایت آن برای غیر فعال کردن برخی اسپورها باعث شده تا صنایع به روش‌های کارآمدتر روی آورند [۱۷].

۱-۹-۲-۲ میدان‌های الکتریکی پالسی قوی

میدان الکتریکی پالسی قوی یکی از تکنولوژی‌های جدید نگهداری مواد غذایی است که به عنوان یکی از روش‌های غیر حرارتی استریل مواد غذایی محسوب می‌شود. از میدان الکتریکی با پالس‌های کوتاه و مقیاس زمانی بین میکرو ثانیه و میلی ثانیه جهت سالم‌سازی مواد غذایی مایع استفاده می‌شود. به منظور به حداقل رسیدن فرآیند حرارتی در این روش، ماده غذایی در زمانی کوتاه و با صرف انرژی کم فرآوری می‌گردد. این سیستم فرآوری از اجزای مختلفی که عبارت‌اند از: منبع ولتاژ قوی، خازن ذخیره، کلید، محفظه واکنش و نیز تجهیزات بسته‌بندی اسپتیک^۱ تشکیل شده است (شکل ۱-۵). در این روش محصولات غذایی در داخل یک محفظه که حاوی حداقل دو الکتروود می‌باشد، قرار گرفته و پالس‌هایی با ولتاژ بالا دریافت می‌نمایند. جنس این الکتروودها معمولاً از تیتانیوم است. اعمال میدان الکتریکی قوی روی محصول غذایی سبب غیر فعال‌سازی میکروارگانیسم‌ها می‌گردد. بعد از اتمام فرآیند، مواد غذایی به روش اسپتیک بسته‌بندی می‌شوند. هرچند جهت افزایش زمان ماندگاری ماده غذایی،

¹ Aseptic

توصیه می‌شود در درجه حرارت‌های سرد نگهداری گردد. برای شارژ نمودن خازن از یک منبع انرژی استفاده می‌شود و همچنین وظیفه کلید نیز تخلیه انرژی ذخیره شده در خازن، به ماده غذایی موجود در محفظه واکنش می‌باشد. در فرآوری مواد غذایی به کمک میدان‌های الکتریکی ممکن است حرارت نیز تولید شود [۱۸].



شکل ۱-۵: تصویری از اجزای مختلف دستگاه میدان الکتریکی پالسی قوی [۱۸]

معمولاً در داخل سیستم وسیله‌ای جهت خنک کردن محفظه واکنش تعبیه شده است. یکی از اجزای مهم و پیچیده این سیستم، محفظه واکنش است. تا به حال انواع مختلفی از محفظه‌های ثابت و مداوم طراحی شده‌اند. از مزایای این روش می‌توان به حفظ رنگ، طعم و مواد مغذی اشاره نمود، همچنین تاکنون شواهدی مبنی بر

مسمومیت غذایی گزارش نشده است، همچنین زمان درمان در این روش نسبتاً کم بوده و بدون هیچ خطر زیست محیطی آلودگی‌های مواد غذایی زودده می‌شود. از مهم‌ترین موانع و معایب این تکنولوژی مخارج ابتدایی بالای آن، محدودیت در اندازه ذرات مواد غذایی، عدم تاثیر بر جواهرزنی اسپورها و همچنین مصرف بالای انرژی می‌باشد [۱۹].

۱-۹-۲-۳ اشعه‌های پرنرژی

اشعه‌دهی مواد غذایی نوعی فرآیند سرد برای استریل کردن غذا محسوب می‌شود که در سال‌های اخیر به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است. این روش ضمن اینکه نتایج سودمندی به همراه دارد، ترکیبات سمی و یا رادیواکتیو در ماده غذایی ایجاد نمی‌کند. در این فرآیند ماده غذایی بسته‌بندی شده در برابر اشعه‌های گاما، اشعه X و الکترون می‌باشد. اشعه گاما از کبالت ۶۰ یا سزیم ۱۳۷ ساطع می‌شود. سیستم پرتو الکترونی آسان‌تر از بقیه روش‌های اشعه‌دهی است. اشعه گاما و X چون در مواد غذایی جامد بیشتر نفوذ می‌کنند، می‌توانند در محصولات پالت چینی شده در جعبه‌های استاندارد استفاده شوند، در حالی که پرتو الکترونی فقط برای جعبه و بسته‌بندی‌های ویژه مناسب است. پردازش مواد غذایی با استفاده از اشعه‌ی گاما یکی از روش‌های مؤثر کاهش آلودگی مواد غذایی می‌باشد که قادر است این محصولات را در آخرین فرم بسته‌بندی بدون ایجاد حرارت و در محدوده‌ی دز انتخابی، بدون آنکه تخریبی بر طعم، مزه و عطر محصول داشته باشد ضدعفونی نماید [۲۰].

از جمله مزایای این روش می‌توان به افزایش زمان نگهداری محصولات، ضدعفونی کردن ادویه‌ها، میوه‌ها و غلات، کاهش میکروارگانیسم‌های عامل فساد، تأخیر در رسیدن میوه‌ها و تخریب یا کاهش میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای غیرقابل اجتناب به ویژه عوامل آلوده‌کننده مواد غذایی خام با منشأ حیوانی اشاره نمود. اما این روش هنوز توسط بسیاری از کشورها، همچنین گروهی از مصرف‌کنندگان پذیرفته نشده است و اغلب از زمینه‌های فکری و روانی ایجاد شده در اذهان عمومی در مورد ماهیت پرتو، نشأت می‌گیرد. علاوه بر موارد ذکر شده، پرتو دهی با دزهای کم باعث نابودی اسپورها و ویروس‌ها نمی‌گردد و بسیاری از فرآورده‌های غذایی دارای یک آستانه‌ی دز اشعه

برای تغییرات حسی هستند. پرتودهی می‌تواند منجر به تغییرات نامطلوب روی پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها، رنگدانه‌ها، مواد معطر و همچنین تخریب برخی از ویتامین‌ها شود. همچنین یکسری تغییرات شیمیایی در مواد غذایی ایجاد می‌شود، که در مورد بسیاری از تغییرات اطلاعات چندانی در دست نیست. از محدودیت‌های دیگر برای پرتودهی، گران و در دسترس نبودن پرتو گاما می‌باشد [۲۱].

۱-۹-۲-۴ روش نوین استریل کردن

برای اطمینان و بهبود کیفیت مواد غذایی، به ویژه برای محصولات کشاورزی حساس به حرارت، پلاسما یکی از جدیدترین فناوری‌های سبز است که امروزه در سراسر جهان برای کاربردهای مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. پلاسمای سرد با فناوری غیر حرارتی می‌تواند سبب کاهش بار میکروبی از سطح مواد غذایی خام کشاورزی شود. پلاسمای سرد یک تکنولوژی نوظهور می‌باشد که عمده‌تاً برای ضدعفونی سطوح آلوده و به طور بالقوه حجم به کار می‌رود. در میان روش‌های جدید برای غیرفعال‌سازی میکروارگانیسم‌های نامطلوب، پلاسمای غیر حرارتی اثر بخشی کافی به همراه حداقل آسیب به زیست ماده‌ی در معرض تابش، مانند بافت‌های گیاهی، حیوانی و مواد غذایی فرآوری شده یا مواد بسته‌بندی حساس به حرارت را دارد. این فناوری غیر حرارتی بدون نیاز به مواد شیمیایی قادر به کارکردن به طور آشکارا و مداوم در فشار اتمسفر می‌باشد [۲۲].

۱-۱۰ روش‌های ضدعفونی ادویه‌ها

در میان محصولات غذایی مختلف استریل ادویه‌ها با توجه به مصارف گسترده‌شان حائز اهمیت است، که در سال‌های اخیر روش‌های مختلفی به منظور ضدعفونی آن‌ها از جمله روش‌های شیمیایی و فیزیکی مورد استفاده قرار گرفته است [۲۳].

۱-۱۰-۱ روش‌های شیمیایی ضدعفونی ادویه‌ها

از روش‌های شیمیایی که برای استریل ادویه‌ها و گیاهان دارویی استفاده می‌شود، می‌توان متیل بروماید^۱، فرمالدهید^۲، اتیلن اکساید^۳ و ازن را نام برد.

۱-۱۰-۱-۱ متیل بروماید

متیل بروماید به طور قابل توجهی باعث کاهش فلور میکروبی می‌شود. با این حال، این ماده دارای فعالیت محدود در برابر باکتری اشرشیاکلی^۴، استافیلوکوکوس اورئوس^۵، اسپور باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی می‌باشد، که این ترکیب اثر نامطلوبی بر لایه ازن جو زمین می‌گذارد. از همین رو استفاده از آن در کشورهای اتحادیه اروپا مجاز نیست [۲۳].

۱-۱۰-۱-۲ فرمالدهید

فرمالدهید نیز برای ضدعفونی گیاهان استفاده می‌شود. فناوری استفاده از این ترکیب شیمیایی به طور قابل توجهی جهت میکروبیولوژی کارآمد است، اما استفاده از این ماده، مقدار اسانس در گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. همچنین ماده‌ای سمی و سرطان‌زاست که برای استریل مایعات استفاده نمی‌شود [۲۱].

۱-۱۰-۱-۳ اتیلن اکساید

از روش‌های معمول شیمیایی که برای ضدعفونی انواع ادویه‌جات و گیاهان دارویی استفاده می‌شود، می‌توان به گاز اتیلن اکساید اشاره کرد. اتیلن اکساید در حذف ویروس‌ها، قارچ‌ها، باکتری‌ها و اسپور باکتریایی مؤثر است.

¹ Methyl Bromide

² Formaldehyde

³ Ethylene Oxide (Eto)

⁴ Escherichia coli

⁵ Staphylococcus aureus

در اثر استفاده از این ماده، باقیمانده‌های شیمیایی مضرى همچون اتیلن کلروهیدرین^۱ و اتیلن برموهیدرین^۲ که سرطان‌زا هستند و حتی پس از پردازش نیز ماه‌ها در ماده غذایی باقی می‌مانند. از دیگر مشکلات استفاده از گاز اتیلن اکساید این است که قبل از حمل و نقل یا فروش، محصول استریل شده باید در ظروف باز نگهداری شود تا بخار گاز به آرامی خارج شود. این فرآیند باعث افزایش هزینه انبارداری، نگهداری نامناسب محصول و افزایش خطر آلودگی مجدد آن می‌شود. از این‌رو استفاده از این گاز در بسیاری از کشورهای اروپایی به دلیل حفظ سلامتی محیط و ایمنی محصول ممنوع شده است [۲۴].

۱-۱۰-۱-۴-۱ ازن

یک روش نسبتاً جدید ضدعفونی ادویه‌ها استفاده از ازن می‌باشد. خاصیت اکسیداسیون قوی و توانایی عبور از غشاهای بیولوژیکی دو خصوصیت عمده میکروب‌کشی ازن را تشکیل می‌دهند. حساسیت نسبت به ازن در باکتری‌های گرم مثبت مثل استافیلوکوکوس اورئوس از گرم منفی‌ها مانند اشرشیاکلی بیشتر است. همچنین ازن اثر مثبتی بر روی ویروس‌ها و مخمرها دارد. آسیب‌پذیری‌های متنوع برای استفاده از ازن در میکروارگانیزم‌ها مشاهده می‌شود. باکتری‌ها حساس‌تر از قارچ‌ها در مقابل ازن هستند. بزرگ‌ترین مشکل استفاده از این روش تماس این گاز با مواد غذایی است و همچنین اسپورهای باکتریایی در برابر ازن مقاوم می‌باشند [۲۳].

۱-۱۰-۲-۱ روش‌های فیزیکی ضدعفونی ادویه‌ها

روش‌های فیزیکی مورد استفاده برای ضدعفونی ادویه‌ها در واقع همان فرآیندهای استریل کردن غیر حرارتی محصولات غذایی می‌باشند که پیش‌تر از این مورد بررسی قرار گرفت. هرکدام از روش‌های فشار هیدرواستاتیک بالا، میدان‌های الکتریکی پالسی، استفاده از اشعه‌های پرانرژی دارای محدودیت‌ها و معایبی می‌باشند که سبب

¹ Ethylene Chlorohydrin

² Ethylene Bromohydrin

تحقیق برای روش‌های استریل جدید با عملکرد بی‌ضرر برای افراد و مواد شده است. پلاسمای سرد یک روش ضدعفونی غیر حرارتی است که امروزه فعالیت ضد میکروبی آن بر روی انواع غذاها مورد بررسی قرار گرفته است [۲۳].

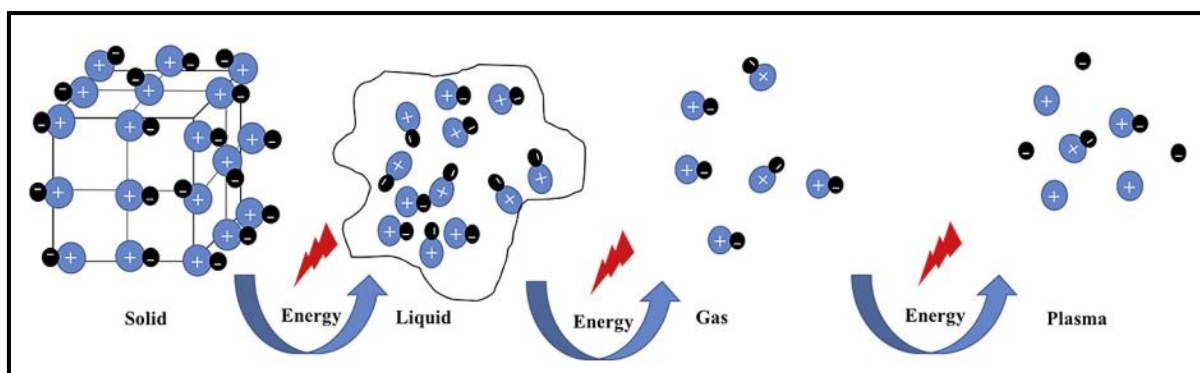
۱۱- مزایای استفاده از فناوری پلاسما

به طور کلی به کارگیری فناوری پلاسما نسبت به دیگر روش‌های مرسوم مزایای بیشتری دارد. پلاسما یک فرآیند خشک است و چون مواد شیمیایی سمی ندارد، از این رو برای انسان ضرری ندارد، همچنین تولید پسماند نمی‌کند و استانداردهای زیست محیطی بالایی دارد. این نوآوری از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه است و می‌تواند به راحتی مقیاس‌پذیر شود و به سهولت در خط تولید ادغام شود. پلاسما یک روش سریع می‌باشد، زمان پردازش آن در قیاس با روش‌های دیگر بسیار کوتاه است. نیاز به انرژی بسیار کمی داشته و راندمان بالایی در دمای پایین و همچنین قابلیت کار کردن در فشار اتمسفر را دارد. این تکنولوژی می‌تواند برای ضدعفونی انواع محصولات استفاده شود و فرآیند استریل مواد را بدون تخریب حرارتی و بدون تغییر خواص ذاتی محصول انجام می‌دهد [۲۵].

۱۲- تعریف پلاسما

پلاسما مخلوطی از گاز تا حدی یونیزه است که اغلب به عنوان حالت چهارم ماده در نظر گرفته می‌شود. همان‌طور که در شکل ۱-۶ مشاهده می‌شود، مواد با افزایش سطح انرژی از حالت جامد به مایع، از مایع به گاز و در نهایت به پلاسما تبدیل می‌شوند. تمایز اساسی بین جامدات، مایعات و گازها به قدرت نیروهای پیوستگی بین اجزا تشکیل دهنده آن‌ها مربوط می‌شود. این نیروهای پیوستگی در جامدات نسبتاً قوی، در مایعات ضعیف و در گازها تقریباً وجود ندارد. عامل اساسی که باعث می‌شود، یک ماده به یکی از این سه حالت تعلق داشته باشد، انرژی جنبشی کاتوره‌ای (انرژی گرمایی) اتم‌ها و مولکول‌های آن ماده است، که به دمای جسم بستگی دارد. با حرارت

دادن به جسم مایع یا جامد، اتم‌ها و مولکول‌ها انرژی گرمایی بیشتری کسب نموده، تا جایی که بتوانند بر انرژی پتانسیل بستگی غلبه نمایند که این وضعیت در نهایت به گذار فاز منجر خواهد شد [۲۶].



شکل ۱-۶: فرآیند تشکیل پلاسما [۳۴]

این گذار فاز در یک فشار معین و دمای ثابت صورت می‌گیرد. چنانچه یک گاز مولکولی انرژی لازم برای غلبه بر انرژی پیوستگی الکترون‌ها در بیرونی‌ترین مدار خود را بیابد، در این وضعیت یک گاز یونیزه یا پلاسما به وجود می‌آید. گذار گاز به پلاسما از دیدگاه ترمودینامیکی گذار فاز محسوب نمی‌شود، زیرا سایر تبدیل فازها، یعنی از جامد به مایع و مایع به گاز در دمای ثابت انجام می‌گیرد. اما تبدیل فاز از گاز به پلاسما تدریجاً با افزایش دما صورت می‌گیرد. در واقع زمانی که به یک گاز خنثی انرژی (حرارتی یا الکتریکی) داده می‌شود، در اثر این انرژی گاز دچار تفکیک و شکست مولکولی می‌گردد. در این حالت انرژی گاز به حدی می‌رسد که الکترون‌های آزاد، رادیکال‌ها^۱، فوتون، یون‌های مثبت و منفی در آن تشکیل می‌شود، در حالی که برخی مولکول‌ها ممکن است هنوز خنثی باقی بمانند. در این حالت با افزایش دمای گاز به دلیل افزایش انرژی مولکولی، حالت ماده تغییر کرده و با تولید گونه‌های فعال، پلاسما ایجاد می‌شود. همچنین هنگامی که یک جریان الکتریکی متغیر با زمان از میان یک

¹ Radicals

سیم پیچ عبور می‌کند، یک میدان مغناطیسی متغیر با زمان در اطراف آن ایجاد می‌شود، که به نوبه خود باعث تولید جریان الکتریکی در گاز و تشکیل پلاسما می‌گردد [۲۷].

پلاسما گاز یونیزه‌ای است که الکترون‌ها و یون‌های آن از هم جدا شده‌اند، ولی هر گاز یونیزه را نمی‌توان پلاسما نامید. تعریف کلی پلاسما به این صورت است؛ پلاسما گاز شبه‌خنثایی از ذرات باردار و خنثی است که رفتار جمعی از خود ارائه می‌دهند. شبه‌خنثی بودن پلاسما یعنی تعداد بارهای مثبت و منفی آن تقریباً برابر می‌باشند، $n_i \approx n_e \approx n$ که n_i تعداد یون‌ها و n_e تعداد الکترون‌ها می‌باشد. به دلیل اینکه حاملان بار مثبت و منفی برابر هستند، پلاسما دارای بار خنثی می‌باشد. ویژگی دیگر پلاسما، حرکت جمعی ذرات باردار است. در پلاسما که مشتمل بر ذرات باردار است، بارها با حرکت خود می‌توانند توده‌های متمرکزی از بارهای مثبت یا منفی را به طور موضعی به وجود آورند و بدین ترتیب سبب پیدایش میدان‌های الکتریکی شوند. با حرکت بارها، جریان و در نتیجه میدان مغناطیسی هم تولید می‌شود. این میدان‌ها بر حرکت سایر ذرات باردار که دورتر واقع شده‌اند، اثر می‌گذارند. لذا منظور از رفتار جمعی در پلاسما حرکاتی است که نه تنها به شرایط موضعی، بلکه به حالت پلاسما در مناطق دور نیز بستگی دارد. از دیدگاه ماکروسکوپی، پلاسما به لحاظ الکتریکی خنثی است، اما به دلیل دارا بودن حامل‌های بار آزاد، هادی جریان الکتریکی بوده و هدایت الکتریکی آن حتی از فلزاتی همچون طلا و مس نیز بیش‌تر است [۲۸].

۱-۳ تولید پلاسما

پلاسما را می‌توان از طریق اعمال ولتاژ به دو الکتروود فلزی که در بین آن‌ها یک نوع گاز وجود دارد، تولید کرد. اگر ولتاژ به حد کافی بالا باشد، شکست الکتریکی^۱ رخ خواهد داد و برخی از مولکول‌ها و اتم‌های موجود در گاز یونیزه می‌شوند. در ابتدای فرآیند با اعمال میدان الکتریکی بین آند و کاتد، الکترون‌های آزاد (بارهایی که توسط

¹ Electrical breakdown

پرتوهای کیهانی و رادیواکتیوهای طبیعی ایجاد شده‌اند) به سمت الکترودهای با بار مخالف کشیده می‌شوند. در پلاسما، الکترون‌ها به سمت آند و یون‌های مثبت به طرف کاتد شتاب گرفته و متناوباً با ذرات خنثی گاز زمینه برخورد کرده و جریان کمی ایجاد می‌کنند. با ادامه‌ی افزایش ولتاژ، جریان نیز افزایش می‌یابد تا جایی که میدان، تمام بارهای جدید را به سمت الکترودها کشانده و جریان به حالت اشباع برسد. در واقع زمان رسیدن به جریان اشباع، به نرخ یونیزاسیون گاز بستگی دارد. با ادامه‌ی افزایش ولتاژ، جریان نیز زیاد می‌شود و در ولتاژ خاصی، شکست الکتریکی رخ می‌دهد که تابش نور نیز قابل رؤیت است. پس از این مرحله الکترون‌ها با حرکت در میدان، انرژی کسب کرده و با رسیدن به انرژی یونیزاسیون اتمی، باعث ایجاد الکترون‌های جدید می‌شوند. این الکترون‌های کم سرعت نیز فرآیند قبل را طی می‌کنند که نتیجه‌ی آن بهمن الکترونی خواهد بود. گاز در این مرحله در مدت زمان 10^{-7} تا 10^{-9} ثانیه به اندازه‌ی کافی یونیزه شده و جریان چند برابر می‌شود [۲۹].

در واقع تخلیه الکتریکی^۱ در گازها به معنی عبور جریان الکتریکی از گاز یونیزه شده می‌باشد. شکست الکتریکی یکی از فرآیندهای تخلیه الکتریکی است، که در حین آن گاز یا دی‌الکتریک، خاصیت عایقی خود را از دست می‌دهد و رسانا می‌شوند. برای سیستم‌های الکتروودی مختلف، این ولتاژ شکست به پارامترهای مختلفی بستگی دارد. به عنوان مثال برای دو الکتروود تخت موازی ولتاژ شکست به پارامترهای مختلفی از جمله نوع گاز، فشارکاری و فاصله‌ی بین الکترودها وابسته است. ولتاژ تخلیه برای ایجاد پلاسما توسط قانون پاشن^۲ بیان می‌شود.

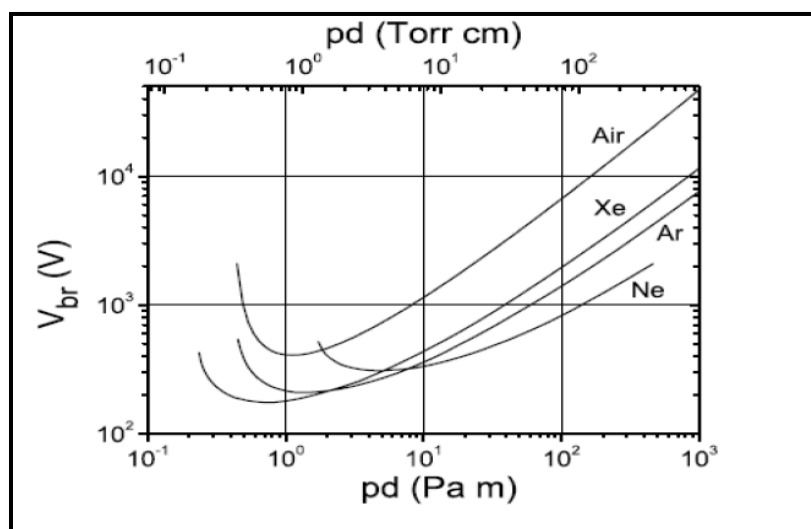
$$V_B = f(Pd) \quad (1-1)$$

V_B ولتاژ شکست می‌باشد که به حاصل ضرب فشار گاز و فاصله بین الکترودها بستگی دارد. شکل منحنی پاشن برای گازهای مختلف تقریباً یکسان است اما شیب‌های متفاوتی دارد. منحنی V_B بر حسب P برای هر نوع

¹ Electrical discharge

² Paschen law

گاز و الکتروود یک کمینه دارد که پتانسیل شکست نامیده می‌شود. در شکل ۷-۱ منحنی پاشن برای چند نوع گاز مختلف نمایش داده شده است [۳۰].



شکل ۷-۱: منحنی پاشن، نمایش ولتاژ شکست (V_{br}) به عنوان تابعی از pd برای گازهای مختلف [۳۰]

طبق این قانون ولتاژ اعمالی باید به اندازه‌ای زیاد باشد تا الکترون‌ها به اندازه‌ی کافی شتاب بگیرند تا بتوانند اتم‌ها و مولکول‌های فاز گاز را یونیزه کنند. همچنین اگر فاصله‌ی بین دو الکتروود کوتاه باشد، الکترون‌ها به انرژی کافی برای یونیزاسیون نمی‌رسند. به همین دلیل بسیاری از سیستم‌های پلاسما در راکتورهایی به طول چند ده سانتی‌متر در فشار کم تولید می‌شود [۳۱].

۱-۴ دسته‌بندی پلاسما

پلاسما از نظر چگالی بارها و انرژی ذرات بسیار متنوع است. از مهم‌ترین عواملی که چگونگی حالت پلاسما را تعیین می‌کند، دما و فشار می‌باشد. پلاسما به دو دسته حرارتی (تعادلی) و غیر حرارتی (غیر تعادلی) تقسیم‌بندی می‌شود. همچنین براساس فشار نیز به دو دسته فشار بالا و فشار پایین طبقه‌بندی می‌شود. در ادامه به صورت اجمالی به معرفی آن‌ها می‌پردازیم.

۱-۱۴-۱ دسته‌بندی پلاسما براساس فشار

پلاسما به طور کلی از تخلیه الکتریکی در فشار کم یا زیاد ایجاد می‌شود. بر این اساس پلاسما به دو دسته، پلاسمای فشار بالا و فشار پایین تقسیم‌بندی می‌شود. معمولاً پلاسمای فشار بالا در فشار یک اتمسفر و بالاتر اتفاق می‌افتد، که از آن جمله می‌توان به تخلیه قوسی و تخلیه کرونا^۱ اشاره کرد. اما پلاسمای فشار پایین، معمولاً در فشار ۱۰ torr یا کمتر اتفاق می‌افتد که بارزترین مثال آن تخلیه تابان است. اختلاف عمده‌ی پلاسمای فشار بالا و پایین بیشتر مربوط به چگونگی ایجاد، انرژی و چگالی ذرات باردار می‌باشد. از آنجایی که هزینه‌ی ساخت و نگهداری سیستم‌های خلأ بسیار بالا می‌باشد، در سال‌های اخیر انواع مختلف پلاسمای سرد فشار اتمسفری توسعه یافته است. از جمله مزایای پلاسمای فشار اتمسفری نسبت به فشار پایین می‌توان حذف سیستم‌های گران قیمت، قابلیت پردازش مستقیم، راندمان بالا و مقیاس‌پذیری در ناحیه‌ی وسیع را ذکر کرد [۳۲].

۱-۱۴-۲ دسته‌بندی پلاسما براساس دما

پلاسما براساس دما به دو دسته گرم یا پلاسمای تعادلی ترمودینامیکی موضعی^۲ و سرد یا پلاسمای غیر تعادلی ترمودینامیکی موضعی^۳ طبقه‌بندی می‌شود. پلاسمایی که تقریباً به طور کامل یونیزه شده است و به تعادل کامل ترمودینامیکی نزدیک گردیده است، پلاسمای تعادلی یا حرارتی می‌گویند. پلاسمای حرارتی بر خلاف پلاسمای غیر حرارتی در تعادل گرمایی می‌باشد. پلاسماهای گرم در دماهای بالا، انرژی و درجه‌ی یونیزاسیون بالایی دارند. در پلاسمای حرارتی، درجه حرارت الکترون‌ها با ذرات سنگین (یون‌ها، مولکول‌های خنثی و اتم‌ها) تقریباً برابر است. پلاسما در یک فاز تعادلی یا تقسیم مساوی انرژی قرار دارد که انرژی جنبشی ذرات باردار به سمت انرژی جنبشی ذرات خنثی میل می‌کند و دمای آن به چندین هزار درجه کلوین می‌رسد. برای تولید این نوع پلاسما،

¹ Corona discharge

² Local thermodynamic equilibrium plasma (LTE)

³ Non Local thermodynamic equilibrium plasma (non LTE)

توان و فشار بالا نیاز است. از این پلاسماها در صنایع هسته‌ای، متالورژی و در فناوری‌های لیزری استفاده می‌کنند [۲۶، ۳۲].

نمونه‌ی دیگر پلاسما، پلاسمای غیر حرارتی یا غیر تعادلی است، که درجه‌ی یونیزاسیون آن پایین است. پلاسمای غیر حرارتی زمانی ایجاد می‌گردد که میزان زیادی انرژی به الکترون‌ها منتقل شود و در این حالت دمای الکترون بیشتر از سایر ذرات سنگین و دمای گاز می‌باشد، و ذرات خنثی و یون‌ها میزان انرژی ناچیزی را حمل و دریافت کرده و سرد باقی می‌مانند. با توجه به اختلاف جرمی خیلی زیاد بین الکترون‌ها و ذرات سنگین، دمای پلاسما (دمای گاز) توسط دمای ذرات سنگین تعیین می‌شود. در این حالت الکترون‌های داغ، گاز خنثی سرد و یون‌ها به طور همزمان در پلاسما حضور دارند. لامپ مهتابی حالتی از پلاسمای سرد است [۳۵].

با توجه به خصوصیات پلاسمای سرد این فرآیند ترکیب منحصر به فردی از واکنش‌پذیری بالا در دمای پایین ارائه می‌دهد و آن را قادر به تیمار مواد غذایی حساس به حرارت می‌سازد. تولید پلاسمای غیر حرارتی توسط تخلیه الکتریکی در گازها در هر دو فشار کم و فشار اتمسفری امکان‌پذیر است. تخلیه الکتریکی معمولاً در اتمسفر طبیعی یا مصنوعی، نیتروژن، اکسیژن، هلیوم، آرگون یا مخلوط آن‌ها اتفاق می‌افتد. پلاسمای غیر حرارتی که در فشار اتمسفر تولید می‌شود، و مرکب از عوامل فعال مختلفی مانند اشعه UV، ذرات خنثی یا برانگیخته‌ی اتم‌ها و مولکول‌ها، یون‌های مثبت و منفی، رادیکال‌ها و الکترون‌های آزاد می‌باشد [۳۶].

اکثر گونه‌های واکنشی تولید شده توسط پلاسما به شرح زیر می‌باشند. البته ترکیب و فراوانی این گونه‌ها با توجه به نوع منبع پلاسما متفاوت می‌باشد.

- اکسیژن (O_2) و نیتروژن (N_2) مولکولی و برانگیخته.

- مولکول و اتم فعال اکسیژن (گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر (ROS) مانند اکسیژن اتمی (O))، مولکول

اکسیژن (O_2)، آنیون سوپراکسید (O_2^-) و ازن (O_3)).

- گونه‌های واکنش‌پذیر نیتروژن (RNS) مانند نیتروژن اتمی (N)، نیتروژن برانگیخته (N_2)، رادیکال اکسید نیتریک (NO^*).

- در صورت وجود رطوبت در محیط (H_2O^+)، آنیون (OH^-)، رادیکال (OH^*) یا پراکسید هیدروژن (H_2O_2) نیز تولید می‌شود [۳۷].

۱-۵ ساختار و منابع تولید پلاسمای غیر حرارتی

مکانیسم‌های مختلفی برای تولید پلاسمای سرد وجود دارد، از جمله تخلیه کرونا، تخلیه ماکروویو^۱، قوس لغزان^۲، پلاسما جت^۳ و تخلیه سد دی‌الکتریک^۴ که در ادامه به طور مختصر معرفی می‌شوند.

۱-۱۵-۱ تخلیه کرونا

تخلیه کرونا یک تخلیه ضعیف نورانی است، که معمولاً در فشار اتمسفری و در نزدیکی نواحی تیز، لبه‌ها یا سیم‌های نازک که میدان الکتریکی در آن به اندازه کافی بزرگ باشد، اتفاق می‌افتد (شکل ۱-۸). بنابراین تخلیه کرونا همیشه به صورت غیر یکنواخت در نزدیکی یکی از الکترودها ایجاد می‌گردد [۳۸]. در ضمن این فرآیند، تنها در نزدیکی الکترودها، که میدان الکتریکی به اندازه کافی بزرگ است، یونیزاسیون و سپس تولید مؤثر ذرات باردار اتفاق می‌افتد که این ناحیه را معمولاً حجم فعال کرونا^۵ می‌گویند. همچنین این ناحیه (حجم فعال کرونا) دارای اهمیت زیادی است؛ زیرا اکثر برانگیختگی‌ها و فرآیندهای واکنشی در این ناحیه اتفاق می‌افتند [۳۹].

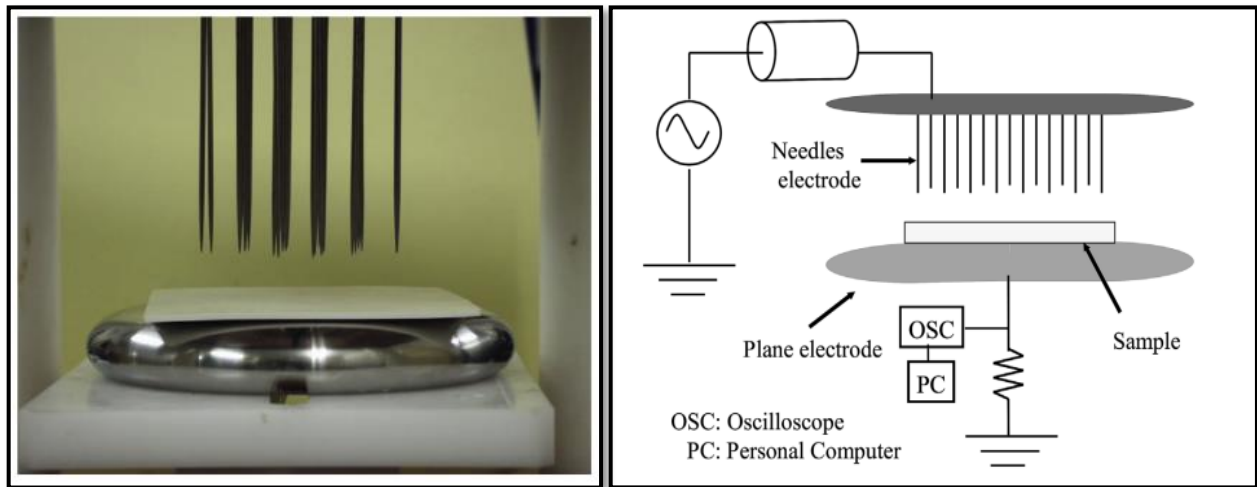
¹ Microwave discharge

² Gliding arc

³ Plasma jet

⁴ Dielectric barrier discharge (DBD)

⁵ Corona Active volume



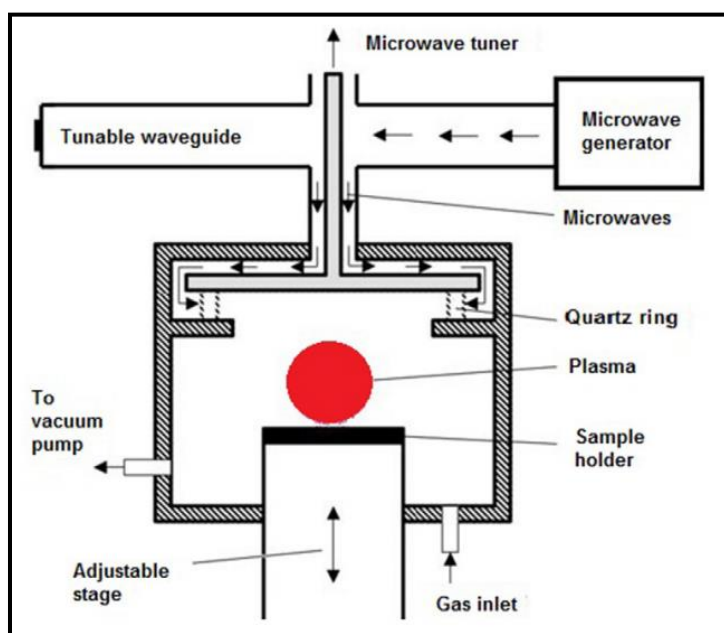
شکل ۱-۸: نمایی از دستگاه تخلیه کرونا [۳۸]

۱-۵-۲ تخلیه ماکروویو

از آن جایی که رایج‌ترین طول موج، $10^{-4} - 10^{-1}$ m، مورد استفاده برای مایکروویو مطابق با فرکانس 10^{11} Hz- 10^9 می‌باشد، تخلیه‌ی ماکروویو توسط امواج الکترومغناطیسی با فرکانس بیشتر از صدها مگا هرتز تولید می‌شود. در نتیجه معمولاً انرژی یون‌ها در پلاسمای ایجاد شده با مایکروویو کم است. به همین دلیل اغلب سعی می‌شود تا به کمک میدان‌های اضافی DC یا اعمال فرکانس‌های رادیویی، شرایط ایجاد پلاسما با مایکروویو بهبود داده شود. تخلیه معمولاً درون یک محفظه که امواج درون آن به شکل رزونانس است، صورت می‌گیرد. از جمله کاربردهای تخلیه ماکروویو می‌توان به صنعت پتروشیمی اشاره کرد [۴۰].

اصول کار سیستم‌های مایکروویو به این طریق است، که امواج مایکروویو در طول سیستم هدایت می‌شوند و انرژی را به الکترون‌های گاز پلاسما منتقل می‌کنند. برخوردهای الاستیک بین الکترون‌ها و ذرات سنگین رخ می‌دهد. به علت جرم زیاد ذرات سنگین، الکترون‌های برخوردی پس زده می‌شوند، در حالی که ذرات سنگین ساکن

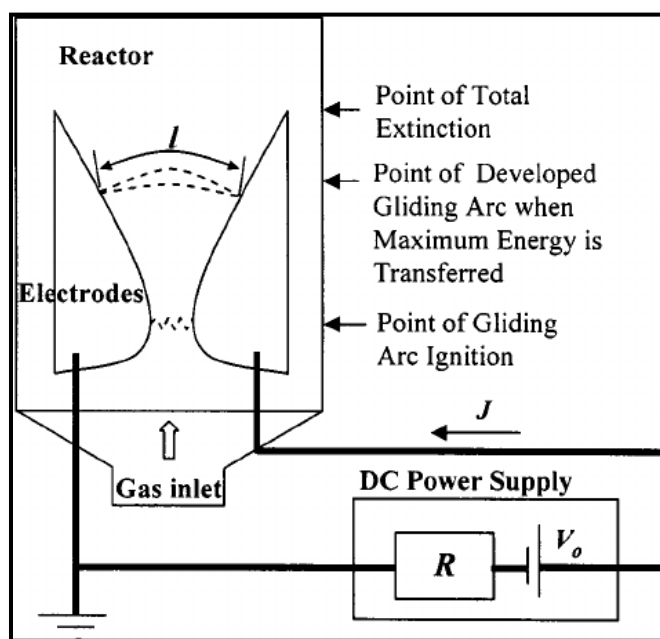
باقی می‌مانند. بنابراین الکترون‌ها شتاب می‌گیرند و انرژی جنبشی کسب می‌کنند و ذرات سنگین اندکی گرم می‌شوند. بعد از چندین برخورد الاستیک، الکترون‌ها انرژی کافی برای ایجاد برخوردهای غیر الاستیک را کسب می‌کنند. گاز به طور جزئی یونیزه می‌شود و پلاسما شکل می‌گیرد که انتشار امواج میکروویو را تقویت می‌کند. همان‌طور که در شکل ۹-۱ مشاهده می‌گردد، تخلیه فرکانس میکروویو جزء تخلیه‌های بدون الکتروود می‌باشد. اختلاف تخلیه‌های بدون الکتروود و الکتروودی، بیشتر مربوط به دخالت الکتروود در نگه داشتن جریان الکتریکی به وسیله مکانیسم‌های مختلف یونیزاسیون است. در نتیجه این روش‌ها نیاز به مدارهای الکتریکی متفاوتی دارند. تخلیه‌های بدون الکتروود نقش مهمی در تکنولوژی‌های پاک دارند [۴۱].



شکل ۹-۱: تصویری شماتیک از دستگاه تخلیه ماکروویو [۴۰]

۱-۵-۳ قوس لغزان

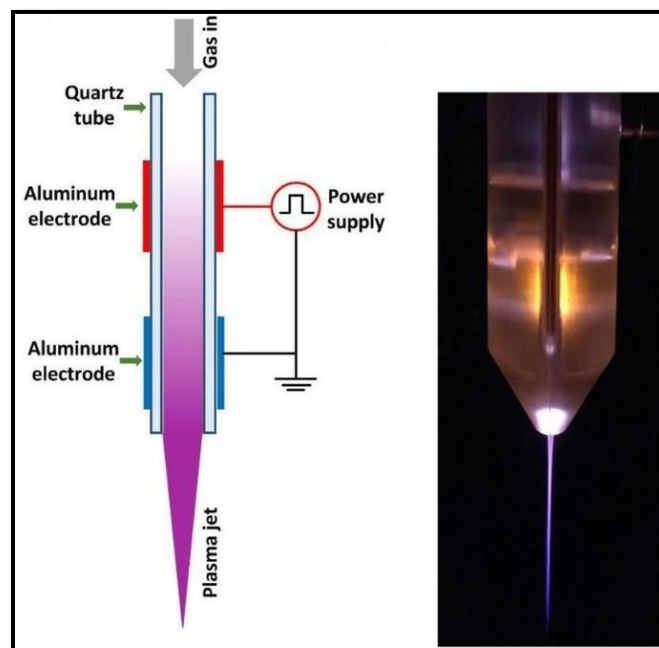
قوس لغزان یک نوع منبع پلاسمای حرارتی می‌باشد، اما ممکن است در برخی شرایط پلاسمای غیر حرارتی نیز تولید نماید. تخلیه بین دو الکترود جدا از هم که بین آن‌ها گاز وجود دارد، ایجاد می‌شود [۴۲]. قوس لغزان ترکیبی از پلاسمای حرارتی و غیر حرارتی است و پلاسمای غیر حرارتی در توان بالا ایجاد می‌شود. هنگام اعمال اختلاف پتانسیل بین الکترودها، از طریق اتصال سیستم مورد نظر به یک منبع تغذیه ولتاژ بالا، از کم‌ترین فاصله بین الکترودها شاهد قوس الکتریکی خواهیم بود. با عبور جریان گاز از بین دو الکترود، قوس تشکیل شده توسط شار گاز ورودی به سمت دو سر الکترود (بخش پایینی الکترودها) حرکت می‌کند که این حرکت باعث تغییر رژیم پلاسما از حرارتی به غیر حرارتی می‌شود (شکل ۱-۱۰). در واقع قوس ایجاد شده‌ی اولیه با افزایش فضای بین الکترودها (از بالا به پایین) رشد می‌کند و مجدداً در حداقل فاصله، برانگیخته شده و چرخه از نو آغاز می‌گردد [۴۳].



شکل ۱-۱۰: تصویری شماتیک از اجزای دستگاه گلایدینگ آرک [۴۳]

۱-۱۵-۴ جت پلاسما

یکی از انواع پلاسماهای سرد فشار اتمسفری، جت پلاسما است که بر پایه‌ی تخلیه‌ی سد دی‌الکتریک بنا نهاده شده است. ساختارهای متفاوتی برای تولید جت پلاسمای سرد فشار اتمسفری وجود دارد. معمولاً از مشخصه‌ی همه آن‌ها می‌توان به استفاده از یک نازل در محدوده‌ی میلی‌متر تا میکرومتر نام برد که اطراف این نازل الکترودهایی قرار دارند. شکل ۱-۱۱ نمایی ساده از دستگاه جت پلاسما را نشان می‌دهد. در جت پلاسما میدان الکتریکی ایجاد شده در راستای شارش گاز می‌باشد و پلاسما در اثر تخلیه الکتریکی بین دو الکتروود ایجاد می‌شود. یک منبع AC می‌تواند ولتاژ مورد نیاز برای تخلیه را ایجاد کند. از گازهای مختلفی همچون آرگون، نیتروژن، اکسیژن و ترکیب آن‌ها در تولید جت پلاسما استفاده می‌شود. نوع گاز، میزان سرعت شارش گاز و ولتاژ اعمالی در ایجاد پلاسما و در طول جت بسیار مؤثر است [۴۴].



شکل ۱-۱۱: اجزای دستگاه جت پلاسما به همراه شعله آن [۴۴]

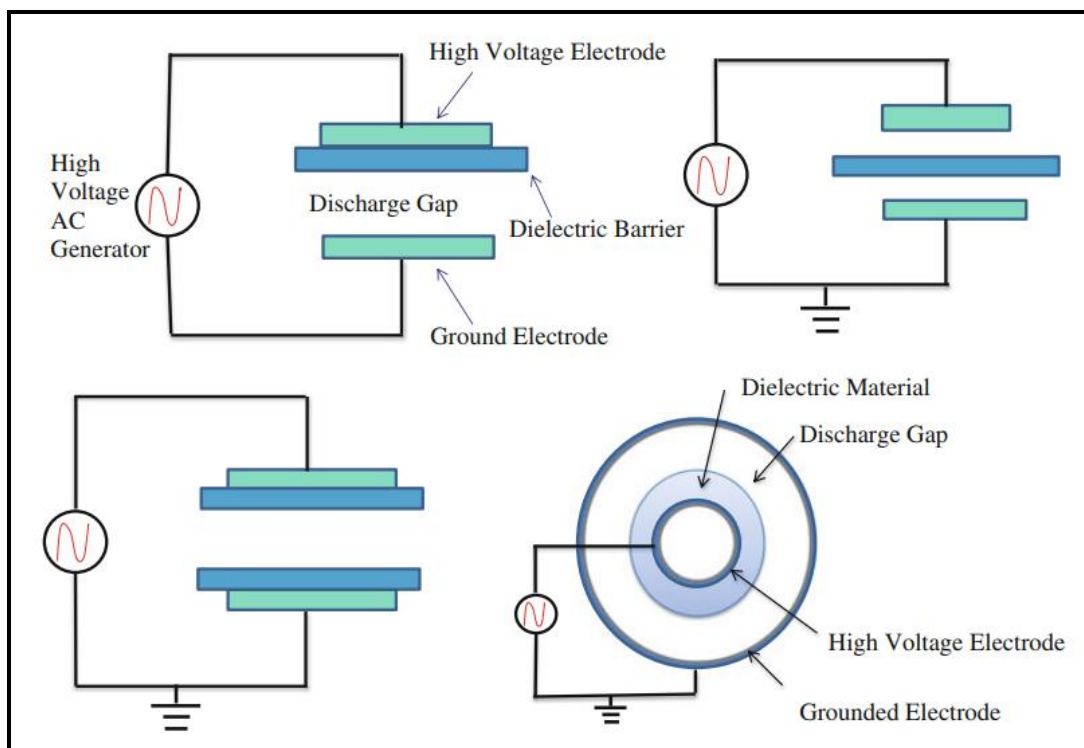
سه روش برای جلوگیری از قوس الکتریکی در جت پلاسما وجود دارد که می‌توانند به تنهایی یا همراه با یکدیگر به کار روند. یکی از این روش‌ها استفاده از ساختار تخلیه سد دی‌الکتریک می‌باشد، که در آن دو الکتروود توسط یک دی‌الکتریک مانند شیشه از هم جدا می‌شوند. یکی دیگر از این روش‌ها استفاده از یک ولتاژ با فرکانس خیلی زیاد مانند RF می‌باشد. در اکثر موارد پلاسما RF یک نوع پلاسما جفت شده‌ی خازنی می‌باشد. به عنوان مثال بین دو الکتروود در فرکانس ۱۳/۵۶ MHz به وجود می‌آیند. روش سوم عمل سوئیچ کردن ولتاژ قبل از گذار به قوس الکتریکی می‌باشد به عنوان مثال اعمال ولتاژ با عرض پالس چند صد نانوثانیه و یا کمتر، که به هندسه‌ی الکتروود وابسته است. به طور کلی، در منطقه‌ی فعال مورد استفاده برای تخلیه، جریانی از گازهای کمکی شارش می‌شود که ذرات خارج از ناحیه‌ی الکتروود را به درون منطقه‌ی انتشار امواج یونیزاسیون می‌کشد. این امر موجب تشکیل جریانی از ذرات فعال در حال سوختن مانند خروج جریانی کوچک با سرعت زیاد از یک روزنه بوده و جت نامیده می‌شود. به دلیل طراحی ساده و تعمیر و نگهداری آسان برای کاربر، تخلیه الکتریکی در فشار اتمسفر بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد. هنگامی که پلاسما در تماس با سطح ماده قرار دارد، انرژی از پلاسما انتقال پیدا می‌کند و اجازه می‌دهد تا واکنش ثانویه در سطح مواد رخ دهد. خصوصیات سطح تغییر یافته و در بیشتر موارد برای چاپ، نقاشی و کاربردهای نظیر آن در صنعت ایده‌آل است. در پاکسازی سطوح، سطح مورد نظر با گونه‌های واکنش‌پذیر موجود در پلاسما واکنش داده، در نتیجه آلودگی‌های زیستی در دمای پایین از بین می‌روند [۳۵].

۱-۵-۵ تخلیه سد دی‌الکتریک

تخلیه سد دی‌الکتریک، اولین بار به وسیله زیمنس^۱ در سال ۱۸۵۷ برای تولید ازن به کار گرفته شد. در واقع این نوع تخلیه باعث تولید پلاسما سرد و غیر تعادلی می‌شود. تخلیه سد دی‌الکتریک شامل دو الکتروود است که حداقل یک الکتروود توسط لایه‌ی دی‌الکتریک پوشیده شده است. وجود دی‌الکتریک مانع از عبور جریان بالا

¹ Siemens

میان دو الکتروود و شکل‌گیری تخلیه قوسی می‌گردد. برای تولید پلاسما به این روش، منبع تغذیه باید ولتاژ پالسی و یا سینوسی را به هر یک از دو الکتروود اعمال کند، که باعث تحریک و انتشار الکترون از کاتد می‌شود. زمانی که این الکترون‌ها به الکتروود مقابل می‌رسند، بر روی سطح آن پخش می‌شوند و میدان الکتریکی موضعی را کاهش می‌دهند [۳۳]. جریان عبوری در پلاسمای تخلیه سد دی‌الکتریک در حدود میکروآمپر می‌باشد. گستره فرکانس اعمالی در این تخلیه بسیار پایین است، که نشان دهنده اعمال انرژی کم به گاز و یونیزاسیون ضعیف است. در این روش، تخلیه بین دو الکتروود که یکی به عنوان الکتروود توان و دیگری به عنوان الکتروود زمین در نظر گرفته می‌شود، صورت می‌گیرد. برای مطمئن شدن از ایجاد تخلیه در بین الکتروودها، فاصله آن‌ها باید حداکثر چند میلی‌متر باشد (شکل ۱-۱۲) [۴۵].



شکل ۱-۱۲: انواع مختلف دستگاه تخلیه سد دی‌الکتریک [۴۵]

همان‌طور که گفته شد در پلاسمای DBD حداقل یکی از الکترودها با یک لایه نازک از دی‌الکتریک پوشانده شده است. به طور کلی زمانی که ولتاژ بالا بین دو الکترودها بدون عایق هستند اعمال می‌شود، یک قوس الکتریکی کوتاه (در حدود چند میلی‌ثانیه) ایجاد می‌شود، اما اگر در مقابل حداقل یکی از الکترودها یک لایه دی‌الکتریک قرار داده شود، جریان محدود شده و از تشکیل قوس الکتریکی جلوگیری می‌کند و پلاسمای غیر حرارتی تولید می‌شود. همچنین اگر ولتاژ بالا ثابت باقی بماند، پلاسمای همگن در نزدیکی دی‌الکتریک به وجود می‌آید. دی‌الکتریک به کار رفته اغلب از جنس شیشه، کوارتز، سرامیک و پلیمر می‌باشد. روش تخلیه DBD، می‌تواند یک پلاسمای همگن و رشته‌ای در فشار اتمسفری در مخلوط‌های گازی خاص مانند، نیتروژن خالص و برخی از گازهای نجیب و به خصوص در گازهای حاوی اکسیژن، مانند هوا تولید نماید. به طوری که این پلاسمای همگن و رشته‌ای با چشم انسان قابل مشاهده است [۴۶].

تخلیه DBD معمولاً در فرکانس‌های بین ۵/۰ تا ۵۰۰ کیلوهرتز کار می‌کند و به دلیل ایجاد پلاسمای غیر تعادلی قوی در فشار اتمسفری، کاربردهای صنعتی زیادی دارد. این نوع پلاسما به عنوان پر توان‌ترین، ساده‌ترین و قابل اعتمادترین منبع غیر حرارتی برای ضدعفونی کردن سطوح و کاربرد در زمینه‌های مختلف پزشکی مانند غیر فعال‌سازی باکتری‌ها، درمان بافت‌های زنده و افزایش مطالعه در مورد سلول‌های پستانداران مورد استفاده قرار گرفته است. برای این روش دستگاه‌های مختلفی طراحی شده است که با توجه به نوع کاربرد، شکل الکترودها و نوع دی‌الکتریک متفاوت می‌باشد [۴۷].

۱-۶ مکانیسم غیر فعال‌سازی میکروارگانیسم‌ها توسط پلاسما

چندین مکانیسم جهت غیر فعال‌سازی میکروارگانیسم‌ها توسط پلاسما ارائه شده است. یکی از مکانیسم‌های غیر فعال‌سازی پلاسمای سرد، تولید اشعه UV در طول موج ۳۰۰-۴۰۰ نانومتر است که سبب آسیب به DNA

میکروارگانسیم‌ها می‌شود. اشعه UV با طول موج بیشتر از ۲۵۷ نانومتر می‌تواند پیوندهای C-H و C-C را شکسته و موجب غیر فعال سازی پاتوژن‌ها شود. در حقیقت اشعه UV منجر به آسیب رشته DNA گردیده، در نتیجه مانع از تکثیر و همانندسازی باکتری‌ها می‌شود.

همچنین ذرات باردار مانند الکترون و یون می‌توانند سبب شکستن پیوندهای شیمیایی، آسیب‌های فیزیکی به غشاء سلولی و در نتیجه نفوذ بیشتر گونه‌های فعال پلاسما به درون سلول شوند. هر دو مکانیسم فیزیکی و شیمیایی در آسیب به غشاء سلولی دخیل هستند. القای الکترواستاتیک ایجاد شده توسط الکترون‌های پلاسما و یون‌هایی که در سطح سلول تجمع می‌یابند، سبب تخریب غشاء سلولی می‌شوند [۴۸].

تولید گونه‌های برانگیخته و واکنش‌پذیر پلاسما از جمله: OH, O, O₂, O₃ و NO منجر به اکسیداسیون لیپید، پروتئین و DNA میکروارگانسیم‌ها می‌گردد. حضور رادیکال هیدروکسیل در پلاسما می‌تواند عملکرد لیپید موجود در غشاء خارجی میکروارگانسیم‌ها را مختل کند. علاوه بر این مولکول‌های پروتئین غشاء، که از اسیدهای آمینه ساخته شده‌اند نیز به اکسیداسیون حساس هستند. بنابراین گونه‌های واکنش‌گر و رادیکال‌های تولید شده (گونه‌های فعال اکسیژن و ازن) در پلاسما منجر به نابودی میکروارگانسیم‌ها می‌شوند. با توجه به مکانیسم‌های ذکر شده حضور ذرات باردار و واکنش‌های شیمیایی می‌تواند باعث آسیب فیزیکی روی غشاء میکروارگانسیم شود. این باعث نشت اجزای درون سلولی و در نهایت مرگ سلول می‌شود [۴۹].

فصل دوم

روش ها و ابزار تجزیه و تحلیل زعفران

۱-۲ مقدمه

بررسی تغییرات فیزیکی و شیمیایی ایجاد شده توسط پلاسما بر روی زعفران، نقش مهمی در راستای شناسایی و ارزیابی این روش در استریل کردن محصولات غذایی دارد. برای این منظور با استفاده از روش‌ها و دستگاه‌های مختلف می‌توان خواص فیزیکی و شیمیایی زعفران از جمله شاخص‌های رنگ، ریخت شناسی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و مشخصه‌های اصلی (کروسین، پیکروکروسین و سافرانال) را مورد بررسی قرار داد. در ادامه به معرفی برخی از روش‌های شناسایی کیفیت زعفران و پلاسمای تولید شده از طریق هانتربل^۱، طیف سنجی گسیل اپتیکی (OES)، میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM)، تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) و روش استاندارد اندازه‌گیری متابولیت‌های زعفران پرداخته خواهد شد.

۲-۲ رنگ سنجی با دستگاه هانتربل

ظاهر محصول یکی از مهم‌ترین خصوصیات کیفی-حسی در مواد غذایی تازه و فرآوری شده می‌باشد. رنگ غذا اولین پارامتر کیفی است که توسط مصرف‌کننده ارزیابی می‌گردد و در پذیرش محصول نقش اساسی دارد. رنگ به همراه طعم و بافت نقش مهمی در مقبولیت غذا ایفا می‌کند و می‌تواند باعث افزایش جلب توجه مشتری شود. علاوه بر این، رنگ می‌تواند نواقص موجود در غذا و تغییرات شیمیایی آن از جمله فرآیندهای حرارتی و خشک کردن را نیز نشان دهد. رنگ مواد غذایی در اثر رنگدانه‌های طبیعی شامل کلروفیل^۲ محلول در آب (سبز)، کاروتنوئیدها (زرد، نارنجی و قرمز)، آنتوسیانین‌های^۳ محلول در آب (قرمز و آبی)، فلاونوئیدها^۴ (زرد) و بتالائین^۵

¹ Hunterlab Colorimeter

² Chlorophyll

³ Anthocyanin

⁴ Flavonoid

⁵ Betalain

(قرمز) ایجاد می‌شود [۵۰].

شناسایی رنگ می‌تواند توسط خواص حسی انسان و یا به وسیله‌ی ابزارهای فیزیکی صورت گیرد. اگر چه پردازش تصاویر توسط انسان بسیار قدرتمند است اما وابسته به شخص است و از فردی به فرد دیگر، این قدرت در تمام پارامترهای خود متغیر است. همچنین استفاده از عوامل انسانی بسیار زمان‌بر بوده و نیاز به تعلیمات یکسان به تمام افراد آموزش دیده دارد. بنابراین استفاده از ابزارهایی جهت شناسایی کیفیت رنگی غذاها لازم است. معمولاً رنگ غذاها در سیستم $L^*a^*b^*$ اندازه‌گیری می‌شود. فضای رنگی $L^*a^*b^*$ یا CIELab یک استاندارد بین‌المللی برای اندازه‌گیری رنگ است که توسط کمیسیون بین‌المللی روشنایی^۱ در سال ۱۹۷۶ ارائه گردید.

مفهوم $L^*a^*b^*$ شامل: L^* جزء نشان‌دهنده‌ی روشنایی می‌باشد و بین ۰ و ۱۰۰ متغیر است. پارامترهای a^* (از سبز تا قرمز) و b^* (از آبی تا زرد) اجزای رنگی می‌باشند که بین ۱۲۰- تا ۱۲۰ متغیر هستند. دریافت اطلاعات در فضای $L^*a^*b^*$ کاملاً یکنواخت است، یعنی فاصله اقلیدسی بین دو رنگ متفاوت تقریباً معادل تفاوت بین دو رنگ در بینایی انسان است [۵۱].

۲-۲-۱ روش کار با دستگاه هانتربل

قبل از رنگ سنجی نمونه‌ها، دستگاه با استفاده از سرامیک‌های سفید، سبز و مشکی کالیبره شد. سپس نمونه‌ی شاهد و تمامی نمونه‌های پردازش شده درون فنجان شیشه‌ای^۲ ۶۴ میلی‌متری (۲.۵ اینچی) ریخته شدند. پوشش مات فنجان شیشه‌ای^۳، روی فنجان قرار گرفت و در نهایت فنجان حاوی نمونه و پوشش آن در محل مخصوص تعبیه شده در دستگاه قرار گرفت. در شکل ۲-۱ نمایی از اجزا و دستگاه هانتربل مشاهده می‌شود.

¹ International Commission on Illumination

² Glass Sample Cup

³ Sample Cup Opaque Cover



شکل ۱-۲: نمایی از دستگاه هانتربل واقع در دانشگاه تربیت مدرس

با استفاده از روش ذکر شده شاخص‌های $L^*a^*b^*$ برای نمونه‌ی شاهد و پردازش شده به دست آمد و با استفاده از فرمول‌های زیر می‌توان به ترتیب تغییرات رنگ نمونه‌های پردازش شده نسبت به نمونه‌ی شاهد (ΔE)، زاویه رنگ^۱ (H) و شدت رنگ^۲ (C) را بررسی نمود [۵۲].

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2} \quad (۱-۲)$$

$$H = \tan^{-1}(b / a) \quad (۲-۲)$$

$$C = \sqrt{a^2 + b^2} \quad (۳-۲)$$

^۱ Hue angle

^۲ Chromaticity

۳-۲ طیف سنجی گسیل اپتیکی^۱

طیف سنجی گسیل اپتیکی یک روش رایج است که به صورت گسترده برای تعیین پارامترهای تخلیه و شناسایی پلاسما در نواحی مرئی-فرابنفش به کار می‌رود. این روش اطلاعات ارزشمندی در زمینه حالت‌های برانگیخته اتمی و مولکولی فراهم می‌کند. علاوه بر آن، می‌تواند بسیاری از رادیکال‌ها و گونه‌های اتمی یا مولکولی فعال را مشخص نماید. بنابراین اطلاعاتی در مورد فرآیندهای شیمیایی پلاسما به دست می‌آید. شناسایی رادیکال‌ها، به دلیل یافتن مکانیسم‌های غیر فعال‌سازی و برهمکنش پلاسما با سلول‌های زنده، دارای اهمیت زیادی در کاربردهای بیولوژیکی و پزشکی می‌باشد. حالت‌های برانگیخته، بیشتر توسط برخوردها با الکترون‌های پر انرژی تولید می‌شوند و از این‌رو گسیل اپتیکی، می‌تواند یک اندازه‌گیری از اندازه محیط فعال پلاسما را فراهم کند. در نتیجه محاسبه مشخصات تخلیه پایه را امکان‌پذیر می‌کند و موجب درک مکانیسم‌های فیزیکی می‌شود [۵۳].

برای اندازه‌گیری اکسیژن فعال یا گونه‌های نیتروژن حاصل از پلاسما، طیف انتشار اپتیکی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر واقع در آزمایشگاه دانشگاه صنعتی شاهرود (شکل ۲-۲) به دست می‌آید. دستگاه اسپکتروفتومتر مذکور مدل AvaSpec-ULS3648 RS می‌باشد، که طیف انتشار اپتیکی را در ناحیه UV-Vis با محدوده طول موجی nm ۸۵۰-۲۰۰ و وضوح nm ۰/۳ تهیه می‌نماید.

¹ Optical Emission Spectroscopy (OES)



شکل ۲-۲: دستگاه طیف‌سنج گسیل نوری واقع در دانشگاه صنعتی شاهرود

۲-۴ میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی^۱

در میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی از یک گسیل گر میدانی کاتد سرد و یک بلور تنگستن استفاده شده است، که از طریق اعمال میدان الکتریکی قوی، برای تولید پرتو الکترونی استفاده می‌شود و مبنای آن پدیده‌ی تونل‌زنی می‌باشد. اعمال میدان الکتریکی قوی بر سطح فلز باعث کاهش ارتفاع سد پتانسیل الکترون شده و احتمال تونل‌زنی از سطح فلز افزایش می‌یابد، که این امر موجب ایجاد شار بزرگی از الکترون‌ها می‌گردد. در این فرآیند مقدار بار گسیل شده به بزرگی میدان الکتریکی اعمال شده بستگی دارد. برای به دست آوردن بیش‌ترین بهره برای تولید جریان الکتریکی لازم است، از فلزی بسیار نوک تیز استفاده شود. برای جلوگیری از اکسید شدن

¹ Field emission scanning electron microscopy (FESEM)

نوک فلز، از خلأ بسیار بالا استفاده می‌گردد. الکترون‌های ایجاد شده را می‌توان به کمک لنزهای مغناطیسی کانونی کرد. باریکه الکترونی ایجاد شده در اثر برخورد با ماده، تولید الکترون‌های ثانویه می‌کند، که این الکترون‌ها در بر دارنده اطلاعاتی از مشخصات سطحی یا توپوگرافی سطح نمونه می‌باشند. الکترون‌های بازگشتی دسته‌ی دیگری از الکترون‌های ایجاد شده هستند، که حاوی اطلاعاتی در ارتباط با ترکیب شیمیایی ماده می‌باشند. در مواد نیمه‌رسانا به منظور آماده سازی نمونه، سطح آن را به وسیله طلا یا کربن پوشش نازکی می‌دهند تا بین پایه و نمونه، اتصال الکتریکی ایجاد شود [۵۴]. شکل ۲-۳ نمایانگر تصویری از دستگاه FESEM مدل HV-Sigma 300 با ولتاژ ۵ کیلو ولت می‌باشد.



شکل ۲-۳: تصویری از دستگاه FESEM واقع در آزمایشگاه دانشگاه صنعتی شاهرود

۵-۲ اندازه‌گیری ترکیبات اصلی زعفران

مهم‌ترین ترکیبات موجود در زعفران عبارت‌اند از کروسین، پیکروکروسین و سافرانال؛ که به ترتیب مسئول رنگ، طعم و عطر زعفران می‌باشند. برای اندازه‌گیری این متابولیت‌ها و مطالعات کیفیت و پایداری زعفران، از روش طیف سنجی اسپکتروفتومتر^۱ UV-Vis استفاده می‌شود [۸]. اساس روش بر مبنای ثبت تغییرات چگالی اپتیکی عصاره آبی زعفران در طول موج بین ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر در دمای محیط می‌باشد. طبق استاندارد ISO/TS3632-2 مقادیر پیکروکروسین، سافرانال و کروسین مستقیماً با خواندن طیف جذب محلول آبی ۱٪ زعفران خشک شده به ترتیب در ۲۵۷، ۳۳۰ و ۴۴۰ نانومتر به صورت $E_{1cm}^{1\%}$ و با توجه به معادله ۲-۴ بیان می‌شوند [۵۵].

$$E_{1cm}^{1\%} = (D \times 1000) / M \times (100 - H) \quad (۴-۲)$$

در این رابطه D میزان جذب در طول موج‌های ۲۵۷، ۳۱۰ و ۴۴۰ نانومتر، m جرم زعفران برحسب گرم و H میزان رطوبت نمونه می‌باشد. برای اندازه‌گیری طیف جذب عصاره زعفران در طول موج‌های مشخص از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل WPA S2000 UV-Vis که در شکل ۲-۴ مشاهده می‌شود، استفاده گردید.

¹ Spectrophotometer



شکل ۲-۴: دستگاه اسپکتروفتومتر واقع در دانشگاه فردوسی مشهد

۲-۶ اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های زعفران با روش پاکسازی رادیکال^۱ DPPH صورت می‌گیرد. DPPH یک رادیکال آزاد ناپایدار است که می‌تواند یک الکترون یا رادیکال هیدروژن دریافت کند و به حالت پایدار درآید. به علت وجود الکترون منفرد در ساختمان DPPH، این رادیکال در طول موج ۵۱۷ نانومتر دارای جذب خوبی می‌باشد و هرگاه در حضور یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی قرار بگیرد، که فعالیت پاکسازی رادیکال آزاد داشته باشد، رنگ آن زایل شده و کاهش جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر، بیانی از فعالیت نمونه آنتی‌اکسیدان خواهد بود. برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها، ۰/۰۰۴ گرم از پودر DPPH با ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول ترکیب شد (محلول بنفش رنگ حاصل شد). همچنین برای تهیه‌ی نمونه‌ها ۹۶۰ میکرولیتر از محلول DPPH، ۱ سی‌سی

^۱ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine

متانول و ۴۰ میکرولیتر از عصاره کلاله‌ها با هم ترکیب گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی قرار گرفت. سپس میزان جذب آن در ۵۱۷ نانومتر خوانده شد و با استفاده از رابطه ۲-۵ درصد مهار یا احیای DPPH قابل محاسبه می‌باشد.

$$AA\% = ((A_0 - A_1) / A_0) \times 100 \quad (5-2)$$

در این رابطه A_0 میزان جذب کنترل منفی (محلول DPPH به حجم ۲ سی‌سی) و A_1 میزان جذب نمونه‌ها می‌باشد [۵۶].

فصل سوم

جزئیات مراحل و چیدمان آزمایشگاهی

۳-۱ مقدمه

به منظور بررسی اثر پلاسما بر نابودی میکروارگانیسم‌های موجود در زعفران، قارچ آسپرژیلوس نایجر خریداری شده، کشت داده شد و سپس بر روی رشته‌های زعفران تلقیح گردید، و توسط لام نئوبار قبل و بعد از تابش پلاسما شمارش گردید، که در ادامه به تفصیل نحوه تلقیح قارچ، روش شمارش آن‌ها، پردازش نمونه‌های زعفران توسط دستگاه تخلیه سد دی‌الکترونیک و همچنین سازوکار دستگاه بیان شده است.

۳-۲ آماده‌سازی زعفران

کلاله‌های خشک زعفران به صورت عمده از بازار تهیه شدند. سپس رشته‌های زعفران با کمک پنس استریل شده، بر روی پلیت‌های شیشه‌ای قرار گرفت. زعفران‌ها به دو دسته نمونه شاهد و نمونه پردازش شده توسط پلاسما تقسیم شدند. در نهایت هر گروه از نمونه‌ها جهت بررسی تأثیر پلاسمای سرد بر روی خواص اصلی فیزیکی و شیمیایی زعفران مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۳-۳ آماده‌سازی قارچ آسپرژیلوس نایجر و تلقیح آن

قارچ آسپرژیلوس نایجر از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران خریداری شد. قارچ خریداری شده از این مرکز به صورت پودر لیوفیلیزه داخل ویال‌های شیشه‌ای^۱ می‌باشد، که به کمک سرم فیزیولوژی رقیق می‌گردد. محلول مذکور برای رشد باید در محیط عمومی کشت قارچ‌ها^۲ (آگار) قرار گیرد. در ابتدا محیط کشت آگار توسط دستگاه اتوکلاو در دمای ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت دو ساعت استریل گردید. پس از خروج آگار از اتوکلاو و سرد شدن آن، نمونه قارچ آسپرژیلوس نایجر در محیط کشت به مدت ۴ الی ۵ روز در دمای ۲۵ درجه

¹ Vial

² Potato Dextrose Agar (PDA)

سانتی گراد قرار گرفته تا اسپورهای سطحی افزایش یابد. توئین ۸۰ (پلی سوربات)^۱ (۰/۱٪) به عنوان محلول برای استخراج اسپورهای آسپرژیلوس نایجر مورد استفاده قرار گرفت و غلظت ۱۰۰ اسپور در هر میلی لیتر تهیه شد. یک میلی لیتر از این اسپورها با کمک میکروپیپت^۲ همانند شکل ۳-۱ بر روی رشته‌های زعفران داخل پلیت‌های استریل ریخته شد.



شکل ۳-۱: تلقیح قارچ آسپرژیلوس نایجر بر روی رشته‌های زعفران

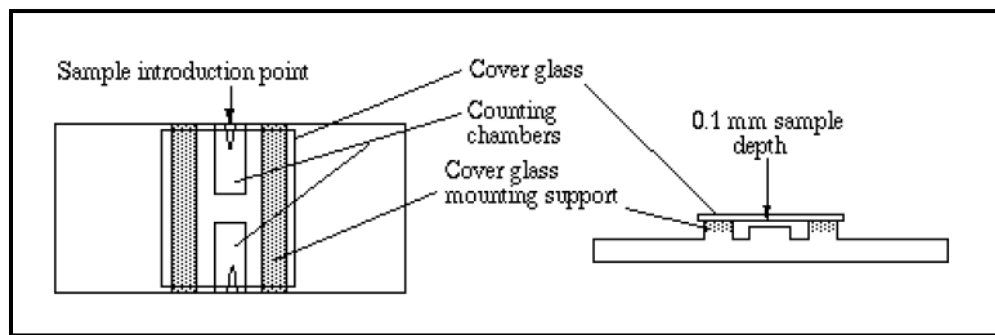
۳-۴ شمارش قارچ آسپرژیلوس نایجر

نمونه پردازش شده و نمونه کنترلی با غلظت ۱ گرم در ۱۰ سی سی توسط نمک نرمال رقیق شد. سپس ۰/۱ سی سی از این محلول روی آگار به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد کشت داده شد. سرانجام،

^۱ Polysorbate (Tween)

^۲ Micropipette

تعداد کلنی‌های قارچ برای هر دو نمونه (قبل و بعد از قرارگرفتن در معرض تابش پلاسما)، از طریق لام نئوبار^۱ شمارش شد. لام نئوبار همان‌طور که در شکل ۲-۳ مشاهده می‌شود، صفحه شیشه‌ای ضخیمی است که در قسمت یک سوم میانی آن سه سکوی موازی وجود دارد، که توسط شیارهای کم عمق از یکدیگر جدا شده‌اند و سکوی میانی ۰/۱ میلی‌متر از دو سکوی دیگر پایین‌تر است و آن‌ها لامل را نگه می‌دارند. این سکوی میانی به وسیله یک شیار عرضی کوتاه به دو قسمت تقسیم می‌شود. با گذاشتن لامل، ۰/۱ میلی‌متر فاصله بین لام و لامل ایجاد می‌شود. هر یک از محل‌های علامت‌گذاری شده در شکل با چشم غیر مسلح به شکل بعلاوه (+) دیده می‌شود.

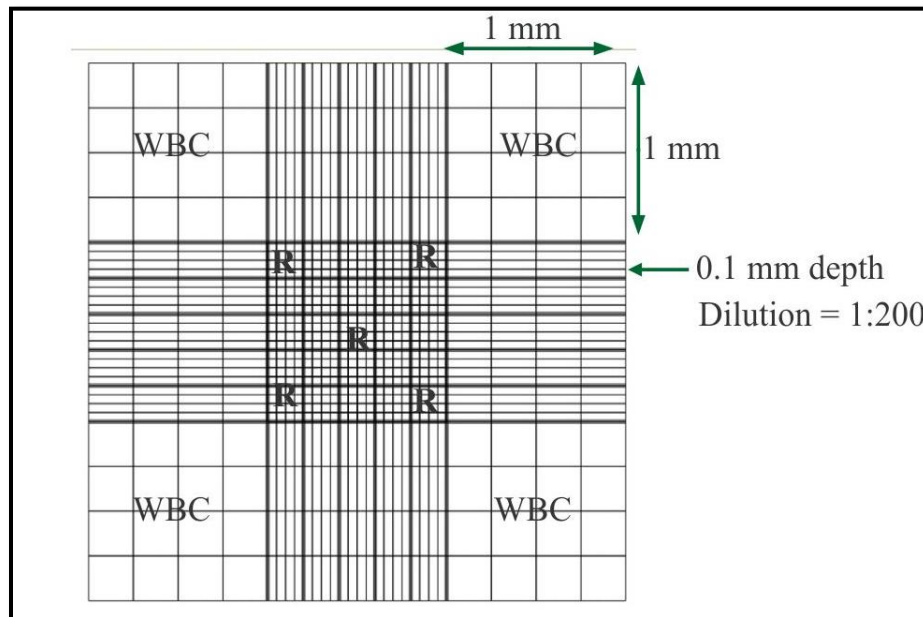


شکل ۲-۳: نمایی شماتیک از لام نئوبار

جدول لام نئوبار از یک مربع بزرگ به اندازه‌ی ۳×۳ میلی‌متر تشکیل شده است. این مربع بزرگ توسط ۴ خط سه تایی موازی عمودی و افقی به ۹ مربع ۱ میلی‌متری تقسیم شده است. چهار مربعی که در گوشه‌ها قرار دارند، خود به ۱۶ مربع کوچک‌تر تقسیم شده‌اند و با علامت W مشخص می‌شوند. در ادامه اضلاع مربع مرکزی ابتدا به ۵ قسمت و هر قسمت مجدداً به ۱۶ قسمت دیگر تقسیم می‌شوند. بدین ترتیب مربع یک میلی‌متری مرکز مجموعاً به ۴۰۰ قسمت مساوی تقسیم می‌شود و با علامت R مشخص می‌گردد. هر مربع ۱ میلی‌متری را مربع بزرگ، هر مربع ۰/۲ میلی‌متری واقع در مربع بزرگ را مربع متوسط و سرانجام هر مربع واقع در داخل مربع ۰/۲

¹ Neubauer

میلی متری را مربع کوچک می نامند. شکل کلی لام نئوبار در شکل ۳-۳ مشاهده می شود.



شکل ۳-۳: تصویری از محفظه لام نئوبار

جهت شمارش تعداد اسپورهای موجود در یک سوسپانسیون از مربع بزرگ استفاده می شود. نمونه مورد آزمایش پس از رقیق شدن با استفاده از پیپت در فضای بین لام و لامل ریخته شد و پراکندگی اسپورها توسط عدسی X10 بررسی گردید.

۳-۵ شرایط پردازش با پلاسمای سرد

پلاسمای فشار اتمسفری به دلیل سادگی و هزینه‌ی کمتر نسبت به پلاسمای فشار پایین مورد توجه زیادی قرار گرفته است. این نوع پلاسما دارای الکترون‌های داغ تا 10 eV ، یون‌های سرد و گونه‌های خنثی با دمایی در محدوده‌ی دمای اتاق می‌باشد که از لحاظ میکروسکوپی یک پلاسمای سرد محسوب می‌شود [۵۷]. یکی از منابع تولید پلاسمای سرد، تخلیه سد دی‌الکتریک است که به طور کلی، بین دو الکتروود که حداقل یکی از آن‌ها با یک

لایه دی الکتریک پوشانده شده است، صورت می گیرد. در این تخلیه ولتاژ بالای متناوب در حد چندین کیلو ولت با فرکانس ۵۰ هرتز تا چندین کیلو هرتز بین دو الکترود اعمال می شود و وجود دی الکتریک مانع از عبور جریان بالا میان دو الکترود و شکل گیری تخلیه قوسی می گردد. جریان عبوری در پلاسمای تخلیه سد دی الکتریک در حدود میکروآمپر می باشد [۴۶].

در هر نیم سیکل از نوسانات ولتاژ متناوب، پس از آنکه ولتاژ اعمال شده در گاز به اندازه‌ی ولتاژ لازم برای فروشکست رسید، تخلیه رشته‌های باریک شکل می گیرد و الکترون‌های رسانش به سمت الکترود مثبت جریان می یابد. زمانی که بار در انتهای هر رشته روی سطح دی الکتریک انباشته می شود، ولتاژ در راستای رشته افت می کند تا آنجا که کمتر از اندازه‌ی لازم برای حفظ تخلیه الکتریکی باشد و در نتیجه تخلیه قطع می شود. تحرک کم بارهای الکتریکی در دی الکتریک نه تنها منجر به تسریع خاموش شدن رشته می شود، بلکه ناحیه‌ی افت ولتاژ را محدود و موضعی نیز می کند. در نتیجه رشته‌ها می توانند تا حد ممکن به هم نزدیک شوند. در واقع با اضافه کردن لایه‌ی دی الکتریک به ساختار تخلیه، نوعی کنترل در جریان صورت می گیرد. وجود این ماده‌ی عایق باعث انباشتگی بار بر روی سطح آن شده و باعث ایجاد یک میدان الکتریکی در خلاف جهت میدان اولیه می شود. لذا می توان گفت با اضافه کردن دی الکتریک به ساختار تخلیه، یک جریان با مدت زمان نانو ثانیه تولید و پس از این زمان، جریان قطع می گردد. اکنون اگر بتوان با سرعتی از همین مرتبه‌ی زمانی، این انباشتگی بار را از روی ماده‌ی دی الکتریک حذف کرد، دوباره میدان برقرار شده و جریان تولید می شود. این هدف توسط یک ولتاژ متناوب و یا یک ولتاژ پالسی محقق می گردد. به این ترتیب با تغییر جهت میدان، بارها در خلاف جهت قبل حرکت می کنند. لذا باید ولتاژ اعمالی بر روی دو الکترود با سرعتی از حدود نانو ثانیه یا میکروثانیه تغییر جهت دهد، که با همین سرعت قطع و وصل جریان صورت می گیرد. قطع و وصل جریان در این ساختار و با این سرعت باعث ایجاد پلاسمای نوع پلاسمای سرد در فضای بین دو الکترود شده و لذا می توان آن را منبع تولید پلاسمای سرد در فشار اتمسفری دانست.

بنابراین فضای گازی بین الکترودهای موازی می‌تواند به طور میانگین با میکرو تخلیه‌ها به طور یکنواخت پوشیده شود که قطر هر یک حدود 0.1 میلی‌متر و عمر آن 10 نانو ثانیه است [۳۲]. عبارت میکرو تخلیه به یک رشته پلاسمای باریک و روشن گفته می‌شود که در فرآیند تخلیه سد دی‌الکتریک مشاهده می‌شود. تخلیه سد دی‌الکتریک شامل میکرو تخلیه‌های موضعی غیر پایدار زیادی است که در حجم تخلیه توزیع شده است [۵۸].

تخلیه سد دی‌الکتریک متناسب با کاربردهای متنوعش دارای ساختار متفاوتی است. ساختار تخلیه سد دی‌الکتریک به سه دسته تخلیه حجمی^۱، تخلیه سطحی^۲ و تخلیه هم‌صفحه^۳ تقسیم می‌شود، که در شکل ۳-۴ به صورت شماتیک انواع مختلف تخلیه سد دی‌الکتریک نشان داده شده است. تخلیه حجمی به دو صورت مسطح^۴ و استوانه‌ای^۵ یا هم‌محور^۶ می‌باشد. ساختار مسطح شامل دو الکتروود موازی و استوانه‌ای شامل دو الکتروود استوانه‌ای هم‌محور (الکتروود داخلی و خارجی) است. در ساختار مسطح، لایه دی‌الکتریک به سه صورت در بین الکتروودها قرار می‌گیرد: ۱- لایه دی‌الکتریک بر روی هر دو الکتروود، ۲- لایه دی‌الکتریک تنها روی یک الکتروود و ۳- لایه دی‌الکتریک ما بین دو الکتروود موازی.

در ساختار استوانه‌ای لایه دی‌الکتریک به سه صورت در بین الکتروودها می‌باشد: ۱- لایه دی‌الکتریک بر روی دو الکتروود خارجی و داخلی، ۲- لایه دی‌الکتریک بر روی الکتروود داخلی و ۳- لایه دی‌الکتریک بر روی الکتروود خارجی. تخلیه سطحی شامل دو الکتروود موازی است که یکی از الکتروودها بزرگتر از دیگری می‌باشد، لایه دی‌الکتریک فضای بین دو الکتروود (گاف) را کاملاً می‌پوشاند. در این ساختار، فرآیند تخلیه در طول لایه دی‌الکتریک رخ می‌دهد و هیچ گونه تخلیه‌ای در گاف صورت نمی‌گیرد. تخلیه هم‌صفحه ترکیبی از دو نوع حجمی

¹ Volume discharge

² Surface discharge

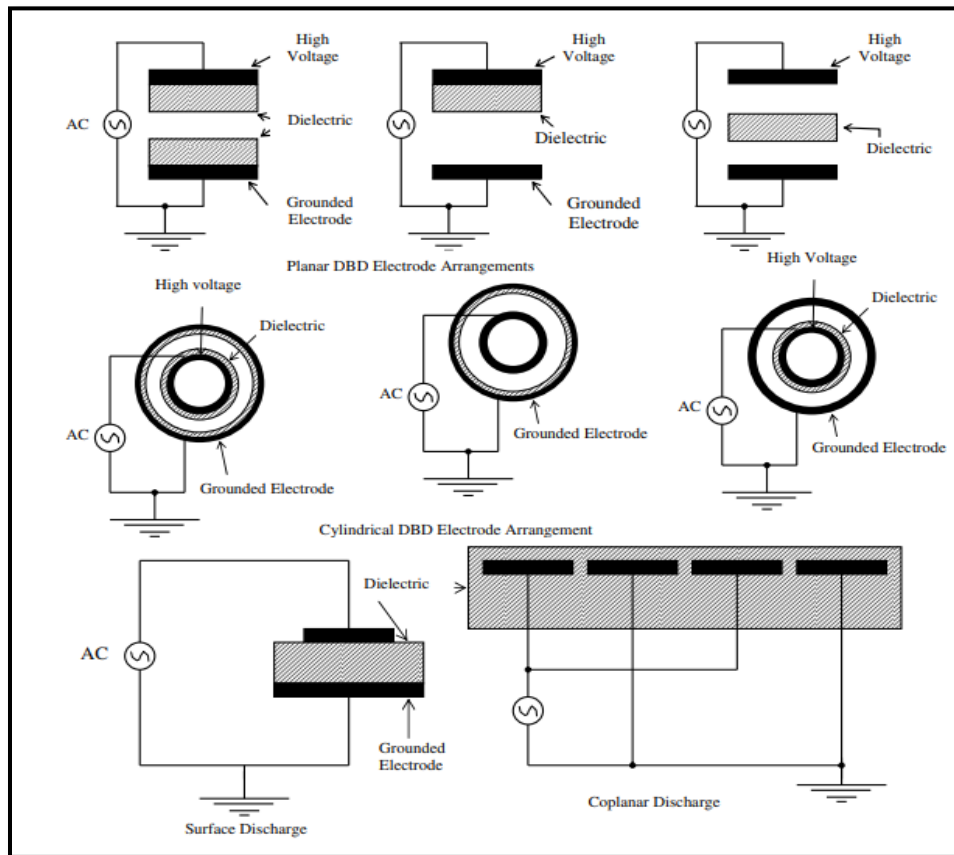
³ Coplanar discharge

⁴ Planar

⁵ Cylindrical

⁶ Coaxial

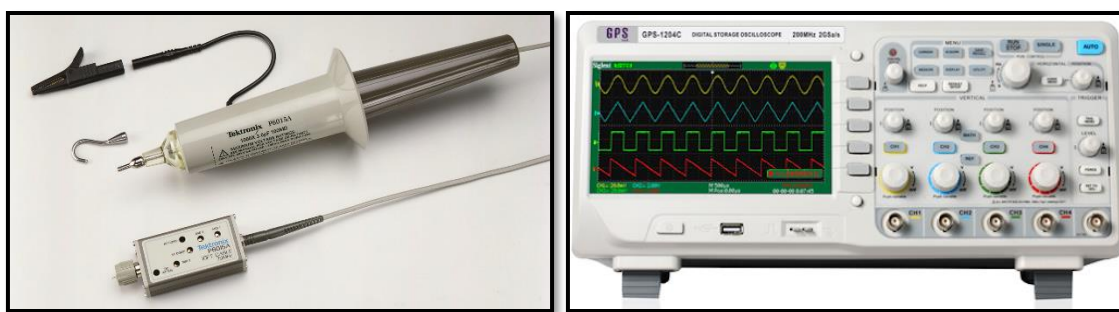
و سطحی می‌باشد. الکترودها در داخل لایه دی‌الکتریک قرار می‌گیرند [۵۹].



شکل ۳-۴: تصویری شماتیک از انواع الکترودها و نحوه قرارگیری دی‌الکتریک در ساختار تخلیه سد دی‌الکتریک [۵۹]

جنس دی‌الکتریک مورد استفاده در ساختار تخلیه سد دی‌الکتریک بسیار اهمیت دارد. معمولاً در تخلیه سد دی‌الکتریک از عایق‌هایی مانند شیشه، کوارتز، سرامیک، فویل‌های پلاستیکی، ورقه‌های تفلون، لایه‌های پلیمر و ... استفاده می‌شود که این عایق‌ها دارای استحکام بالا و همچنین ثابت دی‌الکتریک بالایی هستند. در واقع درجه‌ی استحکام این مواد از اهمیت بسزایی برخوردار است تا در مقابل برخوردهای الکترون-یونی استقامت خوبی داشته و به مرور زمان فرسوده نشوند [۳۲].

در دستگاه پلاسمایی مورد استفاده در این پژوهش، یک الکتروود به صورت دیسک با قطر ۵ سانتی متر و الکتروود ثانویه، توری از جنس گالوانیزه می باشد که با یک دی الکتریک از جنس شیشه پوشانده شده است. فرکانس دستگاه ۵۷ KHz می باشد. برای تولید پلاسما تخلیه سد دی الکتریک از منبع تغذیه ی ولتاژ بالای AC استفاده شد. بیشینه توان، ولتاژ و جریان خروجی منبع تغذیه استفاده شده در این پژوهش به ترتیب برابر ۱۰۰۰W، ۱kV و ۱۰۰mA می باشد. برای اندازه گیری شکل و مقدار ولتاژ دو سر الکتروود دستگاه تخلیه سد دی الکتریک از پروب ولتاژ بالا^۱ به همراه اسیلوسکوپ^۲ استفاده شد. اسیلوسکوپ دستگاه الکترونیکی است که امکان مشاهده ی ولتاژ را فراهم می نماید. غالباً مقدار ولتاژ به صورت نموداری دو بعدی نمایش داده می شود که محور افقی، زمان و محور عمودی آن ولتاژ است. اندازه گیری ولتاژ توسط پروب ولتاژ بالا صورت می گیرد. برای انتقال سیگنال های الکتریکی به اسیلوسکوپ از پروب استفاده می شود. سیم رابط پروب معمولاً از جنس کابل هم محور^۳ می باشد تا میزان نویز به حداقل برسد. در این پروژه همان طور که در شکل ۳-۵ مشاهده می شود، از پروب ولتاژ بالای Tektronix p6015 و اسیلوسکوپ دیجیتالی ۲۰۰MHz استفاده شده است.



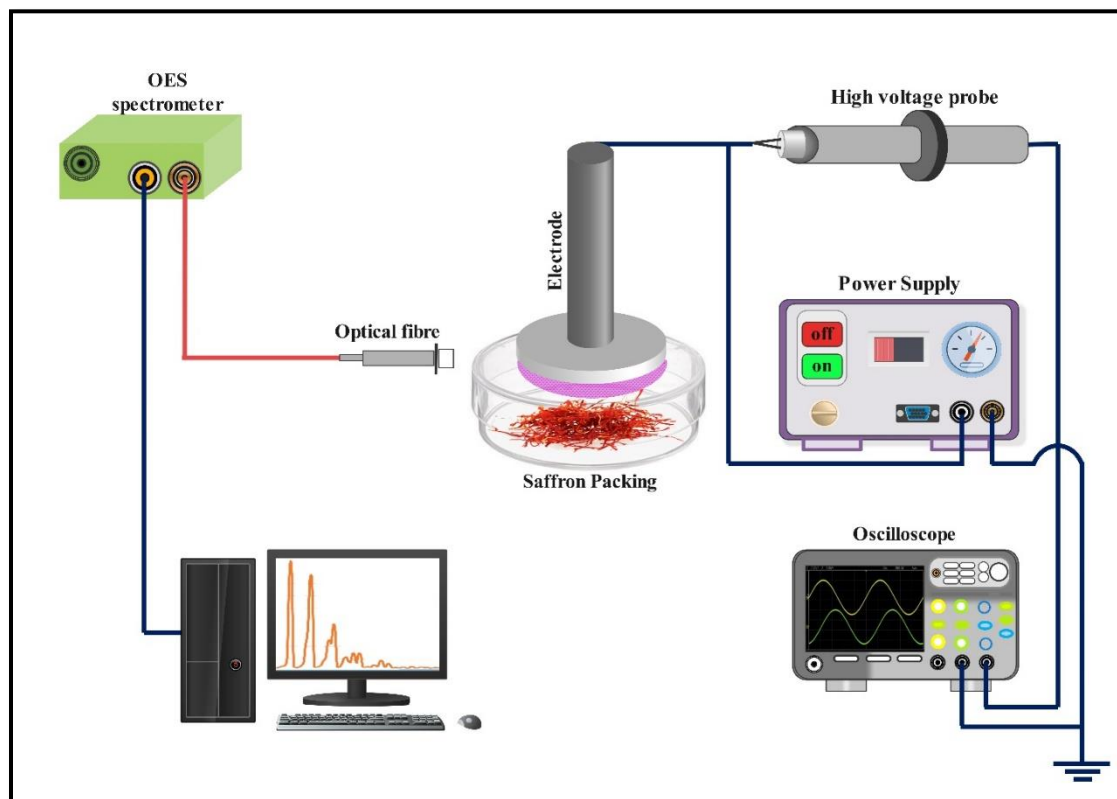
شکل ۳-۵: دستگاه اسیلوسکوپ و پروب ولتاژ بالا

¹ High Voltage Probe

² Oscilloscope

³ Coaxial Cable

۰/۰۰۵ گرم از رشته‌های زعفران بر روی پلیت شیشه‌ای استریل قرار داده شد، تا در زمان‌های ۱، ۲، ۵ و ۱۰ دقیقه در معرض تابش پلاسما قرار بگیرند. در شکل ۳-۶ تصویری شماتیک از دستگاه و نحوه کار آن مشاهده می‌شود.



شکل ۳-۶: تصویری شماتیک از دستگاه تخلیه سد دی‌الکتریک

۳-۶ اندازه‌گیری پارامترهای پلاسما

پارامترهای اساسی برای توصیف پلاسما چگالی و دمای ذرات می‌باشد. به کمک طیف‌سنج گسیل ایتیکی می‌توان دمای الکترونی را محاسبه نمود. برای محاسبه دمای الکترون‌ها از رابطه بولتزمن استفاده می‌شود.

$$\ln\left(\frac{\lambda_{ij} I_{ij}}{hc A_{ij} g_j}\right) = -\frac{1}{KT} (E_j) + \ln\left(\frac{n}{U(T)}\right) \quad (۱-۳)$$

که در آن λ_{ij} و I_{ij} به ترتیب شدت و طول موج مربوط به انتقال از i به j ، h ثابت پلانک، c سرعت نور، n تراکم عددی گونه‌های گسیل شده، $U(T)$ تابع پارش، A_{ij} احتمال انتقال بین سطح i و j ، K ثابت بولتزمن، T دمای برانگیختگی، g_j وزن آماری سطح انرژی بالایی و E_j سطح انرژی بالایی در واحد الکترون ولت است [۶۰].

رابطه (۱-۳) یک رابطه خطی است که اگر $\ln\left(\frac{\lambda_{ij} I_{ij}}{hc A_{ij} g_j}\right)$ را براساس E_j رسم کنیم، از طریق شیب خط می‌توان دما را محاسبه کرد. در جدول ۱-۳ اطلاعات گونه‌های نیتروژن مورد نیاز برای محاسبه دمای الکترونی مشاهده می‌شود.

جدول ۱-۳: اطلاعات گونه‌های نیتروژن جهت اندازه‌گیری دما

Wavelength $\lambda(nm)$	Transitions	Statistical Weight g_j	Transition Probability $A_{ij} (S^{-1})$	Upper level energy $E_j(eV)$
۳۸۰/۵۷	$2s^2 2p^2(^1D) 3p^2 p^0[3/2] \rightarrow 2s^2 2p^2(^3P) 3s^2 p[1/2]$	۴	$۸/۹۵E+۰۵$	۱۳/۹۲۶
۳۹۰/۵۰	$2s^2 2p^2(^3P) 3p^2 D^0[3/2] \rightarrow 2s^2 2p^2(^3P) 3s^2 p[3/2]$	۴	$۴/۱۴E+۰۵$	۱۳/۸۶۸
۴۲۶/۶۸	$2s^2 2p^2(^1D) 3d^2 p[3/2] \rightarrow 2s^2 2p^2(^3P) 3p^2 D^0[5/2]$	۴	$۲/۲۶E+۰۶$	۱۴/۹۱۶

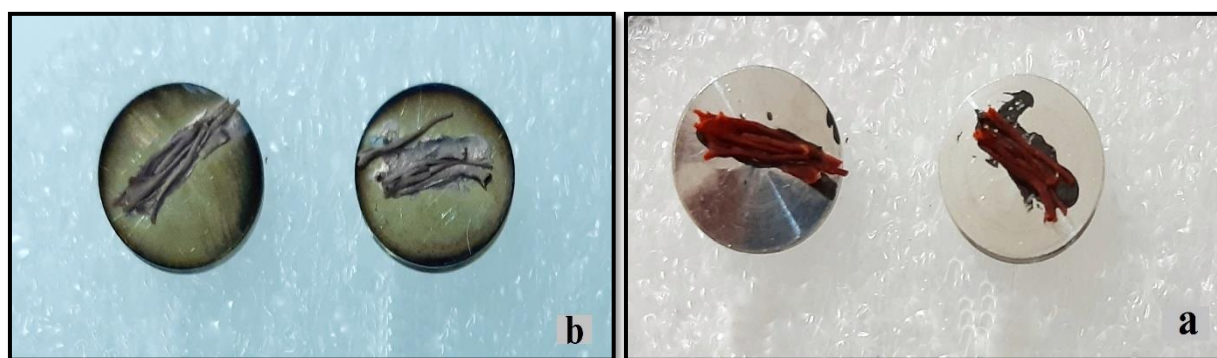
برای محاسبه چگالی الکترون‌ها می‌توان از رابطه ۲-۳ استفاده کرد.

$$\Delta\lambda_{1/2} = 2\omega(N_e/10^{16}) \quad (۲-۳)$$

که در آن $\Delta\lambda_{1/2}$ نیم پهنای پهن شدگی استارک، ω پارامتر ضربه الکترون و Ne چگالی الکترون می‌باشد. برای به دست آوردن مقدار پارامتر ضربه می‌توان به مرجع [۶۱] مراجعه نمود، سپس با قرار دادن مقادیر نیم پهنای چگالی الکترونی حاصل می‌شود.

۷-۳ آماده‌سازی نمونه‌ها برای تصویربرداری FESEM

برای بررسی تأثیر پلاسمای سرد اتمسفری بر خصوصیات ریخت شناسی و ساختار رشته‌های زعفران، از میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی استفاده می‌شود. تصاویر نمونه پردازش شده و شاهد با هم مقایسه می‌گردند. برای این منظور، رشته‌های زعفران با یک لایه نازک از طلا (۱۵ nm) توسط دستگاه کندوپاش رومیزی پوشش داده شدند تا تصویری با وضوح بالا به دست آید. به منظور آماده‌سازی زعفران برای تصویربرداری، رشته‌های زعفران توسط پنس استریل و به کمک چسب کربن بر روی پایه مربوطه قرار گرفت (شکل ۷-۳). سپس نمونه‌ها توسط دستگاه کندوپاش لایه نشانی شدند، و در نهایت در داخل دستگاه FESEM جایگذاری شدند.



شکل ۷-۳: (a) نمونه‌ها قبل از لایه‌نشانی طلا (b) نمونه‌ها پس از لایه‌نشانی طلا

۸-۳ عصاره‌گیری زعفران برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

برای اندازه‌گیری خواص آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها نیاز است که از کلاله‌های زعفران عصاره‌گیری شود. به همین منظور ۰/۱ گرم از پودر زعفران توسط ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد در حمام آب گرم به مدت ۳ ساعت با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد عصاره‌گیری شد. سپس مخلوط حاضر در ۵۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول توسط کاغذ صافی فیلتر و برای انجام مطالعات بیوشیمیایی استفاده گردید [۶۲].

۹-۳ آماده‌سازی زعفران برای اندازه‌گیری ترکیبات اصلی

۵۰۰ میلی‌گرم از پودر ساییده شده زعفران به همراه ۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با درجه خلوص تجزیه‌ای، به بالن حجمی با خط نشانه ۱۰۰۰ میلی‌لیتر افزوده شد. با استفاده از یک هسته و همزن مغناطیسی با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت یک ساعت به دور از نور همزده شد. سپس بالن حجمی تا خط نشانه با آب مقطر به حجم رسید و تا زمانی که محلول یکنواخت به دست آید، تکان داده شد. سپس با کمک پیپت ۲۰ میلی‌لیتری محلول به یک بالن حجمی ۲۰۰ میلی‌لیتری انتقال یافت، و تا خط نشانه با آب مقطر به حجم رسانده شد. محلول به سرعت و به دور از نور توسط صافی استات سلولزی^۱ با منافذ ۰/۴۵ میکرومتری، صاف گردید تا محلول شفاف به دست آید. سپس با استفاده از دستگاه طیف‌سنج تغییرات جذب نمونه‌ها نسبت به آب مقطر به عنوان محلول مرجع اندازه‌گیری شد.

¹ Cellulose acetate sheets

فصل چهارم

بحث و نتایج مربوط به بررسی خواص فیزیکی، شیمیایی و ضد میکروبی زعفران

۴-۱ مقدمه

در این فصل اثر پلاسمای سرد ایجاد شده توسط دستگاه تخلیه سد دی‌الکترونیک بر خواص فیزیکی و شیمیایی زعفران از قبیل رنگ، عطر، طعم و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن مورد بررسی قرار گرفت. همچنین مشخص گردید که گونه‌های تولید شده توسط پلاسما چگونه اثر ضد میکروبی دارند، و باعث نابودی قارچ‌های تلقیح شده بر روی رشته‌های زعفران می‌گردند.

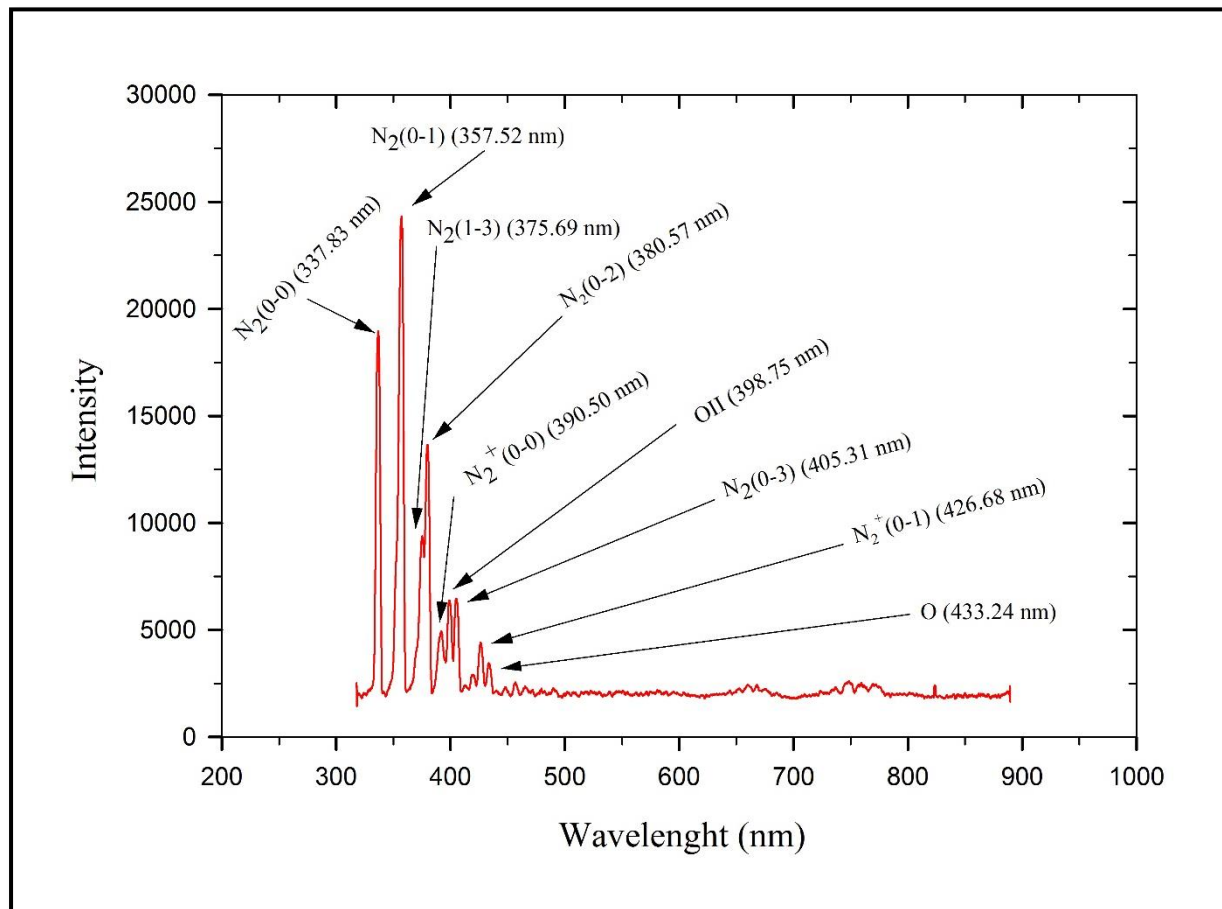
۴-۲ بررسی اثر گونه‌های تولید شده بر زعفران

به منظور تجزیه و تحلیل رابطه بین نتایج استریل کردن و گونه‌های شیمیایی تولید شده در تخلیه، و در حقیقت به دست آوردن بینشی از ترکیب پلاسما، طیف انتشار آن‌ها با استفاده از طیف سنجی گسیل اپتیکی به عنوان مناسب‌ترین ابزار مورد استفاده در تشخیص پارامتر پلاسما بررسی گردید. طیف انتشار پلاسما سرد اتمسفری در شکل ۴-۱ نشان داده شده است.

خطوط طیف زیادی در پلاسمای هوا وجود دارد. بدیهی است که انتشار خطوط مولکولی N_2 به دلیل وجود ۷۸ درصد محتوای آن در هوا، بیش‌تر از سایر ذرات باشد. هنگامی که دستگاه DBD با گاز هوا فعالیت می‌کند، طیف سیستم مثبت دوم $N_2^+ 1$ ($C^3 \Pi_u - B^3 \Pi_g$) در طول موج‌های ۳۳۷.۸ و ۳۵۷.۵ نانومتر منتشر می‌شود. همچنین انتشار طیف سیستم منفی اول $N_2^+ 2$ ($B^2 \Sigma_u^+ - X^2 \Sigma_g^+$) در ۳۹۰.۵ نانومتر مشاهده شد [۶۳].

¹ Second positive system

² First negative system

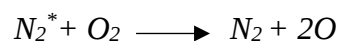


شکل ۴-۱: طیف گسیل اپتیکی پلاسمای تخلیه سد دی الکتریک با گاز هوا

اتم‌های اکسیژن نیز در اثر واکنش بین الکترون و مولکول‌های اکسیژن، طبق واکنش زیر ایجاد می‌شوند [۶۴].



همچنین سیستم مثبت دوم نیتروژن نیز می‌تواند طبق واکنش‌های زیر اکسیژن اتمی تولید نماید [۶۵].

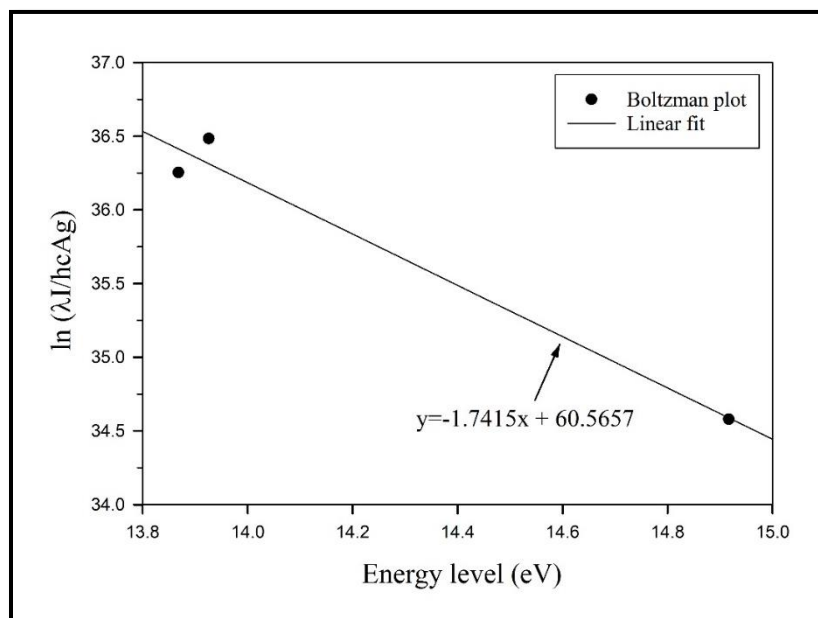




گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر (ROS)، نیتروژن واکنش‌پذیر (RNS)، ذرات باردار و اشعه UV چهارگونه فعال پلاسما هستند. از آنجایی که نیتروژن فراوان‌ترین عنصر موجود در هوا است، RNS گونه فعال غالب می‌باشد. براساس طیف گسیل اپتیکی، مشخص شده است که انواع گوناگون RNS در پلاسما تخلیه سد دی‌الکتریک تولید می‌شود. نتایج نشان می‌دهد که گونه‌های واکنش‌پذیر نیتروژن و ذرات باردار احتمالاً با میکروارگانیزم‌های رشته‌های زعفران در طول پردازش پلاسما فعل و انفعالات داخلی دارند.

۳-۴ دما و چگالی الکترونی در دستگاه تخلیه سد دی‌الکتریک

در شکل ۲-۴ نمودار $\ln(\frac{\lambda_{ij} I_{ij}}{hc A_{ij} g_j})$ برحسب E_j برای گونه N(I) رسم شده است. با محاسبه شیب خط نمودار و به کمک رابطه ۱-۳ دمای الکترونی به صورت $6663/544^\circ K$ به دست آمد.



شکل ۲-۴: منحنی بولتزمن جهت محاسبه دما الکترونی

همچنین با استفاده از رابطه ۲-۳ چگالی الکترونی برای عناصر مختلف موجود در طیف سنجی گسیل اپتیکی، در جدول ۱-۴ مشخص شده است.

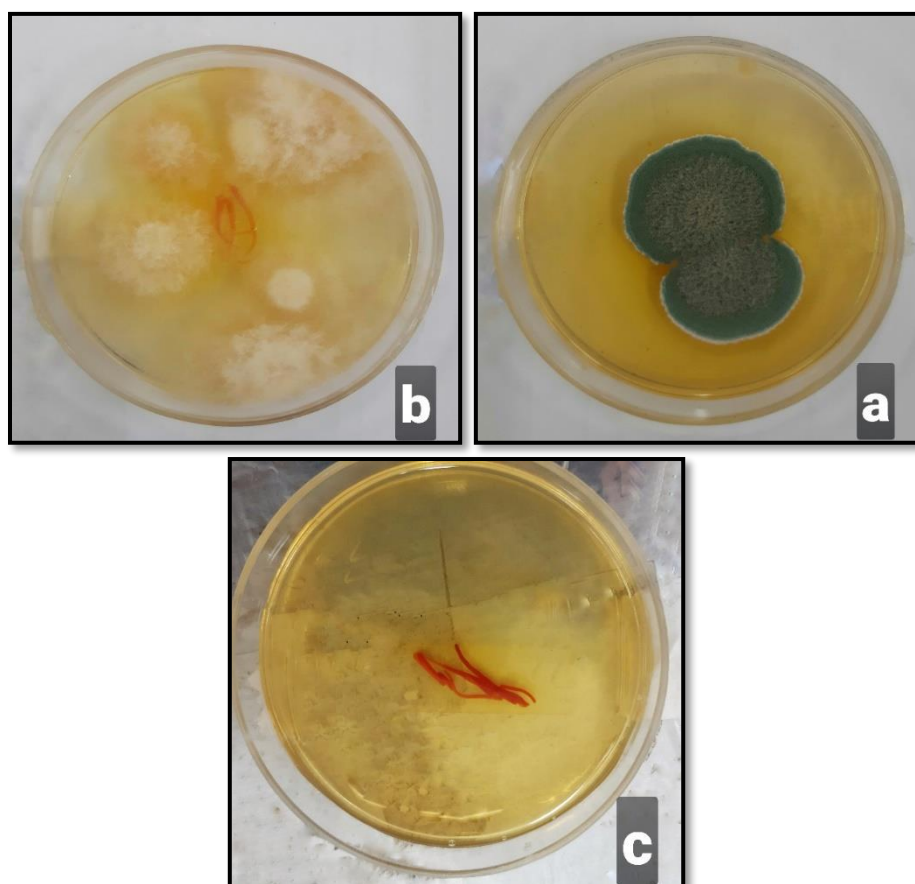
جدول ۱-۴: چگالی الکترونی عناصر موجود در طیف سنجی گسیل اپتیکی

چگالی الکترونی (cm^{-3})	عنصر
$4/75 \times 10^{16}$	NI
$2/86 \times 10^{17}$	NII
$5/34 \times 10^{17}$	NIII
$5/79 \times 10^{17}$	NIV
$2/11 \times 10^{17}$	OII

۴-۴ بررسی اثر تابش پلاسما در نابودی میکروارگانیزم‌های زعفران

در این مطالعه، رشته‌های خشک زعفران در زمان‌های ۱، ۲، ۵ و ۱۰ دقیقه با ولتاژ ۳/۲ کیلو ولت در معرض تابش پلاسمای سرد قرار گرفتند. بررسی رشد قارچ‌های تلقیح شده روی سطح زعفران تحت پردازش با پلاسما، نشان می‌دهد نمونه‌هایی که به مدت ۲ دقیقه و بیشتر در معرض پلاسما قرار داشتند، عاری از هرگونه آلودگی بودند. در شکل ۳-۴ رشد قارچ آسپرژیلوس در نمونه شاهد و نمونه‌های پردازش شده پس از ۱ و ۲ دقیقه تابش پلاسما مشاهده می‌شود. از این رو با یافتن زمان مناسب ۲ دقیقه به منظور تأثیر مثبت پلاسما بر قارچ آسپرژیلوس

نایجر، مابقی آنالیزها روی دو نمونه شاهد و پردازش شده (۲ دقیقه) انجام پذیرفت. زمان کافی برای رشد اسپوره‌های آسپرژیلوس نایجر ۲ دقیقه بود. پس از این زمان، رشد کاملاً متوقف شد. از همه مهم‌تر، تولید اسپورها به مدت ۱ دقیقه متوقف شدند.



شکل ۴-۳: (a) نمونه شاهد (b) نمونه پس از ۱ دقیقه تیمار (c) نمونه پس از ۲ دقیقه تیمار

گازی که جهت تولید پلاسما به کار می‌رود نقش مهمی در غیر فعال شدن میکروارگانیسم‌ها دارد. نوع ترکیب گازی می‌تواند، نسبت و نوع گونه‌های واکنشی تولید شده را تغییر دهد. گونه‌های اکشیژن و نیتروژن فعال به تنهایی ممکن است اثر کمتری بر کاهش میکروارگانیسم‌ها داشته باشند [۶۶]. در پژوهشی قرارگرفتن نمونه‌های

آلوده به میکروارگانیزم در برابر گازهای O_3 و NO_2 به طور جداگانه سبب غیر فعال شدن ناچیز میکروارگانیزمها شد، در حالی که استفاده از مخلوط گازهای O_3 و NO_2 به عنوان گاز کاری پلاسما باعث افزایش قابل توجه اثر میکروب‌کشی گردید [۶۷]. گاز هوا تقریباً متشکل از ۲۰ درصد اکسیژن و ۷۸ درصد نیتروژن می‌باشد. هنگامی که پلاسما توسط گاز هوا تولید می‌گردد، تعداد زیادی از گونه‌های RONS از جمله O_3 ، O_2 ، NO ، NO_2 ، HNO_3 ، HNO_2 و OH تولید می‌شوند. این گونه‌های شیمیایی تولید شده در پلاسما با ترکیبات آلی مواد غذایی تداخل می‌کنند و منجر به واکنش‌های بیوشیمیایی ثانویه، جهت میکروب‌زدایی می‌شوند [۶۸].

در این پژوهش برای رد اثرات حرارتی از یک خنک کننده کوچک در کم‌ترین فاصله از الکترودها استفاده گردید. در شرایط آزمایش، دما در حدود ۳۶ درجه سانتی‌گراد توسط ترمومتر لیزری^۱ اندازه‌گیری شد. مطالعات نشان داده است که چنین دمایی در این بازه زمانی، قادر به غیر فعال سازی سطح قابل توجهی از قارچ نمی‌باشد [۶۹]. در مطالعات زیادی اشاره شده است که گونه‌های باردار در برابر گرمای تولید شده در طی پردازش مستقیم با پلاسما، نقش مؤثرتری در میکروب‌کشی داشته است [۶۷، ۶۸].

شروع واکنش‌های شیمیایی در پلاسمای سرد زمانی اتفاق می‌افتد که برخوردی بین الکترون‌ها و برخی از اجزای سازنده پلاسما رخ دهد. به عنوان مثال تأثیر الکترون‌ها بر مولکول‌های هوا، باعث آزاد شدن اکسیژن و نیتروژن اتمی و برانگیخته می‌شود. واکنش‌های ثانویه بین گونه‌های خنثی و یونی اتفاق می‌افتد و منجر به تولید ازن و اتم‌های اکسیژن می‌شود. زمانی که پلاسما در فشار اتمسفری تولید می‌شود، بیش‌تر واکنش‌ها بین گونه‌های خنثی اتفاق می‌افتد [۷۲].

فعل و انفعالات بین RONS تولید شده در پلاسما و اسپورهای قارچ احتمالاً یکی از مسیرهای شیمیایی

¹ Non Contact Thermomete

برای غیر فعال سازی میکروارگانیسم‌ها است. فعالیت ضد میکروبی اثبات شده RONS از آسیب آن‌ها به دیواره‌ی سلول یا غشاء میکروب ناشی می‌شود، و متعاقباً گونه‌های واکنشی دیگر را قادر می‌سازند وارد سلول شوند و به اجزای بین سلولی مانند اندامک‌ها^۱ و مولکول‌های زیستی مهم (DNA، RNA، و پروتئین‌ها) آسیب برسانند [۷۳].

گونه‌های اکسیژن فعال از طریق اکسیداسیون غشاء سلول، پروتئین‌ها، اندامک‌های سلول، اسیدهای چرب و همچنین DNA باعث میکروبی‌زدایی می‌شوند. در صورت وجود رطوبت در هوا، به دلیل واکنش بین الکترون‌ها و مولکول‌های آب، گونه‌هایی از جمله H_2O_2 ، رادیکال‌های اکسیژن و OH تولید می‌شود که خاصیت میکروب‌کشی قوی دارند [۲۶]. گونه‌های نیتروژن فعال در غیر فعال‌سازی میکروبی با ROS همکاری می‌کنند [۷۴]. RNS تولید شده در طی پلاسمای سرد، تمایل به تجمع در سطح سلول دارد و سپس از طریق غشاء پخش می‌شود، و PH داخل سلولی را به میزان قابل توجهی تغییر می‌دهد. این تغییر در PH بر عملکردهای سلولی از قبیل فعالیت آنزیم‌ها، سرعت واکنش، پایداری پروتئین و همچنین ساختار DNA و RNA آسیب می‌رساند [۷۵]. گونه‌های نیتروژن فعال با اثر اکسیدکنندگی شدید بر روی گلیکو پروتئین‌های^۲ سلول‌های قارچی سبب نابودی بار میکروبی محصولات غذایی می‌شوند [۷۶]. گونه‌های واکنش دهنده پلاسما فقط روی سطح غذا تأثیر می‌گذارند، در واقع احتمال ایجاد واکنش‌های شیمیایی در عمق غذا کم است [۷۷]. در نتیجه تغییر تنها در سطح اجزای ماده غذایی اتفاق می‌افتد. غشاء سیتوپلاسمی نشان دهنده مرز بین محفظه داخلی سلول و محیط بیرونی است. در نتیجه، اولین هدف گونه‌های تشکیل شده در پلاسما غشاء سیتوپلاسمی است. چنانچه تراکم گونه‌های فعال برای تخریب ساختار اسپور به اندازه کافی نباشد، سلول‌ها از طریق آپوپتوز^۳، تغییرات فیزیولوژیکی ایجاد می‌کنند و ساختار قارچ را تغییر می‌دهند [۷۸].

¹ Organelles

² Glycoprotein

³ Apoptosis

نوع میکروارگانیسم در غیر فعال سازی آن توسط پلاسمای سرد مؤثر می باشد. ساختار قارچ متشکل از اجزایی مانند کیتین^۱ و فیبریل های سلولز^۲ با ماتریکس پلی ساکاریدی^۳ و هسته حاوی ژنوم دیپلوئید^۴ می باشد که باعث افزایش مقاومت دیواره سلولی و در نتیجه کاهش تخریب DNA قارچ ها می شود [۷۹]. علاوه بر این، قارچ *Aspergillus* در لایه های سلولی خود دارای رنگدانه ملانین^۵ است، که یک اثر محافظتی برای قارچ در برابر تنش های خارجی محسوب می شود [۸۰]. از دیگر عوامل مؤثر در نابودی میکروارگانیسم ها زمان فرآیند تابش پلاسما می باشد. افزایش مدت زمان قرارگیری در معرض پلاسما سبب افزایش زمان تماس بین میکروارگانیسم ها و گونه های فعال واکنشی می شود، که این نیز اثر میکروبی زدایی را بیش تر می کند [۸۱].

مطالعات نشان داده اند که پردازش پلاسمای سرد می تواند در غیر فعال سازی گونه های مختلف قارچی از جمله آسپرژیلوس و پنی سیلیوم^۶ نسبت به سایر روش های ضد عفونی مانند اشعه ماوراء بنفش و ازن مؤثرتر باشد. در پژوهشی اثر ضد میکروبی پلاسمای سرد بر قارچ آسپرژیلوس بررسی گردید. نتایج نشان دادند که پلاسما منجر به غیر فعال شدن اسپورها گردید. به طور کلی، با افزایش زمان قرارگیری در معرض پلاسما و توان اعمال شده، کاهش کلنی ها بیشتر رخ داد. بالاترین توان اعمالی منجر به سریع ترین مرحله غیر فعال سازی گردید، پس از تنها ۱۲۰ ثانیه قرارگیری در معرض پلاسما، کاهش ۲/۱۹ سیکل لگاریتمی نشان داده شد. بر عکس، در توان کم تا ۲۴۰ ثانیه تأثیر بسیار کمی مشاهده شد، در نهایت در طی ۴۸۰ ثانیه به غیر فعال سازی کامل (تعداد کلنی ها کمتر از یک سیکل لگاریتمی) رسید [۸۲]. در پژوهشی که اثر پلاسما DBD فشار اتمسفری بر قارچ های *Ascochyta pinodella* و *Fusarium culmorum* از طریق میکروسکوپ اپتیکی بررسی گردید، نتایج نشان داد که پس از

¹ Chitin

² Fibrils cellulose

³ Polysaccharides matrix

⁴ Diploid genome

⁵ Melanin

⁶ Penicillium

درمان با پلاسما، دیواره‌های سلولی و ساختار غشاء سلول آسیب دیده و منجر به نشت سیتوپلاسم می‌شود. عوامل مؤثر در غیر فعال‌سازی قارچ در چند فرآیند زیر به طور خلاصه بیان گردیده است:

الف) در مدت زمان کوتاه پردازش پلاسما (حدود ۳۰ ثانیه) عملکرد غشاء سلول مهار می‌شود، ادامه یافتن پردازش منجر به نابودی کامل می‌گردد.

ب) در دوزهای پایین، سلول‌های قارچی می‌توانند دچار آپوپتوز شوند.

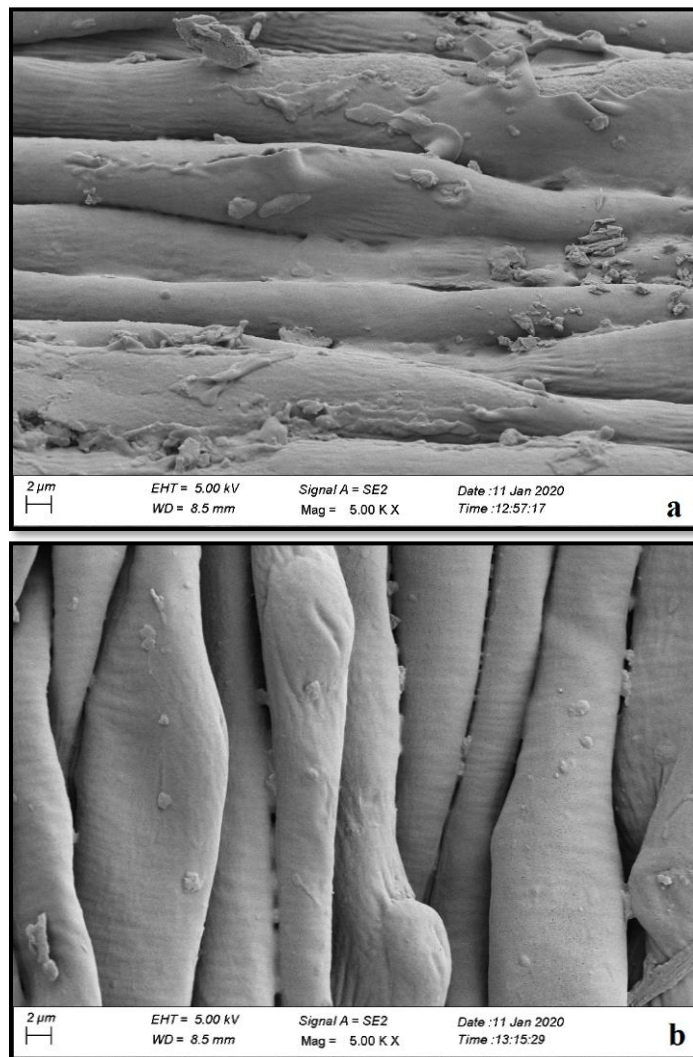
ج) برای غیر فعال‌سازی قارچ تغییر شدید ساختارهای سطح سلول ضروری نیست. با این حال، تغییرات نانو ساختاری درون سلول مشهود خواهد بود.

د) تغییرات سطح سلول، در صورت وقوع، می‌تواند به صورت تغییرات در غشاء سلول و افزایش نفوذپذیری آن مشاهده شود.

ه) گونه‌های اکسیژن حاصل از پلاسما باعث اکسیداسیون اندامک‌های داخل سلول می‌شود [۷۸].

۴-۵ بررسی تابش پلاسما بر خصوصیات ریخت شناسی زعفران

به منظور بررسی ساختار سطح رشته‌های زعفران تحت پردازش با پلاسما DBD از میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی استفاده شد. تابش مستقیم پلاسما بر روی مواد مختلف می‌تواند بر خصوصیات ظاهری و ریخت شناسی سطح آن‌ها تأثیر بگذارد. به عنوان مثال، در تیمار زعفران با پلاسمای سرد O_2 در فشار پایین، دیواره سلولی و سطح نمونه‌های پردازش شده رشته‌های زعفران آسیب دیدند [۸۳]. شکل ۴-۴ نشان می‌دهد، درمان پلاسما هیچ آثار تخریبی بر ساختار رشته‌های زعفران ندارد.



شکل ۴-۴: تصاویر FESEM (a) نمونه کنترلی (b) نمونه پردازش شده

نتایج حاکی از آن است که، بمباران یونی رشته‌های زعفران بسیار ضعیف بوده است و نتوانسته دیواره سلولی رشته‌ها را نابود کند. نتیجه‌گیری می‌شود که در این روش تعامل پلاسما با زعفران از نظر شیمیایی بیشتر از برخورد فیزیکی بوده است. یکی از عوامل نابودی میکروارگانیسم‌ها که توسط پلاسمای سرد ایجاد می‌شود، اشعه ماوراء بنفش است، که در طول موج ۳۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر تولید می‌شود [۴۸]. طبق نتایج مربوط به آنالیز طیف سنجی گسیل اپتیکی که انتشار در بازه فرابنفش را نشان داد، یکی از گونه‌های تولید شده توسط پلاسما فوتون‌های

پرانرژی هستند اما این ذرات در حدی نبودند که بتوانند به رشته‌های زعفران آسیب بزنند، چون طبق عکس‌های FESEM رشته‌ها پس از پردازش تغییری نکرده‌اند.

۴-۶ بررسی اثر تابش پلاسما بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی زعفران

یکی از خواص قابل توجه زعفران در مصارف دارویی، خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. بنابراین هرگونه پردازشی که باعث کاهش یا از بین رفتن این خاصیت ارزشمند شود، نامطلوب تلقی می‌گردد. در این پژوهش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی زعفران از طریق درصد مهار یا احیای رادیکال آزاد DPPH اندازه‌گیری شد. با توجه به جدول ۴-۲ تفاوت در مقادیر آنتی‌اکسیدان پس از پردازش پلاسمایی به صورت معنادار نبوده است ($p < 0.05$). در حقیقت پلاسمای سرد بر روی خاصیت آنتی‌اکسیدانی کلاله‌های زعفران تأثیری نداشت. با توجه به جدول ۴-۲ میزان آنتی‌اکسیدان در اولین اندازه‌گیری نمونه شاهد اختلاف زیادی با سایر اندازه‌گیری‌ها داشته است، از همین رو این مقدار در میانگین‌گیری لحاظ نشده است.

آنتی‌اکسیدان‌ها ساختار فنولی دارند و از تشکیل رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کنند. رابطه مستقیمی بین خواص آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنولی در گیاهان وجود دارد. به طور کلی، عصاره‌های گیاهی با محتوای فنولی بالاتر نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری دارند [۷۷]. فعالیت آنتی‌اکسیدانی زعفران به دلیل وجود فلاونوئیدها، کروسین‌ها، کروسین‌ها و ترکیبات سافرانال است. مطالعات زیادی در مورد تأثیر پلاسمای سرد بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی غذاها (میوه‌ها، سبزیجات و غیره) انجام شده است. نتایج نشان داد که طیف گسترده‌ای از تغییرات (کاهش، افزایش و عدم تغییر) در میزان آنتی‌اکسیدان مواد غذایی اتفاق می‌افتد. اختلاف در نتایج گزارش‌ها ممکن است به نوع و ساختار غذاها، نوع سیستم‌های پلاسمایی و شرایط درمان از جمله ولتاژ ورودی، توان، زمان و گاز کاری بستگی داشته باشد [۸۴].

جدول ۴-۲: مقادیر درصد مهار رادیکال DPPH در سه بار تکرار و میانگین مقادیر

نمونه	شاهد (%)	پردازش شده (%)
دفعات تکرار آنالیز		
۱	۱۴/۴۱۰	۲۷/۲۲۰
۲	۲۸/۳۸۴	۲۳/۷۲۶
۳	۲۷/۳۶۵	۲۶/۶۳۸
میانگین	۲۷/۸۷۵	۲۵/۸۶۱

در پژوهشی اثر پلاسمای سرد فشار اتمسفری^۱ در زمان ۲۰ دقیقه با توان‌های ۲۰ و ۵۰ وات بر عصاره نعناع مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در نمونه پردازش شده در مقایسه با نمونه شاهد، افزایش یافته است. نتایج حاکی از آن بود، که غلظت نمونه‌ها و توان پلاسما مورد استفاده، تأثیر مهمی در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH داشت [۷۷]. در مطالعه‌ای که تأثیر پلاسمای سرد بر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی میوه کیوی اندازه‌گیری شد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH مورد مطالعه قرار گرفت. یافته‌ها نشان دادند که محتوای آنتی‌اکسیدان میوه، تغییرات قابل توجهی نداشته است [۸۵].

۴-۷ بررسی اثر تابش پلاسما بر شاخص‌های رنگ زعفران

رنگ فرآورده‌های غذایی از مهم‌ترین پارامترهایی است که به میزان قابل توجهی در پذیرش مصرف کننده

¹ low pressure cold plasma (LPCP)

تأثیر می‌گذارد. شکل ۴-۵ اثر تابش پلاسما بر شاخص‌های L^* ، a^* و b^* نمونه پردازش شده و کنترلی را نشان می‌دهد. شاخص‌های رنگی L^* (روشنایی)، a^* (قرمز-سبز) و b^* (زرد-آبی) از عوامل ارزیابی کیفیت زعفران می‌باشند. مقایسه مقادیر شاخص‌های L^* ، a^* و b^* نشان داد که در اثر پردازش پلاسما، شاخص‌های a^* و b^* کاهش یافتند و شاخص L^* افزایش یافت. بنابراین قرارگرفتن پودر زعفران در معرض پلاسمای هوا، سبب از دست دادن رنگ قرمز، کاهش زردی و افزایش روشنایی آن گردید. کاروتنوئیدها^۱ مسئول رنگ کلاله‌های زعفران هستند. کاهش رنگ قرمز و افزایش روشنی پودر زعفران را می‌توان به ازن و رادیکال‌های هیدروکسیل تولید شده توسط پلاسمای سرد نسبت داد، که با قرارگیری در معرض تابش پلاسما سبب افزایش اکسیداسیون و تخریب کاروتنوئیدها و کاهش رنگدانه‌ها می‌گردند.

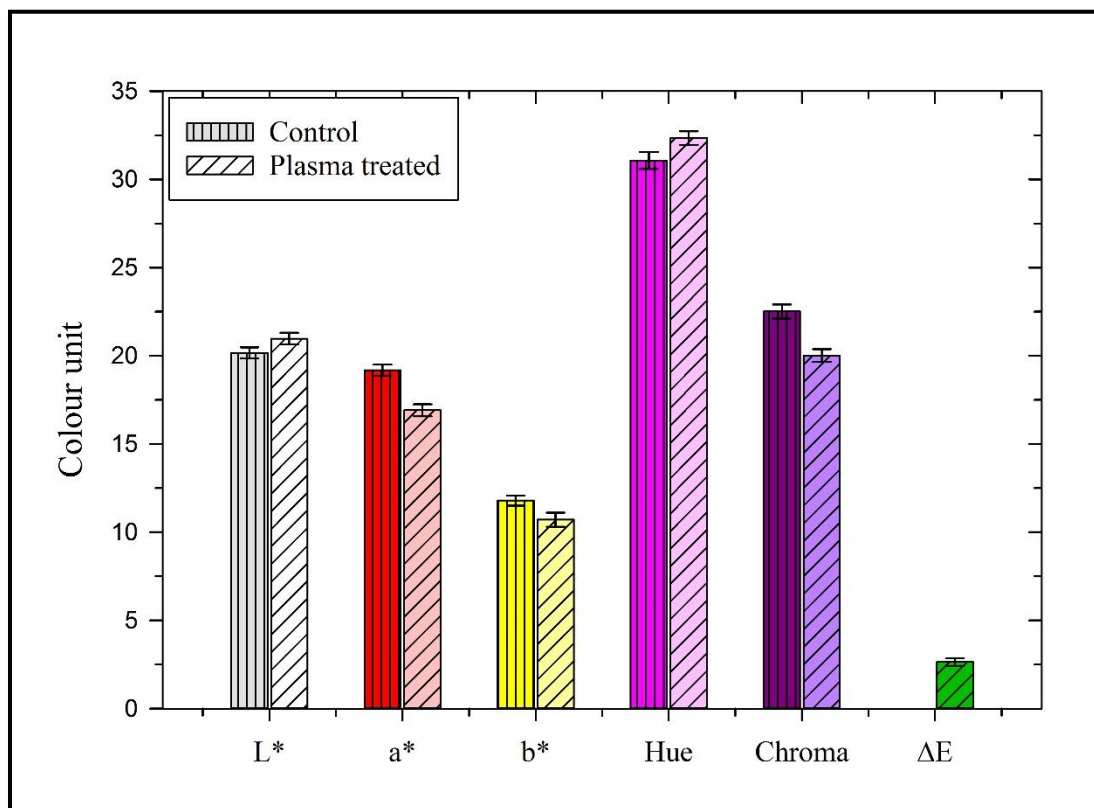
رنگدانه‌های زعفران در اثر واکنش‌های آنزیمی (به وسیله آنزیم‌هایی مانند بتا-گلوکوزیداز) یا غیرآنزیمی (در اثر اکسیژن، گرما و نور) تجزیه می‌شوند، که این امر منجر به کاهش شدت رنگ‌دهی زعفران می‌گردد. در پژوهشی اثر پلاسمای تخلیه سد دی‌الکتریک بر مخلوط آب هویج و پرتقال بررسی گردید. گزارش شده است که در اثر پردازش پلاسمای سرد به مدت ۳۰ ثانیه مقادیر a^* و b^* به طور قابل توجهی کاهش یافتند. این تغییرات در شاخص‌های رنگ به تغییر فعالیت آنزیم‌ها و غیرفعال شدن پراکسیداز^۲ نسبت داده شده است [۸۶].

با توجه به شکل ۴-۵ مقدار شدت رنگ (Chroma) روند کاهشی و مقدار زاویه رنگ (Hue) روند افزایشی داشته است. شدت رنگ جزء خواص کمی رنگ است. هرچه مقدار Chroma بیش‌تر باشد شدت رنگ نمونه‌ها که توسط انسان درک می‌شود، بیش‌تر است. زاویه رنگ ویژگی کیفی رنگ در نظر گرفته می‌شود، و مشخصه‌ای است که طبق آن رنگ‌ها به صورت قرمز، زرد و غیره تعریف شده‌اند. این ویژگی مربوط به تفاوت جذب در طول موج‌های

¹ Carotenoid

² Peroxidase

مختلف است. زاویه ۰ یا ۳۶۰ درجه نشان دهنده‌ی رنگ قرمز است، در حالی که زوایای ۹۰، ۱۸۰ و ۲۷۰ درجه به ترتیب نشان دهنده‌ی رنگ‌های زرد، سبز و آبی هستند [۸۷].



شکل ۴-۵: تغییرات شاخص‌های رنگ بین نمونه شاهد و پردازش شده

اختلاف رنگ کل (ΔE)، میزان اختلاف رنگ بین نمونه‌های شاهد و پردازش شده را نشان می‌دهد. بازه $1/5 < \Delta E < 3$ یعنی تغییرات رنگ نامحسوس است و توسط چشم انسان غیر قابل تشخیص است [۸۶]. گزارش‌های مختلفی در مورد تأثیر پلاسمای سرد بر تغییرات رنگ محصولات غذایی وجود دارد. برخی مطالعات گزارش کردند که هیچ کاهش قابل توجهی در رنگ رخ نداده است، و برخی اظهار داشتند که با افزایش زمان پردازش، کاهش رنگ مشاهده شده است [۸۴]. در پژوهشی که اثر پردازش پلاسمای اکسیژن RF را بر زعفران بررسی کردند، اظهار

داشتند که تغییر در رنگ نمونه‌های زعفران پردازش شده با پلاسما قابل تشخیص نبوده است [۸۳].

۴-۸ بررسی اثر تابش پلاسما بر ترکیبات شیمیایی اصلی زعفران

کیفیت زعفران به غلظت متابولیت‌های ثانویه شامل کروسین، پیکروکروسین و سافرانال بستگی دارد، که به ترتیب عامل رنگ، طعم و عطر زعفران می‌باشند. این کیفیت از طریق استاندارد ISO/TS 3632-2 تعیین می‌گردد [۸۸]. مقادیر این ترکیبات اصلی برای بیان کیفیت زعفران مورد استفاده قرار می‌گیرد. هرچه مقادیر این ترکیبات در زعفران بیشتر باشد، کیفیت محصول نیز بالاتر می‌رود. جدول ۳-۴ اثر پردازش پلاسمای سرد را بر میزان متابولیت‌های اصلی زعفران شامل کروسین، پیکروکروسین و سافرانال نشان می‌دهد. طبق داده‌های جدول میزان کروسین کاهش یافته است، در حالی که مقادیر پیکروکروسین و سافرانال نیز افزایش یافته‌اند. البته این تغییرات از نظر آماری معنادار نبوده است ($p < 0.05$).

رنگدانه‌های کاروتنوئید زعفران که شامل گلیکوزید استرهای کروسین می‌باشد، در اثر عواملی مانند نور و اشعه ماوراء بنفش تخریب می‌شوند. اشعه ماوراء بنفش موجود در پلاسما می‌تواند منجر به کاهش میزان کروسین در زعفران شود. وجود پیوندهای اشباع نشده در ساختار مولکولی کروسین، به عنوان اصلی‌ترین کاروتنوئید زعفران، آن را مستعد عوامل اکسید کننده (رادیکال‌های آزاد، رادیکال هیدروکسیل یا اتم اکسیژن) می‌کند. رادیکال‌های آزاد ممکن است پیوندهای گلیکوزید را شکسته و تغییری در ساختار کروسین ایجاد کنند، که در نتیجه بر رنگ زعفران تأثیر می‌گذارند. عواملی همچون گونه‌های واکنشی اکسیژن و نیتروژن، رادیکال‌های آزاد، ازن و اشعه ماوراء بنفش از اجزای تشکیل دهنده پلاسمای سرد می‌باشند [۸۹].

جدول ۳-۴: مقادیر ترکیبات شیمیایی اصلی زعفران در دو نمونه شاهد و پردازش شده

متابولیت نمونه	پیکروکروسین (mg/Kg)	سافرانال (mg/Kg)	کروسین (mg/Kg)
شاهد	۸۵/۱۲	۴۳/۶۰	۱۹۳/۷۰
پردازش شده	۹۵/۶۲	۴۷/۴۹	۱۸۹/۳۷

در پژوهشی گزارش شده است که پس از پردازش پلاسمای سرد، کروسین در نمونه‌های زعفران کاهش یافته است، همچنین اعلام کردند که افزودن ۵ و ۱۰ درصد اکسیژن به پلاسما جت آرگون بر میزان کروسین زعفران تأثیرگذار بوده است. داده‌ها حاکی از آن بودند که ترکیب گازی حاوی بیش‌ترین میزان اکسیژن سبب کاهش بیش‌تر کروسین می‌گردد. علت کاهش کروسین، تخریب پیوندهای گلیکوزید کروسین توسط رادیکال‌های آزاد تولید شده، بیان گشته است [۹۰]. همچنین استفاده از دستگاه پلاسمای اکسیژن RF در پژوهشی باعث کاهش میزان کروسین زعفران گردید، اگر چه بین نمونه‌های تحت پردازش و شاهد تفاوت معناداری مشاهده نشد [۸۳].

در بررسی گاز ازن جهت میکروبی‌زدایی زعفران، گزارش شده است که گاز ازن میزان کروسین را ۱۴.۹ درصد کاهش داده است [۹۱]. احتمالاً ازن موجود در پلاسما می‌تواند در کاهش کروسین نقش داشته باشد. البته میزان کاهش کروسین در این پژوهش کم بوده است (۲/۲ درصد)، که دلیل آن نیز می‌تواند مربوط به حضور ازن کمتر در پلاسما نسبت به ازن خالص باشد.

سازمان بین‌المللی استاندارد، کیفیت زعفران را بر اساس حداقل مقادیر این ترکیبات، در چهار دسته طبقه‌بندی نموده است. با توجه به نتایج سنجش‌های شیمیایی و مطابقت با استاندارد ISO/TS 3632-2، که در جدول ۴-۴ نشان داده شده است [۹۲]، کیفیت نمونه‌ها را می‌توان به زعفران درجه یک تقسیم‌بندی کرد. اگر چه میزان کروستین در معرض پلاسما کاهش یافت ولی از حد استاندارد آن (درجه ۱) خارج نشد.

جدول ۴-۴: دسته‌بندی زعفران بر اساس مقادیر ترکیبات شیمیایی اصلی [۹۲]

Characteristic	Requirement		Test method
	Saffron in filaments	Saffron in powder form	
Bitterness, expressed as direct reading of the absorbance of picrocrocin at about 257 nm, on dry basis, min.			ISO 3632-2, clause 13
Category I	70	70	
Category II	55	55	
Category III	40	40	
Category IV	30	30	
Safranal, expressed as direct reading of the absorbance at about 330 nm, on dry categories min.	20	20	ISO 3632-2, clause 13
max.	50	50	
Coloring strength, expressed as direct reading of the absorbance of crocin at about 440 nm, on dry basis, min.			ISO 3632-2, clause 13
Category I	190	190	
Category II	150	150	
Category III	110	110	
Category IV	80	80	

سافرانال ماده اصلی فرار زعفران است و متعلق به گروه‌های مونوترپن آلدهید می‌باشد. این ماده در رشته‌های تازه زعفران وجود ندارد و در حین خشک شدن از پیکروکروسیین تولید می‌شود [۳]. نتایج نشان دادند که در اثر تابش پلاسما این دو ماده اصلی زعفران که تأثیر مهمی در کیفیت آن دارند، نه تنها کاهش نیافتند بلکه روند افزایشی داشتند و موجب مرغوب‌تر شدن زعفران شده‌اند. پیکروکروسیین گلیکوزیدی از سافرانال است، که از انتهای خارجی زیگزانتین^۱ به وجود می‌آید. زیگزانتین رنگدانه محلول در چربی است. افزایش این دو مشخصه اصلی زعفران محصول تخریب کاروتنوئید زیگزانتین است [۹۳].

¹ Zeaxanthene

فصل پنجم

نتیجه‌گیری و پیشنهادات برای پژوهش‌های آینده

۵-۱ نتیجه گیری

زعفران گران ترین ادویه جهان است که علاوه بر مصارفی همچون افزودنی رنگ و طعم دهنده به غذا در داروسازی و صنعت نساجی نیز کاربرد دارد. زعفران همانند دیگر محصولات کشاورزی در مراحل برداشت، پس از برداشت، حمل و نقل و نگهداری نیز دچار آلودگی می شود. با توجه به اهمیت صادرات زعفران در قالب محصولات غیرنفتی، پاکسازی آن از هر گونه آلودگی بسیار مهم است. با توجه به اینکه تولید زعفران در ایران حدود ۹۰ درصد تولید کل جهان می باشد، اما متأسفانه به دلیل کم توجهی به بخش فرآوری و بسته بندی این محصول و عرضه آن به صورت فله ای سبب شده است که زعفران ایرانی در بازار جهانی جایگاه مناسبی نداشته باشد. از این رو استفاده از روشی کارآمد که بتواند با کم ترین هزینه و بدون آسیب به کیفیت محصول آن را از هر گونه آلودگی پاک سازد، باعث رشد کشور در صادرات جهانی می شود.

در این پژوهش رشته های زعفران در زمان های ۱، ۲، ۵ و ۱۰ دقیقه در معرض تابش پلاسما تخلیه سد دی الکتریک با ولتاژ کاری ۳/۲ kV قرار گرفت. شمارش قارچ *Aspergillus niger* تلقیح شده بر روی رشته های زعفران نشان داد، نمونه هایی که ۲ دقیقه و یا بیش تر تحت پردازش پلاسما قرار گرفتند، به طور کامل استریل شدند و هیچ گونه قارچی بر روی نمونه ها رشد نکرد. پلاسما همچنین توانست پس از ۱ دقیقه پردازش با تغییر در ساختار قارچ، از رشد و تکثیر اسپورها جلوگیری نماید. از این رو مناسب ترین زمان جهت نابودی کامل میکروارگانیسم زعفران ۲ دقیقه گزارش شد. پلاسما با تولید طیف گسترده ای از گونه های اکسیژن و نیتروژن واکنش پذیر، اشعه ماوراء بنفش و ذرات باردار می تواند باعث نابودی میکروارگانیسم ها شود. آنالیز طیف سنجی گسیل اپتیکی نیز نشان دهنده تولید N_2 ، N_2^+ و O می باشد. گونه های اکسیژن و نیتروژن فعال از طریق اکسیداسیون غشاء، دیواره سلولی و همچنین آسیب به DNA قارچ باعث نابودی آن شده اند. بررسی ساختار سطحی زعفران توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی حاکی از آن است که رشته های زعفران پس از پردازش

پلاسمایی آسیبی ندیده‌اند. از این‌رو می‌توان بیان کرد که بمباران یونی رشته‌های زعفران بسیار ضعیف بوده است و نتوانسته دیواره سلولی رشته‌ها را نابود کند. همچنین اشعه فرابنفش تولید شده نیز به قدری نبوده که بتواند به رشته‌های زعفران آسیب بزند. در نتیجه می‌توان بیان کرد که تعامل پلاسما در این روش از لحاظ واکنش‌های شیمیایی بیشتر از برخورد فیزیکی بوده است، همچنین می‌توان بیان نمود که پلاسما فقط روی سطح زعفران تأثیر گذاشته است، و احتمال ایجاد واکنش‌های شیمیایی در عمق آن کم است.

اندازه‌گیری شاخص‌های رنگی زعفران نشان می‌دهد که پس از تابش پلاسما شاخص‌های a^* و b^* کاهش یافتند و شاخص L^* افزایش یافت. بنابراین قرار گرفتن پودر زعفران در معرض پلاسمای هوا، سبب از دست دادن رنگ قرمز، کاهش زردی و افزایش روشنایی آن گردید. البته با توجه به مقدار ΔE (تغییرات کل رنگ) تغییرات با چشم غیر مسلح قابل رویت نمی‌باشد.

اندازه‌گیری میزان آنتی‌اکسیدان زعفران با روش ارزیابی مهار رادیکال DPPH انجام پذیرفت. نتایج نشان دادند که این خاصیت ارزشمند زعفران در اثر پردازش پلاسمایی تغییر معناداری نداشته است. اندازه‌گیری ترکیبات متابولیت زعفران با روشی مطابق بر استاندارد جهانی نشان داد که تنها مقدار کروسین (عامل رنگ) کاهش یافته است، مقادیر پیکروکروسین (عامل طعم تلخ زعفران) و سافرانال (عامل عطر) افزایش یافتند. با این حال کیفیت نمونه پردازش شده مطابق با استانداردهای بین‌المللی، به عنوان زعفران درجه یک دسته‌بندی می‌شود.

با توجه به نتایج این مطالعه، قارچ اسپرژیلوس نایجر با استفاده از پلاسمای تخلیه سد دی‌الکتریک، بدون آسیب رساندن به ظاهر یا کیفیت رشته‌های زعفران، می‌تواند در بسته‌بندی از بین برود. این باعث می‌شود که محصول در آخرین مرحله تولید و فرآوری استریل شود و بلافاصله بدون هیچ گونه آلودگی به دست مصرف کننده برسد. این روش پردازش زعفران می‌تواند روشی کارآمد و اقتصادی باشد.

۵-۲ پیشنهادات برای پژوهش‌های آینده

در پردازش رشته‌های زعفران به کمک پلاسمای سرد عوامل مختلفی تأثیرگذار است، که در زیر به چند مورد اشاره شده است.

- بررسی اثر گازهای مختلف بر خواص فیزیکی، شیمیایی و ضد میکروبی زعفران

- بررسی اثر جنس دی‌الکتریک در غیر فعال‌سازی میکروارگاناسم‌های زعفران

- بررسی اثر دستگاه‌های پلاسمایی دیگر بر زعفران

- بررسی اثر پلاسمای سرد بر دیگر میکروارگاناسم‌های زعفران

- [1] H. Hatami, S. M. Razavi, H. Eftekhar, and F. Majlesi, "Comprehensive book of public health," *Tehran Arjemand Publ.*, pp. 45–47, 2007.
- [2] J. P. Melnyk, S. Wang, and M. F. Marcone, "Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron," *Food Res. Int.*, vol. 43, no. 8, pp. 1981–1989, 2010.
- [3] T. Shahi, E. Assadpour, and S. M. Jafari, "Main chemical compounds and pharmacological activities of stigmas and tepals of 'red gold'; saffron," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 58, pp. 69–78, 2016.
- [4] M. Nassiri-Asl and H. Hosseinzadeh, "Neuropharmacology effects of saffron (*Crocus sativus*) and Its active constituents," in *Bioactive Nutraceuticals and Dietary Supplements in Neurological and Brain Disease*, Elsevier, 2015, pp. 29–39.
- [5] S. F. A. Aghdaie and J. Roshan, "Investigating Effective Factors on Iran's Saffron Exportation," *Int. Rev. Manag. Bus. Res.*, vol. 4, no. 2, p. 590, 2015.
- [6] M. Mashmoul, A. Azlan, H. Khaza'ai, B. N. M. Yusof, and S. M. Noor, "Saffron: a natural potent antioxidant as a promising anti-obesity drug," *Antioxidants*, vol. 2, no. 4, pp. 293–308, 2013.
- [7] S. M. Jafari, I. Bahrami, D. Dehnad, and S. A. Shahidi, "The influence of nanocellulose coating on saffron quality during storage," *Carbohydr. Polym.*, vol. 181, pp. 536–542, 2018.
- [8] B. L. Raina, S. G. Agarwal, A. K. Bhatia, and G. S. Gaur, "Changes in Pigments and Volatiles of Saffron (*Crocus sativus*L) During Processing and Storage," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 71, no. 1, pp. 27–32, 1996.

- [9] C. W. Hesseltine, O. L. Shotwell, J. J. Ellis, and R. D. Stubblefield, "Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*," *Bacteriol. Rev.*, vol. 30, no. 4, p. 795, 1966.
- [10] H. K. Manonmani, S. Anand, A. Chandrashekar, and E. R. Rati, "Detection of aflatoxigenic fungi in selected food commodities by PCR," *Process Biochem.*, vol. 40, no. 8, pp. 2859–2864, 2005.
- [11] M. L. Martins, H. M. Martins, and F. Bernardo, "Aflatoxins in spices marketed in Portugal," *Food Addit. Contam.*, vol. 18, no. 4, pp. 315–319, 2001.
- [12] R. Noorbakhsh, A. R. Bahrami, S. A. Mortazavi, B. Forghani, and M. Bahreini, "PCR-based identification of aflatoxigenic fungi associated with Iranian saffron," *Food Sci. Biotechnol.*, vol. 18, no. 4, pp. 1038–1041, 2009.
- [13] G. Echeverría and M. L. López, "Assessing juice quality: analysis of organoleptic properties of fruit juices," in *Juice Processing*, CRC Press, 2014,.
- [14] R. Afshari and H. Hosseini, "Non-thermal plasma as a new food preservation method, its present and future prospect," *J Paramed Sci*, vol. 5, pp. 2008–2078, 2014.
- [15] B. K. Tiwari, C. P. O'donnell, and P. J. Cullen, "Effect of non thermal processing technologies on the anthocyanin content of fruit juices," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 20, no. 3–4, pp. 137–145, 2009.
- [16] H. L. M. Lelieveld and H. Hoogland, "Continuous high-pressure processing to extend product shelf life," in *High Pressure Processing of Food*, Springer, 2016,.
- [17] D. Farr, "High pressure technology in the food industry," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 1, pp. 14–16, 1990.
- [18] M. E. A. Mohamed and A. H. A. Eissa, "Pulsed electric fields for food processing technology," *Struct. Funct. food Eng.*, vol. 11, pp. 275–306, 2012.
- [19] S. Ho and G. S. Mittal, "High voltage pulsed electrical field for liquid food pasteurization,"

- Food Rev. Int.*, vol. 16, no. 4, pp. 395–434, 2000.
- [20] G. E. Lester, G. J. Hallman, and J. A. Pérez, “ γ -Irradiation dose: effects on baby-leaf spinach ascorbic acid, carotenoids, folate, α -tocopherol, and phylloquinone concentrations,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 58, no. 8, pp. 4901–4906, 2010.
 - [21] M. Silindir and A. Y. Özer, “Sterilization methods and the comparison of e-beam sterilization with gamma radiation sterilization,” *Fabad J. Pharm. Sci.*, vol. 34, no. 1, p. 43–53, 2009.
 - [22] U. Kogelschatz, “Dielectric-barrier discharges: their history, discharge physics, and industrial applications,” *Plasma Chem. plasma Process.*, vol. 23, no. 1, pp. 1–46, 2003.
 - [23] A. Brodowska, K. Śmigielski, and A. Nowak, “Comparison of methods of herbs and spices decontamination,” *Chemik*, vol. 68, no. 2, pp. 97–102, 2014.
 - [24] A. Chmielewski and W. Migdał, “Radiation decontamination of herbs and spices,” *Nukleonika*, vol. 50, no. 4, pp. 179–184, 2005.
 - [25] O. Schlüter, J. Ehlbeck, C. Hertel, M. Habermeyer, A. Roth, K-H Engel, T. Holzhauser, D. Knorr and G. Eisenbrand “Opinion on the use of plasma processes for treatment of foods,” *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 57, no. 5, pp. 920–927, 2013.
 - [26] X. Liao , D.Liu, Q. Xiang, J. Ahn, S Chen, X. Ye, T.Ding, “Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: A review,” *Food Control*, vol. 75. Elsevier Ltd, pp. 83–91, 01-May-2017.
 - [27] S.K. Pankaja , C. Bueno-Ferrera , N.N. Misraa , V. Milosavljevic, C.P. O'Donnellb , P. Bourkea , K.M. Keenera,c and P.J. Cullena, * “Applications of cold plasma technology in food packaging,” *Trends in Food Science and Technology*, vol. 35, no. 1. pp. 5–17, Jan-2014.
 - [28] F. F. Chen, *Introduction to plasma physics and controlled fusion*, vol. 1. Springer, 1984.

- [29] N. S. J. Braithwaite, "Introduction to gas discharges," *Plasma sources Sci. Technol.*, vol. 9, no. 4, p. 517-527, 2000.
- [30] A. A. Kruithof, "Townsend's ionization coefficients for neon, argon, krypton and xenon," *Physica*, vol. 7, no. 6, pp. 519–540, 1940.
- [31] M. A. Lieberman and A. J. Lichtenberg, *Principles of plasma discharges and materials processing*. John Wiley & Sons, 2005.
- [32] J. R. Roth, *Industrial plasma engineering: Volume 2: Applications to nonthermal plasma processing*, vol. 2. CRC press, 2001.
- [33] M. Moreau, N. Orange, and M. G. J. Feuilleux, "Non-thermal plasma technologies: new tools for bio-decontamination," *Biotechnol. Adv.*, vol. 26, no. 6, pp. 610–617, 2008.
- [34] X. Liao , D.Liu, Q. Xiang, J. Ahn, S Chen, X. Ye, T.Ding "Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: A review," *Food Control*, vol. 75, pp. 83–91, 2017.
- [35] K. H. Becker, U. Kogelschatz, K. H. Schoenbach, and R. J. Barker, *Non-equilibrium air plasmas at atmospheric pressure*. CRC press, 2004.
- [36] R. Thirumdas, C. Sarangapani, and U. S. Annapure, "Cold plasma: a novel non-thermal technology for food processing," *Food Biophys.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–11, 2015.
- [37] V. Scholtz, J. Pazlarova, H. Souskova, J. Khun, and J. Julak, "Nonthermal plasma—A tool for decontamination and disinfection," *Biotechnol. Adv.*, vol. 33, no. 6, pp. 1108–1119, 2015.
- [38] Y. Zhu, "Influence of corona discharge on hydrophobicity of silicone rubber used for outdoor insulation," *Polym. Test.*, vol. 74, pp. 14–20, 2019.
- [39] J. R. Roth, "Industrial plasma engineering, Volume 1, Principles, 1995." Institute of Physics Publishing, Bristol).
- [40] Y. A. Lebedev, "Microwave discharges at low pressures and peculiarities of the processes

- in strongly non-uniform plasma,” *Plasma Sources Sci. Technol.*, vol. 24, no. 5, p. 53001, 2015.
- [41] A. Fridman and L. A. Kennedy, *Plasma Physics and Engineering*. Taylor & Francis, 2004.
 - [42] S. H. SHABANI and M. ZOJAJI, “ASSESSMENT OF CONTAMINATED SPICES EMPLOYED IN FOOD PREPARATION CONCERNED WITH THE HEAT RESISTANT SPORES,” *JOURNAL OF FOOD TECHNOLOGY AND NUTRITION* , Vol. 8 , no. 4 (32); pp. 83 -89, 2011.
 - [43] I. V. Kuznetsova, N. Y. Kalashnikov, A. F. Gutsol, A. A. Fridman, and L. A. Kennedy, “Effect of ‘overshooting’ in the transitional regimes of the low-current gliding arc discharge,” *J. Appl. Phys.*, vol. 92, no. 8, pp. 4231–4237, 2002.
 - [44] J. Chauvin, F. Judée, M. Yousfi, P. Vicendo, and N. Merbahi, “Analysis of reactive oxygen and nitrogen species generated in three liquid media by low temperature helium plasma jet,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–15, 2017.
 - [45] D. P. Subedi, U. M. Joshi, and C. San Wong, “Dielectric barrier discharge (DBD) plasmas and their applications,” in *Plasma Science and Technology for Emerging Economies*, Springer, 2017, pp. 693–737.
 - [46] Y. Ma, G.-J. Zhang, X.-M. Shi, G.-M. Xu, and Y. Yang, “Chemical mechanisms of bacterial inactivation using dielectric barrier discharge plasma in atmospheric air,” *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 36, no. 4, pp. 1615–1620, 2008.
 - [47] L. Bárdos and H. Baránková, “Cold atmospheric plasma: Sources, processes, and applications,” *Thin Solid Films*, vol. 518, no. 23, pp. 6705–6713, 2010.
 - [48] A. Fernández and A. Thompson, “The inactivation of Salmonella by cold atmospheric plasma treatment,” *Food Res. Int.*, vol. 45, no. 2, pp. 678–684, 2012.
 - [49] M. M. Kayes, F. J. Critzer, K. Kelly-Wintenberg, J. R. Roth, T. C. Montie, and D. A. Golden, “Inactivation of foodborne pathogens using a one atmosphere uniform glow discharge

- plasma,” *Foodborne Pathog. Dis.*, vol. 4, no. 1, pp. 50–59, 2007.
- [50] A. Kumar, G. M. Ganjyal, D. D. Jones, and M. A. Hanna, “Digital image processing for measurement of residence time distribution in a laboratory extruder,” *J. Food Eng.*, vol. 75, no. 2, pp. 237–244, 2006.
- [51] F. Mendoza, P. Dejmek, and J. M. Aguilera, “Calibrated color measurements of agricultural foods using image analysis,” *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 41, no. 3, pp. 285–295, 2006.
- [52] J. Chanona-Pérez, R. Quevedo, A. R. Jiménez Aparicio, C. Gumeta Chávez, J. A. Mendoza Pérez, G. Calderón Domínguez, L. Alamilla-Beltrán, Gustavo F. Gutiérrez-López “Image processing methods and fractal analysis for quantitative evaluation of size, shape, structure and microstructure in food materials,” Springer, 2008.
- [53] Z. Machala, M. Janda, K. Hensel, I. Jedlovský, L. Leštinská, V. Foltin, V. Martišovits, M. Morvová “Emission spectroscopy of atmospheric pressure plasmas for bio-medical and environmental applications,” *J. Mol. Spectrosc.*, vol. 243, no. 2, pp. 194–201, Jun. 2007.
- [54] P. J. Goodhew and J. Humphreys, *Electron microscopy and analysis*. CRC Press, 2000.
- [55] M. Lage and C. L. Cantrell, “Quantification of saffron (*Crocus sativus* L.) metabolites crocins, picrocrocin and safranal for quality determination of the spice grown under different environmental Moroccan conditions,” *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, vol. 121, no. 3, pp. 366–373, 2009.
- [56] S. Tajik and V. Niknam, “Effects of salicylic acid on carotenoids and antioxidant activity of saffron (*Crocus sativus* L.),” *Appl. food Biotechnol.*, vol. 2, no. 4, pp. 33–37, 2015.
- [57] N. Georgescu, “High voltage pulsed, cold atmospheric plasma jets: electrical characterization,” *Rom. Reports Phys.*, vol. 60, no. 4, pp. 1025–1032, 2008.
- [58] A. Chirokov, A. Gutsol, and A. Fridman, “Atmospheric pressure plasma of dielectric barrier discharges,” *Pure Appl. Chem.*, vol. 77, no. 2, pp. 487–495, 2005.

- [59] V. Nehra, A. Kumar, and H. K. Dwivedi, "Atmospheric non-thermal plasma sources," *Int. J. Eng.*, vol. 2, no. 1, pp. 53–68, 2008.
- [60] H.-H. Ley, "Analytical methods in plasma diagnostic by optical emission spectroscopy: A tutorial review," *J. Sci. Technol.*, vol. 6, no. 1, 2014.
- [61] N. Konjević, A. Lesage, J. R. Fuhr, and W. L. Wiese, "Experimental Stark widths and shifts for spectral lines of neutral and ionized atoms (a critical review of selected data for the period 1989 through 2000)," *J. Phys. Chem. Ref. Data*, vol. 31, no. 3, pp. 819–927, 2002.
- [62] V. Niknam and H. Ebrahimzadeh, "Phenolics content in *Astragalus* species," *Pak. J. Bot.*, vol. 34, no. 3, pp. 283–289, 2002.
- [63] R. X. Wang *et al.*, "Atmospheric-pressure cold plasma treatment of contaminated fresh fruit and vegetable slices: inactivation and physiochemical properties evaluation," *Eur. Phys. J. D*, vol. 66, no. 10, p. 276, 2012.
- [64] B. Eliasson, M. Hirth, and U. Kogelschatz, "Ozone synthesis from oxygen in dielectric barrier discharges," *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 20, no. 11, p. 1421, 1987.
- [65] H.-S. Ahn, N. Hayashi, S. Ihara, and C. Yamabe, "Ozone generation characteristics by superimposed discharge in oxygen-fed ozonizer," *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 42, no. 10R, p. 6578-6593, 2003.
- [66] H. Lu, S. Patil, K. M. Keener, P. J. Cullen, and P. Bourke, "Bacterial inactivation by high-voltage atmospheric cold plasma: influence of process parameters and effects on cell leakage and DNA," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 116, no. 4, pp. 784–794, 2014.
- [67] D. Bermudez-Aguirre, "Advances in the inactivation of microorganisms and viruses in food and model systems using cold plasma," in *Advances in Cold Plasma Applications for Food Safety and Preservation*, Elsevier, 2020, pp. 49–91.
- [68] D. B. Graves, "The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology," *J. Phys. D. Appl.*

Phys., vol. 45, no. 26, p. 263001-263042, 2012.

- [69] M. P. Doyle and E. H. Marth, "Thermal Inactivation of Conidia From *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: I. Effects of moist heat, age of conidia, and sporulation medium," *J. Milk Food Technol.*, vol. 38, no. 11, pp. 678–682, 1975.
- [70] G. Fridman *et al.*, G. Fridman, A.D. Brooks, M. Balasubramanian, A. Fridman, A.Gutsol, V. N. Vasilets, H.Ayan, G. Friedman "Comparison of direct and indirect effects of non-thermal atmospheric-pressure plasma on bacteria," *Plasma Process. Polym.*, vol. 4, no. 4, pp. 370–375, 2007.
- [71] D. Dobrynin, G. Fridman, G. Friedman, and A. Fridman, "Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue," *New J. Phys.*, vol. 11, no. 11, pp. 115020-115046, 2009.
- [72] L. F. Gaunt, C. B. Beggs, and G. E. Georgiou, "Bactericidal action of the reactive species produced by gas-discharge nonthermal plasma at atmospheric pressure: a review," *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 34, no. 4, pp. 1257–1269, 2006.
- [73] P. Lukes, E. Dolezalova, I. Sisrova, and M. Clupek, "Aqueous-phase chemistry and bactericidal effects from an air discharge plasma in contact with water: evidence for the formation of peroxynitrite through a pseudo-second-order post-discharge reaction of H_2O_2 and HNO_2 ," *Plasma Sources Sci. Technol.*, vol. 23, no. 1, pp. 15019-15034, 2014.
- [74] L. Han, D. Boehm, E. Amias, V. Milosavljević, P. J. Cullen, and P. Bourke, "Atmospheric cold plasma interactions with modified atmosphere packaging inducer gases for safe food preservation," *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 38, pp. 384–392, 2016.
- [75] C. Hertwig, K. Reineke, J. Ehlbeck, D. Knorr, and O. Schlüter, "Decontamination of whole black pepper using different cold atmospheric pressure plasma applications," *Food Control*, vol. 55, pp. 221–229, 2015.
- [76] M. Y. Won, S. J. Lee, and S. C. Min, "Mandarin preservation by microwave-powered cold

- plasma treatment,” *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 39, pp. 25–32, 2017.
- [77] A. S. Kashfi, Y. Ramezan, and M. R. Khani, “Simultaneous study of the antioxidant activity, microbial decontamination and color of dried peppermint (*Mentha piperita* L.) using low pressure cold plasma,” *LWT*, vol. 123, pp. 109121, 2020.
 - [78] N. N. Misra, B. Yadav, M. S. Roopesh, and C. Jo, “Cold plasma for effective fungal and mycotoxin control in foods: mechanisms, inactivation effects, and applications,” *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 18, no. 1, pp. 106–120, 2019.
 - [79] M. Amini and M. Ghoranneviss, “Effects of cold plasma treatment on antioxidants activity, phenolic contents and shelf life of fresh and dried walnut (*Juglans regia* L.) cultivars during storage,” *LWT*, vol. 73, pp. 178–184, 2016.
 - [80] J. E. Kim, Y. J. Oh, M. Y. Won, K.-S. Lee, and S. C. Min, “Microbial decontamination of onion powder using microwave-powered cold plasma treatments,” *Food Microbiol.*, vol. 62, pp. 112–123, 2017.
 - [81] M. Moritz, C. Wiacek, M. Koethe, and P. G. Braun, “Atmospheric pressure plasma jet treatment of *Salmonella* Enteritidis inoculated eggshells,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 245, pp. 22–28, 2017.
 - [82] N. Hojnik, M. Modic, Y. Ni, G. Filipič, U. Cvelbar, and J. L. Walsh, “Effective fungal spore inactivation with an environmentally friendly approach based on atmospheric pressure air plasma,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 53, no. 4, pp. 1893–1904, 2019.
 - [83] S. I. Hosseini, N. Farrokhi, K. Shokri, M. R. Khani, and B. Shokri, “Cold low pressure O₂ plasma treatment of *Crocus sativus*: An efficient way to eliminate toxicogenic fungi with minor effect on molecular and cellular properties of saffron,” *Food Chem.*, vol. 257, no. March, pp. 310–315, 2018.
 - [84] S. K. Pankaj, Z. Wan, and K. M. Keener, “Effects of cold plasma on food quality: A review,” *Foods*, vol. 7, no. 1, pp. 1-21, 2018.

- [85] I. Ramazzina *et al.*, “Effect of cold plasma treatment on physico-chemical parameters and antioxidant activity of minimally processed kiwifruit,” *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 107, pp. 55–65, 2015.
- [86] M. Vukić, D. Vujadinović, M. Ivanović, V. Gojković, and R. Grujić, “Color change of orange and carrot juice blend treated by non-thermal atmospheric plasma,” *J. Food Process. Preserv.*, vol. 42, no. 2, pp. 13525-13532, 2018.
- [87] P. B. Pathare, U. L. Opara, and F. A.-J. Al-Said, “Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: a review,” *Food bioprocess Technol.*, vol. 6, no. 1, pp. 36–60, 2013.
- [88] I. O. for Standardization, “Iso 3632-2,” vol. 2010, 2011.
- [89] A. Mai-Prochnow, A. B. Murphy, K. M. McLean, M. G. Kong, and K. K. Ostrikov, “Atmospheric pressure plasmas: infection control and bacterial responses,” *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 43, no. 6, pp. 508–517, 2014.
- [90] M. Amini, M. Ghoranneviss, and S. Abdijadid, “Effect of cold plasma on crocin esters and volatile compounds of saffron,” *Food Chem.*, vol. 235, pp. 290–293, 2017.
- [91] M. Akbari, M. H. Haddad Khadaparast, and A. Hemati Kakhki, “Effects of ozone treatment on microflora of dried saffron and its living larvae,” in *III International Symposium on Saffron: Forthcoming Challenges in Cultivation, Research and Economics 850*, 2009, pp. 231–234.
- [92] F. Hadizadeh, M. Mahdavi, S.A. Emami, Z. Khashayarmanesh, M. Hassanzadeh, J. Asili, M. Seifi, H. Nassirli, A. Shariatimoghadam, R. Noorbakhsh “Evaluation of ISO method in saffron qualification,” in *II International Symposium on Saffron Biology and Technology 739*, 2006, pp. 405–410.
- [93] S. Frusciante, G. Diretto, M. Bruno, P. Ferrante, M. Pietrella, A. Prado-Cabrero, A. Rubio-Moraga, P. Beyer, L. Gomez-Gomez, S. Al-Babili, and G. Giuliano “Novel carotenoid cleavage dioxygenase catalyzes the first dedicated step in saffron crocin biosynthesis,” *Proc.*

Natl. Acad. Sci., vol. 111, no. 33, pp. 12246–12251, 2014.

- [94] E. G. Ayan, A. Asan, B. Şen, and S. Ökten, “Edirne ili Söğütlük Ormanı toprağından izole edilen *Aspergillus* türlerinin biyoçeşitliliğı,” *MANTAR DERGİSİ/The Journal of Fungus.*, vol. 9, no. 2, pp. 126-141,. 2018.

Abstract

Saffron is a product with high nutritional value and medicinal effects. Traditional methods are still used to harvest this product, which causes microbial contamination during collection and processing. *Aspergillus* is one of the most important microorganisms in saffron, which producing aflatoxin toxin, it can serious problem to the health of consumers. Therefore, the elimination methods of this product are of more importance. In this study, saffron stigma was decontamination with the cold plasma, which is a suitable technologies for heat sensitive products. The effect of cold plasma with a voltage of 3.2 KV and a duration of 2 minutes on the physico-chemical and microbial properties of saffron was investigated. The results of this investigation showed that a plasma treatment could be insignificant influence on the eradicate *A.niger* spores on saffron. Optical emission spectroscopy analysis showed the effect of active species of plasma on chemical and physical changes in saffron, plasma has been able to completely decontamination its microorganisms without harmful effects on the product. The influences of plasma treatment on surface morphology, antioxidant activity, primary chemical compounds, color, flavor, and odor of saffron were also investigated by FESEM imaging, DPPH assay, UV-Vis spectrophotometry, and colorimetry, respectively. In general, it can be said this method not only did not have destructive effects on saffron, but also increased some of its quality indicators. One of the potential advantages of this method is that plasma processing takes place in the last stage of saffron packaging. In this case, all contaminants in the product are removed during harvest, storage, transportation and packing by plasma treatment.

Keywords: Cold plasma, Sterilization of saffron in packing, Main metabolites, *Aspergillus niger*.



Shahrood University of Technology

Faculty of Physics and Nuclear Engineering

M.Sc. Thesis in Atomic and Molecular Physics

Studying the effects of cold plasma parameters on the physico-chemical and antibacterial properties of saffron

By:

Elaheh Ebrahimi

Supervisor:

Dr. Seyed Iman Hosseini

October 2020