



Evaluation of Protein Content in Saffron Plant (*Crocus sativus* L.) Waste, Including Petals and Corms.

Pedram Hassanvand¹, Ali Motamedi², Tayebe Bagheri Lotfabad^{3*}, Mahvash Khodabandeh Shahraky⁴, Atefeh Pirani⁵

¹ MSc., Department of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.

² MSc., Department of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.

^{3*} Associate professor, Department of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.

⁴ Associate professor., Department of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.

⁵ Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

*Corresponding author E-mail: bagheril@nigeb.ac.ir

Keywords	Abstract
Saffron plant (<i>Crocus sativus</i> L.) Agricultural wastes Protein content Petal Corm	Saffron (<i>Crocus sativus</i> L.) is a highly valued plant primarily cultivated for its stigmas, widely used for their coloring, flavoring, and aromatic properties. However, significant quantities of saffron wastes, such as petals and corms, are discarded, despite their potential for alternative applications. This study aims to evaluate the protein content and molecular weight of proteins in saffron waste, specifically petals and corms, collected from Sarayan city in South Khorasan province. The Kjeldahl method was employed to determine protein content, revealing that petals contain 8% protein and corms 3.8%. Additionally, SDS-PAGE analysis identified proteins in the petal precipitate with approximate molecular weights of 10, 25, and 72 kDa. No soluble protein was detected in the supernatant, and only faint bands were observed in corm samples. The findings suggest that saffron petals, due to their relatively high protein content, could serve as a potential protein supplement in livestock and poultry diets. Furthermore, this research highlights the need for further investigation into protein extraction methods from saffron petals for potential biotechnological applications, aiming to create added value from saffron waste.



ارزیابی محتوای پروتئین در ضایعات گیاه زعفران (*Crocus sativus* L.) شامل گلبرگ و بنه

پدرام حسنونند^۱، علی معتمدی^۲، طیبه باقری لطف آباد^{۳*}، مهوش خدابنده شهرکی^۴، عاطفه پیرانی^۵

۱- کارشناسی ارشد، پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری.

۲- کارشناسی ارشد، پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری.

۳- دانشیار، پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری.

۴- دانشیار، پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری.

۵- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد.

*نویسنده مسئول: Email: bagheril@nigeb.ac.ir

چکیده

زعفران (*Crocus sativus* L.) گیاهی ارزشمند است که به طور عمده برای کلاله‌های آن کشت می‌شود و به دلیل ویژگی‌های رنگ‌دهی، طعم‌دهی و عطردهی کاربردهای گسترده‌ای دارد. با این حال، مقادیر زیادی از ضایعات گیاه زعفران مانند گلبرگ‌ها و بنه‌ها دور ریخته می‌شوند، که می‌توانند به عنوان منبعی برای استفاده‌های جایگزین مورد بررسی قرار گیرند. هدف از این مطالعه، ارزیابی محتوای پروتئینی و وزن مولکولی پروتئین‌های موجود در ضایعات گلبرگ و بنه زعفران جمع‌آوری شده از شهرستان سرایان در استان خراسان جنوبی است. برای اندازه‌گیری درصد پروتئین، از روش کج‌لدال استفاده شد که نتایج نشان داد میزان پروتئین در گلبرگ‌ها ۸ درصد و در بنه‌ها ۳٫۸ درصد است. همچنین، با استفاده از روش SDS-PAGE، پروتئین‌های موجود در رسوب گلبرگ با وزن‌های مولکولی تقریبی ۱۰، ۲۵ و ۷۲ کیلودالتون شناسایی شدند. هیچ پروتئین محلولی در سوپ رویی مشاهده نشد و تنها باندهای ضعیفی در نمونه‌های بنه دیده شد. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که گلبرگ‌های زعفران به دلیل محتوای پروتئینی نسبتاً بالا از پتانسیل بکارگیری به عنوان مکمل پروتئینی در جیره غذایی دام و طیور برخوردارند. همچنین، نتایج این تحقیق مطالعات در زمینه روش‌های استخراج پروتئین از گلبرگ‌های گیاه زعفران جهت کاربرد در حوزه زیست فناوری به منظور ایجاد ارزش افزوده از پسماندها را پیشنهاد می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: گیاه زعفران (*Crocus sativus* L.)، ضایعات کشاورزی، محتوای پروتئینی، گلبرگ، بنه.

مقدمه

گیاه زعفران، گیاه ارزشمندی است که بخش کلاله آن به لحاظ رنگ، طعم و عطر مصارف بسیار متعددی دارد. راندمان تولید این گیاه بطور متوسط حدود ۴/۷ کیلو گرم به ازای هر هکتار سطح زیر کشت این گیاه است. مقدار زیادی از محصولات جانبی زعفران با ارزش تجاری کم یا بدون ارزش تجاری در طی فرآوری کلاله‌ها هدر می‌رود (Jadouali et al., 2021). برای تولید یک کیلوگرم زعفران، بیش از ۱۶۰ هزار گل *Crocus sativus* مورد نیاز است (Fahim et al., 2012). برای به دست آوردن تنها ۱ کیلوگرم زعفران یا به اصطلاح "طلای قرمز"، حدود ۳۵۰ کیلوگرم گلبرگ، ۱۵۰۰ کیلوگرم برگ و صدها بنه که به دلیل اندازه کم آنها قابل کشت مجدد یا تجاری سازی نیستند، تولید می‌شوند (Jadouali et al., 2021; Mykhailenko et al., 2021). گزارش دیگری نشان می‌دهد که میزان تولید گلبرگ گیاه زعفران در کشور بیش از ۱۰،۰۰۰ تن در سال است (Fahim et al., 2012). این موضوع باعث می‌شود که محصول از نظر بیومس (زیست توده) سود بسیار کمی داشته باشد، بنابراین، جستجوی کاربردهای جدید از محصولات جانبی این گیاه، مدیریت پایدارتر تولید محصول زعفران را مطلوب می‌نماید (Jadouali et al., 2021). یکی از پیشنهادات برای بکارگیری این ضایعات، استفاده از آن‌ها در خوراک حیوانات می‌باشد (Fahim et al., 2012).

(Jadouali et al., 2021). از اینرو، بررسی محتوای تغذیه‌ای این ضایعات اهمیت پیدا می‌کند. پیش‌تر از این، حضور پروتئین به میزان حدود ۱۰ درصد یا کمتر در گلبرگ‌های گیاه زعفران (Fahim et al., 2012; Hosseini et al., 2018; Jadouali et al., 2021; Moshfegh et al., 2022) و حدود ۸ درصد در بنه گیاه زعفران (Einafshar & Sharayi, 1397) گزارش شده است. در تحقیق حاضر، محتوای پروتئینی موجود در ضایعات گلبرگ و بنه گیاه زعفران جمع‌آوری شده از شهرستان سرایان در استان خراسان جنوبی به لحاظ میزان و وزن ملکولی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه‌ها:

نمونه‌ها در نیمه آبان‌ماه ۱۴۰۲، به صورت تصادفی از زمین‌های مختلف زعفران در شهرستان سرایان در استان خراسان جنوبی جمع‌آوری و در محوطه و شرایط محیطی مزارع زعفران خشک شدند. به منظور آماده‌سازی نمونه‌ها، ابتدا پوست خارجی بنه‌های خشک شده گیاه زعفران جدا شدند (شکل ۱. الف و ب). میانگین وزن ۱۰ عدد بنه بدون پوست ۱۰ گرم و میانگین سایز آنها ۲ سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. در ادامه بنه‌های بدون پوست با استفاده از آسیاب برقی، به صورت پودر تبدیل و به ظرف مناسبی منتقل شدند (شکل ۱. ج). پودر حاصله تا زمان سنجش‌های بعدی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.



شکل ۱. مراحل آماده‌سازی بنه گیاه زعفران. (الف) بنه‌های خشک شده، (ب) بنه‌های خشک بدون پوست، (ج) پودر حاصل از بنه‌های آسیاب شده.

Fig. 1. Preparation of Saffron Plant Corms: (a) Dried corms, (b) Peeled and dried corms, (c) Powder obtained from ground corms.

همچنین، گلبرگ‌های خشک شده گیاه زعفران، با استفاده از آسیاب برقی به صورت پودر تبدیل (شکل ۲. الف) و به ظرف مناسبی منتقل شدند (شکل ۲. ب). پودر حاصله در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان سنجش‌های بعدی نگهداری شد.





شکل ۲. مراحل آماده سازی گلبرگ گیاه زعفران. (الف) گلبرگ های خشک شده، (ب) پودر حاصل از گلبرگ های آسیاب شده.

Fig. 2. Preparation of Saffron Plant Petals: (a) Dried petals, (b) Powder derived from ground petals.

اندازه گیری درصد پروتئین با روش کجلدال

به منظور تعیین درصد پروتئین با روش کجلدال، از روش هضم در بسته (closed reflux) به همراه تقطیر و تیتراسیون طبق روش استاندارد AOAC به شماره ۲۰۰۱،۱۱ استفاده شد (AOAC, 2001). به منظور سنجش درصد نیتروژن کل با استفاده از این روش، ۱ تا ۲ گرم از پودر ماده خشک مورد آزمایش به همراه ۲۰ میلی لیتر سولفوریک اسید غلیظ و ۲ گرم کاتالیست که شامل سولفات پتاسیم، سولفات مس و دی اکسید سلنیم است، هضم گردید. در ادامه، مخلوطی از ۱۰ میلی لیتر از مایع هضم شده به همراه ۵۰ میلی لیتر هیدروکسید سدیم (۴۰ درصد) و ۵۰ میلی لیتر آب مقطر، تقطیر شد. محلول جمع آوری شده حاصل از تقطیر هیدروکلریک اسید ۰،۱ نرمال تیترو گردید. در انتها، درصد نیتروژن کل با استفاده از معادله شماره ۱، محاسبه شد.

$$N (\%) = \frac{N_1 \times V_s \times F_1 \times MW_n}{W_s \times 10} \times F_2$$

در این معادله N_1 و V_s به ترتیب میزان نرمالیه و حجم هیدروکلریک اسید (بر حسب میلی لیتر) مورد استفاده برای تیتراسیون است. F_1 فاکتور اسید مورد استفاده می باشد که برای هیدروکلریک اسید ۱ است. MW_n وزن مولکولی نیتروژن که ۱۴،۰۰۷ است. W_s وزن نمونه اولیه بر حسب گرم می باشد. F_2 ضریب رقت نمونه هضم شده است. مقادیر پروتئین از مقادیر کل نیتروژن با استفاده از فاکتورهای تبدیل محاسبه می شود (Southgate, 2003). در این تحقیق، به منظور محاسبه درصد پروتئین، مقدار درصد نیتروژن کل هر نمونه در عدد ۶،۲۵ ضرب گردید (AOAC, 2001).

محاسبه وزن مولکولی پروتئین به روش SDS-PAGE

برای جداسازی پروتئین های موجود در پودر گلبرگ و بنه گیاه زعفران، از روش SDS-PAGE (الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید با سدیم دودسیل سولفات) استفاده شد. این تکنیک یکی از روش های رایج در جداسازی و تحلیل پروتئین ها بر اساس وزن مولکولی آنها است (Gallagher, 2012).

در این روش ابتدا، ۲۰ میلی گرم از نمونه های پودر گلبرگ و بنه زعفران به طور جداگانه در ۱۰ میلی لیتر آب حل شدند. این سوپانسیون ها در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه به مدت ۱۸ ساعت مخلوط شدند. سپس، به منظور جداسازی فاز مایع و رسوب، نمونه ها سانتریفیوژ (۱۰،۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۵ دقیقه) شدند. به رسوب هر نمونه، به میزان هم حجم با آن، بافر نمونه اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار گرفت. پس از سرد شدن، این نمونه ها در چاهک های ژل پلی اکریل آمید بارگذاری شدند.

همچنین، بخش مایع رویی (سوپرناتانت) نمونه های گلبرگ و بنه، هر کدام به دو بخش تقسیم شدند. به بخش اول، حجم مساوی از بافر نمونه اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار گرفت. پس از سرد شدن، نمونه ها در چاهک های ژل بارگذاری شدند. به بخش دوم از سوپرناتانت، تری کلرواستیک اسید (TCA) تا رسیدن به غلظت نهایی ۱۲٪ اضافه شد تا پروتئین های محلول موجود در نمونه راسب شوند. پس از سانتریفیوژ با سرعت ۱۰،۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه، رسوب جدا شد و به میزان هم حجم با آن، بافر نمونه به رسوب اضافه شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار گرفت و پس از سرد شدن، نمونه ها در چاهک های ژل بارگذاری شدند. در نهایت، برای شناسایی باندهای پروتئین ها، ژل با استفاده از رنگ کوماسی رنگ آمیزی شد تا باندهای پروتئینی قابل مشاهده شوند.

نتایج و بحث

درصد پروتئین موجود در ضایعات گیاه زعفران

مقدار پروتئین موجود در گلبرگ و بنه گیاه زعفران به ترتیب ۸ و ۳.۸ درصد محاسبه شد، که این مقادیر به نتایج گزارشاتی که پیش‌تر از این در تحقیقات فهیم و همکارانش (Fahim et al., 2012) و نیز جادوعلی و همکارانش (Jadouali et al., 2021) آورده شده است، بسیار نزدیک است.

میزان پروتئین موجود در خوراک دام علاوه بر نقش آن در تامین آمینواسیدهای ضروری حیوانات در ویژگی‌های حسی (organoleptic properties) خوراک مصرفی از طرف حیوانات نیز تاثیرگذار است (Fahim et al., 2012).

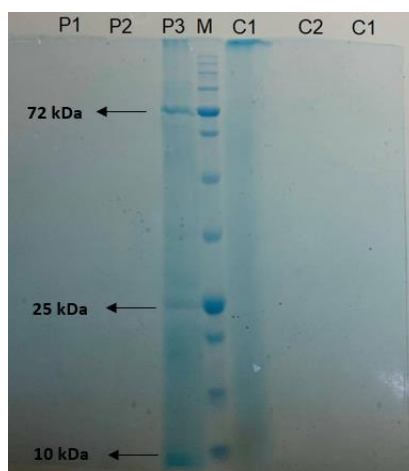
از طرفی در گزارش منتشر شده توسط موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران در خصوص بررسی ویژگی‌های گیاه ذرت به عنوان یکی از خوراک رایج حیوانات، درصد پروتئین موجود در گیاه ذرت ۸ درصد بیان شده است که نشان دهنده مناسب بودن درصد پروتئین موجود در گلبرگ گیاه زعفران و کم بودن درصد پروتئین بنه آن گیاه به عنوان بخشی از غذای حیوانات است (ISIRI, 1996).

وزن مولکولی پروتئین‌های موجود در ضایعات گیاه زعفران

در این مطالعه، به منظور بررسی پروتئین‌های موجود در گلبرگ و بنه گیاه زعفران، از روش SDS-PAGE استفاده شد. نتایج حاصل نشان داد که وزن مولکولی پروتئین‌های موجود در رسوب نمونه‌های گلبرگ زعفران در سه محدوده ۱۰، ۲۵ و ۷۲ کیلودالتون تخمین زده شد (شکل ۳). این یافته‌ها نشان می‌دهد که پروتئین‌های موجود در گلبرگ زعفران بیشتر به صورت رسوبی تجمع یافته و به لحاظ وزن مولکولی و ساختار شیمیایی متنوع هستند، ولی در فاز محلول (سوپ رویی) حضور قابل توجهی ندارند. عدم مشاهده باندهای مشخص در سوپ رویی نمونه‌ها بیانگر عدم وجود پروتئین محلول در این بخش است. همچنین در مطالعه‌ای که پاردی و همکاران انجام دادند، باند پروتئینی با وزن مولکولی حدود ۷۵ کیلودالتون در گلبرگ‌های گونه *Crocus sativus* L. مشاهده گردید (Paredi et al., 2016).

مشاهدات ژل مربوط به نمونه‌های بنه گیاه زعفران نشان داد که هیچ پروتئین محلولی در سوپ رویی این نمونه‌ها مشاهده نشد و تنها مقدار بسیار کمی پروتئین در رسوب بنه قابل شناسایی بود که به صورت یک اسمیر کم‌رنگ در ژل مشاهده شد (شکل ۳).

نتایج به دست آمده حاکی از آن است که پروتئین‌های موجود در بنه و گلبرگ گیاه زعفران تمایل بیشتری به تشکیل رسوب دارند تا حضور در فاز محلول. این مسئله می‌تواند ناشی از ساختار پروتئین‌ها و ترکیبات مرتبط با آن‌ها باشد که موجب کاهش حلالیت در آب و تجمع آن‌ها به صورت رسوب می‌شود. عدم مشاهده پروتئین‌های محلول در سوپ رویی، به‌ویژه در گلبرگ‌ها، می‌تواند ناشی از حضور عوامل محیطی و ترکیبات دخیل در فرایند استخراج باشد که باعث تغییر حلالیت پروتئین‌ها شده است.



شکل ۳. محتوای پروتئینی موجود در گلبرگ و بنه گیاه زعفران بعد از مخلوط شدن نمونه‌ها با آب مقطر به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه. (P1) رسوب پروتئین‌های سوپ رویی مخلوط گلبرگ توسط TCA، (P2) سوپ رویی مخلوط گلبرگ، (P3) رسوب مخلوط گلبرگ، (M) مارکر پروتئینی، (C1) رسوب مخلوط بنه، (C2) سوپ رویی مخلوط بنه، (C3) رسوب پروتئین‌های سوپ رویی مخلوط بنه توسط TCA.



Fig. 3. Protein content in the petals and corms of the saffron plant was analyzed after incubating the samples in distilled water for 18 hours at 30°C with agitation at 180 rpm. (P1) Protein precipitate from the supernatant of the petal mixture using TCA, (P2) Supernatant of the petal mixture, (P3) Precipitate of the petal mixture, (M) Protein marker, (C1) Precipitate of the corm mixture, (C2) Supernatant of the corm mixture, (C3) Protein precipitate from the supernatant of the corm mixture using TCA.

همانطور که نتایج اندازه‌گیری پروتئین کج‌دال و SDS-PAGE نشان می‌دهند، میزان و نوع پروتئین‌های موجود در گلبرگ و بنه گیاه زعفران مربوط به تفاوت در ساختار و ترکیبات بخش‌های مختلف گیاه است. این نتایج، همچنین می‌توانند پایه‌ای برای بررسی‌های بیشتر در مورد ساختار پروتئین‌ها و تغییرات احتمالی آن‌ها تحت شرایط مختلف محیطی و فیزیولوژیکی باشند. از سوی دیگر، مطالعه روش‌های مختلف استخراج و حلالیت پروتئین‌ها میان بخش‌های مختلف گیاه زعفران می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در زمینه بهینه‌سازی روش‌های استخراج پروتئین و کاربردهای زیست فناوری آن‌ها ارائه دهد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که مقدار پروتئین موجود در گلبرگ گیاه زعفران از پتانسیل بکارگیری به‌عنوان مکمل پروتئینی در جیره غذایی دام و طیور برخوردار است و با توجه به حجم بالای تولید و دورریز بودن آن می‌تواند گزینه مناسبی برای استفاده در صنایع پرورش دام و طیور باشد. همچنین از طرفی پروتئین‌های موجود در گلبرگ و بنه گیاه زعفران عمدتاً به‌صورت رسوبی تجمع یافته و در فاز محلول حضور ندارند، که این امر ممکن است به روش استخراج، ساختار و ویژگی‌های شیمیایی آن‌ها مرتبط باشد.

منابع

- AOAC. (2001). AOAC Official method 2001.11, Protein (crude) in animal feed, Forage (plant tissue), Grain, and oilseeds. Block digestion method using copper catalyst and steam distillation into boric acid. Association of Official Analytical Chemists. http://www.aoacofficialmethod.org/index.php?main_page=product_info&cPath=1&product_s_id=672
- Einafshar, S., & Sharayi, P. (1397). Production of Antioxidant Extract, Starch, and Edible Film from Saffron Corm Waste. Promotional Magazine on Saffron and Medicinal Plants, 1(2), 20–26. [In Persian]
- Fahim, N. K., Sadat, S., Janati, F., & Feizy, J. (2012). Chemical composition of agriproduct saffron (crocus sativus L.) petals and its considerations as animal feed. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:59067427>
- Gallagher, S. R. (2012). SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). Current Protocols Essential Laboratory Techniques, 6(1). <https://doi.org/10.1002/9780470089941.et0703s06>
- Hosseini, A., Razavi, B. M., & Hosseinzadeh, H. (2018). Saffron (Crocus sativus) petal as a new pharmacological target: A review. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, Online First. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2018.31243.7529>
- ISIRI. (1996). ISIRI No. 1445, Maize Seen For Animal Feed (Rev), Second Revision (4th ed.). Institute of Standards and Industrial Research of Iran. http://www.aoacofficialmethod.org/index.php?main_page=product_info&cPath=1&product_s_id=672
- Jadouali, S. M., Atifi, H., Mamouni, R., Majourhat, K., Bouzoubaa, Z., & Gharby, S. (2021). Composition of Saffron By-products (Crocus sativus) in Relation to Utilization as Animal Feed. Agricultural Science Digest - A Research Journal, Of. <https://doi.org/10.18805/ag.D-360>
- Moshfegh, F., Zafar Balanejad, S., Shahrokhaby, K., & Attaranzadeh, A. (2022). Investigating the Effect of Crocus sativus (Saffron) Petal Hydro-alcoholic Extract on Ovarian Follicle, Inflammatory Markers, and Antioxidant Enzymes in Mice Model of Polycystic Ovary Syndrome. Journal of Reproduction & Infertility. <https://doi.org/10.18502/jri.v23i1.8447>



- Mykhailenko, O., Ivanauskas, L., Bezruk, I., Sidorenko, L., Lesyk, R., & Georgiyants, V. (2021). Characterization of Phytochemical Components of *Crocus sativus* Leaves: A New Attractive By-Product. *Scientia Pharmaceutica*, 89(2), 28. <https://doi.org/10.3390/scipharm89020028>
- Paredi, G., Raboni, S., Marchesani, F., Ordoudi, S., Tsimidou, M., & Mozzarelli, A. (2016). Insight of Saffron Proteome by Gel-Electrophoresis. *Molecules*, 21(2), 167. <https://doi.org/10.3390/molecules21020167>
- Southgate, D. A. T. (2003). FOOD COMPOSITION TABLES. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (pp. 2599–2606). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00504-6>