



The effect of non-thermal plasma on physicochemical and microbial properties of ginger and sumac powder

Maryam Sarchami¹, Narmela Asefi*²✉ and Soraiyay zafar Hale³

¹PhD Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran

²Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

³PhD Student, Department of Food Science and Technology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

✉ Corresponding author: n.asefi@iaut.ac.ir

ARTICLE INFO

Article type:

Research Article

Article history:

Received: May 4, 2022

Accepted: April 23, 2024

Published: July 4, 2024

Keywords:

Atmospheric pressure cold plasma, ginger, sumac

ABSTRACT

Background: Spices are widely used in food preparation and formulation as flavoring, and when stored in unhygienic settings, they can harbor various bacteria. Cold plasma, a safe method for non-thermal equilibrium discharge production at atmospheric pressure, is an innovative solution for producing healthy food. Cold plasma is one of the new non-thermal methods of maintaining maximum bioactive compounds and minimal changes.

Aims: This research investigated the suitability of cold plasma technology for disinfecting spices.

Methods: In this study, the effect of atmospheric cold plasma using argon gas for 3 minutes on chemical (antioxidant capacity (DPPH) and color), microbial (Coliform count, total and mold count), sensory evaluation and microstructure of ginger and sumac powder, to determine the effectiveness of the plasma effect, the prepared samples were compared with the control sample.

Results: The results showed that by applying 3 minutes of plasma treatment in both samples, cold plasma had no significant effect on the antioxidant capacity of the treated samples compared to the control ($p > 0.05$). Under the scanning electron microscope, sumac and ginger samples had a rough, raised and heterogeneous surface before being exposed to plasma, and after being exposed to plasma with argon gas, they had a smooth and uniform surface. By applying 3 minutes of plasma treatment, the amount of mold growth in sumac from 949 cfu/g to 109 cfu/g and ginger from 2495.6 cfu/g to 1000.2 cfu/g, the total amount of coliform in the treated samples of ginger from cfu/g 6.96 to 7 cfu/g and sumac from 97 cfu/g to 8 cfu/g and also, the total count value in treated ginger samples from 566666 cfu/g to 29000 cfu/g and sumac from 593333 cfu/g to 29666 cfu/g decreased ($P < 0.05$). In terms of sensory evaluation, no significant impact was observed in the samples.

Conclusion: Considering the importance and use of spices in the food and pharmaceutical industry, the use of cold plasma process in reducing the microbial load of spices is possible with the least changes.



Extended Abstract

Introduction: Spices are used as one of the most common flavors in preparing food stuff. Spices represent a prevalent category of natural flavors extensively employed in culinary practices and food formulation. Spices for all or part of the plant that are used in powder form with the aim of increasing the taste and shelf life of the food product. To increase food's nutritional and sensory quality while simultaneously ensuring the products' microbiological safety, one of the key targets is finding alternatives to current food processing and preservation technologies. When it comes to sanitizing methods for crucial food ingredients, the necessity arises to preserve the quality of spices. Various methods are employed, including freezing, drying, irradiation, heating, and packaging, alongside chemical approaches such as using additives. In recent times, non-thermal plasma has emerged as a novel method for treating spices, herbs, seeds, and dried vegetables. The non-thermal nature of cold plasma makes it a valuable alternative to traditional chemical methods, offering an option that minimizes the use of chemical substances while maintaining the quality of the food ingredients. Cold plasma is a dry, non-thermal technology with no chemicals capable of working continuously at atmospheric pressure. This presents an innovative and potentially more sustainable approach to ensure food safety and longevity without compromising the essential characteristics of spices. Preparing, storing and consuming food safely and while preserving nutrients is one of the most important parts of maintaining food health and hygiene. The suitability of food for the growth of microbes can lead to spoilage and ultimately pathogenicity. To increase food's nutritional and sensory quality while simultaneously ensuring the products' microbiological safety, one of the key targets is finding alternatives to current food processing and preservation technologies. Emerging innovations in food science and engineering have developed consistently and quickly over the past 20 years. The innovative food processing method called

"cold plasma" uses energetic reactive gases to inactivate contaminating bacteria in spices. Ginger is an edible plant, a spice and a medicinal plant. Ginger is one of the medicinal plants that is used as a spice with strong antibacterial and antioxidant properties around the world. In addition to treating indigestion, ginger is used as a pleasant and appetizing spice in the food industry. Sumac (*Rhus coriaria* L.) is a pistachio genus of small shrubs 1 to 5 meters high, with 9 to 15 leaflets, covered with hairs and toothed. Employing thermal processes for spices sterilization may cause in destruction of bioactive materials, so it is necessary to recommend employing non-thermal processes which preserve the most amount of bioactive ingredients and cause less alternation. One of these techniques is cold plasma which is a non-thermal process providing microbial safety with minimum destruction. Cold plasma decontamination techniques are significantly safer and more efficient than previous one. Furthermore, the impacts of cold plasma on bioactive components are negligible, and the almost final quality of the products after operations is consistent. The purpose of this investigation is to study the influence of atmospheric cold plasma (DBD), with the use of argon gas, on chemical and microbial features of ginger and sumac in 3 'minutes time.

Material and methods: The examined elements of these spices were: color, scanning electron microscopy (SEM), counting coliform, mold and counting total microbial. In order to show the proficiency of plasma influence, the prepared samples were compared to the controlled sample (non-plasma). Ginger and sumac powder respectively with basic specifications (moisture 23.7%, antioxidant capacity 0.165 µg/ml and total phenolic compounds 0.22 mg of gallic acid per gram of dry matter) and (moisture 11.6%, antioxidant capacity µg) 0.167/ml and total phenolic compounds 0.77 mg of gallic acid per gram of dry matter) with natural taste and smell and free of additional substances with mesh size of 125 were

prepared from Tabriz as raw materials. In order to prepare samples for plasma treatment, DBD plasma device of Faculty of Physics, Faculty of Science and Research, Azad University of Tehran was used in this process. By adjusting the gas current and voltage by 10 kV and frequency of 40 kHz and power of 100 watts, plasma irradiation was performed for 3 minutes using argon gas. In order to extract, 25 grams of the ground samples were added to 250 cc of ethanol and it was soaked and strained for 3 consecutive days, and then the methanol extract obtained was evaporated under a hood and in the next step, its dry weight was calculated. Samples were stirred several times during treatment. Antioxidant capacity was measured using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl solution (DPPH). In a test tube 600 μ l of DPPH solution was poured and 60 μ l of the spice extract was added and 5.34 ml of methanol was added to the tube. After 15 minutes at room temperature and in a dark environment, the absorbance of both test tubes was read by a spectrophotometer at 517 nm, zeroing the device with methanol solvent. The morphological study of the cross section of the spice sample was performed using SEM (manufactured by Tescan, Czech Republic). Bombarding the sample causes electrons to be released from the sample toward the positively charged plate, where these electrons become signals. The movement of the beam on the sample provides a set of signals on the basis of which the microscope can display an image of the sample surface on a computer screen. To evaluate the microbial load of the samples, including total count from PCA sterile culture medium, coliform count from VRB culture medium, mold count from DG18 culture medium were used. 2 replicates were cultured from each treatment. After incubation, the plates were counted. In this study, Sumac and ginger spices were exposed to cold plasma processing with argon gas to examine their microbiological, chemical, physical and organoleptic qualities.

Results and discussion: The results demonstrated that, with the use of plasma, the reduction of mold growth in sumac was 5/8

and in ginger 5/2. The reduction of coliform was 92% in the treated ginger sample and 91% in the treated sumac sample compared to the control. The total count was significant at the 5% probability level ($p < 0.05$). In both treated spices, compared to the control samples, a 20-fold reduction in the microbial population was observed. In investigating the antimicrobial effect of Enterococcus, Salmonella and saffron mold, similar results showed that the rate of decrease in saffron mold population was less than Enterococcus, Salmonella. Plasma had no effect on the antioxidant capacity of control samples. Scanning electron microscopy images to examine the morphology of the samples before plasma exposure showed a rough, prominent and inhomogeneous surface and after exposure to plasma with argon gas with a smooth and uniform surface, which increased the solubility. In the study of the effect of plasma on onion powder, it was reported that the samples treated with cold air plasma had a smoother surface than the samples treated with hot air. Also, no organoleptic changes were observed in the samples. In a study, they reported that the type of gas used did not differ significantly from the color indices of turmeric samples.

Conclusion: Considering the importance and application of spices in the food and pharmaceutical industry, it is important to use the process of reducing the microbial load of spices with the lowest microbial load and maintaining the antioxidant and antimicrobial properties. Currently, various physical methods such as freezing, drying, radiation, heating and packaging and chemical methods such as the use of additives are widely used to preserve food. One of these newly known processes is the use of plasma. The non-thermal nature of cold plasma makes it a valuable alternative to traditional chemical methods, offering an option that minimizes the use of chemical substances while maintaining the quality of the food ingredients. This presents an innovative and potentially more sustainable approach to ensure food safety and longevity without compromising the essential characteristics of spices. In general, cold

plasma is a novel method of food processing that, given its non-thermal nature, can be a good alternative to other methods used for food sterilization/pasteurization.

1- In both types of spices, by applying 3 minutes of treatment time, the total number of bacteria and also the amount of mold count was significantly reduced. This reduction in the total bacterial count and the amount of mold count for sumac spice is more than ginger spice.

2- Examination of coliform counts showed that by applying plasma for 3 minutes in two spices (ginger, sumac), it was reduced by 92%. 3- Changes in the level of inhibition of antioxidant compounds after exposure to cold plasma have been reported for a long time in other studies. The reasons for the lack of change in antioxidant capacity in this study can be attributed to the short plasma time.

4- Morphological evaluation of control and cold plasma treated samples shows that the treated sumac has a smooth structure and a smooth surface and the treated ginger is rougher and spongy compared to sumac.

5- The results of color parameter analysis showed that there is no color reduction in control samples and after treatment.

تأثیر پلاسمای غیرحرارتی بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و میکروبی پودر زنجبیل و سماق

مریم سرچمی^۱ نارملا آصفی^۲ هاله ثریای ظفر^۳

^۱دانشجو دکتری گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه تبریز، ایران

^۲دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

^۳دانش آموخته دکتری گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

✉ مسئول مکاتبه: n.asefi@iaut.ac.ir

چکیده

مشخصات مقاله

زمینه مطالعاتی: سترون سازی با استفاده از پلاسمای سرد، یکی از روش‌های نوین غیرحرارتی در حفظ حداکثری ترکیبات زیست فعال و حداقل تغییرات می‌باشد. ادویه‌جات به عنوان یکی از رایج‌ترین طعم دهنده‌ها در تهیه و فرمولاسیون غذا استفاده می‌شوند.

هدف: این پژوهش با هدف استفاده از فناوری پلاسمای سرد به عنوان روشی در جهت ضدعفونی ادویه به عنوان یک جایگزین مناسب برای فناوری‌های متداول انجام شد.

روش کار: در این مطالعه، اثر پلاسمای سرد اتمسفریک با استفاده از گاز آرگون به مدت ۳ دقیقه بر ویژگی‌های شیمیایی (ظرفیت آنتی اکسیدانی و رنگ)، میکروبی (شمارش کلی فرم، شمارش کلی و کپک)، ارزیابی حسی و میکروساختار پودر زنجبیل و سماق به منظور کارایی تأثیر پلاسمای، نمونه‌های تهیه شده با نمونه شاهد مقایسه گردید.

نتایج: نتایج نشان داد با اعمال ۳ دقیقه پلاسمادهی در هر دو نمونه، پلاسمای سرد تأثیر معناداری بر روی ظرفیت آنتی اکسیدانی نمونه‌های تیمار شده نسبت به شاهد نداشت ($p > 0/05$). نمونه سماق و زنجبیل در زیر میکروسکوپ الکترونی روبشی قبل از قرار گیری در معرض پلاسمای سطح زبر، برجسته و ناهمگن و پس از قرار گیری در معرض پلاسمای با گاز آرگون دارای سطح صاف و یکنواخت داشتند. با اعمال ۳ دقیقه پلاسمادهی مقدار رشد کپک در سماق از 949 cfu/g به 109 cfu/g و زنجبیل از $2495/6 \text{ cfu/g}$ به $1000/2 \text{ cfu/g}$ ، مقدار کلی فرم در نمونه‌های تیمار شده زنجبیل از $96/6 \text{ cfu/g}$ به 7 cfu/g و سماق از 97 cfu/g به 8 cfu/g و همچنین، مقدار شمارش کلی در نمونه‌های تیمار شده زنجبیل از 566666 cfu/g به 29000 cfu/g و سماق از 593333 cfu/g به 29666 cfu/g کاهش یافتند ($p < 0/05$). از لحاظ ارزیابی حسی تأثیر معناداری در نمونه‌ها مشاهده نشد ($p > 0/05$).

نتیجه‌گیری: با توجه به اهمیت و کاربرد ادویه‌جات در صنعت غذایی و دارویی، استفاده از فرایند پلاسمای سرد در کاهش میزان بار میکروبی ادویه‌جات با کمترین تغییرات امکان پذیر است.

نوع مقاله:

علمی پژوهشی

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۱/۲/۱۴

پذیرش: ۱۴۰۳/۲/۴

انتشار: ۱۴۰۳/۴/۱۴

کلید واژگان:

پلاسمای سرد فشار

اتمسفیری، زنجبیل،

سماق

مقدمه

فناوری پلاسمای سرد بعنوان یک روش غیرحرارتی نوظهور، در صنایع غذایی برای دستیابی به فرآیند و نگهداری مواد غذایی بهتر در حال گسترش است (کیم و همکاران ۲۰۱۴). در واقع پلاسمای سرد به حالت چهارم ماده، به گازهایی که به صورت جزئی یا کلی یونیزه شده از فوتون‌ها، یون‌ها، الکترون‌های آزاد و همچنین اتم‌ها در حالت‌های اساسی یا برانگیخته خود تشکیل و دارای شارژ خنثی خالص اطلاق می‌شود. منابع انرژی مورد استفاده می‌تواند الکتریکی، جریان مغناطیسی، امواج رادیو فرکانسی، اشعه ماوراء بنفش و یا نور لیزر باشد (میسرا و همکاران ۲۰۱۱، آجللوپولوس ۲۰۲۲). پلاسمای براساس چگالی و دمای الکترون، به دو دسته پلاسمای دمای بالا و پایین تقسیم می‌شود. تولید پلاسمای حرارتی به فشار بسیار بالا نیاز دارد. محدودیت پلاسمای حرارتی شامل مصرف انرژی، اثر سرکوب بالای واکنش‌های شیمیایی و عمل کردن در دمای بسیار بالاتر از دمای محیط که کاربرد آن در محصولات غذایی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. پلاسمای غیرحرارتی (سرد) از منابع تخلیه در فشارهای متفاوت تولید می‌شود. در سیستم پلاسمای فشار گاز پایین تر باعث استفاده ولتاژ کمتری برای یونیزاسیون می‌شود. پلاسمای سرد از طریق فناوری‌های تولید مانند تخلیه سد دی الکتریک، جت‌های پلاسمای فشار اتمسفری و تخلیه مایکروویو تعریف می‌شود (لی و همکاران ۲۰۲۰، پیونیا بانگر و همکاران ۲۰۲۲).

استفاده از پلاسمای سرد باعث غیرفعال سازی میکروارگانیسم‌ها در دمای پایین، تیمار مواد غذایی خام و تازه، توان ورودی کم، حفظ مواد مغذی، کاهش خطرات ناشی از فرآیندهای حرارتی و شیمیایی، مصرف آب و حلال، هزینه تجهیزات، سازگاری با محیط زیست، بهبود عملکرد سطحی پلیمرها و بیوپلیمرها از جمله قابلیت ترشوندگی، مقاومت در برابر رطوبت، قابلیت چاپ پذیر، رنگ آمیز، مقاومت در برابر چسبندگی به سایر پلیمرها یا مواد، بدون تغییر در خواص مورد نظر پلیمر می‌شود (پانکاژ و همکاران ۲۰۱۴).

یکی از انواع پلاسمای سرد فشار اتمسفری، جت پلاسمای است که بر پایه تخلیه سد دی الکتریک بنا نهاده شده و پلاسمای

در اثر تخلیه الکتریکی بین دو الکترود ایجاد می‌شود (صحبت‌زاده و همکاران ۲۰۱۴). یکی از کاربرد پلاسمای سرد، استفاده در ادویجات مصرفی است.

ادویه به تمام یا قسمتی از گیاه که به صورت پودری با هدف افزایش طعم و ماندگاری در فرآورده غذایی استفاده می‌شود. (بی نام ۱۳۸۰). ادویه جات به علت داشتن ترکیباتی نظیر آلکالوئیدها، پلی‌فنل‌ها، سینامیک آلدئید، کومارین و تانن دارای خاصیت ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی و دارویی می‌باشند (ماکوان و همکاران ۲۰۱۶).

گیاه زنجبیل نام علمی (*Zingiber officinale*) به دلیل خواص دارویی، ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی قوی در دنیا استفاده می‌شود. زنجبیل به عنوان درمان سوء هاضمه، ادویه‌ای مطبوع و اشتهاآور در صنایع غذایی کاربرد دارد (هانتلی و ارنست ۲۰۰۸، کیاما ۲۰۲۰).

گیاه زنجبیل تازه حاوی ۲/۳ درصد پروتئین، ۰/۹ درصد چربی، ۱/۲ درصد ترکیبات معدنی، ۲/۴ درصد فیبر، ۱۲/۳ درصد کربوهیدرات و ۸۰/۹ درصد رطوبت است. ریزوم پودر شده زنجبیل حاوی ۳-۶ درصد روغن، ۹ درصد پروتئین، ۶۰-۷۰ درصد کربوهیدرات، ۳-۸ درصد فیبر، ۸ درصد خاکستر، ۹-۱۲ درصد آب، ۲-۳ درصد چربی فرار و حاوی ویتامین‌های گروه ب و سی است (نیکخواه بداق و همکاران ۲۰۱۹، لی و همکاران ۲۰۱۹).

گیاه سماق بانام علمی (*L Rhus coriaria*) از تیره پسته درختچه‌ای کوچک، پوشیده از کرک و دنداندار است (زرگری ۱۹۹۲). قسمت مورد استفاده سماق، پوسته قرمز رنگ و ترش مزه سطح میوه است. سماق دارای مقدار قابل توجهی تانن قابل حل در آب است. میوه سماق به دلیل داشتن ترکیبات فنلی نظیر تانن، کوئرستین، میریستین، اسیدهای فنلی، فلاونول‌ها، آنتوسیانین‌ها، اسید چربی‌های (اولئیک، لینولئیک و پالمیتیک) و اسیدهای آلی (مالیک، سیتریک، فوماریک و تارتاریک) به عنوان یک منبع آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی و عامل کاهش دهنده قند خون و سرطان کاربرد دارد (ساخر و خطیب ۲۰۲۰).

نتایج بررسی اثر پلاسمای سرد بر زردچوبه نشان داد در غیرفعال سازی میکروارگانیسم‌ها موثر و تفاوت معنی‌داری در

استریل انتقال داده شد. آزمون‌های میکروبی و شیمیایی مورد نظر به ترتیب بلافاصله و بعد از یک هفته نگهداری در دمای 25°C درجه سانتی‌گراد انجام شدند.

آزمون‌های میکروبی

برای انجام آزمون‌های میکروبی، نمونه پودرهای زنجبیل و سماق تحت تیمار و شاهد، ابتدا ۱ گرم از هر نمونه زیر هود استریل با استفاده از ترازوی دیجیتال وزن گردید و با ۹ میلی لیتر رینگر استریل ترکیب شد. پس از شیکر (30s) نمونه‌ها ۱ میلی لیتر از این مخلوط همگن شده با استفاده از سمپلر در شرایط استریل به ۹ میلی لیتر رینگر استریل منتقل و به همین ترتیب رقت سازی تا هفت مرحله انجام گرفت. برای ارزیابی بار میکروبی نمونه‌ها شامل شمارش کلی، شمارش کلی فرم، شمارش کپک انجام شد. از هر تیمار ۲ تکرار کشت داده شد. بعد از انکوباسیون پلیت‌ها شمارش شدند. در نهایت بار میکروبی برحسب $\log_{cfu/g}$ محاسبه شد (کریم ۲۰۰۳).

آزمون‌های شیمیایی

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از محلول ۲ و ۲ دی فنیل 2-پیکریل هیدرازیل انجام شد. ابتدا در داخل یک لوله آزمایش ۶۰۰ میلی لیتر، از محلول DPPH ریخته شد، سپس $60 \mu\text{l}$ از عصاره تهیه شده از ادویه‌ها و $5/34 \text{ ml}$ متانول به لوله افزوده شدند (لوله شماره ۱). لوله شاهد که حاوی $600 \mu\text{l}$ محلول DPPH بود به میزان $5/94 \text{ ml}$ متانول به آن اضافه و به حجم 6 ml رسانده شد (لوله شاهد). پس از گذشت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و محیط تاریک، مقدار جذب هر دو لوله آزمایش توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 517 nm خوانده شد. مقادیر درصد بازدارندگی نمونه‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (ایستراتی و همکاران ۲۰۱۴).

$100 \times (\text{جذب کنترل} / \text{جذب نمونه} - \text{جذب کنترل}) = \text{درصد بازدارندگی}$

تهیه عصاره‌های آبی زنجبیل و سماق

جهت عصاره‌گیری، ۲۵ گرم از نمونه‌های آسیاب شده به ۲۵۰ سی‌سی اتانول اضافه شد و ۳ روز متوالی مرحله‌ی خیساندن و

شاخص‌های حسی ایجاد نمی‌کند (سنایی و همکاران ۲۰۲۰). پلاسما سرد بعنوان یک عامل استریلیزاسیون موثر، ساده و سریع (از چندثانیه تا یک ساعت)، با دمای پایین (کمتر از 70°C) درجه سانتی‌گراد) و قابلیت کاهش (یا از بین بردن) فرم‌های مختلف میکروب‌ها بر مواد غذایی می‌باشد (مین و همکاران ۲۰۱۷، لاروسی ۲۰۰۹، لیا و همکاران ۲۰۱۷).

تا به امروز از روش‌های حرارتی، ضد عفونی با گاز اتیلن اکسید، متیل بروماید و مایکروویو برای میکروب زدایی ادویه جات استفاده شده است، که این روش‌ها باعث کاهش رنگ، طعم و عطر ادویه شده است (وایدونه همکاران ۲۰۲۰، ولف ۲۰۰۸). با توجه به اهمیت اقتصادی و تغذیه‌ای ادویه جات، نیاز است با در نظر گرفتن شاخص‌های کیفی مختلف مطالعاتی در زمینه بهبود خصوصیات ادویه صورت پذیرد. فلذا این مطالعه، بررسی ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی، میکروبی و میکروساختار پودر زنجبیل و سماق تحت تیمار پلاسما سرد در فشار اتمسفریک است.

مواد و روش‌ها

آماده سازی نمونه‌ها

پودر زنجبیل و سماق به ترتیب با مشخصات اولیه (رطوبت $7/23\%$ ، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی $0/165 \mu\text{g/ml}$ و ترکیبات فنولی کل $0/22$ میلی گرم گالیک اسید در گرم ماده خشک) و (رطوبت $11/6\%$ ، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی $0/167 \mu\text{g/ml}$ و ترکیبات فنولی کل $0/77$ میلی گرم گالیک اسید در گرم ماده خشک) با دارا بودن طعم و بوی طبیعی و عاری از مواد اضافی با اندازه مش ۱۲۵ به عنوان مواد اولیه از تبریز تهیه شدند.

روش اعمال پلاسما

جهت آماده سازی نمونه‌ها برای پلاسمادهی از دستگاه پلاسما (دانشکده‌ی فیزیک دانشگاه علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد تهران) مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌ها در مدت زمان ۳ دقیقه پلاسمادهی شدند (نمونه‌ها در طول تیماردهی بارها همزده شد) (گاریسا و همکاران ۱۹۹۸). پس از اتمام زمان گازدهی، نمونه‌های تیمار شده در محیط استریل، به پلیت‌های

سانتی‌گراد تحت هم زدن ملایم بررسی شد (شجاعی علی آبادی و همکاران ۲۰۱۳).

تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار صورت گرفت و جهت بررسی تفاوت‌های آماری بین میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. آنالیز داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS21 در سطح احتمال ۵٪ ($P < 0.05$) صورت گرفت و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

آزمون‌های میکروبی

نتایج حاصل از آنالیز آماری، تأثیر ۳ دقیقه اعمال پلاسما و گاز آرگون بر روی خواص میکروبی زنجبیل و سماق (شمارش کپک، کلی فرم و شمارش کلی میکروارگانیزم‌ها) در سطح احتمال ۵ درصد معنی داری نشان می‌دهد (جدول ۱).

Table 1 Analysis of Variance to Investigate Microbial Properties in Ginger and Sumac.

Sources of changes	Total count	coliform	mold
Type of spice (treatment)	3149±0.2a	7981±0.01a	2955±0.01a

میزان کپک در زنجبیل شاهد ($2495/1 \text{ cfu/g}$) نسبت به سماق شاهد (949 cfu/g) بیشتر بود. با اعمال ۳ دقیقه پلاسمادهی در هر دو نمونه، مقدار کاهش رشد کپک در سماق به 7 cfu/g و زنجبیل به 109 cfu/g رسید. به گونه‌ای که سماق تیمار شده تحت پلاسمای سرد با داشتن 109 cfu/g نسبت به بقیه کمترین میزان کپک را دارا شد (شکل ۱). همچنین، میزان کلی فرم در نمونه‌های تیمار شده زنجبیل (7 cfu/g) نسبت به نمونه شاهد (9676 cfu/g) و در سماق تیمار شده (8 cfu/g) به نسبت نمونه شاهد (97 cfu/g) کاهش یافتند. با توجه به این که محدوده قابل قبول شمارش کلی فرم‌ها در ادویه جات حداکثر 10^2 cfu/g کلونی می‌باشد

صاف کردن آن انجام گردید و در ادامه متانول عصاره‌ی بدست آمده‌ی آن در زیر هود تبخیر و در مرحله‌ی بعد وزن خشک آن محاسبه شد (سینگ ۲۰۰۲).

ارزیابی مورفولوژی با میکروسکوپ الکترونی روبشی انتشار میدانی (FE-SEM)

مطالعه مورفولوژیک سطح مقطع نمونه ادویه‌ها با استفاده از دستگاه (SEM) میکروسکوپ الکترونی روبشی دانشگاه تبریز (FEG-SEM MIRA3) ساخت کمپانی (Tescan کشور چک) که دارای فیلمان انتشار میدانی (Field Emission) در دو حالت خلا بالا و پایین (مناسب برای نمونه‌های نارسانا) که میزان آشکارسازی دستگاه تا 1 nm و قدرت بزرگ‌نمایی آن تا ۱ میلیون برابر با اعمال ولتاژ 15 kv بود، انجام شد. عصاره‌های استخراج شده برای این منظور سانتریفوژ شد. جذب نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای محیط، توسط اسپکتروفتومتر در طول موج 765 nm ، خوانده شده با قرار دادن نتایج حاصل در منحنی کالیبراسیون، میزان فنل کل موجود در نمونه‌های مورد بررسی بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید به دست آمد (چاروئن و همکاران ۲۰۱۵).

اندازه‌گیری رنگ

آزمون رنگ سنجی با استفاده از دستگاه رنگ سنج مدل LES135 انجام شد. تغییرات رنگ نمونه‌های ادویه شاهد و تیمار شده با استفاده از اندازه‌گیری شاخص‌های روشنایی *L (سیاه - سفید)، *a (قرمز - سبز) و *b (آبی - زرد) انجام گرفت. بر این اساس نمونه‌ها در ظرف مخصوص دستگاه به طوری که سطح آن کاملاً پوشانده شود ریخته شد. سپس محفظه تاریک بر روی ظرف گذاشته و در سیستم CIE *L*, *a*, *b* پارامترهای رنگی تعیین شدند (آک و گولچین ۲۰۰۸).

اندازه‌گیری حلالیت در آب

۲ گرم از ادویه مورد نظر را در ۵۰ سی‌سی آب مقطر حل کرده و حلالیت در آب تحت شرایط ثابت در دمای ۲۵ درجه

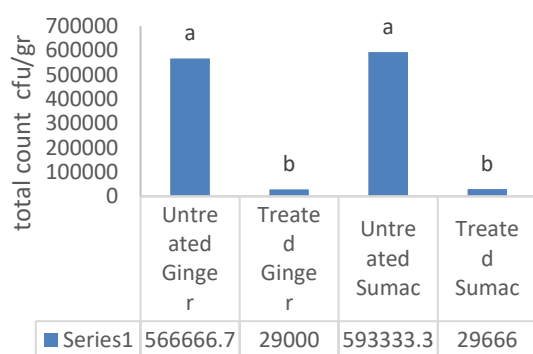


Fig 3- microbial test for Total count in the studied spices.

*Means followed in the same row are significantly different (P<0.05)

مطالعه کیم و همکاران (۲۰۱۴) رفع آلودگی پودر فلفل قرمز به وسیله ۳۰ دقیقه پلاسمادهی با گاز هلیوم و اکسیژن بر شمارش کلی باکتری‌ها باعث کاهش یک سیکل شد. امینی و همکاران (۲۰۱۶) اثر پلاسمادهی بر باکتری‌های *Enterococcus*, *Salmonella* و کپک در زعفران که باعث کاهش سیکلی میکروبی شد مطابقت داشت. همچنین *Candida albicans* به دلیل دیواره سلولی ضخیم نسبت به سایر گونه‌های باکتریایی در مقابل تابش پلازما مقاوم است (نیشم و همکاران ۲۰۱۷).

آزمون‌های شیمیایی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

نتایج حاصل از آنالیز آماری، مقایسه میانگین‌های به دام اندازی (بازدارندگی) رادیکال DPPH برای ادویه زنجبیل و سماق در زمان صفر (نمونه شاهد) و بعد از ۳ دقیقه پلاسمادهی، با اینکه سماق و زنجبیل تیمار یافته نسبت به نمونه شاهد خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری داشتند ولی تفاوت معنی داری باهم نداشتند (شکل ۴).

(بی‌نام ۱۳۸۷)، این میزان بار میکروبی با اعمال پلاسمادهی مطابق استاندارد ملی ایران بود (شکل ۲).

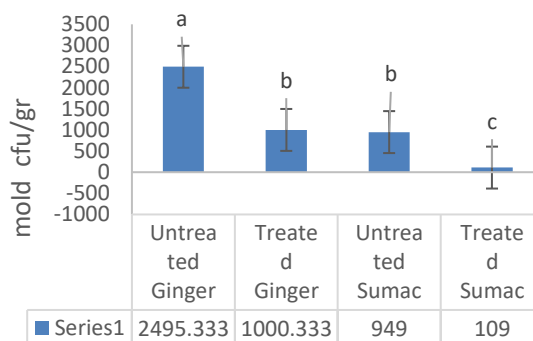


Fig 1- microbial test for mold in the studied spices.

*Means followed in the same row are significantly different (P<0.05)

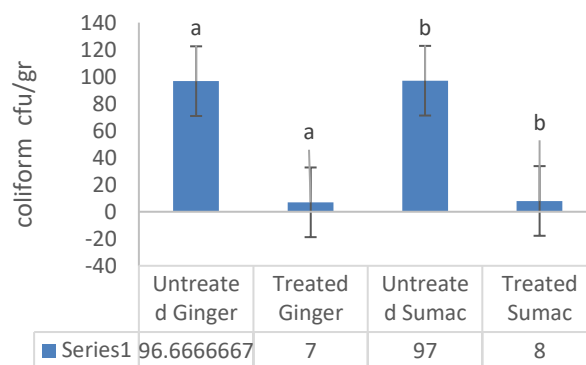


Fig 2- microbial test for Coliform in the studied spices.

*Means followed in the same row are significantly different (P<0.05)

طبق نتایج تجزیه واریانس، میزان شمارش کلی نیز همانند کلی‌فرم در سماق و زنجبیل در خصوص آلودگی میکروبی یکسان بودند. نمونه‌های تیمار شده سماق و زنجبیل به ترتیب با داشتن ۲۹۶۶۶ cfu/g و ۲۹۰۰۰ cfu/g نسبت به نمونه‌های شاهد خود ۵۶۶۶۶۶ cfu/g و ۵۹۳۳۳۳ cfu/g کاهش در میزان جمعیت میکروبی را نشان دادند (شکل ۳). تأثیر پلاسمای سرد در پایین آوردن جمعیت میکروبی کاملاً مشهود و باعث کاهش میزان بار میکروبی مطابق استاندارد ملی ایران شد، که محدوده قابل قبول شمارش کلی باکتری‌ها در ادویه جات حداکثر ۱۰۶cfu/g کلونی می‌باشد (موسومی و پراگر ۲۰۰۳).

(0.05)، (جدول ۲). در مطالعه ای، پس از پلاسمادهی توت فرنگی، سیب، کیوی، گوجه فرنگی، گیلان، کاهو و هویج هیچ گونه کاهش رنگ قابل توجهی گزارش نکردند (میسرا و همکاران ۲۰۱۴). سنایی و همکاران (۲۰۲۰) نوع گاز به کار برده شده تفاوت معنی داری بر شاخص‌های رنگی نمونه‌های زردچوبه نداشتند. هرتویگ و همکاران (۲۰۱۵) پلاسمادهی بر رنگ پودر پاپریکا باعث کاهش مقادیر شاخص a^* (قرمز) با گذشت زمان شد، در حالی که مقادیر شاخص‌های b^* و L^* (روشنایی) و (زردی) افزایش یافت.

Table 2 Result of color indicators evaluation.

Sample	b^*	a^*	L^*
Treated Ginger	4.19±0.02 ^b	1.19±0.02 ^b	30.07±0.02 ^b
Untreated Ginger	4.99±0.01 ^a	2.09±0.01 ^a	30.87±0.01 ^a
Treated Sumac	2.11±0.02 ^b	1.77±0.02 ^b	7.25±0.02 ^b
Untreated Sumac	2.92±0.01 ^a	1.89±0.01 ^a	7.73±0.01 ^a

*Means followed in the same row are significantly different ($P < 0.05$)

ارزیابی مورفولوژی با میکروسکوپ الکترونی روبشی انتشار میدانی (SEM)

میکروسکوپ الکترونی روبشی به منظور بررسی مورفولوژی استفاده می‌شود. باتوجه به نتایج بدست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد (شکل ۵ و ۶) نمونه شاهد زنجبیل و سماق قبل از پلاسمادهی سطح زبر، برجسته و نا همگن دارند اما پس از پلاسمادهی با گاز آرگون نمونه زنجبیل و سماق دارای سطح صاف و یکنواخت شدند (شکل ۷ و ۸). در مقایسه بین دو ادویه سماق و زنجبیل تیمار شده، سماق دارای سطح هموارتری بود که این تغییر می‌تواند خاصیت نفوذ حلالیت را در آب افزایش دهد.

این مطالعه، با مطالعات تأثیر پلاسمای در پودر پیاز، تصاویر میکروسکوپی نمونه‌های تیمار شده با پلاسمای هوا سرد سطح صاف‌تر نسبت به نمونه‌های تیمار شده با هوای گرم داشت (کیم و همکاران ۲۰۱۶). تصاویر میکروسکوپی از سطح خارجی و بافت داخلی سلول بذر در نمونه پلاسمادهی نشان

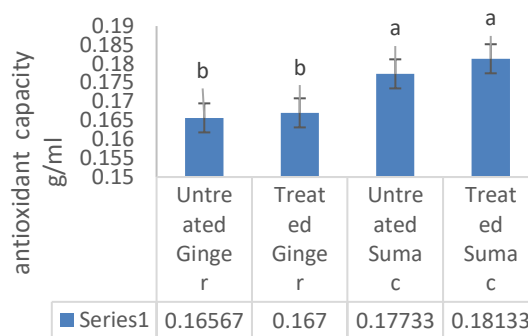


Fig 4- Antioxidant capacity test in the studied spices.

*Means followed in the same row are significantly different ($P < 0.05$)

تغییر در میزان بازدارندگی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی اعمال پلاسمای سرد به مدت مختلف در پژوهش‌ها گزارش شده است. علل عدم تغییر در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در این پژوهش را می‌توان به زمان کوتاه پلاسمادهی نسبت داد، چون با افزایش زمان پلاسمادهی، کاهش احتمال ظرفیت آنتی‌اکسیدانی دارا است. البته نوع محصول، نوع پلاسمای مورد استفاده و شرایط متغیر در هنگام تیمار پلاسمادهی موثر است. طبق مطالعات، تیمار پلاسمای بسته به زمان اعمال و حجم نمونه موجب افزایش ۱۴/۹۵ تا ۴۸/۹۹ درصدی ترکیبات فولیک آب انار شد. تیمار پلاسمای سرد باعث ایجاد گونه‌های شیمیایی فعال، ذره‌های باردار و فوتون‌های فرابنفش می‌شوند که انرژی الکتریکی کافی برای شکست پیوندهای کووالان و تحریک چندین واکنش شیمیایی را دارند و موجب شکست غشای سلولی و بهبود هیدرولیز و دپلمریزاسیون ترکیبات فنلی می‌شوند (هرسگ و همکاران ۲۰۱۶). پلاسمادهی در ۷۵۰ ولت بر میزان فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در پودر بابونه و دارچین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بابونه (۵۵ درصد) کاهش و دارچین (۲۱/۴ درصد) افزایش داد. بیشترین درصد پلی‌فنل کل در ۶۵۰ و ۷۵۰ ولت به مدت ۱۰ دقیقه مشاهده شد (سولیس پاچو و همکاران ۲۰۱۳).

ارزیابی شاخص‌های رنگی

با توجه به نتایج آنالیز آماری، تفاوت معنی داری از نظر شاخص‌های رنگی در نمونه‌های ادویه وجود نداشت ($p >$)

حلالیت در آب

طبق بررسی‌های انجام شده مشاهده شد که میزان حلالیت در آب، ادویه سماق و زنجبیل اصلاح شده با پلاسما سرد در مقایسه با ادویه شاهد افزایش یافت. در بررسی پانکاج و همکاران (۲۰۱۷) که به تاثیر پلاسما سرد بر فیلم‌های کیتوزان پرداختند به این نتیجه رسیدند که با افزایش زمان اعمال پلاسما اثرگذاری بر میزان حلالیت افزایش می‌یابد که این به دلیل افزایش قطبیت بعد از پلاسمادهی می‌باشد. همچنین در بررسی دیگر پانکاج و همکاران (2015)، تاثیر پلاسما سرد بر فیلم‌های نشاسته ذرت نشان داد که حلالیت فیلم‌ها به دلیل افزایش گروه‌های قطب در سطح بعد از اعمال پلاسما اکسیژن افزایش یافته است. البته اگرچه حلالیت پلیمرها افزایش یافت اما نفوذپذیری به بخار آب در زمان‌های مختلف پلاسمادهی بدون تغییر ماند.

نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت و کاربرد ادویه جات در صنعت غذایی و دارویی، استفاده از فرایند کاهش بار میکروبی ادویه جات با کمترین بار میکروبی و حفظ خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی مهم است. در حال حاضر انواع روش‌های فیزیکی همچون انجماد، خشک کردن، پرتودهی، حرارت‌دهی و بسته‌بندی و روش‌های شیمیایی مانند استفاده از انواع افزودنی‌ها به‌طور گسترده جهت نگهداری مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. یکی از این فرآیندهای تازه شناخته شده استفاده از پلاسما است. با بررسی فرایند انجام شده روی بار میکروبی ادویه سماق و زنجبیل نتایج نشان داد، با اعمال ۳ دقیقه زمان تیماردهی میزان شمارش کلی باکتری‌ها، کپک کاهش معنی‌داری داشتند. این کاهش بار میکروبی در ادویه سماق بیشتر از ادویه زنجبیل بود. تغییر در میزان بازدارندگی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی پس از قرار گرفتن در معرض پلاسمادهی انجام شد. ارزیابی مورفولوژی نمونه‌های شاهد و تیمار شده با پلاسما سرد نشان می‌دهد که سماق تیمار شده دارای ساختار هموار و سطح صاف و زنجبیل تیمار شده به نسبت سماق حالت زبر و اسفنجی دارد، همچنین باعث ایجاد هیچ گونه کاهش رنگی در نمونه‌های

داد که سطوح خارجی بذرها در معرض پلاسما سرد نسبت به حالت بدون مواجهه با پلاسما هموارتر و دارای برجستگی کمتری هستند. این تغییر خاصیت آب دوستی نمونه‌ها را افزایش داد. اما در مواجهه بذر با پلاسما سرد، تغییری در بافت داخلی سلول مشاهده نگردید (فریدونی و عزیزاده ۱۴۰۱).

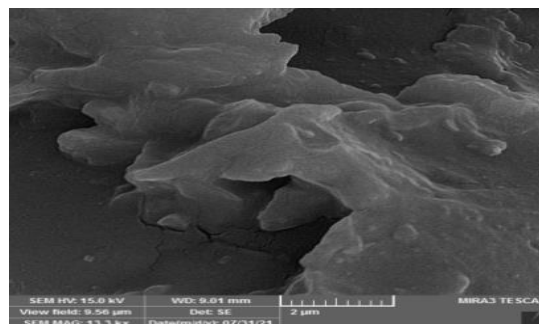


Fig 5- Untreated Ginger 2 micrometers

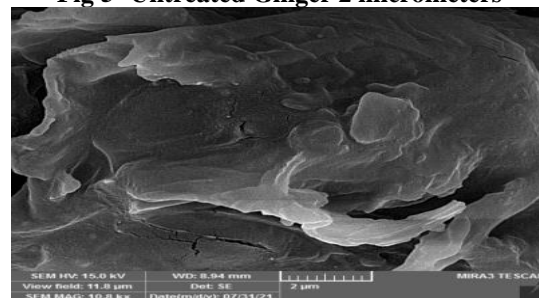


Fig 6- Treated Ginger 2 micrometers

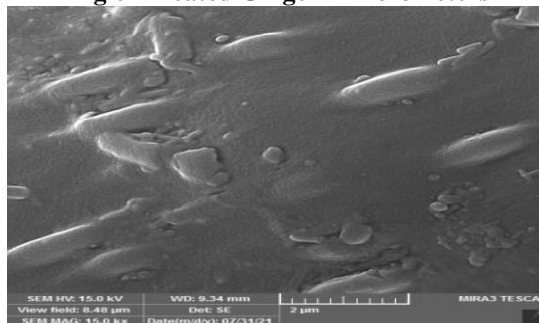


Fig 7- Untreated Sumac 2 micrometers

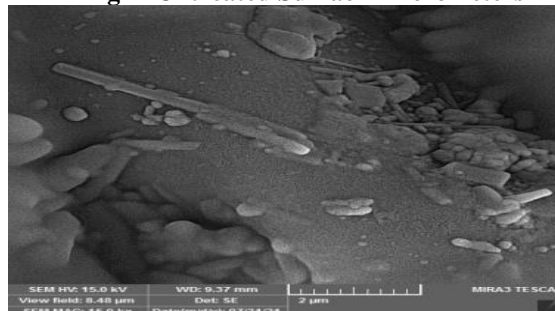


Fig 8- Treated Sumac 2 micrometers

شاهد و تیماردهی شده نشد. اعمال پلاسمای سرد باعث افزایش در حلالیت در آب، ادویه سماق و زنجبیل شد.

References

- استاندارد ملی ایران شماره ۴۶۹۶، ۱۳۸۰. نامگذاری ادویه و چاشنی.
- استاندارد ملی ایران شماره ۱-۱۰۸۹۹، ۱۳۸۷. میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام، روش جامع برای شمارش کپک‌ها و مخمرها، قسمت دوم، روش شمارش کلنی در فراورده‌های با فعالیت آبی (aw) بیشتر از ۰/۹۵.
- فریدونی محسن، و حاجی آقاعلیزاده حسین، ۱۴۰۱. بررسی اثر پلاسمای سرد بر جوانه زنی بذر نخود و تغییرات رنگ آن با استفاده از مدل فازی عصبی. علوم غذایی و تغذیه، ۱۹(۴) (۷۶ پیاپی)، ۵-۱۶.
- Ak T and Gülçin Y, 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-biological interaction*. 174(1): 27-37.
- Amini, M and Ghoranneviss M, 2016. "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*73: 178-184.
- Aggelopoulos CA, 2022. Recent advances of cold plasma technology for water and soil remediation: A critical review. *Chemical Engineering Journal*, 428, 131657.
- Charoen R, Savedboworn W, Phuditcharnchnakun S and Khuntaweetap T, 2015. Development of Antioxidant Gummy Jelly Candy Supplemented with Psidium guajava Leaf Extract. King Mongkut's University of Technology North Bangkok *International Journal of Applied Science & Technology*. 8(2): 145-151.
- Hertwig CK, Reineke J, Ehlbeck D and Schlüter O, 2015. "Decontamination of whole black pepper using different cold atmospheric pressure plasma applications." *FoodControl*55: 221-229.
- Huntley A, Ernst E, 2008. Herbal medicines for asthma: a Systematic Review. *Thorax*. 55: 925.
- Herceg Z, Kovačević DB, Kljusurić JG, Jambrak AR, Zorić Z, and DragovićUzelac V, 2016. Gas phase plasma impact on phenolic compounds in pomegranate juice. *Food chemistry*, 190, 665-672.
- Istrati D, Constantin O, Vizireanu C and Dinca RM, 2014. The study of antioxidant and antimicrobial activity of extracts for meat marinade. *Romanian Biotechnological Letters*. 5: 9687-9698.
- Kiyama R, 2020. Nutritional implications of ginger: chemistry, biological activities and signaling pathways. *The Journal of nutritional biochemistry*. 86: 108486-108501.
- Kim JS, Lee EJ, Choi EH, and Kim YJ, 2014. Inactivation of *Staphylococcus aureus* on the beef jerky by radio-frequency atmospheric pressure plasma discharge treatment. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol*. 22, 124-130.
- Kim JE, Oh YJ, Won MY, Lee KS and Min SC, 2016. Microbial decontamination of onion powder using microwave-powered cold plasma treatments. *Food Microbiology*. 62: 112-123.
- Kim JE, Lee DU and Min SC, 2014. Microbial decontamination of red pepper powder by cold plasma. *Food Microbiology*.38: 128-136.
- Laroussi M, 2009. Low-temperature plasmas for medicine *IEEE Transactions on plasma. journal of science* 37(6): 714-725.
- Li H, Liu Y, Luo D, Ma Y, Zhang J, Li M, Yao L, Shi X, Liu X and Yang K, 2019. Ginger for health care: An overview of systematic reviews. *Complementary therapies in medicine*, 45: 114-123.
- Liao X, Liu D, Xiang Q, Ahn J, Chen S, Ye X and Ding T, 2017. Inactivation mechanisms of nonthermal plasma on microbes: A review. *Food Control* 75: 83-91.
- Lei Z, Xin C, Yang J, Zhang L, Hao S, Min L and Xin W, 2020. The denitration mechanism of fly ash catalysts prepared by low-temperature plasma technology. *Vacuum*, 181, 109695.

- Misra N, Tiwari B, Raghavarao K and Cullen P, 2011. Nonthermal plasma inactivation of food-borne pathogens. *Food Engineering Reviews* 3: 159–170.
- Misra NN, Keener K, Bourke P, Mosnier JP, Cullen P, 2014. In- package atmospheric pressure cold plasma treatment of cherry tomatoes. *Journal of Bioscience and bioengineering*. 118, 2: Pages 177-182.
- Min SC, Roh SH, Niemira BA, Boyd G, Sites JE, Uknalis J and Fan X, 2017. In package inhibition of *E. coli* O157: H7 on bulk Romaine lettuce using cold plasma. *Food Microbiology* 65: 1-6.
- Macwan SR, Dabhi BK, Aparnathi KD and Prajapati JB, 2016. Essential oils of herbs and spices: their antimicrobial activity and application in preservation of food. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(5), 885-901.
- Mousumi B, prabir k, 2003. Microbiological quality of some retail spices in India. *Food research International*.36:469- 474.
- Nishime T, Borges A, Koga-Ito C, Machida, M, Hein L and Kostov K, 2017. "Non-thermal atmospheric pressure plasma jet applied to inactivation of different microorganisms." *Surface and Coatings Technology*. 312: 19-24.
- Nikkhah Bodagh M, Maleki I, and Hekmatdoost A, 2019. Ginger in gastrointestinal disorders: A systematic review of clinical trials. *Food science & nutrition*. 7(1), 96-108.
- Pankaj SK, Bueno-Ferrer C, Misra NN, Milosavljević V, O'donnell CP, Bourke P and Cullen PJ, 2014. Applications of cold plasma technology in food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 35(1), 5-17.
- Pankaj S, Bueno-Ferrer C, O'Neill L, Tiwari B, Bourke P and Cullen P, 2017. Characterization of dielectric barrier discharge atmospheric air plasma treated chitosan films. *Journal of food processing and preservation* 41(1): 1-7.
- Pankaj SK, Bueno-Ferrer C, Misra N, O'Neill L, Tiwari B and Bourke P, 2015. Dielectric barrier discharges atmospheric air plasma treatment of high amylose corn starch films. *LWT-Food Science and Technology* 63(2): 1076-28.
- Puniabangar S, Suri S, Nayi Pand Phimolsiripol Y, 2022. Cold plasma for microbial safety: Principle, mechanism, and factors responsible. *Journal of Food Processing and Preservation*, e16850.
- Sanaee F, Mortazavi SA, tabatabaei yazdi F, Shahidi F, 2020. Effect of cold plasma treatment on microbial load reduction and physicochemical properties of turmeric. *Journal of food science and technology (Iran)*, 17(99), 153-161
- Sakhr K and El-Khatib S, 2020. Physicochemical properties and medicinal, nutritional and industrial applications of Lebanese Sumac (Syrian Sumac-*Rhus coriaria*): A review. *Heliyon*, 6(1), 03207.
- Sohbatzadeh F, Hosseinzadeh Colagar A, Mirzanejhad S, Motallebi S, Farhadi M, Bagheri M and Mortazavi M, 2014. Design and construction of triplet atmospheric cold plasma jet for sterilization. *Iranian Journal of Physics Research*, 13(4).
- Shojaee-Aliabadi S, Hosseini H, Mohammadifar MA, Mohammadi A, Ghasemlou M, Ojagh SM, Hosseini SM and Khaksar R, 2013. Characterization of antioxidant-antimicrobial κ -carrageenan films containing *Satureja hortensis* essential oil. *International journal of biological macromolecules* 52:116-124.
- Solis-Pacheco JR, Villanueva-Tiburcio JE, Pena-Eguiluz R, Gonzakez-Reyzoso O, Cabrera-Diaz E, Gonzalez-Alvarez V and Aguilar-Uscanga BR, 2013. Effect of plasma energy on the antioxidant activity, total polyphenols and fungal viability in chamomile (*Matricaria chamomilla*) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*). *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2,5: 2318-2322.
- Vaideanu M, Banciu A, Radulescu D, Ionica D and Nita-Lazar M, 2020. Microbiological efficiency tests of the cosmetic tools disinfection procedures.
- Wolf J, 2008. Flavoring healthful diets-spices continue to show steady gain in popularity.
- Zargari A, 1992. Medicinal plants. Tehran University Press. 561.