ارزیابی اثرات پری بیوتیکی و ویژگی‌های کیفی اینولین استخراج شده از کاسنی غیربومی ایران

منیره نهاردانی[1]، مرضیه حسینی نژاد [2*]، امیرحسین الهامی راد[3]

[1] دانش آموخته‌ی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار، سبزوار، ایران

[2] استادیار پژوهشکده‌ی علوم و صنایع غذایی خراسان رضوی، مشهد، ایران

[3] استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار، گروه علوم و صنایع غذایی، سبزوار، ایران

تاریخ دریافت: 1391/2/28 تاریخ پذیرش: 1391/6/13

چکیده

اهمیت پری بیوتیک‌ها یا ترکیبات غذایی غیرقابل هضم که به طور انتخابی رشد و فعالیت باکتری‌های پروبیوتیک نظیر لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکترها را تحریک می‌کنند به طور روزافزونی مورد توجه قرار گرفته است. اینولین، یکی از ترکیبات ارزشمند پری بیوتیک است که در سطح تجاری از ریشه‌ی گیاه کاسنی چندساله استخراج می‌گردد. با توجه به این که در ایران، گیاه دارویی کاسنی یکساله و به صورت خودرو رشد می‌یابد ریشه‌ی این گیاه، مناسب استخراج اینولین نمی باشد. این پژوهش با هدف استخراج اینولین از گیاه کاسنی چندساله با منشأ غیر بومی و مقایسه‌ی اینولین استخراجی با نمونه‌ی اینولین تجاری صورت گرفت. فرآیند تولید، شامل استخراج اینولین طبیعی موجود در ریشه‌ی کاسنی غیر بومی با استفاده از انتشار در آب داغ، خالص سازی و تغلیظ عصاره بوده و در نهایت، اینولین به وسیله‌ی ترسیب با اتانول بازیابی گردید. اینولین استخراجی از کاسنی غیربومی در مقایسه با اینولین شاهد از درجه‌ی پلیمریزاسیون بالاتری برخوردار بود. افزایش رشد و فعالیت باکتری پروبیوتیک *Lactobacillus casei* و باکتری پاتوژن *Escherichia coli* تحت تاثیر اینولین استخراجی در درصدهای مختلف 0، 1 و 2 درصد مورد بررسی قرار گرفته و با اینولین خالص تجاری، گلوکز و فروکتوز مقایسه گردید. نتایج تغییرات جذب سنجی و بررسی رشد و زنده مانی سلول‌های باکتریایی نشان داد که سطح 2 درصد نمونه‌های اینولین در افزایش دانسیته‌ی سلولی و افزایش رشد و بقاء (افزایش تقریبیLog 1) باکتری پروبیوتیک موثرتر بودند، درحالی که سطح 2 درصد گلوکز و فروکتوز موجب افزایش بیش تر رشد و تکثیر *اشرشیاکلی* گردید.

واژه‌های کلیدی: پری بیوتیک، اینولین، کاسنی، باکتری پروبیوتیک.

* مسوول مکاتبات: *M_hosseininezhad@krifst.ir, hosseinynejad@yahoo.com*

Archive of SID

www.SID.ir

1- مقدمه

پری بیوتیک‌ها[1]، اجزای غذایی غیر قابل هضمی هستند که با تحریک انتخابی رشد یا فعالیت تعداد محدودی از باکتری‌های روده‌ی بزرگ می‌توانند سلامت میزبان را بهبود بخشند (12). امروزه، رایج ترین پری بیوتیک‌ها در اروپا، ژاپن و استرالیا، فروکتوالیگوساکاریدها[2] و اینولین[3] می‌باشد. اینولین و الیگوفروکتوزها ترکیبات غذایی طبیعی متعلق به‌یک خانواده از کربوهیدرات‌های شناخته شده تحت عنوان فروکتان‌ها، شامل یک سری از الیگو و پلی ساکاریدهای فروکتوز با پیوندهای β (2→1) می‌باشند که گلوکز قند انتهایی بیش تر زنجیره‌ها است. آرایش فضایی β در C_2 آنومریک در مونومرهای فروکتوز، مانع هضم فروکتان‌ها می‌شود و این، مسوول کم شدن مقدار کالری آن‌ها و اثرات فیبرهای رژیمی آن‌هاست (14و16). اینولین به طور موفقیت آمیزی به عنوان جایگزین چربی و قند با مزایای مختلف شامل میزان کالری کم تر، غنی سازی با فیبرهای غذایی و ویژگی‌های تغذیه ای به کار می‌رود (14). اینولین و الیگوفروکتوزها از طریق بهبود نظم، افزایش تناوب دفع و حجم مدفوع به بهبود عملکرد روده کمک می‌نمایند)20(. در ضمن، مصرف اینولین سبب کاهش تری گلیسریدها و کاهش تولید چربی نیز می‌گردد (20). البته عوامل متعددی از قبیل شرایط محیطی و ویژگی‌های ژنتیکی گیاه بر میزان و کیفیت اینولین استخراجی اثرگذار است (2).

مطالعات مختلف در شرایط آزمایشگاهی و محیطی نشان داده است که رژیم حاوی β (2→1) فروکتان (نظیر اینولین و الیگوفروکتوزها) رشد بیفیدوباکترها و لاکتوباسیلوس‌ها را تحریک نموده، سبب افزایش تولید ویتامین‌های B و K شده و به صورت انتخابی از رشد ارگانیسم‌های پاتوژن به ویژه باکتریوئیدها، فوزوباکترها و کلستریدیا جلوگیری می‌کند(7و9).

اینولین در 15٪ از گونه‌های گیاهان گلدار مانند مارچوبه ، سیر ، تره فرنگی، پیاز ، کنگر فرنگی و کاسنی به طور طبیعی موجود بوده و در ضمن توسط برخی از باکتری‌ها و قارچ‌ها نیز تولید می‌شود. دو گونه‌ی مناسب برای تولید اینولین عبارتند از سیب زمینی ترشی[4] و کاسنی[5] که در حال حاضر در بسیاری از کشورهای پیشرفته دنیا، اینولین تجاری از ریشه‌ی گیاه کاسنی چند ساله و سیب زمینی ترشی استخراج شده و از آن در صنعت غذا به طور گسترده، استفاده می‌گردد (11). برای استخراج اینولین از گیاهان روش‌های مختلفی عنوان گردیده است که از آن جمله می‌توان به استخراج با آب گرم، ترسیب با حلال‌های مختلف مانند اتانول، پروپانول، استون، استونیتریل و استخراج آبی بااعمال امواج فرا صوت اشاره نمود (15، 16و22). در ایران تاکنون چندین بررسی در زمینه‌ی استخراج و خالص سازی اینولین از گیاهان بومی صورت گرفته است (3و4). گیاه کاسنی اگرچه دارای منشاء مدیترانه ای است اما امروزه در نواحی مختلف کشور ما نیز یافت می‌شود که عمدتاً به شکل یک ساله بوده و به صورت خودرو رشد می‌کند. از کاسنی برای مصارف تغذیه ای و تهیه دارو استفاده می‌شود. با این وجود تاکنون اینولین به عنوان یک ترکیب غذایی با ارزش در ایران ناشناخته بوده و یا در مقادیر کم از منابع خارجی تامین می‌گردد.

از آن جا که گیاه‌یکساله‌ی کاسنی که در ایران به صورت خودرو رشد می‌یابد از ریشه‌های ضخیم مشابه کاسنی چند ساله برخوردار نبوده و به این سبب از میزان اینولین کم تر از کاسنی اروپا برخوردار است نمی تواند جهت تولید اینولین مورد بهره برداری و برنامه ریزی‌های تجاری قرار گیرد. لذا در این تحقیق، ارزیابی میزان و ویژگی پری بیوتیکی اینولین استخراج شده از ریشه‌های کاسنی چندساله غیر بومی که بذر خارجی آن جهت انجام تحقیقات زراعی در ایران کشت گردیده، مورد بررسی قرار گرفته است. بدین منظور، اینولین طی روش رسوب دهی با حلال اتانول از کاسنی دوساله استخراج و با اینولین خالص آزمایشگاهی به عنوان شاهد، مقایسه گردید.

2- مواد و روش ها

برای استخراج اینولین، ریشه‌های کاسنی چند ساله (*Cichorium intybus*)، که بذر آن قبلاً از کشور مجارستان تهیه و در مزرعه‌ی تحقیقاتی پارک علم و فناوری خراسان کشت شده بود در زمان برداشت، تهیه گردید.

[1] Prebiotics
[2] Fructooligosaccharides(FOS)
[3] Inulin
[4] Jerusalem artichoke(*Helianthus tuberosus*)
[5] *Cichorium intybus L.*

Archive of SID
www.SID.ir

2-1- تهیه‌ی اینولین از عصاره گیاه کاسنی

برای استخراج اینولین، ریشه‌ها بعد از برداشت به منظور حذف آلودگی‌ها با آب سرد شسته و بعد از خشک شدن آب از سطح آن‌ها در دمای 4°C نگه داری شدند.

ریشه‌های کاسنی پس از پوست گیری با 3 لیترآب به ازای هر کیلوگرم غده در یک مخلوط کن خرد شده و سوسپانسیون حاصل به مدت یک ساعت در دمای 90°C-80 قرار گرفت. پس از صاف کردن عصاره‌ی حاصل،pH سوسپانسیون عصاره با استفاده از محلول هیدروکسید کلسیم 5 درصد (مرک آلمان) از 6-5 به حدود12-10 رسانده شد. عصاره به مدت نیم ساعت در دمای 60-50 °C قرار گرفته و رسوب حاصل با استفاده از کاغذ صافی جدا گردید. سپس pH عصاره با محلول اسید فسفریک10درصد (مرک) به 9-8 رسانده و به مدت 3-2 ساعت در دمای 60°C نگه داری شد تا رسوب تشکیل گردد. پس از صاف کردن رسوب حاصله با استفاده از کاغذ صافی، عصاره‌ی تصفیه شده با افزودن 20 گرم کربن فعال (مرک) به ازای هر کیلو گرم غده و همزدن شدید در دمای 60 °C برای مدت زمان 30-15 دقیقه رنگبری شد و سپس کربن فعال با کاغذ صافی جدا گردید. عصاره‌ی به دست آمده با استفاده از دستگاه تغلیظ تحت خلا(Buchiwaterbath B-480 , Switzerland) تا بریکس 42 تغلیظ گردید.

به منظور رسوب مواد قندی و اینولین از عصاره‌ی تغلیظ شده، محلول اتانول 96 درصد به نسبت 8 به 1 به آن افزوده شد. سوسپانسیون حاصله برای ته نشینی کامل رسوب به مدت 2 روز در دمای 40°C قرار گرفت و سپس، الکل آن جدا گردید. رسوب به دست آمده به مدت 4 روز در آون (-854 , Memmert , W-Germany Schwabach) در دمای 50°C نگه داری و درنهایت، رسوب خشک شده آسیاب و وزن آن نسبت به غده‌های اولیه، محاسبه گردید (1و19).

2-2- آنالیز پودراینولین استخراجی

به منظور اندازه گیری قند کل موجود در نمونه‌ها از روش فنول سولفوریک اسید استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا به 1 میلی لیتر نمونه رقیق شده، 1 میلی لیتر فنول 5 درصد افزوده شد. سپس، 5 میلی لیتر اسید سولفوریک 98 درصد (مرک) به نمونه‌ها اضافه و بعد ازگذشت 20 دقیقه، جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-160A, Shimadzu Japan) در طول موج 490nm اندازه گیری شد. در این روش از گلوکز به عنوان استاندارد استفاده و بعد از رسم منحنی استاندارد، میزان قند کل موجود در نمونه، تعیین گردید (24).

برای اندازه گیری pH محلول اینولین استخراج شده، ابتدا محلول 10٪ اینولین در آب تهیه شد و بعد pH این محلول با استفاده از دستگاه pH متر الکترونیکی (Metrohm AG Herisan , Switzerland) اندازه گیری شد (16).

برای اندازه گیری درصد ماده‌ی خشک نمونه از روش (AOAC،2000a) استفاده شد(5). بدین منظور، 5 گرم نمونه در دمای100°C خشک و با استفاده از فرمول زیر، درصد ماده‌ی خشک محاسبه شد:

100×جرم نمونه اولیه /جرم نمونه خشک شده= درصد ماده خشک

برای اندازه گیری خاکستر کل از روش (AOAC، 2000b) استفاده شد (6). 5 گرم نمونه در کوره‌ی الکتریکی با دمای 550°C سوزانده شد و بعد از رسیدن به وزن ثابت، درصد خاکستر نمونه از روی وزن اولیه‌ی نمونه و وزن خاکستر حاصل طبق فرمول زیر، محاسبه گردید:

100×جرم نمونه اولیه /جرم خاکستر= درصد خاکستر

برای اندازه گیری قند احیا کننده موجود در نمونه‌ها از معرف دی نیتروسالیسیلیک اسید استفاده و مقدار قند احیاکننده نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 575nm و با استفاده از استاندارد گلوکز اندازه گیری شد (17).

میانگین درجه‌ی پلیمریزاسیون اینولین استخراج شده از تقسیم درصد وزنی قند کل[1] بر درصد وزنی قند احیا کننده به دست می‌آید و در تعیین کیفیت اینولین استخراج شده، فاکتور مهمی می‌باشد (1).

2-3- روش‌های میکروبی

جهت به دست آوردن کشت فعال باکتری‌های *لاکتوباسیلوس کازئی*(PTCC NO.:1608) و *اشرشیاکلی*(PTCC NO.:1330)، از آمپول‌های لیوفیلیزه شده تهیه شده از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران، ابتدا

[1]Total Sugar

Archive of SID

www.SID.ir

مقدار 300-400µL از محیط کشت استریل اختصاصی هر باکتری به ماده‌ی خشک موجود در آمپول افزوده شد و بعد از یکنواخت شدن، سوسپانسیون حاصله به 20 ml محیط کشت مایع منتقل گردید و در دما و شرایط مناسب آن سویه نگه داری شد.

2-3-1- بررسی قابلیت رشد و تکثیر باکتری‌ها

جهت انجام تحقیقات برای بررسی قابلیت افزایش رشد نژاد پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* و نژاد پاتوژن *اشرشیاکلی* توسط پودر اینولین استخراجی، سطح‌های 0، 1 و 2 درصد(w/v) از نمونه‌های اینولین استخراجی، اینولین تجاری (شاهد) و مونوساکاریدهای گلوکز و فروکتوز در محیط براث پایه (de Man Rogosa and Sharpe) MRS برای *لاکتوباسیلوس* و نوترینت براث برای *اشرشیاکلی* حل شدند و سپس، برای 15 min در 121 ° C اتوکلاو گردیدند (25). بعد از آماده شدن محیط کشت، مقدار 1 µl 100(1٪) از کشت فعال هر باکتری با 1 = OD[1] به 10ml از محیط کشت‌های تهیه شده اضافه گردید و در شرایط مناسب برای یک شب انکوبه گذاری شد. در پایان دوره‌ی انکوبه گذاری، میزان رشد و تکثیر باکتریایی با اندازه گیری ODدر 600 nm به دست آمد (13و 25).

2-3-2- بررسی رشد و زنده مانی باکتری‌ها

بررسی رشد و زنده مانی باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* و باکتری اشرشیاکلی از طریق شمارش سلول‌های زنده باکتریایی، روی پلیت[2]، در محیط آگاردار صورت گرفت. برای این منظور، 1 میلی لیتر از رقت تهیه شده از کشت‌های باکتریایی به پلیت منتقل گردید. بعد از گذشت دوره‌ی انکوباسیون مناسب برای هر گونه باکتریایی (48 ساعت برای *لاکتوباسیلوس کازئی* و 24 ساعت برای *اشرشیاکلی*)، شمارش کلنی‌های ظاهر شده بر سطح پلیت صورت گرفت (18).

2-3-3- اندازه گیری pH کشت‌های باکتریایی

pH کشت‌های باکتریایی به وسیله‌ی pH متر در دمای 20°C اندازه گیری شد (18).

2-4- تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز آماری داده‌ها به صورت کاملاً تصادفی و با استفاده از آزمون فاکتوریل، توسط نرم افزار SPSS vers . 16 در سطح اطمینان 99 درصد صورت گرفت و مقایسه‌ی میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD توسط نرم افزار Statisticxvers.8 در همین سطح اطمینان انجام شد.

3- نتایج و بحث

3-1- ویژگی اینولین‌های استخراج شده

اینولین استخراج شده از گیاه کاسنی غیر بومی دو ساله به صورت پودر سفید رنگ، بدون شیرینی، بی بو و فاقد طعم نامطلوب یا ته مزه خاص بوده و حلالیت آن در آب سرد پایین تر از آب گرم بود (تقریباً 5٪ حلالیت در دمای اتاق). نتایج آنالیز اینولین استخراج شده به همراه اینولین شاهد در جدول 1، آورده شده است.

با توجه به داده‌های به دست آمده مشاهده گردید که بین هر دو نمونه‌ی اینولین، اختلاف آماری معنا داری در مقدار کربوهیدرات کل وجود داشت($P<0/01$). هچنین، نمونه‌ها در مقدار قند احیا از نظر آماری اختلاف معنی داری داشتند ($P<0/01$) که مقدار قند احیا در نمونه‌ی شاهد بیش تر از اینولین استخراجی از کاسنی دوساله بود.

مقدار ماده‌ی خشک موجود در اینولین استخراجی از گیاه کاسنی دوساله و اینولین تجاری اختلاف معناداری با یکدیگر داشتند. همچنین، تیمارها در مقدار خاکستر اختلاف معنا داری را دارا بودند که خاکستر مربوط به نمونه اینولین استخراجی از نمونه‌ی شاهد بالاتر بود ($P<0/01$). pH مربوط به محلول 10٪ تهیه شده از اینولین استخراجی بالاتر از pH محلول اینولین شاهد بود (جدول 1).

مقدار اینولین موجود در اعضای خانواده‌ی کامپوزیته نظیر کاسنی در دامنه ی کم تر از 1 تا 20٪ نسبت به وزن گیاه تازه وجود دارد و بدون توجه به ساختمان اینولین (خطی یا انشعاب دار) طول زنجیره نیز متفاوت است (14). از آن جا که میزان اینولین استخراجی برابر است با تفاضل قند احیا از قند کل به دست آمده، در نتیجه، مشاهده شد که مقدار اینولین نمونه‌ی شاهد (89/725

[1] Optical Density
[2] Viable count

Archive of SID

www.SID.ir

٪) نسبت به اینولین استخراجی از کاسنی دو ساله (80/457 ٪) بیش تر بود.

میانگین درجه‌ی پلیمریزاسیون برای نمونه‌ی اینولین کاسنی دو ساله 41/98 و برای اینولین شاهد 24/03 محاسبه گردید. از آن جا که اینولین، مخلوط ناهمگنی از اولیگومرها با DPهای مختلف است، ویژگی نمونه‌های اینولین با میانگین درجه‌ی پلیمریزاسیون یا DPn تعیین می‌گردد. حداکثر درجه‌ی پلیمریزاسیون در اینولین گیاهی تقریباً پایین (کم تر از 200) می‌باشد که این حداکثر درجه و میانگین آن بستگی به عوامل متعدد از جمله نوع گیاه ، شرایط آب و هوایی و سن فیزیولوژی گیاه دارد (29). در حقیقت، علت تفاوت درDP اینولین استخراج شده مورد آزمون با اینولین شاهد نیز به تفاوت در موارد ذکر شده مربوط می‌باشد. تفاوت در DPn بین اینولین‌های مختلف، منجر به تفاوت‌های مشخص در ویژگی‌های کیفیتی و عملگرای آن‌ها می‌گردد. اینولین‌های با زنجیره طولانی از حلالیت کم تری برخوردار بوده و وقتی در آب یا شیر پخش شوند باعث تشکیل میکروکریستال‌های اینولین می‌گردند. این کریستال‌ها به طور مشخص در دهان، قابل حس نیستند ولی در تشکیل یک بافت خامه ای نرم و ایجاد یک حس دهانی مشابه چربی، دخالت دارند (16).

اینولین استخراجی از کاسنی دو ساله در مقایسه با اینولین شاهد از ارزش DPn بالایی برخوردار بود. بلوردی (1387) در تحقیق خود بر روی استخراج اینولین از گیاه سیب زمینی ترشی به درجه‌ی پلیمریزاسیونی برابر با26/31 دست یافت که ارزش DPnاین محصول بالاتر بود)1(. درجه‌ی پلیمریزاسیون بالای این اینولین خواص آن را جهت استفاده در صنایع غذایی مناسب تر می‌سازد. به طور نمونه، اینولین در صورت استفاده به عنوان جایگزین چربی با آب یا هر نوع محلول آبکی مخلوط شده و تشکیل یک شبکه‌ی ژل مانند با ساختارخامه ای می‌دهد که قابل پخش و مالش پذیر بوده و می‌تواند در محصولات غذایی جایگزین چربی گردد (11). همچنین، اینولین در ترکیب با عوامل ژل دهنده نظیر ژلاتین، آلژینات، کاراگینان و مالتودکسترین خصوصیات امولسیونی محصولاتی نظیر بستنی، سس و دسرها را بهبود بخشیده و می‌تواند در این محصولات غذایی به عنوان پایدارکننده، مورد استفاده قرار گیرد. این ویژگی‌ها مستلزم داشتن درجه‌ی پلیمریزاسیون بالا در زنجیره‌ی اینولین می‌باشد (11).

3-2- بررسی رشد وتکثیر باکتری‌های مورد آزمون

3-2-1- اثر نوع و مقدار کربوهیدرات

در بررسی اثر نوع کربوهیدرات بر دانسیته‌ی سلولی کشت‌های باکتریایی مشخص شد که بیش ترین مقدار دانسیته‌ی سلولی برای باکتری کازئی ابتدا بر روی اینولین استخراجی از کاسنی دو ساله و پس از آن بر روی اینولین تجاری و با اختلاف معنادار با هم به دست آمد ($P<0/01$). باکتری *اشرشیاکلی*، بیش ترین افزایش در دانسیته‌ی سلولی را بر روی گلوکز و بعد از آن بر روی فروکتوز نشان داد (شکل 1).

افزودن درصدهای مختلف کربوهیدرات، اثر معناداری ($P<0/01$) را بر بیومس کشت‌های باکتریایی داشت، به طوری که کشت‌های حاوی سطح 2 درصد قند افزوده شده، بالاترین دانسیته‌ی سلولی را نشان دادند (شکل 1). بدین ترتیب، مشاهده شد که روند تغییرات ODدر مورد هر دو باکتری، در درصدهای مختلف 4 کربوهیدرات، مشابه و افزایشی بود.

اثر رقابتی مصرف اینولین در مقایسه با گلوکز و فروکتوز که قندهای ساده ای هستند، قابل توجه بود. گلوکز با توجه به دریافت سریع، قابلیت بهره گیری مناسب، تبدیل انرژی سلولی[1] و اندازه‌ی مولکول آن به عنوان منبع اصلی کربن برای کلیه‌ی میکروارگانیسم‌ها شناخته شده است. با این حال، برخی باکتری‌ها با داشتن یک مکانیسم آنزیمی پیچیده به خوبی قادر به بهره گیری از کربوهیدرات‌های پیچیده جهت رشد و فعالیت‌های حیاتی خود می‌باشند (25).

در باکتری پروبیوتیک کازئی، سطح 2 درصد از هر دو اینولین، بالاترین اثر افزایشی در OD ایجاد کرده بود، درحالی که در همین سطح، مونوساکاریدهای گلوکز و فروکتوز به میزان کم تر وبا اختلاف معنادار با آن‌ها اثرگذار بودند. این مساله برای *اشرشیاکلی* کاملاً متفاوت بود و مونوساکاریدهای آزمون شده در تمام سطوح، بالاترین رشد را باعث شدند.

با توجه به تحقیقی که پینگ سو و همکاران[2] (2007) انجام دادند و اثر پری بیوتیک‌های تجاری را روی نژادهای پروبیوتیک، با اندازه گیری OD طی دوره زمانی 48 ساعت بررسی کردند مشخص گردید که *لاکتوباسیلوس کازئی* L26، حداکثر رشد را به ترتیب روی 1/5 درصد فروکتوالیگوساکاریدها، اینولین (با

[1]Cellular energy conversion
[2]Ping Su et al.

Archive of SID

www.SID.ir

میانگین درجه‌ی پلیمریزاسیون 22) و گلوکز داشت که با نتایج به دست آمده از تحقیق ما مشابه بود (25).

طبق گزارش وانگ و گیبسون[1] (1993)، *اشرشیاکلی* OD بالاتری را در تخمیر گلوکز نسبت به الیگوفروکتوزهای کاسنی نشان داد که با نتایج به دست آمده، مطابقت دارد (28).

3-3- بررسی قابلیت رشد و زنده مانی

3-3-1- اثر نوع و میزان کربوهیدرات

بیش ترین افزایش لگاریتم رشد در باکتری کازئی در حضور اینولین تجاری به دست آمد که بین این کربوهیدرات با اینولین استخراجی از نظر آماری اختلاف معناداری وجود داشت ($P<0/01$) (جدول 2). موثرترین کربوهیدرات در افزایش لگاریتم رشد سلول‌های زنده باکتری *اشرشیاکلی*، فروکتوز بود (جدول 3). به نظر می‌رسد *اشرشیاکلی* در استفاده از مونوساکاریدها نسبت به اینولین‌های بلند زنجیر موفق تر باشد. به عبارتی، اینولین کاسنی دوساله و یک ساله با درجه‌ی پلیمریزاسیون بالا شرایط را برای تغذیه *اشرشیاکلی* سخت می کنند.

بر طبق تحقیقات فوکس و گیبسون[2] (2002)، *اشرشیاکلی* مونوساکاریدها را بسیار بهتر از فروکتوالیگوساکاریدها، اینولین، گزیلوالیگوساکاریدها، لاکتولوز[3]، لاکتیتول[4]، نشاسته و دکسترین مورد تخمیر قرار می‌دهد (10). همچنین، شارپ و همکاران[5] (2001) اعلام کردند که فروکتوز بهتر از فروکتوالیگوساکاریدها به وسیله‌ی *اشرشیاکلی* مصرف می‌شود که با نتایج به دست آمده در این تحقیق، مطابقت دارد (23).

افزایش رشد و زنده مانی سلول‌های باکتریایی در حضور سطوح مختلف کربوهیدرات به این ترتیب بود که در باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* روند افزایشی تا سطح 2 درصد به طور معنادار ادامه پیدا کرد ($P<0/01$) (جدول 2). در باکتری *اشرشیاکلی*، روند افزایش لگاریتم رشد سلول‌های زنده، تا سطح 2 درصد هر دو اینولین مشاهده شد، اما با افزایش درصد قند از 1 تا 2٪، برای قندهای ساده‌ی گلوکز و فروکتوز، نمودار لگاریتم رشد دارای روند کاهشی بود. البته این روند در مورد گلوکز شدیدتر بود (جدول3).

با توجه به روند افزایشی OD از صفر تا 2 درصد، در کشت باکتری *اشرشیاکلی*، به نظر می‌رسد که تعدادی از سلول‌ها در سطح 2 درصد از بین رفته باشند. به عبارت دیگر، رشد زیاد باکتری‌ها در این سطح و به موجب آن کاهش شدید در ترکیبات غذایی محیط کشت و کاهش زیاد pH در نتیجه، تجمع اسید لاکتیک حاصل از رشد و فعالیت‌های متابولیکی باکتری‌ها در محیط ، روند معکوس در زنده مانی باکتری‌ها داشته و تعداد سلول‌های زنده را با کاهش شدید مواجه کرده است. بنابراین، می‌توان عنوان کرد افزایش کربوهیدرات به محیط کشت تا سطح مشخصی می‌تواند تعداد سلول زنده‌ی محیط را افزایش دهد(21).

طبق یافته‌های فوکس و گیبسون[6] (2002) pH پایین (3 و زیر آن)، رشد *اشرشیاکلی* را به طور کامل متوقف می کند)10(. بدین ترتیب، بیش ترین افزایش در تعداد سلول زنده‌ی باکتری *اشرشیاکلی* بر روی سطوح 1 درصد قند فروکتوز مشاهده گردید.

3-4- بررسی pH کشت‌های باکتریایی

3-4-1- اثر متقابل نوع و میزان کربوهیدرات

اسیدهای آلی علاوه بر اثر بازدارندگی بر روی باکتری‌های پاتوژن، نقش مهمی در سلامت روده‌ی بزرگ انسان ایفا می کنند (8). از هر دو نظر، تولید اسیدهای آلی به وسیله‌ی بیفیدوباکترها و لاکتوباسیلوس‌ها بسیار مهم است.

در بررسی روند تغییرات pH در باکتری کازئی رشد داده شده بر روی سطح‌های مختلف 4 کربوهیدرات مورد آزمون ملاحظه گردید که سطح 2 درصد اینولین استخراجی توانسته است کم ترین مقدار pH را نسبت به سطح 2 درصد سایر کربوهیدرات‌ها، ایجاد کند (شکل2). با توجه به روند OD که بیش ترین جذب در سطح 2 درصد این کربوهیدرات‌ها خوانده شد، به نظر می‌رسد نتایج به دست آمده، صحیح باشد (شکل 1).

فوکس و گیبسون[7] (2002) گزارش کردند که میزان اسید تولیدی به وسیله‌ی یک باکتری بستگی به منبع کربن در دسترس آن دارد. به عنوان مثال، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در حضور نشاسته و ترکیب فروکتوالیگوساکارید با اینولین مقدار 17-12 mM لاکتات و در نتیجه‌ی تخمیر فروکتوالیگوساکارید و ترکیب

[1] Wang & Gibson
[2] Fooks& Gibson
[3] Lactulose
[4] Lactitol
[5] Sharp et al.
[6] Fooks and Gibson
[7] Fooks and Gibson

Archive of SID

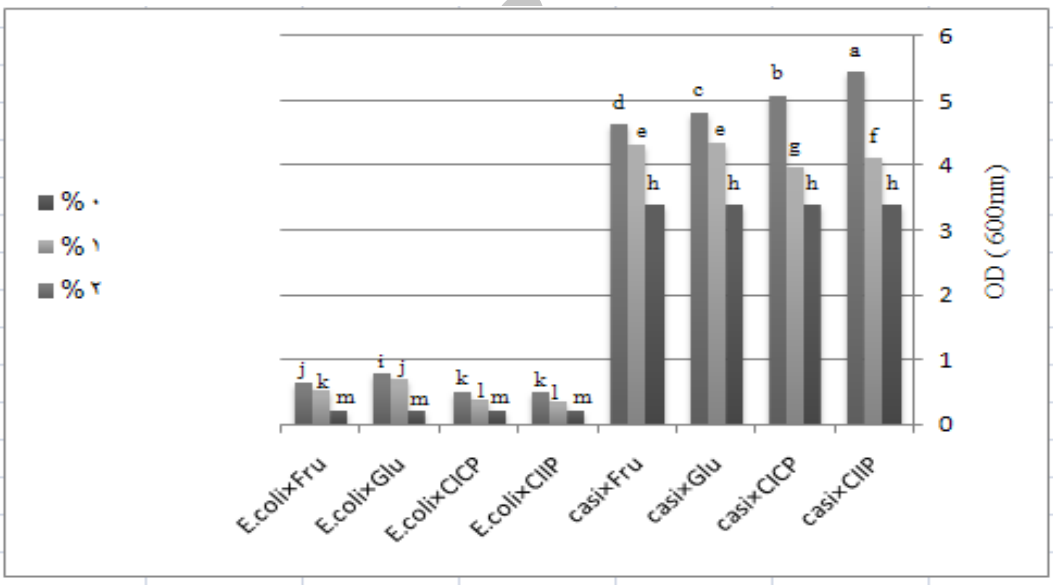
www.SID.ir

فروکتوالیگوساکارید با گزیلوالیگوساکارید مقدار 20-25 mM لاکتات تولید کرد.

جدول 1- نتایج آنالیز کمی و کیفی اینولین‌های استخراج شده و اینولین استاندارد

فاکتورهای مورد بررسی	کاسنی دو ساله	اینولین تجاری (شاهد)
میانگین درجه پلیمریزاسیون	41/98	24/03
وضعیت ظاهری	پودر سفید رنگ	پودر کرمی رنگ
٪کربوهیدرات کل	$82/417 \pm 0/466^{b*}$	$93/575 \pm 0/145^{a}$
٪ قند احیا	$1/96 \pm 0/187^{b}$	$3/85 \pm 0/043^{a}$
٪اینولین و الیگوفروکتوز	~80/457	~89/725
٪ ماده خشک	$95/32 \pm 0/45^{a}$	$90 \pm 0/586^{b}$
٪ خاکستر	$5/19 \pm 0/15^{a}$	$\sim 0/5 \pm 0/02^{b}$
pH محلول 10٪	$6/65 \pm 0/05^{a}$	$5/97 \pm 0/06^{b}$

*کمیت‌های دارای حروف غیرمشترک لاتین در هر ردیف از لحاظ آماری تفاوت معناداری با یکدیگر دارند (آزمون LSD $p < 0/01$).مقادیر همراه با اختلاف میانگین سه تکرار ذکر شده اند.



شکل 1- روند تغییرات رشد و تکثیر سلولی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* و *اشرشیاکلی* درمحیط کشت حاوی انواع و سطح‌های مختلف کربوهیدرات (CIIP : اینولین استخراجی، CICP: اینولین تجاری، Glu: گلوکز، Fru: فروکتوز) در طی دوره‌ی زمانی 24 ساعت (میانگین‌های دارای حروف مشترک درسطح 1٪ تفاوت معناداری ندارند).

www.SID.ir

جدول2- تغییرات لگاریتم رشد *لاکتوباسیلوس کازئی* در MRS براث اصلاح شده با سطح‌های مختلف دو اینولین و دو منوساکارید

نوع کربوهیدرات	غلظت کربوهیدرات (٪)	شمارش باکتریایی ($mlCFUlog^{-1}$)
CIIP	0(کنترل)	$8/490 \pm 0/36^{e}$
	1	$8/773 \pm 0/21^{d}$
	2	$9/178 \pm 0/98^{b}$
CICP	0 (کنترل)	$8/490 \pm 0/36^{e}$
	1	$9/039 \pm 0/9^{c}$
	2	$9/442 \pm 0/4^{a}$
Glu	0 (کنترل)	$8/490 \pm 0/36^{e}$
	1	$8/578 \pm 0/646^{e}$
	2	$9/171 \pm 0/82^{b}$
Fru	0 (کنترل)	$8/490 \pm 0/36^{e}$
	1	$8/695 \pm 0/22^{d}$
	2	$9/189 \pm 0/33^{b}$

میانگین‌ها دارای حروف مشترک در سطح ٪1 تفاوت آماری ندارند. مقادیر همراه با S.D. سه تکرار ذکر شده اند.

CIIP : اینولین استخراجی، CICP : اینولین تجاری، Glu: گلوکز، Fru: فروکتوز

جدول3- تغییرات لگاریتم رشد باکتری *اشرشیاکلی* در نوترینت براث اصلاح شده با سطح‌های مختلف دواینولین و دو منوساکارید

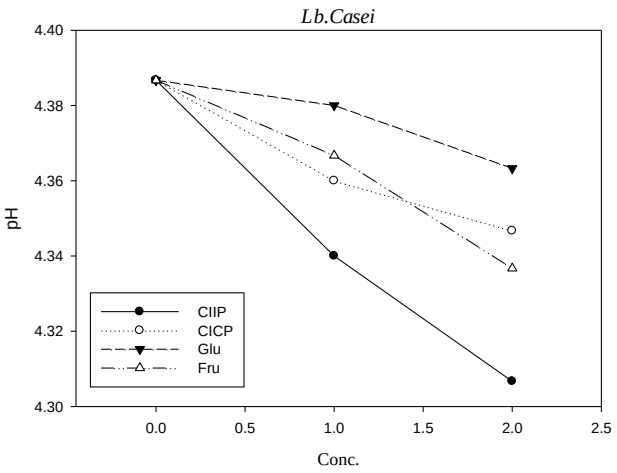
نوع کربوهیدرات	غلظت کربوهیدرات (٪)	شمارش باکتریایی ($mlCFUlog^{-1}$)
CIIP	0(کنترل)	$10/505 \pm 0/27^{f}$
	1	$10/853 \pm 0/58^{e}$
	2	$11/137 \pm 0/59^{c}$
CICP	0 (کنترل)	$10/505 \pm 0/27^{f}$
	1	$10/959 \pm 0/47^{d}$
	2	$11/339 \pm 0/4^{b}$
Glu	0 (کنترل)	$10/505 \pm 0/27^{f}$
	1	$11/354 \pm 0/21^{b}$
	2	$10/815 \pm 0/27^{e}$
Fru	0 (کنترل)	$10/505 \pm 0/27^{f}$
	1	$11/492 \pm 0/22^{a}$
	2	$11/339 \pm 0/22^{b}$

میانگین‌ها دارای حروف مشترک در سطح ٪1 تفاوت آماری ندارند. مقادیر همراه با S.D. سه تکرار ذکر شده اند.

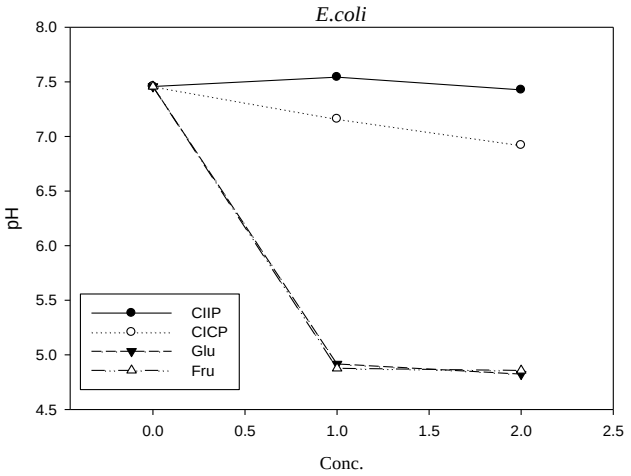
CIIP : اینولین استخراجی، CICP: اینولین تجاری، Glu: گلوکز، Fru: فروکتوز

Archive of SID

www.SID.ir



شکل 2- روند تغییرات pH باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* در محیط کشت حاوی انواع و سطوح مختلف کربوهیدرات در طی دوره‌ی زمانی 24 ساعت.



شکل3- روند تغییرات pH باکتری *اشرشیاکلی* در محیط کشت حاوی انواع و سطوح مختلف کربوهیدرات در طی دوره‌ی زمانی 24 ساعت

همچنین این محققین، عنوان نمودند که فروکتوالیگوساکارید و ترکیب فروکتوالیگوساکارید با گزیلوالیگوساکارید، سطح بالاتری از استات را (20-30 mM) بعد از 24 ساعت تولید کردند(10).

روند تغییرات pH در باکتری *اشرشیاکلی* بر روی دو مونوساکارید به این ترتیب بود که در سطح 1 درصد این دو قند کاهش شدید pH ملاحظه گردید و بعد از آن تا سطح 2 درصد مقدار pH تقریبا ثابت باقی ماند که با توجه به روند رشد باکتری بر روی گلوکز و فروکتوز، نتیجه به دست آمده توجیه پذیر است (شکل 3). تغییرات pH/*شرشیاکلی* بر روی اینولین‌ها مطابق با نتایج به دست آمده از میزان رشد این باکتری بر روی آن‌ها بود به این ترتیب که رشد کم تر باکتری بر روی این کربوهیدرات‌ها باعث کاهش کم تر pH شده بود.

در تمام موارد عنوان شده در قسمت‌های قبل به نظر می‌رسد علاوه بر میزان رشد باکتری که بر روی pH اثرگذار است، نوع سوبسترای مورد استفاده هم در میزان کاهش pH موثر باشد (27).

4- نتیجه گیری

ترکیب پری بیوتیک استخراج شده از کاسنی غیر بومی در تقویت رشد *لاکتوباسیلوس کازئی* موفق تر از منوساکاریدهای مورد بررسی و اینولین تجاری بود. این در حالی است که مونوساکاریدهای گلوکز و فروکتوز در بالا بردن رشد *اشرشیاکلی* موثرتر بودند.

بررسی سطح‌های مختلف کربوهیدرات‌های اضافه شده به محیط کشت نشان داد که اثر آن‌ها در رشد و زنده مانی نژادهای باکتریایی متفاوت است به طوری که در باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی*، جمعیت باکتریایی قابل شمارش در سطح 2٪ همه کربوهیدرات‌ها حداکثر بود. در باکتری *اشرشیاکلی*، سطح 1٪ مونوساکاریدها بیش ترین اثر را در رشد و بقاء سلول زنده باعث شد و در مورد اینولین‌ها، سطح 2٪ موثرتر بود. نتایج حاصل از این تحقیق، نشان می‌دهد که کاسنی غیر بومی ایران می‌تواند به عنوان منبع با ارزشی از اینولین مورد بهره برداری قرار گیرد. در این خصوص، مطالعات زراعی به منظور جایگزینی کاسنی دوساله با کاسنی بومی یکساله جهت دستیابی به اینولین با ویژگی‌های پری بیوتیکی با ارزش تر پیشنهاد می گردد.

5- منابع

1- بلوردی،م. 1387. تولید کامبوجیا با استفاده ازعصاره‌ی گیاهان حاوی اینولین، پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد، دانشکده‌ی مهندسی بیوسیستم کشاورزی، دانشگاه تهران.

2-زرگری، ع. 1371. گیاهان دارویی.جلد سوم، انتشارات دانشگاه تهران، چاپ پنجم، صفحه‌ی 890.

3- فخر رنجبری، ح. 1377. بررسی مواد موثره‌ی کاسنی(*Cichoriumintubes L.*). وزارت جهاد سازندگی، مرکز تحقیقات دارویی، مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام جهادسازندگی استان آذربایجان غربی، گروه گیاهان دارویی،کد طرح 03-0311001000-76.

4- کوثری، ا. 1372. استخراج و خالص سازی اینولین از گیاهان بومی ایران. مرکز تحقیقات دارویی، تهران.

Archive

www.SID.ir

artichoke fructans with ethanol using response surface methodology. *Journal of Food Chemistry*, 104 : 73–80.

20- Roberfroid, M. B. 2005. Inulin-type fructans: functional food ingredients. New York: CRC Press.

21- Roberfroid, M. B., Van Loo, J. A. E. and Gibson, G. R.1998. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *Journal of Nutrition*, 128:11-19.

22- Saengthongpinit, W. and Sajjaanantakul, T. 2005. Influence of harvest time and storage temperature on characteristics of inulin from Jerusalem artichoke tubers. *Post Harvest Biology and Technology*, 37: 93-100.

23- Sharp, R., Fishbain, S. and Macfarlane, G.T. 2001. Effect of short- chain carbohydrates on human intestinal bifidobacteria and *Escherichia coli* in vitro. *Journal of Microbial*, 50: 152-160.

24- Southgate, D. A. T. 1991. Determination of food carbohydrates. 2nded. New York: Elsevier Science Publishers Ltd. pp 232.

25- Su, P., Henriksson, A. and Mitchell, H. 2007. Selected prebiotics support the growth of probiotic mono-cultures in vitro. *Food Microbiology Anaerobe*, 13 :134–139.

26- Suzuli, M. 1993. History of fractan research. Rose to Edelman, in: Science and Technology of Fructans, Suzuki, M. and Chatterton, N.J. CRC Press, Boca R aton, FL. pp: 21-39.

27-Wada, K.1990. In vitro fermentability of oligofructose and inulin by some species of human intestinal flora.Technical report by calpis intestinal flora laboratory, available from ORAFTI, aandorenstraat ,1-B3300 ,Tienen, Belgium.

28- Wang, X. and Gibson, G. R. 1993. Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *Journal of applied eacteriology* ,75: 373-380.

5– AOAC. 2000a. *Official methods of analysis*. Method 990.20. Determination of solids by direct forced air oven drying method . 17th ed. Washington DC: AOAC.

6- AOAC. 2000b. *Official methods of analysis*. Method 945.46. Determination of ash by gravimetric method . 17th ed. Washington DC:AOAC.

7- Bortnowska, G. and Makiewicz, A.2006. Technological utility of sugar gum and xanthan for the production of low fat inulin enriched mayonnaise. *ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 5(2): 135-146.

8- Cook, S. I., and Sellin, J. H.1998. Short chain fatty acids in health and disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 12: 499–507.

9- Coussement, P. 1995. Pre-and synbiotics with inulin and oligofructose. *Food Technology Europe*, January,102-104.

10- Fooks, L. J. and Gibson, G. R.2002. In vitro investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. *FEMS Microbiology Ecology*,39:67-75

11- Frank, A. M. E. 2000. Inulin and oligofructose. In: Gibson, G. Angus,F. editors. *LFRA Ingredient Handbook: Prebiotics and Probiotics*. Surrey: Leatherhead Publishing. P 1-18.

12- Gibson, G.R. and Roberfroid, M. B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota; introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125:1401-1412.

13- Huebner,J., Wehling, R. L. and Hutkins, R.W. 2007. *Functional activity of commercial prebiotics. International Dairy Journal*, 17: 770–775

14- Kaur, N. and Gupta, A.K. 2002. Application of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Bioscience*, 27: 703-714.

15- Lingyun, W. Jianhua, W. Xiaodong, Z.H. Da, T. Yalin, Y. Chenggang, C. Tianhua, F and Fan, Z. H. 2007. Studies on the extracting technical conditions of inulin from Jerusalem artichoke tubers. *Journal of Food Engineering* , 79:1087-1093.

16- Lopez-Molina, D., Navarro-Martinez, M. D., Rojas-Melgarejo, F., Hiner, A. N., Chazarra, S., and Rodriguez-Lopez, J. N. 2005. Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke. *Phytochemistry*, 1476-1484.

17- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Annual Chemistry*, 31:426-430.

18- Paseephol,T. and Sherkat, F.2009. Probiotic stability of yoghurts containing Jerusalem artichoke inulins during refrigerated storage. *Journal of Functional Foods*, 1: 311-318

19- Paseephol, T., Small, D., Sherkat, F.2007. Process optimisation for fractionating Jerusalem

Archive of SID

www.SID.ir