

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

منیره نهاردانی^۱، مرضیه حسینی نژاد^{۲*}، امیرحسین الهامی راد^۳

^۱ دانش آموخته‌ی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار، سبزوار، ایران

^۲ استادیار پژوهشکده‌ی علوم و صنایع غذایی خراسان رضوی، مشهد، ایران

^۳ استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار، گروه علوم و صنایع غذایی، سبزوار، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۶/۱۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۲/۲۸

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 نمی‌باشد. 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 ۰، ۱ و ۲ 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 ۲ درصد نمونه‌های اینولین در افزایش دانسیته‌ی سلولی و افزایش رشد و بقاء (افزایش تقریبی ۱ Log) باکتری پروبیوتیک موثرتر بودند، درحالی که سطح ۲ درصد گلوکز و فروکتوز موجب افزایش بیش تر رشد و تکثیر/اشرشیاکلی گردید.

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

۱- مقدمه

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 (۱۱). 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 با اعمال امواج فرا صوت اشاره نمود (۱۵، ۱۶ و ۲۲). در ایران تاکنون چندین بررسی در زمینه‌ی استخراج و خالص سازی اینولین از گیاهان بومی صورت گرفته است (۳ و ۴). گیاه کاسنی اگرچه دارای منشاء مدیترانه‌ای 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 تغذیه‌ای 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 گیاه یکساله‌ی 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 کم‌تر از کاسنی اروپا برخوردار است نمی‌تواند 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.

۲- مواد و روش‌ها

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.

پری بیوتیک‌ها^۱، 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 (۱۲). امروزه، رایج ترین پری بیوتیک‌ها در اروپا، ژاپن و استرالیا، فروکتوالیگوساکاریدها^۲ و اینولین^۳ می‌باشد. اینولین و الیگوفروکتوزها ترکیبات غذایی طبیعی متعلق به یک خانواده از کربوهیدرات‌های شناخته شده تحت عنوان فروکتان‌ها، شامل یک سری از الیگو و پلی ساکاریدهای فروکتوز با پیوندهای (1→2) β می‌باشند که گلوکز قند انتهایی بیش تر زنجیره‌ها است. آرایش فضایی β در C₂ آنومریک در مونومرهای فروکتوز، مانع هضم فروکتان‌ها می‌شود و این، مسوول کم شدن مقدار کالری آن‌ها و اثرات فیبرهای رژیمی آن‌هاست (۱۴ و ۱۶). 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 تغذیه‌ای به کار می‌رود (۱۴). اینولین و الیگوفروکتوزها از طریق بهبود نظم، افزایش تناوب دفع و حجم مدفوع به بهبود عملکرد روده کمک می‌نمایند (۲۰). در ضمن، مصرف اینولین سبب کاهش تری گلیسریدها و کاهش تولید چربی نیز می‌گردد (۲۰). البته عوامل متعددی از قبیل شرایط محیطی و ویژگی‌های ژنتیکی گیاه بر میزان و کیفیت اینولین استخراجی اثرگذار است (۲).

مطالعات مختلف در شرایط آزمایشگاهی و محیطی نشان داده است که رژیم حاوی (1→2) β 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 ارگانسیم‌های پاتوژن به ویژه باکتریوئیدها، فوزوباکترها و کلستریدیا جلوگیری می‌کند (۷ و ۹).

اینولین در ۱۵٪ 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^۴ و کاسنی^۵ که در حال حاضر در بسیاری از

¹ Prebiotics

² Fructooligosaccharides (FOS)

³ Inulin

⁴ Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*)

⁵ *Cichorium intybus* L.

۲-۱- تهیه 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 ۳ لیتر آب به ازای هر کیلوگرم غده در یک مخلوط کن خرد شده و سوسپانسیون حاصل به مدت یک ساعت در دمای 90°C - 80°C قرار گرفت. پس از صاف کردن عصاره‌ی حاصل، pH سوسپانسیون عصاره با استفاده از محلول هیدروکسید کلسیم ۵ درصد (مرک آلمان) از ۶-۵ به حدود ۱۲-۱۰ رسانده شد. عصاره به مدت نیم ساعت در دمای 60° قرار گرفته و رسوب حاصل با استفاده از کاغذ صافی جدا گردید. سپس pH عصاره با محلول اسید فسفریک ۱۰ درصد (مرک) به ۹-۸ رسانده و به مدت ۲-۳ 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 ۲۰ گرم کربن فعال (مرک) به ازای هر کیلوگرم غده و همزدن شدید در دمای 60°C برای مدت زمان ۳۰-۱۵ دقیقه رنگبری شد و سپس کربن فعال با کاغذ صافی جدا گردید. عصاره‌ی به دست آمده با استفاده از دستگاه تغلیظ تحت خلأ (Buchiwatbath, Switzerland, B-480) تا بریکس ۴۲ تغلیظ گردید.

به منظور رسوب مواد قندی و اینولین از عصاره‌ی تغلیظ شده، محلول اتانول ۹۶ درصد به نسبت ۸ به ۱ به آن افزوده شد. سوسپانسیون حاصله برای ته نشینی کامل رسوب به مدت ۲ روز در دمای 40°C قرار گرفت و سپس، الکل آن جدا گردید. رسوب به دست آمده به مدت ۴ روز در آن (Memmert, 854-)، در دمای 50°C (Schwabach, W-Germany) در دمای 50°C نگه داری و در نهایت، رسوب خشک شده آسیاب و وزن آن نسبت به غده‌های اولیه، محاسبه گردید (۱۹۰۱).

۲-۳- روش‌های میکروبی

جهت به دست آوردن کشت فعال باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی (PTCC NO.: ۱۶۰۸) و اشرشیاکلی (PTCC NO.: 1330)، از آمپول‌های لیوفیلیزه شده تهیه شده از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران، ابتدا مقدار $400\text{ }\mu\text{L}$ - $300\text{ }\mu\text{L}$ از محیط کشت استریل اختصاصی هر باکتری به ماده‌ی خشک موجود در آمپول افزوده شد و بعد از یکنواخت شدن، سوسپانسیون حاصله به

۲-۲- آنالیز پودر اینولین استخراجی

به منظور اندازه گیری قند کل موجود در نمونه‌ها از روش فنول سولفوریک اسید استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا به ۱ میلی لیتر نمونه رقیق شده، ۱ میلی لیتر فنول ۵ درصد افزوده شد. سپس، ۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ۹۸ درصد (مرک) به نمونه‌ها اضافه و بعد از گذشت ۲۰ دقیقه، جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-160A, Shimadzu Japan) در طول موج 490 nm

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

برای اندازه گیری خاکستر کل از روش (AOAC, 2000b) استفاده شد (۶). ۵ 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:

۱۰۰×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 احیا کننده نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 575 nm و با استفاده از استاندارد گلوکز اندازه گیری شد (۱۷). میانگین درجه‌ی پلیمریزاسیون اینولین استخراج شده از تقسیم درصد وزنی قند کل^۱ بر درصد وزنی قند احیا کننده به دست می‌آید و در تعیین کیفیت اینولین استخراج شده، فاکتور مهمی می‌باشد (۱).

¹Total Sugar

۲۰ ml محیط کشت مایع منتقل گردید و در دما و شرایط مناسب آن سویه نگه داری شد.

۲-۳-۱- بررسی قابلیت رشد و تکثیر باکتری‌ها

جهت انجام تحقیقات برای بررسی قابلیت افزایش رشد نژاد پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی و نژاد پاتوزن/شرشیاکلی توسط پودر اینولین استخراجی، سطح‌های ۱،۰ و ۲ درصد (w/v) از نمونه‌های اینولین استخراجی، اینولین تجاری (شاهد) و مونوساکاریدهای گلوکز و فروکتوز در محیط برات پایه (de MRS (Man Rogosa and Sharpe برای لاکتوباسیلوس و نوترینت برات برای/شرشیاکلی حل شدند و سپس، برای ۱۵ min در 121°C اتوکلاو گردیدند (۲۵). بعد از آماده شدن محیط کشت، مقدار $100\ \mu\text{l}$ (۱٪) از کشت فعال هر باکتری با $\text{OD} = 1$ به ۱۰ ml 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 OD در ۶۰۰ nm به دست آمد (۱۳ و ۲۵).

۲-۳-۲- بررسی رشد و زنده مانگی باکتری‌ها

بررسی رشد و زنده مانگی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی و باکتری اشرشیاکلی از طریق شمارش سلول‌های زنده باکتریایی، روی پلیت^۲، در محیط آگاردار صورت گرفت. برای این منظور، ۱ میلی لیتر از رقت تهیه شده از کشت‌های باکتریایی به پلیت منتقل گردید. بعد از گذشت دوره‌ی انکوباسیون مناسب برای هر گونه باکتریایی (۴۸ ساعت برای لاکتوباسیلوس کازئی و ۲۴ ساعت برای اشرشیاکلی)، شمارش کلنی‌های ظاهر شده بر سطح پلیت صورت گرفت (۱۸).

۲-۳-۳- اندازه گیری pH کشت‌های باکتریایی

pH کشت‌های باکتریایی به وسیله‌ی pH متر در دمای 20°C اندازه گیری شد (۱۸).

۲-۴- 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 ۹۹ درصد صورت گرفت و مقایسه‌ی میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD توسط نرم افزار Statisticxvers.8 در همین سطح اطمینان انجام شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- 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 ۵٪ حلالیت در دمای اتاق). نتایج آنالیز اینولین استخراج شده به همراه اینولین شاهد در جدول ۱، آورده شده است.

با توجه به داده‌های به دست آمده مشاهده گردید که بین هر دو نمونه‌ی اینولین، اختلاف آماری معناداری در مقدار کربوهیدرات کل وجود داشت ($P < 0/01$). همچنین، 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 معناداری را دارا بودند که خاکستر مربوط به نمونه اینولین استخراجی از نمونه‌ی شاهد بالاتر بود ($P < 0/01$). pH مربوط به محلول ۱۰٪ تهیه شده از اینولین استخراجی بالاتر از pH محلول اینولین شاهد بود (جدول ۱).

مقدار اینولین موجود در اعضای خانواده‌ی کامپوزیته نظیر کاسنی در دامنه‌ی کم تر از ۱ تا ۲۰٪ نسبت به وزن گیاه تازه وجود دارد و بدون توجه به ساختمان اینولین (خطی یا انشعاب دار) طول زنجیره نیز متفاوت است (۱۴). 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 (۸۹/۷۲۵٪) نسبت به اینولین استخراجی از کاسنی دو ساله (۸۰/۴۵۷٪) بیش تر بود.

¹ Optical Density

² Viable count

۳-۲- بررسی رشد و تکثیر باکتری های مورد آزمون

۳-۲-۱- اثر نوع و مقدار کربوهیدرات

در بررسی اثر نوع کربوهیدرات بر دانسیته ی سلولی کشت های باکتریایی مشخص شد که بیش ترین مقدار دانسیته ی 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 /شرشیاکلی، بیش ترین افزایش در دانسیته ی سلولی را بر روی گلوکز و بعد از آن بر روی فروکتوز نشان داد (شکل ۱).

افزودن درصد های مختلف کربوهیدرات، اثر معناداری ($P < 0/01$) را بر بیومس کشت های باکتریایی داشت، به طوری که کشت های حاوی سطح ۲ درصد قند افزوده شده، بالاترین دانسیته ی سلولی را نشان دادند (شکل ۱). بدین ترتیب، مشاهده شد که روند تغییرات OD در مورد هر دو باکتری، در درصد های مختلف ۴ 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^۱ و اندازه ی مولکول آن به عنوان منبع اصلی کربن برای کلیه ی میکروارگانیسم ها شناخته شده است. با این حال، برخی باکتری ها با داشتن یک مکانیسم آنزیمی پیچیده به خوبی قادر به بهره گیری از کربوهیدرات های پیچیده جهت رشد و فعالیت های حیاتی خود می باشند (۲۵).

در باکتری پروبیوتیک کازئی، سطح ۲ درصد از هر دو اینولین، بالاترین اثر افزایشی در OD ایجاد کرده بود، در حالی که در همین سطح، مونوساکارید های گلوکز و فروکتوز به میزان کم تر و با اختلاف معنادار با آن ها اثر گذار بودند. این مساله برای /شرشیاکلی کاملاً متفاوت بود و مونوساکارید های آزمون شده در تمام سطوح، بالاترین رشد را باعث شدند.

با توجه به تحقیقی که پینگ سو و همکاران^۲ (۲۰۰۷) انجام دادند و اثر پری بیوتیک های تجاری را روی نژادهای پروبیوتیک، با اندازه گیری OD طی دوره زمانی ۴۸ ساعت بررسی کردند مشخص گردید که لاکتوباسیلوس کازئی L26، حداکثر رشد را به ترتیب روی ۱/۵ درصد فروکتوز و گالاکتوز، اینولین (با

میانگین درجه ی پلیمریزاسیون برای نمونه ی اینولین کاسنی دو ساله ۴۱/۹۸ و برای اینولین شاهد ۲۴/۰۳ محاسبه گردید. از آن جا که اینولین، مخلوط ناهمگنی از اولیگومرها با DP های مختلف است، ویژگی نمونه های اینولین با میانگین درجه ی پلیمریزاسیون یا DPn تعیین می گردد. حداکثر درجه ی پلیمریزاسیون در اینولین گیاهی تقریباً پایین (کم تر از ۲۰۰) می باشد که این حداکثر درجه و میانگین آن بستگی به عوامل متعدد از جمله نوع گیاه، شرایط آب و هوایی و سن فیزیولوژی گیاه دارد (۲۹). در حقیقت، علت تفاوت در DP اینولین استخراج شده مورد آزمون با اینولین شاهد نیز به تفاوت در موارد ذکر شده مربوط می باشد. تفاوت در DPn بین اینولین های مختلف، منجر به تفاوت های مشخص در ویژگی های کیفیتی و عملکردی آن ها می گردد. اینولین های با زنجیره طولانی از حلالیت کم تری برخوردار بوده و وقتی در آب یا شیر پخش شوند باعث تشکیل میکرو کریستال های اینولین می گردند. این کریستال ها 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 (۱۶).

اینولین استخراجی از کاسنی دو ساله در مقایسه با اینولین شاهد از ارزش DPn بالایی برخوردار بود. بلوردی (۱۳۸۷) در تحقیق خود بر روی استخراج اینولین از گیاه سیب زمینی ترشی به درجه ی پلیمریزاسیونی برابر با ۲۶/۳۱ دست یافت که ارزش DPn این محصول بالاتر بود (۱). درجه ی پلیمریزاسیون بالای این اینولین خواص آن را جهت استفاده در صنایع غذایی مناسب تر می سازد. به طور نمونه، اینولین در صورت استفاده به عنوان جایگزین چربی با آب یا هر نوع محلول آبی مخلوط شده و تشکیل یک شبکه ی ژل مانند با ساختار خامه ای می دهد که قابل پخش و مالش پذیر بوده و می تواند در محصولات غذایی جایگزین چربی گردد (۱۱). همچنین، اینولین در ترکیب با عوامل ژل دهنده نظیر ژلاتین، آلژینات، کاراگینان و مالتودکسترین خصوصیات امولسیون محمولاتی نظیر بستنی، سس و دسر ها را بهبود بخشیده و می تواند در این محصولات غذایی به عنوان پایدار کننده، مورد استفاده قرار گیرد. این ویژگی ها مستلزم داشتن درجه ی پلیمریزاسیون بالا در زنجیره ی اینولین می باشد (۱۱).

¹Cellular energy conversion

²Ping Su et al.

با توجه به روند افزایشی OD از صفر تا ۲ درصد، در کشت باکتری /شرشیاکلی، به نظر می‌رسد که تعدادی از سلول‌ها در سطح ۲ 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 ماننی 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 (۲۱). طبق یافته‌های فوکس و گیسون^۱ (۲۰۰۲) pH پایین (۳ و زیر آن)، رشد /شرشیاکلی را به طور کامل متوقف می‌کند (۱۰). بدین ترتیب، بیش‌ترین افزایش در تعداد سلول زنده‌ی باکتری /شرشیاکلی بر روی سطوح ۱ درصد قند فروکتوز مشاهده گردید.

۳-۴- بررسی pH کشت‌های باکتریایی

۳-۴-۱- اثر متقابل نوع و میزان کربوهیدرات

اسیدهای آلی علاوه بر اثر بازدارندگی بر روی باکتری‌های پاتوژن، نقش مهمی در سلامت روده‌ی بزرگ انسان ایفا می‌کنند (۸). 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 ۴ کربوهیدرات مورد آزمون ملاحظه گردید که سطح ۲ درصد اینولین استخراجی توانسته است کم‌ترین مقدار pH را نسبت به سطح ۲ درصد سایر کربوهیدرات‌ها، ایجاد کند (شکل ۲). با توجه به روند OD که بیش‌ترین جذب در سطح ۲ درصد این کربوهیدرات‌ها خوانده شد، به نظر می‌رسد نتایج به دست آمده، صحیح باشد (شکل ۱).

فوکس و گیسون^۲ (۲۰۰۲) گزارش کردند که میزان اسید تولیدی به وسیله‌ی یک باکتری بستگی به منبع کربن در دسترس آن دارد. به عنوان مثال، لاکتوباسیلوس پلانٹاروم در حضور نشاسته و ترکیب فروکتوالیگوساکارید با اینولین مقدار ۱۷-۱۲ لاکتات و در نتیجه‌ی تخمیر فروکتوالیگوساکارید و ترکیب فروکتوالیگوساکارید با گزیلوالیگوساکارید مقدار ۲۵-۲۰ لاکتات تولید کرد.

میانگین درجه‌ی پلیمریزاسیون (۲۲) و گلوکز داشت که با نتایج به دست آمده از تحقیق ما مشابه بود (۲۵).

طبق گزارش وانگ و گیسون^۱ (۱۹۹۳)، /شرشیاکلی OD بالاتری را در تخمیر گلوکز نسبت به الیگوفروکتوزهای کاسنی نشان داد که با نتایج به دست آمده، مطابقت دارد (۲۸).

۳-۳- بررسی قابلیت رشد و زنده ماننی

۳-۳-۱- اثر نوع و میزان کربوهیدرات

بیش‌ترین 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 ۲). موثرترین کربوهیدرات در افزایش لگاریتم رشد سلول‌های زنده باکتری /شرشیاکلی، فروکتوز بود (جدول ۳). به نظر می‌رسد /شرشیاکلی در استفاده از مونوساکاریدها نسبت به اینولین‌های بلند زنجیر موفق‌تر باشد. به عبارتی، اینولین کاسنی دوساله و یک‌ساله با درجه‌ی پلیمریزاسیون بالا شرایط را برای تغذیه /شرشیاکلی سخت می‌کنند.

بر طبق تحقیقات فوکس و گیسون^۲ (۲۰۰۲)، /شرشیاکلی مونوساکاریدها را بسیار بهتر از فروکتوالیگوساکاریدها، اینولین، گزیلوالیگوساکاریدها، لاکتولوز^۳، لاکتیتول^۴، نشاسته و دکسترین مورد تخمیر قرار می‌دهد (۱۰). همچنین، شارپ و همکاران^۵ (۲۰۱۱) اعلام کردند که فروکتوز بهتر از فروکتوالیگوساکاریدها به وسیله‌ی /شرشیاکلی مصرف می‌شود که با نتایج به دست آمده در این تحقیق، مطابقت دارد (۲۳).

افزایش رشد و زنده ماننی سلول‌های باکتریایی در حضور سطوح مختلف کربوهیدرات به این ترتیب بود که در باکتری لاکتوباسیلوس کازئی روند افزایشی تا سطح ۲ درصد به طور معنادار ادامه پیدا کرد ($P < 0/01$) (جدول ۲). در باکتری /شرشیاکلی، روند افزایش لگاریتم رشد سلول‌های زنده، تا سطح ۲ درصد هر دو اینولین مشاهده شد، اما با افزایش درصد قند از ۱ تا ۲٪، برای قندهای ساده‌ی گلوکز و فروکتوز، نمودار لگاریتم رشد دارای روند کاهشی بود. البته این روند در مورد گلوکز شدیدتر بود (جدول ۳).

¹Wang & Gibson

²Fooks & Gibson

³Lactulose

⁴Lactitol

⁵Sharp et al.

⁶ Fooks and Gibson

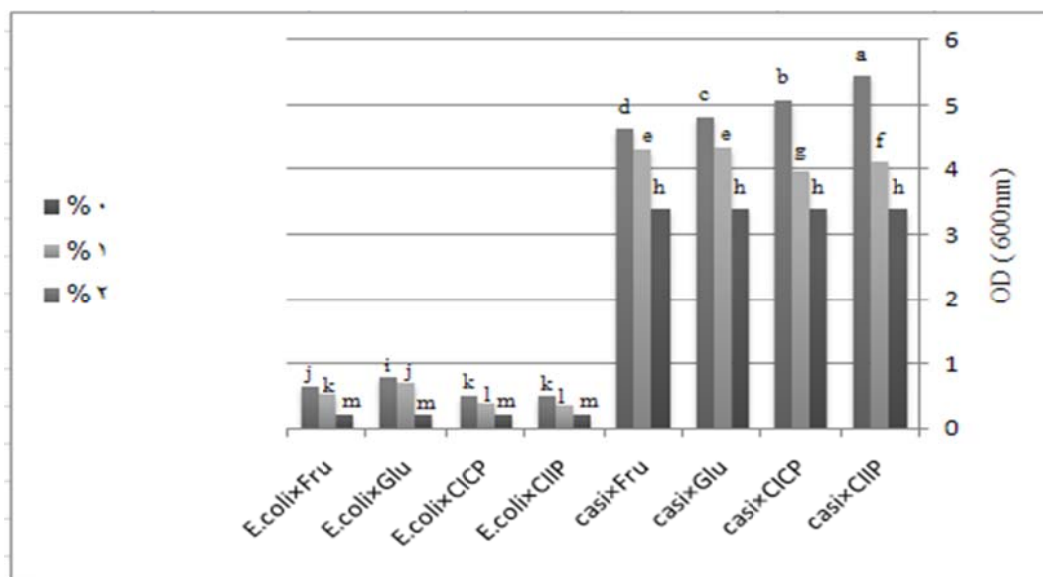
⁷ Fooks and Gibson

جدول ۱- نتایج آنالیز کمی و کیفی اینولین های استخراج شده و اینولین استاندارد

فاکتورهای مورد بررسی	کاسنی دو ساله	اینولین تجاری (شاهد)
میاتگین درجه پلیمریزاسیون	۴۱/۹۸	۲۴/۰۳
وضعیت ظاهری	پودر سفید رنگ	پودر کرمی رنگ
% کربوهیدرات کل	۸۲/۴۱۷ ± ۰/۴۶۶ ^{b*}	۹۳/۵۷۵ ± ۰/۱۴۵ ^a
% قند احیا	۱/۹۶ ± ۰/۱۸۷ ^b	۳/۸۵ ± ۰/۰۴۳ ^a
% اینولین و الیگوفروکتوز	~۸۰/۴۵۷	~۸۹/۷۲۵
% ماده خشک	۹۵/۳۲ ± ۰/۴۵ ^a	۹۰ ± ۰/۵۸۶ ^b
% خاکستر	۵/۱۹ ± ۰/۱۵ ^a	~ ۰/۵ ± ۰/۰۲ ^b
pH محلول ۱۰٪	۶/۶۵ ± ۰/۰۵ ^a	۵/۹۷ ± ۰/۰۶ ^b

*کمیت های دارای حروف غیرمشترک لاتین در هر ردیف از لحاظ آماری تفاوت معناداری با یکدیگر دارند (آزمون LSD

، p < ۰/۰۱). مقادیر همراه با اختلاف میانگین سه تکرار ذکر شده اند.



شکل ۱- روند تغییرات رشد و تکثیر سلولی باکتری های لاکتوباسیلوس کازنی و اشرشیاکلی در محیط کشت حاوی انواع و سطح های مختلف کربوهیدرات (ClIP : اینولین استخراجی، ClCP : اینولین تجاری، Glu : گلوکز، Fru : فروکتوز) در طی دوره ی زمانی ۲۴ ساعت (میانگین های دارای حروف مشترک در سطح ۱٪ تفاوت معناداری ندارند).

جدول ۲- تغییرات لگاریتم رشد لاکتوباسیلوس کازئی در MRS بر اث اصلاح شده با سطح‌های مختلف دو اینولین و دو منوساکارید

شمارش باکتریایی ^{-۱} (mlCFUlog)	غلظت کربوهیدرات (%)	نوع کربوهیدرات
۸/۴۹۰ ± ۰/۳۶ ^e	۰ (کنترل)	CIIP
۸/۷۷۳ ± ۰/۲۱ ^d	۱	
۹/۱۷۸ ± ۰/۹۸ ^b	۲	
۸/۴۹۰ ± ۰/۳۶ ^e	۰ (کنترل)	CICP
۹/۰۳۹ ± ۰/۹ ^c	۱	
۹/۴۴۲ ± ۰/۴ ^a	۲	
۸/۴۹۰ ± ۰/۳۶ ^e	۰ (کنترل)	Glu
۸/۵۷۸ ± ۰/۶۴۶ ^e	۱	
۹/۱۷۱ ± ۰/۸۲ ^b	۲	
۸/۴۹۰ ± ۰/۳۶ ^e	۰ (کنترل)	Fru
۸/۶۹۵ ± ۰/۲۲ ^d	۱	
۹/۱۸۹ ± ۰/۳۳ ^b	۲	

میانگین‌ها دارای حروف مشترک در سطح ۱٪ تفاوت آماری ندارند. مقادیر همراه با S.D. سه تکرار ذکر شده اند.

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

جدول ۳- تغییرات لگاریتم رشد باکتری اشرشیاکلی در نوترینت بر اث اصلاح شده با سطح‌های مختلف دو اینولین و دو منوساکارید

شمارش باکتریایی ^{-۱} (mlCFUlog)	غلظت کربوهیدرات (%)	نوع کربوهیدرات
۱۰/۵۰۵ ± ۰/۲۷ ^f	۰ (کنترل)	CIIP
۱۰/۸۵۳ ± ۰/۵۸ ^e	۱	
۱۱/۱۳۷ ± ۰/۵۹ ^c	۲	
۱۰/۵۰۵ ± ۰/۲۷ ^f	۰ (کنترل)	CICP
۱۰/۹۵۹ ± ۰/۴۷ ^d	۱	
۱۱/۳۳۹ ± ۰/۴ ^b	۲	
۱۰/۵۰۵ ± ۰/۲۷ ^f	۰ (کنترل)	Glu
۱۱/۳۵۴ ± ۰/۲۱ ^b	۱	
۱۰/۸۱۵ ± ۰/۲۷ ^e	۲	
۱۰/۵۰۵ ± ۰/۲۷ ^f	۰ (کنترل)	Fru
۱۱/۴۹۲ ± ۰/۲۲ ^a	۱	
۱۱/۳۳۹ ± ۰/۲۲ ^b	۲	

میانگین‌ها دارای حروف مشترک در سطح ۱٪ تفاوت آماری ندارند. مقادیر همراه با S.D. سه تکرار ذکر شده اند.

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

در تمام موارد عنوان شده در قسمت های قبل به نظر می رسد علاوه بر میزان رشد باکتری که بر روی pH اثر گذار است، نوع سوبسترای مورد استفاده هم در میزان کاهش pH موثر باشد (۲۷).

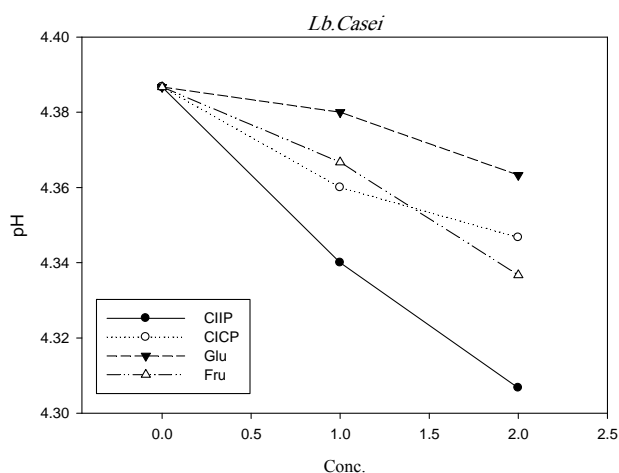
۴- نتیجه گیری

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 منوساکاریدهای گلوکز و فروکتوز در بالا بردن رشد/شرشیاکلی موثرتر بودند.

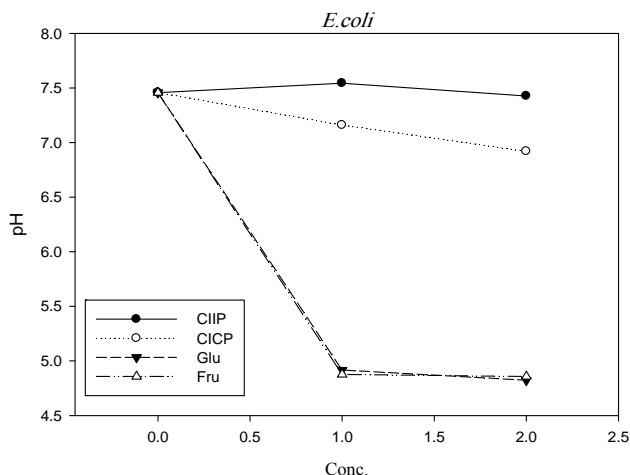
بررسی سطح های مختلف کربوهیدرات های اضافه شده به محیط کشت نشان داد که اثر آن ها در رشد و زنده ماننی نژادهای باکتریایی متفاوت است به طوری که در باکتری لاکتوباسیلوس کازئی، جمعیت باکتریایی قابل شمارش در سطح ۲٪ همه کربوهیدرات ها حداکثر بود. در باکتری/شرشیاکلی، سطح ۱٪ منوساکاریدها بیش اثر را در رشد و بقاء سلول زنده باعث شد و در مورد اینولین ها، سطح ۲٪ موثرتر بود. نتایج حاصل از این تحقیق، نشان می دهد که کاسنی غیر بومی ایران می تواند 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 ویژگی های پری بیوتیکی با ارزش تر پیشنهاد می گردد.

۵- منابع

- ۱- بلوردی، م. ۱۳۸۷. تولید کامبوجیا با استفاده از عصاره گیاهان حاوی اینولین، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده مهندسی بیوسیستم کشاورزی، دانشگاه تهران.
- ۲- زرگری، ع. ۱۳۷۱. گیاهان دارویی. جلد سوم، انتشارات دانشگاه تهران، چاپ پنجم، صفحه ۸۹۰.
- ۳- فخر رنجبری، ح. ۱۳۷۷. بررسی مواد موثره 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 ۰۳-۰۳۱۱۰۰۱۰۰۰-۷۶.
- ۴- کوثری، ا. ۱۳۷۲. استخراج و خالص سازی اینولین از گیاهان بومی ایران. مرکز تحقیقات دارویی، تهران.



شکل ۲- روند تغییرات pH باکتری لاکتوباسیلوس کازئی در محیط کشت حاوی انواع و سطوح مختلف کربوهیدرات در طی دوره ۲۴ ساعته.



شکل ۳- روند تغییرات pH باکتری/شرشیاکلی در محیط کشت حاوی انواع و سطوح مختلف کربوهیدرات در طی دوره ۲۴ ساعته

همچنین این محققین، عنوان نمودند که فروکتوالیگوساکارید و ترکیب فروکتوالیگوساکارید با گزیلوالیگوساکارید، سطح بالاتری از استات را (۲۰-۳۰ mM) بعد از ۲۴ ساعت تولید کردند (۱۰).
روند تغییرات pH در باکتری/شرشیاکلی بر روی دو منوساکارید به این ترتیب بود که در سطح ۱ درصد این دو قند کاهش شدید pH ملاحظه گردید و بعد از آن تا سطح ۲ درصد مقدار pH تقریباً ثابت باقی ماند که با توجه به روند رشد باکتری بر روی گلوکز و فروکتوز، نتیجه به دست آمده توجیه پذیر است (شکل ۳). تغییرات pH/شرشیاکلی بر روی اینولین ها مطابق با نتایج به دست آمده از میزان رشد این باکتری بر روی آن ها بود به این ترتیب که رشد کم تر باکتری بر روی این کربوهیدرات ها باعث کاهش کم تر pH شده بود.

- 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 ORAFIT, 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