استخراج اینولین از گیاه دارویی کاسنی و بررسی اثرآن بر رشد *Lactobacillus rhamnosus*

منیره نهاردانی[1*]، مرضیه حسینی‌نژاد[2]، امیرحسین الهامی‌راد[3]، زهرا پورفلاح[1]

[1] دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاداسلامی واحد سبزوار، سبزوار، ایران

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

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۸/۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۱۴

چکیده

پری بیوتیک‌ها ترکیبات غذایی غیرقابل هضمی هستند که هدف گروه‌های خاص در میکروفلور موجود در روده‌ی بزرگ انسان می‌باشند. پری بیوتیک‌های کارآمد نیاز به تخمیر خاص در ناحیه معده‌ای- روده‌ای دارند که در نتیجه آن قادر به اصلاح کردن ترکیب میکروفلور مدفوع به سمت یک ساختار زیستی سالم‌تر هستند. این پژوهش با هدف بررسی اثرات پری بیوتیکی اینولین استخراجی از گیاه دارویی کاسنی چندساله صورت گرفت. اینولین طبیعی موجود در ریشه کاسنی استخراج شد. افزایش رشد و فعالیت باکتری پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* و باکتری پاتوژن *E.coli* تحت تاثیر ترکیب پری بیوتیکی استخراجی در درصدهای مختلف صفر، ۱، ۱/۵ و۲ مورد بررسی قرار گرفت و با پودر اینولین خالص تجاری و دو مونوساکارید گلوکز و فروکتوز مقایسه گردید. نتایج حاصل ازجذب‌سنجی نشان داد که سطح ۲ درصد اینولین در افزایش دانسیته سلولی باکتری‌های پروبیوتیک *L.rhamnosus* موثر بودند و در مقابل سطح ۲ درصد گلوکز و فروکتوز در روند افزایشی دانسیته سلولی اشرشیاکلی مؤثرتر می‌باشند. در بررسی رشد و بقای سلول‌های باکتریایی، تعداد باکتری زنده *L.rhamnosus* ، در سطح ۱/۵ درصد، 10^{10} CFU ml^{-1} گزارش گردید که افزایش تقریبی ۰/۷ Log سلول زنده را نسبت به سطح صفر داشت که بیشترین افزایش در این سطح مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: پری بیوتیک، اینولین، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، کاسنی .

* مسوول مکاتبه: monireh.nahardani @yahoo.com

۱- مقدمه

امروزه به خاطر افزایش آگاهی عمومی نسبت به رابطه بین غذا و سلامت، مصرف کننده‌های مواد غذایی علاقه بیشتری به غذاهایی که علاوه بر رفع نیاز تغذیه‌ای، اثر مثبت بر سلامت داشته باشد، پیدا کرده‌اند. تقاضای مصرف کننده، سازندگان مواد غذایی را به سمت تولید فراورده‌های جدید با افزایش ویژگی‌های سلامتی‌زا سوق داده است. در بین غذاهای فراویژه، فراورده‌های حاوی ترکیبات پری بیوتیک که تقریبا غیرقابل هضم در ناحیه معده‌ای- روده‌ای هستند، نوید بخش می‌باشند. این ترکیبات، اثرات سودمند بر سلامت و تندرستی انسان از طریق توسعه رشد بیفیدوباکترها و لاکتوباسیلوس‌ها در کلون دارند (۶). در حال حاضر توجه ویژه‌ای به ترکیب کردن پری بیوتیک‌ها با باکتری‌های پروبیوتیک تحت عنوان مواد غذایی سینبیوتیک[1]، برای افزایش ویژگی‌های فراسودمند و سلامت زا معطوف شده است (۱۲و۱۵). پری بیوتیک‌ها دارای مزایای تکنولوژیکی به خاطر مقدار کالری کم، عدم ایجاد پوسیدگی در دندان[2] و جایگزینی چربی می‌باشند. بیشتر پری بیوتیک‌ها از منابع گیاهی طبیعی مانند پیاز، سیر، گندم و.. سرچشمه می‌گیرند، اما برخی از آنها از طریق روش‌های آنزیماتیک و یا از طریق تکنیک‌های بیوتکنولوژیکی خاص تولید می‌شوند (۱۱و ۲۰).

حرکت به سمت پرو و پری بیوتیک و درنهایت سینبیوتیک ابزار امیدبخشی برای توسعه غذاهای فراسودمند است. القای رشد باکتری‌های پروبیوتیک در انسان با استفاده از کربوهیدرات‌های رژیمی برای افزایش بقای گونه‌های باکتریایی خاص، منجر به ممانعت از رشد پاتوژن‌ها و کاهش ریسک عفونت‌های روده‌ای شده است.

در حال حاضر رایج ترین نوع پری بیوتیک‌ها در اروپا، ژاپن و استرالیا، فروکتوالیگوساکاریدها و اینولین[3] هستند و تحقیقات نیز بیشتر بر روی این ترکیبات متمرکز شده است. الیگوفروکتوزها فیبرهای غذایی محلول و قابل تخمیری هستند که متعلق به خانواده فراکتان‌ها می‌باشند (۱۶).

امروزه دو گونه مناسب برای تولید اینولین، سیب‌زمینی‌ترشی (*Jerusalem Artichoke*) و کاسنی (*Cichorium intybus L*) می‌باشند که کاسنی بیشتر به عنوان منبع اینولین به کار رفته است(۵).

اینولین و الیگوفروکتوزها از طریق بهبود هضم، افزایش تناوب دفع و حجم مدفوع به بهبود عملکرد روده کمک می‌نمایند. در ضمن مصرف اینولین سبب کاهش تری‌گلیسریدها و کاهش تولید چربی نیز می‌گردد (۱۶). امروزه اینولین به طور موفقیت‌آمیزی برای جایگزینی چربی و قند با مزایایی از جمله، میزان کالری کمتر، غنی‌سازی با فیبرهای غذایی و دیگر ویژگی‌های تغذیه‌ای نیز به کار می‌رود (۸).

این پژوهش با هدف استخراج اینولین از کاسنی چند ساله غیر بومی با استفاده از روش رسوب دهی با حلال اتانول به عنوان روشی قدیمی، ساده و ارزان و بررسی مقایسه‌ای اثرات پری‌بیوتیکی اینولین استخراجی بر رشد یک گونه باکتری پروبیوتیک (*L.rhamnosus*) و یک نژاد پاتوژن (*E.coli*) صورت گرفته است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد اولیه

برای استخراج اینولین، ریشه‌های کاسنی چند ساله (*Cichorium intybus*)، که بذر آن قبلاً از مجارستان آورده شده و در مزرعه تحقیقاتی پارک علم و فناوری خراسان کشت گردیده بود، در زمان برداشت تهیه گردید. ریشه‌ها پس از برداشت، به منظور حذف آلودگی‌ها، با آب سرد شسته و بعد از خشک شدن آب از سطح آن‌ها در دمای ۴°C نگهداری شدند.

۲-۲- استخراج اینولین

کاسنی‌ها با ۳ لیتر آب به ازای هر کیلوگرم غده در یک مخلوط کن خرد شدند. سوسپانسیون حاصل به مدت یک ساعت در دمای ۹۰°C-۸۰ قرار گرفت و عصاره حاصل صاف شد. pH عصاره با استفاده از محلول هیدروکسید کلسیم ۵ درصد به حدود ۱۲- ۱۰ رسانده شد، عصاره به مدت نیم ساعت در دمای ۶۰°C- ۵۰ قرار گرفت و رسوب حاصل جدا گردید. سپس pH عصاره با محلول اسید فسفریک ۱۰ درصد (مرک) به ۹- ۸ رسید و به مدت ۳- ۲ ساعت در دمای ۶۰ °C نگهداری، سپس رسوب ایجاد شده جدا گردید. عصاره تصفیه شده با افزودن ۲۰ گرم کربن فعال به ازای هر کیلو گرم غده و همزدن شدید در دمای ۶۰ °C برای

[1]Synbiotic
[2]Non-Cariogeni
[3] Inulin

مدت زمان ۳۰- ۱۵ دقیقه رنگبری شد. میزان ماده جامد محلول عصاره بدست آمده با استفاده از دستگاه تغلیظ تحت خلا (Buchi waterbath B-48, Switzerland) به بریکس ۴۲ رسید (۱و۱۴).

برای رسوب مواد قندی و اینولین، به عصاره تغلیظ شده به نسبت ۸ به ۱ اتانول ۹۶ درصد اضافه شد. سوسپانسیون حاصل برای ته نشینی کامل رسوب به مدت ۲ روز در دمای $40\ ^oC$ قرار گرفت و بعد از آن الکل جدا گردید. برای خشک شدن، رسوب به مدت ۴ روز در دمای $50\ ^oC$ نگهداری شد. رسوب خشک شده در پایان آسیاب گردید و وزن نهایی آن نسبت به غده‌های اولیه بدست آمد (۱).

۲-۳- آنالیز پودر اینولین استخراجی

قند کل موجود در نمونه‌ها با روش فنول سولفوریک اسید تعیین گردید (۱۸). برای اندازه‌گیری قند احیا کننده موجود در نمونه‌ها از معرف دی نیتروسالیسیلیک اسید[1] استفاده شد و مقدار قند احیاکننده نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۷۵nm و با استفاده از استاندارد گلوکز اندازه‌گیری شد (۱۰). میانگین درجه پلیمریزاسیون اینولین استخراج شده از تقسیم درصد وزنی قند کل بر درصد وزنی قند احیا کننده بدست می‌آید که در تعیین کیفیت اینولین استخراج شده فاکتور مهمی می‌باشد. برای اندازه‌گیری pH محلول اینولین استخراج شده، ابتدا محلول ۱۰٪ اینولین در آب تهیه و سپس pH این محلول با استفاده از دستگاه pH متر الکترونیکی (Metrohm AG Herisan, Switzerland) اندازه‌گیری شد (۹). درصد ماده خشک نمونه با روش (AOAC،2000a) اندازه‌گیری گردید (۲). برای اندازه‌گیری خاکستر کل از روش (AOAC،2000b) استفاده شد (۳).

۲-٤- روش‌های میکروبی

۲-٤-۱- بررسی قابلیت تخمیر در محیط مایع

قابلیت افزایش رشد نژاد پروبیوتیک *L.rhamnosus* و نژاد پاتوژن *E.coli* در محیط کشت پایه تکمیل شده با نمونه اینولین استخراجی، اینولین کاسنی تجاری (استاندارد) و مونوساکاریدهای گلوکز و فروکتوز در سطح‌های صفر، ۱، ۱/۵ و ۲ درصد بررسی شد. برای تهیه محیط کشت مورد نظر، همه کربوهیدرات‌های مورد بررسی در درصدهای مختلف در محیط مایع پایه حل شدند (MRS broth برای لاکتوباسیلوس رامنوسوس و Nutrient broth برای اشرشیاکلی) و سپس برای ۱۵ دقیقه در $121\ ^oC$ اتوکلاو شدند (۲۳). بعد از آماده شدن محیط کشت، مقدار ۱۰۰ µl (۱٪) از کشت فعال هر باکتری با OD = ۱ به ۱۰ ml از محیط کشت‌های تهیه شده اضافه گردید و در شرایط مناسب برای یک شب انکوبه گذاری شد. در پایان دوره گرمخانه‌گذاری، میزان رشد و تکثیر باکتریایی با اندازه‌گیری OD در ۶۰۰ nm بدست آمد (۷و۱۹).

۲-٤-۲- بررسی رشد و بقای باکتری‌ها

بررسی رشد و بقای باکتری *L.rhamnosus* و باکتری *E.coli* از طریق شمارش سلول‌های زنده باکتریایی روی پلیت[2] در محیط آگار صورت گرفت. برای این منظور یک میلی‌لیتر از رقت تهیه شده از کشت‌های باکتریایی، به پلیت‌ها منتقل گردید. بعد از گذشت دوره گرمخانه گذاری مناسب برای هر گونه باکتریایی، شمارش کلنی‌های ظاهر شده بر سطح پلیت صورت گرفت (۱۳).

۲-٤-۳- بررسی pH کشت‌های باکتریایی

pH کشت‌های باکتریایی توسط pH متر در دمای 20^oC اندازه‌گیری شد (۱۳).

۲-۵- تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از جدول ANOVA در قالب طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی و سطح معنی‌داری $P<0/01$ انجام پذیرفت. از آزمون حداقل اختلاف معنی داری (LSD) بین میانگین‌ها نیز استفاده گردید. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار Statisticx vers. 8 انجام و نمودارها نیز توسط نرم افزار Sigma plot ver۱۰ و Office۲۰۰۷ ترسیم شدند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- خصوصیات کمی وکیفی اینولین استخراج شده

اینولین استخراجی به صورت پودر سفید رنگی بود که محلول ۱۰٪ آن pH معادل ۶/۶۵ داشت. میزان ماده خشک اینولین بدست

[1] Dinitro Salicylic Acid

[2] Viable Count

آمده ۹۵/۳۲ درصد بود. نتایج آزمایش فنول سولفوریک اسید نشان داد که در پودر اینولین استخراجی ۸۲/۴۱ ٪ کربوهیدرات وجود داشت. مقدار کربوهیدرات موجود در پودر اینولین استاندارد ۹۳/۵۷۵٪ اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری میزان کربوهیدرات احیاکننده به روش DNS مشخص نمود که مقدار قند احیاکننده در اینولین بدست آمده از کاسنی دو ساله برابر با ۱/۹۶٪ و در اینولین استاندارد ۳/۸۵٪ بود. میانگین درجه پلیمریزاسیون برای اینولین کاسنی دوساله ۴۱/۹۸ و برای اینولین استاندارد ۲۴/۰۳ محاسبه گردید. خاکستر اینولین استخراجی ۵/۱۹٪ بود. نتایج بدست آمده از آنالیز پودرهای اینولین استخراجی با نتایج ذکر شده در منابع علمی تشابه زیادی داشت (۱،۱۳و۱۴).

۳-۲- بررسی قابلیت تخمیر در محیط مایع

۳-۲-۱- اثر نوع کربوهیدرات

بررسی اثر نوع کربوهیدرات بر دانسیته نوری (OD[1]) کشت‌های باکتریایی نشان داد که در باکتری *L.rhamnosus*، بیشترین افزایش در OD، در محیط حاوی اینولین استخراجی و بعد از آن گلوکز مشاهده شد که بین این دو کربوهیدرات اختلاف معنی داری وجود داشت (P<۰/۰۱) (شکل ۱). در خصوص باکتری *E.coli* بیشترین افزایش در دانسیته سلولی در محیط حاوی گلوکز و بعد از آن فروکتوز مشاهده گردید. در خصوص باکتری *E.coli*، کمترین مقدار OD در محیط حاوی اینولین استخراج شده قرائت شد که اختلاف معنی داری بین آن با گلوکز در سطح ۰/۰۱ وجود داشت (شکل ۱).

اثر رقابتی مصرف اینولین در مقایسه با گلوکز و فروکتوز که قندهای ساده‌ای هستند قابل توجه بود. گلوکز با توجه به دریافت سریع، قابلیت بهره گیری مناسب، تبدیل انرژی سلول[2] و اندازه مولکول به عنوان منبع اصلی کربن برای کلیه میکروارگانیسم‌ها شناخته شده است. با این حال برخی باکتری‌ها با داشتن یک مکانیسم آنزیمی پیچیده به خوبی قادر به بهره‌گیری از کربوهیدرات‌های پیچیده جهت رشد و فعالیت‌های حیاتی خود می‌باشند (۱۹). به نظر می‌رسد *E.coli* در استفاده از مونوساکاریدها نسبت به اینولین‌های بلند زنجیره موفق‌تر بوده است. به عبارتی اینولین کاسنی دوساله با درجه پلیمریزاسیون بالا شرایط را برای تغذیه *E.coli* سخت می‌کند (۴). *L.rhamnosus* بهتر از باکتری *E.coli* توانسته است از اینولین کاسنی دو ساله با درجه پلیمریزاسیون بالا استفاده نماید که به نظر می‌رسد این ویژگی مربوط به سیستم متابولیکی و آنزیم‌هایی باشد که این سویه پروبیوتیک دارای آنها است.

۳-۲-۲- اثر میزان کربوهیدرات

افزودن درصدهای مختلف کربوهیدرات اثر افزایشی بر دانسیته سلولی کشت‌های باکتریایی داشت، به طوری که کشت‌های حاوی سطح ۲ درصد قند، بیشترین افزایش را در OD نشان دادند. در باکتری *L.rhamnosus* درسطوح ۱/۵ و ۲ درصد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۱) و میزان OD باکتری *E.coli* تنها در سطح صفر درصد دارای تفاوت معنی‌دار (P<۰/۰۱) با بقیه سطوح بود (شکل۲).

۳-۲-۳- اثرمتقابل نوع و میزان کربوهیدرات بر رشد و تکثیر باکتریایی

در مطالعه اثر متقابل پارامترهای مورد بررسی بر رشد باکتری‌های مورد نظر مشخص گردید که روند تغییرات OD در هر دو باکتری، در درصدهای مختلف ۴ کربوهیدرات، افزایشی بود(شکل۳و۴). در باکتری پروبیوتیک *L.rhamnosus*، بیشترین افزایش در مقدار OD در سطح ۲ درصد اینولین استخراجی از کاسنی چندساله بود. ضمن اینکه سطوح ۱/۵ و ۲ درصد CIIP اختلاف معنی داری با هم نداشتند (P>۰/۰۱). در باکتری پاتوژن *E.coli* قند گلوکز و بعد از آن فروکتوز بیشترین تاثیر را بر میزان دانسیته سلولی نشان داد.

به طور کلی یک کربوهیدرات زمانی می‌تواند به عنوان پری بیوتیک مورد ارزیابی قرار گیرد که توسط گونه‌های بیفیدوباکتر و لاکتوباسیلوس‌ها (نظیر *L.casei* و *L.rhamnosus*) با کارایی بیشتری نسبت به سایر میکروارگانیسم‌ها مانند *E.coli* مورد سوخت و ساز قرار گیرد(۶).

[1] Optical Density
[2] Cellular energy conversion

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

فاکتورهای اندازه‌گیری شده	اینولین کاسنی دو ساله	اینولین تجاری
میانگین درجه پلیمریزاسیون	۴۱/۹۸	۲۴/۰۳
٪کربوهیدرات کل	۸۲/۴۱۷ ± ۰/۴۶۶	۹۳/۵۷۵ ± ۰/۲۰۵
٪ قند احیا	۱/۹۶ ±۰/۱۸۷	۳/۸۵ ± ۰/۰۴۳
٪ ماده خشک	۹۵/۳۲ ± ۰/۶۳۶	~ ۹۰
٪ خاکستر	۵/۱۹ ± ۰/۲۱۲	≤ ۰/۵
pH محلول ۱۰٪	۶/۶۵ ± ۰/۰۷	۵ -۷
وضعیت ظاهری	پودر سفید رنگ	پودر کرم رنگ

مقادیر همراه با S.D سه تکرار ذکر شده‌اند.

جدول۲- تغییرات لگاریتمی رشد L.rhamnosus در MRS مایع اصلاح شده با سطوح مختلف دو نوع اینولین و دو مونوساکارید

نوع کربوهیدرات	غلظت کربوهیدرات (٪)	شمارش باکتریایی($\log \ CFU\ ml^{-1}$)
CIIP	۰(کنترل)	۹/۶۰۸ ± ۰/۲۷ ^{h}
	۱	۱۰/۱۶۱ ± ۰/۵۸ ^{b}
	۱/۵	۱۰/۳۵۳ ± ۰/۴۴^{a}
	۲	۹/۹۱۶ ± ۰/۵۹ ^{d}
CICP	۰ (کنترل)	۹/۶۰۸ ± ۰/۲۷ ^{h}
	۱	۹/۷۶۶ ± ۰/۴۷ ^{ef}
	۱/۵	۱۰ /۱۷۲ ± ۰/۲۱^{b}
	۲	۱۰/۰۱۵ ± ۰/۴ ^{c}
Glu	۰ (کنترل)	۹/۶۰۸ ± ۰/۲۷ ^{h}
	۱	۱۰/۳۴۱ ± ۰/۲۱ ^{a}
	۱/۵	۹/۷۰۴ ± ۰/۴۱^{fg}
	۲	۹/۸۲۴ ± ۰/۲۷ ^{e}
Fru	۰ (کنترل)	۹/۶۰۸ ± ۰/۲۷ ^{h}
	۱	۹/۸۲۷ ± ۰/۲۲ ^{e}
	۱/۵	۹/۹۴۳ ± ۰/۳۴ ^{cd}
	۲	۹/۶۴۳ ± ۰/۲۲ ^{gh}

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

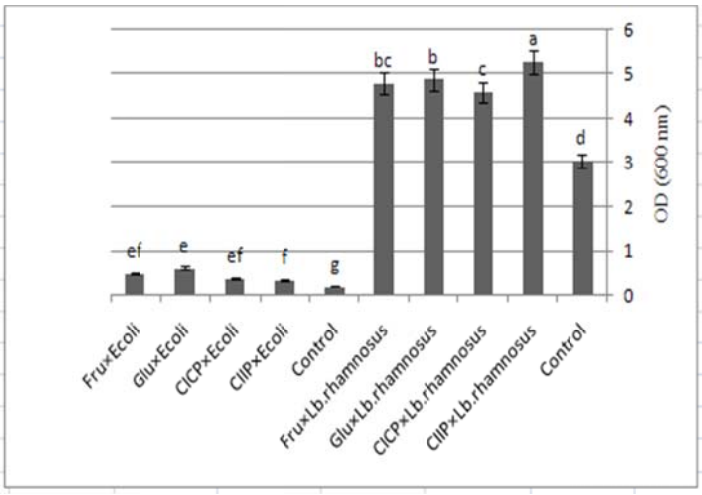
CIIP: اینولین استخراجی، CICP : اینولین تجاری، Glu : گلوکز، Fru : فروکتوز.

جدول۳- تغییرات لگاریتمی رشد باکتریE.coli در نوترینت براث اصلاح شده با سطوح مختلف دو نوع اینولین و دو مونوساکارید

نوع کربوهیدرات	غلظت کربوهیدرات (٪)	شمارش باکتریایی($\log \ CFU\ ml^{-1}$)
CIIP	۰(کنترل)	۱۰/۵۰۵ ± ۰/۲۷ ^{h}
	۱	۱۰/۸۵۳ ± ۰/۵۸ ^{fg}
	۱/۵	۱۰/۹۹۳ ± ۰/۴۴ ^{e}
	۲	۱۱/۱۳۷ ± ۰/۵۹ ^{d}
CICP	۰ (کنترل)	۱۰/۵۰۵ ± ۰/۲۷ ^{h}
	۱	۱۰/۹۵۹ ± ۰/۴۷ ^{e}
	۱/۵	۱۱ /۲۱۷ ± ۰/۲۱ ^{c}
	۲	۱۱/۳۳۹ ± ۰/۴ ^{b}
Glu	۰ (کنترل)	۱۰/۵۰۵ ± ۰/۲۷ ^{h}
	۱	۱۱/۳۵۴ ± ۰/۲۱ ^{b}
	۱/۵	۱۰/۹۲۶ ± ۰/۴۱ ^{ef}
	۲	۱۰/۸۱۵ ± ۰/۲۷ ^{g}
Fru	۰ (کنترل)	۱۰/۵۰۵ ± ۰/۲۷ ^{h}
	۱	۱۱/۴۹۲ ± ۰/۲۲ ^{a}
	۱/۵	۱۱/۳۹۵ ± ۰/۳۴ ^{b}
	۲	۱۱/۳۳۹ ± ۰/۲۲ ^{b}

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

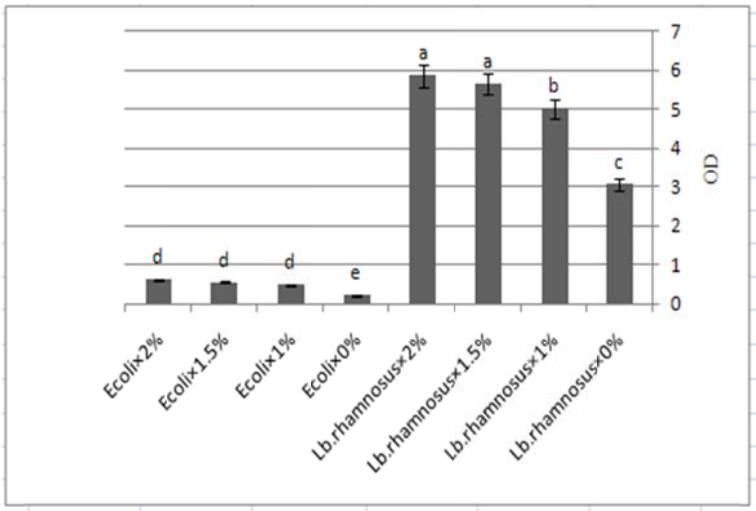
CIIP : اینولین استخراجی، CICP : اینولین تجاری، Glu : گلوکز، Fru : فروکتوز.



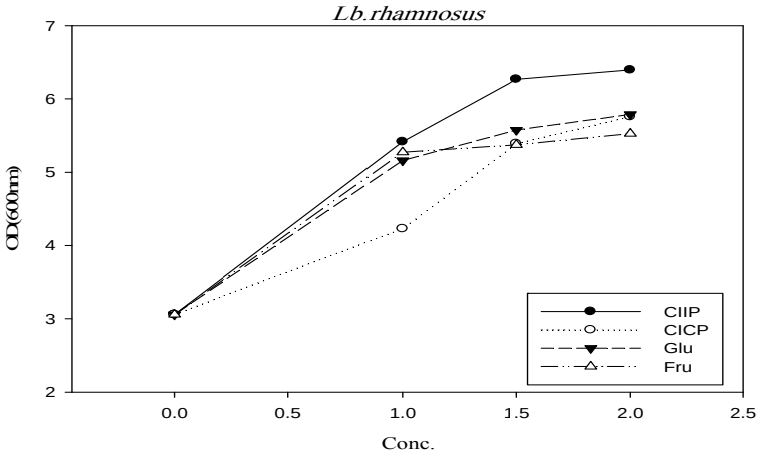
شکل ۱- میانگین تغییرات دانسیته نوری (OD) در کشت‌های باکتریایی مورد بررسی حاوی ۵ کربوهیدرات مختلف و نمونه کنترل در طی دوره زمانی ۲٤ ساعت

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

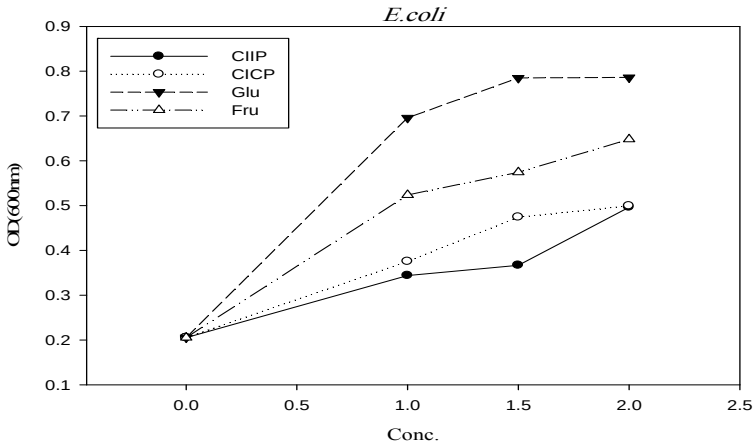
(میانگین‌های دارای حروف مشترک درسطح ۱٪ تفاوت معناداری ندارند).



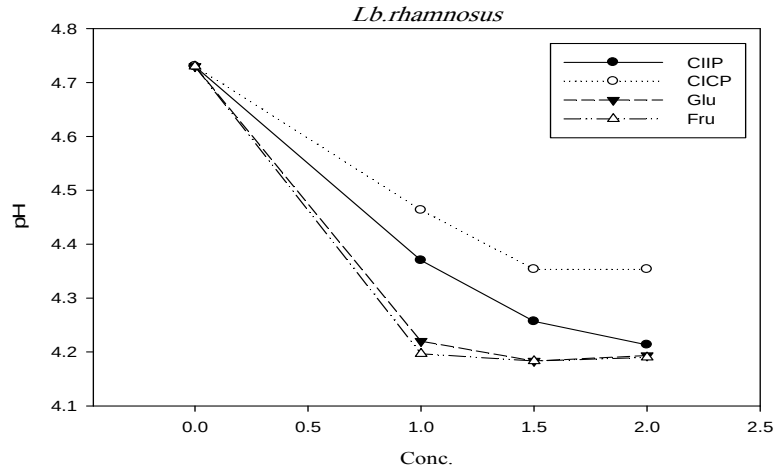
شکل ۲- میانگین تغییرات دانسیته نوری (OD) در کشت‌های باکتریایی مورد بررسی حاوی سطح‌های مختلف کربوهیدرات در طی دوره زمانی ۲٤ ساعت (میانگین‌های دارای حروف مشترک درسطح ۱٪ تفاوت معنی داری ندارند).



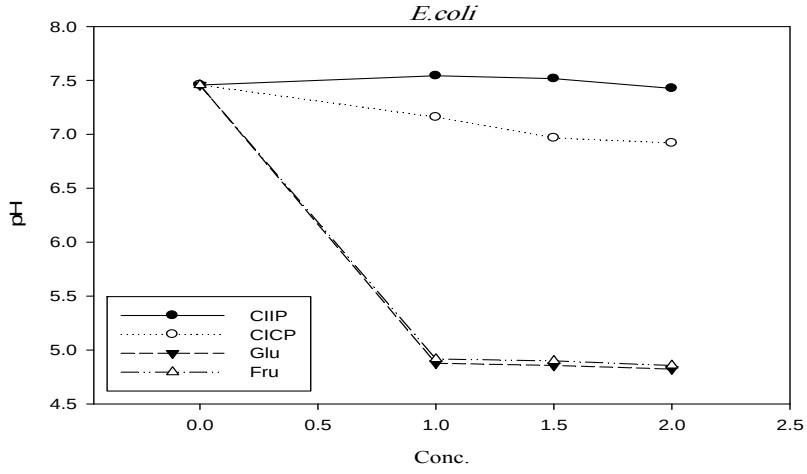
شکل۳- روند تغییرات بیومس سلولی باکتری *L.rhamnosus* در محیط کشت حاوی انواع و سطح‌های مختلف کربوهیدرات در طی دوره زمانی ۲٤ ساعت.



شکل٤- روند تغییرات بیومس سلولی باکتری *E.coli* در محیط کشت حاوی انواع و سطح‌های مختلف کربوهیدرات در طی دوره زمانی ٢٤ ساعت



شکل ٥- روند تغییرات pH باکتری *L.rhamnosus* در محیط کشت حاوی انواع و سطوح مختلف کربوهیدرات در طی دوره زمانی ٢٤ ساعت.



شکل ٦- روند تغییرات pH باکتری *E.coli* در محیط کشت حاوی انواع و سطوح مختلف کربوهیدرات در طی دوره زمانی ٢٤ ساعت.

۳-۳- بررسی رشد و بقاء باکتری‌ها

۳-۳-۱- تاثیر نوع و میزان کربوهیدرات بر رشد و بقای باکتری‌ها

قابلیت رشد و زنده مانی باکتری پروبیوتیک، با شمارش سلولی باکتری مورد بررسی در سطح پلیت به دست آمد. نتایج نشان داد که در *L.rhamnosus*، روند تغییرات رشد به صورت لگاریتمی تا سطح ۱/۵ درصد افزایشی بود اما در سطح ۲ درصد یک کاهش معنی‌دار نسبت به ۱/۵درصد مشاهده شد(جدول ۲). در باکتری *E.coli*، روند افزایش رشد سلول‌های زنده به صورت لگاریتمی، در تمام درصدهای هر دو نوع اینولین مشاهده شد، اما با افزایش درصد قند از ۱ تا ۲ درصد، برای قندهای ساده گلوکز و فروکتوز، نمودار لگاریتمی رشد دارای روند کاهشی بود. البته این روند در مورد گلوکز شدیدتر بود(جدول۳).

با توجه به روند افزایشی OD از صفر تا ۲ درصد در کشت باکتری *L.rhamnosus*، به نظر می‌رسد که تعدادی از سلول‌ها در سطح ۲ درصد از کربوهیدرات‌ها، از بین رفته‌اند. 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 بقای باکتری‌ها داشته و تعداد سلول‌های زنده را با کاهش شدید مواجه کرده است. این مساله در رابطه با باکتری *E.coli* نیز صادق است. بنابراین می‌توان عنوان نمود که افزایش کربوهیدرات به محیط کشت تا سطح مشخصی می‌تواند تعداد سلول زنده محیط را افزایش دهد(۱۷).

۳-٤- اثر تیمارهای مختلف بر pH کشت‌های باکتریایی

۳-٤-۱- اثر متقابل نوع و میزان کربوهیدرات بر pH

در بررسی روند تغییرات pH محیط کشت باکتری *L.rhamnosus*، مشاهده گردید که کمترین مقدار pH به محیط کشت حاوی سطوح ۱/۵ و ۲ درصد گلوکز و فروکتوز ،بدون اختلاف معنی‌دار باهم ($P>0/01$)، مربوط می‌شد. تغییرات pH محیط کشت باکتری *L.rhamnosus* که حاوی ۲٪ از اینولین استخراجی بود، مشابهت زیادی با تغییرات pH محیط کشت این میکروارگانیسم در حضور قندهای گلوکز و فروکتوز داشت(شکل ۵). کمترین کاهش pH در باکتری *L.rhamnosus* به تخمیر اینولین تجاری مربوط می‌شد. با توجه به اینکه *L.rhamnosus* کمترین OD را درحضور اینولین تجاری نشان داد، این روند دور از انتظار نبود. در باکتری *E.coli*، روند تغییرات pH بر روی دو مونوساکارید، مانند *L.rhamnosus* بود، یعنی در سطح یک درصد این دو قند یک کاهش شدید در pH روی داد و پس از آن تا سطح ۲ درصد در این کربوهیدرات‌ها به ثبات رسید(شکل۶). با توجه به روند رشد باکتری بر روی گلوکز و فروکتوز نتیجه بدست آمده توجیه‌پذیر است. تغییرات pH در باکتری *E.coli* بر روی اینولین‌ها مطابق با نتایج حاصل از میزان رشد این باکتری بر روی آنها بود، به این ترتیب که رشد کمتر باکتری بر روی این کربوهیدرات‌ها باعث کاهش کمتر pH شده بود.

به نظر می‌رسد در تمام موارد عنوان شده در قسمت‌های قبل علاوه بر میزان رشد باکتری که بر روی pH اثرگذار است، احتمالاً نوع سوبسترای مورد استفاده نیز بر میزان کاهش pH موثر باشد. مونوساکاریدها در کاهش pH محیط کشت‌های باکتریایی *L.rhamnosus* و *E.coli* موفق‌تر بوده‌اند که این مطلب می‌تواند به دلیل تولید اسید بیشتر از این کربوهیدرات‌ها باشد(۱۲).

٤- نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان گفت که نژادهای مختلف باکتریایی در به کاربردن بهتر و سریعتر انواع ترکیبات قندی متفاوت از هم عمل می‌کنند. همانطور که مشاهده شد در تقویت رشد باکتری‌های پروبیوتیک، اینولین استخراجی نسبت به اینولین استاندارد، دانسیته سلولی بالاتری را نشان داد. این در حالی است که مونوساکاریدهای گلوکز و فروکتوز در بالا بردن رشد *E.coli* موثرتر بودند. بررسی سطوح مختلف کربوهیدرات‌های اضافه شده به محیط کشت نشان داد که در باکتری *L.rhamnosus* سطح ۱/۵٪ از کربوهیدرات‌ها بهترین تاثیر را در افزایش رشد همراه با بقای باکتری در طی دوره ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری داشت. در خصوص باکتری *E.coli* سطح ۱٪ مونوساکاریدها بیشترین اثر را بر رشد و بقای سلول زنده نشان داد و هر دو نوع اینولین در سطح ۲٪ موثرتر بودند.

۵- سپاس گزاری

از مسئولین محترم آزمایشگاه‌های صنایع غذایی و میکروبیولوژی پژوهشکده علوم و صنایع غذایی خراسان که کمال همکاری را در انجام این پروژه نموده‌اند قدردانی می‌گردد.

٦- منابع

۱- بلوردی، محمد. ۱۳۸۷. تولید کامبوجیا با استفاده ازعصاره گیاهان حاوی اینولین، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده مهندسی بیوسیستم کشاورزی، دانشگاه تهران.

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

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

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

5- Frank, AME.2000. Inulin and oligofructose. In: Gibson, G. Angus,F. editors. LFRA Ingredient Handbook: Prebiotics and Probiotics. Surrey: Leatherhead Publishing, p:1-18.

6- Gibson, GR. 2004. Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). Clin Nutr Suppl 1(2):25-31.

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

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

9- Lopez-Molina, D., Navarro-Martinez, M.D., Rojas-Melgarejo, F., Hiner, A.N.P., Chazarra, S., Rodriguez-Lopez, J.N. 2005. Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (Cynara scolymus L.). *Photochem* 66(12):1476-1484.

10- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chem.* 31: 426.

11- Nakakuki T. 2002. Present status and future of functional oligosaccharide development in Japan. *Pure Appl Chem* 74(7):1245-1251.

12- O'Neill, J. 2008. The lifelong benefits of inulin and oligofructose. *Cereal Foods World* 53(2):65-68.

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

14-Paseephol,T., Small,D., Sherkat,F.2007.Process optimisation for fractionating *Jerusalem artichoke* fructans with ethanol using response surface methodology. *Journal of Food Chemistry* 104: 73–80.

15- Rastall RA, Maitin V. 2002. Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. *Curr Opin Biotechnol* 13(5):490-496.

16- Roberfroid, MB. 2005. Inulin-type Fructans: Functional Food Ingredients. New York: CRC Press.

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

18- Southgate, D.A.T. 1991. Determination of food carbohydrates. 2nd ed. New York: Elsevier Science Publishers Ltd. P: 232.

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

20- Van Loo, J., Cummings, J., Delzenne, N., Englyst, H., Franck, A., Hopkins, M., Kok, N., MacFarlane, G., Newton, D., Quigley, M., Roberfroid, M., van Vliet, T., van den Heuvel, E. 1999. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: A consesus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). *Brit J Nutr* 8:121-132.

21- 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.