نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۳ شماره ۴/ سال ۱۳۹۲

تأثیر بتا-فروکتان استخراج شده از ریشه شنگ بر رشد *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* و *اشرشیاکلی* در شرایط آزمایشگاهی

لادن نوربخش[۱]، علی محمدی ثانی[۲]، الناز میلانی[۳]* و الهه منصوری[۱]

تاریخ دریافت: ۹۱/٤/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۲/۵/۱

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد مهندسی کشاورزی، علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی، واحدقوچان
[۲] استادیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد قوچان
[۳] استادیار پژوهشی، گروه پژوهشی فرآوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی مشهد
*مسئول مکاتبه: Email: e_ milani81@yahoo.com

چکیده

پری بیوتیک‌های بیفیدوژنیک، تحت عنوان بتافروکتان ها شامل اینولین، الیگوفروکتوز و فروکتوالیگوساکاریدها می‌باشند. این پژوهش با هدف بررسی اثر بتا فروکتان های کوتاه زنجیره استخراجی از ریشه شنگ در شرایط آزمایشگاهی صورت گرفت. تأثیر بتافروکتان‌های شنگ در غلظت‌های مختلف ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ درصد وزنی – حجمی برافزایش رشد و فعالیت باکتری‌های بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و اشرشیاکلی طی ٤۸ ساعت انکوباسیون مورد بررسی قرار گرفت و با اینولین تجاری (اینولین HP) مقایسه گردید. این بررسی آزمایشگاهی نشان داد که میزان مصرف بتافروکتان‌ها توسط سویه بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و اشرشیاکلی به درجه پلی مریزاسیون زنجیره‌های فروکتوالیگومری بستگی داشته و این باکتری‌ها بتافروکتان‌های شنگ کوتاه زنجیره را با اختلاف معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$) نسبت به اینولین HP بلند زنجیره بهتر مورد مصرف قرار می‌دهند. همچنین در مورد هر دو باکتری، بین محیط حاوی اینولین HP (غلظت های ۲و۳ درصد) و محیط کنترل اختلاف معنی‌داری ($P > ۰/۰۵$) مشاهده نشد که این نتایج نشان دهنده عدم تخمیر این ترکیب پری بیوتیک در غلظت‌های فوق توسط این باکتری‌ها می‌باشد، در حالی که غلظت‌های ۰/۵ و ۱ درصد این ترکیب پری بیوتیک با اختلاف معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$) نسبت به محیط کنترل، تأثیر خوبی بر رشد باکتری‌ها از خود نشان دادند. همچنین بتافروکتان‌های شنگ در غلظت ۲ درصد تأثیر بیشتری ($P < ۰/۰۵$) در رشد بیفیدوباکتریوم بیفیدوم نسبت به اشرشیاکلی از خود نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: پری بیوتیک، بتا-فروکتان، شنگ، اینولین، *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*، *اشرشیاکلی*

مقدمه

بر اساس تعریف، پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که اگر در مقادیر کافی تجویز گردند اثرات مفید سلامتی بر روی میزبان خواهند داشت و شامل گونه‌هایی از جنس باکتری‌های لاکتوباسیلوس، بیفیدوباکتریوم، باسیلوس، انتروکوک واستریپتو کوکوس می‌باشند (FAO ۲۰۰۸).

پری بیوتیک‌ها ترکیبات غیر قابل هضم یا قابلیت هضم اندک هستند که پس از رسیدن به روده به عنوان منبع کربن یا انرژی، بطور انتخابی نسبت و فعالیت باکتریهای روده را تغییر داده و بر میزبان اثرات سلامتی بخش می‌گذارند (اگوئک و همکاران ۲۰۱۰).

پری‌بیوتیک‌ها و پروبیوتیک‌ها امکان تولید غذاهایی که بتوانند میکروفلور معدی روده‌ای را تحریک نمایند میسر می‌سازند.

در سال‌های اخیر ترکیبات پری بیوتیک بویژه اینولین و الیگو فروکتوزها که در دسته بتافروکتان‌ها قرار دارند، مورد توجه زیادی قرار گرفته اند و اثرات سلامتی بخش مصرف این ترکیبات طبیعی به شکل خالص حاصل از منابع گیاهی مختلف بررسی شده است.

اینولین و الیگوفروکتوز ها نقش و فواید زیادی دارند که آنها را برای استفاده در فرمولاسیون غذاهای امروز و آینده مناسب می سازد.

مطالعات مختلف In vivo و In vitro نشان داده است ترکیبات β(۱→۲) فروکتان‌ها (نظیر اینولین و فروکتوالیگوساکاریدها) رشد بیفیدوباکتری‌ها و لاکتوباسیل‌ها را تحریک نموده، سبب افزایش تولید ویتامینB و K شده ودر روده بصورت انتخابی از رشد ارگانیسمهای پاتوژن به ویژه باکتریوئیدس، فوزوباکتریا، اشرشیاکلی و کلستریدیا جلوگیری می‌کنند (اگوئک و همکاران ۲۰۱۰).

افزون بر مطالب اخیر، اینولین و الیگوفروکتوزها فیبرهای غذایی محلول و قابل تخمیری هستند که از طریق بهبود نظم، افزایش تناوب دفع و حجم مدفوع به افزایش عملکرد روده کمک می نمایند (روبرفروید ۲۰۰۵).

بتافروکتان‌ها بر اساس طول زنجیره و درجه پلیمریزاسیون (DP)[۲] به گروههای مختلفی مانند الیگوفروکتوز (DP: ۲-۷)، اینولین طبیعی (استاندارد) استخراج شده از ریشه کاسنی (DP: ۲-۶۵)، اینولین HP یا اینولین با کارایی بالا (DP: ۱۰-۶۵) و فروکتوالیگوساکارید طبقه بندی می‌شوند (روبرفرید ۲۰۰۷ و رودریگوس۲۰۰۷).

تأثیر پری‌بیوتیکی نه تنها به میزان ترکیب پری بیوتیک در رژیم وابسته است بلکه به درجه پلی مریزاسیون نیز بستگی دارد (وندی ویل۲۰۰٤).

شنگ گیاهی از خانواده کامپوزیته با نام علمی *Tragopogon pratensis L.* می باشد و در چمنزارهای مرطوب مناطق شمال ایران و مناطق غرب ایران نظیر کردستان، تفرش و اراک می روید (زرگری۱۳۷۲).

گیاه شنگ غنی از الیگو ساکاریدهای با DP پایین (کوتاه زنجیره) می باشد، ۷۵ درصد از اینولین های موجود در این گیاه DP کمتر از ۵ دارند (فلام ۲۰۰۱). طی بررسی های انجام گرفته توسط برایوداکوستا و همکارانش در سال ۲۰۰۵ و با بکارگیری آنالیز فیزیکی- شیمیایی توسط HPLC و DSC [۲]، بتافروکتان های اصلی در شنگ اینولین و فروکتوالیگوساکاریدهای کوتاه زنجیره هستندو میزان این ترکیبات در شنگ ۱۱-٤ ٪ می‌باشد.

هدف از انجام این پژوهش، ارزیابی تأثیر پری بیوتیکی بتافروکتان استخراج شده ازریشه شنگ در مقایسه با اینولین تجاری (اینولین HP) بر رشد و فعالیت بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و اشرشیاکلی در شرایط آزمایشگاهی بود.

[۱] Degree of polymerization
[۲] Differential Scanning Calorimetry

مواد

Bifidobacterium bifidum PTCC 1644 و PTCC Escherichia coli 1330 از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتریهای صنعتی ایران تهیه شد.

گیاه شنگ از ارتفاعات آشخانه بجنورد جمع‌آوری شد. ترکیبات بتافروکتان از ریشه این گیاه بر طبق روش میلانی و همکاران (۱۳۹۰) استخراج گردید.

ترکیبات اصلی موجود در ریشه شنگ، β(۲→۱) فروکتان های کوتاه زنجیره هستند که عبارتند از: اینولین با DP= ۱-۷ و فروکتوالیگوساکاریدهای کوتاه زنجیره با DP=۳-۷ /۱۰ (روبرفروید ۲۰۰۵ و برایو داکوستا و همکاران ۲۰۰۵).

ترکیبات β(۲→۱) فروکتان های کوتاه زنجیره استخراج شده از گیاه شنگ تحت عنوان SCSF[۳] نامیده می شوند (برایو داکوستا و همکاران ۲۰۰۵).

اینولین تجاری (اینولینHP) که از شرکت Beneo-Orafti کشور بلژیک خریداری شد. این ترکیب دارای DP= ۱۰-۶۰ متوسط حدود ۲۵ می باشد.

مواد شیمیایی مورد استفاده شامل گلیسرول، اسید سولفوریک ۹۶ درصد، اتانول ۹۶ درصد، اسید فسفریک، هیدروکسید کلسیم، سدیم دی هیدروژن فسفات دو آبه، دی سدیم هیدروژن فسفات بدون آب، کلرید باریم، کلرید سدیم، گازپک A و کاغذ صافی واتمن شماره۱ و ٤ که همگی از شرکت مرک آلمان (Merck) تهیه شدند.

محیط کشت‌های مورد استفاده برای هر باکتری بسته به نوع باکتری محیط کشت های بکارگرفته شده متفاوت خواهد بود. برای رشد و فعالیت بیفیدوباکتریوم بیفیدوم از محیط کشت اختصاصی یا بعبارتی MRS غنی شده و شرایط بی هوازی و برای باکتری E.coli از محیط کشت TSB یا تریپتیکاز سویا براث در شرایط هوازی در دمای ۳۷ درجه استفاده شد (کریتن ۲۰۱۰ و روسا ۲۰۰۵). محیط کشت‌ها از شرکت مرک آلمان تهیه شدند.

روش کار

استخراج آبی بتافروکتان از ریشه شنگ

پس از جداسازی ساقه ها و برگهای شنگ، ریشه ها به طور کامل پوست گیری شده و به دقت شسته شدند. پس از آن نمونه های شنگ، به قطعات کوچک برش خورده و برای ٢٤ ساعت در آون با دمای ٤٥ درجه سانتی گراد قرار گرفتند تا رطوبت نهایی نمونه ها به ٥ درصد کاهش یابد، سپس نمونه ها از آون خارج و به دسیکاتور منتقل شده و پس از سرد شدن، توسط آسیاب پودر و سپس از الک با مش ٥٠ میکرومترجهت رسیدن به دانه بندی یکسان عبور داده شدند.

برای تهیه عصاره، پودر شنگ با ۸/۹۷ برابر آن آب مقطر مخلوط و برای مدت زمان ۳۹ دقیقه تحت دمای ٥٦ درجه سانتی گراد در بن ماری قرار گرفت، سپس جهت صاف شدن اولیه محلول از پارچه تنظیف عبور داده شده و سپس محلول بوسیله روتاری اواپراتور تحت خلاء با دمای ٥٥ درجه سانتی گراد تا رسیدن به بریکس ۱۲/۲ تغلیظ شد.

محلول تغلیظ شده را با هیدروکسید کلسیم ٥ درصد در دمای ٦٠ درجه سانتی گراد برای مدت زمان ۳۰ دقیقه مخلوط شد که ماحصل آن، تشکیل ذرات ترسیب یافته و مایع شفاف زرد رنگ بر روی سطح محلول می باشد، توسط این روش pH دوغاب حاصله از ٥/٥ به حدود ۱۱ افزایش می یافت.

پس از تنظیم pH در ۱۱ محلول کلوئیدی برای مدت نیم ساعت در دمای ٦٠ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از گذشت این زمان با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ٤ و قیف بوخنر متصل به پمپ خلاء، عمل فیلتراسیون انجام گرفت و جهت کاهش pH دوغاب، محلول ۱۰ درصد اسید فسفریک به ترکیبات فیلتر شده تا رسیدن به ۹-۸ = pH افزوده شد، قبل از فیلتراسیون مجدد به کمک کاغذ

[۳] short chains β(2→1) fructans extracted from salsify roots

صافی واتمن شماره ٤ مخلوط با pH = ۸/۵ برای مدت ۲ ساعت در دمای $^{\circ}C$ ٦٠ قرار گرفت.

پس از آن فرایند شفاف سازی برای ۲ مرحله پیگیری شده و شربت شفاف مجدداً توسط روتاری اواپراتور تحت خلاء تا رسیدن به درجه بریکس ۳۲ مورد تغلیظ قرار گرفت و در نهایت عصاره تغلیظ شده از مرحله قبل به نسبت ۱ به۱۳ با اتانول ۹۷ درصد مخلوط شده و برای مدت زمان ۷۲ ساعت در دمای$^{\circ}C$ ٤٢ در آون قرار داده شد و پس از تبخیر کامل اتانول پودر سفید رنگ حاصله همان ترکیبات بتافروکتان است که جهت نگهداری برای انجام آزمون های میکروبی در فریزر $^{\circ}C$ ٢٠- نگهداری شد.

آماده سازی سوسپانسیون باکتری

برای تکثیر پروبیوتیک‌ها، بیفیدوباکتریوم بیفیدوم خشک شده به روش انجمادی به محیط MRS غنی شده با ۰/۲ گرم سدیم تیوگلیکولات، ۰/۱ گرم کلرید کلسیم دو آبه و ۰/۵ گرم ال- سیستئین هیدروکلراید در یک لیتر منتقل شد و مدت یک شب در شرایط بی هوازی (با استفاده ازگازپک و جار بی‌هوازی) گرمخانه گذاری شد. اشرشیاکلی نیز به محیط TSB منتقل و در شرایط هوازی به مدت یک شب فعال سازی شد (لی۲۰۰۸).

سپس محیط حاوی باکتری (در فاز لگاریتمی) در میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتری تقسیم کرده و در دمای ٤ درجه سانتی گراد، با دور g ۲۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ (شرکت سیگما) گردید. باکتری‌ها جدا و ۲ بار با محلول PBS (بافر فسفات سالین pH=۷/٤) شستشو گردیدند، در نهایت تعداد باکتری‌ها با استفاده از محلول استاندارد ۰/۵ مک فارلند و بکارگیری جدول آن به تعداد مورد نظر رسانیده شد (تعداد باکتری های بیفیدوباکتریوم بیفیدوم به 10^{7} CFU/ml و اشرشیاکلی به 10^{9}-10^{10} رسانیده شد) (لوپز مولینا ۲۰۰۵ ولی ۲۰۰۸).

در این مرحله برای اطمینان از زنده بودن این تعداد باکتری، شمارش بیفیدوباکتریوم بیفیدوم به روش پورپلیت تحت شرایط بی هوازی و اشرشیا کلی به روش سطحی در شرایط هوازی در دمای $^{\circ}C$ ۳۷ انجام شد.

آماده سازی محیط کشت و تلقیح باکتری به محیط حاوی پری بیوتیک

در این مرحله محلولهای بتا-فروکتان شنگ و اینولین تجاری در غلظت های مختلف تهیه شده و سپس با استفاده ازفیلتر سرنگی ۰/٤٥ این محلولها استریل شدند (هو ۲۰۰٦) و ارلن‌های حاوی ٤٤ میلی لیتر از محیط کشت هر باکتری در اتوکلاو (مدل HIRAYAMA) با دمای ۱۲۱ درجه به مدت ۱۵ دقیقه استریل گردید.

سپس از غلظت‌های مختلف پری بیوتیک (۰/۵، ۱، ۲ و ۳ درصد وزنی-حجمی) به محیط‌های کشت استریل، اضافه و با سمپلر مقدار ٤٤٠ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری مورد نظر به ارلن‌های فوق تلقیح شد (مولینا ۲۰۰۵ و هو ۲۰۰٦).

تعیین کدورت محیط کشت

برای بررسی میزان رشد باکتری های مورد نظر، کدورت محیط کشت (محیط کنترل و محیط حاوی غلظت های مختلف پری‌بیوتیک) طی٤٨ ساعت انکوباسیون توسط انکوباتور سازنده شرکت VELP در دمای $^{\circ}C$ ۳۷ با بکارگیری اسپکتروفوتومتر مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان جذب در طول موج ٦٢٠ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر (Biochrom) هر٤ ساعت قرائت شد. هر آزمایش در ۲ تکرار انجام گرفت. محیط کشت فاقد باکتری، به عنوان محلول بلانک در نظر گرفته شد. با رسم منحنی رشد مربوط به هر باکتری در طی مدت ٤٨ ساعت، میزان رشد باکتری در حضور پری بیوتیک و در محیط کنترل (فاقد پری‌بیوتیک) مورد بررسی قرار گرفت (فوکس۲۰۰۲، رادا ۲۰۰۸ و گودرسکا و همکاران ۲۰۰۸).

اندازه گیری pH محیط کشت

میزان pH نمونه های حاوی اینولین تجاری (HP) و بتافروکتان های شنگ و نیز نمونه کنترل توسط دستگاه pH در طول ٤٨ ساعت، هر ٤ ساعت یک بار و در ۲ تکرار اندازه گیری شد (لی۲۰۰۸).

محاسبه شدت رشد ویژه وزمان تقسیم سلولی باکتری

شدت رشد ویژه (μ) و زمان مربوط به باکتری برای هر غلظت از پری بیوتیک در طول ٤٨ ساعت از زمان کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و با بکارگیری فرمول ذیل محاسبه شد (رادا ۲۰۰۸) :

$$\mu=(Lnx-Lnx_0)/(t-t_0)$$

x و x_0 میزان جذب های اندازه گیری شده در زمان های t و t0 در فاز لگاریتمی رشد می باشند.

زمان دو برابر شدن سلولهای باکتری از فرمول مقابل محاسبه شد:

$$t_g=Ln2/\mu$$

طرح آماری

تجزیه و تحلیل نتایج با طرح آماری ۳ فاکتور کاملا تصادفی و در دو تکرار و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام شد. برای انجام آنالیز واریانس از نرم‌افزار Minitab و مقایسه میانگین‌ها از نرم‌افزار Mstatc استفاده شد. ترسیم منحنی‌ها نیز با استفاده از نرم‌افزار Excel و Slide write انجام شد.

نتایج و بحث

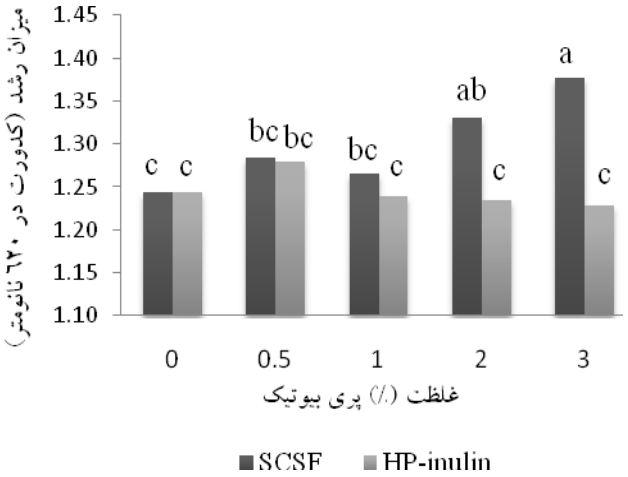
ارزیابی تغییرات کدورت محیط کشت

بیفیدوباکتری ها بعد از لاکتوباسیل‌ها به عنوان رایج ترین انواع پروبیوتیک شناخته می‌شوند.

معروفترین گونه پروبیوتیک در بین بیفیدوباکتریها *Bifidobacteriumbifidum* می‌باشد (تال والکر ۲۰۰٤). باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در محیط حاوی غلظت‌های مختلفی از SCSF، نسبت به محیط کنترل (فاقد ترکیبات پری بیوتیک) میزان رشد و فعالیت بیشتری از خود نشان داده است (شکل ۱).

غلظت های ۰/۵ و ۱ درصد وزنی-حجمیSCSF نسبت به سایر غلظت‌ها اثر کمتری بر رشد و تولید متابولیت بیفیدوباکتریوم بیفیدوم داشت، در حالیکه در غلظت ۳ درصد، بالاترین میزان رشد مشاهده شد.

مقایسه میانگین‌ها در شکل ۱، حاکی از عدم وجود اختلاف معنی‌دار در غلظت‌های ۲ و۳ درصد می‌باشد؛ در حالیکه اختلاف بین این غلظت ها و محیط کنترل کاملاً از نظر آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).



شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف SCSF و اینولین HP بر جمعیت بیفیدوباکتریوم بیفیدوم

همچنین با توجه به نتایج آزمون دانکن و مقایسه میانگین‌ها، بین غلظت های ۰/۵ و ۱ درصد و محیط کنترل اختلاف غیرمعنی‌دار بود (P >۰/۰۵) که نشان دهنده عدم تأثیر این غلظت‌ها بر تحریک رشد بیفیدوباکتریوم بیفیدوم می باشد بنابراین با توجه به این نتایج می توان گفت که تأثیر غلظت های ۲ و۳ درصد SCSF در تحریک رشد بیفیدوباکتریوم بیفیدوم، نسبت به غلظت‌های ۰/۵٪ و ۱٪ بیشتر بوده است.

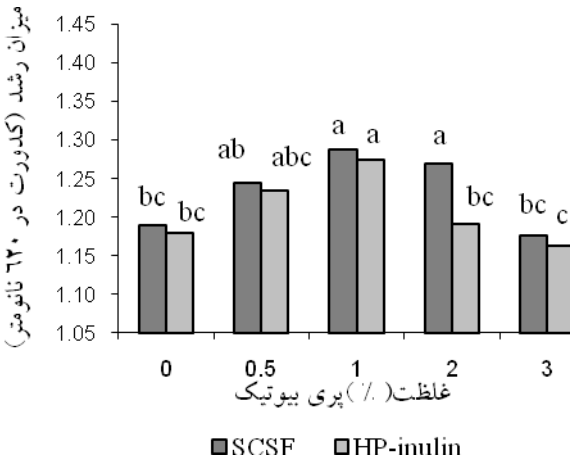
توانایی کلی‌فرم‌ها در مصرف الیگوساکاریدهای پری‌بیوتیک متفاوت می‌باشد، آنچنان‌که ونگ و گیبسون

(۱۹۹۳) و هارتمینک و همکاران (۱۹۹۷) طی تحقیقاتشان گزارش کردند که FOS بعنوان یک ترکیب پری‌بیوتیک رایج می تواند سبب تحریک رشد اشرشیاکلی و تولید متابولیت توسط این باکتری شود، در حالی که هیداکا و همکارانش در سال ۱۹۸٦، میتسوکا و همکاران در سال ۱۹۸۷، بیلی و همکاران در سال ۱۹۹۱ و مون سان در سال ۱۹۹۵ طی بررسی های انجام گرفته خلاف این نظریه را ثابت کردند بر اساس گزارشات این محققین اشرشیاکلی در محیط حاوی FOS فاقد رشد و فعالیت بوده است.

با توجه به مقایسه میانگین‌ها و شکل ۲ اختلاف معنی داری بین غلظت های ۰/۵، ۱ و ۲ درصد وزنی-حجمی SCSF وجود نداشت ($P > ۰/۰۵$) در حالیکه بین این غلظتها و محیط کنترل اختلاف معنی داری مشاهده شد ($P < ۰/۰۵$).

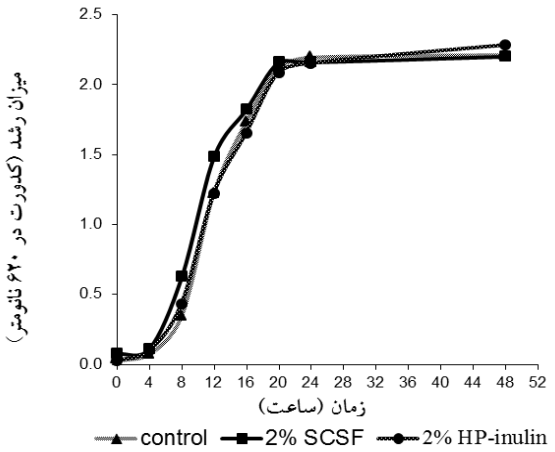
بنابراین می توان گفت که *Escherichia coli* در محیط حاوی غلظت های ۰/۵، ۱ و ۲ درصد وزنی-حجمی SCSF، نسبت به محیط کنترل (فاقد ترکیبات پری بیوتیک) میزان رشد و فعالیت بیشتری از خود نشان داد.

همچنین قابل ذکر است که بین غلظت ۳٪ SCSF و محیط کنترل اختلاف معنی‌دار نبود ($P > ۰/۰۵$) یا به عبارتی دیگرSCSF با غلظت۳ درصد وزنی-حجمی فاقد تأثیر بر رشد و تولید متابولیت این گونه بود. همانطور که درشکل ۳ ملاحظه می‌شود، جمعیت بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در محیط حاوی ۲٪ SCSF پس از ۲۰ ساعت از کشت به حداکثر میزان رشد رسید، این در حالی است که باکتری در محیط کنترل پس از ۲٤ ساعت از زمان آغاز کشت به نقطه حداکثر رشد خود رسید.



شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف SCSF و اینولین HP بر جمعیت *Escherichia coli*

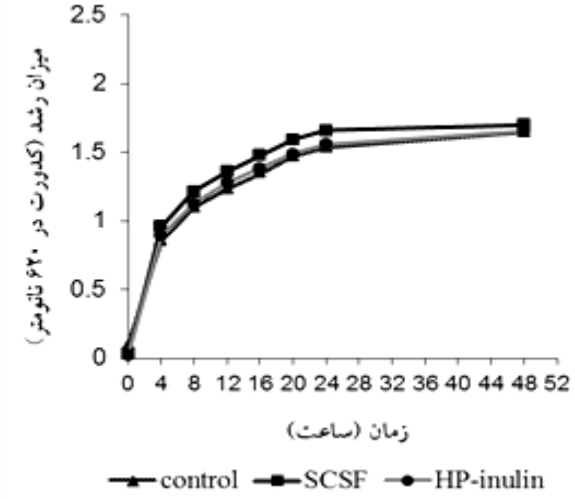
با توجه به این نتایج تأثیر پری‌بیوتیکی فروکتان‌های استخراج شده از شنگ در رشد بیفیدوباکتریوم بیفیدوم کاملاً به وضوح قابل مشاهده است، زیرا در محیط کنترل طی مدت زمان بیشتری به حداکثر میزان رشد خود رسید.



شکل ۳ - تأثیر غلظت (٪۲w/v) SCSF و اینولین HP بر رشد جمعیت بیفیدوباکتریوم بیفیدوم

با توجه به شکل٤ در محیط حاوی ۲٪ SCSF پس از سپری شدن ۲٤ ساعت از زمان کشت جمعیت اشرشیاکلی به حداکثر میزان رشد رسید، در حالی که این باکتری در محیط کنترل پس از ٤۸ ساعت از زمان آغاز کشت به

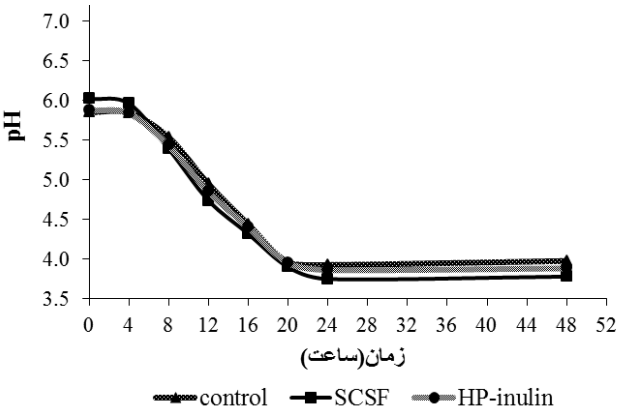
حداکثرمیزان رشدش رسید که این نشان دهنده تأثیر این ترکیب پری بیوتیک درافزایش رشد اشرشیاکلی بود.



شکل۴- تأثیر غلظت(۲w/v٪) SCSF **و اینولین** HP **بر رشد جمعیت اشرشیاکلی**

بررسی تغییرات pH **محیط کشت**

متابولیسم ترکیبات پلی فروکتان توسط بیفیدوباکتریوم بیفیدوم منجر به تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیره نظیر اسید پروپیونیک، اسید بوتیریک، اسید لاکتیک و اسید استیک می شود و در نتیجه pH محیط در مقادیر زیاد کاهش پیدا می کند (لی۲۰۰۸).

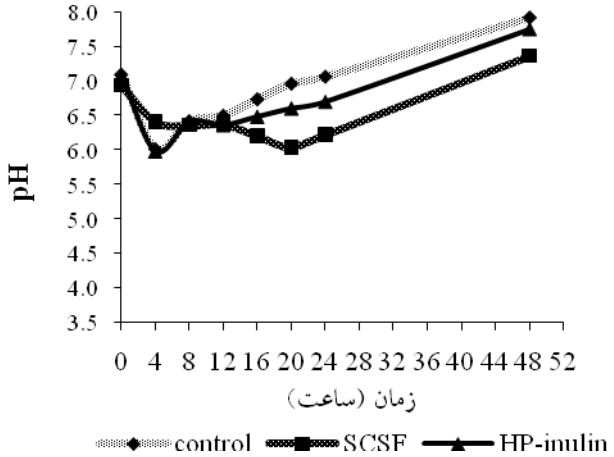


شکل ۵- تأثیر غلظت (۲ w/v٪) SCSF **و اینولین** HP **بر تغییرات** pH **محیط بیفیدوباکتریوم بیفیدوم**

همچنین روند تغییرات pH محیط کشت این باکتری در طی ٤٨ ساعت از آغاز کشت در محیط های مختلف درشکل۵ ملاحظه می شود.

اشرشیاکلی با مصرف SCSF تا زمان ۲۰ ساعت از کشت، موجب کاهش pH شد و پس از گذشت این زمان افزایش چشمگیری در مقادیر pH مشاهده شد، در حالی که این باکتری در محیط کنترل (فاقد الیگوساکاریدها) بدلیل وجود مقادیر کمتر قند تا زمان ٤ ساعت به شدت موجب کاهش pH شد و پس از گذشت این زمان pH بطور چشمگیری افزایش یافت (شکل ٦).

می توان گفت که بدلیل وجود مقادیر پروتئین و گلوکز در محیط کشت پایه این باکتری، درابتدا با مصرف قندها و تولید اسید pH کاهش یافته (فوکس۲۰۰۲) و پس از آن با مصرف ترکیبات پروتئینی و تولید الکل و ترکیبات آمینی pH افزایش یافته است (گووکس۱۹۹۵).



شکل ۶- تأثیر غلظت (۲w/v٪) SCSF **و اینولین**HP **بر تغییرات** pH **محیط اشرشیاکلی**

درمحیط حاوی پری بیوتیک نسبت به محیط کنترل بدلیل وجود مقادیر بیشتر ترکیبات قندی طی مدت زمان بیشتری کاهش pH مشاهده شد.

در محیط حاوی اینولین HP، بدلیل مصرف کمتر این ترکیب پری بیوتیک نسبت به SCSF توسط اشرشیاکلی، در مدت زمان کوتاهتری (تا٤ ساعت) کاهش pH ملاحظه

شد، در حالی که در محیط دارای SCSF به جهت مصرف بیشتر این پری بیوتیک توسط این باکتری طی مدت زمان بیشتری (تا ۲۰ ساعت پس از آغاز کشت) تولید اسید و بدنبال آن کاهش pH مشاهده شد و پس از گذشت ۲۰ ساعت بدلیل مصرف ترکیبات پروتئینی (کازئین) موجود در محیط کشت pH افزایش یافت.

تأثیر غلظت‌های مختلف اینولین HP بر رشد باکتری‌ها

با توجه به شکل های ۱ و۲ برای بیفیدوباکتریوم بیفیدوم بین محیط حاوی غلظت های ۱ و۲ و۳ درصد اینولین HP و محیط کنترل اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($P > ۰/۰۵$) که این نتایج نشان دهنده عدم تخمیر این پری بیوتیک در غلظت های فوق توسط بیفیدوباکتریوم بیفیدوم بود.

در مورد اشرشیاکلی بین غلظتهای ۰/۵ و ۱ درصد اینولین تجاری با محیط کنترل اختلاف کاملا معنی دار بود ($P < ۰/۰۵$).

با توجه به شواهد بدست آمده می توان گفت که غلظت ۰/۵ درصد اینولین تجاری در هر دو باکتری مورد مصرف قرار گرفت و یا به عبارتی این ترکیب سبب تحریک رشد آنها شد.

مقایسه تأثیربتافروکتان ها بر رشد و فعالیت گونه های میکروبی درطی ۴۸ ساعت از کشت

همان طور که در شکل ۱ مشاهده می شود، بین غلظت های۱،۲ و ۳ HP-inulin و محیط کنترل از نظر آماری اختلاف معنی‌دار ($P > ۰/۰۵$) نبود زیرا بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در محیط حاوی این غلظت‌ها رشدی همانند محیط کنترل داشت در حالیکه بین غلظت۰/۵ درصد اینولینHP و محیط کنترل اختلاف معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$) مشاهده شد.

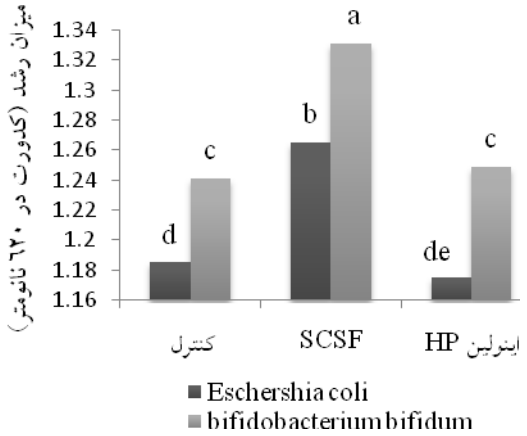
بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در حضور ۰/۵ درصد اینولین HP رشدی بیشتر از محیط کنترل داشت و این نشان دهنده این است این ترکیب پری بیوتیک فقط در غلظت های پایین اثر پری بیوتیکی و تحریک کنندگی رشد بر این باکتری را داشته است. مورد اشرشیاکلی با توجه به شکل۲، اختلاف بین غلظتهای ۲ و ۳ درصد اینولینHP و محیط کنترل از نظر آماری غیرمعنی دار بود ($P>۰/۰۵$) که نشان دهنده عدم تأثیر این ترکیب پری بیوتیک در غلظت های بالا بر روی رشد و فعالیت این باکتری می باشد و این باکتری در محیط حاوی ۱ درصد اینولین HP نسبت به محیط کنترل رشد بیشتری از خود نشان داد و اختلاف بین این دو محیط کاملاً معنی دار بود ($P < ۰/۰۵$) و نشان دهنده عدم مصرف این پری بیوتیک توسط بیفیدوباکتریوم می باشد.

جدول۱- مقایسه میزان رشد بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و اشرشیاکلی در حضور پری‌بیوتیک‌های مختلف پس از ۲۰ ساعت از آغاز کشت

پروبیوتیک	(۲درصد) اینولینHP	SCSF(۲ درصد)	کنترل
بیفیدوباکتریوم بیفیدوم	۲/۰۵۵± ۰/۱۱b	۲/۱۶۲±۰/۰٤a	۲/۰۹۲± ۰/۰۷ b
اشرشیاکلی	۱/٤۰۹± ۰/۰۱b	۱/٥۹٤±۰/۰۲a	۱/٤٦۰±۰/۰٦ b

میانگین‌های ۲ تکرار جذب در ٦۲۰ نانومتر± **SD** می باشند و حروف لاتین نتایج آزمون دانکن می باشند. اعداد حداقل با یک حروف مشابه از لحاظ آماری معنی‌دار نیستند، آزمون دانکن در سطح آماری۰/۰۵

با توجه به شکل٤ و جدول ۱ میزان کدورت اشرشیاکلی پس از ۲۰ ساعت از زمان آغاز کشت در محیط حاوی۲ ٪ SCSF به ۱/۵۹٤ رسید در حالی که پس از این زمان در محیط کنترل میزان جذب به ۱/٤٦۰ و در محیط دارای اینولینHP به ۱/٤۰۹ رسید و این نشان دهنده تأثیر بیشتر SCSF با غلظت ۲٪ نسبت به اینولین HP در این غلظت بر تحریک کنندگی رشد اشرشیاکلی نیز بود. نتایج فوق نشان دهنده اثر تحریک کنندگی بیشتر SCSF با DP کمتر نسبت به اینولین تجاری (HP-inulin) با DP بیشتردر رشد و فعالیت بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و اشرشیاکلی بود.



شکل ۷- تأثیر(۱→۲)β فروکتان های با درجه پلی مریزاسیون مختلف در غلظت ۲ درصد وزنی - حجمی بر رشد بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و اشرشیاکلی

در واقع می توان ذکر کرد که اینولین HP بعنوان یک ترکیب پری بیوتیک نسبت به SCSFتأثیرزیادی بر رشد و فعالیت این گونه ها نداشت. بعبارتی دیگراین پری بیوتیک برای بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در غلظت ۰/۵ درصد و اشرشیاکلی در غلظت های ۰/۵ و ۱ درصد بیشترین تأثیر را داشت.

با توجه به شکل ۷، باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم نسبت به اشرشیاکلی SCSF را به میزان بیشتری مورد مصرف قرار داد و اختلاف معنی داری بین این دو باکتری در میزان مصرف بتا فروکتان های شنگ وجود داشت ($P < ۰/۰۵$) و نیز در هر دو باکتری میزان مصرف اینولین HP و محیط کنترل غیر معنی دار بود ($P > ۰/۰۵$).

نرخ رشد ویژه و زمان تقسیم سلولی بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و اشرشیاکلی در حضور پریبیوتیکهای مختلف

همانطور که در جداول ۲ و ۳ مشاهده می شود بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و اشرشیاکلی در محیط حاوی ۲٪ SCSF دارای بیشترین میزان شدت رشد ویژه و کوتاهترین زمان تقسیم سلولی بود و همچنین اختلاف معنی داری در بین محیط حاوی SCSF با محیط کنترل و محیط دارای اینولین HP وجود داشت ($P < ۰/۰۵$). همچنین قابل ملاحظه است که در محیط حاوی ۲ درصد بتافروکتان شنگ، نرخ رشد ویژه بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در میزان بالاتری نسبت به اشرشیاکلی قرارداشت.

جدول۲ - مقایسه نرخ رشد ویژه (μ) (برحسب h^{-1}) بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و اشرشیاکلی در محیطهای حاوی پری بیوتیکهای مختلف

پروبیوتیک	(۲درصد) اینولینHP	(۲ درصد)SCSF	کنترل
بیفیدوباکتریوم بیفیدوم	۰/۰۷۶۵ ± ۰/۰۴ b	۰/۱۸۶ ± ۰/۱۸ a	۰/۰۷۷۳ ± ۰/۰۰۵ b
اشرشیاکلی	۰/۰۹۴ ± ۰/۰۲ b	۰/۱۶ ± ۰/۱۱ a	۰/۰۹۱ ± ۰/۰۲ b

ارقام ذکر شده میانگین دو تکرار (μ) و(tg) ± SD می باشند و حروف لاتین نتایج بدست آمده از آزمون دانکن و مقایسه میانگینها می‌باشند ، اعداد حداقل با یک حروف مشابه از لحاظ آماری معنی دار نیستند، آزمون دانکن در سطح آماری۰/۰۵

جدول۳- مقایسه زمان تقسیم سلولی (برحسب h) بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و اشرشیاکلی در محیط حاوی پری بیوتیکهای مختلف

پروبیوتیک	(۲درصد) اینولین HP	(۲ درصد)SCSF	کنترل
بیفیدوباکتریوم بیفیدوم	۹/۰۶ ± ۰/۱۰ a	۳/۷۲ ± ۰/۲۵ b	۸/۹۶ ± ۰/۰۱ a
اشرشیاکلی	۷/۳۷ ± ۰/۰۵ a	۴/۳۳ ± ۰/۰۹ b	۷/۴۵ ± ۰/۱۵ a

ارقام ذکر شده میانگین دو تکرار (μ) و(tg) ± SD می باشند و حروف لاتین نتایج بدست آمده از آزمون دانکن و مقایسه میانگین‌ها می باشند، اعداد حداقل با یک حروف مشابه از لحاظ آماری معنی دار نیستند، آزمون دانکن در سطح آماری۰/۰۵

نتیجه گیری

۱- میزان مصرف بتافروکتان های استخراجی از ریشه گیاه شنگ توسط بیفیدوباکتریوم بیفیدوم که بعنوان سویه رایج پروبیوتیک محسوب می شود، در رقابت با اینولین تجاری برتری داشت.

۲- باکتری اشرشیاکلی بعنوان یک گونه غیر پروبیوتیک رشد و فعالیت متابولیکی خوبی در محیط حاوی پری بیوتیک های شنگ در شرایط آزمایشگاهی نیز از خود نشان داد.

۳- بتافروکتان استخراجی از ریشه شنگ بدلیل داشتن DP پایین تر (طبق ارزیابی انجام گرفته بوسیله دستگاه HPLC) در حدود۷-۲ نسبت به اینولین تجاری (HP) با درجه پلی مریزاسیون حدود ۲۵ ، توسط باکتری های مورد نظر راحت تر مورد مصرف و استفاده قرار گرفت و باکتری ها رشد و فعالیت بیشتری از خود نشان دادند.

٤- اینولین تجاری در غلظتهای پایین تر (۰/۵٪ و ۱٪ وزنی – حجمی) سبب افزایش رشد بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و اشرشیاکلی شد در حالیکه در غلظتهای بالاتر (۲ و ۳ درصد) بی تأثیر بر میزان رشد و فعالیت آنها بود.

٥- باکتری پروبیوتیک در محیط دارای بتافروکتان شنگ رشد و فعالیت بیشتری نسبت به اشرشیاکلی در شرایط آزمایشگاهی داشت.

٦- استفاده از بتافروکتان استخراجی از ریشه گیاه شنگ می تواند بعنوان جایگزینی مناسب برای اینولین تجاری HP باشد وتولید این ترکیب پری بیوتیک در داخل کشور راهی برای مقابله با واردات این کالا از خارج کشور و عدم پرداخت هزینه گزاف در کشور می باشد.

منابع مورد استفاده

زرگری ع، ۱۳۷۲ . گیاهان دارویی، انتشارات دانشگاه تهران، چاپ پنجم، جلد سوم، صفحه۸.

میلانی الناز، گلی موحد غلامعلی، حسینی فرشته، ۱۳۹۰. کارایی روش سطح پاسخ در بهینه سازی شرایط استخراج اینولین از گیاه شنگ، مجله پژوهشهای صنایع غذایی، جلد ۲۱، شماره ۱ صفحه‌های ۳۵ تا ٤٥.

Bailey JS, Blankenship LC and Cox NA, 1991. Effect of fructooligosaccharides on Salmonella colonization of the chicken intestine. Poultry Science 70: 2433–2438.

Biaro-da-costa ML, Janourio MIN, Simao FMS, Leitao AEB, 2005. Characterization of inulin from chicory and salsify cultivated in Portugal. Alim Nutr Araraquara 16:221-225.

Crittenden R, Karppinen S, Ojanen S, Tenkanen M, Fagerstrom R, Matto J, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Poutanen K, 2002. Fermentation of cereal dietary fibre carbohydrates by probiotic and intestinal bacteria. Journal of the Science of Food and Agriculture 82: 781-789.

FAO/WHO, 2001. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.

Flamm G, Glinsmann W, Kritchevsky D, Prosky L, Roberfroid M, 2001. Inulin and Oligofructose as Dietary Fiber: A Review of the Evidence. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 5:353-362.

Fooks LJ, Gibson GR, 2002. In vitro investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. FEMS Microbiology Ecology 39: 67-75.

Goderska K, Nowak J, Czarnecki Z, 2008. Comparison of the *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* species in media supplemented with selected saccharids including prebiotic. Acta Sci. Pol Technol Aliment 7(2):5-20.

Gopal A, Shah NP, Roginski H, 1996. Bile tolerance, taurocholate and cholesterol removal by *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. Milchwissenschaft 51(11):619-622.

Hartemink R, Laere KMJ and van Rombouts FM, 1997. Growth of enterobacteria on fructo-oligosaccharides. Journal of Applied Microbiology 83: 367–374.

Goux w, Strong AAD, Lee PWN and Reitzer LJ, 1995. Utilization of Aspartate as a Nitrogen Source in Escherichia coli. Journal of Biological Chemistry, 270: 638-646.

Hidaka H, Eida T, Takizawa T, Tokunaga T and Tashiro Y, 1986. Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. Bifidobacteria Microflora 5: 37–50.

Hu B, Gong Q, Wang, Y, Yiming M, Li J, Yu W, 2006. Prebiotic effects of neoagaro-oligosaccharides prepared by enzymatic hydrolysis of agarose. Anaerobe 12: 260–266.

Hughes R, Rowland IR, 2001. Stimulation of apoptosis by two prebiotic chicory fructans in the rat colon. Carcinogenesis 22: 43–47.

Li D, Kim M, Zhengyu J, Zhou J, 2008. Prebiotic effectiveness of inulin extracted from edible burdock. Anaerobe 14: 29–34.

Lopez-Molina D, Navarro-Martínez MD, Rojas-Melgarejo F, NP HA, Chazarra S, Rodriguez-Lopez JN, 2005. Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (Cynara scolymus L.). Phytochemistry 66: 1476–1484.

Mitsuoka T, Hidaka H and Eida T, 1987. Effect of fructooligosaccharides on intestinal microflora. Die Nahrung 31:427–436.

Monsan P and Paul F, 1995. Enzymatic synthesis of oligosaccharides. FEMS Microbiol Rev 16:187–192.

Niness RK, 1999. Breakfast Foods and the Health Benefits of Inulin and Oligofructose. Cereal Food World 44:79-81.

Rada V, Nevoral J, Trojanova I, Tomankova E, Smehilova M, Killer J, 2008. Growth of infant faecal bifidobacteria and clostridia on prebiotic oligosaccharides in in vitro conditions. Anaerobe 14: 205–20823.

Roberfroid MB, 2005. Introducing inulin-type fructans. British Journal of Nutrition 93:13–25.

Roberfroid M, 2007. Prebiotics: the concept revisited. 2. J Nutr 137: 830-837.

Rodrigues SP and Gustavo A, 2007. Ultrasound extraction of compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder. Journal of Food Engineering 80: 869-872.

Rousseau V, Lepargneur JP, Roques CM, Remaud-Simeon F, 2005. Prebiotic effects of oligosaccharides on selected vaginal lactobacilli and pathogenic microorganisms. Anaerobe 11: 145-153.

Talwalkar A and Kailasapathy K, 2004. A Review of Oxygen Toxicity in Probiotic Yogurts: Influence on the Survival of Probiotic Bacteria and Protective Techniques. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 3: 117-124.

Van dWT, Boon N, Possemiers S, Jacobs H and Verstraete W, 2004. Prebiotic effects of chicory inulin in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. Fems Microbiol Ecol 51:143–153.

Wang X, Gibson G, 1993. Effect of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. Journal of Applied Bacteriology 75:373–380.

Evaluation of the in vitro effect of β-fructan extracted from Salsify root on growth of *B.bifidum* and *E.coli*

L Nourbakhsh[1], A Mohamadi Sani[2], E Milani*[3] and E Mansouri[1]

Received: Sunday, July 15, 2012 Accepted: Tuesday, July 23, 2013
[1]MSc Graduated, Department of Food Science, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran
[2]Assistant Prof., Department of Food Science, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran
[3]Assistant Prof, Department of Food Processing, Iranian Academic Centre for Education Culture and Research (ACECR), Mashhad, Iran
*Corresponding author: Email: e_ milani81@yahoo.com

Abstract
Bifidogenic prebiotics fructans contain inulin, oligofructose and fructooligosaccharides. The aim of this study was to evaluate in vitro effectiveness, short chain β-fructans extracted from Salsify root (SCSF). Effect of SCSF on growth and activity of *Bifidobacterium bifidum* and *E.coli* was evaluated in concentrations of 0.5, 1, 2, 3% (w/v) during the 48 hours incubation period and it was compared with commercial inulin (HP-inulin). The results indicated that utilization of β(2→1) fructans by *Bifidobacterium bifidum* depended on the DP of fructo-oligomeric chains and these bacteria significantly utilized SCSF with short chain (lower DP) better than HP-inulin with higher DP ($p<0.05$). Also, in the case of both bacteria growth, no differences were observed between medium containing 2% and 3% (w/v) HP-inulin and medium without HP-inulin ($p>0.05$). Therefore, it can be concluded that HP-inulin at concentrations 2% and 3% (w/v) was not fermented by these bacteria, whereas supplementation with 0.5% and 1% (w/v) HP-inulin was found to be effective on bacteria growth ($p<0.05$). Also, the effects of SCSF (2% w/v) in growing of *Bifidobacterium bifidum* were significantly higher than that for *Escherichia coli* ($p<0.05$).

Keywords: Prebiotic, β-fructans, Salsify, HP-inulin, *Bifidobacterium bifidum*, *Escherichia coli*