DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2014.10715

دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۰، شماره ۵، صفحه ۷۹۲-۷۸۰ (۱۳۹۳)

اثر اینولین استخراجی از منابع گیاهی متفاوت بر مقاومت به شرایط اسید معدی در دوگونه لاکتوباسیلوس

سارا کمالی[۱*]، محمد الهی[۲]، مرضیه حسینی‌نژاد[۳] و مسعود یاورمنش[۲]

۱- نویسنده مسئول، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
پست الکترونیک: Kamalisarah@yahoo.com

۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- استادیار، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی خراسان رضوی، مشهد

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۱ تاریخ اصلاح نهایی: دی ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۱

چکیده

اینولین به علت ویژگی‌های تکنولوژیکی مختلف و اثرات پری‌بیوتیکی و سلامت‌بخش ارزنده، به‌طور گسترده‌ای در محصولات متفاوت و ترکیب‌های سین‌بیوتیک استفاده می‌شود. بقاء سوش‌های پروبیوتیک در طی استرس‌های گوارشی می‌تواند تحت تأثیر ترکیب غذایی حامل قرار گیرد. در این پژوهش امکان افزایش قابلیت رشد و زنده‌مانی دو سوش لاکتوباسیلوس کازئی PTCC 1608 و لاکتوباسیلوس رامنوسوس PTCC 1637 در حضور اینولین از منابع گیاهی مختلف (*Cichorium intybus & Heliantus tuberosus*) و اینولین استاندارد آزمایشگاهی در شرایط اسیدی (۴، pH= ۲/۵) و pH= ۶/۲ به‌عنوان کنترل بررسی و با گلوکز مقایسه شد. افزودن کربوهیدرات به محیط کشت دو سوش باکتری به‌طور معنی‌داری باعث افزایش رشد و مقاومت باکتری‌ها به شرایط اسیدی گردید. البته اینولین کاسنی غیربومی و اینولین استاندارد در افزایش مقاومت باکتری اثری بیشتر از اینولین سیب‌زمینی ترشی و قابل مقایسه با گلوکز داشتند.

واژه‌های کلیدی: سیب‌زمینی ترشی، فروکتان، کاسنی، لاکتوباسیلوس، استرس.

مقدمه

با شناخت تأثیر عمیق فلور میکروبی کولن بر سلامت میزبان و با توجه به عدم کارایی آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان عامل پیشگیری به هنگام عدم وجود بیماری، علاقه به استفاده از پری‌بیوتیک‌ها به‌عنوان ترکیب‌های غذایی فراسودمند در تنظیم ساختار فلور میکروبی کولن با هدف ایجاد اثرات مثبت بر سلامت افزایش یافته‌است (Gibson *et al.*, 2005؛ Wang, 2009). پری‌بیوتیک ترکیبی است که به‌طور انتخابی تخمیر شده و تغییر خاصی را در ترکیب و یا فعالیت فلور میکروبی دستگاه گوارش ایجاد می‌کند (Roberfroid, 2007). مهمترین گونه‌های باکتریایی که هدف تحریک انتخابی هستند شامل بیفیدوباکتر و لاکتوباسیلوس (یا پروبیوتیک‌ها) است (Wang, 2009). پروبیوتیک‌ها کشت‌های میکروبی حاوی یک یا مخلوطی از میکروارگانیسم‌های غیرپاتوژن و زنده بوده که در مصرف به مقدار کافی، اثرات مفیدی بر بهبود تعادل میکروبی روده و کیفیت عملکرد آن دارند (Vernazza *et al.*, 2006a). استفاده از پری‌بیوتیک‌ها در محصولات مختلف دارای اثر مثبتی بر مشکل کاهش تعداد ارگانیسم‌های زنده پس از مصرف محصول در طول گذر از سیستم گوارشی فوقانی و زمان انبارمانی بوده و باعث افزایش پروبیوتیک‌های بومی دستگاه گوارش نیز می‌شوند (Crittenden, 1999). نتایج تحقیقات مختلف حکایت از اثر مثبت پری‌بیوتیک‌هایی مانند فروکتان‌های اینولین، گزیلوالیگوساکاریدها، فیبر و عصاره

غلات و گرانول‌های نشاسته بر افزایش مقاومت بعضی از سوش‌های پروبیوتیک به شرایط اسیدی داشته‌است (Pan *et al*., 2009؛ Brink *et al*., 2006؛ Charalampopoulos *et al*., 2003؛ Michida *et al*., 2006؛ Wang *et al*., 1999). بنابراین تحقیق در یافتن پری‌بیوتیکی که اثرات مثبتی بر عملکرد سوش پروبوتیک مورد نظر ازجمله افزایش مقاومت به شرایط استرس‌زای سیستم گوارشی داشته باشد، مفید بوده و می‌تواند ارزش بیشتری برای محصول نهایی فراهم سازد (Saarela *et al*., 2003). بیشتر محصولات پری‌بیوتیک تجاری حاوی فروکتان‌های اینولین هستند (Tugland & Meyer, 2002). فروکتان‌های اینولین به‌طور طبیعی در حدود ۳۶۰۰۰ گونه گیاهی یافت می‌شوند و مجموعه‌ای از الیگو و پلی‌ساکاریدهایی از D-فروکتوز با پیوندهای β (۱→۲) بوده که در انتهای بیشتر زنجیره‌ها D-گلوکز با پیوند α(۱→۲) حضور دارد (Holownia *et al*., 2010). منابع عمده استخراج اینولین در گیاهان دارویی کاسنی (*Cichorium intybus*) و سیب‌زمینی ترشی (*Heliantus tuberosus*) است (Kaur & Gupta, 2002). در ایران گیاه کاسنی اغلب به‌صورت خودرو رشد می‌کند که دارای ریشه ضعیفی بوده و مناسب استخراج اینولین نیست. خاک و شرایط آب و هوایی مورد نیاز این گیاه شبیه چغندرقند است. سیب‌زمینی ترشی در مقیاس کم در بعضی نقاط کشور، در حاشیه مزارع کشت شده و بیشتر به مصرف تهیه ترشی‌های خانگی می‌رسد (Fazaeli *et al*., 2009). در مقایسه با ریشه کاسنی، غده سیب‌زمینی ترشی حاوی ترکیب‌های با مزه تلخ نیست، و مقاومت خوبی به یخبندان، خشکی و سایر شرایط نامناسب مانند آفات و بیماری‌ها نشان می‌دهد و می‌توان آن را با هزینه و کوددهی کم در تمام انواع خاک کشت کرد (Pua & Davey, 2010؛ Ma *et al*., 2011).

با نظر به قابلیت و استعداد آب و هوایی کشورمان در کشت محصولات کشاورزی مانند کاسنی و سیب‌زمینی ترشی و قابلیت استفاده چند منظوره از این گیاهان علاوه بر استخراج اینولین مانند خوراک دام، پرورش زنبور عسل، حفاظت از خاک و اثرات دارویی مختلف، و عدم تولید اینولین تجاری در داخل، تحقیقات در جنبه‌های گوناگون مانند شناسایی و استخراج ترکیب‌های مختلف از منابع بومی و کشت داده شده و بررسی اثرات این ترکیب‌ها در مقیاس آزمایشگاهی و بالینی، می‌تواند مفید واقع شود. بنابراین این پژوهش به بررسی خصوصیات اینولین استخراج شده از سیب‌زمینی ترشی بومی و مقایسه آن با سایر انواع اینولین از منابع متفاوت و اثر انواع اینولین با ویژگی‌های متفاوت بر مقاومت دو سوش لاکتوباسیلوس به pHهای اسیدی معمول معده و مقایسه آن با گلوکز می‌پردازد.

مواد و روشها

استخراج اینولین از غده سیب‌زمینی ترشی

سیب‌زمینی ترشی منطقه کرج از بازار میوه و تره‌بار مشهد خریداری شد. به‌منظور حذف آلودگی، غده‌ها با آب سرد کاملاً شسته شده و پس از خشک شدن تا زمان انجام عملیات استخراج، در ۱۸°C- نگهداری شد. غده‌ها پس از پوست‌گیری، در مخلوط‌کن خرد شده و با ۳ لیترآب مقطر به ازای هر کیلوگرم غده خرد شده مخلوط شد. از متابی‌سولفیت‌سدیم در آب مقطر به غلظت ۱۰۰ppm به‌منظور به حداقل رساندن فرایند قهوه‌ای شدن استفاده گردید. مخلوط حاصل به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۹۰-۸۰°C قرار گرفته و طی این مدت عمل همزدن انجام شد. پس از صاف کردن عصاره به‌منظور تصفیه، pH سوسپانسیون عصاره با استفاده از محلول هیدروکسیدکلسیم ۵٪ از ۶-۵ به حدود ۱۲-۱۰ رسانده شد. سپس از محلول اسید فسفریک ۱۰٪ استفاده گردید و pH عصاره به ۹-۸ رسانده شد و به مدت ۳-۲ ساعت در دمای ۶۰°C نگه‌داری شد تا رسوب تشکیل گردد، آنگاه رسوب حاصل با استفاده از کاغذ صافی و تحت خلأ جدا شد. برای اطمینان از فرایند تصفیه، مرحله افزودن هیدروکسیدکلسیم و اسید فسفریک دو بار انجام شد. عصاره تصفیه شده با افزودن حدود ۲۰ گرم کربن فعال به ازای هر کیلوگرم غده و همزدن شدید در دمای ۶۰°C به مدت ۳۰-۱۵ دقیقه رنگ‌بری شد و کربن فعال به کمک صافی تحت خلأ جدا گردید. با استفاده از دستگاه تغلیظ تحت خلأ (اواپراتور چرخشی) در دمای ۷۰°C عمل تغلیظ عصاره انجام شده و بریکس به ۴۲ رسانده شد. به‌منظور خالص‌سازی بیشتر، اینولین با استفاده از اتانول رسوب داده شد. برای این منظور به عصاره تغلیظ شده به نسبت ۸ به ۱ اتانول ۹۹٪ افزوده شد. سوسپانسیون حاصل برای ته‌نشینی کامل رسوب به‌مدت ۲ روز در دمای ۴۰°C قرار داده شد و بعد از آن الکل جدا گردید. رسوب بدست آمده به‌مدت ۴ روز در دمای ۵۰°C قرار گرفت، رسوب خشک شده در پایان آسیاب گردید و وزن نهایی آن به

وزن غده‌های اولیه بدست آمد (Balvardi *et al*., 2011؛ Paseephol *et al*., 2007).

اندازه‌گیری کربوهیدرات کل

قند کل موجود در نمونه‌ها به روش فنول سولفوریک اسید اندازه‌گیری شد. ابتدا به ۱ میلی‌لیتر نمونه رقیق شده، ۱ میلی‌لیتر فنول ۵٪ افزوده شد. سپس ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸٪، به نمونه‌ها اضافه و پس از قرار دادن نمونه‌ها در حمام آب ۳۰°C به مدت ۲۰ دقیقه، جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۹۰nm اندازه‌گیری شد. به‌منظور تهیه منحنی استاندارد از گلوکز استفاده شد (Southgate, 1991).

اندازه‌گیری قند احیاء

برای اندازه‌گیری قند احیاء از معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید استفاده شد. به ۳ میلی‌لیتر از محلول نمونه‌ها ۳ میلی‌لیتر از معرف دی‌نیتروسالسیلیک اسید اضافه گردید. لوله‌ها با فویل به‌طور کامل پوشانده و به مدت ۵ تا ۱۵ دقیقه در دمای ۹۰°C قرار داده شدند. سپس ۱ میلی‌لیتر تارتارات سدیم پتاسیم ۴۰٪ به لوله‌ها اضافه و بلافاصله تا دمای اتاق سرد شدند و در نهایت جذب در ۵۷۵nm خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از گلوکز استفاده شد (Miller, 1995).

تعیین میانگین درجه پلیمریزاسیون

میانگین درجه پلیمریزاسیون اینولین استخراج شده از تقسیم درصد وزنی قند کل بر درصد وزنی قند احیاء بدست آمد (Paseephol *et al*., 2007).

محاسبه مقدار اینولین

درصد اینولین در پودر نهایی از کم کردن مقدار قند احیاء از کربوهیدرات کل بدست آمد (Lingyun *et al*., 2007).

اندازه‌گیری pH محلول اینولین

برای اندازه‌گیری pH محلول اینولین، ابتدا محلول ۱۰٪ اینولین در آب مقطر تهیه شد و بعد pH این محلول با استفاده از pHمتر اندازه‌گیری شد (López-Molina *et al*., 2005).

اندازه‌گیری درصد ماده خشک

برای اندازه‌گیری درصد ماده خشک نمونه، ۵ گرم از هر نمونه اینولین، در دمای ۱۰۲ ± ۲°C خشک شده و بعد در دسیکاتور حاوی سیلیکاژل سرد و با ترازو وزن گردید و درصد ماده خشک از تقسیم جرم نمونه خشک شده بر جرم نمونه اولیه در صد محاسبه شد.

اندازه‌گیری خاکستر کل

۵ گرم از نمونه در بوته چینی در کوره الکتریکی با دمای ۵۵۰°C سوزانده شد و درصد خاکستر کل از تقسیم وزن خاکستر حاصل بر وزن اولیه نمونه در ۱۰۰ بدست آمد.

لازم به تذکر این مطلب است که پودر اینولین کاسنی (*Cichorium intybus*) توسط نهاردانی (۱۳۸۹) عیناً به همین روش استخراج و آنالیز شد، بذر این گیاه قبلاً از کشور مجارستان تهیه و در مزرعه تحقیقاتی پارک علم و فناوری خراسان رضوی کشت شده بود. خصوصیات این اینولین با خصوصیات اینولین سیب‌زمینی ترشی مقایسه شد و از آن در مراحل بعدی آزمایش یعنی بررسی اثر اسید استفاده گردید.

محیط کشت و سوش‌ها

دو سوش لاکتوباسیلوس کازئی PTCC 1608 و لاکتوباسیلوس رامنوسوس PTCC 1637 به‌صورت لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران تهیه و مطابق با دستور در محیط کشت MRS براث (De Man Rogosa & Sharp broth) فعال شده و بعد کشت‌های نگهداری تهیه شد. برای تهیه کشت ۱۶ ساعته (Over night) از کشت‌های نگهداری ۱۰۰µL به ۱۰mL MRS براث تلقیح شده و ۱۶ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شد.

به‌منظور بررسی اثر هر کدام از کربوهیدرات‌های مد نظر به تنهایی، محیط MRS براث بدون کربوهیدرات تهیه شد (g/L) (Saarela *et al*., 2003؛ Kimoto-Nira *et al*., 2010): پپتون کازئین ۱۰/۰، آمینواسید با پایه نیتروژن مخمر ۵/۰ (yeast nitrogen base)، استات سدیم ۵/۰ ($Na\text{-}acetate\times3H_2O$)، دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات ۲/۰ ($K_2HPO_4\times3H_2O$)، سولفات‌منیزیم ۰/۲ ($MgSo_4\times7H_2O$)، دی‌آمونیوم سیترات ۲/۰ ($(NH_3)_2C_6H_8O_7$)، سولفات منگنز

۰/۵ ($MnSO_4 \times H_2O$) و توبین ۸۰، ۱ mL (pH=۶/۲ محیط کشت).

بررسی اثر محیط اسیدی

بدین منظور، محیط کشت براث بدون کربوهیدرات در غلظت ۲ برابر تهیه شده و pH محیط کشت به کمک HCl ۱۲ مولار در محدوده ۲/۵ و ۴ تنظیم شد. محیط کشت شاهد دارای محدوده pH= ۶/۲ بود و بعد اتوکلاو شد. گلوکز و منابع اینولین، اینولین استخراجی از کاسنی و سیب‌زمینی ترشی و اینولین کاسنی استاندارد آزمایشگاهی (Fluka 57610) در ۵۰٪ باقیمانده آب مقطر به‌طور کامل حل شده و اتوکلاو شد. سپس محلول هر یک از کربوهیدرات‌ها با محیط‌های کشت تهیه شده، در شرایط استریل مخلوط شد، به‌طوری که غلظت نهایی گلوکز و انواع اینولین در محیط کشت ۲W/V% باشد. در محیط کشت بدون کربوهیدرات از آب مقطر استفاده شد. پس از مخلوط‌سازی pH محیط کشت کنترل شد. پس از تلقیح تعداد مشخص باکتری در زمان صفر محیط‌های کشت در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شد و پس از ۳ و ۶ ساعت شمارش سلول‌های زنده با استفاده از رقت‌سازی و کشت سطحی بر MRS آگار در شرایط بی‌هوازی به‌مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۷°C انجام شد. نتایج شمارش به‌صورت لگاریتمی (log_{10}cfu/ml) بیان شد (Hyronimus *et al.*, 2000). همچنین مقادیر دانسیته نوری (Optical Density=OD) در زمان‌های ۳ و ۶ ساعت در طول موج ۶۰۰nm اندازه‌گیری شد (Voravuthikunchai *et al.*, 2006).

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری اثر کربوهیدرات‌ها در شرایط اسیدی، آنالیز واریانس توسط نرم‌افزار Minitab برای هر یک از سوش‌های لاکتوباسیلوس انجام شد. لگاریتم شمارش سلولی در ۴ نوع کربوهیدرات و تیمار بدون کربوهیدرات، ۳ سطح pH (۲/۵، ۴، ۶/۲) در زمان‌های صفر، ۳ و ۶ ساعت و دانسیته نوری در زمان‌های ۳ و ۶ ساعت، در قالب طرح آماری فاکتوریل کاملاً تصادفی انجام شد. برای مقایسه میانگین از نرم‌افزار Mstat-C و از آزمون LSD استفاده شد ($p \leq ۰/۰۵$). داده‌ها از سه تکرار بدست آمده‌است.

نتایج

مقایسه خصوصیات انواع اینولین

نتایج حکایت از تفاوت در خصوصیات انواع اینولین بکار گرفته شده دارد (جدول ۱). مقدار قند احیاء در پودر اینولین سیب‌زمینی ترشی کمترین مقدار و در اینولین استاندارد آزمایشگاهی بیشترین مقدار بود. اینولین بدست آمده از سیب‌زمینی ترشی دارای بالاترین درجه پلیمریزاسیون و درصد خاکستر کل بود.

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

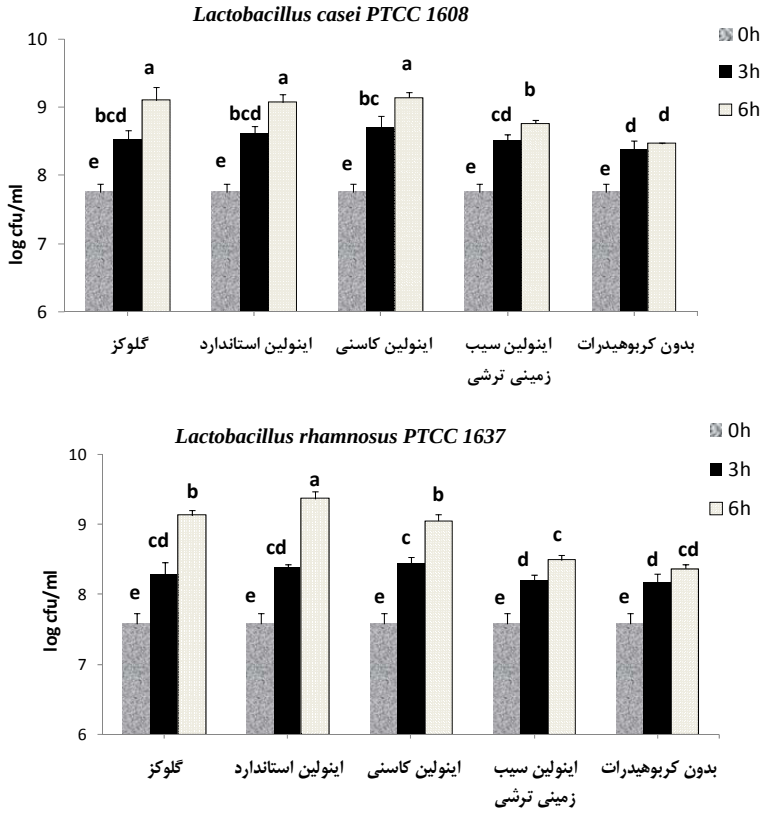
فاکتورهای اندازه‌گیری شده	اینولین کاسنی*	اینولین سیب‌زمینی ترشی	اینولین استاندارد (Fluka57610)
درصد کربوهیدرات کل	۸۲/۴۲ ± ۰/۴۷	۸۷/۲۲ ± ۰/۸۲	۹۳/۵۸ ± ۰/۲۱
درصد قند احیاء	۱/۹۶ ± ۰/۱۹	۱/۳۹ ± ۰/۱۳	۳/۸۵ ± ۰/۰۴
درصد تقریبی اینولین	~۸۰/۴۶	~۸۵/۸۳	~۸۹/۷۳
متوسط درجه پلیمریزاسیون	۴۱/۹۸	۶۲/۶۰	۲۴/۰۳
درصد ماده خشک	۹۵/۳۲ ± ۰/۶۵	۹۵/۹۱ ± ۰/۲۹	۹۰ ± ۰/۵۹
درصد خاکستر کل	۵/۱۹ ± ۰/۲۱	۸/۸۷ ± ۰/۲۹	۰/۵ ± ۰/۰۲
وضعیت ظاهری	پودر سفید رنگ	پودر کرم رنگ	پودر کرم رنگ
pH محلول ۱۰٪	۶/۶۵ ± ۰/۰۷	۶/۹۲ ± ۰/۰۵	۵/۸۵ ± ۰/۰۲

*: نهاردانی (۱۳۸۹)

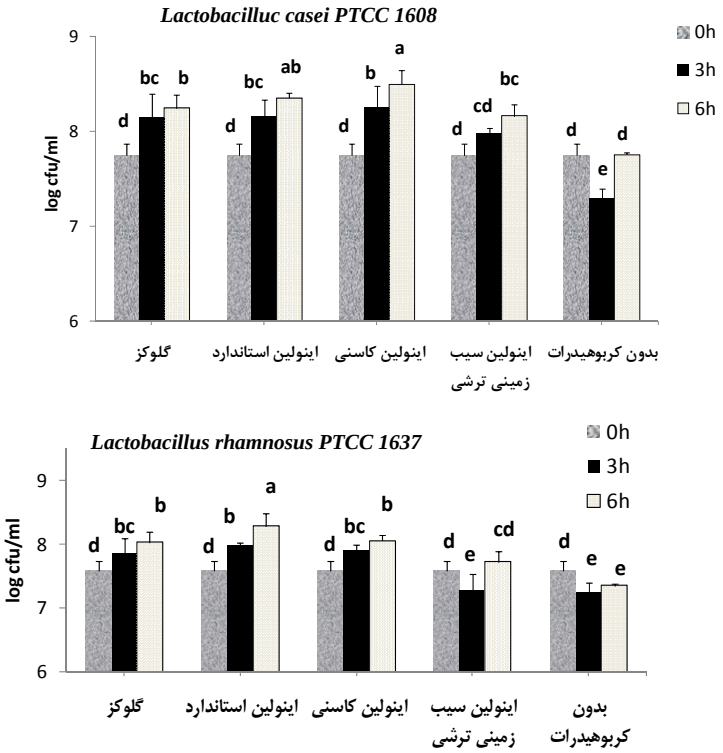
بررسی اثر شرایط اسیدی بر لگاریتم شمارش سلولی

در pH= ۶/۲ در طی ۶ ساعت لاکتوباسیلوس کازئی در تیمارهای حاوی اینولین کاسنی و استاندارد به‌خوبی گلوکز رشد داشت و لگاریتم شمارش سلول‌های زنده در این سه تیمار معنی دار نبود. در لاکتوباسیلوس رامنوسوس اینولین کاسنی اثر مشابهی همانند گلوکز بعد از ۶ ساعت داشت، در حالی‌که اثر اینولین استاندارد بر شمارش سلولی بیشتر از گلوکز و اینولین کاسنی بود (شکل ۱).

در pH= ۴ در هر دو سوش باکتری افزودن کربوهیدارت به محیط کشت در افزایش مقاومت باکتری به کاهش pH معنی دار بود (شکل ۲). در هر دو سوش با وجود کاهش pH در مواردی روند افزایشی رشد نسبت به زمان صفر مشاهده می‌شود. در لاکتوباسیلوس کازئی بعد از ۶ ساعت تفاوت معنی‌داری بین تیمار اینولین سیب زمینی ترشی و گلوکز مشاهده نشد. اینولین کاسنی استاندارد اثر مشابهی همانند گلوکز داشت، همچنین اثر اینولین کاسنی و اینولین استاندارد تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. در لاکتوباسیلوس رامنوسوس تیمار اینولین استاندارد بیشترین اثر را بر افزایش لگاریتم شمارش سلول‌های زنده داشته و پس از آن اینولین استخراجی از کاسنی و گلوکز اثر مشابهی ($p \leq ۰/۰۵$) داشتند.



شکل ۱- اثر نوع کربوهیدرات در pH =۶/۲ در طی زمان‌های ۰، ۳ و ۶ ساعت بر لگاریتم شمارش سلولی در لاکتوباسیلوس کازئی و رامنوسوس

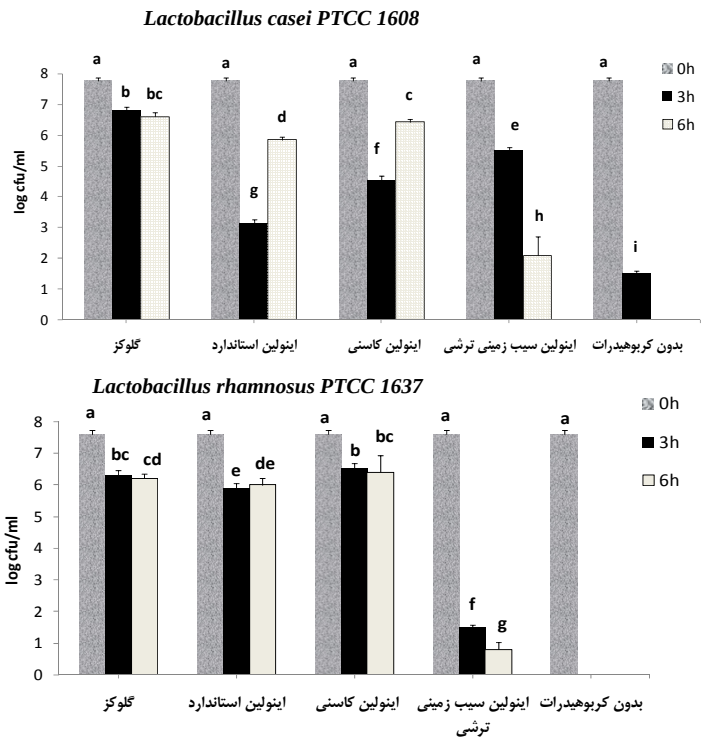


شکل ۲- اثر نوع کربوهیدرات در pH= ۴ بر لگاریتم شمارش سلولی در لاکتوباسیلوس کازئی و رامنوسوس

کاهش pH و ایجاد استرس در محیط کشت در طی زمان در دو سوش منجر به کاهش معنی‌داری ($p \leq ۰/۰۵$) در لگاریتم شمارش سلول‌های زنده شده‌است (شکل ۳). به نظر می‌رسد با افزایش استرس بر دو باکتری نقش درجه پلیمریزاسیون تا حدودی مشخص‌تر شده، به‌طوری که برای هر دو باکتری اینولین سیب‌زمینی ترشی با درجه پلیمریزاسیون بالا بیشترین کاهش شمارش سلولی را نسبت به سایر منابع کربوهیدرات داشت؛ در عین حال کاهش شمارش سلولی نسبت به زمان اولیه در این تیمار در لاکتوباسیلوس کازئی کمتر از لاکتوباسیلوس رامنوسوس بود. همچنین واضح است که افزودن گلوکز و اینولین به محیط کشت دو باکتری اثر معنی‌داری ($p \leq ۰/۰۵$) بر بقاء سلول در شرایط اسیدی داشته، به‌طوری که در نمونه‌های بدون کربوهیدرات در لاکتوباسیلوس کازئی بعد از ۶ ساعت و در لاکتوباسیلوس رامنوسوس بعد از ۳ ساعت، سلول زنده‌ای قابل گزارش نبود. در لاکتوباسیلوس کازئی، در طی ۶ ساعت گلوکز و اینولین کاسنی اثر مثبت مشابهی بر زنده‌مانی این سوش از لاکتوباسیلوس کازئی داشتند. در لاکتوباسیلوس رامنوسوس، نتایج مقایسه میانگین ($p \leq ۰/۰۵$) نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار میان تیمار گلوکز و اینولین استاندارد و همچنین عدم تفاوت میان تیمار گلوکز و اینولین استخراجی از کاسنی بود.

بررسی اثر شرایط اسیدی بر دانسیته نوری

بررسی تغییرات دانسیته نوری ازجمله فاکتورهای مورد بررسی در شرایط مختلف رشد باکتری است که می‌توان نتایج آن را با نتایج حاصل از شمارش سلول‌های زنده مقایسه کرد (شکل ۴). در pH= ۶/۲ همان‌طور که نتایج بدست آمده از لگاریتم شمارش سلولی نشان داد، در لاکتوباسیلوس کازئی تغییرات دانسیته نوری نیز بعد از ۳ و ۶ ساعت در گلوکز و اینولین استاندارد و کاسنی تفاوت معنی‌داری نداشت. همینطور رشد در اینولین سیب‌زمینی ترشی کمتر از گلوکز و سایر انواع اینولین بود ($p \leq ۰/۰۵$).



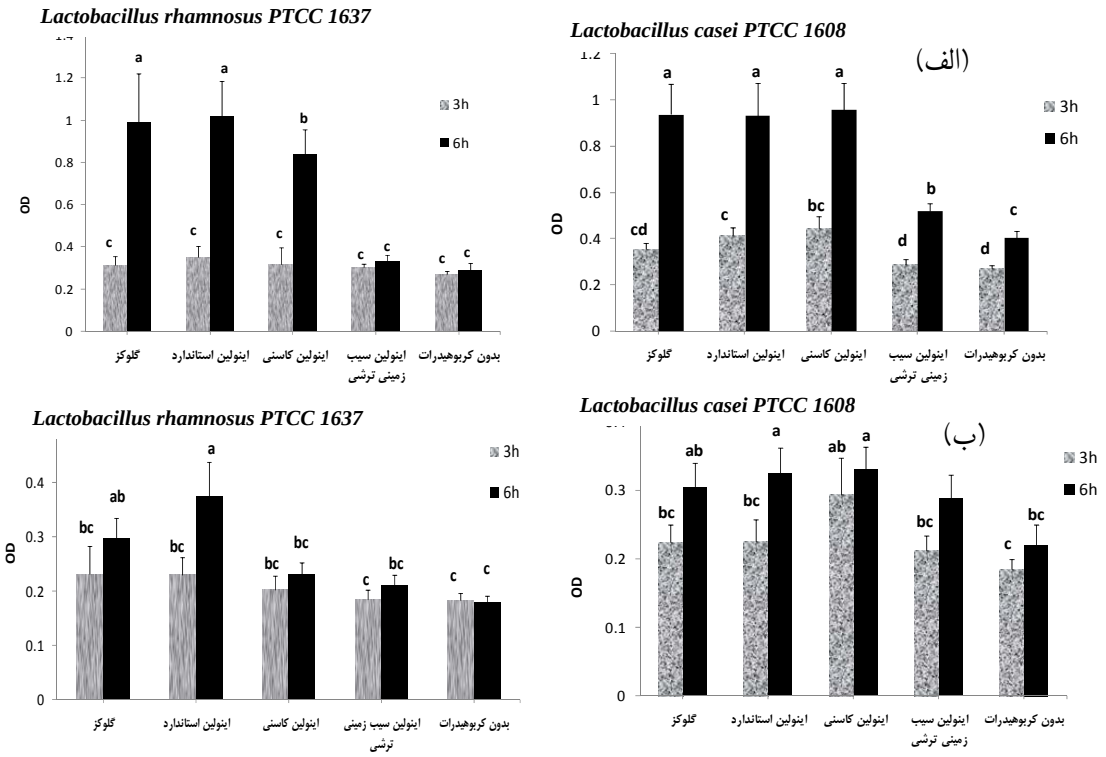
شکل ۳- اثر نوع کربوهیدرات در pH= ۲/۵ بر لگاریتم شمارش سلولی در لاکتوباسیلوس کازئی و رامنوسوس

در لاکتوباسیلوس رامنوسوس دانسیته نوری به‌طور معنی‌داری در اینولین کاسنی کمتر از اینولین استاندارد و گلوکز بود. با توجه به نتایج، اینولین کاسنی و اینولین استاندارد اثرات مثبتی بر افزایش دانسیته نوری در دو سوش باکتری داشتند.

در pH= ۴ تغییرات دانسیته نوری در هر دو سوش باکتری روند افزایشی رشد را نشان می‌دهد. در لاکتوباسیلوس کازئی انواع اینولین اثر مثبتی بر افزایش دانسیته نوری داشتند. همچنین در لاکتوباسیلوس رامنوسوس اینولین استاندارد بیشترین اثر را در افزایش دانسیته نوری داشت که با گلوکز تفاوت معنی داری نشان نداد. در لگاریتم شمارش سلولی نیز بیشترین رشد در تیمار اینولین استاندارد دیده شد. در pH= ۲/۵ مقادیر دانسیته نوری در هر دو سوش باکتری تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. دانسیته نوری در تمامی تیمارها کمتر از ۰/۲ (خارج از محدوده خطی قانون بیر-لامبرت) بود، که این مسئله می‌تواند ناشی از عدم رشد باکتری و یا در مواردی رشد بسیار کم (نتایج حاصل از لگاریتم سلولی) باشد. به‌طور کلی تغییرات دانسیته نوری در دو سوش باکتری با نتایج لگاریتم شمارش سلولی قابل مقایسه است.

بحث

نتایج حاصل از آنالیز کمّی و کیفی انواع اینولین حکایت از خصوصیات متفاوت اینولین در منابع متفاوت داشت. متوسط درجه پلیمریزاسیون شاخصی کیفی بوده و رابطه نزدیکی با خصوصیات عملگرای اینولین در کاربردهای غذایی دارد. متوسط درجه پلیمریزاسیون بالاتر نشان‌دهنده حضور نسبت بیشتری از فروکتان‌های بلند زنجیر در اینولین است (Paseephol *et al.*, 2007). اینولین حاصل از منابع گیاهی مختلف، در مراحل مختلف دوره رشد یا شرایط متفاوت آب و هوایی دارای متوسط درجه پلیمریزاسیون متفاوت است (López-Molina *et al.*, 2005). نتایج تحقیقات نشان داد که اینولین سیب‌زمینی ترشی درجه پلیمریزاسیون بالاتری در فصل پاییز نسبت به برداشت در فصل بهار دارد (Praznik *et al.*, 2002).



شکل ۴- اثر نوع کربوهیدرات در الف) pH = ۶/۲ و ب) pH= ۴ در طی زمان ۳ و ۶ ساعت بر OD

برداشت سیب‌زمینی ترشی در این پژوهش نیز در اوایل فصل پاییز بود که می‌تواند یکی از دلایل درجه پلیمریزاسیون بالای آن باشد. همچنین اینولین موجود در سیب‌زمینی ترشی می‌تواند درجه پلیمریزاسیونی بالاتر از ۴۰ داشته باشد (Kays & Nottingham, 2007). مواد معدنی در اینولین استخراجی توسط Milani و همکاران (۲۰۱۰a) از سیب‌زمینی ترشی ۳۱/۰۲mg کلسیم، ۱۱mg فسفر، ۰/۰۳۲mg آهن و ۵/۸mg پتاسیم در ۱۰۰ گرم عصاره تخمین زده شد. مقدار خاکستر در سیب‌زمینی ترشی برداشت شده از مناطق مختلف چین در ریشه‌های تازه از ۴/۲۱٪ تا ۱۲/۵۸٪ متفاوت بود (Ma *et al*., 2011). همچنین در پژوهشی عصاره الکلی استخراج شده از ریشه خشک شده کاسنی حاوی ۰/۰۳ ± ۳/۸٪ خاکستر بود (Jurgonbski *et al*., 2011). Balvardi و همکاران (۲۰۱۱) در شرایط مشابه، اینولینی با متوسط درجه پلیمریزاسیون ۲۶/۳۱ از سیب‌زمینی ترشی استخراج کردند. نتایج متفاوت این تحقیق می‌تواند به‌دلیل زمان‌های متفاوت برداشت، شرایط متفاوت نگهداری و یا احتمالاً استفاده از واریته متفاوت باشد. از طرفی در منابع متفاوت pH محلول ۱۰٪ اینولین در محدوده ی ۷-۵ گزارش شده‌است، که نتایج بدست آمده در این محدوده قرار دارد (López-Molina *et al*., 2005؛ Stephen *et al*., 2006).

با احتساب ۸۵/۸۳٪ اینولین در پودر سیب‌زمینی ترشی و با توجه به وزن پودر بدست آمده از غده های تازه، بازده استخراجی اینولین سیب‌زمینی ترشی از غده‌های تازه پس از تصفیه و خالص‌سازی در حدود ۱۰/۲۱٪ تخمین زده شد. بازده اینولین استخراجی از کنگرفرنگی توسط عباسی و فرزان‌مهر (۱۳۸۸) در بهترین حالت در استخراج آبی ۲/۳ گرم در ۱۰۰ گرم و در استخراج آبی با اعمال امواج فراصوت مستقیم ۲/۶ در ۱۰۰ گرم کنگرفرنگی محاسبه شد. همچنین در پژوهش Milani و همکاران (۲۰۱۱)، ۱۳/۲۳٪ اینولین از پودر خشک گیاه شنگ در شرایط بهینه استخراج آبی بدست آمد. به نظر می‌رسد بازده اینولین از سیب‌زمینی ترشی در این پژوهش بالاتر از این دو مورد بوده‌است، هر

چند این بازده همچنان کمتر از بازده معمول ۱۹-۱۴٪ براساس وزن تر و ۸۳-۶۸٪ براساس وزن خشک سیب‌زمینی ترشی است (Frank & Leenheer, 2002؛ Paseephol *et al*., 2007). در پژوهش Milani و همکاران (۲۰۱۰b) بازده استخراج سیب‌زمینی ترشی در شرایط بهینه ۴۲/۷۱٪ وزن خشک (پودر خشک شده) محاسبه شد که همچنان بازده کمتری از منابع صنعتی بوده و نسبت به سایر منابع داخلی بازده بیشتری است. بنابراین سیب‌زمینی ترشی منبع بومی غنی‌تری از اینولین نسبت به کنگرفرنگی و شنگ است، در عین حال اینولین کمتری نسبت به منابع صنعتی از آن استخراج شد. بنابراین تحقیقات بیشتری در زمینه شناسایی و پرورش واریته‌های مختلف بومی این گیاه و بررسی شرایط کاشت، داشت و برداشت، استخراج و خالص‌سازی به‌منظور رسیدن به بازده بالایی از اینولین مورد نیاز است.

لازم به تذکر این مطلب است که pH معده در حدود ۱ به هنگام روزه‌داری بوده و پس از هر وعده غذایی به حدود ۴/۵ می‌رسد و حرکت مواد غذایی از معده حدود ۳ تا ۶ ساعت به طول می‌انجامد (Vernazza *et al*., 2006b؛ Guo *et al*., 2009). در شرایط اسیدی اثر کمتر اینولین حاصل از سیب‌زمینی ترشی ناشی از متوسط درجه پلیمریزاسیون بالای آن است. فاکتورهای اصلی تأثیرگذار بر قابلیت تخمیر ساکاریدها شامل ساختار شیمیایی، ترکیب واحدهای مونومر، درجه پلیمریزاسیون و خطی یا منشعب بودن ساختمان ساکارید و به تبع آن حلالیت در آب است و عموماً ساکاریدهای کوتاه زنجیر، با ساختار خطی و محلول در آب بهتر تخمیر می‌شوند (Biedrzycka & Bielecka, 2004). توانایی تخمیر اینولین به تولید آنزیم بتافروکتوفورانوزیداز توسط باکتری نسبت داده شده که توانایی تولید این آنزیم در مقادیر متفاوت در باکتری‌های اسید لاکتیک گزارش شده‌است (Makras *et al*., 2005).

در pH= ۲/۵ در لاکتوباسیلوس کازئی در تیمارهای گلوکز و اینولین کاسنی و در لاکتوباسیلوس رامنوسوس در تیمارهای گلوکز، اینولین کاسنی و استاندارد تعداد باکتری‌های زنده بعد از ۶ ساعت تقریباً برابر و یا بیش از ۶ دوره لگاریتمی بود. محققان بقاء باکتری‌ها را بعد از استرس اسید در مقادیر بیش از 10^6cfu/ml برای ایجاد اثرات پروبیوتیکی در میزبان مثبت دانستند (Ding & Shah, 2007). از آنجا که بلع پروبیوتیک‌ها همراه با ترکیب‌های غذایی منجر به افزایش pH معده به ۳ یا مقادیر بالاتر می‌شود، ازاین‌رو بقاء باکتری‌ها در این pH با اهمیت تلقی شده است (Mishra & Prasad, 2005). بنابراین با توجه به زنده‌مانی خوب دو سوش لاکتوباسیلوس مورد ارزیابی در این پژوهش (در pH= ۲/۵)، به نظر می‌رسد این دو سوش قابلیت خوبی در مقاومت به شرایط اسیدی معده در تیمارهای ذکر شده داشته باشند.

لازم به تذکر این مطلب است که در pH= ۲/۵ در لاکتوباسیلوس رامنوسوس اینولین کاسنی به‌طور معنی‌داری اثر بیشتری از اینولین استاندارد داشته است، این در حالیست که درجه پلیمریزاسیون اینولین کاسنی از اینولین استاندارد بیشتر است. در لاکتوباسیلوس کازئی نیز اینولین کاسنی به‌طور معنی‌داری پس از ۳ و ۶ ساعت اثر بیشتری از اینولین استاندارد داشت، همچنین در تیمار اینولین سیب‌زمینی ترشی با وجود کاهش معنی‌دار پس از ۶ ساعت نسبت به سایر تیمارهای کربوهیدرات، کاهش لگاریتم شمارش سلولی پس از ۳ ساعت به‌طور معنی‌داری کمتر از سایر نمونه‌های اینولین بود. در توجیه این مسئله، ازجمله عوامل مداخله‌کننده‌ای که می‌توان به آن اشاره کرد، حضور مواد معدنی بیشتر به‌ترتیب در اینولین سیب‌زمینی ترشی و اینولین کاسنی نسبت به اینولین استاندارد بود (جدول ۱). املاح می‌تواند موجب تحریک رشد بعضی از پروبیوتیک‌ها شود، چنانچه افزودن قندهای ساده مثل گلوکز و فروکتوز و املاحی مثل منیزیم و منگنز رشد لاکتوباسیلوس اسیدفیلوس را تقویت می‌کند، همچنین افزودن این مواد همراه با آب گوجه‌فرنگی یا پالپ پاپایا به ماده غذایی در نهایت منجر به افزایش تعداد پروبیوتیک‌های زنده، کوتاه شدن زمان تقسیم سلولی و مصرف بهینه قند می‌گردد (همایونی‌راد، ۱۳۸۷). در پژوهشی سوش‌های لاکتوباسیلوس رامنوسوس ۸/۴ و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس K1 در محیط MRS براث غنی شده با فروکتان‌های اینولین و کربنات کلسیم به‌طور همزمان رشد بهتری از محیط کنترل (حاوی فروکتان به تنهایی) داشتند (Majkowska *et al*., 2003).

از طرفی واکنش دیگری که در محیط کشت تیمارهای اینولین در شرایط اسیدی اتفاق می‌افتد، هیدرولیز اینولین است که می‌تواند عامل تأثیرگذار مهمی بر رشد باکتری‌ها در شرایط اسیدی باشد. پایداری شیمیایی اینولین در محیط

اسیدی ۴ ≥pH با توجه بـه زمـان حـرارت و افـزایش دمـا کاهش می‌یابد، به‌طوری که در ۲=pH در دمای ۴۰°C پـس از ۵۵ دقیقه بیش از ۲۰٪ قند احیاء در محلـول ۵٪ اینـولین تشکیل شد و در دمای ۲۰°C این مقدار کمتـر از ۱۰٪ بـود. همچنین با افزایش زمان تا ۵۵ دقیقه روند تولید قنـد احیـاء افزایشی بود (Glibowski & Bukowska, 2011). بنـابراین انتظار می‌رود در ۲/۵ =pH و دمای ۳۷°C در محیط کشـت در طی مدت زمان طولانی‌تر ۳ و ۶ ساعت مقادیری از قنـد احیاء گلوکز و فروکتوز تشکیل شود، که می‌تواند در افزایش مقاومت باکتری مؤثر باشد. چنـین پدیـده‌ای در ۴ =pH بـا احتمال کمتر قابل انکار نیست.

اثر کربوهیدارت در افزایش مقاومت باکتری به شرایط اسیدی به توانایی تخمیر آن کربوهیدرات توسـط بـاکتری در شرایط اسیدی و تولید ATP مورد نیاز به‌منظور حفـظ تعادل باکتری نسبت داده شده اسـت. در شـرایط اسـیدی، میکروارگانیسـم‌هـا بـا قابلیـت تخمیـر بـی‌هـوازی pH سیتوپلاسمی را با مکانیسم‌های مختلفی تنظـیم مـی‌کننـد، ازجمله مهمترین مکانیسم‌ها، انتقال پروتون از سیتوپلاسـم باکتری به محیط خـارج سـلول از طریـق فعالیـت آنـزیم ATPase و مصرف ATP اسـت. نتـایج تحقیقـات نشـان داده‌است که فعالیت این آنزیم در تعدادی از بـاکتری هـای اسید لاکتیک با کاهش pH محیط خارج سلولی از خنثـی به ۵ افزایش مـی‌یابـد، بـه‌عنـوان مثـال فعالیـت آنزیمـی لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در معرض pHهای ۳ و ۳/۵ افزایش یافت. در پژوهش‌هـای مختلف در pHهای ۴ تا ۷ باکتری های اسید لاکتیک قادر به استفاده از کربوهیدرات ها بوده و ATP بیشتری (مـورد نیـاز) را بـرای حفـظ بقـاء سـلولی تولیـد کردنـد (Charalampopoulos *et al.*, 2003). تحقیقات نشان داد که حضور گلوکز و فروکتوز در شـیره معـدی بـا ۲ =pH منجر به افزایش بقاء سلول‌هـای زنـده در لاکتوباسـیلوس رامنوسـوس GG مـی‌شـود (Corcoran *et al.*, 2005). نتایج نشان‌دهنده آن بود که فرایند گلیکولیز نقـش مهمـی در این امر دارد، به طوری که گلیکولیز در pH پایین منجر به فراهم ساختن ATP برای حفظ تعادل باکتری می‌شـود. همچنین بقاء لاکتوباسیلوس رامنوسـوس GG در حضـور کربوهیدرات‌هایی کـه قابلیـت متـابولیز آن را دارد ماننـد گلوکز و فروکتوز در ۲ =pH بسیار بیشـتر از تیمـار هـای حاوی لاکتوز و ساکارز بود که توانایی باکتری در متابولیز آنها بسیار کمتر بود. در این پژوهش نیز در تیمار اینـولین سیب‌زمینی ترشی که توانایی باکتری در اسـتفاده از آن در ۶/۲ =pH کمتر بوده‌است، کمترین قابلیت بقاء در شـرایط اسیدی ملاحظه می‌شود.

نتایج پژوهش دیگری نشان داد که اینولین سینرژی منجر به افزایش مقاومت سـویه‌هـای متفـاوت لاکتوباسـیلوس در ۳ =pH نسبت به گلوکز می‌شود، علت این نتیجه اسـتفاده از اینولین به‌عنوان منبع کربن توسط باکتری‌ها بیان شد (Brink *et al.*, 2006). همچنـین افـزودن گزیلوالیگوسـاکارید و فروکتوالیگوساکارید به محیط کشت لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس حاوی شیره معـدی (۲ =pH) باعث افزایش بقاء این دو باکتری بیشتر از گلوکز شد که بیان شد اثر حمایتی این الیگوساکاریدها می‌توانـد در ارتبـاط بـا تحریک رشد این باکتری‌ها توسـط الیگوسـاکاریدهـا باشـد (Pan *et al.*, 2009).

با توجه به نتایج، افزودن انواع اینولین بـه‌ویـژه اینـولین کاسنی و استاندارد به محیط کشت در افـزایش مقاومـت دو سوش لاکتوباسیلوس به شرایط اسیدی مؤثر بود و حتـی در مواردی که به آن اشاره شد این اثر بیشتر از گلـوکز بـود. از آنجا که گلوکز به سرعت در سیسـتم گوارشـی بـدن جـذب می‌شود، حضور اینولین همراه با بـاکتری عـلاوه‌بـر افـزایش مقاومت باکتری پروبیوتیک به شرایط اسیدی منجر به ایجـاد اثرات پری‌بیوتیکی در روده بزرگ نیـز مـی‌شـود. بنـابراین انتخاب مواد مغذی حامل پروبیوتیک‌ها امری مهم و حیـاتی است.

منابع مورد استفاده

- عباسی، س. و فرزان مهر، ح.، ۱۳۸۸. بهینه سازی استخراج اینـولین از کنگر فرنگی با و بدون اعمال فراصـوت بـه کمـک روش سـطح پاسخ، علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، ۴۷: ۴۳۵- ۴۲۳.
- نهاردانی، م.، ۱۳۸۹. استخراج و بررسی اثرات پری بایوتیکی اینولین گیاه کاسنی دوساله. پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد، دانشـگاه آزاد سبزوار.
- همایونی‌راد، ع.، ۱۳۸۷. خواص سلامت بخش غذاهای فراسـودمند- پروبیوتیک، پری‌بیوتیک و سین‌بیوتیک. انتشـارات دانشـگاه علـوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تبریز، تبریز، ۱۵۶ صفحه.

- Balvardi, M., Safari, M., Habibi Rezaei, M., Hosseini, S.M.H., Rezaei, K. and Mosavi Movahedi, S.A.A., 2011. Kombucha production using extracted inulin from Jerusalem artichoke tuber. Journal of Food Science and Technology, 8(29): 89-100.
- Biedrzycka., E. and Bielecka, M., 2004. Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. Trends in Food Science and Technology, 15(3-4): 170-175.
- Brink, M., Todorov, S.D., Martin, J.H., Senekal, M. and Dicks, L.M.T., 2006. The effect of prebiotics on production of antimicrobial compounds, resistance to growth at low pH and in the presence of bile, and adhesion of probiotic cells to intestinal mucus. Journal of Applied Microbiology, 100: 813-820.
- Charalampopoulos, D., Pandiella, S.S. and Webb, C., 2003. Evaluation of the effect of malt, wheat and barley extracts on the viability of potentially probiotic lactic acid bacteria under acidic conditions. International Journal of Food Microbiology, 82(2): 133-141.
- Corcoran, B.M., Stanton, C., Fitzgerald, G.F. and Ross, R.P., 2005. Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. Applied and Environmental Microbiology, 71(6): 3060-3067.
- Crittenden, R.G., 1999. Prebiotics: 141-156. In: Tannock, G W., (Ed.). Probiotics: A Critical Review. Horizon Scientific Press, 170p.
- Ding, W.K. and Shah, N.P., 2007. Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. Journal of Food Science, 72(9): M446-M450.
- Fazaeli, H., Nosratabadi, N., Karkodi, K. and Mirhadi, A., 2009. In vitro and in vivo analysis of jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) and alfafa nutritive value. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, Water and Soil Science, 13(48): 163-173.
- Frank, A. and Leenheer, L.D., 2002. Inulin: 439-479. In: Vandamme, E.J., De Baets, S. and Steinbuchel, A., (Eds.). Biopolymers, Polysaccharides II: Polysaccharides from Eukaryotes. Wiley, 644p.
- Gibson, G.R., McCartney, A.L. and Rastall, R.A., 2005. Prebiotics and resistance to gastrointestinal infections. British Journal of Nutrition, 93(Suppl. 1): S31-S34.
- Glibowski, P. and Bukowska, A., 2011. The effect of pH, temperature and heating time on inulin chemical stability. Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria, 10(2): 189-196.
- Guo, Z., Wang, J., Yan, L., Chen, W., Liu, X.M. and Zhang, H.P., 2009. In vitro comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei Zhang*, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. Food Science and Technology, 42(10): 1640-1646.
- Holownia, P., Jaworska-Luczak, B., Wiśniewska, I., Biliński, P. and Wojtyla, A., 2010. The benefits & potential health hazards posed by the prebiotic inulin-a review. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 60(3): 201-211.
- Hyronimus, B., Le Marrec, C., Sassi, A.H. and Deschamps, A., 2000. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology, 61(2-3): 193-197
- Jurgonbski, A., Milala, J., Jusbkiewicz, J., Zdunbczyk, Z. and Krol, B., 2011. Composition of chicory root, peel, seed and leaf ethanol extracts and biological properties of their non-inulin fractions. Food Technology and Biotechnology, 49(1): 40-47.
- Kaur, N. and Gupta, A.K., 2002. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. Journal of Biosciences, 27(7): 703-714.
- Kays, S.J. and Nottingham, S.F., 2007. Biology and Chemistry of Jerusalem Artichoke: *Helianthus tuberosus* L. CRC press, Florida, 496p.
- Kimoto-Nira, H., Suzuki, C., Sasaki, K., Kobayashi, M. and Mizumachi, K., 2010. Survival of a Lactococcus lactis strain varies with its carbohydrate preference under in vitro conditions simulated gastrointestinal tract. International Journal of Food Microbiology, 143(3): 226-229.
- Lingyun, W., Jianhua, W., Xiaodong, Z., Da, T., Yalin, Y., Chenggang, C., Tianhua, F. and Fan, Z., 2007. Studies on the extracting technical conditions of inulin from jerusalem artichoke tubers. Journal of Food Engineering, 79(3): 1087-1093.
- López-Molina, D., Navarro- Martínez. M.D., Rojas-Melgarejo, F., Hiner, A.N.P., Chazarra, S. and Rodríguez-López, J.N., 2005. Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (*Cynara Scolymus* L.). Journal of Phytochemistry, 66(12): 1476-1484.
- Ma, X.Y., Zhang, L.H., Shao, H.B., Xu, G., Zhang, F., Ni, F.T. and Brestic, M., 2011. Jerusalem artichoke (*Helianthus Tuberosus*), a medicinal salt-resistant plant has high adaptability and multiple-use values. Journal of Medicinal Plants Research, 5(8): 1272-1279.
- Majkowska, A., Bielecka, M. and Biedrzycka, E., 2003. Selection of the probiotic strains of lactic acid bacteria stimulated by fructans in the presence of calcium. Polish Journal of Food and Nutrition Science, 12(Suppl.2): 64-68.
- Makras, L., Van Acker, G. and De Vuyst, L., 2005. *Lactobacillus paracasei* Subsp. *paracasei* 8700:2 degrades inulin-type fructans exhibiting different degrees of polymerization. Applied and Environmental Microbiology, 71(11): 6531-6537.
- Michida, H., Tamalampudi, S., Pandiella, S.S., Webb, C., Fukuda, H. and Kondo, A., 2006. Effect of cereal extracts and cereal fiber on viability of Lactobacillus plantarum under gastrointestinal tract conditions. Biochemical Engineering Journal, 28: 73-78.
- Milani, E., Poorazarang, H., Kadkhodaii, E., Vakilian, H. and Vatan Khah, Sh., 2010a. Evaluation of ultrasonic application for inulin extraction from *Helianthus tuberosus* and optimization of extraction conditions using response surface methodology (RSM). Iranian Food Science and Technology Research Journal, 6(2): 113-120.
- Milani, E., Poorazarang, H., Vatan Khah, Sh. and Vakilian, H., 2010b. Optimization of inulin extraction from *Helianthus tuberosus* using response surface methodology (RSM). Iranian Food Science and Technology Research Journal, 6(3): 178-183.

- Milani, E., Golimovahhed, Q.A. and Hosseini, F., 2011. Application of response surface methodology for optimization of inulin extraction from salsify plant. Journal of Food Research (Agricultural Science), 21: 35-43.
- Miller, G.L., 1995. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, 31(3): 426-428.
- Mishra, V. and Prasad D.N., 2005. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. International Journal of Food Microbiology, 103: 109-115.
- Pan, X., Wu, T., Zhang, L., Cai, L. and Song, Z., 2009. Influence of oligosaccharides on the growth and tolerance capacity of lactobacilli to simulated stress environment. Letters in Applied Microbiology, 48(3): 362-367.
- Paseephol, T., Small, D. and Sherkat, F., 2007. Process optimization for fractionating Jerusalem artichoke fructans with ethanol using response surface methodology. Journal of Food Chemistry, 104: 73-80.
- Praznik, W., Cieślik, E. and Florkiewicz, A.F., 2002. Soluble dietary fibres in Jerusalem artichoke powders: composition and application in bread. Nahrung/Food, 46(3): 151-157.
- Pua, E.C. and Davey, M.R., 2010. Plant Biology-Biotechnological Perspectives. Springr, 431p.
- Roberfroid, M.B., 2007. Inulin-type fructans: functional food ingredients. The Journal of Nutrition, 137(11): 2493-2502.
- Saarela, M., Hallamaa, K., Mattila-Sandholm, T. and Matto, J., 2003. The effect of lactose derivatives lactulose, lactitol and lactobionic acid on the functional and technological properties of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. International Dairy Journal, 13(4): 291-302.
- Southgate, D.A.T., 1991. Determination of Food Carbohydrates. Elsevier Applied Science, 232p.
- Stephen, A.M., Phillips, G.O. and Williams, P.A., 2006. Food Polysaccharides and Their Applications (Food Science and Technology). CRC press, 752p.
- Tugland, B.C. and Meyer, D., 2002. Non-digestible oligo-and polysaccharides (dietary fiber): their physiology and role in human health and food. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 1(3): 90-109.
- Vernazza, C.L., Gibson, G.R. and Rastall, R.A., 2006a. Carbohydrate preference, acid tolerance and bile tolerance in five strains of bifidobacterium. Journal of Applied Microbiology, 100(4): 846-853.
- Vernazza, C.L., Rabiu, B.A. and Gibson, G.R., 2006b. Human colonic microbiology and the role of dietary intervention: introduction to prebiotics: 1-28. In: Gibson, G.R. and Rastall, R.A., (Eds.). Prebiotics: Development and Application. John Wiley & Sons, 264p.
- Voravuthikunchai, S.P., Bilasoi, S. and Supamala, O., 2006. Antagonistic activity against pathogenic bacteria by human vaginal lactobacilli. Anaerobe, 12(5-6): 221-226.
- Wang, X., Brown, I.L., Evans, A.J. and Conway, P.L., 1999. The protective effects of high amylose maize (amylomaize) starch granules on the survival of bifidobacterium spp. in the mouse intestinal tract. Journal of Applied Microbiology, 87(5): 631-639.
- Wang, Y., 2009. Prebiotics: present and future in food science and technology. Food Research International, 42: 8-12.

The effectiveness of inulin extracted from different plant sources on gastric acid resistance of two lactobacillus species

S. Kamali[1*], M. Elahi[2], M. Hosseini Nejadand[3] and M. Yavarmanesh[2]

1*- Corresponding author, MSc. Graduate, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University, Mashhad, Iran, E-mail: kamalisarah@yahoo.com
2- Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University, Mashhad, Iran
3- Khorasan Research Institute for Food Science and Technology (KRIFST), Mashhad, Iran

Received: September 2012 Revised: December 2012 Accepted: February 2013

Abstract

Because of various technological properties, beneficial prebiotic and health effects, inulin is extensively used in different products and symbiotic combinations. The survival of probiotic strains during gastric stress is influenced by the physicochemical properties of food carriers used for delivery. In this study, the possibility of increasing the growth and survival potential of two Lactobacillus strains (Lactobacillus casei PTCC 1608 and Lactobacillus rhamnosus PTCC 1637) was investigated in the presence of inulin, extracted from different plant sources (*Cichorium intybus & Heliantus tuberosus*), and standard inulin under acidic conditions (pH= 4, 2.5) and pH=6.2 as control and compared to glucose. Our results clealy showed that the addition of carbohydrate to *lactobacillus* cultures significantly increased the growth and resistance of bacteria under acidic conditions. The inulin extracted from *Cichorium intybus* and standard inulin were more effective in increasing the resistance of bacteria as compared to the inulin extracted from *Heliantus tuberosus.*

Keywords: Jerusalem artichoke, fructan, chicory, lactobacillus, stress.