جداسازی پلی‌ساکاریدها از هسته‌خرما و بررسی برخی خصوصیات فراسودمند آن

مهرنوش تدینی[1*]، ،محمود شیخ زین الدین[2]، صبیحه سلیمانیان زاد[3]

1. دانشجوی دکترای علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان و عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد باغملک
2. دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
3. دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

(تاریخ دریافت: 92/12/26، تاریخ پذیرش: 93/2/18)

چکیده

هدف این تحقیق، جداسازی پلی‌ساکاریدهای هسته‌خرما و بررسی قابلیت پریبیوتیکی و برخی خصوصیات فراسودمند آن در مقایسه با اینولین (پریبیوتیک تجاری) است. پلی‌ساکاریدهای هسته‌خرما طی چند مرحله متوالی شامل چربی‌زدایی، استخراج آبی و رسوب پلی‌ساکارید به‌وسیله الکل، جداسازی شدند. آنالیز ساختاری آن به‌وسیله تبدیل فوریه مادون قرمز انجام شد. سپس مقاومت به هضم آن در شرایط شبیه‌سازی‌شده آزمایشگاهی بررسی شد. در مرحله بعد اثر آن بر رشد باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A7 در مقایسه با اینولین به‌عنوان پریبیوتیک استاندارد مورد مطالعه قرار گرفت. سپس برخی خصوصیات عملکردی آن یعنی قابلیت نگه‌داری آب، قابلیت جذب روغن و خصوصیت آنتی‌اکسیدانی آن در مقایسه با اینولین مورد ارزیابی قرار گرفت. در طیف تبدیل فوریه مادون قرمز، باندهای شاخص پلی‌ساکاریدها مشاهده گردید. پلی‌ساکاریدهای جداشده از هسته‌خرما مقاومت به هضم قابل مقایسه و حتی بهتر از اینولین نشان دادند. پلی‌ساکاریدهای جداشده از هسته‌خرما زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک را افزایش داده و رفتاری مشابه اینولین نشان دادند. قابلیت جذب روغن و قابلیت نگه‌داری آب برای پلی‌ساکاریدهای جداشده از هسته‌خرما به ترتیب 4/64±0/04 و 1/83±0/03 که قابل مقایسه با فیبرهای رژیمی و بسیار بیش‌تر از اینولین بوده است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن حدود 40٪ در غلظت مورد مطالعه بوده و ارتباط مستقیمی بین غلظت پلی‌ساکارید و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده گردید.

با توجه به نتایج به‌دست آمده پلی‌ساکاریدهای جداشده از هسته‌خرما قابلیت پریبیوتیکی قابل مقایسه و حتی بهتر از اینولین نشان دادند. هم‌چنین به‌دلیل قابلیت نگه‌داری آب و جذب روغن بالا و فعالیت آنتی‌اکسیدانی مطلوب می‌توانند گزینه مناسبی برای استفاده‌های تکنولوژیکی و اثرات سلامتی بخش برای تولید مواد غذایی فرا سودمند باشند.

واژه‌های کلیدی: پریبیوتیک، پلی‌ساکارید، فراسودمند فعالیت آنتی‌اکسیدانی، هسته‌خرما.

* مسئول مکاتبات: m.t.tadayoni@gmail.com

1- مقدمه

سابقه استفاده از گیاهان و ترکیبات زیست‌فعال آن‌ها به هزاران سال قبل برمی‌گردد. طب گیاهی در سالیان متمادی از گیاهان و عصاره‌های آن‌ها برای درمان بیماری‌های انسان و حیوان استفاده برده است. شیوع کم بیماری‌های غیرعفونی، وجود برخی ادعاها مبنی بر اثر برخی ترکیبات غذایی در پیش‌گیری و درمان بعضی بیماری‌ها توجه محققین را به استخراج ترکیبات زیست‌فعال از منابع گیاهی جلب کرده است [1]. این نوع خصوصیات در ترکیبات گیاهی به ویتامین‌ها، لیپیدها، فنولیک اسیدها، پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها برمی‌گردد که در میان آن‌ها پلی‌ساکاریدها به‌دلیل تنوع ساختاری و ترکیبی می‌توانند حامل اطلاعات بیولوژیکی و عملکردهای فیزیولوژیکی متعدد نسبت به سایر ترکیبات گیاهی مانند پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک باشند. طبق مطالعات انجام‌شده در مدل سیستم‌های آزمایشگاهی و یا مدل‌های انسانی و حیوانی، پلی‌ساکاریدهای استخراج‌شده از منابع گیاهی دارای اثر ضدویروسی، تقویت سیتم ایمنی، اثر ضد سرطانی، اثر آنتی‌اکسیدانی، محافظت کبدی، اثر ضد لخته‌کنندگی، اثر ضد التهابی، فعالیت خون‌سازی و اثر پریبیوتیکی می‌باشند [۵،۴،۳،۲]. پلی‌ساکاریدهای پریبیوتیک ترکیبات غیرقابل هضمی هستند که از طریق تحریک انتخابی رشد یا تغییر فعالیت برخی از میکروب‌های موجود در روده بزرگ، اثر مثبتی بر سلامتی میزبان دارند [6]. پریبیوتیک‌ها به تنهایی و یا همراه با پروبیوتیک‌ها (سینبیوتیک) می‌توانند اثراتی هم‌چون کاهش میزان کلسترول خون، اثر بر متابولیسم قند در بدن، افزایش جذب موادمعدنی، کاهش ریسک ابتلا به بیماری‌های قلبی و سرطان روده بزرگ داشته باشند [۹،۸،۷]. علاوه‌بر این پلی‌ساکاریدها به‌دلیل دارا بودن ساختار متخلخل قادر به جذب آب و چربی در شبکه خود هستند و بنابراین از این طریق می‌توانند بر پایداری و اصلاح بافت‌های غذایی و یا دارویی موثر باشند[10]. هم‌چنین خصوصیت جذب آب و چربی پلی‌ساکاریدها به لحاظ فیزیولوژیکی بسیار مهم است زیرا از این طریق می‌توانند در کنترل چاقی یا کنترل وضعیت چربی خون و بهبود وضعیت سلامتی موثر باشند[۱۲،۱۱]. به‌همین دلیل استخراج پلی‌ساکاریدهای زیست‌فعال از منابع جدید به‌عنوان یکی از موضوعات به روز بسیاری از محققین می‌باشد.

طبق آمارهای سازمان بهداشت جهانی شیوع بیماری‌هایی مانند پوکی استخوان، بیماری‌های قلبی عروقی، سرطان‌ها و بیماری‌های دهان ودندان به‌دلیل شیوه زندگی و الگوهای تغذیه‌ای رو به افزایش است. بسیاری از ترکیبات زیست‌فعال موثر بر سلامتی به‌طور معمول در برخی مواد غذایی و یا منابع گیاهی خوراکی وجود دارد ولی عدم سهولت مصرف برخی منابع غذایی یا گیاهی، عدم مطابقت ذائقه‌ای و یا محدودیت‌های فصلی و منطقه‌ای امکان مصرف عمومی را محدود می‌سازد. لذا به‌نظر می‌رسد جداسازی ترکیبات زیست‌فعال از منابع جدید و شناسایی و ارزیابی خصوصیات زیست‌فعال آن‌ها و اضافه کردن آن‌ها به مواد غذایی مطابق با ذائقه مصرف‌کنندگان داخلی استفاده از اثرات سلامتی بخش آن‌ها را امکان پذیر می‌سازد. در دنیا پلی‌ساکاریدها از منابع مختلف مانند گیاهان و برخی قارچ‌ها یا علف‌ها و گیاهان دریایی جداسازی‌شده و خصوصیات زیست‌فعال آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفته است. به‌دلیل تنوع ساختاری و عملکردی پلی‌ساکاریدها حتی در یک منبع گیاهی، گرایش زیادی در محققین برای یافتن پلی‌ساکاریدهای جدید در منابع مختلف با خصوصیات عملکردی و زیست‌فعالی جدید و مضاعف وجود دارد. در این تحقیق استخراج پلی‌ساکاریدهای زیست‌فعال از هسته‌خرما مورد توجه قرار گرفت. تولید سالیانه خرما در ایران حدود یک میلیون تن می باشد که 12-6٪ وزن میوه بسته به نوع رقم متعلق به هسته است. ترکیب شیمیایی هسته بیش‌تر شامل پلی‌ساکاریدهای مرکب است [13]. با توجه به داشتن ساختار چوبی و غیرقابل نفوذ هسته کاربرد مشخصی برای آن تعریف نشده‌است و به مقدار فراوان و قیمت بسیار پایین به وفور می‌توان آن را تهیه نمود. بنابراین هدف از این تحقیق جداسازی پلی‌ساکاریدها از هسته‌خرما و بررسی خصوصیات پریبیوتیک و ارزیابی خصوصیات تکنولوژیکی و زیست‌فعال آن می‌باشد.

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد

هسته‌خرما از کارخانه فراوری ضایعات خرما در شادگان خوزستان خریداری شد. مواد شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده در این تحقیق شامل هیدروکسید سدیم،

اسیدکلریدریک (37٪)، الکل اتیلیک 95٪،کلرید سدیم، دی هیدروژن پتاسیم فسفات، دی‌پی‌پی‌اچ، متانول از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. هم‌چنین محیط کشت MRS broth، پپتون، کازئین، عصاره مخمر، عصاره گوشت، استات سدیم، دی پتاسیم هیدروژن فسفات، توین 80، دی آمونیوم هیدروژن سیترات، مگنزیم سولفات و سولفات منگنز برای تهیه MRS بدون قند از شرکت مرک خریداری شدند.

2-2- استخراج

هسته‌های خرما به‌وسیله آسیاب سنگی پودرشده و سپس به‌منظور حذف چربی، قندهای آزاد و ترکیبات رنگی از سه حجم الکل 80٪ در دمای 60 درجه سانتیگراد به‌مدت 8 ساعت استفاده شد. به‌منظور جداسازی ترکیبات حل‌شده در الکل و صاف کردن محلول از پارچه نایلونی استفاده‌شده و چندین بار با حلال تازه شسته شد. پس از آن باقی‌مانده حاصل از چربی‌زدایی خشک‌شده و برای استخراج آبی از حمام آب در دمای 90 درجه سانتیگراد با سه حجم آب مقطر داغ به‌مدت 3 ساعت استفاده شد. به‌منظور جداسازی ذرات نامحلول، عصاره استخراج‌شده سانتریفوژشده و مایع شفاف رویی برای تغلیظ و جدا شدن ناخالصی‌های باقی‌مانده در دستگاه تبخیرکننده چرخشی تغلیظ شد. برای حذف ناخالصی‌های باقی‌مانده مجددا عصاره سانتریفوژشده وسپس برای رسوب دادن پلی‌ساکاریدها از سه حجم الکل در دمای 4 °C و به‌مدت 48 ساعت استفاده شد. رسوبات حاصل با سانتریفوژ جداسازی‌شده و برای حذف ناخالصی‌ها چندین بار با الکل مطلق شستشو داده شد. پس از الکل‌زدایی در دستگاه تبخیرکننده چرخشی، عصاره غلیظ‌شده به روش خشک‌کردن انجمادی خشک گردید [۱۵،۱۴].

3-2- شناسایی خصوصیات ساختاری پلی‌ساکارید استخراج‌شده با روش تبدیل فوریه مادون قرمز

شناسایی ساختار پلی‌ساکارید استخراج‌شده با استفاده از دستگاه تبدیل فوریه مادون قرمز انجام شد. طیف تبدیل فوریه مادون قرمز از 4000 تا $650\ cm^{-1}$ با قدرت تفکیک $1\ cm^{-1}$ با استفاده از اسپکترومتر Tensor 27 ساخت شرکت Bruker مجهز به سیستم ATR ثبت شد [16].

4-2- بررسی مقاومت به هضم اسیدی و آنزیمی پلی‌ساکارید استخراج‌شده

برای بررسی مقاومت به هضم پلی‌ساکارید استخراج‌شده شبیه‌سازی شیره‌های گوارشی بر اساس روش جین و همکاران (2006) انجام شد وهم‌زمان ترکیب اینولین تجاری نیز به عنوان پریبیوتیک شاخص با پلی‌ساکارید استخراج‌شده مقایسه گردید. برای شبیه‌سازی معده از کلریدسدیم و اسیدکلریدریک به نسبت‌های مشخص استفاده گردید و pH آن به 1/2±0/5 تنظیم شد (بافر1). برای شبیه‌سازی روده از پتاسیم‌دی‌هیدروژن‌فسفات و سود به نسبت‌های مشخص و pH آن به 7/4 رسانده شد (بافر2). برای شبیه‌سازی مخلوط معده و روده از بافرهای 1و2 به نسبت 39:61 مخلوط‌شده و pH آن به 4/5 تنظیم شد. پلی‌ساکارید استخراج‌شده از هسته‌خرما و اینولین به بافرهای مذکور اضافه‌شده و در انکوباتور شیکردار با دور 100دور در دقیقه و دمای 37 درجه سانتیگراد نگه‌داری شدند و پس از گذشت زمان یک ساعت سانتریفوژ انجام‌شده و از بافر رویی برای اندازه‌گیری قند آزاد نمونه‌برداری شد. قند آزاد به روش DNS اندازه‌گیری‌شده و درصد هیدرولیز با اساس میزان قند آزادشده نسبت به قند کل گزارش شد. در مرحله سوم هضم به بافر 3 آنزیم آلفا آمیلاز اضافه‌شده تا مقاومت آن به هیدرولیز آنزیمی نیز ارزیابی شود[۱۷،۱۵].

5-2- اثر پلی‌ساکارید استخراج‌شده بر رشد باکتری پروبیوتیک

باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A7، سویه پروبیوتیک جداشده از روده انسان که در بانک میکروبی آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی دانشگاه صنعتی اصفهان نگه‌داری می‌شود، به‌عنوان باکتری مورد نظر برای رشد در حضور پریبیوتیک انتخاب شد. فعال‌سازی میکروب مذکور دو بار در محیط MRS broth انجام گرفت. محیط پایه برای اضافه کردن ترکیب پریبیوتیک محیط MRS بدون قند انتخاب شد که اجزا تشکیل دهنده آن طبق دستورالعمل محیط مذکور به‌هم اضافه شدند. سپس برای بررسی رشد باکتری در حضور ترکیب پریبیوتیک به محیط مورد نظر به نسبت 2٪ (w/v) پلی‌ساکارید استخراج‌شده از هسته‌خرما اضافه شد. به‌منظور مقایسه رشد باکتری پروبیوتیک

در حضور پلی‌ساکارید جداشده از هسته‌خرما محیط‌های شامل 2٪ گلوکز و 2٪ اینولین به‌عنوان پریبیوتیک تجاری شاخص تهیه شد. باکتری فعال‌شده به نسبت2٪ (v/v) به محیط‌های مذکور اضافه گردید. از محیط‌های مذکور در زمان‌های 0، 24، 48 و 72 ساعت نمونه‌برداری‌شده و طبق روش مایلز میزرا (1938) کشت و شمارش انجام شد [18]. pH نمونه ها نیز در زمان‌های مذکور اندازه‌گیری شد.

2-6- خصوصیات تکنولوژیکی

ظرفیت نگه‌داری آب (WHC)[1] و ظرفیت جذب چربی (LAC)[2] پلی‌ساکارید استخراج‌شده از هسته‌خرما و نیز اینولین به‌عنوان پریبیوتیک شاخص طبق روش کاروالهو و همکاران (2009) اندازه‌گیری شد. در این روش برای اندازه‌گیری WHC، سی میلی‌لیتر آب مقطر به یک گرم نمونه اضافه‌شده و خوب هم‌زده شد. مخلوط مورد نظر یک ساعت در دمای اتاق نگه‌داری و سپس در 12000 g به مدت 20 دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی دور ریخته و باقی‌مانده وزن شد. WHC به‌صورت نسبت وزن آب به وزن نمونه گزارش می‌شود. برای اندازه‌گیری LAC، 3 گرم نمونه به 18 میلی‌لیتر روغن آفتابگردان اضافه‌شده و به‌مدت یک شبانه روز در دمای اتاق نگه‌داری شد. مخلوط مورد نظر در 1500 g به مدت 10 دقیقه سانتریفوژشده، روغن اضافه دور ریخته شد و سپس باقی‌مانده وزن شد. LAC به‌عنوان نسبت وزن روغن به وزن نمونه گزارش می‌شود [11].

2-7- بررسی خصوصیت آنتی‌اکسیدانی

برای بررسی خصوصیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکارید استخراج‌شده از هسته‌خرما، نمونه پودرشده(0/2 گرم) با 5 میلی‌لیتر متانول مخلوط و توسط انکوباتور شیکردار به مدت 3 ساعت به شدت هم‌زده شدند. سپس در 3000 g به مدت 20 دقیقه سانتریفوژ انجام و مایع رویی حاصل برای بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرارگرفت. برای مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکاریدهای استخراج‌شده از هسته‌خرما با اینولین به‌عنوان پریبیوتیک شاخص استاندارد، شرایط مشابه برای اینولین اعمال شد. هم‌چنین به‌عنوان کنترل مثبت از محلول 1000 میکرومولار اسکوربیک اسید استفاده گردید. برای بررسی اثر غلظت بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکارید استخراج‌شده از هسته‌خرما محدوده غلظتی 0/005-0/04 g/ml نمونه تهیه و سپس عملیات هم‌زدن و سانتریفوژ کردن مانند قبل انجام شد. برای بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی از روش DPPH استفاده شد. برای انجام این آزمایش، 500 میکرولیتر از عصاره متانولی به سرعت به 5 میلی‌لیتر از محلول متانولی 0/1 میلی مولار DPPH اضافه و به شدت مخلوط شد. مخلوط حاصل به مدت 30 دقیقه در دمای اتاق و در مکان تاریک قرار گرفت و سپس جذب آن در 517 نانومتر قرائت شد. جذب خود محلول متانولی DPPH نیز در 517 نانومتر قرائت و از فرمول زیر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی محاسبه شد[۲۰،۱۹]:

(1)

$$\text{Scavenging activity\%} = (Abs_{blank} - Abs_{sample})/Abs_{blank} * 100$$

Abs_{blank}: جذب محلول متانولی DPPH بدون نمونه پلی‌ساکاریدی

Abs_{sample}: جذب محلول متانولی DPPH با نمونه پلی‌ساکاریدی

2-8- تجزیه و تحلیل داده ها

آزمایش‌ها با سه تکرار انجام و در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم افزار SAS (9.1) اختلاف معنی‌دار و یا عدم آن مورد بررسی قرار گرفت.

3-نتایج و بحث

3-1- آنالیز ساختار پلی‌ساکارید استخراج‌شده با روش تبدیل فوریه مادون قرمز

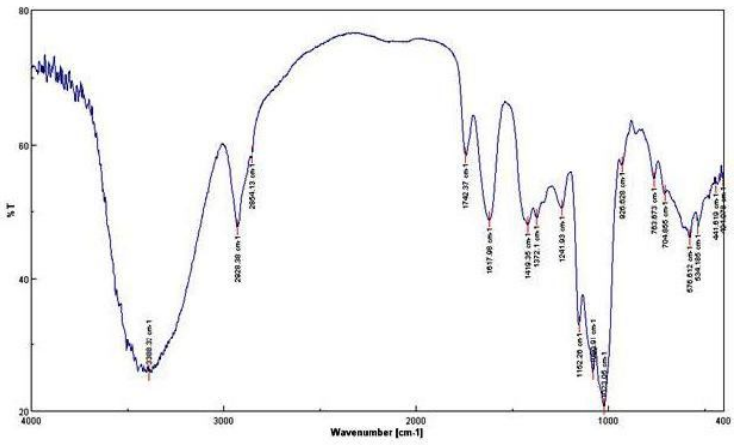
برای بررسی خصوصیات ساختاری پلی‌ساکارید استخراج‌شده از هسته‌خرما از روش تبدیل فوریه مادون قرمز استفاده‌شده‌است. نتایج مربوط در شکل 1 نشان داده‌شده‌است. روش تبدیل فوریه مادون قرمز معمولا در پلی‌ساکاریدها برای بررسی نوع پیوندهای گلیکوزیدی، نوع مونوساکاریدها و گروه‌های عاملی مورد استفده قرار می‌گیرد [16]. باندهای مشاهده‌شده در 1023، 1080 و $1152\ cm^{-1}$ مرتبط با پیوندهای C-C و C-O می‌باشند. باند مشاهده‌شده در $2923\ cm^{-1}$ مربوط به پیوند C-H بوده که این باند به‌عنوان باند شاخص قندها محسوب

1. Water holding capacity
2. Lipid adsorption capacity

می‌شود [۲۱،۱۵،۵]. وجود باندهای 1372، 1241 و 1419 cm^{-1} مربوط به پیوندهای COH، C-H و C-O-C می‌باشد[۱۵،۲۱]. وجود باند در ناحیه 857 و 926 cm^{-1} مبین وجود پیوندهای آلفا و بتا در فرم پیرانوزی قندهاست [۲۱،۱۵،۵]. باند مشاهده‌شده در ناحیه 763 cm^{-1} مربوط به حضور دی‌زایلوز است [16]. مشاهده باندهای شاخص در ناحیه 1000-1200 cm^{-1} و 2923 طیف شکل 1 تاییدکننده وجود پلی ساکارید به‌عنوان ترکیب اصلی و غالب در عصاره استخراج‌شده‌است[15].

3-2- بررسی مقاومت به هضم پلی‌ساکارید استخراج‌شده

برای بررسی مقاومت به هضم پلی‌ساکارید استخراج‌شده از هسته‌خرما شبیه‌سازی شیره‌های گوارشی در سه مرحله انجام گرفت. درصد هیدرولیز محاسبه‌شده برای پلی‌ساکارید استخراج‌شده از هسته‌خرما و اینولین به‌عنوان پریبیوتیک شاخص تجاری در سه مرحله هضم در شکل 2 نشان داده‌شده‌است. همان‌طور که مشاهده می‌شود درصد هیدرولیز پلی‌ساکارید استخراج‌شده از هسته‌خرما در مرحله اول هضم یعنی در معده بسیار کم‌تر از اینولین بوده و در سطح 1٪ با هم اختلاف معنی‌دار دارند ($p < 0/01$). در مرحله دوم یعنی مخلوط معده و روده و در مرحله سوم یعنی روده و در حضور آنزیم آلفا آمیلاز درصد هیدرولیز هر دو نمونه (پلی‌ساکارید استخراج‌شده از هسته‌خرما و اینولین) بسیار ناچیز بوده و تقریبا مشابه همدیگر بوده‌اند. باید در نظر داشت که اولین گام برای اثبات پریبیوتیک بودن یک ترکیب مقاومت آن نسبت به شیره‌های گوارشی و آنزیم‌های تجزیه‌کننده آن ترکیب است. برای این‌که ترکیب پریبیوتیک می‌بایست از قسمت فوقانی دستگاه گوارش سالم عبور کرده و به روده بزرگ برسد و در آنجا به‌وسیله میکروب‌های پروبیوتیک مورد استفاده قرار بگیرد. نتایج این بخش نشان می‌دهد پلی‌ساکارید جداشده از هسته‌خرما در مقایسه با اینولین بسیار مقاوم‌تر بوده به‌طوری‌که تقریبا بیش از 85 درصد آن هیدرولیز نشده باقی می‌ماند. نتایج مطالعات محققین در این زمینه نشان می‌دهد با توجه به تفاوت ساختاری پلی‌ساکاریدهای جداشده از منابع مختلف این خصوصیت یعنی مقاومت به هضم می‌تواند بسیار متغیر باشد. مثلا در مطالعه انجام‌شده توسط فیردوس و همکاران (2012)، پلی‌ساکارید استخراج‌شده از بامبو بیش از 99 درصد مقاومت به هضم نشان داده است [15]. ویچنکات و همکاران (2010) درصد هیدرولیز پلی‌ساکارید استخراج‌شده از پیتایا در برابر آنزیم آلفا آمیلاز را حدود 11٪ گزارش کرده‌اند. هم‌چنین در مطالعه مذکور درصد هیدرولیز اینولین در برابر محیط‌های اسیدی را حدود 55٪ گزارش کرده‌اند [22]. در مطالعه‌ای دیگر توسط ویچنکات و همکاران (2011) مقاومت به هضم در تعداد زیادی از پلی‌ساکاریدهای استخراج‌شده از منابع مختلف گیاهی بررسی گردیده است که بسته به تفاوت‌های ساختاری و منبعی پلی‌ساکاریدهای استخراج‌شده، منابع مناسب

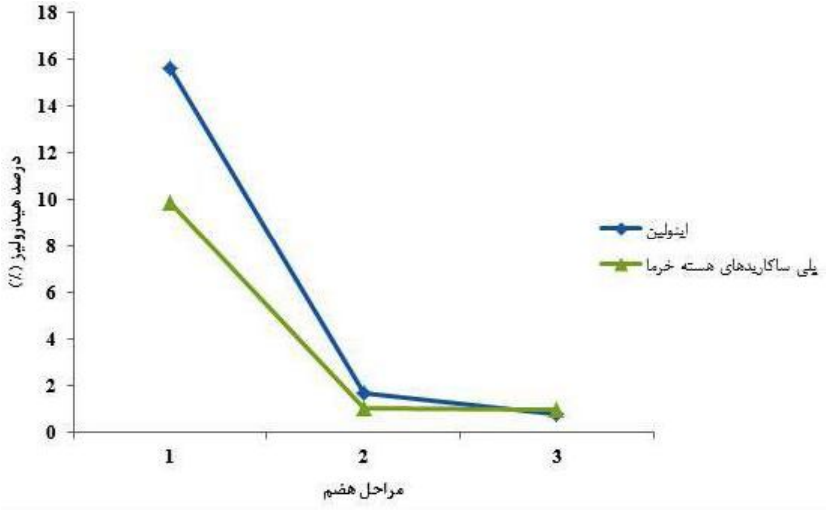


شکل(1) طیف تبدیل فوریه مادون قرمز پلی‌ساکارید استخراج‌شده از هسته‌خرما

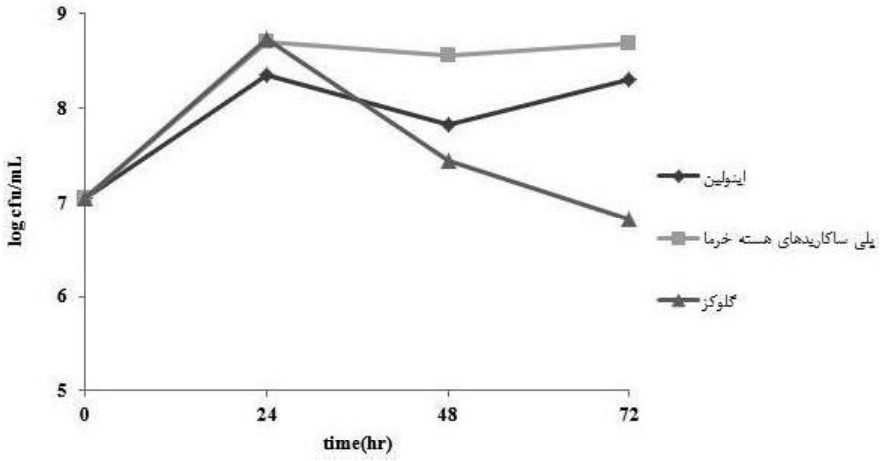
به‌عنوان پریبیوتیک از لحاظ بیش‌ترین مقاومت به هضم 33٪،46٪،60٪ تا 98٪ در برابر هضم مقاوم بوده‌اند [23].

3-3- بررسی اثر پلی‌ساکاریدهای استخراج‌شده از هسته‌خرما بر رشد پروبیوتیک

به‌منظور بررسی اثر پلی‌ساکاریدهای استخراج‌شده از هسته‌خرما بر رشد باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A7 و در واقع قابلیت متابولیزه شدن این ترکیب به‌وسیله باکتری مورد نظر، محیط MRS بدون قند با 2٪ پلی‌ساکارید استخراج‌شده انتخاب شد و برای مقایسه رفتار میکروب از محیط‌های MRS بدون قند با 2٪ اینولین و محیط MRS بدون قند با 2٪گلوکز استفاده شد. در طول 72 ساعت رشد در فواصل 24 ساعته pH نمونه‌ها و شمارش انجام شد. همان‌طور که در شکل3 مشاهده می‌شود پلی‌ساکارید استخراج‌شده اثر تحریک کننده بر رشد باکتری داشته است به‌طوری‌که جمعیت آن پس از 24 ساعت افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته است. از طرفی قابلیت زنده‌ماندن میکروب تا 72 ساعت مطالعه‌شده افزایش یافته است در حالی‌که جمعیت میکروب در محیط حاوی گلوکز پس از 24 ساعت کاهش شدیدی نشان داده‌است. هم‌چنین رفتار میکروب در محیط حاوی پلی‌ساکارید استخراج‌شده از هسته‌خرما مشابه محیط حاوی اینولین (پریبیوتیک شاخص تجاری) به لحاظ افزایش قابلیت زنده‌مانی بوده است.



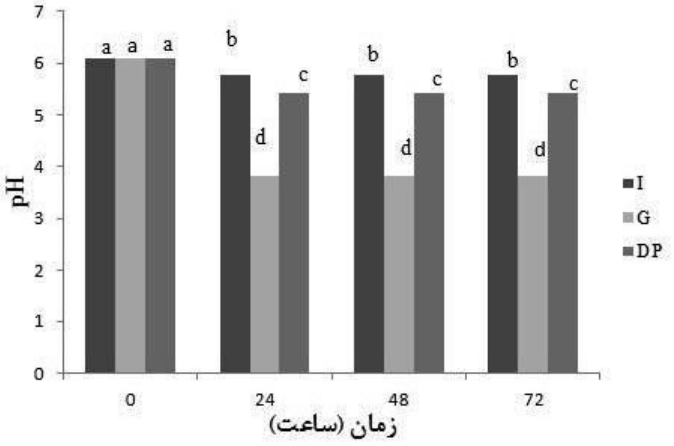
شکل(2) بررسی مقاومت به هضم پلی‌ساکارید استخراج‌شده از هسته‌خرما در برابر مراحل هضم



شکل(3) بررسی اثر پلی ساکاریدهای هسته‌خرما در مقایسه با اینولین و گلوکز بر رشد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A7

(محیط مورد مطالعه MRS بدون قند و 2٪ اینولین، MRS بدون قند و 2٪ پلی ساکاریدهای جداشده از هسته‌خرما، MRS بدون قند و 2٪گلوکز)

نتایج این بخش قابلیت پریبیوتیکی پلی‌ساکاریدهای استخراج‌شده از هسته‌خرما را تایید می‌کنند. مطابق تعریف هوبنر و همکاران (2007) قابلیت پریبیوتیکی یک ترکیب به تاثیر آن ترکیب بر حمایت رشد و زنده‌مانی میکروارگانیسم در مقایسه با رشد آن میکروب در محیط حاوی سوبسترای غیر پریبیوتیک مانند گلوکز برمی‌گردد [9]. نکته اساسی در تعریف پریبیوتیک‌ها امکان رشد باکتری پروبیوتیک در حضور آن و افزایش جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک و از طرفی اثر بر افزایش زنده‌مانی پروبیوتیک است. این مساله به‌خصوص در ترکیب‌های سینبیوتیک که در مواد غذایی استفاده می‌شوند بسیار حائز اهمیت است. یعنی در مواد غذایی پروبیوتیک، ترکیب پریبیوتیک به‌عنوان ترکیب حمایت‌کننده رشد و افزایش زنده‌مانی عمل می‌کند [24]. این موضوع به پیچیدگی ساختاری ترکیبات پریبیوتیک و عدم دسترسی به قند ساده در محیط رشد میکروب مربوط می‌شود. در محیط‌های حاوی قند ساده به‌دلیل پدیده مهار کاتابولیکی و مهار فعالیت آنزیم‌ها رشد محدود می‌شود [25]. ولی در محیط‌های حاوی ترکیب پریبیوتیک به‌دلیل پیچیدگی ساختاری امکان تولید آنزیم‌های بیش‌تر که برای متابولیزه شدن ترکیبات غذایی لازم است فراهم‌شده و به میکروارگانیسم قدرت حفظ ثبات و پایداری می‌دهد. هم‌چنین در محیط روده بزرگ افزایش جمعیت میکروب‌های پروبیوتیک به دلیل افزایش توان رقابتی در مقایسه با سایر میکروب‌های میکروفلور روده (خصوصا میکروب‌های مضر) و تولید متابولیت‌های مفید به وسیله میکروب‌های پروبیوتیک می‌تواند منجر به اثرات سلامتی بخش در میزبان شود [15]. نتایج مربوط به کاهش pH محیط‌های مورد بررسی نشان می‌دهد pH هر سه محیط با هم اختلاف معنی‌داری دارند (شکل4). ضمن آن‌که با توجه کاهش بسیار شدید pH در محیط حاوی گلوکز و جمعیت بالای میکروب پروبیوتیک در محیط‌های حاوی اینولین و پلی‌ساکاریدهای هسته‌خرما احتمالا حاکی از طی مسیرهای متابولیکی متفاوت به‌وسیله میکروارگانیسم در سه محیط مورد بررسی می‌باشد. این مساله نیز نشان دهنده قابلیت پریبیوتیکی پلی‌ساکاریدهای جداشده از هسته‌خرما می‌باشد چرا که در تعریف پریبیوتیک‌ها در سال‌های اخیر بیش‌تر تاکید بر تفاوت در فعالیت میکروب‌ها یا تفاوت در نوع متابولیت‌های تولیدشده به‌وسیله میکروب‌های پروبیوتیک در حضور پریبیوتیک‌هاست [۱۵،۹]. در مطالعات مختلف انجام‌شده، برای اثبات قابلیت پریبیوتیکی یک ترکیب بیش‌تر اثر تحریک‌کنندگی رشد از زمان صفر تا 24 یا 48 ساعت مورد مطالعه قرار گرفته است. اما مقایسه رفتار میکروب در محیط‌های مختلف و یا افزایش زنده‌مانی مساله‌ای است که به‌ندرت به آن پرداخته‌شده‌است. مثلا در مطالعه



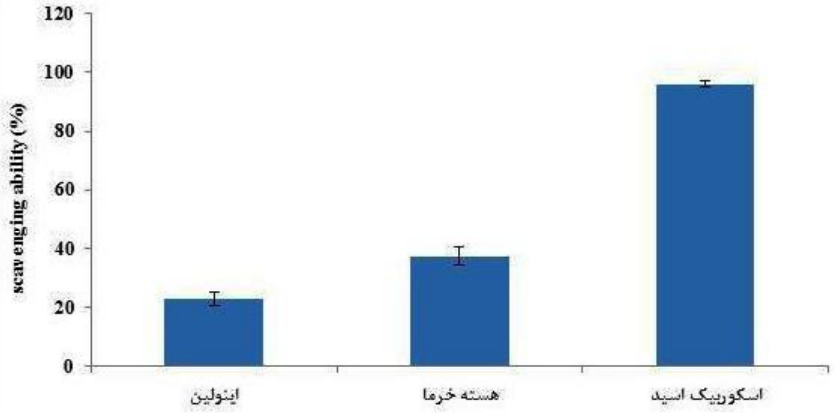
شکل(4) بررسی اثر پلی ساکارید جداشده از هسته‌خرما در مقایسه با اینولین و گلوکز برpH محیط رشد

I: محیط MRS بدون قند و 2٪ اینولین، G: محیط MRS بدون قند و 2٪ گلوکز، DP : محیط MRS بدون قند و 2٪ پلی ساکارید جداشده از هسته‌خرما، داده ها میانگین حاصل از سه تکرار و حروف متفاوت نشاندهنده اختلاف معنی‌دار در سطح 1٪

رامنانی و همکاران (2011) در بررسی اثر پلی‌ساکاریدهای استخراج‌شده از آگار و آلژینات فقط اثر تحریک‌کنندگی رشد روی بیفیدوباکتریوم پس از 24 ساعت مورد ارزیابی قرار گرفته است [26]. در مطالعه ویچنکات و همکاران (2010) اثر تحریک‌کنندگی رشد یک نوع اولیگو ساکارید استخراج‌شده از پیتایا پس از 48 ساعت بر گونه لاکتوباسیلوس دلبروکی مورد بررسی قرار گرفته‌است [22]. اما در مطالعه فیردوس و همکاران (2012) اثر پلی ساکاریدهای استخراج‌شده از گیاه بامبو بر باکتری‌های پروبیوتیک در مدت زمان 72 ساعت مورد بررسی قرار گرفته و افزایش زنده‌مانی تا بیش از 48 ساعت گزارش گردیده است [15]. در مطالعات انجام‌شده به‌وسیله محققین مختلف با توجه به تفاوت ساختاری و مقاومت به هضم مختلف ترکیبات استخراج‌شده، تفاوت محیط‌های کشت بررسی‌شده به لحاظ اجزاء تشکیل‌دهنده و ظرفیت بافری آن‌ها، تفاوت گونه‌های پروبیوتیک مطالعه‌شده به لحاظ رفتار و قابلیت‌های متابولیکی، تفاوت دوره زمانی رشد مطالعه‌شده و غلظت‌های مختلف بررسی‌شده ترکیب پریبیوتیک، نمی‌توان روند مشخصی برای مقایسه یک ترکیب استخراج‌شده جدید با مطالعات قبلی پیدا کرد. لذا در مطالعه حاضر برای مقایسه خصوصیات ترکیب جدید استخراج‌شده در همه مراحل مطالعه از اینولین به‌عنوان پریبیوتیک شاخص تجاری استفاده شد تا مرجع مشخصی برای مقایسه با خصوصیات ترکیب جدید استخراج‌شده باشد. نتایج این بخش به همراه نتایج بخش مقاومت به هضم، قابلیت پریبیوتیکی پلی‌ساکاریدهای هسته‌خرما را اثبات می‌کنند.

3-4- بررسی خصوصیات تکنولوژیکی

برای بررسی قابلیت کاربرد تکنولوژیکی پلی‌ساکاریدهای جداشده از هسته‌خرما در بافت‌های غذایی و اثر آن بر پایداری بافت خصوصیت توانایی نگه‌داری آب (WHC) و توانایی جذب روغن (LAC) اندازه‌گیری‌شده‌است. نتایج مربوط به WHC وLAC پلی‌ساکاریدهای جداشده از هسته‌خرما و مقایسه آن با اینولین در جدول 1 نشان داده‌شده‌است. همان‌طور که مشاهده می‌شود توانایی نگه‌داری آب در مورد پلی‌ساکاریدهای هسته‌خرما بسیار بیش‌تر از اینولین و در سطح 1٪ با هم اختلاف معنی‌دار دارند. WHC به توانایی شبکه پلی‌ساکارید برای جذب و حفظ آّب برمی‌گردد. این موضوع هم به لحاظ تکنولوژیکی و هم از نظر فیزیولوژیکی بسیار حائز اهمیت است. از لحاظ تکنولوژیکی ترکیباتی که توانایی حفظ و جذب آب دارند می‌توانند منجر به افزایش ویسکوزیته، پایداری بافت و جلوگیری از پس دادن آب کمک کنند [۱۰،۱۲]. از طرفی توانایی نگه‌داری آب (WHC) را می‌توان نوعی ویژگی دانست که بیش‌تر برای فیبرهای رژیمی مطالعه‌شده‌است. مقدار WHC پلی‌ساکاریدهای هسته‌خرما قابل مقایسه با توانایی نگه‌داری آب فیبرهای رژیمی استخراج‌شده از لیمو، گریپ فروت، پرتقال و سیب است که توسط فیگورلا و همکاران (2005) مطالعه‌شده‌است [10]. ترکیباتی با توانایی نگه‌داری آب بالا می‌توانند با افزایش ویسکوزیته توده غذایی در دستگاه گوارش، افزایش حجم مدفوع و دفعات تخلیه بیش‌تر به کاهش سرعت جذب مواد کمک کنند. این خصوصیت در کنترل وزن و بهبود وضعیت سلامتی بخصوص برای پیشگیری از بروز بیماری‌های قلبی عروقی و دیابت موثر است [۱۰،۱۲].

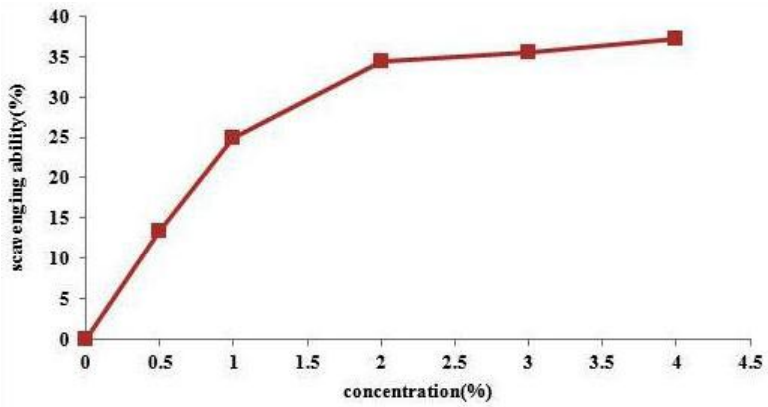


شکل(5) بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

ظرفیت جذب روغن (LAC) به توانایی شبکه پلی‌ساکارید برای جذب روغن برمی‌گردد ترکیباتی با توانایی جذب روغن بالا به لحاظ تکنولوژیکی می‌توانند برای پایداری بافت امولسیون‌های پر چرب استفاده شوند [12]. هم‌چنین به لحاظ فیزیولوژیکی با توجه به داشتن توانایی جذب چربی می‌توانند به کاهش جذب چربی غذای خورده‌شده به خون کمک کنند [11]. این خصوصیت نیز برای فیبرهای رژیمی از منابع مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است به‌طوری‌که مقدار جذب چربی پلی‌ساکاریدهای هسته‌خرما قابل مقایسه با جذب چربی فیبرهای رژیمی مطالعه‌شده مانند سبوس برنج و یا فیبرهای استخراج‌شده از منابع دریایی است و حتی مقدار آن از جذب چربی فیبرهای مطالعه‌شده برخی میوه‌ها بیش‌تر می‌باشد [۱۲،۱۱،۱۰]. همان‌طور که مشاهده می‌شود توانایی جذب چربی پلی‌ساکاریدهای استخراج‌شده از هسته‌خرما از اینولین نیز بسیار بیش‌تر می باشد. در واقع یکی از مکانیسم‌های اثر بخشی فیبرها در کاهش چربی خون، کنترل وزن و بهبود وضعیت سلامتی بخاطر داشتن توانایی جذب آب و جذب چربی است. با توجه به ویژگی جذب چربی و آب مطلوب پلی‌ساکاریدهای جداشده از هسته‌خرما و هم‌چنین اثبات خصوصیت پریبیوتیکی آن در بخش قبل می‌تواند گزینه مناسبی به عنوان یک پلی‌ساکارید زیست‌فعال و قابل رقابت با اینولین برای کاربردهای تکنولوژیکی در مواد غذایی و یا حتی دارویی باشد.

3-5-بررسی خصوصیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکاریدهای جداشده از هسته‌خرما

برای بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکاریدهای جداشده از هسته‌خرما از روش DPPH استفاده شد. $DPPH^-$ یک رادیکال آزاد است که بیش‌ترین جذب را در 517 نانومتر از خود نشان می‌دهد. هر ترکیبی که بتواند یک هیدروژن به آن بدهد از حالت رادیکالی خارج‌شده و به فرم پایدار تبدیل می‌شود و این مساله با تغییر رنگ محلول DPPH و تغییر جذب آن مشخص می‌شود [27]. پلی‌ساکاریدهای جداشده از هسته‌خرما قادر به مهار رادیکال آزاد DPPH در حدود 40٪ بوده‌اند و از لحاظ این خصوصیت نیز نسبت به اینولین برتری داشته‌اند (شکل5). هم‌چنین در مطالعه اثر غلظت بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکاریدهای جداشده از هسته‌خرما همان‌طور که در شکل 6 مشاهده می‌شود با افزایش غلظت فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافته است. در مطالعات انجام‌شده فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکاریدها را مرتبط با خصوصیات ساختاری آن‌ها از جمله نوع مونوساکاریدهای تشکیل دهنده، نوع پیوندهای گلیکوزیدی، وزن مولکولی، وجود برخی گروه‌ها مانند کربونیل، سولفونیل، آمینو، کربوکسیل دانسته‌اند[۲۸،۲۷،۲۰،۴]. در پلی‌ساکاریدهای جداشده از هسته‌خرما با توجه به طیف FTIR توضیح داده‌شده در بخش 3-1 باندهای مربوط به گروه‌های کربونیل و کربوکسیل به ترتیب در 1741و $1418\ cm^{-1}$ مشاهده شد. البته برای تشریح دقیق‌تر چگونگی فعالیت آنتی‌اکسیدانی



شکل(6) اثر غلظت بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکاریدهای هسته‌خرما

جدول(1) اندازه‌گیری خصوصیات تکنولوژیکی و فیزیولوژیکی پلی‌ساکاریدهای جداشده از هسته‌خرما

پلی‌ساکارید	WHC(g water/gDM)	LAC(g oil/gDM)
پلی‌ساکارید جداشده از هسته‌خرما	1/83±0/03[a]	4/64±0/04[a]
اینولین	0/68±0/03[b]	1/83±0/03[b]

داده ها میانگین حاصل از سه تکرار، حروف متفاوت در هرستون اختلاف معنی‌دار در سطح 1٪

پلی‌ساکاریدهای جداشده از هسته‌خرما مطالعات ساختاری بیش‌تری می‌بایست انجام شود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی مطلوب پلی‌ساکاریدهای جداشده از هسته‌خرما می‌تواند یکی از دلایل افزایش زنده‌مانی میکروب پروبیوتیک در محیط کشت حاوی پلی‌ساکاریدهای جدا شد از هسته‌خرما (بخش3-3) باشد. زیرا ترکیب آنتی‌اکسیدان قادر است استرس‌های اکسیداتیو ناشی از متابولیسم ترکیبات مغذی در محیط رشد را برطرف نموده و این موضوع زنده‌مانی بیش‌تر میکروب پروبیوتیک را تضمین می‌نماید [29].

4- نتیجه گیری

نتایج حاصل از این بررسی نشان می‌دهند پلی‌ساکاریدهای جداشده از هسته‌خرما قابلیت پریبیوتیکی قابل مقایسه و حتی بهتر از اینولین (پریبیوتیک تجاری) دارند. هم‌چنین نتایج حاصل از بررسی خصوصیات عملکردی پلی‌ساکاریدهای جداشده نشان می‌دهند قابلیت نگه‌داری آب و جذب چربی آن قابل ملاحظه و بسیار بیش‌تر از اینولین و قابل مقایسه با فیبرهای رژیمی بوده است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکاریدهای جداشده از هسته‌خرما نیز نسبتا مطلوب و بیش‌تر از اینولین بوده است. بر اساس نتایج این مطالعه پلی‌ساکاریدهای جداشده از هسته‌خرما با دارا بودن خصوصیات تکنولوژیکی و زیست‌فعالی مطلوب و در واقع با داشتن چند خصوصیت مطلوب هم‌زمان می‌توانند گزینه مناسبی برای بهبود کیفیت مواد غذایی و اثرات سلامتی بخش در این دسته از مواد غذایی فراسودمند باشند. این امر لزوم مطالعات بیش‌تر در مدل‌های حیوانی و انسانی را می‌طلبد.

منابع

[1] Vidanarachchi, J.K., Iji, P.A., Mikkelsen, L.L. Sims, I., Choct, M.(2009). Isolation and characterization of water-soluble prebiotic compounds from Australian and NewZealand plants. *Carbohyd Polym.*, 77, 670–676.

[2] Jin, M., Zhao, K., Huang, Q., Xu, C., Shang, P. (2012). Isolation, structure and bioactivities of the polysaccharides from Angelica sinensis (Oliv.) Diels: A review. *Carbohyd Polym.*, 89, 713– 722.

[3] Zhang, Y. Li, S., Wang, X., Zhang , L., Cheung, P.C.K. (2011). Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities. *Food Hydrocolloid.*, 25, 196-206.

[4] Jiao, G., Yu, G., Zhang, J., Stephen Ewart, H. (2011). Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Drugs.*, 9, 196-223.

[5] Yu, Z., Ming, G. Kaiping, W., Zhixiang, C., Liquan, D., Jingyu, L., Fang, Z. (2010). Structure, chain conformation and antitumor activity of a novel polysaccharide from Lentinus edodes. *Fitoterapia.*, 81, 1163–1170.

[6] Matteuzzi, D., Swennen, E., Rossi, M., Hartman, T., Lebet, V. (2004). Prebiotic effects of a wheat germ preparation in human healthy subjects. *Food Microbiol.*, 21, 119–124.

[7] Madhukumar, M.S., Muralikrishna, G. (2010). Structural characterisation and determination of prebiotic activity of purified xylo-oligosaccharides obtained from Bengal gram husk (Cicer arietinum L.) and wheat bran (Triticum aestivum). *Food Chem.*, 118, 215–223.

[8] Martinez-Villaluenga,C., Gomez, R. (2007). Characterization of bifidobacteria as starters in fermented milk containing raffinose family of oligosaccharides

drug delivery to the colon. *AAPS Pharm Sci Technol.*, 8 (3), 1-8.

[18] Miles, A., Misra, S. S. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *J Hyg.*, 38, 732-749.

[19] Norajit, K., Kim, K., Ryu,.G.H. (2010). Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. *J Food Eng.*, 98, 377–384.

[20] Fan, H., Mazza, G., Liao, X. (2010). Purification, composition and antioxidant activity of polysaccharides from wolfberry, cherry, kiwi and cranberry fruits. *J. Food Sci. Technol*., 2 (1), 9-17.

[21] Xu, X., Chen, P., Wang, Y., Zhang, L. (2009). Chain conformation and rheological behavior of an extracellular heteropolysaccharide Erwinia gum in aqueous solution. *Carbohyd Res*., 344, 113–119.

[22] Wichienchot, S. Jatupornpipat, M. Rastall, R.A. (2010). Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. *Food Chem.*, 120, 850–857.

[23] Wichienchot, S., Thammarutwasik, P., Jongjareonrak, A., Chansuwan, W., Hmadhlu, P., Hongpattarakere, T., Itharat, A., Ooraikul, B. (2011). Extraction and analysis of prebiotics from selected plants from southern Thailand. Songklanakarin *J. Sci. Technol*.,
33 (5), 517-523.

[24] Martinez-Villaluenga,C., Gomez, R. (2007). Characterization of bifidobacteria as starters in fermented milk containing raffinose family of oligosaccharides from lupin as prebiotic. *Int Dairy J*., 17, 116-122.

[25] Griffiths, A.J.F., Gelbart, W.M., Miller, J.H Lewontin, R.C. (1999). Modern genetic analysis, WH Freeman and company, New York, New York, pp. 336-346

[26] Ramnani, P., Chitarraria, R., Tuohya, K., Grant, J., from lupin as prebiotic. *Int Dairy J*., 17, 116-122.

[9] Huebner, J., Wehling, R.L., Parkhurst, A., Hutkins, R.W. (2008). Effect of processing conditions on the prebiotic activity of commercial prebiotics. *Int Dairy J*., 18, 287–293.

[10] Figuerola, F., Hurtado, M.L., Estevez, A. M., Chiffelle, I., Asenjo. F. (2005). Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. *Food Chem.*, 91, 395–401.

[11] Carvalho, A.F.U., Portela, M.C.C., Sousa, M.B., Martins, F.S., Rocha, F.C., Farias, D.F., Feitosa, J.P.A. (2009). Physiological and physico-chemical characterization of dietary fibre from the green seaweed Ulva fasciata Delile. *Braz. J. Biol*., 69(3), 969-977.

[12] Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C., Attia, H. (2011). Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chem.*, 124, 411–421.

[13] ثباتی گاوکانی، م. بررسی وضعیت بازیافت مواد با ارزش از ضایعات کشاورزی،کشاورزی و غذا، شماره74، ص38-40.

[14] Ding, X., Feng, S., Cao, M., Li, M., Tang, J., Guo, C., Zhang, J.,Sun, Q., Yang, Z., Zhao, J. (2010). Structure characterization of polysaccharide isolated from the fruiting bodies of Tricholoma matsutake. *Carbohyd Polym.*, 81, 942–947.

[15] Firdaus, A., Nurul Azmi, M., Mustafa, S., Hashim, D., Abdul Manap, Y. (2012). Prebiotic Activity of Polysaccharides Extracted from Gigantochloa Levis (Buluh beting) Shoots. *Molecules.*, 17, 1635-1651.

[16] Yang, L., Zhang, L. (2009). Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. *Carbohyd Polym*., 76, 349–361.

[17] Jain, S. K., Jain, A., Gupta, Y., Ahirwar, M. (2007). Design and development of hydrogel beads for targeted

Hotchkiss, S., Philp, K.,Campbell, R., Gill, C., Rowlanda, I. (2011). In vitro fermentation and prebiotic potential of novel low molecular weight polysaccharides derived from agar and alginate seaweeds. *Anaerobe.*,1-6.

[27] Yang, B., Prasad, K., Haihui, X., Lin, S., Jian, Y. (2011). Structural characteristics of oligosaccharides from soy sauce lees and their potential prebiotic effect on lactic acid bacteria. *Food Chem*., 126, 590–594.

[28] Luo, A., He, X., Zhou, S., Fan, Y., Luo, A., Chun, Z. (2010).Purification, composition analysis and antioxidant activity of the polysaccharides from Dendrobium nobile Lindl .*Carbohyd Polym.*, 7, 1014–1019.

[29] Molan, A.L., Flanagan, J., Wei, W. P. Moughan, J. (2009). Selenium-containing green tea has higher antioxidant and prebiotic activities than regular green tea. *Food Chem*., 114, 829–835.