

جداسازی پلی‌ساکاریدها از هسته‌خرما و بررسی برخی خصوصیات فراسودمند آن

مهرنوش تدینی^{۱*}، محمود شیخ زین الدین^۲، صبیحه سلیمانان زاد^۳

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 شبیه‌سازی شده آزمایشگاهی بررسی شد. در مرحله بعد اثر آن بر رشد باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانٹاروم* 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 جداسازی شده از هسته‌خرما مقاومت به هضم قابل مقایسه و حتی بهتر از اینولین نشان دادند. پلی‌ساکاریدهای جداسازی شده از هسته‌خرما زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک را افزایش داده و رفتاری مشابه اینولین نشان دادند. قابلیت جذب روغن و قابلیت نگهداری آب برای پلی‌ساکاریدهای جداسازی شده از هسته‌خرما به ترتیب $4/64 \pm 0/04$ و $1/83 \pm 0/03$ 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 جداسازی شده 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.

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 به دلیل 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 سیستم ایمنی، اثر ضد سرطانی، اثر آنتی‌اکسیدانی، محافظت کبدی، اثر ضد لخته‌کنندگی، اثر ضد التهابی، فعالیت خون‌سازی و اثر پریبیوتیکی می‌باشند [۲، ۳، ۴، ۵]. پلی‌ساکاریدهای پریبیوتیک ترکیبات غیرقابل هضمی هستند که از طریق تحریک انتخابی رشد یا تغییر فعالیت برخی از میکروبه‌های 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 ماده معدنی، کاهش ریسک ابتلا به بیماری‌های قلبی و سرطان روده بزرگ داشته باشند [۷، ۸، ۹]. علاوه بر این پلی‌ساکاریدها به دلیل 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 [۱۱، ۱۲]. به همین 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 و دندان به دلیل 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 امکان‌پذیر می‌سازد. در دنیا پلی‌ساکاریدها از منابع مختلف مانند گیاهان و برخی قارچ‌ها یا علف‌ها و گیاهان دریایی جداسازی شده و خصوصیات زیست‌فعال آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفته است. به دلیل 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 هسته خرما مورد توجه قرار گرفت. تولید سالیان خرما در ایران حدود یک میلیون تن می‌باشد که ۱۲-۶٪ 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 هسته خرما 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،

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

برای بررسی مقاومت به هضم پلی‌ساکارید استخراج‌شده شبیه‌سازی شیرهای گوارشی بر اساس روش جین و همکاران (2006) انجام شد و هم‌زمان ترکیب اینولین تجاری نیز به عنوان پریبیوتیک شاخص با پلی‌ساکارید استخراج‌شده مقایسه گردید. برای شبیه‌سازی معده از کلرید سدیم و اسید کلریدریک به نسبت‌های مشخص استفاده گردید و pH آن به $1/2 \pm 0/5$ تنظیم شد (بافر 1). برای شبیه‌سازی روده از پتاسیم‌دی‌هیدروژن فسفات و سود به نسبت‌های مشخص و pH آن به $7/4$ رسانده شد (بافر 2). برای شبیه‌سازی مخلوط معده و روده از بافرهای 1 و 2 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 100 دور 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 اندازه‌گیری شده و درصد هیدرولیز با اساس میزان قند آزاد شده 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 [17، 15].

2-5- اثر پلی‌ساکارید استخراج‌شده بر رشد باکتری پروبیوتیک

باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتروم* A7، سویه پروبیوتیک جدا شده 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 به هم 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

اسید کلریدریک (37٪)، الکل اتیلیک 95٪، کلرید سدیم، دی‌هیدروژن پتاسیم فسفات، دی‌بی‌بی‌اچ، متانول از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. هم‌چنین محیط کشت MRS broth، پپتون، کازئین، عصاره مخمر، عصاره گوشت، استات سدیم، دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات، توین 80، دی‌آمونیم هیدروژن سیترات، مگنیزیم سولفات و سولفات منگنز برای تهیه MRS بدون قند از شرکت مرک خریداری شدند.

2-2- استخراج

هسته‌های خرما به‌وسیله آسیاب سنگی پودر شده و سپس به‌منظور حذف چربی، قندهای آزاد و ترکیبات رنگی از سه حجم الکل 80٪ در دمای 60 درجه سانتیگراد به مدت 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 به مدت 3 ساعت استفاده شد. به‌منظور جداسازی ذرات نامحلول، عصاره استخراج‌شده سانتریفوژ شده و مایع شفاف رویی برای تغلیظ و جدا شدن ناخالصی‌های باقی‌مانده در دستگاه تبخیرکننده چرخشی تغلیظ شد. برای حذف ناخالصی‌های باقی‌مانده مجدداً عصاره سانتریفوژ شده و سپس برای رسوب دادن پلی‌ساکاریدها از سه حجم الکل در دمای 4 °C و به مدت 48 ساعت استفاده شد. رسوبات حاصل با سانتریفوژ جداسازی شده 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 [15، 14].

2-3- 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].

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)

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

$\text{Abs}_{\text{blank}}$: جذب محلول متانولی DPPH بدون نمونه پلی‌ساکاریدی
 $\text{Abs}_{\text{sample}}$: 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 استفاده شده است. نتایج مربوط در شکل 1 نشان داده شده است. روش تبدیل فوریه مادون قرمز معمولا در پلی‌ساکاریدها برای بررسی نوع پیوندهای گلیکوزیدی، نوع مونوساکاریدها و گروه‌های عاملی مورد استفاده قرار می‌گیرد [16]. باندهای مشاهده شده در 1023، 1080 و 1152 cm^{-1} مرتبط با پیوندهای C-C و C-O می‌باشند. باند مشاهده شده در 2923 cm^{-1} مربوط به پیوند C-H بوده که این باند به‌عنوان باند شاخص قندها محسوب

در حضور پلی‌ساکارید جدا شده از هسته‌خرما محیط‌های شامل 2٪ گلوکز و 2٪ اینولین به‌عنوان پرپیوتیک تجاری شاخص تهیه شد. باکتری فعال شده به نسبت 2٪ (v/v) به محیط‌های مذکور اضافه گردید. از محیط‌های مذکور در زمان‌های 0، 24، 48 و 72 ساعت نمونه‌برداری شده و طبق روش مایلز میزرا (1938) کشت و شمارش انجام شد [18]. pH نمونه‌ها 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 پرپیوتیک شاخص طبق روش کاروالهو و همکاران (2009) اندازه‌گیری شد. در این روش برای اندازه‌گیری WHC، سی میلی‌لیتر آب مقطر به یک گرم نمونه اضافه شده 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 اضافه شده و به مدت یک شبانه روز در دمای اتاق نگهداری شد. مخلوط مورد نظر در 1500 g به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ شده، 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 پودر شده (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 قرار گرفت. برای مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکاریدهای استخراج‌شده از هسته‌خرما با اینولین به‌عنوان پرپیوتیک شاخص استاندارد، شرایط مشابه برای اینولین اعمال شد. هم‌چنین به‌عنوان کنترل مثبت از محلول 1000

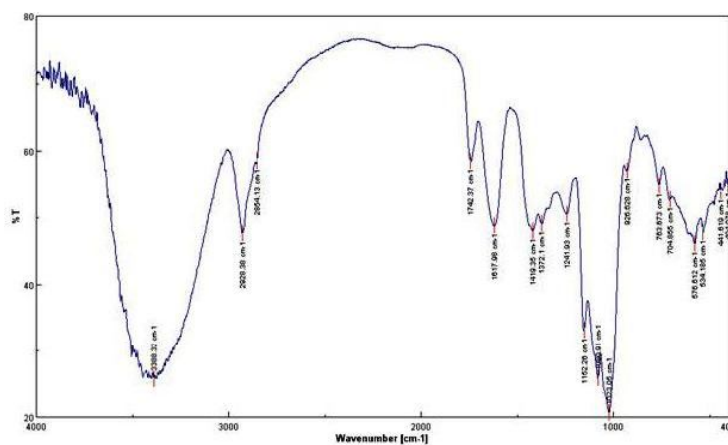
1. Water holding capacity
 2. Lipid adsorption capacity

تقریباً مشابه همدیگر بوده‌اند. باید در نظر داشت که اولین گام برای اثبات پربیبوتیک بودن یک ترکیب مقاومت آن نسبت به شیرهای گوارشی و آنزیم‌های تجزیه‌کننده آن ترکیب است. برای این که ترکیب پربیبوتیک می‌بایست از قسمت فوقانی دستگاه گوارش سالم عبور کرده و به روده بزرگ برسد و در آنجا به وسیله میکروبی‌های پربیبوتیک مورد استفاده قرار بگیرد. نتایج این بخش نشان می‌دهد پلی‌ساکارید جدا شده از هسته‌خرما در مقایسه با اینولین بسیار مقاوم‌تر بوده به طوری که تقریباً بیش از 85 درصد آن هیدرولیز نشده باقی می‌ماند. نتایج مطالعات محققین در این زمینه نشان می‌دهد با توجه به تفاوت ساختاری پلی‌ساکاریدهای جدا شده از منابع مختلف این خصوصیت یعنی مقاومت به هضم می‌تواند بسیار متغیر باشد. مثلاً در مطالعه انجام شده توسط فیردوس و همکاران (2012)، پلی‌ساکارید استخراج شده از بامبو بیش از 99 درصد مقاومت به هضم نشان داده است [15]. ویچنکات و همکاران (2010) درصد هیدرولیز پلی‌ساکارید استخراج شده 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 استخراج شده از منابع مختلف گیاهی بررسی گردیده است که بسته به تفاوت‌های ساختاری و منبعی پلی‌ساکاریدهای استخراج شده، منابع مناسب

می‌شود [21، 15، 5]. وجود باندهای 1372، 1241 و 1419 cm^{-1} مربوط به پیوندهای C-H، COH، و C-O-C می‌باشد [15، 21]. وجود باند در ناحیه 857 و 926 cm^{-1} مبین وجود پیوندهای آلفا و بتا در فرم پیرانوزی قندهاست [21، 15، 5]. باند مشاهده شده در ناحیه 763 cm^{-1} مربوط به حضور دی‌زایلووز است [16]. مشاهده باندهای شاخص در ناحیه $1000-1200 \text{ cm}^{-1}$ و 2923 طیف شکل 1 تاییدکننده وجود پلی‌ساکارید به عنوان ترکیب اصلی و غالب در عصاره استخراج شده است [15].

3-2- بررسی مقاومت به هضم پلی‌ساکارید استخراج شده

برای بررسی مقاومت به هضم پلی‌ساکارید استخراج شده از هسته‌خرما شبیه‌سازی شیرهای گوارشی در سه مرحله انجام گرفت. درصد هیدرولیز محاسبه شده برای پلی‌ساکارید استخراج شده از هسته‌خرما و اینولین به عنوان پربیبوتیک شاخص تجاری در سه مرحله هضم در شکل 2 نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود درصد هیدرولیز پلی‌ساکارید استخراج شده 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 استخراج شده از هسته‌خرما و اینولین) بسیار ناچیز بوده و



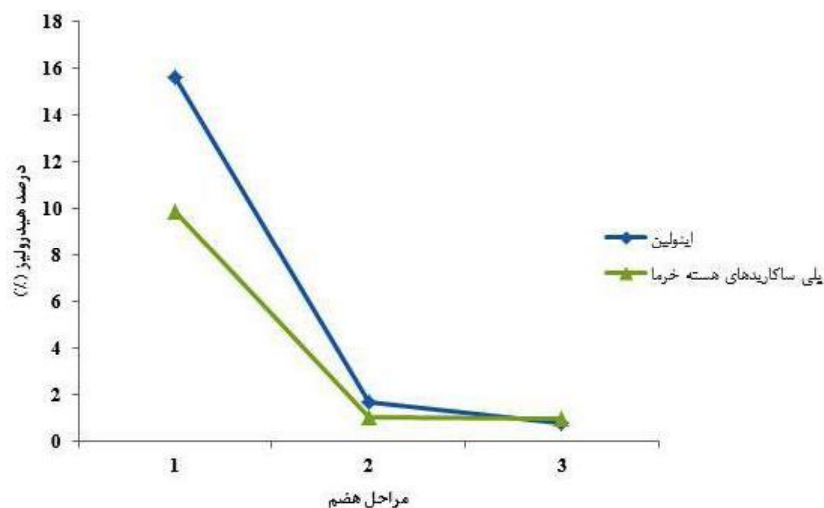
شکل (1) طیف تبدیل فوریه مادون قرمز پلی‌ساکارید استخراج شده از هسته‌خرما

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

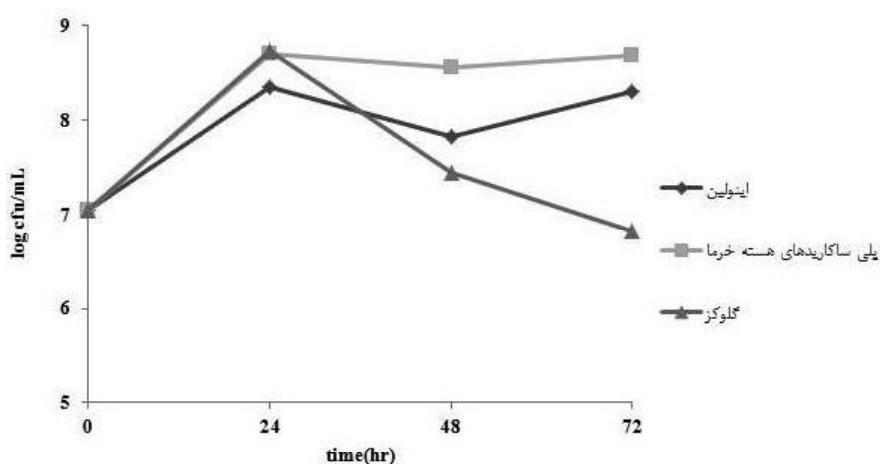
استفاده شد. در طول 72 ساعت رشد در فواصل 24 ساعته pH نمونه‌ها و شمارش انجام شد. همان‌طور که در شکل 3 مشاهده می‌شود پلی‌ساکارید استخراج‌شده اثر تحریک‌کننده بر رشد باکتری داشته است به‌طوری‌که جمعیت آن پس از 24 ساعت افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته است. از طرفی قابلیت زنده‌ماندن میکروب تا 72 ساعت مطالعه‌شده افزایش 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.

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

به‌منظور بررسی اثر پلی‌ساکاریدهای استخراج‌شده از هسته‌خرما بر رشد باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتروم 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



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

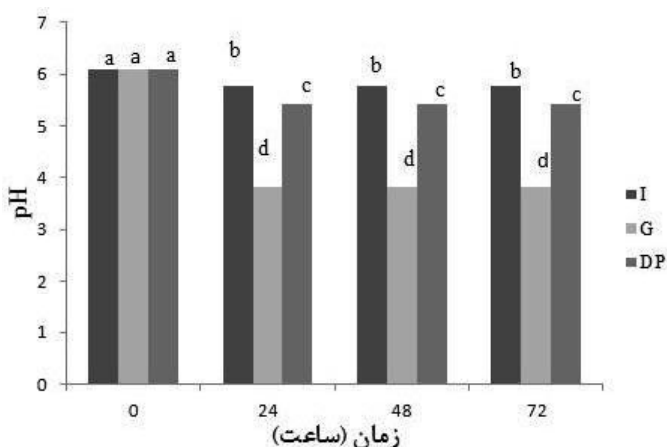


شکل (3) بررسی اثر پلی‌ساکاریدهای هسته‌خرما در مقایسه با اینولین و گلوکز بر رشد لاکتوباسیلوس پلانتروم A7

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

نتایج این بخش قابلیت پریبیوتیکی پلی ساکاریدهای استخراج شده از هسته خرما را تایید می کنند. مطابق تعریف هوبنر و همکاران (2007) قابلیت پریبیوتیکی یک ترکیب به تاثیر آن ترکیب بر حمایت رشد و زنده ماندن میکروارگانیسم در مقایسه با رشد آن میکروب در محیط حاوی سوبسترای غیر پریبیوتیک مانند گلوکز برمی گردد [9]. نکته اساسی در تعریف پریبیوتیک ها امکان رشد باکتری پریبیوتیک در حضور آن و افزایش جمعیت باکتری های پریبیوتیک و از طرفی اثر بر افزایش زنده ماندن پریبیوتیک است. این مساله به خصوص در ترکیب های سینبیوتیک که در مواد غذایی استفاده می شوند بسیار حائز اهمیت است. یعنی در مواد غذایی پریبیوتیک، ترکیب پریبیوتیک به عنوان ترکیب حمایت کننده رشد و افزایش زنده ماندن عمل می کند [24]. این موضوع به پیچیدگی ساختاری ترکیبات پریبیوتیک و عدم دسترسی به قند ساده در محیط رشد میکروب مربوط می شود. در محیط های حاوی قند ساده به دلیل پدیده مهار کاتابولیکی و مهار فعالیت آنزیم ها رشد محدود می شود [25]. ولی در محیط های حاوی ترکیب پریبیوتیک به دلیل پیچیدگی ساختاری امکان تولید آنزیم های بیش تر که برای متابولیسم شدن ترکیبات غذایی لازم است فراهم شده و به میکروارگانیسم قدرت حفظ ثبات و پایداری می دهد. همچنین در محیط روده بزرگ افزایش

جمعیت میکروب های پریبیوتیک به دلیل افزایش توان رقابتی در مقایسه با سایر میکروب های میکروفلور روده (خصوصا میکروب های مضر) و تولید متابولیت های مفید به وسیله میکروب های پریبیوتیک می تواند منجر به اثرات سلامتی بخش در میزبان شود [15]. نتایج مربوط به کاهش pH محیط های مورد بررسی نشان می دهد pH هر سه محیط با هم اختلاف معنی داری دارند (شکل 4). ضمن آن که با توجه کاهش بسیار شدید pH در محیط حاوی گلوکز و جمعیت بالای میکروب پریبیوتیک در محیط های حاوی اینولین و پلی ساکاریدهای هسته خرما احتمالاً حاکی از طی مسیرهای متابولیکی متفاوت به وسیله میکروارگانیسم در سه محیط مورد بررسی می باشد. این مساله نیز نشان دهنده قابلیت پریبیوتیکی پلی ساکاریدهای جداسازی شده از هسته خرما می باشد چرا که در تعریف پریبیوتیک ها در سال های اخیر بیش تر تاکید بر تفاوت در فعالیت میکروب ها یا تفاوت در نوع متابولیت های تولید شده به وسیله میکروب های پریبیوتیک در حضور پریبیوتیک هاست [15, 9]. در مطالعات مختلف انجام شده، برای اثبات قابلیت پریبیوتیکی یک ترکیب بیش تر اثر تحریک کننده رشد از زمان صفر تا 24 یا 48 ساعت مورد مطالعه قرار گرفته است. اما مقایسه رفتار میکروب در محیط های مختلف و یا افزایش زنده ماندن مساله ای است که به ندرت به آن پرداخته شده است. مثلاً در مطالعه



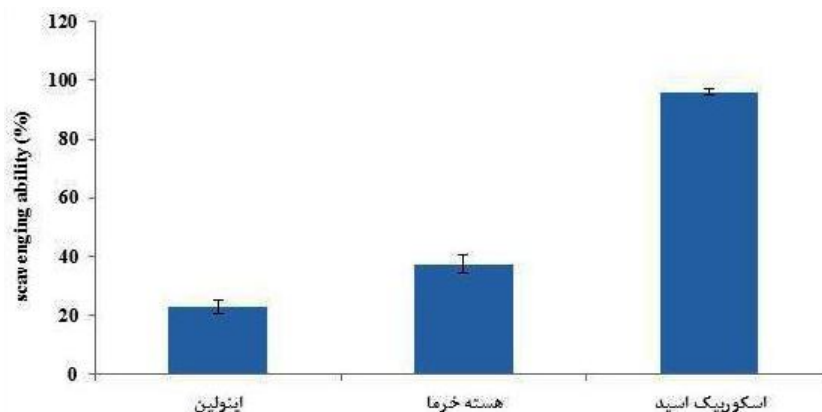
شکل (4) بررسی اثر پلی ساکارید جداسازی شده از هسته خرما در مقایسه با اینولین و گلوکز بر pH محیط رشد

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 جداسازی شده از هسته خرما، داده ها میانگین حاصل از سه تکرار و حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح 1٪

3-4- بررسی خصوصیات تکنولوژیکی

برای بررسی قابلیت کاربرد تکنولوژیکی پلی‌ساکاریدهای جدا شده از هسته خرما در بافت‌های غذایی و اثر آن بر پایداری بافت خصوصیت توانایی نگهداری آب (WHC) و توانایی جذب روغن (LAC) اندازه‌گیری شده است. نتایج مربوط به WHC و LAC پلی‌ساکاریدهای جدا شده از هسته خرما و مقایسه آن با اینولین در جدول ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود توانایی نگهداری آب در مورد پلی‌ساکاریدهای هسته خرما بسیار بیشتر از اینولین و در سطح ۱٪ با هم اختلاف معنی‌دار دارند. WHC به توانایی شبکه پلی‌ساکارید برای جذب و حفظ آب 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 مطالعه شده است. مقدار WHC پلی‌ساکاریدهای هسته خرما قابل مقایسه با توانایی نگهداری آب فیبرهای رژیمی استخراج شده از لیمو، گریپ فروت، پرتقال و سیب است که توسط فیگورلا و همکاران (۲۰۰۵) مطالعه شده است [۱۰]. 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].

رامنانی و همکاران (۲۰۱۱) در بررسی اثر پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از آگار و آلژینات فقط اثر تحریک‌کنندگی رشد روی بیفیدوباکتریوم پس از ۲۴ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفته است [۲۶]. در مطالعه ویچنکات و همکاران (۲۰۱۰) اثر تحریک‌کنندگی رشد یک نوع اولیگو ساکارید استخراج شده از پیتایا پس از ۴۸ ساعت بر گونه لاکتوباسیلوس دلبروکی مورد بررسی قرار گرفته است [۲۲]. اما در مطالعه فیردوس و همکاران (۲۰۱۲) اثر پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از گیاه بامبو بر باکتری‌های پروبیوتیک در مدت زمان ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفته و افزایش زنده‌مانی تا بیش از ۴۸ ساعت گزارش گردیده است [۱۵]. در مطالعات انجام شده به وسیله محققین مختلف با توجه به تفاوت ساختاری و مقاومت به هضم مختلف ترکیبات استخراج شده، تفاوت محیط‌های کشت بررسی شده به لحاظ اجزاء تشکیل دهنده و ظرفیت بافری آن‌ها، تفاوت گونه‌های پروبیوتیک مطالعه شده به لحاظ رفتار و قابلیت‌های متابولیکی، تفاوت دوره زمانی رشد مطالعه شده و غلظت‌های مختلف بررسی شده ترکیب پر بیوتیک، نمی‌توان روند مشخصی برای مقایسه یک ترکیب استخراج شده جدید با مطالعات قبلی پیدا کرد. لذا در مطالعه حاضر برای مقایسه خصوصیات ترکیب جدید استخراج شده در همه مراحل مطالعه از اینولین به عنوان پر بیوتیک شاخص تجاری استفاده شد تا مرجع مشخصی برای مقایسه با خصوصیات ترکیب جدید استخراج شده باشد. نتایج این بخش به همراه نتایج بخش مقاومت به هضم، قابلیت پر بیوتیکی پلی‌ساکاریدهای هسته خرما را اثبات می‌کنند.

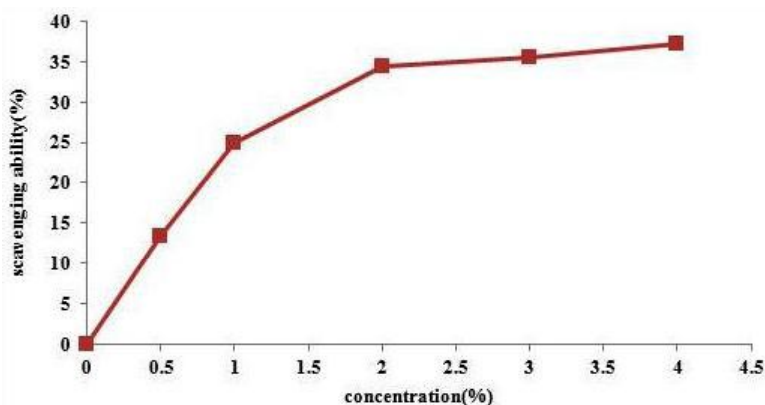


شکل (۵) بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

3-5- بررسی خصوصیت آنتی اکسیدانی پلی ساکاریدهای جداساده از هسته خرما

برای بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی پلی ساکاریدهای جداساده از هسته خرما 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 خارج شده و به فرم پایدار تبدیل می‌شود و این مساله با تغییر رنگ محلول DPPH و تغییر جذب آن مشخص می‌شود [27]. پلی ساکاریدهای جداساده از هسته خرما قادر به مهار رادیکال آزاد DPPH در حدود 40٪ بوده‌اند و از لحاظ این خصوصیت نیز نسبت به اینولین برتری داشته‌اند (شکل 5). همچنین در مطالعه اثر غلظت بر فعالیت آنتی اکسیدانی پلی ساکاریدهای جداساده از هسته خرما همان‌طور که در شکل 6 مشاهده می‌شود با افزایش غلظت فعالیت آنتی اکسیدانی افزایش یافته است. در مطالعات انجام شده فعالیت آنتی اکسیدانی پلی ساکاریدها 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 پلی ساکاریدهای جداساده از هسته خرما با توجه به طیف FTIR توضیح داده شده در بخش 3-1 باندهای مربوط به گروه‌های کربونیل و کربوکسیل به ترتیب در 1741 و 1418 cm⁻¹ مشاهده شد. البته برای تشریح دقیق‌تر چگونگی فعالیت آنتی اکسیدانی

ظرفیت جذب روغن (LAC) به توانایی شبکه پلی ساکارید برای جذب روغن برمی‌گردد ترکیباتی با توانایی جذب روغن بالا به لحاظ تکنولوژیکی می‌توانند برای پایداری بافت امولسیون‌های چرب استفاده شوند [12]. همچنین به لحاظ فیزیولوژیکی با توجه به داشتن توانایی جذب چربی می‌توانند به کاهش جذب چربی غذای خورده شده به خون کمک کنند [11]. این خصوصیت نیز برای فیبرهای رژیمی از منابع مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است به طوری که مقدار جذب چربی پلی ساکاریدهای هسته خرما قابل مقایسه با جذب چربی فیبرهای رژیمی مطالعه شده مانند سبوس برنج و یا فیبرهای استخراج شده از منابع دریایی است و حتی مقدار آن از جذب چربی فیبرهای مطالعه شده برخی میوه‌ها بیشتر می‌باشد [۱۲، ۱۱، ۱۰]. همان‌طور که مشاهده می‌شود توانایی جذب چربی پلی ساکاریدهای استخراج شده از هسته خرما از اینولین نیز بسیار بیشتر می‌باشد. 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 پلی ساکاریدهای جداساده از هسته خرما و همچنین اثبات خصوصیت پریبیوتیکی آن در بخش قبل می‌تواند گزینه مناسبی به عنوان یک پلی ساکارید زیست‌فعال و قابل رقابت با اینولین برای کاربردهای تکنولوژیکی در مواد غذایی و یا حتی دارویی باشد.



شکل (6) اثر غلظت بر فعالیت آنتی اکسیدانی پلی ساکاریدهای هسته خرما

جدول (۱) اندازه‌گیری خصوصیات تکنولوژیکی و فیزیولوژیکی پلی‌ساکاریدهای جدا شده از هسته خرما

پلی‌ساکارید	WHC(g water/gDM)	LAC(g oil/gDM)
پلی‌ساکارید جدا شده از هسته خرما	1/83±0/03 ^a	4/64±0/04 ^a
اینولین	0/68±0/03 ^b	1/83±0/03 ^b

داده‌ها میانگین حاصل از سه تکرار، حروف متفاوت در هر ستون اختلاف معنی‌دار در سطح 1٪

بهرتر از اینولین (پریبیوتیک تجاری) دارند. هم‌چنین نتایج حاصل از بررسی خصوصیات عملکردی پلی‌ساکاریدهای جدا شده 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 جدا شده از هسته خرما نیز نسبتاً مطلوب و بیش‌تر از اینولین بوده است. بر اساس نتایج این مطالعه پلی‌ساکاریدهای جدا شده از هسته خرما 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.

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

4- نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این بررسی نشان می‌دهند پلی‌ساکاریدهای جدا شده از هسته خرما قابلیت پریبیوتیکی قابل مقایسه و حتی

منابع

- [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 [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 New Zealand plants. *Carbohydr 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. *Carbohydr 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.

- 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., Oraikul, 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، شماره 74، ص 38-40.
- [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., Rowland, 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. *Carbohydr 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.