نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذایی
جلد نهم، شماره اول، ۹۶
۵۳-۶۶
http://ejfpp.gau.ac.ir

بررسی فعالیت پری‌بیوتیکی پلی‌ساکاریدهای استخراج‌شده از بلوط (*کوئرکوس برانتی*)

مهرنوش تدینی[1*]، محمود شیخ زین الدین[2] و صبیحه سلیمانیان‌زاد[2]

[1] گروه علوم و صنایع غذایی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران
[2] دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۴/۰۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۰۷

چکیده

سابقه و هدف: کنترل وضعیت میکروفلور روده‌ای میزبان می‌تواند در جلوگیری از بروز برخی بیماری‌های مزمن مانند چاقی و برخی بیماری‌های مرتبط با آن مانند دیابت نوع دوم مؤثر باشد. پری‌بیوتیک‌ها مواد غذایی غیرقابل‌هضمی هستند که از طریق تحریک انتخابی رشد یا فعالیت پروبیوتیک‌ها در روده‌ی بزرگ اثرات سلامتی بخش برای میزبان به دنبال خواهند داشت. برخی مزایای سلامتی بخش مرتبط با پری‌بیوتیک‌ها شامل عملکرد بهتر سیستم ایمنی، اثر برجذب مواد معدنی، کاهش بروز سرطان، کاهش احتمال ابتلا به اسهال و بیماری‌های عفونی، کاهش بروز بیماری‌های روده‌ای، بیماری قلبی، دیابت غیر وابسته به انسولین، چاقی و پوکی استخوان می‌باشد. هدف از پژوهش حاضر بررسی قابلیت پری‌بیوتیکی پلی‌ساکارید استخراج شده از بلوط، تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ویژگی‌های ساختمانی و عملکردی بوده است.

مواد و روش‌ها: پلی‌ساکاریدهای میوه‌ی بلوط بعد از طی مراحل چربی‌زدایی، استخراج با آب داغ و رسوب با اتانول جداسازی شدند. سپس مقاومت آن نسبت به شرایط هضم اسیدی و آنزیمی به‌صورت برون‌تنی بررسی شد. در مرحله‌ی بعد اثر این پلی‌ساکاریدها بر رشد باکتری پروبیوتیک (*لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A7) در مقایسه با پری‌بیوتیک تجاری اینولین مورد بررسی قرار گرفت. اسیدهای چرب کوتاه زنجیر تولیدشده یا محصول نهایی حاصل از تخمیر باکتری پروبیوتیک در محیط حاوی اینولین و پلی ساکارید بلوط به همراه پروبیوتیک (*لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A7) با کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنجی جرمی مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی ساکارید بدست آمده نیز با آزمون مهار رادیکال آزاد ۲،۲-دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌منظور بررسی ارتباط خصوصیات ساختاری و شناسایی گروه‌های عاملی پلی ساکاریدها از روش طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوریه و رزونانس مغناطیس هسته‌ای استفاده شد.

یافته‌ها: بر اساس نتایج پلی ساکارید بلوط با نشان دادن بیشینه‌ی هیدرولیز ۳ درصد، مقاومت خوبی در شرایط شبیه‌سازی‌شده‌ی هضم داشت. همچنین این پلی ساکاریدها از قابلیت تحریک رشد و افزایش زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک مورد بررسی (*لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A7) برخوردار بود. نتایج حاصل از بررسی اسیدهای چرب کوتاه زنجیر تولید شده در محیط‌های حاوی پلی ساکارید بلوط و اینولین نشان داد اسید استیک به‌عنوان اسید غالب بوده و مقادیر کمی اسید پروپیونیک و اسید بوتیریک نیز در محیط حاوی اینولین شناسایی شدند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی ساکارید استخراج شده از بلوط AP در غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌ترتیب حدود ۱/۳۵±۶۹/۹۴ و ۱/۷۸± ۸۲/۲۴ درصد بود. باندهای شاخص مرتبط با فعالیت آنتی‌اکسیدانی شامل کربونیل، سولفات و پیوندهای بتا در طیف مادون قرمز تبدیل فوریه و رزونانس مغناطیس هسته‌ای مشاهده شدند.

[*] مسئول مکاتبه: m.t.tadayoni@gmail.com

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد ترکیبات استخراج شده از بلوط می‌تواند به‌عنوان یک پری‌بیوتیک مناسب استفاده شود. به نظر می‌رسد فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا و خاصیت پری‌بیوتیکی مناسب پلی ساکاریدهای بلوط باهم مرتبط هستند. با توجه به افزایش تقاضا برای ترکیبات پری‌بیوتیک و قیمت بالای آن‌ها، بلوط می‌تواند به‌عنوان منبع بالقوه در استخراج ترکیبات پری‌بیوتیک جهت کاربرد در مواد غذایی فراسودمند معرفی شود.

واژه‌های کلیدی: بلوط، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، مواد غذایی فراسودمند، پری‌بیوتیک

مقدمه

ایجاد میکروفلور روده یک فرایند تدریجی است و این موضوع تحت تأثیر نوع زایمان، وضعیت فلور میکروبی روده مادر و نوع تغذیه‌ی نوزاد قرار می‌گیرد (۱۱). غلبه فلور بیفیدوباکتریایی در روده شرایط مطلوب و مؤثری بر سلامتی ایجاد می‌نماید. با افزایش سن به‌ویژه در دوران بزرگ‌سالی، سهم بیفیدوباکتر نسبت به‌کل فلور میکروبی روده کاهش می‌یابد. این مسئله منجر به مشکلات فیزیولوژیکی، عدم عملکرد درست سیستم ایمنی و افزایش حساسیت به عفونت‌های روده‌ای می‌شود؛ بنابراین تغییر فلور روده به سمت جمعیت بیشتر بیفیدوباکتر بسیار مهم به نظر می‌رسد. یکی از راه حل‌ها واردکردن بیفیدوباکتر به‌عنوان پروبیوتیک در فراورده‌های غذایی است تا نوع و تعداد میکروفلور کولون بهبود یابد (۱). علیرغم اثرات مفید پروبیوتیک‌ها بر سلامتی انسان نتایج بررسی‌ها حاکی از رشد و ماندگاری اندک آن‌ها در سیستم گوارشی دارد؛ بنابراین تحقق راهکارهایی جهت تحریک رشد باکتری‌های مطلوب در کولون جالب‌توجه می‌باشد (۱۷). راه‌حل مؤثر در تحریک رشد پروبیوتیک‌ها خصوصاً بیفیدوباکتر غنی‌سازی مواد غذایی با پری‌بیوتیک‌ها است. پری‌بیوتیک را می‌توان به‌عنوان ماده غذایی غیرقابل‌هضمی تعریف نمود که از طریق تحریک انتخابی رشد یا فعالیت یک یا تعدادی محدودی از باکتری‌ها در کولون بر سلامتی میزبان اثر می‌گذارد (۲۴، ۲۸). عمده اثرات سلامتی بخش پری‌بیوتیک‌ها به بهینه‌سازی عملکرد کولون و متابولیسم برمی‌گردد. این اثرات سلامتی بخش بیشتر از طریق مکانیسم‌هایی مانند افزایش بیان یا تغییر در ترکیب اسیدهای چرب کوتاه زنجیر، افزایش وزن مدفوع، کاهش pH کولون، کاهش در تولید فراورده‌های ازته و آنزیم‌های احیاء کننده، افزایش بیان پروتئین‌های باند کننده یا بیومارکرهای خاص درزمینه‌ی متابولیسم لیپیدها، مواد معدنی و کنترل سیستم ایمنی صورت می‌گیرد (۲۲). اثرات سلامتی بخشی همچون تقویت سیستم ایمنی، اثر ضد سرطانی، بهبود اسهال، کاهش کلسترول خون، کنترل وزن، بهبود دیابت، بهبود بیماری‌های مزمن کلیوی، کنترل جذب مواد معدنی و جلوگیری از ابتلا به پوکی استخوان برای انواع پری‌بیوتیک‌ها در پژوهش‌های مختلف گزارش شده است (۲۲، ۲۴، ۲۵). پری‌بیوتیک‌ها ممکن است مستقیماً از منابع طبیعی استخراج شوند. همچنین ممکن است طی فرایندهای شیمیایی از پلی‌ساکاریدها یا به‌وسیله فرایندهای سنتز شیمیایی یا آنزیمی از دی‌ساکاریدها تولید شوند. بیشتر آن‌ها از پلی‌ساکاریدهای گیاهی یا آلگ‌های دریایی سنتز و یا جداسازی شده‌اند که از معروف‌ترین آن‌ها می‌توان به فروکتوالیگوساکاریدها، گالاکتوالیگوساکاریدها، زایلوالیگوساکاریدها و ایزومالتوالیگوساکاریدها اشاره کرد (۲۲). با توجه به اهمیت پری‌بیوتیک‌ها در بهبود سلامتی و نقش‌های تکنولوژیکی برخی از آن‌ها در بهبود خصوصیات کیفی مواد غذایی، تلاش‌های زیادی در کشورهای مختلف برای یافتن پری‌بیوتیک‌های جدید از منابع طبیعی مختلف با خصوصیات عملکردی مضاعف و قیمت پایین‌تر در مقایسه با انواع مرسوم و وارداتی صورت گرفته است.

میوه بلوط متعلق به جنس *کوئرکوس*[1] و خانواده *فاگاسه*[2] است. این جنس بیش از دویست گونه‌ی متنوع را در بر می‌گیرد. در بین چهار گونه *کوئرکوس برانتی*، *کوئرکوس اینفکتوریا*، *کوئرکوس لیبانی* و *کوئرکوس پتری* که در منطقه زاگرس رشد می‌کنند، کوئرکوس برانتی فراوانی بیشتری دارد (۲۳). در پژوهش‌های مختلف ارقام متفاوت آن دارای ترکیبات

1. *Quercus*
2. *Fagaceae*

آنتی‌اکسیدانی متنوع و اثر ضدمیکروبی علیه برخی گونه‌های میکروبی از جمله *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بوده‌اند (۳، ۴، ۲۰). دسترسی گسترده بلوط در ایران و کاربردهای غذایی و درمانی سنتی از دیرباز تاکنون نشان‌گر قابلیت این منبع جهت استخراج ترکیبات زیست فعال و کاربرد آن در صنعت غذا است. تاکنون پژوهش جامعی در خصوص قابلیت پری‌بیوتیکی بلوط یا ترکیبات استخراج‌شده از آن در ایران صورت نگرفته است. لذا هدف از پژوهش حاضر بررسی قابلیت پ‌بیوتیکی ترکیبات استخراج شده از میوه بلوط و مقایسه آن با پری‌بیوتیک وارداتی (اینولین) و همزمان تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ویژگی‌های ساختمانی و عملکردی پلی‌ساکارید استخراج شده از میوه بلوط بوده است.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه: میوه خشک‌شده بلوط از شهرستان باغملک در استان خوزستان خریداری شد. مواد شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده در این پژوهش شامل هیدروکسید سدیم، اسیدکلریدریک ۳۷ درصد، اتانول ۹۵ درصد، کلرید سدیم و دی هیدروژن پتاسیم فسفات، همچنین محیط کشت دمن روگوسا شارپ[1] براث، پپتون، کازئین، عصاره مخمر، عصاره گوشت، استات سدیم، دی پتاسیم هیدروژن فسفات، توین ۸۰، دی آمونیوم هیدروژن سیترات، سولفات منیزیم و سولفات منگنز از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. اینولین مورداستفاده به‌عنوان پری‌بیوتیک شاخص تجاری از سنسوس آمریکا خریداری شد. باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A7 از کلکسیون میکروبی آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی دانشگاه صنعتی اصفهان تأمین شد.

استخراج پلی‌ساکارید بلوط[2] (AP): مغز میوه بلوط به‌وسیله آسیاب سنگی پودر شد و سپس به‌منظور حذف چربی، قندهای آزاد و ترکیبات رنگی از اتانول ۸۰ درصد استفاده شد. برای این منظور سه تا چهار برابر وزن نمونه، اتانول ۸۰ درصد به نمونه پودر شده اضافه‌شده و در انکوباتور شیکردار (آیکا، مدل کااس ۴۰۰۰، آلمان) با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۸ ساعت قرار گرفت. سپس به‌منظور جداسازی ترکیبات حل‌شده در اتانول و صاف کردن محلول از پارچه نایلونی استفاده شد. به‌منظور حذف بقایای چربی یا قندهای آزاد موجود، باقیمانده حاصل از صاف کردن چندین بار با حلال تازه شسته شد. پس‌ازآن باقیمانده حاصل از چربی‌زدایی در آون ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت چند ساعت خشک شد. برای استخراج پلی‌ساکاریدهای محلول در آب از حمام آبی (ممرت، آلمان) استفاده گردید. برای این منظور نمونه چربی‌زدایی و خشک شده در پنج برابر آب مقطر در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ ساعت غوطه‌ور شد. پس از طی زمان مذکور عصاره استخراج شده برای جداسازی ذرات نامحلول، سانتریفیوژ (k16، آلمان؛ ۳۰۰۰ دور بر اساس شتاب گرانشی، ۱۰ دقیقه، دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد) شد و مایع شفاف رویی برای تغلیظ و جدا شدن ناخالصی‌های باقیمانده در دستگاه تبخیرکننده چرخشی (بوچی، سوئیس) در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد. برای حذف ناخالصی‌های باقیمانده مجدداً عصاره سانتریفیوژ شده (۳۰۰۰ دور بر اساس شتاب گرانشی، ۱۰ دقیقه، دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد) و سپس برای رسوب دادن پلی‌ساکاریدهای محلول در آب، از اتانول ۸۰ درصد استفاده شد. بدین‌منظور میزان دو تا سه برابر حجم عصاره‌ی تغلیظ شده از اتانول ۸۰ درصد به عصاره

1. De Man, Rogosa and Sharp (MRS)

1. Acorn Polysaccharide

اضافه شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، به‌مدت ۴۸ ساعت نگهداری شد. رسوبات حاصل با سانتریفیوژ (۳۰۰۰ دور بر اساس شتاب گرانشی، ۱۰ دقیقه، دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد) جداسازی شده و برای حذف ناخالصی‌ها، چندین بار با اتانول خالص شستشو داده شد. پس از الکل‌زدایی در دستگاه تبخیرکننده‌ی چرخشی، عصاره‌ی غلیظ شده به روش خشک کردن انجمادی (کریست آلفا ۴-۱، آلمان) خشک گردید. پودر حاصل از استخراج "پلی ساکارید بلوط" نامیده شد و خلوص آن با روش فنول سولفوریک اسید محاسبه گردید (۲، ۵، ۸، ۱۲).

بررسی قابلیت پری‌بیوتیکی پلی ساکارید بلوط: بررسی قابلیت پری‌بیوتیکی ترکیب استخراج شده در دو مرحله بررسی شد. در مرحله اول مقاومت به هضم و سپس تحریک رشد باکتری پروبیوتیک مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی مقاومت به هضم پلی ساکارید بلوط، شبیه‌سازی شیره‌های گوارشی بر اساس روش جین و همکاران (۹) انجام شد. برای شبیه‌سازی شیره‌های گوارشی و در واقع شبیه‌سازی فرایند هضم در سه مرحله بافرهای ۱، ۲ و ۳ دارای pHهای ۱/۲، ۴/۵ و ۷/۴ استفاده شد. بافرهای ۱ تا ۳ به ترتیب به ترکیب استخراج‌شده اضافه و پس از گذشت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، نمونه سانتریفیوژ شده و از مایع رویی برای اندازه‌گیری قند آزاد نمونه‌برداری شد. قند آزاد به روش دی نیترو سالیسیلیک اسید[1] (DNS) اندازه‌گیری و درصد هیدرولیز بر اساس میزان قند احیا نسبت به قند کل گزارش شد. در مرحله سوم، حجم معینی از آنزیم آلفا آمیلاز با فعالیت ۲ واحد در میلی‌لیتر افزوده و پس از یک ساعت نمونه‌برداری شد. تمام مراحل اشاره‌شده برای اینولین به‌عنوان پری‌بیوتیک شاخص تجاری نیز انجام شد. برای هر مرحله درصد هیدرولیز به‌عنوان میزان قند احیا به میزان قند کل محاسبه گردید (۵، ۲۶، ۲۷).

باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A7، سویه جداشده از روده‌ی نوزاد انسان که در بانک میکروبی آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی دانشگاه صنعتی اصفهان نگهداری می‌شود، به‌عنوان باکتری پروبیوتیک موردنظر برای رشد در حضور پلی ساکارید بلوط انتخاب شد. خاصیت پروبیوتیکی سویه‌ی مذکور در پژوهش‌های قبلی اثبات شده است (۱۵، ۱۶). محیط‌های مورد بررسی شامل محیط دمن روگوسا شارپ براث بدون قند دارای ۲ درصد اینولین ، دمن روگوسا شارپ براث بدون قند دارای ۲ درصد پلی ساکارید بلوط و محیط دمن روگوسا شارپ براث بدون قند حاوی ۲ درصد گلوکز تهیه شدند. باکتری پروبیوتیک فعال‌شده به تعداد 10^7 کلنی در میلی‌لیتر به محیط‌های مذکور اضافه گردید. از محیط‌های مذکور در زمان‌های صفر و ۲۴ ساعت نمونه‌برداری شده و طبق روش مایلز میزرا (۱۴) کشت و شمارش انجام شد. به‌منظور بررسی اثر پلی ساکارید بلوط برافزایش زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک نمونه‌برداری و کشت در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت نیز انجام شد.

بررسی اسیدهای چرب کوتاه زنجیر تولید شده در محیط رشد باکتری پروبیوتیک: برای بررسی کمی و کیفی اسیدهای چرب کوتاه زنجیر تولید شده در محیط رشد باکتری پروبیوتیک از روش کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی استفاده شد. برای این منظور باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A7 در محیط‌های اینولین و پلی‌ساکارید بلوط کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت نمونه‌برداری انجام شد. پس از یکنواخت شدن ۱ میلی‌لیتر نمونه از محیط مذکور برداشت شده و برای جدا کردن باکتری‌ها از نمونه‌های مذکور میکروسانتریفیوژ (۱۰۰۰۰ دور بر اساس شتاب گرانشی، ۴ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ دقیقه)

1. 3, 5-Dinitrosalicylic acid (DNS)

صورت گرفت. مایع رویی پس از آماده‌سازی به دستگاه کروماتوگرافی گازی-طیف سنجی جرمی[1] (کرومپک، مدل سی پی ۹۰۰۲، ساخت کشور هلند) تزریق شد (۲۱).

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی ساکارید بلوط: برای بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکارید بلوط، نمونه پودر شده پلی‌ساکارید بلوط با متانول مخلوط و توسط انکوباتور شیکردار به‌مدت ۳ ساعت به‌شدت هم زده شدند. سپس در ۳۰۰۰ دور بر اساس شتاب گرانشی به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ انجام‌شده و مایع رویی حاصل برای بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار گرفت. همچنین به‌عنوان کنترل مثبت از محلول ۱۰۰۰ میکرومولار اسید آسکوربیک استفاده گردید. برای بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی از روش مهار رادیکال آزاد ۲،۲ دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل[2] استفاده شد. برای انجام این آزمایش، ۵۰۰ میکرو لیتر از عصاره متانولی به‌سرعت به ۵ میلی‌لیتر از محلول متانولی ۰/۱ میلی مولار ۲،۲-دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل اضافه و به‌شدت مخلوط شد. مخلوط حاصل به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و مکان تاریک قرار گرفت و سپس جذب آن در دستگاه اسپکتروفوتومتر (یونیکو ۲۱۰۰، آمریکا) در ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. جذب محلول متانولی ۲،۲-دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل نیز در ۵۱۷ نانومتر قرائت و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی مطابق رابطه ۱ محاسبه شد (۱۸):

رابطه (۱)

$$Scavenging\ activity(\%) = (\frac{Abs_{blank} - Abs_{sample}}{Abs_{blank}}) \times 100$$

که در آن Abs_{blank}: جذب محلول متانولی ۲،۲ دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل بدون نمونه پلی‌ساکاریدی و Abs_{sample}: جذب محلول متانولی ۲،۲ دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل با نمونه پلی‌ساکاریدی است.

بررسی خصوصیات ساختاری پلی ساکارید بلوط با روش طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوریه: شناسایی ساختار پلی ساکارید بلوط با استفاده از دستگاه طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوریه انجام شد. طیف مادون‌قرمز تبدیل فوریه در محدوده عدد موجی ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ بر سانتی‌متر) با استفاده از اسپکترومتر مجهز به سیستم بازتاب تضعیف شده کل[3] (مدل جاسکو، ساخت کشور ژاپن) ثبت شد (۱۹).

بررسی خصوصیات ساختاری پلی ساکارید بلوط با روش رزونانس مغناطیس هسته‌ای[4]: برای بررسی سیگنال‌های پروتونی پلی‌ساکاریدهای بلوط از روش رزونانس مغناطیس هسته‌ای استفاده شد. پودر پلی ساکارید بلوط در حلال دی متیل سولفواکساید[5] حل‌شده و طیف رزونانس مغناطیس هسته‌ای پلی ساکارید بلوط با استفاده از دستگاه رزونانس مغناطیس هسته‌ای با قدرت ۵۰۰ مگاهرتز مستقر در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه صنعتی شریف بررسی گردید (۳).

تجزیه و تحلیل آماری: کلیه آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد. نتایج در قالب طرح کاملاً تصادفی آنالیز واریانس شدند. مقایسه میانگین‌ها با روش دانکن در سطح اطمینان ۹۹ درصد انجام شد. جهت تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار سس (۹/۱) استفاده شد.

نتایج و بحث

بررسی قابلیت پری‌بیوتیکی ترکیبات استخراج‌شده (پلی ساکارید بلوط): ترکیب پری‌بیوتیک باید از قسمت فوقانی دستگاه گوارش سالم عبور کرده، به روده بزرگ برسد و در آنجا به‌وسیله‌ی باکتری‌های

1 . Gas Chromatography-Mass Spectroscopy (GC-MS)
2. 2, 2- Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
3. Attenuated total reflection (ATR)
4. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)
5. Dimethyl sulfoxide (DMSO)

پروبیوتیک مورداستفاده قرار گیرد. درصد هیدرولیز محاسبه‌شده برای پلی‌ساکارید بلوط و اینولین (In) به‌عنوان پری‌بیوتیک شاخص تجاری در سه مرحله هضم در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- میزان هیدرولیز پلی ساکارید بلوط و اینولین در شرایط هضم شبیه‌سازی‌شده

Table 1- Degree of hydrolysis of acorn polysaccharide (AP) and inuline (In) in the simulated digestion conditions

مراحل هضم Digestion steps	میزان هیدرولیز پلی ساکارید بلوط (٪) Acorn Polysaccharide (AP) Hydrolysis (%)	میزان هیدرولیز اینولین (٪) Inulin Hydrolysis (%)
مرحله ۱ Step1	^{b} 0.1±1.33	0.78 ^{a}± 15.58
مرحله ۲ Step2	0.14± 0.03 ^{b}	0.3 ^{a}± 1.7
مرحله ۳ Step3	0.78± 0.04 ^{a}	0.81±0.03 ^{a}

داده‌ها میانگین حاصل از سه تکرار، حروف متفاوت در هر مرحله بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد است.

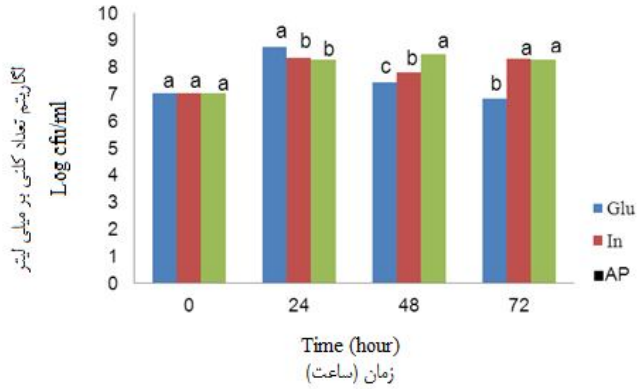
The values are average of triplicate analyses, and different letters indicate significant differences in the same digestion step ($p<0.01$)

بیشترین مقدار تجزیه و هیدرولیز در هر دو ترکیب در مرحله اول هضم یعنی شرایط شبیه‌سازی‌شده معده اتفاق افتاده است (جدول ۱). پلی ساکارید بلوط با حدود ۱/۳۳ درصد تجزیه مقاوم‌ترین ترکیب نسبت به شرایط شبیه‌سازی‌شده هضم معدی بوده که در مقایسه با اینولین (به‌عنوان پری‌بیوتیک شاخص تجاری) برتری چشمگیری نشان داد (جدول ۱). در پژوهش ویچنکات و همکاران (۲۰۱۰) پیرامون بررسی ویژگی‌های پری‌بیوتیکی الیگوساکاریدهای استخراجی از پیتایا[1]، بیشترین مقدار هیدرولیز در pH یک و زمان یک ساعت روی‌داده و پس از آن هیدرولیز تقریباً ثابت بوده است (۲۷). همچنین مقاومت اینولین به pH یک در مقایسه با پری‌بیوتیک مورد بررسی ضعیف گزارش‌شده است (۲۷). در پژوهش حاضر نیز بیشترین هیدرولیز در مرحله اول هضم مشاهده شد و در دو مرحله دیگر ترکیبات موردبررسی تفاوت چشمگیری نشان ندادند.

نتایج پژوهش محققین در این زمینه نشان می‌دهد با توجه به تفاوت ساختاری ترکیبات جداشده از منابع مختلف (۲۶) و همچنین نوع روش استفاده شده مقاومت به هضم می‌تواند بسیار متغیر باشد (۵، ۲۶، ۲۷). در برخی پژوهش‌های انجام‌شده اثر زمان و pHهای مختلف به‌عنوان شاخص‌های مؤثر بر هضم‌پذیری ارزیابی‌شده است. ولی در پژوهش حاضر شرایط هضم مشابه هضم انسانی از لحاظ pH و زمان به‌طور ثابت اجراشده است. لذا مقایسه نتایج این پژوهش با سایر موارد به‌طور کامل امکان‌پذیر نیست. با توجه به اینکه در مورد مقاومت به هضم پلی ساکارید بلوط هیچ اطلاعی در دست نیست، برای اطمینان از صحت نتایج و مقایسه‌ی مقاومت به هضم ترکیب موردبررسی، اینولین به‌عنوان پری‌بیوتیک شاخص (کنترل مثبت) در شرایط یکسان آزمایشی به‌طور همزمان مورد ارزیابی قرار گرفت. در پژوهش انجام‌شده پیرامون پلی‌ساکارید استخراجی از بامبو مقاومت به هضم بالای ۹۹ درصدی در فرایند شبیه‌سازی‌شده‌ی هضم گوارشی گزارش‌شده است (۵). در بررسی مقاومت به هضم پلی‌ساکاریدهای استخراجی از منابع مختلف گیاهی تایلند بسته به تفاوت‌های ساختاری و نوع منبع استخراج محدوده‌ی مقاومت به هضم در شرایط شبیه‌سازی‌شده‌ی معده و روده بین ۳۳ تا ۹۸ درصد متغیر بود (۲۶).

1. Pitaya

در مرحله دوم باهدف بررسی قابلیت پری‌بیوتیکی پلی ساکارید بلوط، اثر آن‌ها بر تحریک رشد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم A7* مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی محیط حاوی پلی ساکارید بلوط پس از ۲۴ ساعت نشان داد، این باکتری قابلیت متابولیزه کردن ترکیبات استخراج‌شده از بلوط را داشته؛ به‌طوری‌که جمعیت آن نسبت به لحظه صفر افزایش فراوانی نشان داده است (شکل ۱).



شکل ۱- شمارش میکروبی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A7 در حضور پلی ساکارید بلوط، اینولین و گلوکز

Figure 1- Microbial counts of *L. plantarum* A7 in the presence of acorn polysaccharides (AP), In (inulin), and Glu (glucose) as carbon sources

در پژوهش‌های مختلف انجام‌شده پیرامون اثبات قابلیت پری‌بیوتیکی یک ترکیب اثر تحریک‌کنندگی رشد از زمان صفرتا ۲۴ یا ۴۸ ساعت مورد ارزیابی قرارگرفته است. مثلاً در بررسی انجام شده بر قابلیت پری‌بیوتیکی پلی‌ساکاریدهای استخراجی از آگار و آلژینات اثر تحریک‌کنندگی رشد روی بیفیدوباکتریوم پس از ۲۴ ساعت مورد ارزیابی قرارگرفته است (۲۱). به‌منظور ارزیابی خاصیت پری‌بیوتیکی اولیگوساکاریدهای استخراج‌شده از پیتایا اثر تحریک‌کنندگی رشد پس از ۴۸ ساعت بر گونه *لاکتوباسیلوس دلبروکی* گزارش‌شده است (۲۷)؛ به‌عبارت‌دیگر جمعیت لحظه صفر نسبت به ۴۸ ساعت بعد مورد مقایسه قرارگرفته است. با توجه به تفاوت ساختاری و مقاومت به هضم مختلف ترکیبات استخراج‌شده، تفاوت محیط‌های کشت بررسی‌شده به لحاظ اجزای تشکیل‌دهنده و ظرفیت بافری آن‌ها، تفاوت گونه‌های پروبیوتیک به لحاظ رفتار و قابلیت‌های متابولیکی، تفاوت دوره‌ی زمانی رشد و غلظت‌های مختلف ترکیب پری‌بیوتیک، نمی‌توان روند مشخصی برای مقایسه یک ترکیب استخراج‌شده جدید با پژوهش‌های قبلی پیدا کرد (۵). با توجه به تأیید قابلیت پری‌بیوتیکی پلی ساکارید بلوط، اثر آن برافزایش زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم A7* پس از ۲۴ ساعت در مقایسه با اینولین و گلوکز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد جمعیت *لاکتوباسیلوس پلانتاروم A7* در محیط حاوی پلی ساکارید بلوط حتی پس از ۷۲ ساعت ثبات فراوانی در مقایسه با محیط حاوی گلوکز دارد (شکل ۱). به‌لحاظ این ویژگی نیز پلی ساکارید بلوط رفتاری مشابه با اینولین نشان داده است. در بررسی قابلیت پری‌بیوتیکی پلی‌ساکاریدهای استخراج‌شده از گیاه بامبو بر باکتری‌های پروبیوتیک افزایش زنده‌مانی تا بیش از ۴۸ ساعت گزارش گردیده است (۵).

اثر پری‌بیوتیک‌های جداشده بر تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیر: در این پژوهش تولید اسیدهای

چرب کوتاه زنجیر به‌وسیله باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم *A7* در محیط حاوی پلی ساکارید بلوط و اینولین مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲).

جدول ۲- اسیدهای چرب کوتاه زنجیر تولید شده در محیط حاوی پلی‌ساکاریدهای بلوط و پری‌بیوتیک تجاری اینولین

Table 2- Short chain fatty acid (SCFA) concentration in Acorn Polysaccharide (AP) and Inuline-supplemented media

نمونه Sample	اسید بوتیریک Butyric acid	اسید پروپیونیک Propionic acid	اسید استیک Acetic acid	اسید کاپروئیک Caproic acid
محیط حاوی پلی ساکارید بلوط (Acorn Polysaccharide supplemented medium)	trace	0.13 mM	25.28 mM	trace
محیط حاوی اینولین (Inuline supplemented medium)	1.82 mM	1.11 mM	10.73 mM	0.44 mM

همان‌طور که مشاهده می‌شود اسید غالب تولیدشده در محیط کشت حاوی پلی ساکارید بلوط اسید استیک است. ضمن اینکه در محیط حاوی پلی ساکارید بلوط، اسید پروپیونیک نیز مشاهده شد. یکی از مکانیسم‌های مرتبط با اثرات سلامتی بخش پری‌بیوتیک‌ها بر سلامتی انسانی به تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیر و اثر آن بر سالم‌سازی محیط کولون بر می‌گردد. اسیدهای چرب کوتاه زنجیر با کاهش pH کولون و مهار رشد باکتری‌های مضر و پروتئولیتیک و در نتیجه ممانعت از تولید متابولیت‌های آمینی و ازته‌ی سرطان‌زا به ایجاد محیطی پاک و سالم در کولون کمک می‌کنند. همچنین کاهش pH کولون با افزایش جذب مواد معدنی مانند کلسیم و منیزیم، کاهش جذب آمونیاک و ترکیبات آمینی دیگر و کاهش حلالیت نمک‌های صفراوی مرتبط است (۲۲). در این پژوهش در محیط حاوی اینولین، اسید پروپیونیک و اسید بوتیریک به مقدار کم مشاهده شد. تولید اسید پروپیونیک و اسید بوتیریک مطابق گزارش برخی محققین می‌تواند اثرات سلامتی بخش به دنبال داشته باشد. تولید اسید پروپیونیک به دلیل ایجاد ممانعت در فرایند سنتز کلسترول کبدی و درنتیجه کاهش کلسترول جالب توجه است. اسید بوتیریک نیز به‌عنوان منبع انرژی به‌وسیله سلول‌های پوششی روده مصرف‌شده و اثرات ضد سرطانی آن گزارش‌شده است (۲۵). در بررسی انجام‌شده بر پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از قارچ‌های دارویی و اثر آن بر تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیر به‌وسیله لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتر مشخص‌شده که اسید استیک به‌عنوان اسید غالب بوده و مقادیر بسیار کم اسید پروپیونیک و اسید بوتیریک نیز تولیدشده است. لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتر عمدتاً اسیدلاکتیک و اسید استیک تولید می‌کنند. مطابق نظر برخی محققین، دلیل عدم مشاهده اسیدلاکتیک در چنین محیط‌هایی به محدودیت منبع کربن یا عدم حضور منابع کربنی ساده مرتبط است که در نتیجه اسیدلاکتیک به‌عنوان یک محصول حد واسط در سیستم بسته مصرف می‌شود (۷). در بررسی میزان اسیدهای چرب کوتاه زنجیر تولیدی به‌وسیله باکتری‌های کولون در حضور بتاگلوکان یولاف، نسبت تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیر استات، پروپیونات، بوتیرات به‌صورت ۳۹:۲۷:۳۴ گزارش‌شده است (۷). در واقع میزان تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیر بسته به نوع گونه‌های

میکروبی، اثر ارتباطات میکروبی در کشت‌های مختلط و ترکیب شیمیایی کربوهیدرات‌ها (نوع منوساکاریدهای تشکیل‌دهنده، نوع پیوند و درجه شاخه‌دار بودن) می‌تواند متغیر باشد (۲۵).

بررسی ارتباط فعالیت آنتی‌اکسیدانی با ویژگی‌های ساختمانی و قابلیت پری‌بیوتیکی: جهت بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی ساکارید بلوط، از روش به دام اندازی رادیکال ۲،۲-دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل به‌عنوان روش گسترده و مناسب ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی استفاده‌شده است (۱۳). ۲،۲-دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل یک رادیکال آزاد است که بیشترین جذب را در ۵۱۷ نانومتر از خود نشان می‌دهد. هر ترکیبی که بتواند یک هیدروژن به آن بدهد، از حالت رادیکالی خارج‌شده، به فرم پایدار تبدیل می‌شود و این مسئله با تغییر رنگ محلول ۲،۲-دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل و تغییر جذب آن مشخص می‌شود (۲۸). همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود پلی ساکارید بلوط فعالیت آنتی‌اکسیدانی مطلوبی در غلظت مورد بررسی نشان داده است.

جدول ۳- فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره بلوط (پلی ساکارید بلوط)

Table 3- Antioxidant activity of acorn polysaccharide (AP)

ترکیب Compound	فعالیت آنتی‌اکسیدانی (٪) Antioxidant activity (%)
پلی ساکارید بلوط در غلظت ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر Acorn Polysaccharide (20 mg/ml)	69.94± 1.35
پلی ساکارید بلوط در غلظت ۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر Acorn Polysaccharide (40 mg/ml)	82.24±1.78
پلی ساکارید بلوط در غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار Acorn Polysaccharide (1000 µM)	96±1

فعالیت مطلوب آنتی‌اکسیدانی بلوط در بررسی‌های متعدد محققین گزارش شده است (۶، ۲۰). اما در این پژوهش ارتباط فعالیت آنتی‌اکسیدانی با ویژگی‌های ساختمانی و قابلیت پری‌بیوتیکی نیز مدنظر بود. برای مشخص نمودن گروه‌های عاملی در ساختار پلی‌ساکارید بلوط از طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه و رزونانس مغناطیس هسته‌ای استفاده شده است. طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوریه (شکل ۲-الف) باندهای جذبی شاخص مرتبط با حضور پلی‌ساکاریدها را نشان می‌دهد.

باندهای جذبی شاخص برای تفسیر پلی‌ساکاریدها و باندهای مشاهده شده برای پلی ساکارید بلوط در جدول ۴ ارائه شده است. در بررسی‌های انجام شده پیرامون پلی‌ساکاریدهای استخراج‌شده از منابع گیاهی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با ویژگی‌های ساختاری از جمله حضور گروه‌های سولفات، کربونیل و کربوکسیل مرتبط بوده است (۱۰، ۲۸). در طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوریه وجود باند در ناحیه ۱۲۶۰-۱۲۴۰ و ۱۷۴۲ برسانتی‌متر به‌ترتیب معرف حضور گروه سولفات و کربونیل است (۱۹، ۲۰).

جدول ٤- شناسایی ساختاری پلی ساکارید بلوط

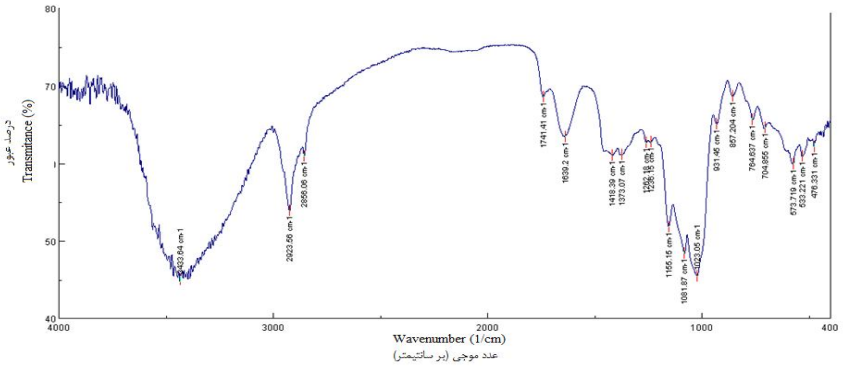
Table 4- Structural identification of acorn polysaccharide (AP)

باندهای پلی ساکارید بلوط Acorn Polysaccharide Bands	باندهای اختصاصی پلی‌ساکاریدها Specific bands of polysaccharides
931, 857 cm^{-1}	750-950 cm^{-1}
1155, 1081, 1023 cm^{-1}	1000-1200 cm^{-1}
1418, 1373, 1262, 1236 cm^{-1}	1200-1500 cm^{-1}
2923 cm^{-1}	2923 cm^{-1}

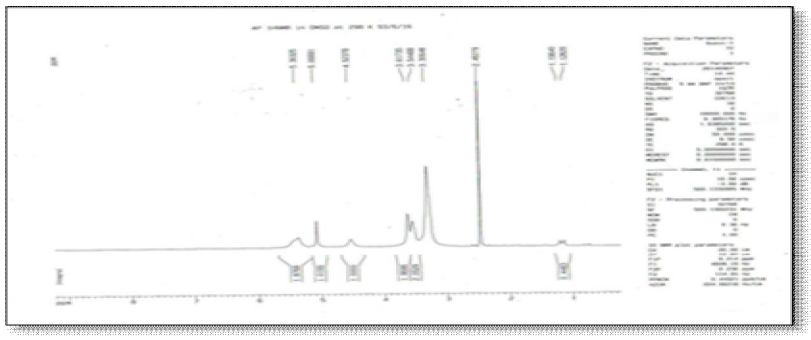
از طرفی در بررسی پلی‌ساکارید جداشده از گیاهان خانواده ارکیده، حضور پیوندهای بتا در ساختار پلی‌ساکارید با فعالیت آنتی‌اکسیدانی مرتبط دانسته شده است. در طیف به‌دست‌آمده برای پلی ساکارید بلوط باند جذبی در عدد موجی ۹۳۱ بر سانتی‌متر معرف حضور پیوندهای بتا است که

می‌تواند بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی مطلوب آن اثرگذار باشد (۱۳).

برای تأیید ویژگی‌های ساختاری مذکور، طیف رزونانس مغناطیس هسته‌ای مربوط به پلی ساکارید بلوط نیز در شکل ۲- ب به نمایش درآمده است. سیگنال‌های پروتون پلی‌ساکاریدها در ناحیه ۵/۵-۳/۵ قابل مشاهده است. رزونانس‌های پروتون مرتبط با وضعیت آنومریک در ناحیه ۵/۵-۴/۵ تأیید می‌شوند. سیگنال‌های مربوط به پلی ساکارید بلوط در قسمت ۴/۵ مرتبط با وضعیت بتا و سیگنال‌های ۵/۰۶ و ۵/۳۶ مرتبط با وضعیت آلفا است (۳). این نتایج با نتایج حاصل از تفسیر طیف مادون‌قرمز تبدیل فوریه پلی ساکارید بلوط هم‌خوانی داشته و تأییدکننده وضعیت ساختاری تفسیر شده است.



A



B

شکل ۲- طیف مادون قرمز تبدیل فوریه (a)، طیف رزونانس مغناطیس هسته‌ای (b) پلی‌ساکارید بلوط

Figure 2- FTIR spectra for acorn polysaccharide (AP) (a) The ^{1}H NMR for AP (b)

در بخش دوم پژوهش ارتباط فعالیت آنتی‌اکسیدانی با قابلیت پری‌بیوتیکی پلی ساکارید بلوط مورد بررسی قرارگرفته است. اثرات سلامتی بخش ترکیبات پری‌بیوتیک و آنتی‌اکسیدان در برخی پژوهش‌ها به‌طور همزمان و در سایر موارد جداگانه گزارش‌شده است. در پژوهش انجام‌شده پیرامون قابلیت پری‌بیوتیکی الیگوساکاریدهای جداشده از ضایعات فراوری سس سویا، علیرغم فعالیت پری‌بیوتیکی مطلوب، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسیار ضعیف بوده و فعالیت پری‌بیوتیکی الیگوساکاریدهای بررسی‌شده غیر مرتبط با فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها بوده است (۲۸). در پژوهشی دیگر، فعالیت پری‌بیوتیکی عصاره محلول استخراج‌شده از چای سبز با فعالیت آنتی‌اکسیدانی مرتبط گزارش‌شده است (۱۷). در این پژوهش بر نقش آنتی‌اکسیدانی ترکیبات موجود در عصاره چای سبز جهت مهار تنش‌های اکسیداتیو و افزایش زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدان و درنتیجه بهبود فعالیت پری‌بیوتیکی تأکید شده است (۱۷)؛ به‌عبارت‌دیگر رفع

تنش‌های اکسیداتیو و ایجاد شرایط بهینه برای رشد یکی از دلایل افزایش زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در حضور ترکیبات پری‌بیوتیک با فعالیت آنتی‌اکسیدانی مطلوب است.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد ترکیبات جداشده از بلوط (پلی ساکارید بلوط) با توجه به دارا بودن مقاومت به هضم مطلوب و توانایی تحریک رشد پروبیوتیک موردبررسی (*لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A7)، پتانسیل استفاده به‌عنوان ترکیب پری‌بیوتیک را دارند. همچنین ترکیبات جداشده فعالیت آنتی‌اکسیدانی مناسبی در غلظت‌های مورد بررسی نشان می‌دهند که این امر امکان کاربرد آن را در محصولات فراسودمند فراهم می‌سازد. به نظر می‌رسد یکی از مکانیسم‌های افزایش زنده‌مانی پروبیوتیک‌های مورد بررسی در حضور ترکیبات جداشده از بلوط ارتباط فعالیت آنتی‌اکسیدانی و خصوصیت پری-بیوتیکی پلی ساکارید بلوط است. اگرچه این موضوع مستلزم انجام مطالعات درون‌تنی برای تأیید خصوصیت پری‌بیوتیکی و بررسی دقیق مکانیسم‌های افزایش زنده‌مانی پروبیوتیک در حضور ترکیب مورد بررسی است. با توجه به پتانسیل پری‌بیوتیکی ترکیبات جداشده، فراوانی بلوط در کشور، تنوع خصوصیات عملکردی پری‌بیوتیک‌ها و قیمت بالای پری‌بیوتیک‌های وارداتی به نظر می‌رسد می‌توان بلوط را به‌عنوان منبع مناسب جهت استخراج ترکیبات فراسودمند در نظر گرفت.

منابع

1.Biedrzycka, E., and Bielecka, M. 2004. Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. Trends in Food Science and Technology. 15: 170–175.

2.Cai, W., Gu, X., and Tang, J. 2008. Extraction, purification and characterization of the polysaccharides from *Opuntia milpa alta*. Carbohydrate Polymer. 71: 403-410.

3.Ding, X., Feng, S., Cao, M., Li, M., Tang, J., Guo, C., Zhang, J., Sun, Q., Yang, Z., and Zhao, J. 2010. Structure characterization of polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Tricholomamatsutake*. Carbohydrate Polymer. 81: 942–947.

4.Ebrahimi, A., Khayami, M. and Nejati, V. 2012. Comparison of antibacterial effects of different parts of *Quercus persica* against *Escherichia Coli* O157:H7. Journal of Gonabad University of Medical Science. 18: 1. 11-18. (In Persian)

5.Firdaus, A., Nurul Azmi, M., Mustafa, S., Hashim, D., and Abdul-Manap, Y. 2012. Prebiotic activity of polysaccharides extracted from *Gigantochloa Levis* (Buluh beting) shoots. Molecules. 17: 1635-1651.

6.Ghaderi Ghahfarokhi, M., Sadeghi Mahoonak, A. R., Alami, M., Azizi, M. H. and Ghorbani, M**.** 2012**.** Study on antioxidant activities of phenolic extracts from fruit of a variety of Iranian Acorn (*Q. castaneifolia var castaneifolia*). Journal of Food Science and Technology. 35: 9.45-56. (In Persian)

7.Gao, Sh., Lai, C., and Cheung, P. 2009. Nondigestible carbohydrate isolated from medicinal mushroom *Sclerotia* as novel prebiotics. International Journal of Medical Mushrooms. 11: 1-8.

8.Jahanbin, K., Moini, S., Gohari, A., Emam-Djomeh, Z., and Masi, P. 2012. Isolation, purification and characterization of a new gum from *Acanthophyllum bracteatum* roots. Food Hydrocolloid. 27: 14-21.

9. Jain, S. K., Jain, A., Gupta, Y., and Ahirwar, M. 2007. Design and development of hydrogel beads for targeted drug delivery to the colon. American Association of Pharmaceutical Scientist. 8: 1-8.

10.Jiao, G., Yu, G., Zhang, J., and Stephen Ewart, H. 2011. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. Drugs. 9: 196-223.

11. Kukkonen, K., Savilahti, E., Haahtela, T., Juntunen-Backman, K., Korpela, R., Poussa, T., Tuure, T., and Kuitunen, M. 2007. Probiotics and prebiotic galactooligosaccharides in the prevention of allergic diseases: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 11: 192-198.
12. Liu, J., Miao, S., Wen, X., and Sun, Y. 2009. Optimization of polysaccharides (ABP) extraction from the fruiting bodies of *Agaricus blazei Murill* using response surface methodology (RSM). Carbohydrate polymer. 78: 704-709.
13. Luo, A., He, X., Zhou, S., Fan, Y., and Chun, Z. 2010. Purification, composition analysis and antioxidant activity of the polysaccharides from *Dendrobium nobile Lindl*. Carbohydrate Polymer. 7: 1014–1019.
14. Miles, A., and Misra, S.S. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. Journal of Hygiene. 38: 732-749.
15. Mirlohi, M., Soleimanian- zad, S., Dokhani, S., and Sheikh-Zeinoddin, M. 2008. Identification of *Lactobacilli* from Fecal Flora of Some Iranian Infants. Iranian Journal of Pediatrics. 18: 357-363.
16. Mirlohi, M., Soleimanian- zad, S., Dokhani, S., Sheikh-Zeinoddin, M., and Abghari, A. 2009. Investigation of acid and bile tolerance of native *Lactobacilli* isolated from fecal samples and commercial probiotics by growth and survival studies. Iranian Journal of Biotechnology. 7: 233- 240.
17. Molan, A.L., Flanagan, J., Wei, W.P., and Moughan, J. 2009. Selenium-containing green tea has higher antioxidant and prebiotic activities than regular green tea. Food Chemistry. 114: 829–835.
18. Norajit, K., Kim, K., and Ryu, G.H. 2010. Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. Journal of Food Engineering. 98: 377–384.
19. Pereira, L., Amado, A., Critchley, A., Velde, F., and Ribeiro-Claro, P. 2009. Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman). Food Hydrocolloid. 23: 1903–1909.
20. Popovi, B.M., Stajner, D., Zdero, R., Orlovi, S., and Gali, Z. 2013. Antioxidant characterization of oak extracts combining spectrophotometric assays and chemometrics. The Scientific World Journal. 1-8.
21. Ramnani, P., Chitarraria, R., Tuohya, K., Grant, J., Hotchkiss, S., Philp, K., Campbell, R., Gill, C., and Rowlanda, I. 2011. In vitro fermentation and prebiotic potential of novel low molecular weight polysaccharides derived from agar and alginate seaweed. Anaerobe. 1-6.
22. Saad, N., Delatte, C.M. Urdaci, J.M., and Bressollier, P. 2013. An overview of last advances in probiotic and prebiotic field. LWT- Food Science and Technology. 50: 1-16.
23. Saffarzadeh, A., Vincze, L., and Csapo, J. 1999. Determination of the chemical composition of acorn (*Quercus branti*), pistaciaatlantica, pistaciakhinjuk seeds as non-conventional feedstuffs. Acta agrarian kaposvariensis. 3: 59-69.
24. Wang, Y. 2009. Prebiotics: Present and future in food science and technology. Food Research International. 42: 8–12.
25. Wang, Y., Han, F., Hu, B., Li, J., and Yu, W. 2006. In vivo prebiotic properties of alginate oligosaccharides prepared through enzymatic hydrolysis of alginate. Nutrition Research. 26: 597-603.
26. Wichienchot, S., Thammarutwasik, P., Jongjareonrak, A., Chansuwan, W., Hmadhlu, Hongpattarakere, P., Itharat, A., and Ooraikul, B. 2011. Extraction and analysis of prebiotics from selected plants from southern Thailand. Songklanakarin. Journal of Science and Technology. 33: 517-523.
27. Wichienchot, S., Jatupornpipat, M., and Rastall, R. A. 2010. Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. Food Chemistry. 120: 850–857.
28. Yang, B., Prasad, K., Haihui, X., Lin, S., and Jian, Y. 2011. Structural characteristics of oligosaccharides from soy sauce lees and their potential prebiotic effect on lactic acid bacteria. Food Chemistry.126: 590–594.

EJFPP, Vol. 9 (1): 53-66
http://ejfpp.gau.ac.ir

Evaluation of prebiotic activity of polysaccharides extracted from acorn

M. Tadayoni[1*], M. Sheikh-Zeinoddin[2] and S. Soleimanian-Zad[3]
[1] Department of Food Science and Technology, Ahvaz Branch, Islamic Azad University Ahvaz, Iran.
[2]Associate Professor, Department of Food Science, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
Received: 2016/06/28; Accepted: 2016/12/27

Abstract

Background and objectives: It is well accepted that modulation of intestinal microflora could be helpful in the prevention of chronic diseases, including obesity and related disorders such as type 2 diabetes. Prebiotics are non-digestible food ingredients that beneficially affects the host heath by selectively stimulation of the growth and / or activity of probiotics in the large intestine. Some health benefits includes better immune response, effect on mineral absorption, reduction in incidence of cancers, reduced risk of infection and diarrhea, reduction in incidence of intestinal and cardiovascular diseases, non-insulin dependent diabetes, obesity and osteoporosis. The aim of this study was to evaluate the prebiotic potential and antioxidant activity of polysaccharides isolated from acorn fruit (AP), and its structural and functional properties.

Materials and methods: AP was extracted from acorn fruit after defatting, extraction by hot water and precipitation with ethanol. Then *in vitro* resistance of AP to acidic and enzymatic digestion was evaluated. In the second step, the effect of AP on probiotic (*Lactobacillus plantarum* A7) growth was studied in comparison to commercial prebiotic inulin. The short chain fatty acids (SCFA) or the fermentation end products in AP and inulin supplemented media fermented with probiotic (*L. plantarum* A7) were analyzed using gas chromatography- mass spectrometry (GC/MS). The antioxidant activity of AP was evaluated by DPPH scavenging ability. FTIR spectroscopy and NMR were used to study structural properties and to identify the functional groups of AP.

Results: AP showed that it was resistant to hydrolysis by simulated human gastric juice, giving maximum hydrolysis of 3%. AP was also found to be capable of stimulating the growth and enhancing the viability of studied probiotic (*L. plantarum* A7). The short chain fatty acids profile in AP- and inulin-supplemented media was dominated by acetic acid, followed by minor amounts of propionic acid and butyric acid in AP- and inulin-supplemented media, respectively. AP scavenged DPPH radicals by 69.9 and 82.2 at 20 mg/ml and 40 mg/ml, respectively. Characteristic bands related to antioxidant capability including carboxyl, sulphate and β-glycosidic linkages were observed in IR and NMR spectra of AP**.**

Conclusion: In overall, this study revealed that the AP can be used as a promising prebiotic. Our results showed that high antioxidant activity of AP and its prebiotic potential seems to be related. Because of increasing demand for prebiotics and high price of commercially available prebiotics, acorn could be a potential source of prebiotic compounds which may be used in functional food and healthier products.

***Keywords*:** Acorn, Antioxidant activity, Functional food, Prebiotic

[*] Correspondng author: m.t.tadayoni@gmail.com