Study of the effectiveness of citrus pectin as a prebiotic

Dr. Dima Al-Diab*
Dr. Balssam Jreikous**
Nada Mouhammad***

(Received 8 / 4 / 2024. Accepted 15 / 5 / 2024)

□ ABSTRACT □

Plants and their products are a rich source of many compounds used in various pharmaceutical, food and pharmaceutical industries. Pectin, which is a structural polysaccharide in plants, is gaining increasing importance because of its multiple uses and benefits. However, in recent years, focus has been placed on the use of pectin as a prebiotic and its ability to modify intestinal microbial growth. This study aims to study the prebiotic effectiveness of pectin extracted from griffon and compare it with commercial pectin at two concentrations of 0.5% and 1%. The study found that pectin plays an important role as a prebiotic compared to a negative control that does not contain pectin, meaning that it enhances bacterial growth of the Lactobacillus species, and that an increase in the concentration of added pectin leads to an increase in bacterial growth.

Keywords: Pectin, Grapefruit ,Probiotic, Prebiotic, Lactobacillus

Copyright **:**Tishreen University journal-Syria, The authors retain the copyright under a CC BY-NC-SA 04

*Associate Professor – Analytical and Food Chemistry Department, Faculty of Pharmacy, Tishreen University, Lattakia, Syria. E.mail: dyabdima@yahoo.com dimaaldyab@tishreen.edu.sy
**Assistant professor,Department of Botany , FacultyofSciences , Tishreen University , Lattakia , Syria
***Postgraduate Student– Analytical and Food Chemistry Department, Faculty of Pharmacy, Tishreen University, Lattakia, Syria. E.mail:nada.mouhammad@tishreen.edu.sy

دراسة فعالية بكتين الحمضيات كبريبيوتيك

د.ديمة الدياب*
د. بلسم جريكوس**
ندى محمد***

(تاريخ الإيداع 8 / 4 / 2024. قبل للنشر في 15 / 5 / 2024)

□ ملخّص □

تعد النباتات ومنتجاتها مصدراً غنياً بالعديد من المركبات المستخدمة في شتى الصناعات الدوائية والغذائية والصيدلانية، يكتسب البكتين وهو عديد سكاريد هيكلي في النباتات أهمية متزايدة لما له من استخدامات وفوائد متعددة إلا أنه في السنوات الأخيرة تم التركيز على استخدام البكتين كبريبيوتيك وقدرته في تعديل النمو الميكروبي المعوي. تهدف هذه الدراسة إلى دراسة فعالية البكتين المستخلص من الغريفون كبريبيوتيك ومقارنته مع بكتين تجاري بتركيزين 0.5% و1%. وجدت الدراسة أن البكتين يلعب دور هام كبريبيوتيك مقارنة مع شاهد سلبي لا يحوي بكتين أي أنه يعزز النمو الجرثومي لنوع العصيات اللبنية وأن الزيادة في التركيز للبكتين المضاف تؤدي لزيادة في النمو الجرثومي.

الكلمات المفتاحية: البكتين، الغريفون، بريبيوتيك، بروبيوتيك، العصيات اللبنية.

حقوق النشر :مجلة جامعة تشرين- سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص CC BY-NC-SA 04

* أستاذ مساعد، قسم الكيمياء التحليلية والغذائية، كلية الصيدلة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية dimaaldyab@tishreen.edu.sy
**مدرس، قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة تشرين اللاذقية، سورية.
***طالبة ماجستير، قسم الكيمياء التحليلية والغذائية، كلية الصيدلة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية. nada.mouhammad@tishreen.edu.sy

مقدمة

يعتبر البكتين مصطلح عام يشير إلى مجموعة من البوليمرات الطبيعية التي تتواجد على شكل مواد بنيوية في جميع النباتات، كما يُعتبر جزءاً من النظام الغذائي الطبيعي للإنسان.

البكتين بنيوياً هو عبارة عن عديد سكاريد غير متجانس هيكلي موجود في جدران الخلايا الأولية تم عزله ووصفه لأول مرة في عام 1825 من قبل هنري براكانوت، ويتكون من وحدات حمض الغالاكتورونيك المتصلة بروابط من نمط α(1−4) [1] [2] .

يتم الحصول على البكتين التجاري من مصادر مختلفة مثل ثفل التفاح وقشور الحمضيات بحيث تعتبر الأنسجة البيضاء المتوضعة بين القشرة القاسية الخارجية ولب الثمرة أو ما يسمى بالالبيدو وهي تعتبر مصادر غنية بالبكتين، يتم استخلاصه بطرق مائية تحت ظروف حمضية معتدلة، بحيث يسوق تجارياً على شكل مسحوق أبيض إلى بني فاتح [3] [4].

يعد البكتين من الكربوهيدرات الغير قابلة للهضم، ويُتوسط تحلله في الجهاز الهضمي للإنسان جزء صغير من الميكروبات الموجودة في الأمعاء. حيث يتم الاستفادة من الظروف اللاهوائية في الأمعاء في تعزيز عمليات التحلل والتخمر الغير مكتملة، مما يؤدي إلى إنتاج منتجات نهائية مثل الأحماض الدهنية قصيرة السلسلة (SCFA) Short-chain Fatty Acid. وبهذا الشكل، يشترك البكتين ومنتجات تحلله الجزئي والكامل في تفاعلات ووظائف متعددة مع الخلايا البشرية في الجهاز الهضمي، بما في ذلك الوظائف الفزيولوجية والمناعية. أظهرت الأبحاث أن البكتين يلعب دوراً مهماً في الوقاية من التهاب الأمعاء، والتعديل المناعي، والتفاعلات بين العوامل الغذائية والدوائية [5].

تسهم كل من الألياف الغذائية الغير قابلة للذوبان (مثل السللوز، الهيمسللوز، الليغنن) والقابلة للذوبان(مثل البكتين) في الفوائد الصحية بحيث يكملان بعضهما البعض، وبشكل عام يعتبر أن الفوائد الصحية للبكتين تنشأ من دوره كألياف غذائية قابلة للذوبان[6].

تظهر الدراسات بوضوح أن تناول كميات كبيرة من الألياف يرتبط بمعدلات أقل لأمراض القلب والأوعية الدموية، في حين البيانات المتعلقة بالسكري والسمنة والسرطان فهي أكثر تبايناً. من المهم استهلاك الألياف من مجموعة متنوعة من المصادر خاصة أن تناول الألياف في جميع أنحاء العالم أقل من نصف المستويات الموصى بها [7]. بناء عليه فقد قامت العديد من الدراسات بإضافة الألياف الغذائية إلى عدد من من الأغذية مثل الحليب ومشتقاته وعصائر الفواكه سعياً للوصول إلى الوارد المنصوح به من الألياف[8، 9]. ولقد أدى تدعيم هذه الأغذية التقليدية بالألياف ومنها البكتين إلى جعلها ترقى لمرتبة الأغذية الوظيفية[10].

يمكن تعريف الغذاء الوظيفي بأنه أي طعام له تأثير إيجابي على صحة الفرد أو أدائه البدني أو حالته العقلية، بالإضافة إلى قيمته الغذائية. يتم الحصول على الأطعمة الوظيفية من مواد طبيعية، ولا يتم تناولها بشكل كبسولات أو أقراص، بل تُستهلك كجزء من النظام الغذائي[11].

العديد من المنتجات الثانوية النباتية غنية بالبكتين، وقد تكون مفيدة كبريبيوتيك، نظراً لأن الجزيئات البكتينية معقدة وغير متجانسة، فإن أجزاء مختلفة من البكتين قد تمارس فعاليات مختلفة كبريبيوتيك و/أو وظائف أخرى داعمة للصحة [12]

ظهرت 3 أدوات لتعديل الفلورا المعوية وهي إضافة الكائنات الحية الدقيقة الخارجية إلى الأطعمة (البروبيوتيك) أو التحفيز الانتقائي لنمو ونشاط الكائنات الحية الدقيقة الموجودة في الجهاز الهضمي (البريبيوتيك)، أو مزيج بين السابقين وتسمى ب Synbiotics [13].

عام 2007 عرف الاجتماع الفني لمنظمة الأغذية والزراعة بشأن البريبيوتيك بأنه مصطلح "غذاء غير قابل للحياة"، وهو المكون الذي يمنح فائدة صحية للمضيف مرتبطة بتعديل الفلورا المعوية[14]. أما البروبيوتيك فقد تم تعريفها من قبل منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة FAO ومنظمة الصحة العالمية WHO هو"الكائنات الحية الدقيقة التي عند تناولها بكميات كافية تمنح فائدة صحية للمضيف[15].

هناك أدلة على أن الأطعمة الغنية بالبكتين، مثل التفاح، يمكن أن تعدل تكوين الكائنات الحية الدقيقة في الأمعاء لدى البشر، وقد أرجع بعض الباحثين هذا التأثير إلى وجود البكتين. أثبت شينوهارا وزملاؤه أن سلالات الشّقاء، والعصيات اللبنية، والمكورات المعوية، و*Bacteroides* تستقلب بكتين التفاح. أيضاً، عندما تم تحضين عينات البراز مع بكتين التفاح، زادت أعداد البكتيريا *Bifidobacterium* و*Lactobacillus* زيادة كبيرة [15].

أهمية البحث وأهدافه

أهمية البحث

تأتي أهمية هذا البحث نتيجة ل:

- الفوائد العديدة للبريبيوتيك بما فيها البكتين وضرورة إدخاله للنظام الغذائي.
- تنوع مصادر البكتين بحيث يمكن الاستفادة من نفايات الحمضيات كمصدر له.

أهداف البحث

دراسة فعالية البكتين الطبيعي المستخلص من نفايات الحمضيات كبريبيوتيك على جراثيم مسوقة تجارياً وهي من نوع العصيات اللبنية.

طرائق البحث ومواده:

- **المواد والتجهيزات المستخدمة**

استخدمت في الدراسة مجموعة من الأجهزة والأدوات المخبرية المتوافرة في مخابر كلية الصيدلة والموضحة في الجدول(1) والجدول (2)، كما استخدمت مجموعة من المواد والمحلات الموضحة في الجدول (3):

الجدول(1). الأجهزة المستخدمة في الدراسة

الجهاز	الطراز
ميزان ذو حساسية 0.0001غ	RADWAG, AS 220/C/2
سخان كهربائي	LABINCO MODEL L34
فرن كهربائي	Janat instruments
مرمدة	HEATECH
ميكروويف	Wattar, MOD: WAT-26A

طاحونة كهربائية	
ميزان حرارة زئبقي	-
مقياس ph	Jenway
جهاز تعقيم حراري Autoclave	NUVE steam Art Model OT 40L
مصدر لهب	-
حاضنة جرثومية	JRAD
مازج كهربائي Vortex	DRAGON LAB

الجدول(2).الأدوات المخبرية المستخدمة في الدراسة

الأداة	السعة
بيشر	أحجام متعددة
أسطوانة مدرجة	50 – 100 مل
بوتقة	–
جفنة	–
ورق ترشيح	–
قمع ترشيح	
ممصّات عيارية	أحجام مختلفة
ستالة	
أنابيب اختبار	5-10
ميكروببيت	50-100 ميكروليتر
بوالين معايرة	أحجام مختلفة
دورق حجمي	50-100
أطباق بتري قياس 9	-
عبوات بلاستيكية عقيمة	

الجدول(3). المواد والمحلات المستخدمة في الدراسة

المادة	الشركة
حمض كلور الماء (Hcl)	Riedel-De Haen AG, Germany
كحول إيتيلي 95% Ethanol	Sari, Syria
ماء مقطر حديثاً	--
هيدروكسيد صوديوم	Surechem , UK
مشعر فينول فتالئين	Rectapur, UK

ماء عقيم	
مستحضر صيدلاني حاوي على جراثيم *Lactobacillus*	WALMARK
وسط MRS LACTOBACILLUS MRS AGAR	TITAN BIOTECH LTD. India

جمع العينات وتحضيرها

شملت الدراسة نوع من الحمضيات منتشر في سوريا بكثرة، وهو البرتقال من نوع الغريفون. جمعت العينات بفترات متعاقبة في موسم الحمضيات، وذلك من أرض زراعية تقع في قرية (الزياديّة) في ريف محافظة اللاذقية.

غسلت الثمار وجففت، ثم تم بشر القشرة الخارجية (الفلافيدو) والتخلص منها وجمع الطبقة البيضاء (الألبيدو) وتجفيفها بالميكرويف للتخلص من الرطوبة ثم تحويلها لقطع صغيرة وناعمة، تم تقسيم مسحوق الألبيدو المجفف وحفظه بالبراد.

الجدول (4) عينات الغريفون المدروسة وتاريخ الحصول عليها

الاسم العربي	الاسم الأجنبي	الاسم اللاتيني	الفصيلة	تاريخ جمع العينات
غريفون	Grapefruit	*Citrus Paradisi*	Rutaceae	تشرين الثاني من عام 2022

استخلاص البكتين

تم أخذ 10غ من مسحوق ألبيدو الغريفون ثم أُضيف 200 مل ماء مقطر وضُبطت درجة حموضة الوسط بإضافة 4 مل HCl(0.5N) ثم التسخين على سخان حراري (90–95°م) لمدة 45 د مع التحريك المستمر. بعد ذلك برّد المزيج و رشّح للحصول على الطبقة المائية، ثم ترسيب البكتين بإضافة الكحول الإيتيلي (95%) بنسبة 1:1 إلى العينة، بعدها تترك العينة مدة ساعة تقريباً لتمام الترسيب. أخيراً يفصل البكتين المترسب عن السائل بالإبانة ويُترك في الهواء الطلق حتى يجف.

حساب المردود

بعد استخلاص البكتين وتركه حتى يجف تماما حسبت النسبة المئوية لمردود استخلاص البكتين وفق القانون[16]:

$$y\,(\%) = \frac{100 \times \text{وزن البكتين}}{\text{وزن العينة}} [17]$$

تحديد الرطوبة

أخذ 0.5غ من البكتين المجفف في جفنة مصقولة محددة الوزن وهي فارغة ثم أُدخلت إلى الفرن الكهربائي المضبوط على درجة حرارة 105 م° وجُففت حتى ثبات الوزن.

بعدها تم التبريد والوزن وحساب النسبة المئوية للرطوبة بحسب الطريقة المرجعية وفق القانون

$$M\,(\%) = \frac{(M1 - M2) \times 100}{M1 - M0}$$

حيث:

M النسبة المئوية للرطوبة

M0 وزن الجفنة فارغة (g)

M1 وزن العينة مع الجفنة قبل التجفيف (g)

M2 وزن العينة مع الجفنة بعد التجفيف (g)

كُرِّرت التجربة ثلاث مرات وأخذ المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري.

تحديد الرماد

أخذ 0.5غ من البكتين المجفف في بوتقة مصقولة وموزونة مسبقاً وأضيف لها 1−2 مل من حمض الآزوت المركز ثم نقلت إلى المرمدة بدرجة حرارة (550−600) م° حتى ظهور اللون الأبيض، وبعد ذلك بُرّدت ووزنت وتم حساب النسبة المئوية للرماد حسب الطريقة المرجعية وفق القانون:

$$[17] \quad A\ (\%) = \frac{(W2-W0)\times 100}{W1-W0}$$

A النسبة المئوية للرماد

W0 وزن الجفنة فارغة (g)

W1 وزن الجفنة مع العينة قبل الترميد (g)

W2 وزن الجفنة مع الرماد (g)

كرّرت التجربة ثلاث مرات وأخذ المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري.

تحديد درجة الأسترة

أخذ 0.5غ تم ورُطبت بإضافة 2مل إيتانول ثم أُضيف 25 مل ماء مقطر ساخن مع التحريك باستمرار حتى ضمان انحلال العينة. بعدها تمت إضافة قطرتين من مشعر الفينول فيتالئين والمعايرة ب(NaOH(0.25N وسُجل الحجم المستهلك V1. بعد ذلك أُضيف 10 مل من (NaOH(0.25N وتُركت العينة 30 دقيقة لتمام تفاعل التصبن، ثم أُضيف 10مل من (HCl(0.25N مع التحريك حتى زوال اللون الوردي. أخيراً يُعاير الحمض الزائد ب(NaOH(0.1N ويسجل الحجم المستهلك V2.

تم حساب درجة الأسترة وفق القانون :

$$DE\% = \frac{V2}{V1+V2}\times\ 100[17]$$

كرّرت التجربة ثلاث مرات وأخذ المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري.

تحضير وسط الزرع

إن الوسط الملائم لنمو العصيات اللبنية هو وسط (MRS (DeMan, Rogosa, Sharpe Agar وتم تحضيره حسب تعليمات وإرشادات المصنع وذلك بوزن 67.1غ من الوسط ووضعه في دورق مخروطي سعة ليتر وإضافة الماء المقطر حتى الخط، ثم يوضع على اللهب مع التحريك حتى تمام الانحلال لمسحوق الوسط والوصول لدرجة الغليان. بعدها يوضع في الأوتوكلاف للتعقيم مدة ربع ساعة بدرجة حرارة 121 مئوية تحت ضغط 15 Psi (Pounds per square inch).

الجدول (5): مكونات الوسط الزرعي MRS

مكونات وسط MRS		تركيز غرام/ليتر
ديكستروز		20
آغار		12
ببتون		10
خلاصة لحم		10
خلاصة خميرة		5
أسيتات الصوديوم		5
سيترات الأمونيوم		2
فوسفات ثنائي الصوديوم		2
توين 80		1
سلفات المغنزيوم		0.1
سلفات المنغنيز		0.05
	pH(at 25 C°) 6.5±0.2	

الشكل1. وسط MRS المستخدم

إضافة البكتين لوسط الزرع

تضاف عينة مسحوق البكتين إلى وسط الزرع بنسبة (0.5% أو1%) بحيث تتم إضافته تدريجيا أثناء تحضير الوسط كي ينحل بشكل جيد ويمتزج مع الوسط، كما تمت الاستعانة بجهاز المزج الكهربائي (Vortex) بعد إخراج الوسط من جهاز الأتوكلاف لمنع تشكل تكتلات هلامية ضمن وسط الزرع.

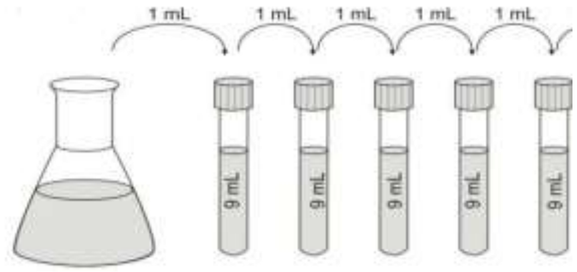
تحضير أنابيب التمديد والتعقيم بالأوتوكلاف

تعبئة الأنابيب الزجاجية ذات الغطاء البلاستيكي ب 9مل ماء عقيم ليتم استخدامها لاحقا في تحضير سلسلة التمديد، ثم أغلقت هذه الأنابيب نصف إغلاق ووضعت بالأوتوكلاف مع الأدوات الزجاجية والأوساط الزرعية من أجل التعقيم [18].

تحضير المعلق الجرثومي وسلسلة التمديد

استخدم نوع بروبيوتيك تجاري حاوي على أجناس *Lactobacillus* و *Bifidobacterium*.

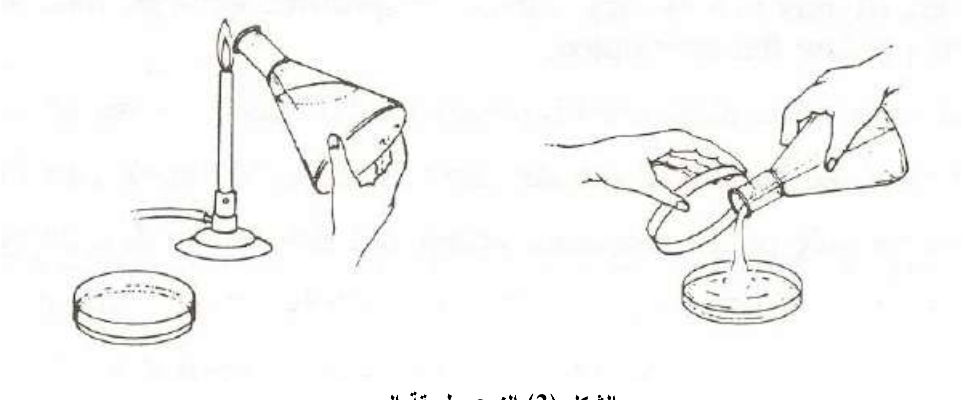
أُفرغت كبسولة السمتحضر الصيدلاني للبروبيوتيك في 100 مل ماء عقيم وحُركت بشكل جيد باستخدام جهاز المزج الكهربائي (Vortex) لضمان الانحلال وتشكيل المعلق الجرثومي، ثم تم تحضير سلسلة التمديد العشرية بإضافة 1مل من المحلول الأم إلى 9 مل ماء عقيم الموجودة في أنبوب الاختباروالمحضرة مسبقاً وبذلك تم الحصول على التمديد العشري الأول، ومنه نحضر التمديد الثاني بأخذ 1 مل من أنبوب التمديد الأول ونضيف إلى الثاني وهكذا حتى الوصول للتمديد الخامس.



الشكل (2) تحضير سلسلة التمديد

الزرع بطريقة الصب

بداية، تم سحب 1000 ميكروليتر من كل معلق جرثومي من سلاسل التمديد العشرية وأفرغت ضمن طبق بتري وصب فوقه وسط MRS، حُضنت الأطباق مدة 48 ساعة بدرجة حرارة 37 م°.بعد نمو الجراثيم تم اختيار الطبق الحاوي على مستعمرات جرثومية قابلة للعد (بين 30 و300 مستعمرة) [19].



الشكل (3) الزرع بطريقة الصب

لاحقاً، تم سحب 1000 ميكروليتر من التمديد المناسب للمعلق الجرثومي وتفريغه ضمن طبق بتري وصبّ فوقه وسط الزرع الحاوي على البكتين ثم نقل الأطباق مقلوبة إلى الحاضنة الجرثومية وتركها48 ساعة حتى تنمو المستعمرات الجرثومية ويتم العد.

كُررت العملية ثلاثة مرات وتم التعبير عن النتائج بالمتوسط الحسابي± الانحراف المعياري.

التحليل الإحصائي

استخدمت برمجية spss لإجراء اختبار ستيودينت students' test للتأكد من وجود فرق إحصائي هام بين النتائج المعبرة عن نمو الجراثيم بدون إضافة بكتين والنتائج المعبرة عن نمو الجراثيم بعد إضافة البكتين. أُجري اختبار ستيودنت عند مستوى الدلالة 95% (p=0.05)، كما أجري الاختبار للتأكد من وجود فرق إحصائي هام بين النوع التجاري والنوع الخام المستخلص، بحيث إذا كانت قيمة p أكبر من 0.05 فهذا يعني عدم وجود فرق إحصائي هام، أما إذا كانت قيمة p أصغر من 0.05 فهي تشير لوجود فرق إحصائي هام.

النتائج والمناقشة

1.مردود البكتين:

كان مردود استخلاص البكتين من ألبيدو الغريفون على أساس المادة الجافة (10.9%± 0.7)، وكانت النسبة متقاربة مع نتائج دراسة قامت بها الباحثة رهف (2022) حيث تراوح مردود البكيتن (19.5%–9%) [20].

البكتين رطب

البكتين بعد التجفيف

في دراسة قام بها الباحث Sayah وزملاؤه عام 2016 كانت النسبة المئوية لمردود البكتين عند استخلاصه من قشور الغريفون باستخدام حمض الكبريت حوالي 33% [21]. وفي دراسة أخرى جرت عام 2011 كان مردود استخلاص البكتين من ألبيدو الغريفون حوالي 19% باستخدام HCl [22]. ويفسر الاختلاف في النسب أن مردود البكتين يختلف بحسب نضج الثمار وطريقة الاستخلاص المتبعة والمواد المستخدمة في الاستخلاص[20].

2.رطوبة البكتين

بعد تجفيف العينات بالفرن الكهربائي كانت النتائج كالتالي:

الجدول(4–1) النسبة المئوية للرطوبة

نوع البكتين	البكتين الخام المستخلص	البكتين التجاري
الرطوبة% (n=3)	%3.87±0.23	%8.04±0.97

إن رطوبة كل العينات كانت ضمن القيمة المسموحة (أقل من 12%) وهذه النتائج جاءت موافقة لمعايير جودة البكتين[23]، يجب أن يكون البكتين ذو محتوى منخفض من الرطوبة كي يتم تخزينه بشكل آَمن إذ يؤدي ارتفاع نسبة الرطوبة في البكتين إلى تسريع نمو الكائنات الحية الدقيقة والتي يمكن أن تؤثر على جودة البكتين[24].

3.تحديد النسبة المئوية للرماد:

تم تحديد محتوى الرماد في عينات البكتين بعد استخلاصه ومقارنته مع الرماد في البكتين التجاري فكانت النتائج موضحة كالتالي:

الجدول(4−2) النسبة المئوية للرماد

نوع البكتين	البكتين الخام المستخلص	البكتين التجاري
الرماد% (n=3)	%1.975 ±0.11	%1.937±0.74

يتم تعريف الرماد على أنه المواد الغير عضوية التي يتم الحصول عليها من بقايا المواد العضوية المحترقة ومن خلاله يمكن معرفة المحتوى المعدني في المادة والذي بدوره سوف يؤثر على جودة البكتين [25]، بحيث يعد البكتين عالي الجودة عندما يكون ذو رماد منخفض ونسبته أقل من 10% [26].

يظهر من الجدول أن النتائج أقل من 10% وقد توافقت نتائج دراستنا مع نتائج دراسة أجريت على بكتين مستخلص من الغريفون بحيث تراوح محتواه من الرماد (1,8−2%)[27].

4. تحديد درجة الأسترة:

تعد درجة الأسترة والتي تعرف بعدد وحدات حمض الغالاكتورونيك المؤسترة مع الميتانول خاصية مهمة للبكتين لأنها تحدد خواصه المبلورة وتأثيراته الفيزيولوجية. ووفقاً لهذا التعريف يتم تصنيفه كبكتين مرتفع الأسترة عندما DE>50% وبكتين منخفض الأسترة عندما DE<50%. تختلف خواص LMP عن خواص HMP وبالتالي هناك استخدامات مختلفة لكل منهما حيث يشيع استخدام HMP كعامل مثبت ومبلور، في حين يستخدم LMP كبديل للدهون[28].

تم تحديد درجة الاسترة بحسب الطريقة المرجعية وجاءت النتائج مبينة بالجدول التالي:

الجدول (4−3) النسبة المئوية لدرجة الأسترة

نوع البكتين	البكتين الخام المستخلص	البكتين التجاري
%DE (n=3)	%88.99±3.3	%77.21±0.61

ظهر في الجدول (4−3) أن البكتين الخام هو بكتين عالي درجة الأسترة وقد تقاربت هذه النتائج مع نتائج دراسة قام بها SAYAH حيث كانت درجة أسترة البكتين المستخلص من ألبيدو الغريفون تساوي 75.35%[21]. إضافة إلى توافق نتائج الدراسة الحالية مع نتائج دراسة أخرى كان فيها البكتين المستخلص من الغريفون من النوع عالي الأسترة[20].

5.نتائج الزرع الجرثومي:

1.5. اختيار التمديد المناسب:

بعد أن أخرجت أطباق الزرع من الحاضنة لوحظ وجود نمو جرثومي وتم التعرف على المستعمرات النامية التي تطابقت صفاتها مع الصفات العامة لمستعمرات جراثيم العصيات اللبنية (بيضاء اللون، كريمية، مستديرة الحواف). اختيرت الأطباق النامية والقابلة للعد الحاوية على عدد مستعمرات بين (30–300). تم حساب تعداد الجراثيم (cfu/ml) بالقانون التالي:

Cfu/ml=(No of colonies/ml)/Dilution factor [29]

بحيث No of colonies: عدد المستعمرات النامية

Dilution factor: نسبة التمديد

العصيات اللبنية النامية على وسط MRS

العصيات اللبنية هي عصيات لاهوائية اختيارية فيتم زرعها بطريقة الصب، بحيث تستخدم هذه الطريقة لحساب عدد الكائنات الحية التي تتم إضافتها إلى وسط الزرع المنصهر قبل تصلبه فتؤدي إلى توزيع المستعمرات بشكل متجانس[30].

تحضر مستحضرات البروبيوتيك باستخدام العديد من الأجناس الجرثومية المختلفة (العصيات اللبنية والشّقاء) وفي الممارسة العملية يدعم وسط MRS نمو العصيات اللبنية المختلفة بحيث يتم الحضن مدة 48–72 ساعة بحرارة 35 م° بظروف لاهوائية، في حين أن تنمية جراثيم الشّقاء يتطلب تدعيم الوسط بالسيستئين. وبالتّالي فإن الجراثيم النامية على الوسط في دراستنا هي العصيات اللبنية[31].

إن جنس العصيات واحدا من أهم أجناس جراثيم حمض اللبن، وتضم أكثر من 170 نوع وأشهر أنواع العصيات اللبنية المستخدمة كبريبيوتيك هي (*Acidophilus, Plantarum Rhamnosus, Paracasei, Fermentum*) [32].

يستخدم مرجعياً العديد من الطرق للتميز بين أنواع العصيات اللبنية مثل اختبارات كيميائية حيوية او استخدام طرق أكثر دقة للتميز بين الأنواع مثل الطرق الجزيئية (استخلاص DNA، تفاعل البولميراز المتسلسل PCR، الرحلان الكهربائي)[33] ، وللتأكد من أنواع السلالات الموجودة كان من الأفضل إجراء أحد التفاعلات السابقة إلا أنه تعذر ذلك ضمن إمكانيات الكلية.

2.5.التعداد العام للعصيات اللبنية عند إضافة أنواع البكتين بتركيز 0.5%:

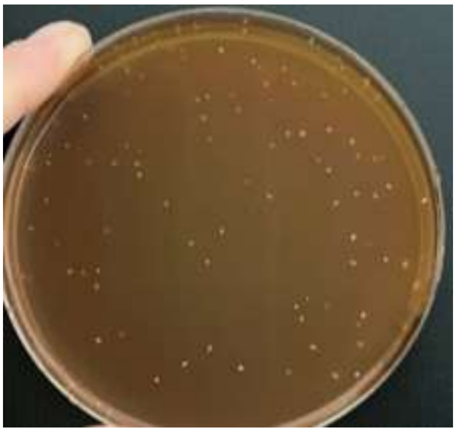
ظهر نمو جرثومي عند الشاهد السلبي الخالي من البكتين (43×10^5 cfu/ml) وقد ازداد النمو عند إضافة البكتين الخام بتركيز (0.5%) بحيث التعداد (165×10^5 cfu/ml) أما عند البكتين التجاري فقد بلغ التعداد 169×10^5 (cfu/ml). تم إجراء اختبار ت ستيودنت لمقارنة التعداد الجرثومي بعد إضافة أنواع البكتين (خام، تجاري) عند تركيز 0.5% مع التعداد الجرثومي للشاهد السلبي (بدون بكتين) حيث كانت قيمة ($p<0.05$)، أي يوجد فرق إحصائي هام وبالتالي يمكن اعتبارها أنها ذات فعالية حيوية أي أنها تشكل ركيزة انتقائية لواحد أو عدد محدد من البكتيريا المفيدة المحتملة في القولون وبالتالي تحفيزها على النمو.

توافقت النتائج مع دراسة أجريت عام 2016 في الهند تم فيها تنمية سلالات من البروبيوتيك *acidophilus, (LAB-Lactobacillus casei, L. Bifidobacterium bifidum)* في مرق MRS مدة 48 ساعة وبدرجة حرارة 37م°، وإضافة 0.4% بكتين خام إلى المرق، وقد خلصت النتائج أن البكتين قد حفز من نمو الجراثيم وبالتالي يمكن استخدامه كبريبيوتيك[13].

استخدمت دراسة أخرى بكتين مستخلص من نبات الفيرولا (وهو نبات بري منتشر على نطاق واسع في أوزبكستان) إضافة لبكتين مستخلص من ثقل التفاح وبكتين من قشور اليوسفي، أظهرت النتائج أن التعداد الجرثومي قد ازداد عند كل نوع من أنواع البكتين مقارنة مع الشاهد الخالي من البكتين والحاوي على غلوكوز بحيث كان التعداد الجرثومي متقارباً بين الأوساط الحاوية على بكتين الفيرولا وبكتين اليوسفي بينما كان التعداد الجرثومي أقل عند إضافة بكتين ثقل التفاح[34].

إن كل من البكتين الخام المستخلص والبكتين التجاري هي بكتينات من النوع عالي الأسترة HMP وقد أبدت فعالية محفزة لنمو البروبيوتيك، وتوافقت هذه النتيجة مع دراسة قام الباحث باك وزملاؤه لتحري قدرة 3 سلالات من *Lactobacillus*هي:

(Lactobacillus bulagaricus, Lactobacillus casei ,Lactobacillus delbrukii) على تخمير كل من: البكتين عالي الميتوكسي، بكتين الشوندر السكري، فركتوأوليغوسكاريد، غالاكتوأوليغوسكاريد، وإنولين الأغاف و الغلوكوز حيث تمت الدراسة عبر تحري عيوشية الجراثيم عند زراعتها على أوساط MRS حاوية على المركبات السابقة المذكورة كمصدر للكربون بشروط لاهوائية بالدرجة 37 م°. اقترحت هذه الدراسة أنه يمكن للبكتين عالي الميتوكسيل أن يلعب دور بريبيوتيك عبر مساعدة أنواع معينة من جراثيم البروبيوتيك على النجاة أثناء عبورها عبر السبيل الهضمي وتعرضها للحموض الصفراوية في الأمعاء[35].

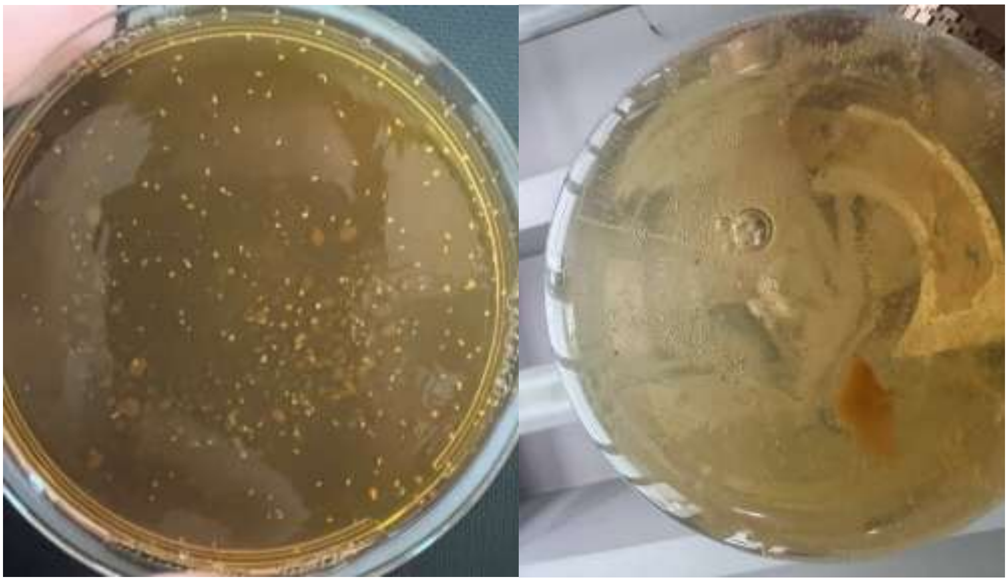


نمو العصيات اللبنية مع إضافة البكتين الخام للوسط بتركيز 0.5%

2.2.5.التعداد العام للعصيات اللبنية عند إضافة أنواع البكتين بتركيز 1%:

أُضيف تركيز 1% من البكتين الخام المستخلص والبكتين التجاري وتجربتها فكان التعداد الجرثومي عند إضافة البكتين الخام (276×10^{5} cfu/ml)، أما عند البكتين التجاري فقد بلغ (220×10^{5}cfu/ml).

تمت تجربة إضافة تركيز 1.5% من كل من أنواع البكتين السابقة إلى وسط الزرع MRS لتحري تأثيره على التعداد الجرثومي إلا أنه شكل كتلات هلامية في الوسط ولم نتمكن من حله وبعثرته جيدا فحالت هذه المعوقات الميكانيكية عن دراسة تأثير هذا التركيز.



يبين الشكل تعذر حل البكتين عند تركيز 1.5%

يمكن تفسير الزيادة في النمو في دراستنا بأنه قد لوحظ وجود علاقة ارتباط بين التركيز المضاف من البكتين وازدياد التأثير المعزز للنمو الجرثومي بحيث أن نتائج المقارنة بين التركيزين أعطت زيادة في التعداد عند إضافة نفس النوع بتركيز أكبر وهذا يدل أنه كلما ازداد تركيز البكتين المضاف ازدادت تأثيراته الحيوية، هذه النتيجة متوافقة مع دراسة أجريت لتحري تأثير البكتين على العصيات اللبنية المهبلية حيث كان لزيادة تركيز البكتين تأثير مهم على نمو المستعمرات الجرثومية.[36]

تم تطبيق اختبار t ستيودنت للمقارنة بين تعداد العصيات اللبنية عند إضافة البكتين الخام المستخلص والبكتين التجاري عند كلا التركيزين، حيث كانت قيمة ($p>0.05$) أي لا يوجد فرق إحصائي هام، وبما أن كلا النوعين لم يخضع لتغيير في بنيته الكيميائية وكلاهما من نوع البكيتنات عالية درجة الأسترة بالتالي أبدى كلاهما تأثيرا متشابهاً داعماً لنمو الجراثيم.

تم تطبيق اختبار t ستيودنت لمقارنة تعداد العصيات اللبنية عند إضافة البكتين الخام المستخلص والتجاري عند تركيز 1% مع الشاهد السلبي (بدون بكتين) حيث كانت قيمة ($p<0.05$) أي يوجد فرق إحصائي هام، وبالتالي يمكن اعتبار هذه الأنواع أنها ذات فعالية حيوية كبريبيوتيك.

توافقت النتائج مع دراسة أجريت عام 2014 تم فيها دراسة تأثير البكتين المستخلص من قشور ومخلفات الفواكه لتعزيز نمو نوعي البروبيوتيك *Lactobacillus acidophilus* و *Bifidobacterium bifidum* من خلال إضافة البكتين المستخلص لوسط النمو MRS والمقارنة مع عينات بكتين تجاري بحيث حضنت الأوساط بدرجة حرارة 37 م وبعد 48 ساعة تم عد المستعمرات. أظهرت النتائج أن البكتين حفز نمو البروبيوتيك كما كان تأثيره أفضل على *Lactobacillus* إذ أدى إلى نمو جرثومي أكبر مقارنة ب *Bifidobacterium*[35].

قام الباحث Nazzaro وزملاؤه في إيطاليا بتحري دور كل من البكتين والانولين على عيوشية البروبيوتيك *Lactobacillus Plantarum* بعد مرورها بأوساط صنعية محاكية لعصارات المعدة والبنكرياس وذلك عبر تقييم نمو هذه الجراثيم ومقارنتها مع الغلوكوز كشاهد، قُيمت عيوشية الخلايا (cfu/ml) إحصائياً عبر زرعها على أطباق MRS بالدرجة 30° مدة 48. لم يؤثر وجود البكتين أو الإينولين بشكل هام إحصائياً على نمو الجراثيم بالمقارنة مع الغلوكوز قبل تعريضها للشروط الصنعية لكن حفز كل من البكتين والإينولين مقاومة الجراثيم للعصارات المعدية والمعوية على عكس الغلوكوز الذي لم يحفز مقاومة الجراثيم، خلصت الدراسة إلى أن يلعب البكتين دور بريبيوتيك لأنه أعطى نتائج واعدة من حيث حماية البروبيوتيك أثناء تعريضها إلى شروط تحاكي أوساط السبيل الهضمي[37].

الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات:

- يعد الغريفون مصدرا هاما للحصول على بكتين ذو خواص جيدة.
- أظهر البكتين المستخلص والبكتين التجاري فعالية محفزة لنمو أنواع من البروبيوتيك وبالتالي يمكن الاعتماد عليه كبريبيوتيك.
- أدت زيادة تركيز البكتين الخام المستخلص والبكتين التجاري المضاف إلى زيادة في تعداد جراثيم البروبيوتيك

التوصيات:

- البحث عن مصادر أخرى للبريبيوتيك ودراسة فعاليتها.
- التحري عن فعالية تراكيز أكبر من البكتين كبريبيوتيك.
- تجربة تأثير البكتين على أنواع بروبيوتيك أخرى.

References:

1.Srivastava, P. and R. Malviya, *Sources of pectin, extraction and its applications in pharmaceutical industry - An overview.* Indian Journal of Natural Products and Resources, 2011. **2**: p. 10-18.

2.Bagde, P.P., et al. *EXTRACTION OF PECTIN FROM ORANGE PEEL AND LEMON PEEL*. 2017.

3.Rolin, C. and J. De Vries, *Pectin*, in *Food Gels*, P. Harris, Editor. 1990, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 401-434.

4.Convention, U.S.P., *Food Chemicals Codex (9th Edition)*. 2014: United States Pharmacopeial.

5.Elshahed, M.S., et al., *Pectin in diet: Interactions with the human microbiome, role in gut homeostasis, and nutrient-drug interactions.* Carbohydr Polym, 2021. **255**: p. 117388.

6.Morris, V.J., et al., *The bioactivity of modified pectin fragments.* Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2013. **1**(1): p. 21-37.

7.Slavin, J., *Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits.* Nutrients, 2013. **5**(4): p. 1417-35.

8.Nelson, A.L., *Properties of high-fiber ingredients.* Cereal Foods World, 2001. **46**: p. 93-97.

9.Rodríguez Arcos, R., et al., *Dietry fibre from vegetable products as source of functional ingredients.* Trends in Food Science & Technology, 2006. **17**: p. 3-15.

10. Bagchi, D., *Nutraceutical and Functional Food Regulations in the United States and Around the World: Second Edition*. 2014. 1-549.

11. ابراهيم، م. and ديمة .ا, *Determination of some components of citrus fruits wastes and monitoring bioactivities of these wastes in experimental animals.* Tishreen University Journal -Medical Sciences Series, 2023. **45**(5): p. 579-594.

12. Onumpai, C., et al., *Microbial utilization and selectivity of pectin fractions with various structures.* Appl Environ Microbiol, 2011. **77**(16): p. 5747-54.

13. Chatterjee, E. and S. Ga Manuel, *Effect of Fruit Pectin on Growth of Lactic Acid Bacteria.* Journal of Probiotics & Health, 2016. **04**(02).

14. Guarino, M.P.L., et al., *Mechanisms of Action of Prebiotics and Their Effects on Gastro-Intestinal Disorders in Adults.* Nutrients, 2020. **12**(4).

15. Amirreza, K., B. Reza, and K. Shabnam, *Probiotics: A Comprehensive Review of Their Classification, Mode of Action and Role in Human Nutrition*, in *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*, R. Venketeshwer and G.R. Leticia, Editors. 2016, IntechOpen: Rijeka. p. Ch. 2.

16. Singhal, S. and N.R. Swami Hulle, *Citrus pectins: Structural properties, extraction methods, modifications and applications in food systems – A review.* Applied Food Research, 2022. **2**(2).

17. Mesbahi, G., J. Jamalian, and A. Farahnaky, *A comparative study on functional properties of beet and citrus pectins in food systems.* Food Hydrocolloids, 2005. **19**(4): p. 731-738.

18. احمد، ا.، ا. ديمة, and نزيه .د, *Antimicrobial effect of Rosmary extract to improve the shelf life of chicken meat.* Tishreen University Journal -Medical Sciences Series, 2023. **45**(3): p. 477-488.

19. Sanders, E.R., *Aseptic laboratory techniques: plating methods.* J Vis Exp, 2012(63): p. e3064.

20. الحاج، ر. and الدياب .د, *Extraction and Characterization of Pectin from Grape Fruit (Citrus paradisi) and Valencia (Citrus sinensis).* Tishreen University Journal -Medical Sciences Series, 2022. **44**(2): p. 253-275.
21. Sayah, M.Y., et al., *Yield, Esterification Degree and Molecular Weight Evaluation of Pectins Isolated from Orange and Grapefruit Peels under Different Conditions.* PLOS ONE, 2016. **11**(9): p. e0161751.
22. Bagherian, H., et al., *Comparisons between conventional, microwave- and ultrasound-assisted methods for extraction of pectin from grapefruit.* Chemical Engineering and Processing - CHEM ENG PROCESS, 2011. **50**.
23. *JECFA, F., Compendium of food additive specifications. Monograph 7, Pectins. 2009.*. 2009.
24. Begum, R., et al., *Characterization of Jackfruit (Artocarpus Heterophyllus) Waste Pectin as Influenced by Various Extraction Conditions.* Agriculture and Agricultural Science Procedia, 2014. **2**: p. 244-251.
25. Lekhuleni, I., et al., *Physicochemical properties of South African prickly pear fruit and peel: Extraction and characterisation of pectin from the peel.* Open Agriculture, 2021. **6**: p. 178-191.
26. Azad, A.K.M., *Isolation and Characterization of Pectin Extracted from Lemon Pomace during Ripening.* Journal of Food and Nutrition Sciences, 2014. **2**(2).
27. Mohamed, H., *Extraction and Characterization of Pectin from Grapefruit Peels.* MOJ Food Processing & Technology, 2016. **2**: p. 1-8.
28. Robledo, V. and L. Castro, *Pectin - Extraction, Purification, Characterization and Applications*. 2020.
29. Sanjeevani Shekhar, D., A. Kiran Suresh, and M. Jayashri Gajanan, *In vitro and in vivo evaluation of prebiotic potential of pectin on vaginal lactobacilli.* Journal of Applied Biology & Biotechnology, 2022.
30. Roginski, H., J.W. Fuquay, and P.F. Fox, *Encyclopedia of dairy sciences*. ScienceDirect Reference. 2003, Amsterdam: Academic Press.
31. Saarela, M., et al., *Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties.* J Biotechnol, 2000. **84**(3): p. 197-215.
32. Bowman, J. and T. McMeekin, *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. 2005. p. 443-491.
33. Alia Sabia Alebrahim, W.A., Abir Alramo, *isolation of Lactobacilli from Some Food Products and Studying Their Antibacterial Activity against Listeria monocytogenes.* 2021.
34. Islamova, Z.I., et al., *Comparative Assessment of the Prebiotic Activity of Some Pectin Polysaccharides.* Pharmaceutical Chemistry Journal, 2017. **51**(4): p. 288-291.
35. Manuel, S., *Fruit Waste Pectin in Enhancing the Establishment of Probiotic Bacteria.* Journal of Nutritional Health & Food Engineering, 2014. **1**.
36. Ho, Y.Y., C.M. Lin, and M.C. Wu, *Evaluation of the prebiotic effects of citrus pectin hydrolysate.* J Food Drug Anal, 2017. **25**(3): p. 550-558.
37. Nazzaro, F., et al., *Biochemical Traits, Survival and Biological Properties of the Probiotic Lactobacillus plantarum Grown in the Presence of Prebiotic Inulin and Pectin as Energy Source.* Pharmaceuticals (Basel), 2012. **5**(5): p. 481-92.