

مقایسه اثر اعمال تنش های کمتر از حد کشندگی بر زندهمانی لاکتوباسیلوس پلاتناروم و لاکتوباسیلوس فرمنتوم استفاده شده به عنوان کشت همراه در ماست سین بیوتیک و دستگاه گوارش مصرف کنندگان

سید حمید نوربخش^۱، مسعود یاور منش^{۲*}، سید علی مرتضوی^۳، علی معظمی^۴، پیمان ادیبی^۵
 ۱. دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
 ۲. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
 ۳. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
 ۴. گروه علوم مولکولی، دانشگاه علوم کشاورزی سوئد، اوپسالا، سوئد.
 ۵. گروه بیماری های داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

* نویسنده مسئول: yavarmanesh@um.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۲۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۱/۲۰

چکیده

پروبیوتیکها میکرواورگانیزمهای زندهای هستند که در صورت مصرف به تعداد کافی باعث افزایش سطح سلامت مصرف کننده می شوند، چالش اصلی در استفاده از پروبیوتیکها زنده و فعال نگه داشتن آنها در حین فرآیند مواد غذایی و دستگاه گوارش مصرف کننده است. هدف از این پژوهش مقایسه اثر تنش های کمتر از حد کشندگی بر زندهمانی لاکتوباسیلوس پلاتناروم و لاکتوباسیلوس فرمنتوم در ماست سین بیوتیک است. در این پژوهش اثر تنش های اسیدی (pH های ۲/۵، ۳/۵، ۴/۵، ۵/۵ و ۶/۵)، اسمزی (غلظت ۲ و ۴ درصد نمک)، صفرا (غلظت ۰/۲، ۰/۴، ۰/۸، ۱ و ۱/۲ درصد) و سرما (۴ درجه سانتیگراد) در مقیاس کمتر از حد کشندگی به عنوان تیمار افزایش دهنده مقاومت باکتری ها بررسی شد. میزان زندهمانی سویه های تیمار شده و تیمار نشده در ماست و دستگاه گوارش در طول یک ماه از طریق شمارش سلول زنده مقایسه گردید. نتایج بیانگر موثر بودن اعمال تنش های کمتر از حد کشندگی بر افزایش مقاومت باکتری ها بود ($P \leq 0.05$). میزان مقاومت هر دو سویه در برابر تنش های اسیدی، نمک، صفرا و سرما افزایش یافت، علاوه بر این تعداد سلول های زنده لاکتوباسیلوس پلاتناروم و لاکتوباسیلوس فرمنتوم پس از یک ماه مصرف ماست در مدفوع مصرف کنندگان افزایش نشان داد. نتایج نشان داد به طور کلی استفاده از تنش های کمتر از حد کشندگی باعث افزایش زندهمانی باکتری ها در مواجهه با تنش های گوارشی و سرما می شود، البته میزان افزایش زندهمانی در بین سویه های مختلف متفاوت بود.

واژگان کلیدی: پروبیوتیک، پری بیوتیک، سین بیوتیک، ماست، زنده مان.

مقدمه

پروبیوتیک است (Tamime et al., 2005). پروبیوتیکها به دسته ای از میکرواورگانیزم های سودمند زنده اطلاق می شود که در صورت مصرف به میزان کافی، باعث افزایش سطح سلامت مصرف کننده می شوند. از مهم ترین اثرات مواد غذایی پروبیوتیک، می توان به بهبود عملکرد سیستم گوارش و حفظ تعادل سیستم های متابولیک بدن اشاره نمود. پری بیوتیکها ترکیباتی عمدتاً پلی ساکاریدی هستند که توسط دستگاه گوارش انسان قابل هضم نبوده و به طور انتخابی باعث افزایش رشد باکتری های پروبیوتیک می شوند.

غذا در تحقیقات امروزی نه تنها نقش تأمین کننده مواد مغذی را دارد بلکه، به عنوان حاملی برای مواد زیست فعال نیز مطرح است. به این دسته از غذاها که علاوه بر تأمین انرژی، باعث ارتقاء سلامت مصرف کنندگان می شوند فراسودمند^۱ می گویند (Tamime et al., 2005). گرایش مردم به مصرف غذاهای فراسودمند منجر به رشد روز افزون سرمایه گذاری در بخش تولید این دسته از مواد غذایی شده است. یکی از مهمترین غذاهای فراسودمند، فرآورده های

1. Functional Foods

ترش و فراورده‌های لبنی تخمیری وجود دارد که جزء فلور غالب روده انسان بوده و پتانسیل پروبیوتیکی آن به اثبات رسیده است. این باکتری به دلیل مقاومت مطلوب در برابر تنش‌های حرارتی و فیزیکی و نیز تنش‌های گوارشی، به عنوان یک پروبیوتیک تجاری در تولید محصولات پروبیوتیک مورد استفاده قرار می‌گیرد (Morelli et al., 2000). ماست یکی از فراورده‌های لبنی تخمیری است که به وسیله تخمیری لاکتیکی دو باکتری آغازگر *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*^۴ و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*^۵ تولید می‌شود. در بسیاری از موارد تعداد کافی از باکتری‌های پروبیوتیک در داخل محصول به صورت فعال وجود ندارد و یا باکتری توانایی عبور از دستگاه گوارش و جایگزین شدن در روده را دارا نیست (Coman et al., 2005). بنابراین بررسی میزان زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در ماست و همچنین تبیین یک استراتژی ساده و کارا برای افزایش مقاومت سلول‌های باکتری در برابر تنش‌ها ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این پژوهش مقایسه اثر اعمال تنش‌های کمتر از حد کشندگی ناشی از فرآیند تولید ماست مثل سرما، و فشار اسمزی و تنش‌های گوارشی مثل pH اسیدی معده و صفرا به عنوان عامل ایجاد کننده مقاومت موثر بر افزایش زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* در ماست سین‌بیوتیک حاوی زیلولیگوساکارید^۶ و دستگاه گوارش مصرف کنندگان پس از یک دوره مصرف یک ماهه بود.

مواد و روش کار

این پژوهش بالینی در سال ۱۳۹۴ در مرکز ثبت تحقیقات بالینی وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی ایران به

به ماده غذایی که به طور همزمان حاوی باکتری‌های پروبیوتیک و ترکیبات پری‌بیوتیک باشد، فرآورده سین‌بیوتیک^۱ می‌گویند (Scherezenmeir et al., 2001). یکی از مهمترین عوامل در اثر بخشی پروبیوتیک‌ها، تعداد سلول زنده در فرآورده نهایی و همچنین در دستگاه گوارش مصرف کننده است، اما در طی فرآیند تولید و نگهداری مواد غذایی، همچنین در حین فرآیند گوارش به دلیل اعمال تنش‌هایی همانند گرما، سرما، فشار اسمزی، pH اسیدی معده و نمک‌های صفاوی در روده کوچک تعداد سلول‌های زنده کاهش می‌یابد (Sahadeva et al., 2011). به همین دلیل استفاده از سویه‌های پروبیوتیک مقاوم‌تر و همچنین استفاده از تکنیک‌هایی برای افزایش مقاومت سلول‌ها، امروزه به عنوان عاملی برای افزایش تعداد سلول‌های زنده مورد استفاده قرار می‌گیرد. استفاده از سویه‌هایی که دارای ژنوم غنی‌تر هستند و همچنین اعمال تنش‌های کمتر از حد کشندگی به منظور فعال سازی ژن‌های ایجاد مقاومت برای مقاوم سازی سلول‌ها در برابر تنش‌های ناشی از فرآیند تولید و گوارش ماده غذایی یکی از جدیدترین، کارا ترین و ساده ترین استراتژی‌های افزایش نرخ زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها است (Maragkoudakis et al., 2005). *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*^۲ باکتری میله ای کوتاه، پر نیاز و غیر بیماری‌زا است که دارای بزرگ‌ترین ژنوم شناخته شده در بین گروه باکتری‌های اسید لاکتیکی است و دارای چرخه‌های متابولیکی متعددی است که به طور کامل شناسایی شده‌اند. استفاده از این باکتری در مواد غذایی باعث بهبود فعالیت‌های فیزیولوژیک روده کوچک و ارتقاء سطح سلامت و ایمنی میزبان می‌شود (Nissen et al., 2009). *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*^۳ یکی دیگر از مهمترین جنس‌های خانواده *لاکتوباسیلوس* است که به طور گسترده در خمیر

4. *Lactobacillus acidophilus*
5. *Streptococcus thermophilus*
6. Xylooligosaccharide

1. Synbiotic
2. *Lactobacillus plantarum*
3. *Lactobacillus fermentum*

۵/۵ و ۶/۵، به صورت جداگانه در فواصل زمانی ۲،۰ و ۴ ساعت پس از تلقیح باکتری به میزان $10^8 \times 1/5$ CFU/ml (مطابق با استاندارد ۰/۵ مک فارلند) در محیط کشت MRS مایع مورد بررسی قرار گرفت. غلظت‌های مختلف اسید از طریق تنظیم pH محیط کشت MRS مایع، به وسیله محلول ۵ مولار اسید هیدروکلریک تهیه شد (Morelli et al., 2000). میزان زنده‌مانی سویه‌ها از طریق شمارش کلنی‌های رشد کرده بر روی MRS در یک میلی لیتر از محیط کشت محاسبه و جمعیت میکروبی به صورت CFU/ml گزارش شد.

آزمون تعیین مقاومت طبیعی باکتری‌ها در برابر غلظت‌های مختلف صفر

در این آزمون از سوسپانسیون غلیظ میکروبی به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در داخل لوله‌های حاوی MRS مایع حاوی صفر، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۸، ۱ و ۱/۲ درصد وزنی/حجمی صفر (سیگما، آمریکا) تلقیح شد، دانسیته نوری ۶۳۰ نانومتر در حدود ۰/۵ مک‌فارلند تنظیم شد، سپس لوله‌ها در داخل گرم‌خانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد، دارای ۱۰ درصد حجمی دی‌اکسیدکربن گرم‌خانه گذاری شدند. به منظور شمارش باکتری‌های زنده مانده، پس از تهیه رقت مناسب در محلول رینگر، در محیط کشت MRS جامد به صورت سطحی کشت داده شد و در گرم‌خانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد، دارای ۱۰٪ حجمی دی‌اکسیدکربن گرم‌خانه گذاری شد (Bove et al., 2005; Begley et al., 2012). شمارش کلی کلنی‌های رشد یافته نمایانگر مقاومت باکتری‌های مورد نظر به نمک صفرای در هر غلظت بود.

آزمون تعیین مقاومت طبیعی باکتری‌ها در برابر نمک و سرما

برای بررسی میزان مقاومت لاکتوباسیلوس پلاننتاروم و لاکتوباسیلوس فرمنتوم به تنش هم زمان سرما و نمک یک

شماره IRCT2015042821985N1 به ثبت رسیده است. در این پژوهش، همه شرکت کنندگان (۱۰ مرد و ۱۰ زن) فرم رضایت نامه کتبی را امضاء نموده‌اند و هیچ یک از مصرف کنندگان در حین پژوهش و سه ماه قبل از آن آنتی بیوتیک مصرف نکرده بودند. علاوه بر این از نظر گوارشی سالم بوده، سیگار و الکل نیز مصرف نمی‌کردند. لازم به ذکر است که در طول دوره پژوهش ۲ نفر زن و یک نفر مرد از پژوهش کنار گذاشته شدند.

مقاومت به آنتی بیوتیک

به منظور فعال سازی، بسته لیوفیلیزه باکتری‌های لاکتوباسیلوس پلاننتاروم ATCC 14917 و لاکتوباسیلوس فرمنتوم ATCC 14931 در شرایط استریل باز و طبق دستورالعمل موجود در بسته به محیط کشت (MRS) ام ار اس^۱ مایع (مرک، آلمان) منتقل و در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد به مدت ۲۴ ساعت در اتمسفر حاوی ۱۰ درصد دی اکسید کربن گرم‌خانه‌گذاری شد تا باکتری با جذب آب از حالت کمون خارج شده و وارد مرحله رشد لگاریتمی شود. مقاومت به آنتی بیوتیک سویه‌ها، در برابر ۷ نوع آنتی‌بیوتیک مختلف (کوآموکسی کلاو^۲، تتراسایکلین^۳، آموکسی سیلین^۴، ونکومایسین^۵، اریترومایسین^۶، پنی سیلین^۷ و جنتامایسین^۸) بر اساس الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی انتشار دیسک به روش کربی- بوئر، ارزیابی شد (Morelli et al., 2000).

آزمون تعیین مقاومت طبیعی باکتری‌ها در برابر غلظت‌های مختلف اسید

در این آزمون، مقاومت طبیعی لاکتوباسیلوس پلاننتاروم و لاکتوباسیلوس فرمنتوم در برابر pHهای ۲/۵، ۳/۵، ۴/۵

1. de Man, Rogosa and Sharpe (MRS)
2. Co-amoxiclav
3. Tetracycline
4. Amoxicillin
5. Vancomycin
6. Erythromycin
7. Penicillin
8. Gentamicin

نتایج حاصل از تعیین مقاومت طبیعی در برابر pH‌های مشابه مقایسه شد.

مقاوم سازی باکتری در برابر غلظت‌های افزایشی صفرا در این مرحله از یک کلنی کاملاً مجزا که از آزمون مرحله قبل در $pH = 2/5$ جدا شده بود کشت تازه ۱۸ ساعته تهیه شد. از این سوسپانسیون غلیظ میکروبی به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در لوله‌های آزمایش محیط کشت MRS حاوی صفرا، تلقیح شد. لوله آزمایش فاقد صفرا به عنوان نمونه کنترل مثبت در نظر گرفته شد. از آنجا که حداکثر زمان مواجهه غذا با صفرا در روده کوچک ۴ ساعت است، به صورت مشابه با شرایط واقعی پس از تلقیح و در زمان‌های صفر، ۲ و ۴ ساعت نمونه برداری انجام گرفت، این کار در غلظت‌های صفر، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۸، ۱ و ۱/۲ درصد صفرا نیز انجام شد، در هر مرحله باکتری جدا شده از غلظت قبل (غلظت کم‌تر صفرا) مجدداً در محیط کشت MRS مایع کشت داده شد و مثل مرحله اول در مرحله بعدی (غلظت بیشتر) استفاده شد. در هر مرحله نیز میزان زنده‌مانی محاسبه شد (Sarkar et al., 2010).

تولید ماست

به منظور تولید ماست سین بیوتیک، شیر خشک بدون چربی (شرکت پگاه مشهد، ایران) به میزان ۱۱ درصد با آب ۴۰ درجه سانتی‌گراد (وزنی/وزنی) مخلوط و پس از یکنواخت شدن، ۱/۵ درصد پودر زایلوالیگو ساکارید (سانتوری، ژاپن) به عنوان ماده پری‌بیوتیک به مخلوط اضافه شد. مخلوط نهایی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد پاستوریزه و به سرعت تا دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد خنک گردید. سپس مطابق دستورالعمل سازنده، ۰/۱ درصد وزنی استارتر ماست YoFlex-YF-L904 (کریستین هانسن دانمارک) و نیز از هر سویه باکتری پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس پلاتناروم و لاکتوباسیلوس فرمنتوم) سلول‌های تیمار شده و تیمار نشده به صورت

سوسپانسیون غلیظ میکروبی مشابه با مراحل قبل تهیه و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به محیط کشت MRS مایع حاوی ۲ و ۴ درصد وزنی/وزنی NaCl (نمک طعام) به صورت جداگانه تلقیح شد. نمونه‌ها برای مدت یک ماه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و به صورت هفتگی شمارش تعداد سلول زنده در محیط کشت MRS جامد انجام شد (Chiu et al., 2007). شمارش کلی کلنی‌های رشد یافته نمایانگر مقاومت باکتری‌های مورد نظر به تنش سرما و نمک بود.

مقاوم سازی به تنش‌های نمک و سرما

به منظور مقاوم سازی باکتری‌های لاکتوباسیلوس پلاتناروم و لاکتوباسیلوس فرمنتوم در برابر سرما و نمک، مطابق مراحل قبل یک سوسپانسیون غلیظ میکروبی تهیه و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر تا کدورت ۰/۵ مک‌فارلند به محیط کشت MRS مایع حاوی ۲ درصد وزنی/وزنی NaCl تلقیح شد، پس از چهار هفته از محیط کشت MRS مایع حاوی ۲ درصد نمک بروی محیط کشت MRS جامد کشت داده شد و یک کلنی رشد یافته بر روی محیط MRS جامد جدا و از آن کشت تازه ۱۸ ساعته در محیط MRS مایع تهیه شد (Sarkar et al., 2010; Settachaimongkon et al., 2015).

مقاوم سازی باکتری با استفاده از غلظت‌های افزایشی اسید در این مرحله باکتری‌های جدا شده از مرحله قبل (غلظت ۴ درصد نمک) در مقابل غلظت‌های افزایشی اسید از کم به زیاد قرار گرفت، به صورتی که باکتری جدا شده از مرحله قبل (pH بیشتر) پس از کشت شبانه در مرحله بعد (pH کم‌تر) مورد استفاده قرار گرفت. در هر مرحله پس از تلقیح باکتری و تنظیم دانسیته نوری، در زمان‌های صفر، ۲ و ۴ ساعت پس از تلقیح، تعداد باکتری شمارش و هم زمان دانسیته نوری قرائت شد (Sarkar et al., 2010). نتایج با

تمامی تیمارها در سه تکرار انجام پذیرفت. تجزیه تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار مینی تب^۱ ۱۷ در سطح اطمینان ۹۵ درصد و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن انجام پذیرفت. کلیه نمودارها با استفاده از نرم افزار اکسل ۲۰۱۶ رسم شد.

نتایج

ارزیابی مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها
نتایج آزمون مقاومت آنتی بیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس فرمنتوم به عنوان یکی از مهمترین شاخص‌های پروبیوتیکی در جدول ۱، آورده شده است. لاکتوباسیلوس پلانتاروم نسبت به بازدارنده‌های سنتز دیواره به خصوص کوآموکسی کلاو و تتراسایکلین حساس بود ولی در برابر بازدارنده‌های سنتز نوکلئیک اسید، نظیر ونکومایسین کاملاً مقاوم و در برابر پنی‌سیلین، جنتاماسین و آموکسی سیلین مقاومت نسبتاً خوبی داشت. سوبه لاکتوباسیلوس فرمنتوم نسبت به کوآموکسی کلاو حساس بود، و نسبت به تتراسایکلین حساسیت نسبی داشت. همچنین بر خلاف لاکتوباسیلوس پلانتاروم نسبت به پنی سیلین و اریترو مایسین کاملاً مقاوم بود.

جداگانه و به میزان حداقل 10^7 CFU/ml به ترکیب افزوده شد. در مجموع ۴ نوع ماست تولید و در ظرف های پلی اتیلنی درب دار توزیع شد، پس از رسیدن به $pH=4/2$ از گرمخانه خارج و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا پایان مدت زمان پژوهش نگهداری شد (Tamime et al., 2005; Shah et al., 1997).

شمارش تعداد باکتری‌های پروبیوتیک در طول دوره نگهداری ماست و پس از مصرف در نمونه مدفوع شمارش تعداد باکتری‌های پروبیوتیک در ماست و در نمونه مدفوع مصرف کنندگان در محیط کشت MRS جامد حاوی ۰/۰۲ درصد وزنی/وزنی سدیم ازآید و در بازه زمانی یک هفته‌ای به مدت چهار هفته انجام شد (Shah et al., 2000, 2007). شرکت کنندگان در پژوهش به چهار دسته ۵ نفری تقسیم شدند که به ترتیب ماست حاوی لاکتوباسیلوس پلانتاروم تیمار نشده، لاکتوباسیلوس پلانتاروم تیمار شده، لاکتوباسیلوس فرمنتوم تیمار نشده و لاکتوباسیلوس فرمنتوم تیمار شده را به مدت ۴ هفته، روزانه به میزان ۱۰۰ گرم مصرف کردند. قبل از شروع آزمون و به صورت هفتگی تا پایان ۴ هفته مصرف منظم ماست، نمونه مدفوع آن‌ها جمع آوری و تعداد سلول‌های زنده لاکتوباسیلوس در آن‌ها شمارش گردید. شرکت کنندگان در طول دوره مداخله هیچ فرآورده تخمیری لبنی مصرف نکردند.

اندازه‌گیری میزان اسیدیته و pH

اندازه‌گیری میزان اسیدیته به روش دورنیک و اندازه‌گیری pH با استفاده از pH متر (WTW، آلمان) در بازه زمانی یک هفته‌ای در طول چهار هفته انجام پذیرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

1. Minitab

جدول ۱- میزان حساسیت سلول های باکتری در برابر آنتی بیوتیک های رایج

نام سویه	حساس	نسبتاً حساس	مقاوم
لاکتوباسیلوس ATCC پلانتاروم 14917	کوآموکسی کلاو (۳۰ میکروگرم) تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، اریترومايسين (۱۵ میکروگرم)	پنی سیلین (۱۰ میکروگرم) جنتاماسین (۱۰ میکروگرم)	ونکومايسين (۳۰ میکروگرم)
لاکتوباسیلوس فرمنتوم ATCC 14937	کوآموکسی کلاو (۳۰ میکروگرم)	آموکسی سیلین (۲۵ میکروگرم) آموکسی سیلین (۲۵ میکروگرم) تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم) جنتاماسین (۱۰ میکروگرم)	ونکومايسين (۳۰ میکروگرم) پنی سیلین (۱۰ میکروگرم) اریترومايسين (۱۵ میکروگرم)

سلولی است. علاوه بر این، سلول نتوانسته است سیستم آنزیمی هیدرولیز نمک های صفراوی را بازیابی نماید و پس از چهار ساعت جمعیت آن ها به طور معنی داری کاهش پیدا کرده است. با افزایش غلظت صفرا و زمان، جمعیت سلولی کاهش پیدا کرد که این کاهش در سویه لاکتوباسیلوس پلانتاروم بیشتر از لاکتوباسیلوس فرمنتوم مشاهده گردید.

آزمون تعیین مقاومت طبیعی لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس فرمنتوم به نمک و سرما

بر اساس نتایج آزمون بررسی میزان مقاومت لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس فرمنتوم به تنش هم زمان سرما و نمک میزان زنده ماندن هر دو سویه در غلظت کمتر نمک بیشتر بود و با افزایش زمان نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد از جمعیت میکروبی کاسته شد. بر اساس نتایج، مقاومت سویه لاکتوباسیلوس فرمنتوم در مقایسه با سویه لاکتوباسیلوس پلانتاروم بالاتر بود. جمعیت سلولی سویه لاکتوباسیلوس پلانتاروم در غلظت ۴ درصد نمک و پس از ۴ هفته بیش از یک سیکل لگاریتمی کاهش داشت در حالی که در سویه لاکتوباسیلوس فرمنتوم این کاهش کمتر از یک سیکل لگاریتمی بود. به طور کلی میزان زنده ماندن سویه هایی که ابتدا در غلظت ۲ درصد نمک کشت داده شده بودند در برابر غلظت ۴ درصد نمک و مدت زمان ۴ هفته نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد به نسبت سویه های تیمار نشده

آزمون تعیین مقاومت طبیعی باکتری ها در برابر غلظت های مختلف اسید

نتایج آزمون اندازه گیری مقاومت طبیعی باکتری های لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس فرمنتوم در pH های مختلف نشان داد که اگر چه جمعیت میکروبی در لحظه تلقیح در کلیه تیمارها حدوداً یکسان بوده، اما در $pH=2/5$ تعداد سلول زنده در لحظه تلقیح باکتری در محیط کشت به میزان قابل توجهی کاهش یافته است. این پدیده می تواند به دلیل مواجه شدن ناگهانی سلول با غلظت زیاد اسید باشد، در ابتدا سلول های حساس تر به طور کامل تحت تأثیر قرار گرفته اند، با افزایش زمان از جمعیت سلولی کاسته شد ولی با کاهش غلظت اسید به تدریج جمعیت سلولی افزایش یافت به طوری که بیشترین افزایش جمعیت در $pH=5/5$ و پس از ۴ ساعت مشاهده شد.

آزمون تعیین مقاومت طبیعی لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس فرمنتوم در برابر صفرا

نتایج حاصل از آزمون مقاومت طبیعی لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس فرمنتوم به صفرا نشان داد که در غلظت ۱/۲٪ صفرا، پس از گذشت چهار ساعت از زمان تلقیح، جمعیت سلولی در هر دو سویه به میزان حدود یک سیکل لگاریتمی کاهش یافت. علت این پدیده ناشی از غلظت زیاد صفرا و به طبع آن آسیب به ساختار دیواره

به طرز معنی داری بیشتر بود، همچنین این افزایش مقاومت در سویه لاکتوباسیلوس فرمنتوم بیشتر از سویه لاکتوباسیلوس پلانتاروم بود. بر این اساس در غلظت ۴ درصد نمک و پس از پایان ۴ هفته جمعیت سلولی سویه لاکتوباسیلوس فرمنتوم تیمار شده با غلظت کمتر نمک (۲ درصد) تقریباً ثابت باقی ماند در حالی که بیشترین کاهش جمعیت سلولی در سویه لاکتوباسیلوس پلانتاروم تیمار نشده با بیش از یک سیکل لگاریتمی مشاهده شد.

تیمار باکتری‌ها در برابر تنش اسید

مقایسه میزان مقاومت باکتری مواجه شده با تنش‌های با شدت کمتر از حد کشندگی در مقابل مقاومت طبیعی باکتری در pH یکسان بیانگر افزایش قابل توجه میزان مقاومت باکتری در مقابل تنش‌های یاد شده در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده است. نتایج به دست آمده نشان می‌دهند، باکتری جدا شده از تیمار با pH بیشتر پس از تلقیح در pH کمتر نرخ زنده‌مانی زیادتری در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده نشان داد، روند کلی حاکی از افزایش معنی‌دار تعداد سلول زنده مانده در مقایسه با مقاومت طبیعی سلول در pH یکسان است. اگر چه تعداد سلول زنده در سویه‌های تیمار نشده در $pH=2/5$ دقیقاً پس از تلقیح کاهش یافت، اما سلول‌های جدا شده از تیمار با $pH=3/5$ که در $pH=2/5$ کشت داده شده بودند علی‌رغم کاهش جمعیت، مقاومت بیشتری در برابر pH کم نشان دادند و میزان زنده‌مانی آن‌ها در هر دوسویه در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده بیشتر بود. علاوه بر این در $pH=5/5$ نیز سلول‌ها ۴ ساعت پس از تلقیح رشد بیشتری در مقایسه با سلول تیمار نشده داشتند که بیانگر ایجاد مقاومت در سلول‌ها در برابر غلظت‌های بیشتر اسید است. افزایش میزان زنده‌مانی در سویه لاکتوباسیلوس فرمنتوم بیشتر بود.

تیمار باکتری‌ها در برابر تنش صفرا

باکتری جدا شده از تیمار مقاوم سازی در برابر اسید برای شروع آزمون تنش صفرا مورد استفاده قرار گرفت. از آنجا که در دستگاه گوارش نیز ابتدا سلول در مقابل اسید معده قرار گرفته و پس از آن در بخش اول روده کوچک با نمک‌های صفراوی مواجه می‌شود، در این پژوهش نیز ترتیب آزمایش‌ها به همین صورت طراحی شد. نتایج آزمون مقاوم سازی در برابر غلظت‌های افزایشی صفرا نشان داد که میزان جمعیت باکتری‌های تیمار شده در مقایسه با باکتری تیمار نشده، در غلظت یکسان بیشتر بوده است. این افزایش جمعیت که می‌توان به افزایش مقاومت سلول در برابر صفرا تعبیر نمود در تیمارهای دیگر روند کلی مشابهی داشت، به طوری که جمعیت سلولی تا ۴ ساعت پس از تلقیح و در غلظت‌های بالاتر صفرا کاهش داشته است. بر اساس نتایج به دست آمده باکتری در غلظت‌های کمتر صفرا، رشد بالاتری نشان داده است. این پدیده می‌تواند ناشی از بازیابی چرخه‌های متابولیزه کردن صفرا باشد. بر اساس نتایج به دست آمده از آزمون مواجهه سازی هر دو سویه باکتری با غلظت‌های افزایشی صفرا، مقاومت سلول در برابر این تنش افزایش یافته که این افزایش تنها در سویه لاکتوباسیلوس فرمنتوم معنی‌دار بود به صورتی که سلول تیمار شده توانسته است در غلظت $1/2$ ٪ صفرا پس از ۴ ساعت مقاومت بیشتری از نمونه تیمار نشده نشان دهد. افزایش میزان زنده‌مانی در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده برای سویه لاکتوباسیلوس پلانتاروم معنی‌دار نبود.

شمارش تعداد سلول‌های زنده در ماست و نمونه مدفوع مصرف‌کنندگان

تعداد سلول‌های زنده لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس فرمنتوم در نمونه‌های ماست به صورت شمارش هفتگی در جدول ۲، آورده شده است. نتایج نشان داد میزان زنده‌مانی سلول‌های تیمار شده لاکتوباسیلوس فرمنتوم به طور معنی‌داری در مقایسه با نمونه‌های تیمار نشده افزایش

نمونه های مدفوع افراد نشان دهنده افزایش معنی دار تعداد سلول های زنده در نمونه حاوی سلول های تیمار شده در مقایسه با سلول تیمار نشده است، که این افزایش در نمونه حاوی لاکتوباسیلوس فرمنتوم بیشتر بود.

یافته است، همچنین میزان افزایش زنده مانگی در ماست حاوی لاکتوباسیلوس پلاتناروم به عنوان کشت پروبیوتیک همراه نیز معنی دار است. نتایج شمارش تعداد سلول های زنده لاکتوباسیلوس پلاتناروم و لاکتوباسیلوس فرمنتوم در

جدول ۲- شمارش تعداد سلول های زنده در ماست سین بیوتیک و مدفوع کنندگان (حروف متفاوت نمایانگر اختلاف در سطح اطمینان ۹۵ درصد در هر سطر است. نتایج میانگین سه تکرار (Mean \pm SD) است).

زمان	تعداد باکتری تیمار نشده (log CFU/ml)					تعداد باکتری تیمار شده (log CFU/ml)				
	روز اول	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم	روز اول	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم
ماست حاوی لاکتوباسیلوس پلاتناروم	±۰/۱۱	±۰/۱۸	±۰/۱۲	±۰/۱۲	±۰/۱۵	±۰/۱۹	±۰/۱۳	±۰/۲۱	±۰/۱۷	±۰/۱۶
ماست حاوی لاکتوباسیلوس فرمنتوم	±۰/۱۲	±۰/۱۴	±۰/۱۶	±۰/۱۷	±۰/۱۱	±۰/۱۹	±۰/۱۹	±۰/۲۱	±۰/۱۴	±۰/۱۳
مدفوع حاوی لاکتوباسیلوس پلاتناروم	±۰/۱۵	±۰/۱۳	±۰/۱۹	±۰/۰۸	±۰/۱۵	±۰/۱۴	±۰/۱۴	±۰/۱۴	±۰/۱۸	±۰/۱۸
مدفوع حاوی لاکتوباسیلوس فرمنتوم	±۰/۱۷	±۰/۱۳	±۰/۱۵	±۰/۲۳	±۰/۰۶	±۰/۱۹	±۰/۲۴	±۰/۱۱	±۰/۱۷	±۰/۱۹

بحث

مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بیانگر مقاومت باکتری لاکتوباسیلوس کازئی در برابر کلیه آنتی بیوتیک های مورد بررسی بود (Erduogru et al., 2006). در میان انواع آنتی بیوتیک، مقاومت به ونکومایسین از جمله مهم ترین ویژگی های باکتری های پروبیوتیک به شمار می رود. دلیل این پدیده، به واسطه عملکرد ویژه ونکومایسین در برابر عفونت های حاد ناشی از پاتوژن های مقاوم به داروهای ترکیبی است. یکی دیگر از مهمترین خصوصیات باکتری های پروبیوتیک مقاومت نسبی در برابر اسید معده و صفرا در روده کوچک است، تا پس از طی این مراحل در روده کوچک جایگزین شوند. در بسیاری از میکروارگانیسم ها، قرار گرفتن در معرض یک تنش با شدت

یکی از مهم ترین پارامترها در تعیین خصوصیات پروبیوتیک ها مقاومت آن ها به آنتی بیوتیک ها است که در این پژوهش هر دو سویه لاکتوباسیلوس پلاتناروم و لاکتوباسیلوس فرمنتوم مقاومت خوبی به آنتی بیوتیک های رایج نشان دادند. نتایج فوق، با نتایج ویرسا و همکاران (۲۰۰۶) مطابقت داشت (Vriese et al., 2006). در پژوهش اردوگرل و همکاران (۲۰۰۶) مقاومت سویه های لاکتوباسیلوس کازئی^۱ و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس^۲ جدا شده از انواع ماست و پنیر در برابر انواع آنتی بیوتیک های (توبرامایسین^۳، سفالوتین^۴، ونکومایسین^۵ و آمپی سیلین^۶)

1. *Lactobacillus casei*
2. *Lactobacillus bulgaricus*
3. Tobramycin
4. Cephalothin

5. Vancomycin
6. Ampicillin

تائوروداکسیکولات^۱ (یکی از نمک‌های صفراوی) سطوح مختلفی از فعالیت سیستم هیدرولیز صفرا را نشان داد، این پژوهشگران گزارش نمودند در برخی از سلول‌های باکتریایی فعالیت سیستم هیدرولیز صفرا به میزان معنی داری بیشتر بوده که در نتیجه سلول مقاومت بیشتری را به غلظت‌های بیشتر و زمان‌های طولانی‌تر مواجه شده با این نمک صفراوی نشان داد (Taranto et al., 2006). بگلی و همکاران (۲۰۰۵)، غلظت صفرا را در روده کوچک در حدود ۰/۶ درصد گزارش کردند، آن‌ها کاهش کمتر از یک سیکل لگاریتمی جمعیت لاکتوباسیلوس پلانناروم پروبیوتیک را در مقابل این غلظت از صفرا گزارش کردند که با نتایج به دست آمده در این پژوهش مطابقت دارد (Begley et al., 2005). بر اساس مطالعات دی آنجلس (۲۰۰۴)، قرار دادن برخی از گونه‌های لاکتوباسیلوس در معرض تنش مشابه با تنش‌های مورد استفاده در این پژوهش با شدت کمتر از حد کشندگی، زنده‌مانی آن‌ها را در مقابل تنش‌های بعدی چه در آزمایشگاه و چه در فرآیند‌های تولید ماده غذایی افزایش می‌دهد (De Angelis et al., 2004). مهم‌ترین عامل در ایجاد توانایی مقابله با صفرا در باکتری‌های تولیدکننده اسید لاکتیک سیستم تجزیه نمک‌های صفراوی است. مطالعات نشان داد این سیستم در زمان مواجه شدن با تنش‌های دیگر مثل دمای کم و pH کم نیز فعال می‌شود (Begley et al., 2001; Wouters et al., 2010). تحقیقات مشابهی افزایش نرخ زنده‌مانی سلول‌های جنس لاکتوباسیلوس مواجه شده با غلظت‌های کمتر از حد کشندگی صفرا را در کسب مقاومت در برابر غلظت‌های بیشتر صفرا در روده کوچک گزارش کردند. که این نتایج با نتایج به دست آمده در این پژوهش انطباق داشت (Watanabe et al., 2012). بر اساس مطالعات انجام شده استفاده از مواد پروبیوتیک و همچنین استفاده از تنش‌های کمتر از حد کشندگی در کشت همراه

کمتر از حد کشندگی، باعث مقاومت به همان تنش کشنده می‌شود (Sarkar et al., 2010). نتایج این پژوهش بیانگر افزایش میزان زنده‌مانی هر دو سویه پس از مواجهه با دوز کمتر از حد کشندگی تیمارهای اسیدی، صفرا، نمک و سرما بود. در مواجه شدن با تنش اسیدی میزان زنده‌مانی با افزایش pH افزایش یافت که این پدیده به دلیل وجود زمان کافی برای فعال شدن مکانیسم‌های دفاعی و همچنین پدیده انتخاب طبیعی است. این افزایش تعداد سلول زنده شمارش شده که به عنوان افزایش مقاومت تفسیر می‌شود می‌تواند ناشی از فعال شدن سیستم‌های مقابله با اسید در تنش مرحله قبل باشد که در این مرحله باعث بهبود سازگاری سلول با غلظت بیشتر اسید شده است. پارتی و همکاران (۲۰۱۰)، غیر فعال شدن ۱۴ گونه لاکتوباسیلوس را در $pH \leq 3$ گزارش کردند (Parente et al., 2010). مصلحی و همکاران (۲۰۱۰)، نیز وجود سلول‌های حساس‌تر در یک جمعیت از باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس را گزارش نمودند، آن‌ها همچنین امکان استفاده از پدیده انتخاب طبیعی را در جداسازی سلول‌های مقاوم به تنش مطرح نمودند (Moslehi-Jenabian et al., 2009). دینگ و همکاران (۲۰۰۷)، تأثیر $pH \leq 2/5$ را بر کاهش ۸ گونه مختلف لاکتوباسیلوس مورد بررسی قرار دادند و به نتایج مشابهی دست یافتند (Ding et al., 2007). صفرا در روده کوچک نیز یکی دیگر از عوامل محدودکننده زنده‌مانی باکتری‌های در دستگاه گوارش است که از طریق برهم زدن ساختار دولایه فسفولیپیدی غشاء سلولی باعث مرگ سلولی می‌شود. سلول‌های باکتری‌های پروبیوتیک دارای مکانیسم محافظتی مختلفی در برابر صفرا هستند که یکی از آن‌ها سیستم‌ها سیستم هیدرولیز صفرا است، بر اساس مطالعات تارانگو و همکاران (۲۰۰۶)، لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر گونه بولگاریکوس تیمار شده با غلظت‌های مختلف

1. Taurodeoxycholate

- and bile. *FEMS Microbiol Rev.* 29: 625-651.
2. Bove, P., V. Capozzi, C. Garofalo, A. Rieu, G. Spano and Fiocco, D. 2012. Inactivation of the *ftsH* gene of *Lactobacillus plantarum* WCFS1: effects on growth, stress tolerance, cell surface properties and biofilm formation. *Microbiol Res.* 167: 187-193.
 3. Chiu, H.H., Tsai, C.C., Hsih, H.Y., Tsen, H. Y. 2007. Screening from pickled vegetables the potential probiotic strains of lactic acid bacteria able to inhibit the *Salmonella* invasion in mice, *J Appl Microbiol.* 104: 605-612.
 4. Coman, M. M., C. Cecchini, M. C. Verdenelli, S. Silvi, C. Orpianesi and Cresci, A. 2012. Functional foods as carriers for SYN BIO, a probiotic bacteria combination. *Int J Food Microbiol.* 157: 346-352.
 5. Dave, R. I. and Shah, N. P. 1997. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *Int Dairy J* 7: 31-41.
 6. De Angelis, M., R. Di Cagno, C. Huet, C. Crecchio, P. F. Fox and Gobbetti, M. 2004. Heat Shock Response in *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol.* 70: 1336-1346.
 7. Ding, W. K. and Shah, N. P. 2007. Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *J Food Sci.* 72: 446-450.
 8. Erduogrul Z, Erbulur. F. 2006. Isolation and Characterization of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* from Various Foods. *Turk J Biol.* 30: 39-44.
 9. Maragkoudakis, P.A., G. Zoumpopoulou, Ch. Miaris, G. Kalantzopoulos, B. P., and Tsakalidou. E. 2005. Probiotic potential of

پروبیوتیک منجر به افزایش زندهمانی سلولها می شود (Dave et al., 1997; Scherezenmeir et al., 2001)

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان دهنده افزایش مقاومت باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم و لاکتوباسیلوس فرمنتوم به عنوان باکتری شاخص پروبیوتیک با استفاده از اعمال تنش های کمتر از حد کشندگی است. بر اساس نتایج به دست آمده نرخ بقاء باکتری در ماست به عنوان یک محصول تخمیری حامل باکتری پروبیوتیک با استفاده از تیمارهای اعمال شده به طرز معنی داری افزایش یافت، این افزایش تعداد سلول زنده مانده منجر به بهبود عملکرد باکتری و بروز بیشتر خصوصیات مطلوب سلامت زای آن برای انسان می شود. بر اساس نتایج این پژوهش هر دو باکتری لاکتوباسیلوس پلانتروم و لاکتوباسیلوس فرمنتوم می توانند به عنوان کشت همراه در محصولات پروبیوتیک مورد استفاده قرار گیرند، البته باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم مقاومت بیشتر در برابر تنش ها از خود نشان داد. در مجموع بر اساس نتایج به دست آمده در این پژوهش، می توان محصولات فراسودمند نوینی را که شرایط نگهداری و تولید آنها برای این دسته از باکتری ها مرگ آور بوده و قبلاً امکان تولید بهینه آنها میسر نبوده را تولید کرد.

تشکر و قدردانی

مقاله علمی _ پژوهشی حاضر مستخرج از رساله دکتری با کد ۳۷۹۳۸ مصوب در دانشگاه فردوسی مشهد است. نویسندگان مقاله بر خود لازم می دانند که از جناب آقای دکتر احمد یراقی استاد محترم گروه بی هوشی و مراقبت های ویژه دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به دلیل کمک های بی دریغشان در این پژوهش صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

1. Begley, M., Gahan, C.G. and Hill, C. 2005. The interaction between bacteria

- formation in set-yoghurt. Food Microbiol. 49: 104-115.
18. Shah, N. P. and Lankaputhra, W. E. V. 1997. Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in yogurt. Int Dairy J. 7: 349-356.
 19. Shah, N. P., 2000. Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. J Dairy Sci. 83: 894-907.
 20. Shah, N. P. 2007. Functional cultures and health benefits. Int Dairy J. 17: 1262-1277.
 21. Tamime, A. Y. 2005. Probiotic dairy products, Wiley Online Library. New York.
 22. Taranto, M. P., G. Perez-Martinez and Valdez, G. 2006. Effect of bile acid on the cell membrane functionality of lactic acid bacteria for oral administration. Res Microbiol. 157: 720-725.
 23. Vriesa, M. C. d., E. E. Vaughan, M. Kleerebezemans and Vos, W. M. d. 2006. *Lactobacillus plantarum* survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. Int Dairy J. 16: 1018-1028.
 24. Watanabe, M., S. van der Veen, H. Nakajima and Abee, T. 2012. Effect of respiration and manganese on oxidative stress resistance of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. Microbiol. 158: 293-300.
 25. Wouters, J. A., H. Frenkiel, W. M. de Vos, O. P. Kuipers and Abee, T. 2001. Cold shock proteins of *Lactococcus lactis* MG1363 are involved in cryoprotection and in the production of cold-induced proteins. Appl Environ Microbiol. 67: 5171-5178.
 - Lactobacillus strains isolated from dairy products. Int Dairy J. 16:189-199.
 10. Morelli L. 2000. In vitro selection of probiotic lactobacilli: A critical appraisal. Curr Issues Intest Microbiol. 2: 59-67.
 11. Moslehi-Jenabian, S., K. Gori and Jespersen, L. 2009. AI-2 signalling is induced by acidic shock in probiotic strains of *Lactobacillus* spp. Int J Food Microbiol. 135: 295-302.
 12. Nissen, L., W. Chingwaru, B. Sgorbati, B. Biavati and Cencic, A. 2009. Gut health promoting activity of new putative probiotic/protective *Lactobacillus* spp. strains: A functional study in the small intestinal cell model. Int J Food Microbiol. 135: 288-294.
 13. Parente, E., F. Ciocia, A. Ricciardi, T. Zotta, G. E. Felis and Torriani, S. 2010. Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: A multivariate screening study. Int J Food Microbiol. 144: 270-279.
 14. Sahadeva, R., Leong, S., Chua, K., Tan, C., Chan, H., Tong, E., Wong, S. and Chan, H. 2011. Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. Int Food Res J. 18: 1515-1522.
 15. Sarkar, S. 2010. Approaches for enhancing the viability of probiotics: A review. Br Food J 112: 329-349.
 16. Scherezzenmeir, J., De Verse, M. 2001. Probiotics, and synbiotics-approaching a definition. Am J Clin Nutr. 73: 361-364.
 17. Settachaimongkon, S., Van Valenberg, H. J. F., Winata, V., Wang, X., Nout, M. J. R., Van Hooijdonk, T. C. M., Zwietering, M. H. and Smid, E. J. 2015. Effect of sublethal preculturing on the survival of probiotics and metabolite

Comparison of the effects of sub-lethal stresses on viability of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* used as an adjunct culture in synbiotic yoghurt and digestion system

Noorbakhsh H¹, Yavarmanesh M^{2*}, Mortazavi A³, Moazzami A⁴, Adibi P⁵

1. PhD Student of Food Science and Technology, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

2. Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

3. Department of Molecular Sciences, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.

4. Department of internal medicine, Medical University of Isfahan, Isfahan, Iran.

*Corresponding author: yavarmanesh@um.ac.ir

Accepted: 12 September 2017

Received: 09 April 2017

Abstract

Probiotics are defined as a live microorganism that when administered in an adequate amount promote the health status of consumers. The most important challenge in consumption of probiotics is how to keep them alive during food processing and through the digestion system. The aim of this study is the comparison of the effects of sub-lethal pre-culturing on the viability of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum*. In this study the effect of sub-lethal stresses such as low pH (2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5), Salt (2, 4 %), bile (0.2, 0.4, 0.8, 1 and 1. %) and Cold (4 °C) on increasing of viability of cells was investigated. The survival rate of treated and untreated cells in yogurt and digestion system using the enumeration of viable cells was also comprised. The results showed that sub-lethal pre-culturing had a significant effect on the viability of cells ($P \leq 0.05$). The viability of treated cells was increased in all stresses, moreover, the number viable cells in the stool sample of consumers showed a significant increase after one-month consumption of yogurt. The results demonstrate that sub-lethal pre-culturing was led to increasing the number of viable cells in all mentioned stresses, while the increasing rate of viability was different between two bacteria.

Keywords: Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, Yoghurt, Viability.