مقایسه اثر اعمال تنش های کمتر از حد کشندگی بر زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* استفاده شده به عنوان کشت همراه در ماست سین‌بیوتیک و دستگاه گوارش مصرف‌کنندگان

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 دریافت: ۱۳۹۶/۰۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۲۱

چکیده

پروبیوتیک‌ها میکرواورگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در صورت مصرف به تعداد کافی باعث افزایش سطح سلامت مصرف کننده می‌شوند، 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 تنش‌های کمتر از حد کشندگی بر زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* در ماست سین‌بیوتیک است. در این پژوهش اثر تنش‌های اسیدی (pH های ۲/۵، ۳/۵، ۴/۵، ۵/۵و۶/۵)، 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 باکتری‌ها بررسی شد. میزان زنده‌مانی سویه‌های 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 تنش‌های کمتر از حد کشندگی بر افزایش مقاومت باکتری‌ها بود ($P\leq0.05$). میزان مقاومت هر دو سویه در برابر تنش‌های اسیدی، نمک، صفرا و سرما افزایش یافت، علاوه بر این تعداد سلول‌های زنده *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* پس از یک ماه مصرف ماست در مدفوع مصرف کنندگان افزایش نشان داد. نتایج نشان داد به طور کلی استفاده از تنش‌های کمتر از حد کشندگی باعث افزایش زنده‌مانی باکتری‌ها در مواجه با تنش‌های گوارشی و سرما می‌شود، البته میزان افزایش زنده‌مانی در بین سویه‌های مختلف متفاوت بود.

واژگان کلیدی: پروبیوتیک، پری‌بیوتیک، سین‌بیوتیک، ماست، زنده مانی.

مقدمه

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 می‌شوند فراسودمند[۱] می‌گویند (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، فرآورده‌های پروبیوتیک است (Tamime et al., 2005). پروبیوتیک‌ها به دسته‌ای از میکرواورگانیسم‌های سودمند زنده اطلاق می‌شود که در صورت مصرف به میزان کافی، باعث افزایش سطح سلامت مصرف کننده می‌شوند. از مهم‌ترین اثرات مواد غذایی پروبیوتیک، می‌توان به بهبود عملکرد سیستم گوارش و حفظ تعادل سیستم‌های متابولیک بدن اشاره نمود. پری‌بیوتیک‌ها ترکیباتی عمدتاً پلی ساکاریدی هستند که توسط دستگاه گوارش انسان قابل هضم نبوده و به طور انتخابی باعث افزایش رشد باکتری‌های پروبیوتیک می‌شوند.

1. Functional Foods

به ماده غذایی که به طور همزمان حاوی باکتری های پروبیوتیک و ترکیبات پری‌بیوتیک باشد، فرآورده سین‌بیوتیک[1] 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 صفراوی 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*[2] باکتری میله ای کوتاه، پر نیاز و غیر بیماری‌زا است که دارای بزرگ‌ترین ژنوم شناخته شده در بین گروه باکتری‌های اسید لاکتیک 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*[3] یکی دیگر از مهمترین جنس‌های خانواده لاکتوباسیلوس است که به طور گسترده در خمیر 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 فرآورده‌های لبنی تخمیری است که به وسیله تخمیری لاکتیکی دو باکتری آغازگر *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*[4] و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*[5] 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 وکارا 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 زایلوالیگوساکارید[6] 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 آموزشی پزشکی ایران به

1 .Synbiotic
2 .*Lactobacillus plantarum*
3 .*Lactobacillus fermentum*
4 .*Lactobacillus acidophilus*
5 .*Streptococcus thermophilus*
6 .Xylooligosaccharide

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 پلانتاروم* ATCC 14917 و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* ATCC 14931 در شرایط استریل باز و طبق دستورالعمل موجود در بسته به محیط کشت (MRS) ام ار اس[1] مایع (مرک،آلمان) منتقل و در دمای ۳۷ درجهٔ 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[2]، تتراسایکلین[3]، آموکسی سیلین[4]، ونکومایسین[5]، اریترومایسین[6]، پنی سیلین[7] و جنتامایسین[8]) 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 پلانتاروم* و *لاکتو باسیلوس فرمنتوم* در برابر pHهای ۲/۵، ۳/۵، ۴/۵، ۵/۵ و ۶/۵، به صورت جداگانه در فواصل زمانی ۰، ۲ و ۴ ساعت پس از تلقیح باکتری به میزان $1/5\times10^{8}$ CFU/ml[9] (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 صفرا

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 صفرا (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 درجهٔ سانتی‌گراد، دارای ۱۰٪ حجمی دی‌اکسیدکربن گرمخانه گذاری شد (Bove et al., 2012; Begley et al., 2005). شمارش کلی کلنی‌های رشد یافته نمایانگر مقاومت باکتری‌های مورد نظر به نمک صفراوی در هر غلظت بود.

آزمون تعیین مقاومت طبیعی باکتری‌ها در برابر نمک و سرما

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

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

9 .Colony Forming Unit

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 درجهٔ 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 *لاکتو باسیلوس پلانتاروم* و *لاکتو باسیلوس 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 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 =۲/۵ 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 مواجه 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 درجهٔ 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 درجهٔ سانتیگراد پاستوریزه و به سرعت تا دمای ۴۳ درجهٔ 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 پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*) سلول‌های تیمار شده و تیمار نشده به صورت

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=۴/۲ از گرمخانه خارج و در دمای ۴ درجهٔ 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 *لاکتو باسیلوس 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 *لاکتو باسیلوس* در آن ها 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

تمامی تیمارها در سه تکرار انجام پذیرفت. تجزیه تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار مینی تب[1] 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 دیوارهٔ به‌خصوص 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 نسبتا خوبی داشت. سویه *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* نسبت به کوآموکسی کلاو حساس بود، و نسبت به تتراسیکلین حساسیت نسبی داشت. همچنین بر خلاف *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* نسبت به پنی سیلین و اریترو مایسین کاملاً مقاوم بود.

1. Minitab

جدول ۱- میزان حساسیت سلول‌های باکتری در برابر آنتی بیوتیک‌های رایج

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

آزمون تعیین مقاومت طبیعی باکتری‌ها در برابر غلظت‌های مختلف اسید

نتایج آزمون اندازه‌گیری مقاومت طبیعی باکتری‌های *لاکتو باسیلوس پلانتاروم* و *لاکتو باسیلوس فرمنتوم* در pH های مختلف نشان داد که اگر چه جمعیت میکروبی در لحظه تلقیح در کلیه تیمارها حدوداً یکسان بوده، اما در pH=۲/۵ تعداد سلول زنده در لحظه تلقیح باکتری در محیط کشت به میزان قابل توجهی کاهش یافته است. این پدیده می‌تواند به دلیل مواجه شدن ناگهانی سلول با غلظت زیاد اسید باشد، در ابتدا سلول‌های حساس‌تر به طور کامل تحت تأثیر قرار گرفته‌اند، 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=۵/۵ 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 سلولی است. علاوه بر این، سلول نتوانسته است سیستم آنزیمی هیدرولیز نمک‌های صفراوی را بازیابی نماید و پس از چهار ساعت جمعیت آن‌ها 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 *لاکتو باسیلوس پلانتاروم* و *لاکتو باسیلوس فرمنتوم* به تنش هم‌زمان سرما و نمک میزان زنده‌مانی هر دو سویه در غلظت کمتر نمک بیشتر بود و با افزایش زمان نگهداری در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد 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 زنده‌مانی سویه‌هایی 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 درجهٔ سانتی‌گراد به نسبت سویه های تیمار نشده

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) تقریبا 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=۲/۵ دقیقاً پس از تلقیح کاهش یافت، اما سلول‌های جدا شده از تیمار با pH= ۳/۵ که در pH=۲/۵ کشت داده شده بودند علی رغم 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=۵/۵ 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 غلظت های 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 می توان 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 مواجه 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* معنی دار بود به صورتی که سلول تیمار شده توانسته است در غلظت ۱/۲ ٪ 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* معنی دار نبود.

شمارش تعداد سلول‌های زنده در ماست و نمونه مدفوع مصرف کنندگان

تعداد سلول‌های زنده *لاکتو باسیلوس پلانتاروم* و *لاکتو باسیلوس 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 معنی داری در مقایسه با نمونه‌های تیمار نشده افزایش

یافته است، همچنین میزان افزایش زنده‌مانی در ماست حاوی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به عنوان کشت پروبیوتیک همراه نیز معنی داراست. نتایج شمارش تعداد سلول‌های زنده *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* در نمونه های مدفوع افراد نشان دهنده افزایش معنی دار تعداد سلول‌های زنده در نمونه حاوی سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول تیمار نشده است، که این افزایش در نمونه حاوی *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* بیشتر بود.

جدول ۲- شمارش تعداد سلول‌های زنده در ماست سین‌بیوتیک و مدفوع مصرف کنندگان (حروف متفاوت نمایانگر اختلاف در سطح اطمینان ۹۵ درصد در هر سطر است. نتایج میانگین سه تکرار (Mean ± 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 پلانتاروم*	۸/۰۵^{Aa} ±۰/۱۱	۸/۰۶^{Aa} ±۰/۱۸	۷/۰۷^{Aa} ±۰/۱۲	۶/۳۴^{Bb} ±۰/۱۲	۵/۷۸^{Ba} ±۰/۱۵	۸/۱۱^{Aa} ±۰/۱۹	۸/۱۵^{Aa} ±۰/۱۳	۷/۷۸^{Aa} ±۰/۲۱	۷/۵۴^{Aa} ±۰/۱۷	۷/۰۳^{Ab} ±۰/۱۶
ماست حاوی *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*	۸/۱۵^{Aa} ±۰/۱۲	۸/۲۱^{Aa} ±۰/۱۴	۷/۱۸^{Ab} ±۰/۱۶	۶/۴۸^{Bb} ±۰/۱۷	۶/۰۴^{Bb} ±۰/۱۱	۸/۱۸^{Aa} ±۰/۱۹	۸/۲۳^{Aa} ±۰/۱۹	۸/۰۱^{Aa} ±۰/۲۱	۷/۷۸^{Aa} ±۰/۱۴	۷/۳۳^{Aa} ±۰/۱۳
مدفوع حاوی لاکتو باسیلوس پلانتاروم	۵/۹۵^{Aa} ±۰/۱۵	۶/۱^{Aa} ±۰/۱۳	۶/۲۳^{Ba} ±۰/۱۹	۶/۲۸^{Aa} ±۰/۰۸	۶/۳۲^{Ba} ±۰/۱۵	۶/۱۲^{Aa} ±۰/۱۴	۶/۸۵^{Aa} ±۰/۱۴	۷/۲^{Aa} ±۰/۱۴	۷/۲^{Aa} ±۰/۱۸	۷/۴^{Ab} ±۰/۱۸
مدفوع حاوی لاکتو باسیلوس فرمنتوم	۵/۹۱^{Aa} ±۰/۱۷	۶/۲^{Aa} ±۰/۱۳	۶/۳۱^{Ba} ±۰/۱۵	۶/۳۸^{Ba} ±۰/۲۳	۶/۳۷^{Ba} ±۰/۰۶	۶/۳۱^{Aa} ±۰/۱۹	۶/۹۰^{Aa} ±۰/۲۴	۷/۳۱^{Ab} ±۰/۱۱	۷/۱۹^{Aa} ±۰/۱۷	۷/۸۱^{Ab} ±۰/۱۹

بحث

یکی از مهم‌ترین پارامترها در تعیین خصوصیات پروبیوتیک‌ها مقاومت آن‌ها به آنتی بیوتیک‌ها است که در این پژوهش هر دو سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* مقاومت خوبی به آنتی بیوتیک‌های رایج نشان دادند. نتایج فوق، با نتایج ویریسا وهمکاران (۲۰۰۶) مطابقت داشت (Vriesa et al., 2006). در پژوهش اردوگرل و همکاران(۲۰۰۶) مقاومت سویه‌های *لاکتوباسیلوس کازئی*[1] و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس*.[2] جدا شده از انواع ماست و پنیر در برابر انواع آنتی‌بیوتیک‌های (توبرامایسین[3]، سفالوتین[4]، ونکومایسین[5] و آمپی سیلین[6]) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بیانگر مقاومت باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* در برابر کلیه آنتی بیوتیک‌های مورد بررسی بود (Erduogrul et al., 2006). در میان انواع آنتی بیوتیک، مقاومت به ونکومایسین از جمله مهم‌ترین ویژگی‌های باکتری‌های پروبیوتیک به شمار می رود. دلیل این پدیده، به واسطه عملکرد ویژه ونکومایسین در برابر عفونت‌های حاد ناشی از پاتوژن های مقاوم به داروهای ترکیبی است. یکی دیگر از مهمترین خصوصیات باکتری‌های 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 میکروارگانیسم‌ها، قرار گرفتن در معرض یک تنش با شدت

1. .*Lactobacillus casei*
2. *Lactobacillus bulgaricus*
3 Tobramycin
4 .Cephalothin
5. Vancomycin
6 .Ampicillin

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 مواجه 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 مکانیسم های 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. پارنتی و همکاران (۲۰۱۰)، غیر فعال شدن ۱۴ گونه *لاکتوباسیلوس* را در $pH \leq ۳$ 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 درجداسازی سلول‌های مقاوم به تنش مطرح نمودند (Moslehi-Jenabian et al., 2009). دینگ و همکاران (۲۰۰۷)، تأثیر $pH \leq ۲/۵$ را بر کاهش ۸ گونه مختلف *لاکتوباسیلوس* مورد بررسی قرار داند و به نتایج مشابهی دست یافتند (Ding et al., 2007). صفرا در روده کوچک نیز یکی دیگر از عوامل محدود کننده زنده‌مانی باکتری های در دستگاه گوارش است که از طریق بر هم 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 تارانتو و همکاران (۲۰۰۶)، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیر گونه بولگاریکوس تیمار شده با غلظت‌های مختلف تائوروداکسیکلات[1] (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 پلانتاروم* 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 گونه های *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 فرآیند های تولید ماده غذایی افزایش می‌دهد (De Angelis et al., 2004). مهم‌ترین عامل در ایجاد توانایی مقابله با صفرا در باکتری های تولید کننده اسید لاکتیک سیستم تجزیه نمک های 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., 2010; Wouters et al., 2001). تحقیقات مشابهی افزایش نرخ زنده‌مانی سلول‌های جنس *لاکتو باسیلوس* 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

1 .Taurodeoxycholate

پروبیوتیک منجر به افـزایش زنـده‌مـانی سـلول‌هـا مـی‌شـود (Dave et al., 1997; Scherezenmeir et al., 2001)

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشـان دهنـده افـزایش مقاومـت بـاکتری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* بـه عنـوان باکتری شاخص پروبیوتیک با اسـتفاده از اعمـال تـنش‌هـای کمتر از حد کشندگی است. بر اساس نتایج بـه دسـت آمـده نرخ بقاء باکتری در ماست به عنوان یک محصـول تخمیـری حامل باکتری پروبیوتیک با استفاده از تیمارهای اعمال شده به طرز معنی داری افزایش یافت، این افـزایش تعـداد سـلول زنده مانده منجر به بهبـود عملکـرد بـاکتری و بـروز بیشـتر خصوصیات مطلوب سلامت‌زای آن برای انسان مـی‌شـود. بـر اساس نتـایج ایـن پـژوهش هـر دو بـاکتری *لاکتوباسـیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* می‌توانند به عنوان کشت همراه در محصولات پروبیوتیک مورد اسـتفاده قـرار گیرنـد، البته باکتری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* مقاومت بیشتر در برابـر تنش‌ها از خود نشان داد. در مجموع بر اساس نتایج به دست آمده در این پژوهش، می‌توان محصولات فراسودمند نوینی را کـه شـرایط نگهـداری و تولیـد آن‌هـا بـرای ایـن دسـته از باکتری‌ها مرگ آور بـوده و قـبلاً امکـان تولیـد بهینـه آن‌هـا میسر نبوده را تولید کرد.

تشکر و قدردانی

مقاله علمی _ پژوهشی حاضر مستخرج از رساله دکتـری بـا کـد ۳۷۹۳۸ مصـوب در دانشـگاه فردوسـی مشـهد اسـت. نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌داننـد کـه از جنـاب آقـای دکتر احمد یراقی استاد محترم گروه بی‌هوشی و مراقبت‌های ویژه دانشگاه علوم پزشـکی اصـفهان بـه دلیـل کمـک هـای بـی‌دریغشـان در ایـن پـژوهش صـمیمانه تشـکر و قـدردانی نمایند.

منابع

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

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. Kleerebezema 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: Acritical 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. Scherezenmeir, 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 H[1]، Yavarmanesh M[2*]، Mortazavi A[3]، Moazzami A[4] ،Adibi P[5]

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 administrated 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 throw 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.