ویژگی کلسترول کاهی *لاکتوباسیلوس رئوتری* و میزان زنده‌مانی آن در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش و ماست

هیمن نوربخش[۱]، فرامرز خدائیان[۲*]، مونا بیطرف[۱] و سید محمد موسوی[۲]

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۱/۶/۱۹

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

[۲] استادیار و استاد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

[*] مسئول **مکاتبه**: Email: khodaiyan@ut.ac.ir

چکیده

در این مطالعه قابلیت کاهش کلسترول، مقاومت به اسید، مقاومت به نمک صفراوی و زنده‌مانی در ماست *لاکتوباسیلوس رئوتری* (DSM 20016) بررسی شده است. نتایج نشان داد که این باکتری در محیط کشت محتوی ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر کلسترول و ۰/۳٪ وزنی حجمی نمک صفراوی، توانای حذف ۵۸/۹۶ میکروگرم در میلی لیتر کلسترول را از محیط MRS دارد. همچنین، پس از طی ۲ ساعت در pH ۲ شمار باکتری‌های زنده از ۸/۱ به ۳/۳ لگاریتم cfu در میلی لیتر رسیده است. جهت بررسی اثر نمک‌های صفراوی از محیط کشت MRS براث حاوی۰/۳٪ وزنی حجمی اکسگال استفاده شد. نتایج نشان داد که این باکتری در برابر نمک‌های صفراوی مقاوم می‌باشد. در نهایت با توجه به ضرورت وجود تعداد معین باکتری پروبیوتیک در زمان مصرف محصول، زنده‌مانی باکتری در ماست مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از حفظ مطلوب زنده‌مانی باکتری در ماست طی تولید و نگهداری می‌باشد، به طوری که تا پایان هفتهٔ سوم نگهداری تعداد سلول‌های زنده در حد توصیه شده ($cfu۱۰^{۶}$ در میلی لیتر) قرار داشت. با توجه به نتایج آزمایشات انجام شده، *لاکتوباسیلوس رئوتری* پتانسیل مناسبی جهت تولید ماست پروبیوتیک کاهنده کلسترول دارد.

واژهای کلیدی: کاهش کلسترول، لاکتوباسیلوس رئوتری، زنده‌مانی، دستگاه گوارش، ماست

Study on cholesterol removal by *Lactobacillus reuteri* and its survival in simulated gastrointestinal tract and yogurt

H Nourbakhsh[1], F khodaiyan[2*], M Bitaraf[1] and S M Mousavi[2]

Received: December 18, 2011 Accepted: September 9, 2012

[1]MSc Student, Department of Food Science, Engineering and Technology, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
[2]Assistant Professor and Professor, Department of Food Science, Engineering and Technology, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
[*]Corresponding author: Email: khodaiyan@ut.ac.ir

Abstract

In this study, capability to remove cholesterol, acid tolerance, bile salt tolerance and viability in yogurt of *Lactobacillus reuteri* (DSM 20016) were examined. Results showed that *L. reuteri* was able to remove 58.96 µg/ml of cholesterol from culture medium containing 100 µg/ml cholesterol and 0.3 % (w/v) of bile salt. Also, after 2 hours at pH 2, the viable count of *L. reuteri* declined to 3.3 from 8.1 log cfu/ml. In order to study bile tolerance, the growth rate of bacteria was determined in MRS broth containing 0.3% (w/v) bovine bile salt (oxgall). Results illustrated that *L. reuteri*was resistant to the bile salts. Finally the viability of *L. reuteri* in yogurt throughout the storage was examined. Results revealed that *L. reuteri*adequately maintained its viability throughout the storage period, so that after 3 weeks of storage, the number of viable bacteria was over recommended level of 10^6cfu/ml. Therefore, *L. reuteri*was regarded as a suitable probiotic for production of cholesterol-lowering yogurt.

Keywords: Cholesterol removal, *Lactobacillus reuteri*, Survival, Gastrointestinal tract, Yogurt

مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌هایی هستند که در روده، با فعالیت های مختلف خود باعث خواص سلامت بخش در میزبان می گردند. جلوگیری از عفونت، تقویت و تنظیم سیستم ایمنی بدن، بهبود ارزش غذایی، کاهش کلسترول سرم خون و فشار خون و ... از جمله این خواص سلامت بخش می باشند (ساندرز ۱۹۹۹ و سارلا و همکاران۲۰۰۰). اکثر پروبیوتیک های مورد استفاده انسان متعلق به دو جنس *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتریوم* می باشند.

آمار و اطلاعات نشان می‌دهد که بیماری‌های قلبی-عروقی یکی از مهمترین علل مرگ و میر و از کار افتادگی در انسان است. بر اساس مطالعات انجام شده، بالا بودن کلسترول خون ارتباط مستقیمی با بروز حملات قلبی دارد که در صورت درمان آن، خطر حملات مذکور کاهش می‌یابد (عثمان و هوسونو ۲۰۰۰). به طوری که اگر کلسترول خون به میزان ۱٪ کاهش یابد، خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی – عروقی ۲ الی ۳٪ کاهش می‌یابد. یکی از مزایای ویژه پروبیوتیک‌ها خواص کاهندگی کلسترول می‌باشد و در این راستا مطالعات فراوانی انجام شده است که نشان می‌دهد باکتری‌های پروبیوتیک میزان کلسترول سرم خون را کاهش می‌دهند. مان و اسپوری (۱۹۷٤) گزارش دادند که مصرف شیر تخمیر شده توسط لاکتوباسیلوس‌ها با کاهش میزان کلسترول خون مرتبط است. لین و همکاران (۱۹۸۹) نشان دادند که مصرف *لاکتوباسیلوس*

اسیدوفیلوس[1] به میزان cfu ۳×۱۰^{۶} در روز میزان کلسترول را به طور معنی‌داری پس از ۷ هفته کاهش می‌دهد. بوکوسکا و همکاران (۱۹۹۷) گزارش کردند که مصرف محصولات غذایی محتوی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[2]، کلسترول کل و لیپو پروتئین کم چگالی (LDL) را در افرادی که از کلسترول بالا رنج می‌بردند، کاهش می‌دهد. در تحقیق دیگری مشخص شد که مصرف خوراکی *لاکتوباسیلوس جانسونییی*[3] و *لاکتوباسیلوس رئوتری*[4]در خوک‌ها سطح کلسترول را به طور معنی‌داری کاهش داده است (دو تویت و همکاران ۱۹۹۸).*لاکتوباسیلوس رئوتری* یک باکتری میله ای، گرم مثبت و کاتالاز منفی است که امروزه جزو باکتری‌های پروبیوتیک طبقه‌بندی می‌شود و دارای اثرات سودمند و بالینی مطلوبی می‌باشد، به همین منظور در بسیاری از فرآورده های غذایی استفاده می شود (رید و همکارن ۲۰۰۳).

پیشنهاد شده که پروبیوتیک هابه سه شیوه‌ی اصلی کلسترول سرم خودن را کاهش می دهند: **الف**. جلوگیری از ساخت کلسترول به وسیلهٔ فرآورده‌های ترشح شده توسط پروبیوتیک‌ها (ساندرز ۱۹۹۹). **ب**. جذب کلسترول به داخل سلول و هضم آن یا متصل کردن آن به سلول‌های باکتری. این شیوه به ویژه توسط باکتری لاکتوباسیلوس *اسیدوفیلوس* انجام می‌شود (گیلیلند و همکاران ۱۹۸۵). **پ**. غیرمزدوج کردن نمک‌های صفراوی به اسیدهای آزاد توسط آنزیم‌های بیفیدوباکتریم‌ها و برخی لاکتوباسیلوس‌ها (براشرز و همکاران ۱۹۹۸).

مهمترین شیوه کاهش کلسترول در بدن غیرمزدوج کردن اسیدهای صفراوی به اسیدهای آزاد توسط پروبیوتیک‌ها است (براشرز و همکاران ۱۹۹۸). این باکتری‌ها قابلیت ترشح آنزیمهای تجزیه کننده اسید صفراوی را دارند و از این طریق باعث غیر مزدوج کردن این اسیدها می‌گردند. اسیدهای صفراوی غیرمزدوج با سرعت و سهولت بیشتر از بدن دفع می‌شوند. با توجه به آنکه کلسترول، پیش‌ساز اسیدهای صفراوی است، تبدیل مولکول‌های کلسترول به این اسیدها برای جبران اسیدهای غیرمزدوج دفع شده از بدن شدت می‌یابد که نتیجه آن کاهش میزان کلسترول سرم است (بگلی و همکاران ۲۰۰۶).

برای اینکه گونه‌ی پروبیوتیکی به محل مناسب عملکرد خود برسد، باید بتواند به طور زنده از شرایط اسیدی معده و ترشحات قلیایی روده کوچک عبور کند(سارلا و همکاران ۲۰۰۰). غشای سلولی میکروارگانیسم از لیپید و اسیدهای چرب تشکیل شده است. ترشح صفرا در بدن به منظور کمک به هضم چربی‌های موجود در غذا صورت می‌گیرد. بنابراین غشای سلول باکتری‌ها را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد. مطالعات فراوانی زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها را تحت شرایط اسیدی معده و نمک صفراوی روده کوچک، مورد بررسی قرار داده است. لیونگ و شاه (۲۰۰۵) تحمل به نمک و اسید و میزان کلسترول کاهی ۱۱ گونه باکتری *لاکتوباسیلوس* را مورد مطالعه قرار دادند. والکرو گیلیلند(۱۹۹۳) ارتباط بین تحمل به نمک صفراوی، غیرمزدوج کردن نمک‌های صفراوی و میزان کاهش کلسترول را در ۱۹ گونه *لاکتوباسیلوس*مورد بررسی قراردادند و گزارش کردند که بیشترین میزان فعالیت غیرمزدوج کردن در فاز لگاریتمی تاخیر رخ داده که با بیشترین میزان جذب کلسترول از محیط کشت هم‌زمان بوده است. همچنین عثمان و هوسونو (۱۹۹۹) کار مشابهی را در ارتباط با ۱۹ گونه *لاکتوباسیلوس گازری*[5]انجام دادند و تفاوت معنی‌داری را از لحاظ تحمل به نمک و اسید مابین گونه‌ها مشاهده کردند.

[1]- *L. acidophilus*
[2]- *L. plantarum*
[3]- *L. johnsonii*
[4]- *L. reuteri*
[5] -*L. gasseri*

تعداد سلول‌های زنده‌ی پروبیوتیک در هر گرم یا میلی لیتر از فرآورده در لحظهٔ مصرف، ارزش اساسی فرآورده‌های پروبیوتیک را شامل می‌شود. باکتری های پروبیوتیک نه تنها باید در طول مدت زمان ماندگاری غذا زنده بمانند، بلکه می‌بایست ضمن عبور از مجرای گوارش زنده مانده و به محل فعالیت خود (روده) برسند. به همین دلیل فدراسیون بین المللی لبنیات، وجود حداقل 10^{7}cfu در گرم پروبیوتیک زنده را در زمان مصرف ماده غذایی برای بروز اثرات درمانی ضروری می داند (اوهند و سالمینن ۱۹۹۸).در زمان انبارداری محصول تولید شده در یخچال تعداد پروبیوتیک‌ها کاهش می‌یابد. لذا تحقیقات زیادی در ارتباط با زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در طی نگه‌داری در دمای پایین انجام شده است (مورتضویان و همکاران ۲۰۰۷).

ماست یکی از فرآورده‌های است که به وفور مصرف می‌شود و طرفداران زیادی دارد و باید تا زمان مصرف در دمای یخچال نگه‌داری شود. امروزه تحقیقات زیادی در ارتباط با کاربرد *لاکتوباسیلوس رئوتری* در ماست انجام شده است (حکمت و همکاران ۲۰۰۹ و بیطرف و همکاران ۲۰۱۰). برای اینکه این باکتری بتواند اثرات فرسودمند خود را نشان دهد باید بتواند در دمای یخچال زنده‌مانی خود را حفظ کند و در زمان مصرف میزان مشخصی از آن در فرآورده موجود باشد.

در این مطالعه ما به دنبال محورهای زیر در ارتباط با *لاکتوباسیلوس رئوتری* هستیم: ۱- بررسی قدرت کاهندگی کلسترول آن درمحیط MRS و شرایط بی هوازی ۲- بررسی مقاومت این باکتری به تنش‌های ناشی از دستگاه گوارش در حین عبور از آن در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده و ۳- بررسی میزان زنده‌مانی آن در ماست به عنوان یک فرآورده تخمیری. با انجام آزمایشات فوق قابلیت تولید یک محصول پروبیوتیکی کاملاً موثر در کاهش کلسترول مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

مواد و روش ها

مواد

باکتری لاکتوباسیلوس رئوتری (DSM 20016) ازشرکت DSMZ آلمان خریداری گردید . عصاره مخمر، آگار، محیطکشتMRS، پارافین، کلریدسدیم و اسید کلریدریک از شرکت مرک (آلمان) خریداری شد. اکسگال[6]، L- سیستئین هیدروکلرید، سدیم تاروکولات[7]، معرف اُ-فتالآلدهید[8]، نمک صفراوی گاو، و کلسترول از شرکت سیگما (آلمان) و آغازگرماست (شامل مخلوط ۱:۱ *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس*)، شیر خشک بدون چربی (حداکثر ۰/۱٪ چربی، تهیه شده با روش خشک کردن پاششی) از شرکت پگاه تهران خریداری گردید.

تهیه کشت تازه میکروبی

کشت استوک باکتری در محلول ٤٠٪ گلیسرول و در دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس ذخیره شد. قبل از استفاده، دست کم ۳ بار باکتری با تلقیح ۱٪ حجمی حجمی در محیط کشت استریل MRS براث پاساژ داده شد و در دمای ۳۷درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱۸ ساعت در شرایط بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری گردید.

اندازه گیری قابلیت باکتری در حذف کلسترول از محیط کشت

محیط کشت محتوی ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر کلسترول و۰/۳٪ وزنی حجمی نمک صفراویسدیم تاروکولات، به میزان۱٪ حجمی حجمی با کشت تازه باکتری تلقیح شد و به مدت ٢٤ ساعت به طور بی هوازی در دمای ۳۷درجه‌ی سلسیوس گرمخانه گذاری شد. سپس سلول ها توسط سانتریفوژ (SiGmA, 3-16K، آلمان) از محیط کشت جدا شدند (۱۰۰۰۰ برابر شتاب ثقل، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه‌ی سلسیوس).

[6]- Oxgal
[7]- Sodium Taurocholate
[8] -O-phthalaldehyde

روش رنگ سنجی (رودل و موریس ۱۹۷۳) با استفاده از معرف اکسی فتالدهید به منظور اندازه گیری کلسترول استفاده شد. به این ترتیب که به ۰/۵ میلی لیتر از نمونه ۳ میلی لیتر اتانول و ۲ میلی لیتر هیدروکسید پتاسیم ۵۰ درصد اضافه و کاملاً مخلوط شدند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم۶۰ درجه‌ی سلسیوس حرارت داده شدند. بعد از خنک شدن مخلوط، ۵ میلی‌لیتر هگزان به آن اضافه و بخوبی ورتکس گردید. بعد از جداسازی فازها، ۲/۵ میلی‌لیتر از آن جدا شد و هگزان تحت جریان گاز ازت در دمای ۶۰ درجه‌ی سلسیوس تبخیر گردید. سپس ٤ میلی لیتر معرف اکسی فتالدهید به آن اضافه شد. در نهایت جذب در طول موج ۵۵۰ نانومتر خوانده شد و با منحنی استاندارد مقایسه شد تا غلظت کلسترول به دست آید.مقدار کلسترول حذف شده توسط باکتری (بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر) از روی اختلاف مقدار کلسترول در محیط کنترل و مقدار باقیمانده در محیط کشت تعیین شد(گیلیلند و همکاران ۱۹۸۵ و براشرز و همکاران ۱۹۹۸).

تحمل به اسید

برای بررسی مقاومت باکتریبه اسید (HCl)، از محیط کشتMRS براث باpH، ۲ استفاده شد. برای این منظور، به تعداد تکرارها، نمونه تهیه گردید. نمونه ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس به مدت دو ساعت نگهداری شدند. هر نیم ساعت یک نمونه برداشت شد و با استفاده از سرم فیزیولوژی، سری‌های رقت تهیه گردید. از رقت مورد نظر برای کشت اختلاطی در محیط MRSاستفاده گردید. سپس پلیت ها به مدت ٢٤ ساعت در جای بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری شدند. مقاومت به اسید از طریق مقایسه تعداد کلنی ها بعد از ۲ ساعت با زمان صفر صورت گرفت (لیونگ و شاه ۲۰۰۵).

تحمل به نمک صفراوی

در این قسمت از محیط کشت MRS براث حاوی۰/۳٪وزنی حجمی نمک صفراوی اکسگال استفاده شد. بعد از تلقیح (۱۰٪ حجمی حجمی محیط کشت) نمونه‌ها به مدت ۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوسنگهداری شدند. رشد باکتری از طریق اندازه-گیری میزان جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر (Bio Quest, CEILE CE 2502, 2000 ، انگلستان) در طول موج ٦٢٠ نانومتر در هر ساعت بررسی ومنحنی جذب در برابر زمان رسم شد.تحمل باکتری‌ها به نمک بر اساس زمان لازم برای افزایش چگالی نوری[9](OD) به میزان ۰/۳ واحد تعیین گردید. نمونه کنترل، محیط کشت بدون نمک صفراوی بود (گیلیلند و همکاران ۱۹۸۵).

تهیهٔ مایه تلقیح پروبیوتیک

جهت تهیهٔ مایه تلقیح پروبیوتیک، شیر بازساخته با ۱۵/۲٪ ماده‌ی خشک کل (محتوی ۱/۲٪ عصاره‌ی مخمر) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای۸۵ درجه‌ی سلسیوس پاستوریزه شد و پس از خنک شدن، به میزان ۱۰٪ حجمی حجمی با کشت تازه‌ی باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رئوتری* تلقیح گردید. سپس به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس گرمخانه گذاری شد. شیر لخته شدهٔ حاصل به عنوان مایه تلقیح پروبیوتیک برای تولید ماست استفاده شد (حکمت و همکاران ۲۰۰۹).

تولید ماست

شیر باز ساخته با ماده خشک ١٤٪ و چربی ناچیز (حداکثر ۰/۵٪) تحت تیمار حرارتی در دمای۸۵ درجه‌ی سلسیوس و به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری قرارگرفت. بعد از خنک‌شدن تا دمای ٤٥ درجه‌ی سلسیوس، آغازگر معمول ماست (شامل مخلوط ۱:۱ *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس*) و باکتری *لاکتوباسیلوس رئوتری* هر یک

[9]- Optical Density

به میزان ۲٪ حجمی حجمی به شیر تلقیح شدند. پس از آن نمونه ها (همراه با نمونه کنترل) در دمای ٤١ درجه‌ی سلسیوس گرمخانه گذاری شدند. pH نمونه کنترل هر ٥ قیقه با دستگاه pH متر (Metrohm, 827 pH Lab، سوئیس) اندازه‌گیری و پایش می‌شد و در نهایت عمل تخمیر در ٤/٦ =pH متوقف گردید. در نهایت نمونه‌ها به یخچال با دمای٤ درجه‌ی سلسیوس منتقل شدند.

بررسی زنده مانی باکتری پروبیوتیک در ماست

تعداد باکتری پروبیوتیک در نمونه ماست، بلافاصله بعد از تخمیر و در طی ۲۸ روز نگهداری یخچالی (هر هفت روز یک بار) تعیین گردید. شمارش باکتری ها توسط روش رقت سازی دهگانی[10] و کشت پورپلیت، با استفاده از محیط MRS آگار محتوی ۰/۱۵٪ وزنی حجمی نمک صفراوی (جهت جلوگیری از رشد استارترهای معمول ماست) انجام شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس به مدت ٤٨ ساعت گرمخانه گذاری شدند و تعداد باکتری ها در هر میلی لیتر از نمونه گزارش شد (حکمت و همکاران ۲۰۰۹).

آنالیز آماری

برای مطالعه تفاوت بین زمان‌ها از طرح کاملاً تصادفی (CRD) با سه تکرار استفاده شد و برای انجام مقایسات میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (α= 0.05) استفاده گردید. همچنین از نرم افزار SPSS برای آنالیز داده‌ها استفاده شد.

نتایج و بحث

بررسی قابلیت باکتری پروبیوتیک در حذف کلسترول از محیط کشت

نتایج آزمایش کاهش کلسترول نشان داد که باکتری مذکور قابلیت حذف ٥٨/٩٦ میکروگرم در میلی لیتر کلسترول را از محیط کشت دارد. مقایسه ی این مقدار با باکتری‌های پروبیوتیک دیگر اهمیت این باکتری را در کاهش کلسترول نشان می دهد (جدول ۱).

بعضی از محققین بر این باورند که کاهش کلسترول از محیط کشت توسط لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس‌ها فقط در صورت حضور نمک صفراوی و شرایط بی هوازی رخ می دهد (گلیلیند و همکاران ۱۹۸۵). آنها بر اساس یافته های خود حدس زدند که باکتری با رشد در شرایط مناسب ممکن است که قادر باشد استرویدها را به داخل ساختمان سلولی ترکیب کند. آنها برای تعیین مکانیسم مطالعات بیشتری را پیشنهاد کردند.

کلاور و وان در میر (۱۹۹۳) کاهش کلسترول از محیط کشت را به علت گسیخته شدن میسل های کلسترول توسط نمک های صفراوی دکانژوکه شده و رسوب کلسترول با نمک های صفروای آزاد (به علت کاهش pH توسط اسید تولیدی در طول رشد) میدانند. در حالی که کیموتو و همکارانش (۲۰۰۲) با توجه به اینکه این کاهش در pH ٦ نیز رخ می دهد دو مکانیسم محتمل دیگری را جهت کاهش کلسترول از محیط کشت پیشناد کردند: چسبندگی کلسترول به سطح سلول و جذب کلسترول توسط سلول که اولی توسط سلولهای زنده و مرده و دومی فقط توسط سلولهای زنده قابل انجام است.

با توجه به آنچه که گفته شد مکانیسمی که میکروارگانیسم کلسترول را از محیط کشت حذف می‌کند به طور کامل مشخص نیست.

امروزه نشان داده شده است که باکتری های پروبیوتیک که به طور فعال، کلسترول را از محیط کشت جذب می کنند، بر روی کلسترول خون نیز بسیار مؤثراند و باعث کاهش کلسترول خون می شوند. در مقابل گونه هایی که در طی رشد در محیط آزمایشگاهی کلسترول را جذب نمی کنند، هیچ تأثیری بر روی کلسترول خون ندارند (گیلیلند و همکاران ۱۹۸۵). مقایسه باکتری *لاکتوباسیلوس رئوتری* با دیگر باکتری‌ها نشان می‌دهد که مصرف این باکتری با

[10]- Decimal Dilution

فرآوردهای تخمیری می‌تواند نقش مهمی در کاهش سطح کلسترول خون داشته باشد.

جدول۱- میزان قابلیت حذف کلسترول از محیط کشت توسط باکتری*لاکتوباسیلوس رئوتری (میانگین*± انحراف استاندارد)، n=3 و مقایسه آن با سایر باکتری‌های مختلف مورد مطالعه

باکتری	کاهش کلسترول (میکروگرم در میلی‌لیتر)	منبع
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس(4357)	۱۶/۸۸	لیونگ و شاه (۲۰۰۰)
لاکتوباسیلوس کازئی(1521)	۲۰/۳۲	لیونگ و شاه (۲۰۰۰)
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس(GP18)	۲۴/۲	گیلیلند و همکاران (۱۹۸۵)
استرپتوکوکوس ترموفیلوس(20617)	۲۵/۲۵	آل-صالح و همکاران (۲۰۰۷)
بیفیدوباکتریوم اینفنتیس(20088)	۲۹/۳۵	آل-صالح و همکاران (۲۰۰۷)
لاکتوباسیلوس کازئی(L19)	۳۰/۹	براشرز و همکاران (۱۹۹۸)
لاکتوکوکوس لاکتیس(527)	۳۷/۷	کیموتو و همکاران (۲۰۰۲)
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (RP32)	۴۰/۶	گیلیلند و همکاران (۱۹۸۵)
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (L1)	۴۶/۹	براشرز و همکاران (۱۹۹۸)
لاکتوباسیلوس کازئی (M5)	۵۶/۶	براشرز و همکاران (۱۹۹۸)
لاکتوباسیلوس رئوتری (20016)	۵۸/۹۶ ± ۰/۴۸	این مطالعه

* محیط کشت کنترل محتوی ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر کلسترول بوده است.

تحمل به اسید

pH محیط معده با توجه به غذاهای مصرفی متغیر می‌باشد. در این مطالعه اثر pH پایین معده (pH=2) در زمان‌های مختلف ۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه بر روی زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس رئوتری* بررسی شد. جدول ۲ اثر pH=2 را در زمان‌های مختلف بر رشد باکتری بیان می‌دارد. پس از طی زمان ۲ ساعت شمار باکتری‌های زنده از ۸/۱ به۳/۳ لگاریتم cfu در میلی لیتر (کاهش ۴/۸ واحد لگاریتمی) رسیده است. از مقایسه نتایج حاصله با نتایج مطالعه صورت گرفته بر روی سوش‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی توسط لیونگ و شاه (۲۰۰۵) می‌توان دریافت که باکتری *لاکتوباسیلوس رئوتری* مقاومت مناسبی نسبت به pH در طی زمان‌های مشخص از خود نشان می‌دهد (جدول ۲).

تحمل به نمک صفراوی

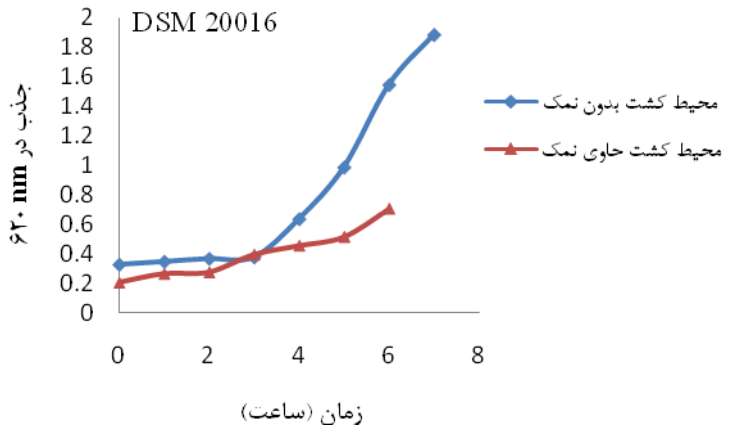
باکتری‌های پروبیوتیک باید در حین عبور از روده کوچک در برابر نمکهای صفراوی مقاوم باشند (ساندرز۲۰۰۰). شکل ۱ مقاومت باکتری *لاکتوباسیلوس رئوتری* را به نمک صفراوی در غلظت۰/۳٪ وزنی حجمی اکسگال نشان می‌دهد.

شکل ۱ نشان می‌دهد که زمان لازم جهت افزایش چگالی نوری به میزان ۰/۳ واحد (OD۰/۵۱–۰/۲۱) در محیط کشت حاوی نمک حدود ۴/۸ ساعت می‌باشد، که حاکی از مقاومت مناسب این باکتری در برابر نمک‌های صفراوی است. این زمان در مطالعه صورت گرفته توسط گیلیلند و همکاران (۱۹۸۵) بر روی گونه‌های

مختلف *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به طور میانگین ۵/۱۳ ساعت و در مطالعه انجام شده دیگر بر روی گونه‌های مختلف لاکتوباسیلوس گازری حدود ۵ ساعت گزارش شده است (عثمان و هوسونو ۲۰۰۰). در نتیجه با مقایسه با مطالعات پیشین می‌توان نتیجه گرفت که *لاکتوباسیلوس رئوتری* نسبتاً مقاومت خوبی را از خود نشان می‌دهد البته این زمان برای باکتری های *بیفیدوباکتریوم* کوتاهتر است (آل–صالح و همکاران ۲۰۰۷).

جدول ۲_ اثر pH ۲ بر روی زنده‌مانی باکتری*ل. رئوتری* در مدت ۲ ساعت (mean ± SE)، n=3 و مقایسه آن با نتایج مطالعه لیونگ و شاه (۲۰۰۵)

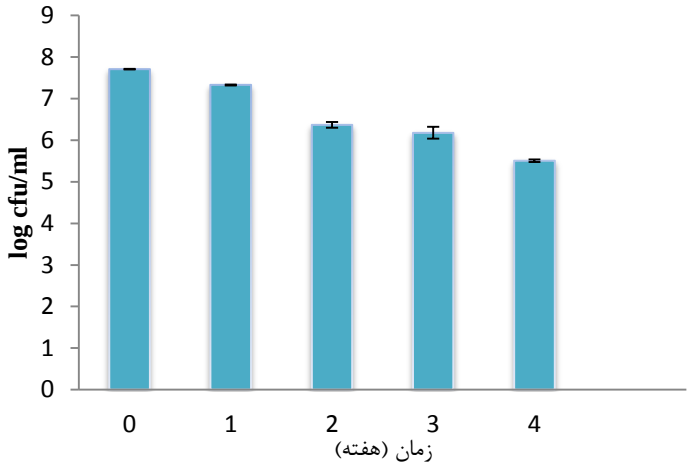
باکتری	شمار میکروبی(لگاریتم cfu در میلی لیتر)				
	۰ دقیقه	۳۰ دقیقه	۶۰ دقیقه	۹۰ دقیقه	۱۲۰ دقیقه
ل. اسیدوفیلوس(4356)	۱۰/۱۳±۰/۵۸	۸/۲۵±۰/۷۵	۷/۶±۰/۰۳	۶/۷۳±۰/۳۲	۵/۷۷±۰/۱۷
ل. اسیدوفیلوس(4962)	۱۰/۲۱±۰/۰۹	۸/۱۱±۰/۳۳	۷/۴۲±۰/۱۳	۶/۲۷±۰/۱۰	۵/۵۵±۰/۲
ل. کازئی (2607)	۱۰/۳۶±۰/۱۸	۹/۰۶±۰/۹۸	۸/۲۵±۰/۰۹	۷/۴۳±۰/۰۸	۴/۰۵±۰/۹۷
ل.کازئی(279)	۱۰/۴±۰/۲۳	۹/۵±۰/۵۱	۸/۳۶±۰/۳۱	۶/۳۹±۰/۰۹	۴/۲±۰/۸۱
ل. رئوتری (این مطالعه)	۸/۱ ± ۰/۲	۷/۷ ± ۰/۱۸	۶/۵ ± ۰/۲۵	۵/۷ ± ۰/۱۵	۳/۳ ± ۰/۲۱



شکل ۱_ تحمل به نمک *لاکتوباسیلوس رئوتری* در MRS براث در دمای۳۷ درجه‌ی سلسیوس

بررسی زنده مانی باکتری *لاکتوباسیلوس رئوتری* در ماست

با توجه به ضرورت وجود تعداد معین باکتری پروبیوتیک در زمان مصرف محصول، زنده مانی باکتری *لاکتوباسیلوس رئوتری* در ماست مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۲ روند تغییرات تعداد سلول های زندهٔ *لاکتوباسیلوس رئوتری* را در ماست طی دورهٔ نگهداری نشان می دهد. بر اساس نتایج به دست آمده، بالاترین شمارش میکروبی در هفتهٔ صفر (بلافاصله بعد از تخمیر) بود و تعداد باکتری پروبیوتیک در ماست با گذشت زمان به طور معنی داری کاهش یافت.



شکل۲- تغییرات تعداد سلول های زنده (لگاریتم cfu در میلی لیتر) **با زمان در ماست و در دمای ۴ درجه‌ی سلسیوس**

قابلیت زیستی پایین باکتری های پروبیوتیک در ماست اساساً مربوط به pH پایین ماست و کاهش بیشتر pH در طی نگهداری می باشد (شاه ۲۰۰۰). گزارش شده است کهpHماست کمتر از ٤/۳۰ شدیداً زنده مانی باکتری های پروبیوتیک را تحت تأثیر قرار می دهد (لنکاپوتر۱۹۹۸). در مطالعه حکمت و همکاران (۲۰۰۹) زندمانی لاکتوباسیلوس رئوتری (RC – 14) در ماست پس از طی ۳ هفته از ٤/٥ به ۱ لگاریتم cfu در میلی لیتر (کاهش ۳/٥ واحد لگاریتمی) رسید. همچنین آنها با افزودن ترکیباتی همچون عصاره مخمر و اینولین به ماست توانستند زندمانی باکتری را تا حد قابل توجهی افزایش دهند. در این مطالعه، زنده مانی *لاکتوباسیلوس رئوتری* (DSM 20016) در ماست طی تولید و نگهداری به میزان قابل توجهی تغییر کردهو البته هر چند در پایان هفته سوم بیش از ۹۰٪ جمعیت باکترایی اولیه از بین رفت (تعداد سلول های زنده از ۷/۷ به ٦/۱۸ لگاریتم cfu در میلی لیتر رسید) این میزان در حد توصیه شده ($cfu۱۰^{٦}$ در میلی لیتر) قرار داشت (جدول ۳). با توجه به نتایج حکمت و همکاران (۲۰۰۹) می‌توان پیش بینی کرد که در صورت اضافه کردن ترکیبات مکمل (عصاره مخمر، اینولین و ...) می‌توان زنده‌مانی باکتری را افزایش داد.

جدول۳- روند تغییرات تعداد سلول های زنده (لگاریتم cfu در میلی لیتر) **در ماست طی ۴ هفته نگهداری یخچالی (mean ± SE)، n=3**

باکتری	زمان نگهداری (هفته)				
	۰	۱	۲	۳	٤
ل. رئوتری	۷/۷۱±۰/۰۱^{a*}	۷/۳۳±۰/۰۱^{b}	٦/۳۷±۰/۰۷^{c}	٦/۱۸±۰/۱٤^{d}	٥/٥۱±۰/۰۳^{e}

* میانگین‌های دارای حروف متفاوت ($P<0.05$) اختلاف معنی‌داری با همدیگر دارند.

نتیجه گیری کلی

با توجه به نتایج آزمایشات انجام شده، لاکتوباسیلوس رئوتری(DSM 20016) پتانسیل مناسبی برای تولید ماست پروبیوتیک کاهنده کلسترول دارد. چراکه اولاً به میزان قابل توجهی قابلیت کاهش کلسترول را دارد، ثانیاًتوانست زنده‌مانی خود را در ماست طی تولید و نگه‌داری در دمای پایین حفظ کند به طوری که هر چند حین سه هفته نگهداری بیش از ۹۰٪ جمعیت باکتریایی اولیه از بین رفت، تعداد سلول های زنده در حد توصیه شده ($cfu۱۰^{٦}$ در میلی لیتر) قرار داشت.

منابع مورد استفاده

Al-Saleh A A, Metwalli A A M, and Abu-TarboushH M, 2007. Bile Salts and Acid Tolerance and Cholesterol Removal from Media by some Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. Journal Saud for Food and Nutrition, 1: 1-17

Begley B, Hill C, and Gahan C G M, 2006. Bile Salt Hydrolyses Activity in Probiotics. Applied And Environmental Microbiology, p. 1729–1738.

Bitaraf M S, Khodaiyan F, Mohammadifar M A, and Mousavi S M, 2010. Application of Response Surface Methodology to Improve Fermentation Time and Rheological Properties of Probiotic Yogurt Containing Lactobacillus reuteri. Journal of Food Bioprocess Technology, Doi: 10.1007/s11947-010-0433-2.

Brashears M M, Gilliland S E, and Buck L M, 1998. Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus casei*. Journal of Dairy Science, 81: 2103-2110.

Bukowska H, Pieczul-Mroz J, Chelstowsky K, (1997). Effect of Lactobacillus plantarum (proviva) on LDL-cholesterol and fibrinogen levels in subjects with moderately elevated choledterol. Atherosclerosis, 134: 325-332.

Du Toit M, Franz C M, and Dicks L M, 1998. Characterization and selection of probiotic lactobacilli for preliminary minipig feeding trail and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. International Journal Food Microbiology, 40, 93-104.

Gilliland S E, Nelson C R, and Maxwell C, 1985. Assimilation of cholesterol by Lactobacillus acidophilus. Applied and Environmental Microbiology, 49, 377-381.

Hekmat S, Soltani H, and Reid G, 2009. Growth and survival of *Lactobacillus reuteri* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 in yogurt for use as a functional food. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 10: 293–296.

Kimoto H, Ohmomo S, and Okamoto T, 2002. Cholesterol Removal from Media by Lactococci. Journal of Dairy Science, 85:3182–3188.

Klaver F A M, and Van der Meer R, 1993. The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and *Bifidobacteriumbifidum*is due to their salt-deconjugating activity. Applied and Environmental Microbiology, 59: 1120–1124.

Lankaputhra W E V, Shah N P, and Britz M L 1996. Survival of bifidobacteria during refrigerated storage in the presence of acid and hydrogen peroxide,Milchwissenschaft, 51: 65–70.

Lin S Y, Ayres J W, and Winkler W, 1989. Lactobacillus effects on cholesterol: in vitro and in vivo results. Journal of Dairy Research, 72: 2885-2899.

Liong M T, and Shah N P, 2005. Acid and Bile Tolerance and Cholesterol Removal Ability of Lactobacilli Strains. Journal of Dairy Science. 88: 55–66.

Mann G V, and Spoerry A, 1974. Studies of a surfactant and cholesteremia in the Maasai. American Journal of Clinical Nutrition, 27: 464-469.

Mortazavian A M, Ehsani M R, Mousavi S M, Rezaei K, Sohrabvandi S, and Reinheimer J A, 2007. Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic microorganisms in yogurt. International Journal of Dairy Technology, Vol 60, No 2.

Ouwehand A C, and Salminen S J, 1998. The health effect of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. International Dairy Journal, 8: 749-758.

Reid G, Charbonneau D, Erb J, Kochanowski B, Beuerman D, and Poehner R, 2003. Oral use of *L. rhamnosus* GR1 and *L.fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora: Randomized, placebo-controlled trial. FEMS Immunology Medical. Microbiology, 3 5, 131 –134.

Rudel L L, & Morris M D, 1973. Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde. Journal of Lipid Research, 14: 364-366.

Saarela M, Mogensen G, Fonden R, matto J, and Mattila-Sanholm T, 2000. Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. Journal of Biotechnology, 84, 197-215.

Sanders M E. 1999. Probiotics. Food technology: 53: 67-75.

Shah N P, 2000. Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. Journal of Dairy Science, 83: 894-907.

Usman A, and Hosono A, 2000. Effect of administration of Lactobacillus gasseri on serum lipids and fecal steroids in hypercholesterolemic rats. Journal of Dairy Science, 83: 1705-1711.

Walker D K, and Gilliland S E, 1993. Relationships amongbile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *lactobacillus acidophilus.* Journal of Dairy Science**,** 76: 956-61.