بررسی خصوصیات پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده از محصولات لبنی تخمیری لیقوان

مریم تاج‌آبادی ابراهیمی: دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات
محمدامین حجازی: پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی تبریز
اشرف السادات نوری: دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات

چکیده

امروزه پژوهش‌های بسیاری برای افزودن باکتری‌های پروبیوتیک به محصولات لبنی به منظور ارتقای سطح سلامت جامعه صورت می‌گیرد. از مشکلات به‌کارگیری باکتری‌های پروبیوتیک می‌توان به ایجاد طعم و عطر نامطلوب و همچنین عدم سازگاری و کاهش حیات این باکتری‌ها در محصولات لبنی اشاره کرد. جداسازی باکتری پروبیوتیک از محصول لبنی می‌تواند منجر به جداسازی سویه‌های مناسب برای افزودن به محصول لبنی گردد. در این پژوهش با استفاده از روش غربال انتخابی ۵۶ ایزوله باکتری اسید لاکتیک متحمل شرایط اسیدی از ۳۰ نمونهٔ مختلف محصول لبنی تخمیری سنتی لیقوان جداسازی شد. پس از بررسی‌های میکروسکوپی و آزمون کاتالاز ۴۸ سویه جنس لاکتوباسیل تشخیص داده شد و مقاومت این سویه‌ها در شرایط اسیدی و املاح صفراوی ارزیابی شد. توانایی جذب کلسترول ۱۸ سویه لاکتوباسیل مقاوم به اسید و صفرا از روی تفاوت میزان جذب کلسترول موجود در محیط کشت باکتری قبل و بعد از دوره گرمخانه‌گذاری ارزیابی شد. نتایج نشان داد این باکتری‌ها توانایی جذب کلسترول بین ۲۶۶-۵۴μ g/ml را دارند. بیش‌تر جذب کلسترول در گونه‌های *L. fariemini*s ,*L. planetarium* *L. alimentarium* ,*L. casei, L. acidophilus* ، که از ماست و پنیر لیقوان جدا شده‌اند مشاهده شد. این نتایج نشان می‌دهد پنیر و ماست لیقوان دارای پتانسیل پروبیوتیکی بوده و بیش‌تر باکتری‌های پروبیوتیک انتخاب شده در این پژوهش از این دو محصول بوده‌اند.

مقدمه

در سال ۱۹۰۷ مچینیکوف[1] علم پروبیوتیک‌ها را پایه‌گذاری کرد؛ یعنی کشت میکروارگانیسم‌های زنده‌ای که اگر به تعداد کافی مصرف شوند روی سلامت مصرف کننده اثرات مطلوبی می‌گذارند. از خصوصیات پروبیوتیک مناسب می‌توان به تحمل اسید و صفرا توانایی کاهش کلسترول ممانعت از رشد باکتری‌های بیماری‌زا و تعدیل سیستم ایمنی اشاره کرد. بر اساس تعریف مؤسسهٔ بین‌المللی علوم حیات[2] محصولی را فراویژه[3] می‌داند که علاوه

واژگان کلیدی: پروبیوتیک، محصولات لبنی لیقوان، اسید و املاح صفراوی، کاهش کلسترول

۱- metchinikoff ۲-international life science institute(ILSI) ۳-functional food

دریافت ۸۶/۱۰/۱۵ پذیرش ۸۷/۱/۳۱

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

بر ارزش غذایی خود محصول به واسطه افزودن پروبیوتیک حداقل یک یا چند اثر مفید دیگر مثل افزایش ایمنی و یا کاهش احتمال ایجاد بیماری را دارا باشد. این تعریف به‌صورت یک اصل در ارزیابی‌ها پذیرفته شده است[۱]،[۲]،[۳].

سال‌هاست که اهمیت مصرف محصولات لبنی در سلامت انسان به اثبات رسیده است؛ اما امروزه پژوهش‌های بسیاری برای افزودن باکتری‌های پروبیوتیک به محصولات لبنی و بررسی تأثیر این باکتری‌ها روی سلامت مصرف کننده صورت می‌گیرد. یکی از مشکلات به‌کارگیری باکتری‌های پروبیوتیک در محصولات لبنی عدم تحمل شرایط اکولوژیک محصول و از بین رفتن باکتری پروبیوتیک در این محصولات است. همچنین ایجاد طعم و عطر نامطلوب توسط باکتری پروبیوتیک در این محصولات مشکل دیگری است که تولید کنندگان محصولات لبنی، با آن روبه‌رو هستند[۴]،[۵]،[۶]. ازاین‌رو جداسازی باکتری پروبیوتیک از محصول لبنی نه تنها می‌تواند منجر به جداسازی باکتری پروبیوتیکی با خصوصیات ویژه شود، بلکه می‌تواند دیدگاه مناسبی برای تولید انبوه محصولات لبنی سنتی که به طور طبیعی حاوی باکتری پروبیوتیک هستند به ما عرضه دارد. از سوی دیگر، انتخاب محصول لبنی صنعتی مشابه منشأ جداسازی پروبیوتیک می‌تواند گامی مناسب برای کاهش مشکلات ناشی از افزودن باکتری پروبیوتیک به محصول لبنی باشد[۷]. تا کنون گونه‌های مختلفی از جنس‌های لاکتوباسیلوس لاکتوکوکوس و بیفیدوباکتریوم به‌عنوان پروبیوتیک معرفی شده‌اند، اما بیش‌تر پروبیوتیک‌های معرفی شده مربوط به جنس لاکتوباسیلوس هستند[۸].

بررسی بقای باکتری‌ها در سیستم گوارشی یکی از مهم‌ترین فاکتورها در انتخاب سویه پروبیوتیکاست[۹]. ازاین‌رو بررسی بقای باکتری در سیستم گوارشی برای انتخاب باکتری‌های پروبیوتیک الزامی است[۱۰]. مقاومت در برابر اسید و صفرا دو خصوصیت اساسی برای پیش‌بینی توانایی باکتری برای عبور از دستگاه گوارش است. بنا بر این ارزیابی مقاومت به اسید و صفرا برای تعیین توانایی تحمل اسید معده و نمک‌های صفراوی روده صورت می‌گیرد[۱۱]،[۱۲]،[۱۳].

بررسی‌ها نشان می‌دهند افزایش سطح کلسترول سرمی با حمله‌های قلبی ارتباط مستقیم دارد. با افزایش هر میکرومول کلسترول(بالای حد طبیعی) احتمال بیماری‌های قلبی ۳۵% و احتمال مرگ ناشی از حملات قلبی ۴۵% افزایش می‌یابد. کاهش مقدار جزئی کلسترول سرمی ۱% می‌تواند منجر به کاهش ۲-۳% حملات قلبی شود[۱۴]. پژوهش‌های متعددی نشان می‌دهند برخی از لاکتوباسیلوس‌ها می‌توانند سطح توتال کلسترول و LDL را کاهش دهند. ازاین‌رو استفاده از محصولات لبنی حاوی پروبیوتیک می‌تواند منجر به کاهش سطح کلسترول سرمی شود[۱۵].

هدف این پژوهش جداسازی، شناسایی بیوشیمیایی و بررسی خصوصیات پروبیوتیکی(اندازه‌گیری میزان بقا در سیستم گوارشی و توانایی کاهش کلسترول) لاکتوباسیل‌های جداشده از انواع محصولات لبنی تخمیری لیقوان است.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

نمونه‌های لبنی سنتی از منطقه لیقوان در استان آذربایجان شرقی و از کارگاه‌های سنتی این منطقه تهیه شد. نمونه‌ها طی۲۴ ساعت به آزمایشگاه منتقل شدند. در تمام مدت انتقال نمونه‌ها در دمای ۴درجه سانتی‌گراد محافظت شدند. این نمونه‌ها شامل ماست، دوغ، کره، پنیر و کشک بودند. نمونه‌های پنیر از چهار مرحله مختلف فرآوری ۰-۱-۲-۳ ماه انتخاب و در مجموع ۳۰ نمونه به آزمایشگاه منتقل شدند.

غنی‌سازی

در مرحلهٔ غنی‌سازی نمونه‌ها به محیط مغذی و مناسب رشد لاکتوباسیل‌ها(MRS broth) منتقل شدند. نمونه‌های پنیر بافت سخت دارند و به راحتی با محیط کشت مخلوط نمی‌شوند. ازاین‌رو ابتدا ۲۰ گرم از هر نمونه پنیر در ۲۰ml سیترات سدیم ۲% حل و سپس به یک لیتر محیط MRS broth اضافه شدد[۱۶]. مشکلی برای انحلال دیگر نمونه‌ها در محیط MRS broth وجود نداشت و ۲۰ml از هر نمونه به یک لیتر محیط اضافه شد. سپس این محیط به مدت۲۴ ساعت در انکوباتور CO_2 دار($10\ CO_2$ %) و دمای ۳۷° C گرمخانه‌گذاری شدند [۱۷].

غربال انتخابی سویه‌های لاکتوباسیل متحمل اسید

فرآورده‌های لبنی دارای تنوع میکروبی بسیار غنی هستند و جداسازی تک تک باکتری‌ها از این محصولات بسیار وقت‌گیر است. ازاین‌رو با اسیدی کردن محیط می‌توان تا حدود زیادی سویه‌های غیرمقاوم را حذف کرد. به این منظور، پس از مرحلهٔ غنی‌سازی ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت را سانتریفیوژ(۱۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه) و میکروب‌های ته‌نشست شده در۲۰ میلی‌لیتر محلول بافر نمک فسفات اسیدی PBS (pH=2/5) حل گردید[۱۸].

برای تهیه بافر نمک فسفات اسیدی مقادیر ۹ گرم در لیتر NaCl، ۹ گرم در لیتر Na_2HPO_4-$2H_2O$ و ۱/۵ گرم در لیتر KH_2PO_4 در آب مقطر حل و بافر حاصل توسط اسید کلریدریک ۱ مولار روی pH= ۲/۵ تنظیم گردید[19]. پس از دو ساعت گرمخانه‌گذاری در انکوباتور CO_2 دار($10\ \%CO_2$) و دمایC ۳۷° محلول سانتریفوژ (۵۰۰۰ دور به مدت ۳۰ دقیقه) گردید. سانتریفوژ نمونه‌ها بعد از مرحلهٔ غنی‌سازی و تیمار اسیدی موجب آن می‌شود که باکتری‌ها حتی با تعداد کم در لایه‌های پایینی رسوب کرده و به‌همراه محیط مایع رویی از دست نروند. پس از دو بار شستشو و سانتریفوژ رسوب با بافر نمک فسفات خنثی سلول‌ها به محیط MRS agar منتقل و۷۲ ساعت در حضور دی‌اکسید کربن گرمخانه‌گذاری شدند. کلنی‌های رشد کرده روی محیطMRS agar پس از ۳ تا ۵ بار کشت خطی خالص شدند. نمونه‌های خالص شده از نظر واکنش گرم و تست کاتالاز بررسی

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

شدند. ایزوله‌های میله‌ای گرم مثبت و کاتالاز منفی جنس *Lactobacilli* spp شناخته و در زیر ۳۰٪ گلیسرول در دمای۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگه‌داری شدند[۹]. در طی مراحل خالص‌سازی برای کاهش مخمرهای موجود در محیط از U/ml ۵۰ نیستاتین استفاده شد[۲۰]. نیستاتین نیز با مهار رشد مخمرها و جلوگیری از تشکیل کلنی پهن آن‌ها روی کلنی ریز باکتری امکان جداسازی بهتر و مؤثرتر لاکتوباسیل‌ها را فراهم می‌آورد.

بررسی میزان تحمل اسید سویه‌های ایزوله شده

سویه‌های ایزوله از مرحلهٔ اول به محیط MRS broth تلقیح و در انکوباتور CO_2 دار و دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از تهیهٔ سریال رقت و تعیین جمعیت از هر محیط ۱ میلی‌لیتر به ۲۰ میلی‌لیتر بافر نمک فسفات اسیدی (pH=۲/۵) تلقیح شد[۲۱]،[۲۲]،[۲۳]. بعد از ۲ ساعت گرمخانه‌گذاری، از هر نمونه سریال رقت تهیه گردید و برای بار دوم تعیین جمعیت صورت گرفت. نتایج برای تعیین تأثیر محیط اسیدی در کاهش جمعیت سویه‌های جداسازی شده مقایسه شدند. بر اساس جمعیت تعیین شده قبل و بعد از تیمار اسیدی، ایزوله‌ها از نظر میزان مقاومت به شرایط اسیدی گروه‌بندی و گروه‌های مقاوم برای بررسی بیش‌تر و آزمون‌های بعدی انتخاب شدند. قابل ذکر است که تعداد رقت‌ها و کشت‌ها برای هر نمونه با ۳ بار تکرار انجام شد.

بررسی میزان تحمل نمک‌های صفراوی

سویه‌های مقاوم به اسید انتخاب شده از مرحلهٔ اول در محیط MRS broth در انکوباتور CO_2 دار(10%) CO_2 کشت و دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد شدند. سپس از هر محیط ۱% به محیط MRS broth حاوی ۰/۳% نمک‌های صفراوی (oxgall) تلقیح شد. همچنین تلقیح مشابهی به محیط MRS broth فاقد نمک‌های صفراوی به‌عنوان شاهد صورت گرفت. بعد از تلقیح تا ۸ ساعت هر ۳۰ دقیقه و بعد از ۲۴ ساعت، میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین شد. تفاوت زمانی بر اساس دقیقه بین افزایش کدورت ۰/۳ واحدی در دو محیط مذکور به‌عنوان زمان تأخیر رشد تعیین شد[۲۴]. ایزوله‌های بررسی شده بر اساس زمان تأخیر رشد در ۵ گروه قرار گرفتند:

- زمان تأخیر رشد بین ۰-۳۰ دقیقه بسیار مقاوم، ۳۰-۶۰ دقیقه مقاوم، ۶۰-۹۰ دقیقه متحمل،۹۰-۱۲۰ دقیقه حساس و ۱۲۰-۱۸۰ دقیقه بسیار حساس.

شناسایی بیوشیمیایی سویه‌های برتر باکتریایی

سویه‌های مقاوم به اسید و املاح صفراوی انتخاب شده از مرحلهٔ قبل بر اساس صفات شکلی و بیوشیمیایی مانند توانایی رشد در دماهای ۱۵ و ۴۵ درجهٔ سانتی‌گراد، تولید اسید و گاز از گلوکز، تخمیر قندهای مختلف و تولید NH_3 از آرژنین بر اساس کتاب برگی شناسایی شدند. همهٔ آزمایش‌ها بر روی باکتری‌ها در مرحلهٔ رشد لگاریتمی صورت گرفته است[۲۵]،[۲۶].

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

بررسی میزان جذب کلسترول

برای بررسی میزان جذب کلسترول از روش o-phthalaldehyde استفاده شد. به این منظور محیط کشت MRS مایع به‌صورت جداگانه آماده و استریل شد. کلسترول قابل حل در آب به صورت فیلتر استریل و با غلظت ۳۰۰µg/ml به محیط‌های استریل اضافه و پش از تلقیح سویه‌ها در دمای ۳۷° C و در انکوباتورCO_2 دار به مدت ۲۰ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. به‌عنوان استاندارد یك محیط حاوی کلسترول اما بدون باکتری و یك محیط فاقد کلسترول در نظر گرفته شد. پس از این دوره، سلول‌ها به کمك سانتریفوژ از محیط کشت جدا شدند . یك میلی‌لیتر از مایع رویی جدا و با یك میلی‌لیتر ۳۳% KOH و ۲ میلی‌لیتر اتانول مخلوط و به مدت یك دقیقه ورتکس و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه نگه‌داری شدند. پس از خنك شدن ۲ میلی‌لیتر آب مقطر و ۳ میلی‌لیتر هگزان به محیطها اضافه و ۱ دقیقه ورتکس شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از لایهٔ هگزان به لولهٔ شیشه‌ای منتقل و زیر گاز نیتروژن تبخیر شد. باقی مانده به سرعت با معرف o-phthalaldehyde مخلوط سپس نیم میلی‌لیتر اسید سولفوریك اضافه شد. بعد از ۱۰ دقیقه جذب نوری در طول موج ۵۵۰ نانومتر بررسی شد[۱۵]. بین کلسترول باقی مانده در محیط کشت و افزایش کدورت محیط ارتباط خطی وجود دارد. ازاین‌رو برای تعیین میزان کلسترول باقی مانده در محیط کشت ازاین فرمول استفاده شد:

$M_1 = OD_S . M_0/OD_C$

OD_S = جذب نوری نمونه

OD_C = جذب نوری کنترل (استاندارد)

M_0 = مقدار کلسترول اضافه شده به محیط کشت

M_1= مقدار کلسترول باقی مانده در محیط کشت

و به منظور تعیین میزان کلسترول جذب شده توسط باکتری از این فرمول استفاده شد:

$X = M_0 - M_1$

نتایج و بحث

غربال انتخابی باکتری‌های متحمل اسید

در این بررسی در مرحلهٔ نخست به منظور حذف انواع غیر متحمل اسید از روش غربال انتخابی در شرایط اسیدی استفاده شد. از سوی دیگر به منظور کاهش احتمال از دست دادن انواع متحمل به اسید در طی مراحل مختلف از سانتریفوژ و نیز افزودن نیستاتین به محیط استفاده شد. با استفاده از روش غربال انتخابی ۵۶ ایزوله باکتری اسید لاکتیک متحمل شرایط اسیدی از ۳۰ نمونه مختلف محصول لبنی تخمیری سنتی لیقوان جداسازی شد. مقایسه نسبت ایزوله‌های متحمل اسید جدا شده از محصولات مختلف نشان می‌دهد، بیش‌ترین ایزوله‌های متحمل اسید به ترتیب از ماست حلبی، پنیر سبلان، پنیر لیقوان تازه و پنیر لیقوان دو ماهه جدا شده است. اما به نسبت سویه‌های کم‌تری از پنیر لیقوان سه ماهه، ماست، کشک و دوغ به‌دست آمده است(جدول۱). پس از

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

بررسی‌های میکروسکوپی و آزمون کاتالاز از میان ۵۶ سویه باکتری اسید لاکتیک جدا شده ۴۸ سویه جنس لاکتوباسیل تشخیص داده شد و برای آزمون‌های تکمیلی(بعدی) انتخاب شد. مقایسهٔ این نتایج با گزارش‌های قبلی نشان می‌دهد، اولاً این روش بسیار سریع‌تر و کم هزینه‌تراست، ثانیاً احتمال از دست رفتن باکتری‌های متحمل اسید کاهش می‌یابد. برای مثال Sussi و همکاران(۲۰۰۵) تنها از یک نمونه پنیر سنتی ایتالیایی۶۳ سویه لاکتوباسیل جدا کردند که از بین آن‌ها تنها سه سویه مقاومت بالایی نسبت به شرایط اسیدی و املاح صفراوی نشان دادند[۲۷]. در پژوهش دیگری Valerie و همکاران (۲۰۰۳) ۸۸ سویهٔ لاکتوباسیل جدا شده از شیر غیر پاستوریزه و پنیر را از نظر خصوصیات پروبیوتیکی بررسی کردند. از ۸۸ سویهٔ بررسی شده تنها ۶ سویه در برابر تیمار اسیدی و املاح صفراوی مقاومت نشان دادند[۲۸]. مقایسهٔ این گزارش‌ها با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش نشان می‌دهد در روش غربال انتخابی، تیمار اسیدی کردن محیط تا حدود زیادی سویه‌های غیرپروبیوتیکی را حذف می‌کند و امکان بررسی نمونه‌های بیش‌تری را فراهم می‌سازد؛ به‌طوری‌که از ۳۰ نمونه مختلف ۵۶ سویه لاکتوباسیل متحمل اسید جداسازی شد و از این تعداد ۱۸ سویه مقاوم به شرایط اسیدی و املاح صفراوی انتخاب شد.

مقاومت به اسید

بررسی مقاومت به اسید روی ۴۸ ایزوله لاکتوباسیل متحمل اسید انجام شد. تعداد ۱۶ ایزوله بعد از ۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در شرایط اسیدی جمعیتی بیش از $۱۰^{۷}$ نشان دادند. تعداد ۱۲ ایزوله نیز بعد از ۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در شرایط اسیدی جمعیت $۱۰^{۵}$ تا $۱۰^{۷}$ نشان دادند. ۲۰ ایزوله دیگر جمعیتی کم‌تر از $۱۰^{۵}$ نشان دادند. هر یک از محققان با توجه به شرایط انتخابی و میزان زنده‌مانی به‌دست آمده گروه‌بندی خاص خود را از نظر مقاومت باکتری‌ها به اسید ارائه کرده‌اند [۲۳]،[۲۹]،[۳۰]،[۳۱]،[۳۲].

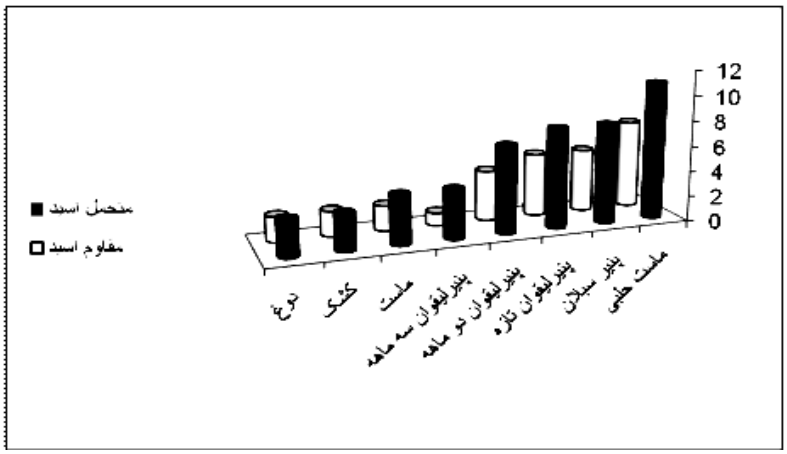
جدول۱. گروه بندی ایزوله‌های متحمل اسید

ردیف	محصول لبنی	تعداد لاکتوباسیل‌های متحمل اسید	تعیین جمعیت بعد از تیمار اسیدی		
			$\geq ۱۰^{۷}$	$۱۰^{۶} \geq x \leq ۱۰^{۵}$	$\leq ۱۰^{۴}$
۱	ماست خیک	۱۱	۵	۲	۴
۲	پنیر سبلان	۸	۳	۲	۳
۳	پنیرلیقوان تازه	۸	۲	۳	۳
۴	پنیرلیقوان دو ماهه	۷	۲	۲	۳
۵	پنیرلیقوان سه ماهه	۴		۱	۳
۶	ماست	۴	۲		۲
۷	کشک	۳	۲		۱
۸	دوغ	۳		۲	۱
	مجموع ایزوله‌ها	۴۸	۱۶	۱۲	۲۰

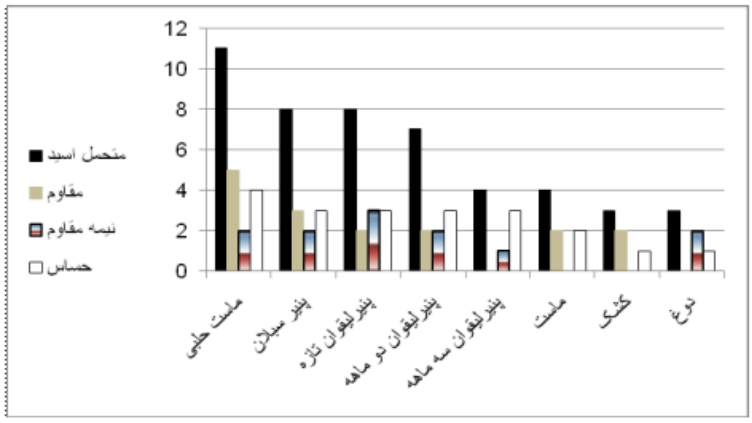
[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

با توجه به موارد ذکر شده ایزوله‌ها بر اساس میزان مقاومت به اسید، در سه گروه قرار گرفتند: ایزوله‌های با جمعیت بیش از $۱۰^{۷}$ مقاوم، ایزوله‌های با جمعیت $۱۰^{۵}$ تا $۱۰^{۷}$ نیمه مقاوم و ایزوله‌های با جمعیت کمتر از $۱۰^{۵}$ حساس (جدول۱). ۲۲ ایزوله مقاوم و نیمه مقاوم به اسید برای بررسی بیش‌تر و آزمون‌های بعدی انتخاب شدند (شکل۲).

به‌طور کلی ایزوله‌های متحمل و مقاوم اسید بیش‌تری از ماست حلبی، پنیر سبلان، پنیرلیقوان تازه و دوماهه نسبت به دیگر محصولات لبنی بررسی شده جدا شد(شکل۱).



شکل ۱. مقایسهٔ تعداد ایزوله‌های لاکتوباسیل مقاوم و متحمل اسید جدا شده از محصولات لبنی سنتی لیقوان



شکل ۲. مقایسهٔ تعداد لاکتوباسیل‌های مقاوم، نیمه مقاوم و حساس به اسید جدا شده از محصولات لبنی سنتی لیقوان

تحمل نمک‌های صفراوی

از ۲۲ سویه بررسیشده ۷ سویه جزء گروه بسیار مقاوم، ۸ سویه جزء گروه مقاوم،۳ سویه جزء گروه متحمل، ۲ سویه جزء گروه حساس و یک سویه جزء گروه بسیار حساس به املاح صفراوی دسته‌بندی شدند. ۱۸ سویه بسیارمقاوم، مقاوم و متحمل نمک‌های صفراوی برای بررسی‌های تکمیلی در این مرحله انتخاب شدند که نتایج آن در جدول۲ قید شده است.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

شناسایی بیوشیمیایی این سویه‌ها نشان داد توانایی مقاومت و تحمل املاح صفراوی وابسته به گونه نیست و در بین سویه‌های یگ گونه متفاوت است(جدول۲). دامنهٔ وسیع میزان مقاومت به املاح صفراوی و گوناگونی در میزان مقاومت سویه‌های مختلف که در این پژوهش مشاهده می‌شود در بسیاری از گزارش‌های ارائه شده توسط دیگر محققان، vijendra (۲۰۰۵)، Liong (۲۰۰۵)، pennacchia (۲۰۰۴) و Jacobsen (۱۹۹۹) نیز قید شده است.

این نتایج با نتایجی که Ortiu در سال ۲۰۰۷ از بررسی لاکتوباسیل‌های جداشده از شیر تخمیری ساردینا به‌دست آورد منطبق است. بر اساس نتایج حاصل از تحقیقات این پژوهش‌گر، سویه‌های جدا شده از فرآورده‌های لبنی سنتی نسبت به پروبیوتیک تجاری Enterolactis, Reuflor مقاومت بیش‌تری دارند. این نتایج اهمیت بررسی مقاومت در برابر شرایط اسیدی و املاح صفراوی، در انتخاب سویه‌های پروبیوتیک را تأیید می‌کند[۳۳].

میزان جذب کلسترول

در این پژوهش ۱۹ سویه انتخابی از مرحلهٔ قبل(سویه‌های مقاوم به اسید و املاح صفراوی) از نظر جذب کلسترول با روش o-phthalaldehyde ارزیابی شدند. توانایی جذب کلسترول توسط این سویه‌ها بین µg/ml ۲۶۶-۵۴ یا(۸۸/۸٪- ۱۸٪) متغیر بود. نتایج نشان می‌دهد که سویه‌های C6i4, Y2f3, Y1l4), C6m3, (C4i2, Y2b9, Y2c4, Y2n2 با جذب کلسترول بالای ۲۰۰µg/ml از بهترین سویه‌های پروبیوتیک برای کاهش جذب کلسترول در این پژوهش هستند. که در مقایسه با سویه‌های تجاری میزان جذب نسبتا بیش‌تری دارند. توانایی جذب کلسترول محیط کشت توسط سویه‌های مختلف باکتری‌های اسید لاکتیک مانند *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. casei*, *Lb. gasseri*, *Lb. amylovorus* را دانشمندان مختلف به اثبات رسانده‌اند[۳۴]،[۳۵]،[۳۶].

در پژوهشی که Malgorzata Ziarona و همکارانش(۲۰۰۷) صورت دادند توانایی جذب کلسترول آغازگرهای لبنی تجاری مانند *Streptococcus salivarius* و *Lactobacillus delbrueckii* بررسی شد. نتایج نشان داد جذب کلسترول هیچ‌کدام از این سویه‌ها از ۲۷٪ تجاوز نکرد. درحالی‌که افزودن سویه‌های پروبیوتیک *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* موجب افزایش جذب کلسترول تا ۳۸٪ شد [۳۷].

Preira و همکاران(۲۰۰۲) در مقایسه‌ای که روی دامنه جذب کلسترول باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از رودهٔ انسان و سویه‌های پروبیوتیک تجاری داشتند، نشان دادند میزان جذب در بین سویه‌های جدا شده از رودهٔ انسان بررسی شده بین ۴۷٪-۰/۴٪ و در بین سویه‌های پروبیوتیک تجاری بین ۱۴/۱٪- ۰/۲٪ متغیر است. بر خلاف انتظار بیش‌ترین جذب کلسترول در سویه‌های غیر تجاری دیده می‌شود[۳۸].

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

جدول۲. شناسایی بیوشیمیایی و تعیین میزان جذب کلسترول لاکتوباسیل‌های مقاوم به اسید و املاح صفراوی

شماره	کد ایزوله	گونه	منبع جداسازی	جذب کلسترول(µg/L)
۱	C4i2	*farieminis*	پنیر لیقوان	۲۴۰
۲	D3b1	*planetarium*	دوغ	۱۶۱
۳	C1d2	*lactis*	پنیر لیقوان	۴۱
۴	C6m1	*jenseuii*	پنیر سبلان	۴۱
۵	C6m3	*planetarium*	پنیر لیقوان	۲۷۶
۶	K1l4	*planetarium*	کشک	۱۱۳
۷	Y1m4	*casei*	ماست تازه	۱۵۳
۸	K2l3	*agilis*	کشک	۹۹
۹	Y1l4	*alimentarium*	ماست تازه	۲۶۶
۱۰	C6l2	*rhumnosus*	پنیر لیقوان	۳۴
۱۱	C2h1	*lactis*	پنیر لیقوان	۵۴
۱۲	y2c4	*casei*	ماست کهنه	۲۲۵
۱۳	Y2l6	*casei*	ماست کهنه	۱۴۱
۱۴	Y3f3	*casei*	ماست کهنه	۲۶۳
۱۵	Y2b9	*acidophilus*	ماست کهنه	۲۴۰
۱۶	Y2p3	*casei*	ماست کهنه	۹۹
۱۷	Y2b10	*salivarus*	ماست کهنه	۱۶۱
۱۸	Y2n2	*casei*	ماست کهنه	۲۱۱

نتیجه‌گیری

تنوع میکروبی در محصولات لبنی بسیار وسیع است. ازاین‌رو بررسی میکروفلور این فرآورده‌ها با مشکلات فراوانی همراه است. روش غربال‌گری مستقیم با ممانعت از رشد باکتری‌های حساس به اسید می‌تواند روشی مناسب برای جداسازی سویه‌های دارای پتانسیل پروبیوتیکی باشد و بررسی خصوصیات پروبیوتیکی محصولات لبنی را ساده‌تر سازد.در این پژوهش از۳۰ نمونهٔ مختلف محصول لبنی تخمیری سنتی ۴۸ سویه لاکتوباسیل خالص‌سازی شد که توانایی حیات در pH=۲/۵ را دارند. بررسی‌های تکمیلی روی این ۴۸ ایزوله مانند بررسی میزان مقاومت نسبت به شرایط اسیدی و املاح صفراوی و توانایی کاهش کلسترول محیط کشت منجر به انتخاب سویه‌های مناسب پروبیوتیک از محصولات لبنی تخمیری سنتی لیقوان شد. بررسی منابع جداسازی این سویه‌ها نشان می‌دهد پنیر دو ماهه و ماست تازه و حلبی لیقوان دارای پتانسیل پروبیوتیکی بیش‌تری نسبت به دیگر محصولات هستند. در صورت انجام پژوهش‌های تکمیلی و تعیین تعداد باکتری‌های پروبیوتیک در هنگام مصرف می‌توان این محصولات را فرآورده‌های لبنی فرآویژه سنتی معرفی نمود.

از آن‌جا که پنیر لیقوان از شیر خام(نجوشیده) تهیه می‌شود، این محصول در بدو تولید حاوی باکتری‌های بیماریزا مثل اشرشیا کولی و استافیلاکوکوس اورئوس است. ازاین‌رو برای کاهش و حذف آلودگی میکروبی و همچنین تکمیل فرآیند تولید و ایجاد عطر و طعم مناسب در این محصول قبل از مصرف پنیر به مدت سه ماه در آب و نمک ۹% نگه‌داری می‌شود. نتایج این بررسی نشان می‌دهد پنیر لیقوان تازه تا دو ماه بعد از تولید و

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

نگه‌داری در آب و نمک منبع بسیار مناسبی از لاکتوباسیل‌های بالقوه پروبیوتیک است. اما لاکتوباسیل‌های بالقوه پروبیوتیک در پنیر لیقوان سه ماهه(زمان مصرف) دیده نمی‌شوند. با توجه به وسعت مصرف پنیر لیقوان در کشور، در صورت حل مشکل آلودگی میکروبی پنیر دو ماهه لیقوان و کاهش دورهٔ نگه‌داری از سه ماه به دو ماه پنیر لیقوان نیز می‌تواند گزینهٔ مناسبی برای تولید محصولات لبنی پروبیوتیک سنتی باشد.

همچنین بررسی‌های تکمیلی روی سویه‌های اسید لاکتیک مقاوم به شرایط اسیدی و املاح صفراوی جدا شده از محصولات لبنی تخمیری سنتی ایران می‌تواند منجر به انتخاب سویه‌های پروبیوتیک مناسب برای کاربرد توام با آغازگرهای تجاری به منظور افزایش سطح سلامت محصولات لبنی باشند.

منابع

1. W.P. Charteris, Ingredient selection criteria for probiotic micro-organisms in functional dairy foods. Dairy Technology, 51 (1998) 123-136.
2. A.J. Alhart and Stage, Use of probiotic in tratment of inflamatory bowel disease, Journal clinic gasteroenterol, 36 (2003) 111-119.
3. M. David Collins, and G. Gibson, Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. 69 (1999) 1052S–7S.
4. M. Saarela, Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. Journal of biotechnology, 84 (2000) 197–215.
5. G. A. Birollo and J.A.Reinheimer, Viability of lactic acid microflora in different types of yoghurt. Food reserch, 33 (2000) 799-805.
6. R.C. Chandan, enhancing market value of milk by adding culture, Journal of Dairy Science, 82 (1999) 2245-2256.
7. G. Ambadoyiannis, Probiotic and Technological Properties of Enterococci Isolates from Infants and Cheese, Food Biotecnology, 18(3) (2004) 307–325.
8. C. Arthure, A. Ouwehand, and S. Salminen, probiotics: an overview of benefical effects. Antonie Van leeuwenhoek, 82 (2002) 279-289.
9. L. Morelli, in vitro selection of probiotic lactobacilli:Acritical appraisal. Current issues intestinal microbiology, 2 (2000) 59-67.
10. P. Marteau, Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of stomach and small intestine: validation and the effect of bile, Journal of Dairy Science, 80 (1997) 1031-1037
11. P.L. Conway, S.L.Gorbach and B.R. Goldin, Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. Journal of Dairy Science, 70 (1987) 1–12.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

12. M.F. Fernandez, S. Boris, and Barbes., Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. Journal of Applied Microbiology, 94 (2003) 449–455
13. A. Bezkorovainy, Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. The american journal of clinical nutrition. 73: 399–405.
14. J. E. Manson, The primary prevention of myocardial infarction, Journal of med, 326 (1992) 1406–1416.
15. M.T. Liong , Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. Journal of Dairy Science, 88 (2005) 55-66.
16. L. Saavedraa, Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic
17. Enterococcus faecium strains. international Journal of Food Microbiology, 88(2003)241-245.
18. V. Coeuret, S. Dubernet , Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. INRA, EDP science (2003) 269-306.
19. C. Pennacchia. and D. Ercolini, Selection of Lactobacillus strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. Meat Science, 67 (2004) 317-309
20. S. Erkkila and E. Petaja, Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. Meat Science, 55 (2000) 297–300.
21. G. Gardiner, Relative Ability of Orally Administered Lactobacillus murinus To Predominate and Persist in the Porcine Gastrointestinal Tract. Applied and Environmental Microbiology, 70 (2004) 1895-1906.
22. P.L. Conway, Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. Journal of Dairy Science, 70 (1987) 1-12.
23. S.E. Gilliland and D.K. Walker, Factors to consider when selecting a culture of Lactobacillus acidophilus as a dietary adjunct to produce a hypocholesteremic effect in humans. Journal of Dairy Science, 73 (1989) 905-911
24. M. Liong, Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. journal of dairy science, 88 (2005) 55-66.
25. L. Saavedraa, Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic Enterococcus faecium strains. International Journal of Food Microbiology, 88 (2003) 241– 245.
26. N. Parvathy Seema and P.K. Surendran, biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from fish and prawn. Journal of culture collections, 4 (2004-2005) 48-52.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

27. E.J. Fagnant, C.C. Sanders, Development and evaluation of a biochemical scheme for identification of endocervical Lactobacilli. Journal of clinical microbiology, (1982) 926-934.

28. M. Succi, Bile salt and acid tolerance of Lactobacillus rhamnosus strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. Ferms Microbiology Letters, 244 (2005) 129–137.

29. Vale´rie Coeuret and M. Gueguen, In vitro screening of potential probiotic activities of selected lactobacilli isolated from unpasteurized milk products for incorporation into soft cheese. Journal of Dairy Research, 71 (2004) 451-460.

30. Dunne.ColuLiam O'Mahony, L.M., Gerardine Thornton, Darrin Morrissey, SileO'Halloran, Maria Feeney, and G.F. Sarah Flynn, Charles Daly, Barry Kiely, Gerald C.O'Sullivan, Fergus Shanahan, and J Kevin Collins, *In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin correlation with in vivo findings.*

31. G. Ambadoyiannis, Probiotic and Technological Properties of Enterococci Isolates from Infants and Cheese. Food Biotecnology, 18(3) (2004) 307-325.

32. M.F. Bernet-Camard, The Human Lactobacillus acidophilus Strain LA1 Secretes a Nonbacteriocin Antibacterial Substance(s) Active In Vitro and In Vivo. Applied and environmental microbiology, 63 (1997) 2747-2753

33. M. Vijendra, Appliction invitro medthods for selection of lactobacillus casei strains as potential probiotics. food microbiology, 103 (2004) 109-115.

34. S. Ortua, Identification and functional characterization of Lactobacillus strains isolated from milk and Gioddu, a traditional Sardinian fermented milk. International Dairy Journal, 17 (2007) 1312-1320.

35. D.R. Walker, Relationship among bile tolerance, bile salt deconjugation, andassimilation of cholesterol by Lactobacillus acidophilus. Journal of Dairy Science, 76 (1993) 956-961.

36. A. Hosono, Impact of fermented milk on human health: Cholesterol-lowering and immunomodulatory properties of fermented milk. Animal Sci, 73 (2002) 241-256.

37. J.P. Grill, Effects of Lactobacillus amylovorus and Bifidobacterium breve on cholesterol. 31 (2000) 154-156.

38. M. Ziarno, E.Sekul, cholesterol assimilation by commercial yoghurt starter cultures ,Acta Sci. Pol., Technol., 6(1) (2007) 83-94.

39. D.I.A. Pereira. and R.Gibson, Cholesterol Assimilation by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria Isolated from the Human Gut. Applied and environmental microbiology, 68 (2002) 4689-4693.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]