فصلنامه

دانش میکروب شناسی

سال اول، شماره ۲، بهار ۱۳۸۸

بررسی تاثیر دمای هوای خروجی اسپری درایر روی بقاء پودر پرو بیوتیکی بیفیدوباکتر

بهاره بیگدلی[1*]، محمد رضا فاضلی[2]، جمیله نوروزی[1]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال(نویسنده مسئول) ۲- دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی

چکیده

اسپری درائینگ روش پیشنهادی برای نگهداری میکروارگانیسم ها با سرعت تولید بالا و هزینه اجرای پایین است اما پودرهای تولید شده در این روش، کاهش قابل توجهی در تعداد باکتری زنده را نشان داده اند. دمای هوای خروجی اسپری درایر، یکی از مهمترین عوامل بر کاهش تعداد باکتری زنده پودرهای پروبیوتیکی است. بنابراین هدف از این تحقیق، بررسی تاثیر دمای هوای خروجی اسپری درایر روی تعداد باکتری زنده پودرهای پروبیوتیکی بیفیدوباکتر تیمار شده و تیمار نشده است. میزان بقاء پودرهای تیمار شده و تیمار نشده در شرایط افزایش دمای هوای خروجی، به شدت تحت تاثیر قرار می گیرد اما پو درهای تیمار شده در مقایسه با پودرهای تیمار نشده در شرایط مشابه، میزان بقاء بهتری را نشان داده اند. به طور کلی، بیفیدوباکتریوم انیمالیس و بیفیدوباکتریوم آدلوسنتیس در شرایط افزایش دمای هوای خروجی، به ترتیب مقاوم ترین و حساس ترین باکتریها بودند. کاهش تعداد باکتری پودرهای تیمار شده و تیمار نشده بیفیدوباکتریوم انیمالیس در شرایط افزایش دمای هوای خروجی، به ترتیب ۲/۴۱ و ۳ /۸۲ واحد لگاریتمی بود. در مقابل، کاهش تعداد باکتری پودرهای تیمار شده و تیمار نشده بیفیدوباکتریوم آدلوسنتیس در شرایط افزایش دمای هوای خروجی، به ترتیب ۴/۵۳ و ۶/۷۲ واحد لگاریتمی است. همچنین خاصیت ضدباکتریایی ایزوله های مقاوم و باکتری های تیمار نشده به روش لکه گذاری با هم مقایسه شد. در روش لکه گذاری، اختلاف معنی داری ($p>0.05$) بین قطر هاله عدم رشد سویه های مقاوم و باکتری های تیمار نشده مشاهده نشد. بررسی تاثیر دمای هوای خروجی اسپری درایر روی تعداد باکتری زنده پودر پروبیوتیکی بیفیدوباکتر، می تواند باعث کسب بهترین دمای هوای خروجی برای نگهداری باکتری های پروبیوتیک گردد. پودرهای بیفیدوباکتر مقاوم تولید شده می توانند در محصولات دارویی و مکملهای غذایی مورد استفاده قرار گیرند.

واژگان کلیدی: پروبیوتیک، بیفیدوباکتر، اسپری درائینگ، مکمل غذایی

مقدمه

طبق تعریف سازمان بهداشت جهانی، پروبیوتیک ها مکمل های غذایی حاوی میکروارگانیسم های زنده و غیرپاتوژن هستند که با ایجاد تعادل در فلور میکروبی دستگاه گوارش، روی سلامتی میزبان خود تاثیر می‌گذارند. بر طبق این تعریف، باکتری های پروبیوتیک باید در مکان هدف یعنی در بدن میزبان، زنده و غیربیماری زا باقی مانده و تمامی خصوصیات پروبیوتیکی خود را نشان دهند (۱). از سوی دیگر پیشنهادشده است که تعداد باکتری‌های پروبیوتیک در مکان هدف درون بدن میزبان، باید حداقل 10^7 میکروارگانیسم زنده و فعال در هر گرم پودر و یا هر میلی لیتر مایع باشند (۲و۳). این باکتری ها با تولید

Archive of SID

www.SID.ir

ترکیبات ضدمیکروبی، مواد مغذی و فاکتورهای رشد باعث حفظ سلامتی مجاری گوارش، کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، پیشگیری از بروز بیماری ها و افزایش قدرت سیستم ایمنی میزبان می شوند (۱ و ۴ و ۵). بیفیدوباکتریوم ها و لاکتوباسیلوس‌ها از مهمترین پروبیوتیک های مورد استفاده در مکمل های غذایی و فرآورده‌های دارویی محسوب می شوند. با توجه به ویژگی های باکتری های پروبیوتیک به ویژه بیفیدوباکتریوم ها در بهبود و حفظ سلامتی میزبان، علاقه به استفاده از آنها به طور روز افزونی گسترش یافته است. انتخاب باکتری های پروبیوتیک مقاوم با توانایی تحمل شرایط استرس در طول مراحل تولید بخصوص فرآیند خشک کردن و نگهداری، یکی از مهمترین مراحل در تولید صنعتی پروبیوتیک‌ها است(۶). یکی از روش‌هایی که امروزه برای حفاظت و نگهداری محیط های کشت پروبیوتیکی مورد استفاده قرار می گیرد، خشک کردن به روش اسپری درایینگ است. این روش از رایج ترین روش های مورد استفاده در تولید مکمل های غذایی خشک پایدار با اشغال حجم کم محسوب می شود (۷). در سال های اخیر به دلیل مزایای روش اسپری درایینگ مانند هزینه کمتر و زمان کوتاه تر، تلاش های فراوانی برای استفاده از روش اسپری درایینگ بجای لیوفیلیزاسیون برای تهیه فرآورده های دارویی و غذایی پروبیوتیکی صورت گرفته است. این مسئله بخصوص در کشور ما با توجه به کمبود امکانات لیوفیلیزاسیون برجسته تر می باشد. با توجه به محاسن ذکر شده، در روش اسپری درایینگ به علت وجود دما و فشار بالا، آسیب های زیادی به فسفولیپیدهای دیواره سلولی باکتری می رسد که این امر باعث از بین رفتن باکتری بلافاصله بعد از خشک کردن و یا در مرحله نگهداری می شود. با توجه به مشکلات مطرح شده، ایجاد سویه های مقاوم به شرایط استرس محیطی موجود در طول مراحل ساخت فرآورده های دارویی و غذایی حائز اهمیت است. امروزه برای حفاظت باکتری های پروبیوتیک در برابر استرس های موجود، از روشهای سازگاری با استرس و حفاظت متقاطع استفاده می شود (۲ و ۸). علاوه بر تولید سویه های مقاوم، تنظیم دمای هوای گرم ورودی که باعث تغییر دمای هوای خروجی موجود در اسپری درایر می شود نیز اهمیت زیادی دارد. در دستگاه اسپری درائینگ، جریان هوای گرم ورودی برای زمان کوتاه در حدود چند ثانیه با باکتری ها موجود در محیط کشت حامل تماس دارد، اما هوای گرم خروجی در تمام زمان خشک کردن در تماس با باکتری ها است و بر روی بقاء و تعداد باکتری های زنده بعد از خشک شدن و مرحله نگهداری تاثیر زیادی می گذارد. در این تحقیق هدف بررسی تاثیر دمای هوای خروجی اسپری درایر بر روی تعداد باکتری های زنده موجود در پودرهای باکتریایی تیمار شده و تیمار نشده بعد از اسپری درائینگ در محیط کشت حامل دارای پروبیوتیک مالتودکسترین بود.

مواد و روش ها

میکروارگانیسمهای مورد استفاده

گونه های باکتریایی مورد استفاده بیفیدوباکتریوم انیمالیس (*Bifidobacterium animalis*)، بیفیدوباکتریوم بیفیدوم (*Bifidobacterium bifidum*)، بیفیدوباکتریوم انگولاتوم (*Bifidobacterium angulatum*) و بیفیدوباکتریوم آدلوسنتیس (*Bifidobacterium adelosentis*)، از سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران به صورت کپسول لیوفیلیزه تهیه گردید. این باکتریها به محیط کشت مایع MRSغنی شده با ۰/۰۵٪ ال سیستئین تلقیح شدند. سپس در شرایط بی هوازی ایجاد شده با دستگاه انوکسومات ($H_2/CO_2/N_2$; 10: 5: 85) و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرما گذاری شدند.

تیمارهای دما

کشت ۲۴ ساعته از هر یک از باکتری ها، به مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm ۶۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. سپس محلول رویی دور ریخته شده و رسوب باقیمانده دو بار با بافر فسفات سالین(PBS) برای جدا کردن باقی مانده محیط کشت شستشو شد. سرانجام سوسپانسیون باکتری به نسبت (v/v) ۱٪ در محیط کشت مایع Mann (MRS) Rogusa Sharp غنی شده با ۰/۰۵٪ ال سیستئین تلقیح شدند. این محیط کشت ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری با دمای ^oC ۴۰ و سپس همین محیط کشت به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ^oC ۵۰،۹۰ دقیقه در دمای ^oC ۶۰ ،۱۲۰ دقیقه در دمای ^oC۷۰ و در انتها به مدت

Archive of SID

www.SID.ir

۱۵۰ دقیقه در دمای $80^{o}C$ قرار داده شد. سپس فرآیند فوق به مدت ۶۰ دقیقه در بن ماری با دمای $40^{o}C$، ۹۰ دقیقه در دمای $50^{o}C$، ۱۲۰ دقیقه در دمای $60^{o}C$، ۱۵۰ دقیقه در دمای $70^{o}C$ و۱۸۰ دقیقه در دمای $80^{o}C$ بر روی سویه های مقاوم به تیمار دمایی ۱ (۱۵۰ دقیقه در دمای $80^{o}C$) و باکتریهای حساس تیمار نشده، به منظور مقاوم سازی بهینه تر به شرایط استرس دمایی، تکرار گردید. بعد از این مرحله، سویه های مقاوم به تیمار دمایی۲ (۱۸۰ دقیقه در دمای $80^{o}C$) جدا شده و روی محیط کشت جامد با pH نرمال برای ۳ تا ۴ روز در شرایط بی هوازی گرما گذاری شدند.

تیمار اسید

کشت ۲۴ ساعته سویه های مقاوم به تیمار دمایی ۲ و باکتری های حساس تیمار نشده، به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۶۰۰۰rpm سانترفیوژ شدند. سپس محلول رویی دور ریخته و رسوب باقیمانده، دو بار با بافر فسفات سالین (PBS) برای جدا کردن باقی مانده محیط کشت شستشو شد. سرانجام سوسپانسیون باکتری ها با نسبت (v/v) ۱ ٪ به محیط کشت مایع MRS غنی شده با ۰/۰۵٪ ال سیستئین با pH= ۷ تلقیح و به مدت ۲ ساعت در شرایط بی هوازی در دمای $37^{o}C$ گرما گذاری شد. سپس تمامی مراحل قبل بر روی محیط های کشت مایع قبلی با pH= ۷ انجام گرفت و رسوب های با قیمانده به مدت ۱/۵ساعت درمحیط کشت مایع با pH= ۶، به مدت ۱ ساعت با pH= ۵، به مدت ۱ ساعت با pH= ۴، به مدت ۱ ساعت با pH= ۳ و درانتها به مدت ۱ ساعت با pH= ۲/۵ تلقیح و گرما گذاری شدند. بعد از این مرحله سویه های مقاوم به تیمارهای دما و اسید جدا و روی محیط کشت جامد برای مدت ۳ تا ۴ روز در شرایط بی هوازی گرما گذاری شدند.

تیمار نمک های صفراوی

کشت ۲۴ ساعته سویه های مقاوم به تیمارهای دما و اسید و باکتریهای حساس تیمار نشده، به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۶۰۰۰rpm سانتریفیوژ شدند. سپس محلول رویی دور ریخته شد و رسوب باقیمانده، دو بار با بافر فسفات سالین (PBS) برای جدا کردن باقی مانده محیط کشت شستشو شد. سرانجام سوسپانسیون باکتری ها با نسبت (v/v) ۱٪ به محیط کشت مایع MRS غنی شده با ۰/۰۵٪ ال سیستئین بعلاوه نمک های صفراوی با درصدهای وزنی حجمی، ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ تلقیح گردید و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی هوازی در دمای $37^{o}C$ گرما گذاری شدند. سپس تعداد باکتری های زنده مانده بعد از ۴۸ ساعت گرما گذاری، با استفاده از روش رقت سازی تعیین گردید. بعد از این مرحله سویه های مقاوم به تیمارهای دما و اسید و نمک های صفراوی (سویه های مقاوم به همه تیمارها) جدا و روی محیط کشت جامد برای مدت ۳ تا ۴ روز در شرایط بی هوازی گرما گذاری شدند (۱).

بررسی تاثیر افزایش دمای هوای خروجی روی بقاء پودرهای باکتریایی تیمار شده و تیمار نشده

سویه های مقاوم به همه تیمارها تهیه شده در مرحله قبل و باکتری های تیمار نشده، مجددا در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در شرایط بی هوازی به مدت ۲۴ ساعت گرما گذاری شدند. کشت ۲۴ ساعته باکتری ها به محیط کشت حامل برای خشک کردن شامل پرمآت(۱۵٪w/v)، قند D-گلوکز(۵٪ w/v) و عصاره تخمیر شده ذرت (۵٪ v/v) اضافه شدند. دراین مرحله به محیط‌های کشت حامل پری بیوتیک مالتودکسترین (۲۰٪ w/v) اضافه گردید. سپس محیط های کشت حامل بوسیله دستگاه اسپری درایر آزمایشگاهی با مشخصات (Buchi mini spray dryer B-119; Switzerland) با جریان ورودی مایع ثابت (۵ ml/min) و با دماهای متغیر هوای خروجی از ۶۵ تا ۹۰ درجه سانتی گراد، خشک شدند. تعداد باکتری زنده موجود در پودرهای باکتریایی هر دو گروه تیمار شده و تیمار نشده، در دماهای هوای خروجی مختلف با روش رقت سازی یا پورپلیت محاسبه شد.

بررسی خاصیت ضد میکروبی علیه باکتری های بیمـاریزا به روش لکه گذاری (Spot test)

جهت بررسی خاصیت ضدمیکروبی باکتری های بیفیدوباکتریوم از روش لکه گذاری استفاده شد، بدین ترتیب که ابتدا سوسپانسیون سلولی با 10^{8}-10^{9} سلول در هر میلی لیتر از هر یک از سویه های مقاوم به همه

Archive of SID

www.SID.ir

تیمارهای موجود در پودر و باکتری های تیمار نشده اولیه تهیه شد و با کمک سمپلر به اندازه ۵ ماکرولیتر در وسط پلیت های حاوی محیط کشت MRS agar + ال- سیستئین (که قبلاً تهیه شده بود) یک قطره قرار داده شد (به طوریکه میانگین قطر هاله ۷ میلی لیتر باشد) و سپس پلیت ها به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی هوازی و دمای ^{o}C ۳۷، گرما گذاری شدند. سپس از باکتری های بیماریزای مورد نظیر اشرشیا کلی (PTCC 1330 *Escherishia coli*)، سودوموناس آئروجینوزا (*Pseudomonas* PTCC *aueruginosa* 1074) و استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1337 *Staphylococcus aureus*) کشت تازه تهیه شد. سپس از محیط های کشت عوامل بیماریزا، سوسپانسیونی با $۱۰^{۸}$-$۱۰^{۹}$ سلول در هر میلی لیتر تهیه گردید و به میزان ۱ میلی لیتر به صورت جداگانه از هر باکتری بیماریزا به ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت نیمه جامد M.H.A + ۰/۷۵ آگار (که قبلاً تهیه و اتوکلاو شده و دمای آن بین ^{o}C ۴۵- ۴۰ است) اضافه گردید، در ادامه از محیط کشت نیمه جامد دارای باکتری، روی سطح محیط های کشت MRS agar + ال- سیستئین که باکتری بیفیدوباکتریوم در وسط آنها به صورت مرکزی رشد کرده است پخش شد، بطوریکه سطح پلیت را کاملاً پوشاند. پس از گذشت چند دقیقه و بستن محیط کشت نیمه جامد، پلیت های حاوی باکتری بیماریزا، به مدت ۴۸ ساعت در شرایط هوازی و دمای ^{o}C ۳۷، گرما گذاری گردید. بعد از گذشت ۴۸ ساعت، قطر هاله ی عدم رشد بیفیدوباکتریوم ها اندازه گیری و ثبت شد.

آنالیز آماری

محاسبات آماری برای تعیین اختلاف معنی دار بین بقاء پودرهای باکتریایی هر دو گروه تیمار شده و نشده بعد از اسپری درائینگ در دماهای هوای خروجی مختلف، بوسیله تکنیک t- test جفت شده ($P < 0.05$) انجام گرفت. لازم به ذکر است که تمامی آزمایشات برای دقت در محاسبات آماری ۳ بار تکرار شده است.

نتایج و بحث

باکتری های پروبیوتیک در اغلب روش های تکنولوژیکی تولید محصولات پروبیوتیک با شرایط استرس زای زیادی مواجه می شوند. از مهمترین آنها می توان به استرس های موجود در مرحله خشک کردن به روش اسپری درائینگ، نگهداری، توزیع وانتقال محصول اشاره کرد که منجر به کاهش میزان زنده ماندن باکتری ها و کاهش تاثیرات پروبیوتیکی آنها، می شود (۹). از میان پیشنهادات بسیار در زمینه روش هایی برای بهبود بقاء باکتری های پروبیوتیک در شرایط نامساعد موجود در طول مراحل تولید تا مصرف، روش هایی بر پایه سازگاری با استرس و حفاظت متقاطع، از بهترین روش های قابل استفاده در این زمینه محسوب می شوند. دانش ما در مورد مکانیسم های سازگاری با استرس و حفاظت متقاطع در باکتری های بیفیدوباکتریوم، هنوز بسیار اندک است (۱۰). تعداد مطالعات کمی در زمینه پاسخ های استرس سازگار کننده و حفاظت متقاطع، در باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (۱۱و۱۲)، بیفیدوباکتریوم بروه، بیفیدوباکتریوم لانگوم و بیفیدوباکتریوم آدلوسنتیس (۱۳) و تیمارهای استرس القاء کننده بهبود طی مراحل اسپری درائینگ در باکتری لاکتوباسیلوس پاراکازئی (۱۴) وجود دارد. به منظور بهبود بقاء و مقاومت باکتری های پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم نسبت به شرایط استرس، از تیمارهای دما، اسید و نمک های صفراوی به ترتیب بر روی سویه های مقاوم جدا شده از تیمار قبلی استفاده شد. همچنین سارلا و همکارانش در سال ۲۰۰۴ (۱۵) بیان کردند که تاثیر کوتاه مدت تیمارهای کمتر از حد کشنده مانند pH = ۳/۵-۴ و ۴۷ درجه سانتی گراد، می تواند باعث بهبود معنی دار بقاء گونه های لاکتوباسیلوس در مقابل تیمارهای کشنده بعدی شود. شایان ذکر است که القاء توانایی تحمل بالا در باکتری های بیفیدوباکتریوم می توانند با استفاده از چندین روش مکمل برای بهبود پایداری کلی آنها در برابر عوامل استرس صورت گیرد، اما انجام چنین تحقیقاتی به دشواری امکان پذیر است (۱۰).

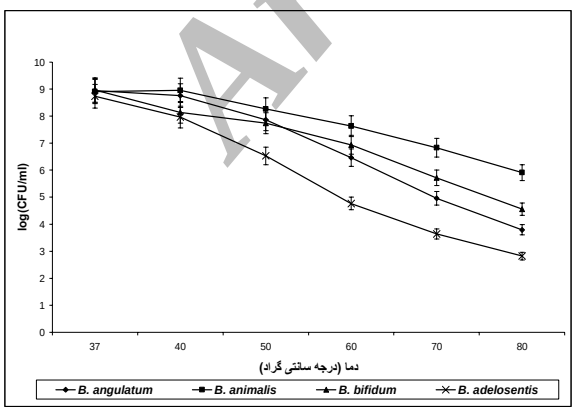
به طور کلی تحمل دمایی بیفیدوباکتریوم ها به صورت ذاتی پایین بوده و برای خشک کردن آنها بوسیله دستگاه اسپری درائینگ ، باید تحمل دمایی آنها بهبود یابد که مستلزم قرار گرفتن باکتری ها در دمای هوای بالا برای مدت زمان طولانی است. برای رسیدن به این منظور با قرار دادن آنها در شرایط استرس دمایی غیر کشنده (تیمارهای دما) قبل از خشک کردن و جدا کردن سویه

Archive of SID

www.SID.ir

های مقاوم به دما، تحمل دمایی در آنها بهبود یافت. در این تیمار دمایی، بقاء (تعداد باکتری زنده) به صورت log(CFU/ml) در دماهای مختلف تعیین گردید و به صورت منحنی رسم شد (نمودار ۱). با توجه به نتایج به دست آمده در نمودار۱، بیفیدوباکتریوم انیمالیس نسبت به بقیه باکتری ها، مقاوم تر بوده و در طی افزایش دما از۴۰ به ۸۰ درجه سانتی گراد، کاهشی برابر با ۳ واحد لگاریتمی در تعداد باکتری زنده را از خود نشان داده است. از سوی دیگر بیفیدوباکتریوم آدلوسنتیس حساس ترین باکتری بوده و کاهشی برابر با ۵/۹۲ واحد لگاریتمی در تعداد باکتری زنده را از خود نشان داده است. کاهش تعداد باکتری زنده بیفیدوباکتریوم ها در طی این تیمار، به ترتیب بیفیدوباکتریوم انیمالیس، بیفیدوباکتریوم بیفیدوم، بیفیدوباکتریوم آنگولاتوم و بیفیدوباکتریوم آدلوسنتیس با کاهش به ترتیب ۳، ۴/۴۱، ۵/۱ و ۵/۹۲ واحد لگاریتمی بوده است.

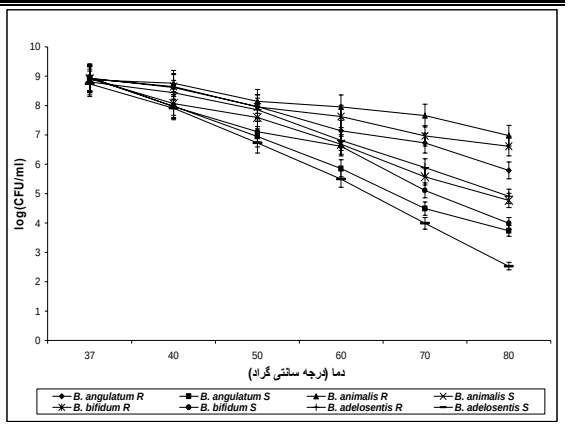
به منظور بهبود تحمل دمایی و سازگاری باکتری های بیفیدوباکتریوم به مراحل خشک کردن به وسیله روش اسپری درائینگ، روی سویه های مقاوم به تیمار دمایی ۱ (۱۵۰ دقیقه در دمای ^{o}C ۸۰) و باکتریهای حساس تیمار نشده، تیمار دمایی مجددی صورت گرفت و تاثیر تیمار قبلی بر روی سویه های مقاوم نسبت به باکتری های حساس تیمار نشده به وسیله تعیین تفاوت بقاء آنها مورد بررسی قرار گرفت. در تیمار دمایی ۲، زمانهای قرار گرفتن در شرایط استرس دمایی افزایش یافت تا سویه ها تحمل دمایی بهتری داشته باشند. با توجه به اینکه بیفیدوباکتریوم ها در طول فرآیند خشک کردن بوسیله اسپری درائینگ، تقریبا به مدت ۳ ساعت در دمای هوای خروجی در حدود ۷۰-۹۰ درجه سانتی گراد قرار می گیرند، با افزایش زمان در تیمار دمایی ۲، باکتریها قبل از قرار گرفتن در فرآیند خشک کردن، در شرایط مشابه قرار گرفته و از سویه های مقاوم در این شرایط، برای تولید پودر پروبیوتیکی بیفیدوباکتریوم بهینه تر با تعداد باکتری زنده بیشتر استفاده شد. در این تیمار دمایی، بقاء (تعداد باکتری زنده) به صورت log(CFU/ml) در دماهای مختلف تعیین گردید و به صورت منحنی رسم شد (نمودار ۲). با توجه به نتایج به دست آمده در نمودار ۲، بقاء (تعداد باکتری زنده) تمامی بیفیدوباکتریوم های مقاوم تیمار شده نسبت به بیفیدوباکتریوم های حساس مشتق شده از آنها، به صورت معنی داری ($p<0.05$) بهبود یافته است، به طوریکه تمامی سویه های مقاوم تیمار شده نسبت به باکتری های تیمار نشده، بیش از ۲ واحد لگاریتمی افزایش بقاء را نشان داده اند و نکته جالب توجه این است که بیفیدوباکتریوم بیفیدوم مقاوم تیمار شده نسبت به باکتری حساس مشتق شده از آن، با ۲,۶۳ واحد لگاریتمی، بیشترین بهبود را در بین باکتریها از خود نشان داده است. همچنین، بیفیدوباکتریوم انیمالیس مقاوم تیمار شده با کاهش ۱/۹ واحد لگاریتمی و بیفیدوباکتریوم آدلوسنتیس حساس با کاهش ۶/۲۵ واحد لگاریتمی، به ترتیب مقاوم ترین و حساس ترین باکتری این آزمایش بوده اند. در تعدادی از تحقیقات دیگر نیز حساسیت ذاتی باکتری های پروبیوتیک به حرارت بررسی شده و مقاومت در برابر استرس دمایی به عنوان یکی از مهمترین عوامل تعیین کننده بقاء باکتری ها در خشک کردن به روش اسپری درائینگ مطرح شده است (۱۶و ۱۷). همچنین تکسیریا و همکارانش در سال ۱۹۹۴(۱۳)، گزارش دادند که سازگاری با دما به وسیله تیمارهای دمایی باعث افزایش بقاء و زنده ماندن باکتری لاکتوباسیلوس بولگاریکوس در طول استرس دمایی می شود. در این تحقیق ثابت شد که استفاده از تیمارهای دمایی متوالی، باعث افزایش بقاء باکتری های بیفیدوباکتریوم در طول استرس دمایی بالاتر و شرایط دمایی خشک کردن به وسیله اسپری درائینگ می شود که با نتایج به دست آمده توسط تکسیریا و همکارانش در سال ۱۹۹۴ مطابقت دارد.



نمودار ۱. تیمار دمایی۱ بر روی باکتری های بیفیدوباکتریوم حساس تیمار نشده. Log (CFU/ml): لگاریتم واحدهای تشکیل دهنده کلنی در هر میلی لیتر.

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار ۲. تیمار دمایی۲ بر روی سویه های مقاوم به تیمار دمایی ۱ (۱۵۰ دقیقه در دمای ۸۰ ^{o}C) و باکتریهای حساس تیمار نشده.

R : سویه های مقاوم به تیمار دمایی ۱ (۱۵۰ دقیقه در دمای ۸۰ ^{o}C). S : باکتریهای بیفیدوباکتریوم حساس تیمار نشده.

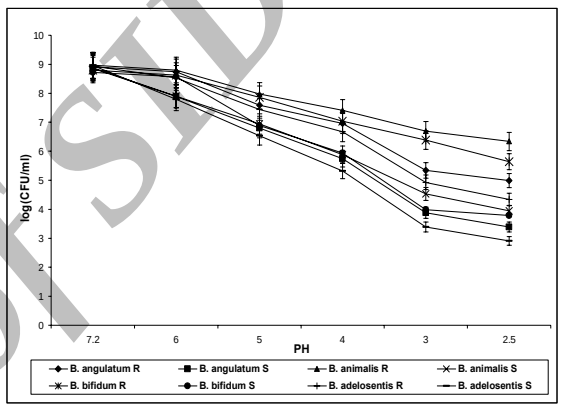
Log : (CFU/ml) لگاریتم واحدهای تشکیل دهنده کلنی در هر میلی لیتر.

با توجه به اینکه بیفیدوباکتریوم ها به صورت ذاتی توانایی تحمل اسیدی ضعیفی را از خود نشان می دهند، به منظور استفاده از مکانیسم های حفاظت متقاطع برای افزایش مقاومت باکتری ها در برابر استرس های محیطی موجود در روش اسپری درائینگ از تیمار اسیدی استفاده شد. به منظور بهبود مقاومت باکتری ها، بر روی سویه های مقاوم به تیمار دمایی ۲ (۱۸۰ دقیقه در دمای ۸۰ ^{o}C) و باکتری های حساس تیمار نشده، تیمار اسیدی انجام گرفت. با توجه به نتایج به دست آمده در نمودار۳، میزان بقاء تمامی سویه های مقاوم به تیمار دمایی ۲ نسبت به باکتری های تیمار نشده، به صورت معنی داری ($p<0.05$) بهبود یافته است، به طوریکه تمامی سویه های مقاوم به تیمار دمایی ۲ نسبت به باکتری های تیمار نشده، از۱/۴۳تا ۲/۴ واحد لگاریتمی افزایش بقاء را نشان دادند و نکته جالب توجه این است که بیفیدوباکتریوم انیمالیس مقاوم نسبت به باکتری حساس مشتق شده از آن با ۲/۴ واحد لگاریتمی ، بیشترین بهبود را در بین باکتر یها از خود نشان داده است. همچنین بیفیدوباکتریوم انیمالیس مقاوم با کاهش ۲/۶۳ واحد لگاریتمی و بیفیدوباکتریوم آدلوسنتیس حساس با کاهش ۶/۰۵ واحد لگاریتمی به ترتیب مقاوم ترین و حساس ترین باکتری این آزمایش بوده اند. پارک و همکارانش در سال ۱۹۹۵ (۱۸) اثبات کردند که سلول های باکتری بیفیدوباکتریوم بروه در۵/۲ = pH باعث مقاومت آنها در مقابل pH اسیدی کشنده بعدی در سطوح ۴-۲ =pH می شود. مائوس و همکارانش در سال ۲۰۰۳ (۱۱) بیان کردند که معمولا تمامی باکتری های بیفیدوباکتریوم دارای تحمل اسیدی ضعیفی هستند، تنها استثنایی که در این بین به چشم می خورد بیفیدوباکتریوم انیمالیس است که می تواند در شرایط اسیدی نسبت به بقیه گونه های بیفیدوباکتریوم خیلی بهتر زنده بماند. جایامان و همکارانش در سال ۲۰۰۶ (۱۹) نشان دادند که باکتری بیفیدوباکتریوم انیمالیس، معمولا تنها گونه بیفیدوباکتریوم زنده در شیرهای تخمیر شده است. نتایج به دست آمده در این تحقیق با نتایج ذکر شده توسط مائوس و همکارانش در سال ۲۰۰۳ (۱۱) و جایامان و همکارانش در سال ۲۰۰۶ (۱۹) مطابقت دارد. با توجه به نتایج موجود در نمودار۴، در همه موارد سویه های مقاوم به تیمارهای دما و اسید نسبت به باکتریهای حساس تیمار نشده در غلظت های بالای نمک صفراوی، به صورت معنی داری ($P<0.05$) افزایش بقاء از خود نشان دادند، به طوریکه تمامی سویه های مقاوم به تیمارهای دما و اسید نسبت به باکتریهای حساس تیمار نشده، از ۱/۵ تا ۳/۱۶ واحد لگاریتمی بهبود یافتند و نکته جالب توجه این است که بیفیدوباکتریوم انیمالیس مقاوم به تیمارهای دما و اسید نسبت به باکتری حساس مشتق شده از آن با ۳/۱۶ واحد لگاریتمی، بیشترین بهبود را در بین باکتری ها از خود نشان داده است. همچنین بیفیدوباکتریوم انیمالیس مقاوم به تیمارهای دما و اسید با کاهش ۱/۸۲ واحد لگاریتمی و بیفیدوباکتریوم آدلوسنتیس حساس با کاهش ۶/۰۳ واحد لگاریتمی، به ترتیب مقاوم ترین و حساس ترین باکتری این آزمایش بوده اند. دزموند و همکارانش در سال ۲۰۰۲ (۱) بیان کردند که القاء تحمل دمایی در باکتری لاکتوباسیلوس پارا کازئی NFBC ۳۳۸، به وسیله پیش تیمار با نمکهای صفراوی و پر اکسید هیدروژن بی تاثیر بود، اما سازگاری با نمک طعام به صورت معنی داری تحمل دمایی این باکتری را افزایش داد. اما نتایج به دست آمده در این تحقیق در مورد تیمار نمک صفراوی بر روی باکتری های بیفیدوباکتریوم نشاندهنده افزایش معنی دار ($P<0.05$) بقاء آنها در شرایط استرس بعدی و افزایش تحمل دمایی آنها در خشک کردن به وسیله اسپری درائینگ است که با نتایج به دست آمده توسط دزموند و

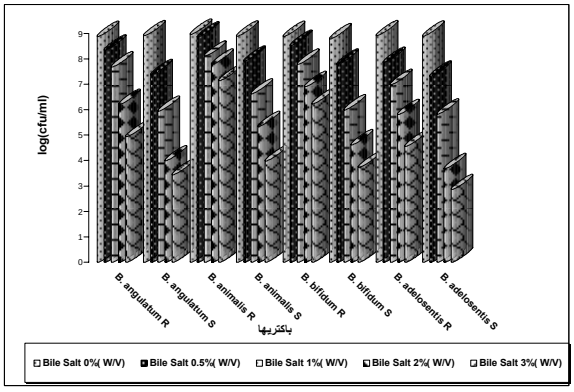
Archive of SID
www.SID.ir

همکارانش در سال ۲۰۰۲(۱) مطابقت ندارد که احتمالا به علت تفاوتهای ساختاری و فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی بین جنسهای لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم است.

در این بررسی میزان بقاء وکاهش تعداد باکتری زنده در هر دو گروه پودرهای تیمار شده و نشده با افزایش دمای هوای خروجی، بعد از اسپری درائینگ بررسی و با هم مقایسه گردید (جدول ۱). افزایش دمای هوای خروجی بر روی تعداد باکتری زنده هر دو گروه پودرهای تیمار شده و تیمار نشده، به شدت تاثیر گذار است، اما میزان این تاثیر بر روی پودرهای تیمار نشده نسبت به پودرهای تیمار شده خیلی زیادتر است.

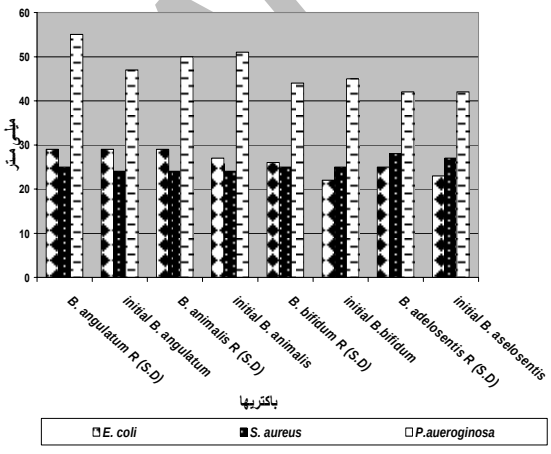


نمودار۳. تیمار اسیدی بر روی سویه های مقاوم به تیمار دمایی ۲ (۱۸۰ دقیقه در دمای ۸۰°C) و باکتریهای حساس تیمار نشده.: سویه های مقاوم به تیمار دمایی ۲ (۱۸۰ دقیقه در دمای ۸۰°C). S: باکتریهای بیفیدوباکتریوم حساس تیمار نشده. R: Log (CFU/ml) لگاریتم واحدهای تشکیل دهنده کلنی درهرمیلی لیتر.



نمودار ۴. تیمار نمک های صفراوی با غلظت های متفاوت روی سویه های مقاوم به تیمارهای دما و اسید و باکتریهای حساس تیمار نشده. سویه های مقاوم به تیمارهای دما واسید. S : باکتریهای بیفیدوباکتریوم حساس تیمار نشده. Log (CFU/ml) : لگاریتم واحدهای تشکیل دهنده کلنی در هر میلی لیتر.

تقریبا در همه موارد بین تعداد باکتری زنده پودرهای تیمار شده و تیمار نشده با افزایش دمای هوای خروجی از ۶۵ تا ۹۰ درجه سانتی گراد به صورت معنی داری (P <0.05) اختلاف وجود دارد. به طورکلی بیفیدوباکتریوم انیمالیس و بیفیدوباکتریوم آدلوسنتیس در شرایط افزایش دمای هوای خروجی، به ترتیب بیشترین و کمترین مقاومت را از خود نشان دادند. باکتری بیفیدوباکتریوم انیمالیس تیمارشده با ۲/۴۱ واحد لگاریتمی کاهش کلی، در دمای هوای خروجی ۹۰ درجه سانتی گراد نسبت به تعداد باکتری زنده قبل از اسپری درائینگ، بهترین باکتری این تحقیق شناخته شد. از سوی دیگر باکتری بیفیدوباکتریوم آدلوسنتیس تیمار نشده با ۶/۷۲ واحد لگاریتمی کاهش کلی، در دمای هوای خروجی ۹۰ درجه سانتی گراد نسبت به تعداد باکتری زنده قبل از اسپری درائینگ، حساس ترین باکتری محسوب شد. اما پودر تیمار شده باکتری بیفیدوباکتریوم آدلوسنتیس در همین شرایط به طور کلی ۴/۵۳ واحد لگاریتمی کاهش را نشان داد که در حدود ۲ واحد لگاریتمی بهبود یافته است. با توجه به نتایج موجود در جدول ۱ پیشنهاد می شود که با تنظیم دمای هوای ورودی بین ۱۰۵ تا ۱۱۵ درجه سانتی گراد به دمای هوای خروجی بین ۶۵ تا ۷۵ درجه سانتی گراد رسیده شود که با توجه به نتایج بیفیدوباکتریوم ها در این محدوده دمای هوای خروجی، کمترین آسیب و کاهش بقاء را نشان می دهند. بنابراین احتمالا با تنظیم دمای هوای ورودی بین ۱۰۵ تا ۱۱۵ درجه سانتی گراد، پودر پرو بیوتیکی بیفیدوباکتریوم خشک با میزان بقاء بهینه تر بدست می آید.



نمودار ۵. بررسی خاصیت ضد میکروبی سویه های مقاوم به همه تیمارهای موجود در پودر و باکتری های تیمار نشده اولیه

Archive of SID

www.SID.ir

با استفاده از روش لکه گذاری (Spot test). S.D: باکتری موجود در پودر خشک شده به وسیله اسپری درائینگ. R: سویه های مقاوم به همه تیمارهای موجود در پودر. Initial: باکتری های بیفیدوباکتریوم تیمار نشده اولیه.

در این تحقیق به منظور بررسی خاصیت ضد میکروبی سویه های مقاوم به همه تیمارهای موجود در پودر و باکتریهای تیمار نشده اولیه، از روش لکه گذاری استفاده شد. با توجه به نتایج به دست آمده در نمودار۵، تفاوت معنی داری ($P>0.05$) میان قطر هاله عدم رشد ایجاد شده به وسیله سویه های مقاوم به همه تیمارهای موجود در پودر و باکتریهای تیمار نشده اولیه مشاهده نشد و در بعضی موارد افزایش قطر هاله عدم رشد سویه های مقاوم به همه تیمارهای موجود در پودر نسبت به باکتریهای تیمار نشده اولیه مشاهده گردید. بر طبق نتایج باکتری بیفیدوباکتریوم آنگولاتوم بیشترین قطر هاله عدم رشد را بر روی باکتری های پاتوژن اشرشیا کلی و سودوموناس آئروجینوزا داشته است، اما باکتری بیفیدوباکتریوم آدلوسنتیس بیشترین قطر هاله عدم رشد را بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس داشته است.

در این تحقیق برای بهینه سازی شرایط استرس محیطی در تولید پودر پروبیوتیکی بیفیدوباکتریوم از راهکار تیمارهای مختلف بر پایه مکانیسمهای سازگاری با استرس و حفاظت متقاطع به منظور افزایش مقاومت باکتری های بیفیدوباکتریوم در شرایط دما و فشار بالای موجود در طی خشک کردن به روش اسپری درائینگ استفاده شد و تاثیر افزایش دمای هوای خروجی بر روی بقاء پودرهای باکتریایی تیمار شده و نشده بعد از اسپری درائینگ مورد بررسی قرار گرفت. امروزه استفاده از پودر پروبیوتیکی بیفیدوباکتریوم در محصولات دارویی و مکمل های غذایی برای مصرف انسانها به شدت رو به افزایش است (۲۰).

با توجه به حساسیت باکتری های جنس بیفیدوباکتریوم به مراحل موجود در دستگاه اسپری درائینگ و تاثیر دمای هوای خروجی بر روی تعداد باکتری زنده، نیاز به مقاوم سازیباکتری ها با استفاده از تیمارهای دمایی مشابه و تیمار اسید و نمک های صفراوی غیر مشابه با استرس های موجود در دستگاه خشک کن، به وضوح احساس می شود (۲۱ و۲۲). همچنین دست یابی به بهترین شرایط تنظیم دستگاه اسپری درائینگ به منظور کمترین تاثیر بر روی بقاء پودر بیفیدوباکتریوم حائز اهمیت است (۲۳ و۲۴). امید است که با استفاده از ایزوله های پروبیوتیک مقاوم در مکمل های غذایی و فرآورده های دارویی و شرایط بهینه خشک کردن باکتری های پروبیوتیک سلامت جامعه بیش از پیش تامین گردد.

جدول۱: تاثیر دمای هوای خروجی دستگاه اسپری درایر بر روی بقاء باکتری ها بعد از اسپری درائینگ. باکتری های تیمار شده (ایزوله های مقاوم به تیمارهای دمایی و اسیدی) قبلا تحت تاثیر تیمارهای دمایی و اسیدی، قرار گرفته اند. تعداد باکتری بر حسب ($\log cfu\ ml^{-1}$); (mean ± S.D.* محاسبه شده است.

	قبل از اسپری درائینگ	بعد از خشک کردن بوسیله دستگاه اسپری درایر					
		دمای هوای خروجی ۶۵ °C	دمای هوای خروجی ۷۰ °C	دمای هوای خروجی ۷۵ °C	دمای هوای خروجی ۸۰ °C	دمای هوای خروجی ۸۵ °C	دمای هوای خروجی ۹۰ °C
بیفیدوباکتریوم انگولاتوم	0.04 ± 8.95 (8.74 ±0.06)#	± 0.158 (8.32±0.21)	7.17 ±0.13¤ (7.83±0.16)	5.90 ± 0.12¤ (7.14±0.06)	4.66 ±0.04¤ (6.53±0.06)	3.36 ±0.13¤ (5.83±0.16)	2.43 ± 0.12¤ (4.94±0.06)
بیفیدوباکتریوم انیمالیس	9.07 ± 0.13 (9.27 ± 0.11)	8.73 ±0.19¤ (9.11±0.30)	8.23 0.06¤ (8.85±0.10)	7.69 ±0.25¤ (8.5 ±0.15)	6.86 ±0.13¤ (7.97±0.11)	5.96 ±0.06¤ (7.55±0.10)	5.25 ±0.25¤ (6.86±0.15)
بیفیدوباکتریوم بیفیدوم	8.87 ± 0.11 (8.97 ± 0.22)	8.41 ± 0.25 (8.69±0.11)	7.85 ±0.10¤ (8.38±0.41)	7.14 ±0.19¤ (7.80±0.11)	6.38 ±0.11¤ (7.17±0.22)	5.39 ±0.10¤ (6.55±0.41)	4.80 ±0.19¤ (5.86±0.11)
بیفیدوباکتریوم آدلوسنتیس	8.89 ± 0.05 (9.39 ± 0.08)	8.07 ±0.05¤ (8.91±0.21)	6.99 ±0.11¤ (8.17±0.11)	5.89 ±0.10¤ (7.23±0.08)	4.79 ±0.05¤ (6.36±0.08)	3.69 ±0.11¤ (5.7 ±0.11)	2.17 ±0.10¤ (4.86±0.08)

Archive of SID

www.SID.ir

سپاسگزاری

نویسندگان از زحمات بی دریغ مسئولان آزمایشگاه تحقیقات پرو بیوتیک و آزمایشگاه داروسازی صنعتی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران صمیمانه تشکر و قدردانی می کنند.

منابع

1- Desmond C; Ross R. P; O'Callaghan E; Fitzgerald G; Stanton C, (2002). Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. J.Appl.Microbiol. **93:**1003–1011.

2- Sanz Y, (2007). Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of Bifidobacterium: A way of selecting improved probiotic strains. Intern. Dairy J. **17:**1284– 1289.

3- Gardiner G. E; O'sullivan E; Kelly J; Auty M. A. E; Fitzgerald G. F; Collins J. K; Ross R. P; Stanton C, (2000). Comparative Survival Rates of Human-Derived Probiotic Lactobacillus paracasei and L. salivarius Strains during Heat Treatment and Spray Drying. Appl. Environ.Microbiol. **66** (6): 2605–2612.

4- Chung H. C; Kim Y. B; Chun S. L; Ji G. E, (1999). Screening and selection of acid and bile resistant bifidobacteria. International Journal of Food Microbiology. **47:**25–32.

5- Sa´nchez B; Christine M; Verge`s C; Collado M. D. C; Anglade P; Baraige F; Sanz Y; Reyes-Gavila´n C. G. D. L; Margolles A; Zagorec M, (2007). Low-pH Adaptation and the Acid Tolerance Response of Bifidobacterium longum Biotype longum. Appl. Environ. Microbiol. **73** (20): 6450–6459.

6- Desmond C; Stanton C; Fitzgerald G. F; Collins K; Ross R. P, (2002). Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. Inter. Dairy J. **12:** 183–190.

7- Simpson P. J; Stanton C; Fitzgerald G. F; Ross R. P, (2005). Intrinsic tolerance of oxygen and survival following spray drying and storage. Journal of Applied species to heat and Microbiology. **99**: 493–501.

8- Collado M. C; Sanz Y, (2007). Induction of acid resistance in Bifidobacterium: a mechanism for improving desirable traits of potentially probiotic strains. J. Appl. Microbiol. **10**: 165-172.

9- Collado M. C; Gueimonde M; Sanz Y; Salminen S, (2006). Adhesion properties and competitive pathogen exclusion ability of bifidobacteria with acquired acid resistance. J. food Protec. **69**: 1675–1679.

10- Corcoran B. M; Ross R. P; Fitzgerald G. F; Stanton C, (2004). Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. J. Appl. Microbiol. **96**: 1024–1039.

11- Maus J. E; Ingham S. C, (2003). Employment of stressful conditions during culture production to enhance subsequent cold- and acid-tolerance of bifidobacteria. J. Appl. Microbiol. **95:** 146–154.

12- Ma¨ tto¨ J; Alakomi H. L; Vaari A; Virkaja¨ rvi I; Saarela M, (2006). Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp, lactis functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it. Intern. Dairy J. **16**: 1029–1037.

13- Teixeira P; Castro H; Kirby R, (1994). Inducible thermo tolerance in *Lactobacillus bulgaricus*. Lett. Appl. Microbiol. **18:** 218–221.

14- Erkkila S; Suihko M. L; Eerola S; Petaja E; Mattila-Sandholm T, (2001). Dry sausage fermented by Lactobacillus rhamnosus strains. Intern. J. Food Microbiol. **64**: 205–210.

15- Saarela M; Rantala M; Hallamaa K; Nohynek L; Virkajarvi I; Matto J, (2004). Stationary-phase acid and heat treatments for improvement of the viability of probiotic lactobacilli and bifidobacteria. J. Appl. Microbiol. **96**: 1205–1214.

16- Gouesbet G; Jan G; Boyaval P, (2001). *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus thermotolerance*. Lait. **81:** 301–309.

17- Desmond C; Stanton C; Fitzgerald G. F; Collins K; Ross R. P, (2001). Environmental adaptation of probiotic

Archive of SID

www.SID.ir

lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. Intern. Dairy J. **11:** 801–808.

18- Park Y. K; So J. S; Heo T. R, (1995). Acid adaptation promotes survival of Bifidobacterium breve against environmental stresses. Foods and Biotechnology. **4**: 226–230.

19- Jayamanne V. S; Adams M. R, (2006). Determination of survival, identity and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bioyoghurts. Lett. Appl. Microbiol., 42: **189–194**.

20- Lankaputhra W. E; Shah N. P, (1996).Bifidobacteria refrigerated storage in the presence acid and hydrogen peroxide. Milchwissenschaft. **51:** 65–69.

21- Gross C. A; Neidhardt F. C; Curtiss R; Ingraham J. L; Lin E. C. C; Low K. B; Magasanik B; Reznikoff W. S; Riley M; Schaechter M, (2000). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. In: Cellular and Molecular Biology. Umbarger H. E (eds). American Society for Microbiology. Washington. USA. **1382–1399**.

22- Van de Guchte M; Serror P; Chervaus C; Smokvina T; Ehrlich S. T; Maguin E, (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek. **82:** 187–216.

23- Mary P; Moschetto N; Tailliez R, (1993). Production and survival during storage of spray-dried *Bradyrhizobium japonicum* cell concentrates. J. Appl. Bacteriol. **74:** 340–344.

24- Roy D; Dussault F; Ward P, (1990). Growth requirements of bifidobacterium strains in milk. Milchwissenschaft. **45:** 500-502.

Archive of SID

www.SID.ir