Archive of SID

فصلنامه

دانش میکروب شناسی

سال اول، شماره ۳، تابستان ۱۳۸۸

بررسی تاثیر تیمارهای مختلف و پری بیوتیک مالتودکسترین روی بقاء پودر پروبیوتیکی بیفیدوباکتر

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

۱ - دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال ۲ - دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی

چکیده

روش اسپری درائینگ با سرعت تولید بالا و هزینه اجرای پایین، یکی از معروفترین روشها در صنایع غذایی است. علاوه بر این، اسپری درائینگ برای حفاظت و تغلیظ میکرو ارگانیسم ها مورد استفاده قرار می گیرد اما پودرهای تولید شده در این روش، کاهش قابل توجهی در تعداد باکتری زنده را نشان داده اند. بنابراین .هدف از این تحقیق، بررسی تاثیر تیمار های مختلف و پری بیوتیک مالتودکسترین بر روی بقاء پودر پروبیوتیکی بیفیدوباکتر در طول اسپری درائینگ و نگهداری است. کاهش تعداد باکتری زنده پودرهای تیمار شده و تیمار نشده در طول اسپری درائینگ به ترتیب، از ۰,۴ تا ۲,۴۴ و از ۱,۵۴ تا ۴,۲۸ واحد لگاریتمی است. به طور کلی پودرهای تیمار شده نسبت به تیمار نشده، میزان ماندگاری بهتری را در شرایط اسپری درائینگ، از خود نشان می دهند. همچنین، کاهش تعداد سلول زنده پودرهای دارای پری بیوتیک مالتودکسترین و بدون مالتودکسترین در طول اسپری درائینگ به ترتیب، از ۰,۵۵ تا ۲,۴۳ و از ۲,۱ تا ۳,۹۸ واحد لگاریتمی است. همچنین پودرهای بدون مالتودکسترین، کاهش شدیدی در تعداد باکتری زنده از ۳,۹۸ تا ۶,۳۸ واحد لگاریتمی بعد از ۶ ماه نگهداری نسبت به تعداد اولیه باکتری زنده قبل از اسپری درائینگ، از خود نشان می دهند اما میزان کاهش در پودرهای با مالتودکسترین، از ۱,۱۶ تا ۳,۵۹ واحد لگاریتمی است. بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و بیفیدوباکتریوم آدلوسنتیس دارای مالتودکسترین، به ترتیب مقاومترین و حساسترین باکتری ها در حین اسپری درائینگ و نگهداری بوده اند. به طور کلی پودرهای با مالتودکسترین نسبت به پودرهای بدون مالتودکسترین ، میزان ماندگاری بهتری را در شرایط اسپری درائینگ، از خود نشان می دهند. بنابراین تیمار های مختلف و پری بیوتیک مالتودکسترین باعث بهینه سازی بقاء در پودرهای تیمار شده بیفیدوباکتریوم در طول اسپری درائینگ و نگهداری، شده است.

واژگان کلیدی: پروبیوتیک، پودر بیفیدوباکتر، مالتودکسترین، پری بیوتیک، بقاء.

مقدمه

استفاده از باکتری های پروبیوتیک در فرآورده های دارویی و غذایی در سالهای اخیر به شدت گسترش یافته است. پروبیوتیک ها در حقیقت مکمل های غذایی حاوی میکروارگانیسم های زنده هستند که با استفاده از ایجاد تعادل در فلور میکروبی دستگاه گوارش، روی سلامتی میزبان خود تاثیر می گذارند (۱، ۲). درحقیقت این باکتری ها راه حل مناسبی برای بهبود و حفظ سلامتی دستگاه گوارش، پیشگیری از بروز بیماری ها، افزایش قدرت سیستم ایمنی و از بین بردن عوامل پاتوژن، هستند (۳، ۴). از باکتری‌های اسید لاکتیک بویژه لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم ها می توان به عنوان مهترین

www.SID.ir

Archive of SID

پروبیوتیک های مورد استفاده در محصولات غذایی و دارویی، نام برد. بیفیدوباکتریوم ها، باکتری های گرم مثبت و بی هوازی هستند که از مهمترین اعضاء فلور طبیعی روده حیوانات خون گرم و انسان محسوب می شوند (۵). به دلیل مزایای فوق، امروزه تهیه فرآورده های دارویی و غذایی پروبیوتیکی با استفاده از جنس بیفیدوباکتریوم، به شدت مورد توجه قرار گرفته است. از سوی دیگر پیشنهاد شده است که فرآورده های پروبیوتیک باید فعالیت متابولیکی و بقاء خود را در زمان مصرف حداقل در حدود $۱۰^{۷}$ میکروارگانیسم زنده و فعال در هر گرم پودر و یا هر میلی لیتر مایع حفظ نماید، تا بتوانند توانایی خود را به عنوان پروبیوتیک نشان دهند (۵، ۶). برای رسیدن به این هدف، باید باکتری ها توانایی تحمل شرایط محیطی در طول مراحل صنعتی ساخت فرآورده های دارویی و غذایی پروبیوتیکی و مرحله نگهداری، را داشته باشند (۷). یکی از روشهایی که امروزه برای نگهداری محیط های کشت پروبیوتیکی مورد استفاده قرار می گیرد، خشک کردن به روش اسپری دراییینگ است. روش اسپری درائینگ برای تولید پودرهایی با تعداد بالای باکتری زنده، استفاده می شود. این روش به علت سرعت بالای تولید به نسبت هزینه پایین اجرا و تولید پودرهای خشک، پایدار و با انتقالی ساده، پیشنهاد می شود، اما پودرهای تولید شده در این روش، کاهش قابل توجهی در تعداد باکتری زنده را نشان داده اند (۸). این کاهش به علت دما و فشار بالا موجود در مراحل اسپری درائینگ به منظور خشک کردن است که باعث ایجاد آسیبهای جدی در فسفولیپیدهای دیواره سلولی باکتری می شود. این امر سبب از بین رفتن باکتری بلافاصله بعد از خشک کردن و یا در مرحله نگهداری می گردد. با توجه به مشکل مطرح شده، دو راهکار عمده برای بالا بردن مقاومت باکتری ها در طول فرآیند اسپری درائینگ وجود دارد که شامل استفاده از تیمارهای مختلف بر پایه سازگاری با استرس و مکانیسم های حفاظت متقاطع و پری بیوتیک ها، است. استفاده از پری بیوتیک‌ها یا ماتریکس های ساکاریدی از اقداماتی است که در سالهای اخیر در مقیاس وسیع مورد توجه محققان صنعت تولید فرآورده های پروبیوتیکی قرار گرفته است، مانند استفاده از ماتریکس های ساکاریدی (مونو، دی و پلی ساکاریدی) مانند پلی دکستروز، مالتودکسترین، ترهالوز و... که علاوه بر ایجاد فضای ماتریکسی مناسب برای اتصال باکتری ها و مصون ماندن حین اسپری درایینگ، نقش بسزائی در تهیه فرآورده های پروبیوتیکی ایفا می‌کنند (۹). در این تحقیق با قرار دادن باکتری ها در شرایط تیمارهای دما، پراکسید هیدروژن و نمک طعام، ایزوله های مقاوم به همه تیمارها جدا شده و پس از چندین بار کشت، آنها به محیط کشت حامل تلقیح و توسط دستگاه اسپری درائینگ خشک شدند. همچنین به منظور بررسی تاثیر پری بیوتیک مالتودکسترین روی بقاء باکتری ها، محیط های کشت حامل به دو صورت با پری بیوتیک مالتودکسترین و بدون پری بیوتیک مالتودکسترین، نیز تهیه و به صورت بالا با دستگاه اسپری درائینگ خشک شدند. سپس پودرهای حاصل در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند و تعداد باکتری زنده موجود در پودرهای باکتریایی هر دو گروه تیمار شده و تیمار نشده و همچنین هر دو گروه دارای مالتودکسترین و بدون مالتودکسترین، پس از اسپری درائینگ و در مدت ۶ ماه نگهداری، مورد بررسی قرار گرفت. سپس خاصیت ضد میکروبی ایزوله های مقاوم به همه تیمارهای موجود در پودر و باکتری های تیمار نشده اولیه به وسیله روش چاهک تست بررسی و با هم مقایسه شد. .هدف از این تحقیق، بررسی تاثیر تیمارهای مختلف و پری بیوتیک مالتودکسترین روی بقاء باکتری ها بعد از خشک کردن بوسیله دستگاه اسپری درائینگ و در مرحله نگهداری و همچنین بررسی خاصیت ضد میکروبی پودر حاصل بود.

مواد و روشها

میکروارگانیسمهای مورد استفاده

گونه های باکتریایی مورد استفاده در این تحقیق یعنی 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. سپس این باکتریها در محیط کشت اختصاصی کشت داده شدند (۱۰).

www.SID.ir

Archive of SID

تیمار دما

کشت ۲۴ ساعته از هر یک از باکتری ها، تحت تاثیر تیمار دمایی قرار داده شدند (۱۰). بعد از این مرحله، ایزوله های مقاوم به تیمار دما (۱۵۰ دقیقه در دمای ۸۰ ^{o}C) جدا و روی محیط کشت جامد با pH نرمال برای ۳ تا ۴ روز در شرایط بی هوازی گرمخانه گذاری شدند.

تیمار پر اکسید هیدروژن

کشت ۲۴ ساعته، ایزوله های مقاوم به تیمار دما و باکتریهای حساس تیمار نشده، به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۶۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی دور ریخته و رسوب باقیمانده، دو بار با بافر فسفات سالین (PBS) برای جداشدن باقی مانده محیط کشت، شستشو شد. سرانجام سوسپانسیون باکتری ها با نسبت ۱٪(v/v) به محیط کشت مایع MRS غنی شده با ٪ ۰،۰۵ ال سیستئین که دارای ۰،۰۰۳ مولار پر اکسید هیدروژن است، تلقیح شدند. سرانجام محیط های کشت به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. بعد از این مرحله ایزوله های مقاوم به تیمارهای دما و پر اکسید هیدروژن جدا و روی محیط کشت جامد برای مدت ۳ تا ۴ روز در شرایط بی هوازی گرمخانه گذاری شدند (۱۱).

تیمار نمک طعام

کشت ۲۴ ساعته ایزوله های مقاوم به تیمارهای دما و پر اکسید هیدروژن و باکتریهای حساس تیمار نشده، به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۶۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی دور ریخته و رسوب باقیمانده، دو بار با بافر فسفات سالین (PBS) برای جداشدن باقی مانده محیط کشت، شستشو شد. سرانجام سوسپانسیون باکتری ها با نسبت ۱٪ (v/v) به محیط کشت مایع MRS غنی شده با ٪ ۰،۰۵ ال سیستئین بعلاوه نمک طعام با درصدهای وزنی حجمی ۰، ۴، ۶، ۸ و ۱۰، تلقیح گردید و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی هوازی در دمای ۳۷ ^{o}C گرمخانه گذاری شد. سپس تعداد باکتری زنده مانده بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری، با استفاده از روش رقت سازی تعیین گردید. بعد از این مرحله ایزوله های مقاوم به تیمارهای دما و پر اکسید هیدروژن و نمک طعام (ایزوله های مقاوم به همه تیمارها) جدا و روی محیط کشت جامد برای مدت ۳ تا ۴ روز در شرایط بی هوازی گرمخانه گذاری شدند (۱).

بررسی تاثیر تیمارهای مختلف و پری بیوتیک مالتودکسترین روی بقاء باکتری ها بعد از خشک کردن بوسیله دستگاه اسپری درائینگ و در مرحله نگهداری

ایزوله های مقاوم به همه تیمارها تهیه شده در مرحله قبل و باکتریهای تیمار نشده، مجددا در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در شرایط بی هوازی به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. کشت ۲۴ ساعته باکتری ها به محیط کشت حامل برای خشک کردن تلقیح شدند (۱۰). سپس محیط های کشت حامل بوسیله دستگاه اسپری درایر آزمایشگاهی (Buchi mini spray dryer B-119; Switzerland) با دمای هوای ورودی ثابت ۱۱۰ ^{o}C و دمای هوای خروجی ۷۰ ^{o}C تا ۶۰ و با جریان ورودی مایع (۵ l/min) خشک گردیدند. به منظور بررسی تاثیر پری بیوتیک مالتودکسترین روی بقاء باکتری ها، در این مرحله به نیمی از محیط های کشت حامل پری بیوتیک مالتودکسترین (۲۰٪ w/v) اضافه گردید تا نتایج این گروه با گروه بدون پری بیوتیک مالتودکسترین مقایسه شود و سپس محیط های کشت به صورت شرح داده شده در بالا، خشک شدند. سرانجام تعداد باکتری زنده موجود در پودرهای باکتریایی هر دو گروه تیمار شده و نشده و همچنین هر دو گروه دارای مالتودکسترین و بدون مالتودکسترین، با روش شمارش بر روی پلیت یا پورپلیت قبل و بعد از اسپری درائینگ محاسبه گردید. سپس پودرهای حاصل در دمای ۴ درجه سانتی گراد درون ظرف شیشه ای درون دسیکاتور برای حفاظت از رطوبت، به مدت ۶ ماه نگهداری شد. در فواصل زمانی ۱ و ۳ و ۶ ماه، از پودرها نمونه برداری انجام گرفت و تعداد باکتری زنده موجود در پودرهای باکتریایی هر دو گروه تیمار شده و تیمار نشده و همچنین هر دو گروه دارای مالتودکسترین و بدون مالتودکسترین، محاسبه و مورد مقایسه قرار گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی خاصیت ضد میکروبی علیه باکتری های پاتوژن به روش چاهک تست (Well test)

جهت بررسی خاصیت ضد میکروبی باکتری های بیفیدوباکتریوم از روش چاهک تست استفاده شد. ابتدا سوسپانسیون سلولی با 10^{8}-10^{9} سلول در هر میلی لیتر، از باکتری های پاتوژن مورد نظر (اشرشیا کلی (۱۳۳۰ *Escherishia coli* PTCC)، سودوموناس آئروجینوزا (*Pseudomonas aueroginosa* PTCC ۱۰۷۴) و استافیلوکوکوس اورئوس (۱۳۳۷ PTCC *Staphylococcus aureus*))، تهیه شد. سپس هر یک از باکتری های پاتوژن بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (M.H.A) با سوآپ کشت سطحی داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط هوازی و دمای ^{o}C ۳۷، گرمخانه گذاری گردید. سپس یک چاهک در مرکز پلیت های حاوی باکتری های پاتوژن رشد یافته، ایجاد شد. از سوی دیگر کشت ۴۸ ساعته از ایزوله های مقاوم به همه تیمارهای موجود در پودر و باکتری های تیمار نشده اولیه، به مدت ۱۵ دقیقه در rpm ۶۰۰۰ سانتریفیوژ شد و ۱۰۰ ماکرولیتر محلول رویی هریک از باکتری ها، درون چاهک های محیط کشت مولر هینتون آگار با پاتوژن های مختلف، به کمک سمپلر ریخته شد و مدت ۲۴ ساعت در شرایط هوازی و دمای ^{o}C ۳۷، گرمخانه گذاری گردید. سپس نتایج به صورت قطر هاله عدم رشد، 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 و همچنین هر دو گروه دارای مالتودکسترین و بدون مالتودکسترین بعد از اسپری درائینگ و در مرحله نگهداری، بوسیله تکنیک t- test جفت شده (p-value < 0.05) انجام گرفت. لازم به ذکر است که تمامی آزمایشات برای دقت در محاسبات آماری ۳ بار تکرار شده است.

نتایج و بحث

با توجه به حساسیت ذاتی بیفیدوباکتریوم ها در شرایط استرس محیطی به ویژه استرس دما و فشار موجود در اسپری درائینگ و با توجه به لزوم حفظ تعداد و فعالیت متابولیسمی باکتری های زنده در طول مراحل تولید تا مصرف توسط میزبان و جایگزینی در دیواره روده، بر آن شدیم تا با استفاده از تیمارهای مختلف بر پایه مکانیسم های بر پایه سازگاری با استرس و حفاظت متقاطع، توانایی تحمل و مقاومت باکتری های پروبیوتیک را در برابر شرایط استرس موجود در سر راهشان، افزایش دهیم. برای رسیدن به هدف بهبود بقاء باکتری های پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم نسبت به شرایط استرس، از تیمارهای دما، پر اکسید هیدروژن، نمک طعام به ترتیب بر روی ایزوله های مقاوم جدا شده از تیمار قبلی، استفاده شد. از سوی دیگر، تحقیقات اندکی در زمینه روش های سازگاری با استرس و حفاظت متقاطع بر روی باکتری های پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم، در سراسر دنیا انجام گرفته است (۱). تاکنون، شیوه اجرای روش های سازگاری با استرس و حفاظت متقاطع، بر پایه تاثیر کوتاه مدت سلول های بیفیدوباکتریوم تحت عوامل گوناگون استرس زا کمتر از حد کشنده مانند گرسنگی، حرارت، نمکهای صفراوی، نمک طعام و pH پایین بود که باعث القاء تحمل نسبت به شرایط استرس زای کشنده بعدی، می شد (۱). در تحقیقات زیادی این موضوع اثبات شده که وقتی باکتری ها در معرض سطح پایینی از استرس قرار بگیرند، مقاومت آنها در برابر تاثیرات بعدی سطوح بالاتر استرس های مشابه و همچنین تعدادی از استرس های متفاوت، توسعه پیدا می کند (۱۲-۱۳).

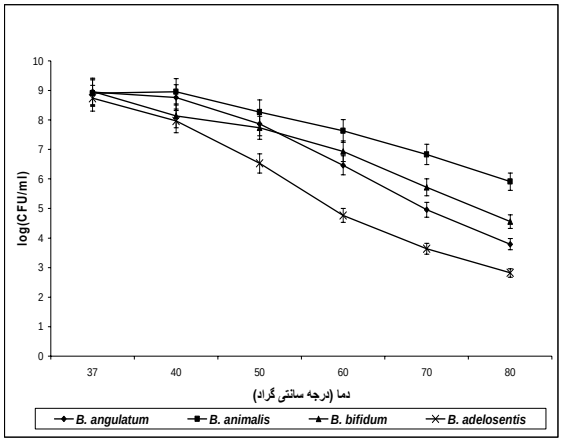
یکی از مهمترین فاکتورهای موثر بر روی بقاء باکتری های پروبیوتیک در طول فرآیند خشک کردن بوسیله اسپری درائینگ، توانایی باکتری ها در مقابل افزایش دما است (۱۰). به منظور بهبود تحمل دمایی و سازگاری بیفیدوباکتریوم ها، باکتریها تحت تاثیر استرس دمایی غیر کشنده (تیمار دما)، قبل از فرآیند خشک کردن بوسیله اسپری درائینگ (استرس کشنده بعدی) قرار گرفتند. 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 نمودار ۱، بیفیدوباکتریوم انیمالیس نسبت به بقیه باکتری ها، مقاوم تر بوده و در طی افزایش دما از ۴۰ به ۸۰ درجه سانتی گراد، کاهشی برابر با ۳

www.SID.ir

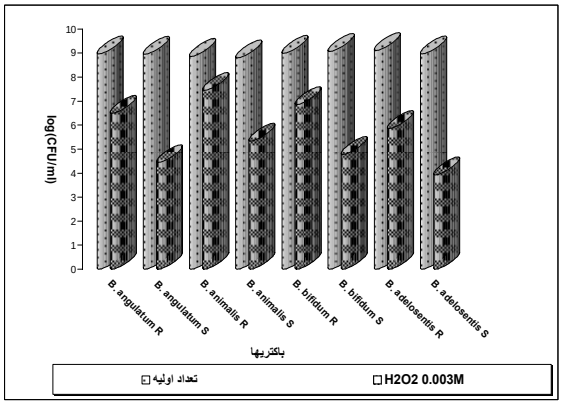
Archive of SID

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. همچنین تکسیریا و همکارانش در سال ۱۹۹۴ (۱۴)، گزارش دادند که سازگاری با دما به وسیله تیمارهای دمایی باعث افزایش بقاء و زنده ماندن باکتری لاکتوباسیلوس بولگاریکوس در طول استرس دمایی، می شودکه با نتایج ما در این تحقیق مشابهت دارد.

همچنین به منظور بهبود مقاومت باکتری ها به شرایط استرس، ایزوله های مقاوم به تیمار دما (۱۵۰ دقیقه در دمای ^{o}C ۸۰) و باکتری های حساس تیمار نشده ، در محیط کشت مایع MRS غنی شده با ٪ ۰,۰۵ ال سیستئین بعلاوه پر اکسید هیدروژن ۰,۰۰۳ مولار به مدت ۲ ساعت در شرایط بی هوازی در دمای ^{o}C ۳۷ گرمخانه گذاری شدند و میزان بقاء آنها بعد از ۲ ساعت گرمخانه گذاری، بررسی و با هم مقایسه گردید (نمودار ۲) . با توجه به نتایج به دست آمده در نمودار ۲، در همه موارد ایزوله های مقاوم به تیمار دما نسبت به باکتری های تیمار نشده، به صورت معنی داری ($P<0.05$) افزایش بقاء از خود نشان دادند، به طوریکه تمامی ایزوله های مقاوم به تیمار دما نسبت به باکتری های تیمار نشده، از ۱,۹۳ تا ۲,۲ واحد لگاریتمی، بهبود یافتند. نکته جالب توجه این است که بیفیدوباکتریوم انیمالیس مقاوم نسبت به باکتری حساس مشتق شده از آن با ۲,۲ واحد لگاریتمی بهبود، بیشترین بهبود را در بین باکتری ها از خود نشان داده است. همچنین، بیفیدوباکتریوم انیمالیس مقاوم با کاهش ۱,۳۲ واحد لگاریتمی و بیفیدوباکتریوم آدلوسنتیس حساس با کاهش ۵,۰۴ واحد لگاریتمی، به ترتیب مقاوم ترین و حساس ترین باکتری این آزمایش بوده اند. اما دزموند و همکارانش در سال ۲۰۰۲ (۴) 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 است، اما سازگاری با نمک طعام به صورت معنی داری تحمل دمایی این باکتری را افزایش داد. اما نتایج به دست آمده ما در این تحقیق در مورد تیمار پر اکسید هیدروژن 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 همکارانش در سال ۲۰۰۲ (۴) در مورد باکتری لاکتوباسیلوس پارا کازئی NFBC۳۳۸، مطابقت ندارد که احتمالا به علت تفاوتهای ساختاری و فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی بین جنسهای لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم، است.



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



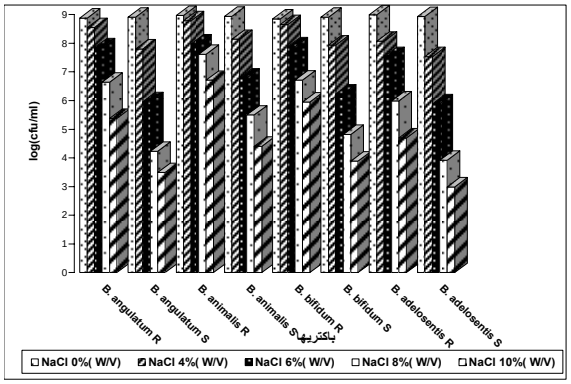
نمودار ۲. تیمار پر اکسید هیدروژن بر روی ایزوله های مقاوم به تیمار دمایی ۲ (۱۸۰ دقیقه در دمای ^{o}C ۸۰) و باکتریهای تیمار نشده. R: نشان دهنده ایزوله های مقاوم به تیمار دمایی ۲ (۱۸۰ دقیقه در دمای ^{o}C ۸۰) ، است. S : نشان دهنده باکتریهای بیفیدوباکتریوم تیمار نشده، است. Log : (CFU/ml)نشان دهنده لگاریتم واحدهای تشکیل دهنده کلنی در هر میلی لیتر، است.

www.SID.ir

Archive of SID

با توجه به مکانیسم های حفاظت متقاطع که بیان می کند ایجاد مقاومت در برابر یک استرس، باعث ایجاد مقاومت در برابر استرس های دیگر می شود، ایزوله های مقاوم به تیمارهای دما و پر اکسید هیدروژن و باکتری‌های حساس تیمار نشده، در غلظت های بالای نمک طعام به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی هوازی در دمای ۳۷ ^{o}C گرمخانه گذاری شدند. سپس توانایی رشد و میزان بقاء آنها بعد از رشد در غلظت های متفاوت نمک طعام بررسی و با هم مقایسه گردید (نمودار ۳). با توجه به نتایج به دست آمده در نمودار ۳، در همه موارد ایزوله های مقاوم به تیمارهای دما و پر اکسید هیدروژن نسبت به باکتری های حساس تیمار نشده در غلظت های بالای نمک طعام، به صورت معنی داری ($P<0.05$) افزایش بقاء از خود نشان دادند، به طوریکه تمامی ایزوله های مقاوم به تیمارهای دما و پر اکسید هیدروژن نسبت به باکتری های حساس تیمار نشده، از ۱,۷۱ تا ۲,۳ واحد لگاریتمی، بهبود یافتند.

نکته جالب توجه این است که بیفیدوباکتریوم انیمالیس مقاوم به تیمارهای دما و پر اکسید هیدروژن نسبت به باکتری حساس مشتق شده از آن، با ۲,۳ واحد لگاریتمی، بیشترین بهبود را در بین باکتری ها از خود نشان داده است. همچنین، بیفیدوباکتریوم انیمالیس مقاوم به تیمارهای دما و پر اکسید هیدروژن با کاهش ۲,۲۶ واحد لگاریتمی و بیفیدوباکتریوم آدلوسنتیس حساس با کاهش ۵,۹۴ واحد لگاریتمی، به ترتیب مقاوم ترین و حساس ترین باکتری این آزمایش بوده اند. همچنین، کیم و همکارانش در سال ۲۰۰۱ (۱۵) بیان کردند که سلول های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس که در معرض تیمار نمک طعام قرار گرفتند، نسبت به باکتری های کنترل تیمار نشده به طور معنی داری مقاومت بیشتری را از خود نشان داده است. همچنین دزموند و همکارانش در سال ۲۰۰۱ (۱۶) اثبات کردند که باکتری لاکتوباسیلوس پارا کازئی NFBC ۳۳۸ که بوسیله قرار گرفتن در نمک طعام ۰,۳ مولار سازگاری یافته بود، به صورت معنی داری نسبت به باکتری های کنترل غیر سازگار در مقابل استرس دمایی (۶۰ درجه سانتی گراد برای ۳۰ دقیقه)، مقاومت بیشتری نشان دادند. بنابر این نتایج موجود در این تحقیق با نتایج به دست آمده توسط کیم و همکارانش در سال ۲۰۰۱ (۱۵) در مورد باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و دزموند و همکارانش در سال ۲۰۰۱ (۱۶) در مورد باکتری لاکتوباسیلوس پارا کازئی NFBC ۳۳۸، مشابهت دارد.



نمودار ۳. تیمار نمک طعام با غلظتهای متفاوت بر روی ایزوله های مقاوم به تیمارهای دما و پر اکسید هیدروژن و باکتری های تیمار نشده. R: نشان دهنده ایزوله های مقاوم به تیمارهای دما و پر اکسید هیدروژن، است.S : نشان دهنده باکتری های بیفیدوباکتریوم حساس تیمار نشده، است. Log (CFU/ml): نشان دهنده لگاریتم واحدهای تشکیل دهنده کلنی در هر میلی لیتر، است.

روش اسپری درائینگ روش اقتصادی برای تولید میکروارگانیسم های زنده در ابعاد صنعتی است (۱۷). از این روش برای نگهداری گسترده گونه های لاکتوباسیلوس (۱۱-۱۸-۱۹-۲۰) و گونه های بیفیدوباکتریوم (۲۱-۲۲) که اخیرا بسیار مورد توجه و علاقه قرار گرفته اند، استفاده شده است. با توجه به مزایای زیاد روش اسپری درائینگ، دما و فشار بالا برای خشک کردن باکتری ها در این روش باعث از بین رفتن باکتری بلافاصله بعد از اسپری درائینگ و یا در مرحله نگهداری، می شود (۲۳). بنابراین استفاده از روش اسپری درائینگ باکتری های پروبیوتیک تعدادی مساله نیز به همراه دارد که از آنها می توان به لزوم حفظ بقاء و زنده ماندن باکتری های پروبیوتیک، اشاره کرد (۱۶-۲۴). در این تحقیق برای بهینه سازی شرایط استرس محیطی در تولید پودر پروبیوتیکی بیفیدوباکتریوم به روش اسپری درائینگ، از راهکارهایی زیر استفاده شد:

- استفاده از تیمارهای مختلف بر پایه مکانیسم های سازگاری با استرس و حفاظت متقاطع به منظور افزایش مقاومت بیفیدوباکتریوم ها

www.SID.ir

Archive of SID

- استفاده از پری بیوتیک مالتودکسترین در محیط کشت حامل به منظور ایجاد فضای ماتریکسی مناسب برای اتصال باکتری ها و مصون ماندن آنها درحین فرآیند خشک کردن به روش اسپری درائینگ

بقاء و میزان کاهش تعداد باکتری زنده در هر دو گروه باکتری های تیمار شده و نشده، بعد از اسپری درائینگ و در فواصل زمانی نگهداری بررسی و با هم مقایسه گردید (جدول ۱). با توجه به داده های موجود در جدول ۱، تمامی بیفیدوباکتریوم های تیمار نشده بعد از اسپری درائینگ کاهش شدیدی را از خود نشان دادند. میزان کاهش تعداد باکتری زنده باکتری های تیمار نشده از ۱,۵۴ تا ۴,۲۸ واحد لگاریتمی و ایزوله های مقاوم به همه تیمارها از ۰,۴ تا ۲,۴۴ واحد لگاریتمی بعد از اسپری درائینگ بوده است. لازم به ذکر است که تمامی ایزوله های مقاوم به همه تیمارها نسبت به باکتری های تیمار نشده به صورت معنی دار ($P < 0.05$)، کاهش تعداد باکتری زنده کمتری را از خود نشان دادند. به طور کلی بیفیدوباکتریوم انیمالیس و بیفیدوباکتریوم آدلوسنتیس در طی مراحل اسپری درائینگ، به ترتیب بیشترین و کمترین مقاومت را از خود نشان داند. همچنین باکتری های تیمار نشده در طی ۶ ماه نگهداری، با کاهش شدیدی از ۱,۳۵ تا ۲,۵۳ واحد لگاریتمی مواجه شدند. اما این کاهش در ایزوله های مقاوم به همه تیمارها خیلی کمتر در حدود ۰,۴۶ تا ۱,۲۳ واحد لگاریتمی بود. شایان ذکر است که در تمامی نمونه گیریهای ۱ و ۳ و ۶ ماهه، اختلاف معنی داری در کاهش تعداد باکتری زنده ($P < 0.05$)، بین دو گروه تیمار شده و نشده مشاهده گردید.

نکته جالب توجه این است که باکتری بیفیدوباکتریوم انیمالیس مقاوم به همه تیمارها با ۰,۸۶ واحد لگاریتمی کاهش کلی نسبت به تعداد باکتری زنده قبل از اسپری درائینگ، بهترین باکتری این تحقیق شناخته شد. از سوی دیگر باکتری بیفیدوباکتریوم آدلوسنتیس تیمار نشده با ۶,۸۱ واحد لگاریتمی کاهش کلی تسبت به تعداد قبل از اسپری درائینگ، حساسترین باکتری محسوب شد. اما ایزوله مقاوم به همه تیمارهای همین باکتری به طور کلی ۳,۶۷ واحد لگاریتمی کاهش را نشان داد که در حدود ۳ واحد لگاریتمی بهبود یافته است. همچنین گاردینر و همکارانش در سال 2002 (۲۵) دریافتند که توانایی تحمل دما و پایداری در طول روش اسپری درائینگ در باکتری لاکتوباسیلوس پاراکازئی گونه NFBC338 با استفاده از سازگاری در مقابل استرس های دیگر، به طور قابل ملاحظه ای افزایش می یابد که با نتایج بدست آمده در این تحقیق در مورد ایزوله های مقاوم به همه تیمارها، مطابقت دارد.

بقاء و میزان کاهش تعداد باکتری زنده در هر دو گروه دارای مالتودکسترین و بدون مالتودکسترین، بعد از خشک کردن به وسیله اسپری درائینگ و در فواصل زمانی نگهداری بررسی و با هم مقایسه گردید (جدول ۲). با توجه به نتایج موجود در جدول ۲، تمامی پودرهای بیفیدوباکتریوم بدون مالتودکسترین بعد از اسپری درائینگ کاهش شدیدی را از خود نشان دادند. میزان کاهش تعداد باکتری زنده پودرهای بیفیدوباکتریوم بدون مالتودکسترین از ۲,۱ تا ۳,۹۸ واحد لگاریتمی و پودرهای بیفیدوباکتریوم دارای مالتودکسترین از ۰,۵۵ تا ۲,۴۳ واحد لگاریتمی بعد از اسپری درائینگ بود. لازم به ذکر است که تمامی پودرهای داری مالتودکسترین نسبت به پودرهای بدون مالتودکسترین به صورت معنی داری ($P < 0.05$)، کاهش تعداد باکتری زنده کمتری را از خود نشان دادند. به طور کلی پودرهای حاوی بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و بیفیدوباکتریوم آدلوسنتیس دارای مالتودکسترین در طی مراحل اسپری درائینگ، به ترتیب بیشترین و کمترین مقاومت را از خود نشان داند. همچنین پودرهای بدون مالتودکسترین در طی ۶ ماه نگهداری ، با کاهش شدیدی از ۱,۶۹ تا ۲,۴ واحد لگاریتمی مواجه شدند. اما این کاهش در پودرهای دارای مالتودکسترین خیلی کمتر در حدود ۰,۶۱ تا ۱,۱۶ واحد لگاریتمی بود. شایان ذکر است که در تمامی نمونه گیریهای ۱ و ۳ و ۶ ماهه، اختلاف معنی داری در کاهش تعداد باکتری زنده ($P < 0.05$)، بین دو گروه دارای مالتودکسترین و بدون مالتودکسترین مشاهده گردید. نکته جالب توجه این است که باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم دارای مالتودکسترین با ۱,۱۶ واحد لگاریتمی کاهش کلی نسبت به قبل از اسپری درائینگ بهترین باکتری این تحقیق شناخته شد. از سوی دیگر باکتری بیفیدوباکتریوم آدلوسنتیس بدون مالتودکسترین با ۶,۳۸ واحد لگاریتمی کاهش کلی تسبت به تعداد قبل از اسپری

www.SID.ir

Archive of SID

درائینگ، حساسترین باکتری محسوب شد. اما پودر دارای مالتودکسترین همین باکتری به طور کلی ۳,۵۹ واحد لگاریتمی کاهش را نشان داد که در حدود ۳ واحد لگاریتمی بهبود یافته است.

کامینگز و همکارانش در سال ۲۰۰۲ (۲۶) نشان دادند که استفاده از پری بیوتیک، موجب تحریک انتخابی باکتری های بیفیدوباکتریوم و لاکتوباسیلوس درون دستگاه گوارش می شود که این امر باعث افزایش مقاومت طبیعی بدن میزبان در مقابل باکتری های پاتوژن کشنده، است. همچنین دزموند و همکارانش در سال ۲۰۰۲ (۴) و لاین و همکارانش در سال ۲۰۰۲ (۲۷) از پری بیوتیک‌هایی مانند صمغ آکاسیا و نشاسته محلول در روش اسپری درائینگ استفاده کردند. دزموند و همکارانش در سال ۲۰۰۲ (۴) بیان کردند که اسپری درائینگ باکتری های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس همراه با ترکیب صمغ آکاسیا و نشاسته محلول، باعث افزایش بقاء باکتری لاکتوباسیلوس پاراکازئی NFBC338 در طول مراحل خشک کردن و نگهداری پودر در هر دو دمای ۱۵ و ۳۰ درجه سانتی گراد در مقایسه با کنترل، شده است. همانطور که بیان شد در تحقیقات قبلی از صمغ آکاسیا و نشاسته محلول به عنوان پری بیوتیک استفاده شده است، اما ما در این تحقیق از مالتو دکسترین به عنوان پری بیوتیک استفاده کردیم که با توجه به نتایج، باعث افزایش بقاء باکتری های بیفیدوباکتریوم در حین خشک کردن به روش اسپری درائینگ و در مرحله نگهداری شد. با توجه به آسیب های جدی وارده به فسفولیپیدهای دیواره سلولی باکتری های پروبیوتیک به علت دما و فشار بالای موجود در مراحل اسپری درائینگ، استفاده از تیمارهای مختلف و ماتریکسهای ساکاریدی مانند پلی دکستروز، مالتودکسترین، ترهالوز و... ، نقش بسزائی در تهیه فرآورده های پروبیوتیکی ایفا می کند. امید است که با استفاده از ایزوله های مقاوم در مکملهای غذایی و فرآورده های دارویی، سلامت جامعه بیش از پیش تامین گرد.

جدول۱. تاثیر تیمارهای دما، پر اکسید هیدروژن و نمک طعام بر روی بقاء باکتریها بعد از اسپری درائینگ و در مرحله نگهداری.

باکتریها	تعداد باکتری زنده قبل از اسپری درائینگ	تعداد باکتری زنده بعد از اسپری درئینگ	یک ماه بعد از اسپری درائینگ	سه ماه بعد از اسپری درائینگ	ششماه بعد از اسپری درائینگ
بیفیدوباکتریوم آنگولاتوم	۸,۸۹ ± ۰,۰۴ (۸,۱۴ ۰,۰۶)#	۵,۹۱± ۰,۱۳¤ (۶,۹۴ ± ۰,۰۶)	5.27 ± ۰,۱۳¤ (۶,۷۲ ± ۰,۱۶)	۴,۳۶ ± ۰,۱۵¤ (۶,۴۱ ± ۰,۲۱)	۳,۶۴ ± ۰,۲۲¤ (۵,۸۸ ± ۰,۲۵)
بیفیدوباکتریوم انیمالیس	۹,۲۷ ± ۰,۱۳ (۹,۳۹ ± ۰,۱۱)	۷,۷۱ ± ۰,۲۵ ¤ (۸,۹۹ ± ۰,۱۵)	۷,۵۰ ± ۰,۰۶¤ (۸,۸۶ ± ۰,۱۰)	۶,۹۸ ± ۰,۱۹¤ (۸,۷۷± ۰,۳۰)	۶,۳۶ ± ۰,۱۵¤ (۸,۵۳ ± ۰,۱۵)
بیفیدوباکتریوم بیفیدوم	۹,۰۷ ± ۰,۱۱ (۸,۷۴ ± ۰,۲۲)	۶,۹۹ ± ۰,۱۹ ¤ (۷,۹۲ ± ۰,۱۱)	۶,۱۴ ± ۰,۱۰¤ (۷,۷۴ ± ۰,۴۱)	۵,۷۶ ± ۰,۲۵¤ (۷,۶۸± ۰,۱۱)	۵,۳۶± ۰,۱۰¤ (۷,۰۷ ± ۰,۱۶)
بیفیدوباکتریوم آدلوسنتیس	۸,۹۵ ± ۰,۰۵ (۸,۸۷ ± ۰,۰۸)	۴,۶۷ ± ۰,۱۰¤ (۶,۴۳ ± ۰,۰۸)	۳,۹۲ ± ۰,۱۱¤ (۵,۹۶ ± ۰,۱۱)	۳,۳۸ ± ۰,۰۵ ¤ (۵,۸۷ ± ۰,۲۱)	۲,۱۴ ± ۰,۰۸¤ (۵,۲۰± ۰,۴۹)

تمامی باکتری های تیمار شده (ایزوله های مقاوم به همه تیمارها) قبلا تحت تاثیر تیمارهای دما، پر اکسید هیدروژن و نمک طعام، قرار گرفته اند. تعداد باکتری بر حسب ($\log$ cfu ml^{-1}; mean ± S.D.*) محاسبه شده است. * نشان دهنده لگاریتم واحد تشکیل دهنده کلنی در هر میلی لیتر؛ میانگین ± انحراف معیار. # اعداد پوشیده شده با پرانتز نشان دهنده لگاریتم بقای باکتری های تیمار شده (ایزوله های مقاوم به همه تیمارها) است و اعداد بدون پرانتز نشان دهنده لگاریتم بقای باکتری های تیمار نشده، است. ¤: نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار($p < 0.05$) بین دو گروه داده مربوط به باکتری های تیمار شده و تیمار نشده، است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۲. تاثیر پری بیوتیک مالتودکسترین بر روی بقاء باکتری ها بعد از اسپری درائینگ و در مرحله نگهداری.

باکتریها	تعداد باکتری زنده قبل از اسپری درائینگ	تعداد باکتری زنده بعد از اسپری درائینگ	یک ماه بعد از اسپری درائینگ	سه ماه بعد از اسپری درائینگ	شش ماه بعد از اسپری درائینگ
بیفیدوباکتریوم انگولاتوم	۸,۹۵ ± ۰,۰۴ (۸,۷۴ ± ۰,۰۶)#	۵,۸۳ ± ۰,۱۲¤ (۷,۱۱ ± ۰,۰۶)	۵,۴۹ ± ۰,۱۳¤ (۶,۹۲ ± ۰,۱۶)	۴,۶۲ ± ۰,۱۵¤ (۶,۶۷± ۰,۲۱)	۳,۸۲ ± ۰,۲۲¤ (۶,۰۴ ± ۰,۲۵)
بیفیدوباکتریوم انیمالیس	۹,۰۷ ± ۰,۱۳ (۹,۲۷ ± ۰,۱۱)	۶,۶۵ ± ۰,۲۵ ¤ (۸,۴۱ ± ۰,۱۵)	۵,۹۶ ± ۰,۰۶¤ (۸,۰۷ ± ۰,۱۰)	۵,۶۴ ±۰,۱۹¤ (۷,۹۱ ± ۰,۳۰)	۴,۹۶ ± ۰,۱۵¤ (۷,۷۳ ± ۰,۱۵)
بیفیدوباکتریوم بیفیدوم	۸,۸۷± ۰,۱۱ (۸,۱۴± ۰,۲۲)	۶,۷۷ ± ۰,۱۹ ¤ (۷,۵۹ ± ۰,۱۱)	۶,۴۳ ± ۰,۱۰¤ (۷,۴۶ ± ۰,۴۱)	۵,۷۴ ± ۰,۲۵¤ (۷,۲۳ ± ۰,۱۱)	۴,۸۹ ± ۰,۱۰¤ (۶,۹۸ ± ۰,۱۶)
بیفیدوباکتریوم آدلوسنتیس	۸,۸۹ ± ۰,۰۵ (۹,۳۹ ± ۰,۰۸)	۴,۹۱ ± ۰,۱۰ ¤ (۶,۹۶ ± ۰,۰۸)	۴,۳۶ ± ۰,۱۱¤ (۶,۸۶ ± ۰,۱۱)	۳,۷۹ ± ۰,۰۵ ¤ (۶,۳۹ ± ۰,۲۱)	۲,۵۱ ± ۰,۰۸¤ (۵,۸۰ ± ۰,۴۹)

تمامی باکتری ها، ایزوله های مقاوم به همه تیمارها هستند که قبلا تحت تاثیر تیمارهای دما، پر اکسید هیدروژن و نمک طعام، قرار گرفته اند. تعداد باکتری بر حسب ($\log$ cfu ml^{-1}; mean ± S.D.*) محاسبه شده است. * نشان دهنده لگاریتم واحد تشکیل دهنده کلنی در هر میلی لیتر؛ میانگین ± انحراف عیار. # اعداد پوشیده شده با پرانتز نشان دهنده لگاریتم بقای پودرهای دارای پری بیوتیک مالتودکسترین است و اعداد بدون پرانتز نشان دهنده لگاریتم بقای پودرهای بدون پری بیوتیک مالتودکسترین است. ¤ نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) بین دو گروه دارای پری بیوتیک مالتودکسترین و بدون مالتودکسترین،است

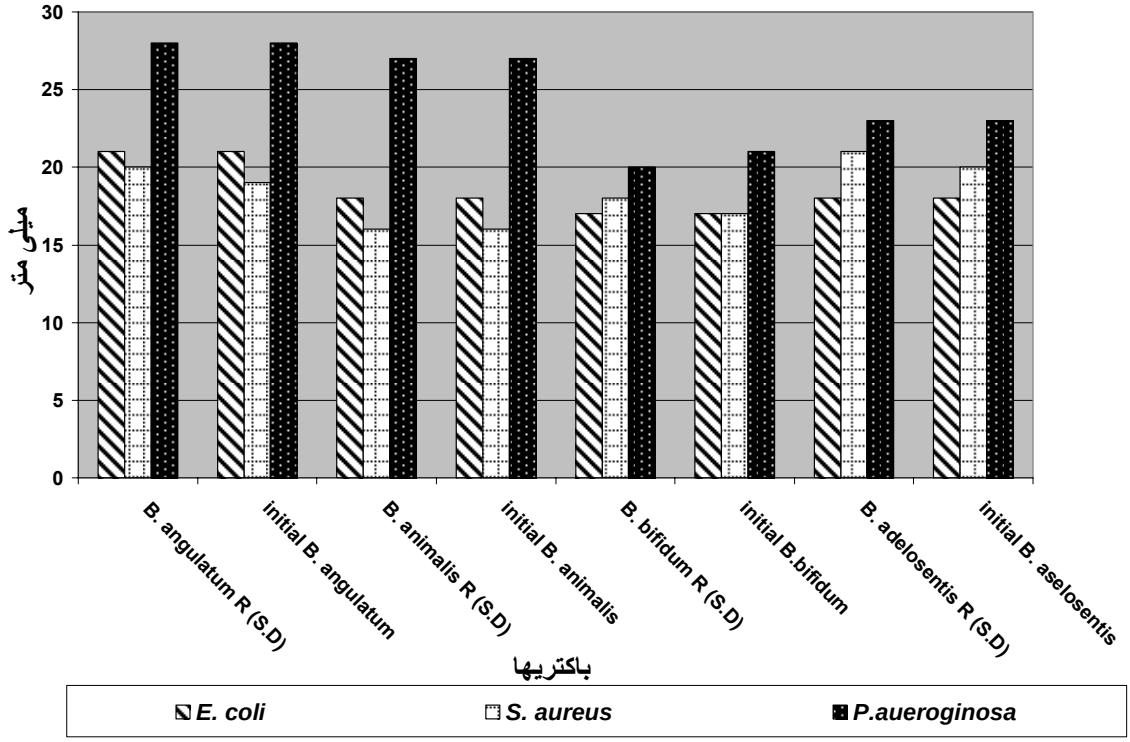
به منظور بررسی خاصیت ضد میکروبی ایزوله های مقاوم به همه تیمارهای موجود در پودر و باکتری های تیمار نشده اولیه، از روش چاهک تست استفاده شد و بعد از گذشت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در شرایط هوازی و دمای ۳۷ ^{o}C، قطر هاله های عدم رشد ایجاد شده به وسیله ایزوله های مقاوم به همه تیمارها و باکتری های تیمار نشده اولیه، اندازه گیری و ثبت شد (نمودار۴). با توجه به نتایج به دست آمده در نمودار ۴، تفاوت معنی داری ($P>0.05$) میان قطر هاله عدم رشد ایجاد شده به وسیله ایزوله های مقاوم به همه تیمارهای موجود در پودر و باکتریهای حساس تیمار نشده اولیه، مشاهده نشد و در بعضی موارد شاهد افزایش قطر هاله عدم رشد (افزایش خاصیت ضد میکروبی) ایزوله های مقاوم به همه تیمارهای موجود در پودر نسبت به باکتریهای تیمار نشده اولیه، بودیم. بر طبق نتایج، باکتری بیفیدوباکتریوم آنگولاتوم بیشترین قطر هاله عدم رشد (خاصیت ضد میکروبی) را بر روی باکتری های پاتوژن اشرشیا کلی و سودوموناس آئروجینوزا داشته است، اما باکتری بیفیدوباکتریوم آدلوسنتیس بیشترین قطر هاله عدم رشد (خاصیت ضد میکروبی) را بر روی باکتری پاتوژن استافیلوکوکوس اورئوس داشته است.

سپاسگزاری

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

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار۴. بررسی خاصیت ضدمیکروبی ایزوله های مقاوم به همه تیمارهای موجود در پودر و باکتری های تیمار نشده اولیه بااستفاده از روش چاهک تست (Well test). S.D : نشان دهنده باکتری موجود در پودر خشک شده به وسیله اسپری درائینگ، است.R : نشان دهنده ایزوله های مقاوم به همه تیمارهای موجود در پودر، است. initial : نشان دهنده باکتری های بیفیدوباکتریوم تیمار نشده اولیه، است.

منابع

1- 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. Journal of Applied Microbiology. **96**: 1024–1039.

2- Collado M. C; Sanz Y, (2007). Induction of acid resistance in Bifidobacterium: a mechanism for improving desirable traits of potentially probiotic strains. Journal of Applied Microbiology. ISSN 1364-5072.

3- 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.

4- 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. Journal of Applied Microbiology. **93**:1003–1011.

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

6- 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. Applied and Environmental Microbiology. **66** (6): 2605–2612.

7- 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. International Dairy Journal. **12**: 183–190.

www.SID.ir

Archive of SID

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

9- Conrad P. B; Miller D. P; Cielenski P. R; De Pablo J. J, (2000). Stabilization and Preservation of Lactobacillus acidophilus in Saccharide Matrices. J. Cryobiology. **41**: 17–24.

۱۰- بررسی تاثیر دمای هوای خروجی اسپری درایر روی بقاء پودر پروبیوتیکی بیفیدوباکتر، بهاره بیگدلی، محمد رضا فاضلی، جمیله نوروزی، فصلنامه دانش میکروب شناسی، سال اول، شماره ۲، بهار ۱۳۸۸، صفحه ۱۰-۱

11- Doleyres Y; Lacroix C, (2005). Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. International Dairy Journal. **15**: 973–988.

12- Rallu F; Gruss A; Maguin E, (1996). Lactococcus lactis and stress. Antonie van Leeuwenhoek. **70**: 243–251.

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

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

15- Kim W. S; Per L; Park J. H; Tandianus J. E; Dunn N. W, (2001). Assessment of Stress Response of the Probiotic Lactobacillus acidophilus. Current Microbiology. **43**: 346–350.

16- Desmond C; Stanton C; Fitzgerald G. F; Collins K; Ross R. P, (2001). Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. International Dairy Journal. **11**: 801–808.

17- Cotter P. D; Hill C, (2003). surviving the acid test: responses of gram positive bacteria to low pH. Microbiol. Mol. Biol. Rev., **67**: 429–453.

18- Erkkila S; Suihko M. L; Eerola S; Petaja E; Mattila-Sandholm T, (2001). Dry sausage fermented by Lactobacillus rhamnosus strains. International Journal of Food Microbiology. **64**: 205–210.

19- 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.

20- 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.

21- Mary P; Moschetto N; Tailliez R, (1993). Production and survival during storage of spray-dried Bradyrhizobium japonicum cell concentrates. Journal of Applied Bacteriology. **74**: 340–344.

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

23- Matsumoto M; Ohishi H; Benno Y, (2004). H+-ATPase activity in Bifidobacterium with special reference to acid tolerance. International Journal of Food Microbiology. **93**: 109–113.

24- Wang X; Gibson G. R, (1993). Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. Journal of Applied Bacteriology. **75**: 373-380.

25- Gardiner G. E; Bouchier P; O'Sullivan E; Kelly J; Collins J. K; Fitzgerald G; Ross R. P; Stanton C, (2002). A spray-dried culture for probiotic Cheddar cheese manufacture. International Dairy Journal. **12**: 749–756.

26- Cummings J. H; Macfarlane G. T, (2002). Gastrointestinal effects of prebiotics. British Journal of Nutrition. **87**: 145–151.

27- Lian W. C; Hsiao H. C; Chou C. C, (2002). Survival of bifidobacteria after spray-drying. International Journal of Food Microbiology. **74**: 79–86.

www.SID.ir