

تغییر قطبیت غشاء باکتری‌های پروبیوتیک در شرایط آزمایشگاهی

• نرگس واسجی (نویسنده مسئول)

عضو هیئت علمی بخش پژوهش‌های بیوتکنولوژی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور

• ناهید مژگانی

عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی

• ابوالحسن صادقی پناه

عضو هیئت علمی بخش مدیریت پرورش دام و طیور-مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور

تاریخ دریافت: آذرماه ۹۳ تاریخ پذیرش: فروردین ۹۴

Emali: n_vaseji@asri.ir

چکیده

اغلب لاکتوباسیل‌های پروبیوتیک به سطوح روده می‌چسبند که این پدیده تحت تأثیر اسیدهای چرب قرار می‌گیرد. این پروژه جهت افزایش خاصیت آب‌گریزی سطح سلول باکتری‌ها و بهبود عملکرد آن‌ها طراحی گردید و به این منظور، محیط‌های کشت MRS حاوی اسیدهای چرب اشباع (استئاریک اسید و پالمیتیک اسید)، غیر اشباع (α لینولنیک اسید، γ لینولنیک اسید، لینولئیک اسید، آراشیدونیک اسید، اولئیک اسید و ...)، مخلوط آن‌ها و یک محیط کنترل بدون اسید چرب، جهت رشد دو نوع باکتری لاکتوباسیلوس رامنوزوس و یک استارتر تجاری مورد استفاده قرار گرفتند. چربی سلولی باکتری‌ها استخراج، صابونی و متیله شده و میزان اسیدهای چرب آنها با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی اندازه‌گیری شدند. تغییرات خاصیت آب‌گریزی و آب‌دوستی غشاء باکتری‌های کشت شده با استفاده از حلال‌های اتیل استات (قطبی) و اکتان (غیر قطبی) و روش اسپکتروفتومتری تخمین زده شدند. نتایج این بررسی نشان داد که افزودن اسیدهای چرب آزاد به محیط کشت باعث تغییراتی در اسیدهای چرب سلولی باکتری می‌گردد و نتایج شاخص قطبیت غشاء نشان داد که محیط‌های حاوی مخلوط اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع بخصوص در مورد استارتر از قطبیت بیشتری برخوردار بوده و کشت بیشتری به حلال قطبی دارند و کشت استارتر در محیط اسیدهای چرب غیر اشباع باعث افزایش معنی‌دار نسبت اسیدهای چرب غیر اشباع به اشباع در سلول باکتری گردید. لاکتوباسیلوس رامنوزوس در هر چهار محیط مورد آزمایش خواص غیر قطبی (در نتیجه تمایل بیشتر به اتصال با موکوس روده) را از خود نشان داد.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، اسیدهای چرب، لاکتوباسیلوس رامنوزوس، استارتر، اتصال

- Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 108 pp: 45-56

Change the polarity of probiotic bacteria membrane in vitro

By: Vaseji, N., Member of Scientific Board, Dept. of Biotechnology, Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Shahid Beheshti St., Karaj, Iran. Mojgani, N., Member of Scientific Board, Dept. of Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, IR Iran. Sadeghipanah, A., Member of Scientific Board, Dept. of Animal Breeding, ASRI.

Received: November 2014 Accepted: March 2015

Email: n_vaseji@asri.ir

Most of probiotic Lactobacilli adhere to intestinal surfaces, a phenomenon influenced by free fatty acids. this project to increase hydrophobicity properties of bacterial cell surface and increase performance of them, was designed and for this purpose, MRS broth media including saturated (palmitic acid, stearic acid), unsaturated fatty acids (α -linolenic acid, γ -linolenic acid, linoleic acid, Arachidonic acid, oleic acid etc), mix of them and control (without fatty acids), for growth *Lactobacillus rhamnosus* and a commercial starter was investigated. Extraction, saponification and methylation of Fat-cell bacteria by gas chromatography was measured. Changes in hydrophobic and hydrophilic properties of cultured bacteria were estimated with ethylacetat (polar solvent), octan (non polar solvent) and spectrophotometric method. The results of this analysis indicated that addition of free fatty acids to culture medium causes changes in cellular fatty acid bacteria and the results of membrane polarity index showed that medium included mix of saturated and unsaturated fatty acids in particular in starter bacteria, have more affinity for polar solvent and starter bacteria in medium including unsaturated fatty acids causes significant increase ratio of unsaturated fatty acids to saturated in cell bacteria. *Lactobacillus rhamnosus* in all of experiments showed Nonpolar properties (tendency to bind to the intestinal mucosa).

Key words: Probiotic, Fatty acids, *Lactobacillus rhamnosus*, Starter, Connectivity

(Di Criscio et al., 2010). اهمیت این باکتریهای مهم صنعتی را میتوان به تولید متابولیت‌هایی مانند: اسیدهای آلی (لاکتیک و اسید استیک)، پراکسید هیدروژن، اتانول، دی استیل، استالدئید، استوئین، دی اکسید کربن، روترین، روتری سایکلین و باکتریوسین نسبت داد. وجود باکتریوسین باکتری های اسید لاکتیک، در درجه اول سبب استفاده از آنها به عنوان نگهدارنده های بیولوژیک می‌شود و در نتیجه قابلیت جایگزین آنتی بیوتیکی را به آنها می دهد. بنابر این، می توان از پروبیوتیک‌ها برای درمان عفونت های مختلف دستگاه گوارش و ادراری استفاده نمود (Šuškuvić J et al. 2010). از خواص این میکروارگانیسم‌ها می‌توان به مقاومت در برابر اسید و صفا اشاره نمود.

(Kimoto-Nira H et al. 2013 & Sahadeva, R.P.K et al. 2011).

پروبیوتیک‌ها پس از مصرف باید برای رسیدن به محل فعالیت خود و اعمال اثرات سلامتی بخش، بر موانع بیولوژیکی دستگاه گوارش غلبه کنند که این موانع شامل آنزیم های گوارشی، اسید در معده و صفا در روده می‌باشند (Sanchez et al., 2009). از دیگر خواص آنها می توان به قابلیت حذف کلسترول اشاره نمود (Remagni M.C et al. 2013) به طور کلی اثرات پروبیوتیک‌ها شامل: بهبود وضعیت ایمنی و میکروبی سیستم گوارشی، تنظیم سیستم ایمنی از طریق افزایش سلول های ایمنی (Miyazawa K et al. 2011)، مهار پاتوژن‌ها، ایجاد تعادل میکروبی در ناحیه معدی - روده‌ای، افزایش سطح عمل سلول های اپی تلیال

مقدمه

امروزه محبوبیت و مقبولیت غذاهای فراسودمند از افزایش سطح توقع و انتظار مردم نسبت به خودو زندگی ناشی شده است، خصوصیات تغذیه ای و سلامتی محصول مورد استفاده از فاکتورهای بسیار اساسی در پذیرش محصول از سوی مصرف کننده آگاه امروز می‌باشد. از این رو متخصصان علوم و صنایع غذایی در پی طراحی و تولید محصولاتی می باشند که علاوه بر خصوصیات حسی و ظاهری مطلوب، دارای خواص سلامتی بخش و تغذیه ای خاص نیز باشند.

رژیم غذایی نقش مهمی در سلامت بشر ایفا می‌کند. امروزه بنا به گزارش برخی محققین، رژیم غذایی باعث ابتلا به بیماری شده یا از آن پیشگیری می کند. در سال‌های اخیر توجه خاص صرف تولید مواد غذایی فراویژه گردیده است. هدف اصلی تولید مواد غذایی فراویژه وارد کردن میکروارگانیسم‌ها یا ترکیبات مفید از طریق مصرف روزانه به شمار می‌رود (Di Criscio et al., 2010). یکی از این موارد پروبیوتیک‌ها هستند که به عنوان غذاهای کاربردی معرفی شده و معمولاً در محصولات لبنی مثل ماست و شیرهای تخمیری و یا حتی به شکل افزودنیهای مغذی استفاده می شوند (Vasiljevic and Shah, 2008) پروبیوتیک‌ها عبارتند از میکرو اورگانیسم های زنده ای که با استقرار در محیط روده می توانند تعادل میکروبی را در جهت افزایش سودمندی آنها اصلاح کنند و با فعالیت خود مانع از فعالیت میکرو اورگانیسم‌های غیر مفید و پاتوژن‌ها می‌باشند

خواص جذب اسیدهای چرب به غشاء پروبیوتیک ها علاوه بر ایجاد تغییرات فیزیکیوشیمیایی در غشاء، حذف اسیدهای چرب مضر از محیط می باشد. در مطالعه ای، اثرات استفاده از لاییدیک اسید روی رشد و هیدروفوبیسیته سطحی لاکتوباسیلوس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که لاییدیک اسید می تواند خواص سطحی فیزیکیوشیمیایی لاکتوباسیل را تغییر داده و از طرفی با جذب این اسید چرب سبب کاهش جذب آن در بدن می گردد (Nagendra P Qinglong Wu and Shah. 2014).

هدف این تحقیق، بررسی این موضوع است که چگونه تغییر اسیدهای چرب سطح باکتری ها بر روی خواص فیزیکی باکتری تاثیر می گذارد.

مواد و روش ها

باکتری های مورد مطالعه

۱- لاکتوباسیلوس رامنوزوس (ATCC:7469, RTCC:1286)
 ۲- استراتر ۱^{ABY} (محصول شرکت CHR-Hansen): این کشت مخلوطی از گونه های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ۵-LA، بیفید و باکتریوم BB/۲، استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس دلبروکئی زیر گونه بولگاریکوس می باشند و به شکل بسته بندی های فریز - درای نگهداری می شوند. این کشت ها باید در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد یا زیر آن نگهداری شوند. نیمه عمر آنها حداقل ۲۴ ماه می باشد و در ۵+ درجه سانتی گراد نیمه عمر آنها حداقل ۶ هفته می باشد.

علت انتخاب این باکتری ها این است که آنها به طور وسیعی به عنوان پروبیوتیک و در صنایع لبنی به کار رفته اند.

کشت باکتری ها

چهار محیط کشت جداگانه به شرح زیر تهیه شدند:

۱- محیط کشت MRS براوث غنی شده با اسیدهای چرب غیر اشباع (به میزان ۵μg/ml) از هر اسید چرب افزوده شده و سپس محیطها برای حل شدن کامل اسیدهای چرب حرارت داده شدند)
 ۲- محیط کشت MRS براوث غنی شده با اسیدهای چرب اشباع (به میزان ۵μg/ml) از هر اسید چرب افزوده شده و سپس محیطها برای حل شدن کامل اسیدهای چرب حرارت داده شدند).
 ۳- محیط کشت MRS براوث غنی شده با کلیه اسیدهای چرب فوق (اشباع + غیر اشباع)

۴- محیط کشت MRS براوث بدون مکمل اسیدهای چرب محیطهای کشت حاوی اسیدهای چرب مختلف (غیر اشباع، اشباع، مخلوطی از اشباع و غیر اشباع) و نیز محیط بدون مکمل اسید چرب (کنترل) در لوله های آزمایش به میزان ۱۰ میلی لیتر ریخته شدند. سپس باکتری های لاکتوباسیلوس و استراتر جداگانه در هر یک از محیط های تهیه شده به میزان یک لوپ (تقریباً ۰/۱ میلی لیتر) کشت شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در شرایط ۱۰٪ CO₂ به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. بعد از گذشت مدت زمان گرمخانه گذاری، سلول های باکتریایی با دور × ۱۵۰۰ g به مدت ۷ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ و جمع آوری شده و سپس دو بار با بافر فسفات نمکی با pH برابر ۷/۴ شستشو داده شدند (جهت حذف بقایای محیط کشت). لوله های حاوی باکتری کشت شده درپوش گذاری شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

(Sengupta R et al. 2013) می باشد. لازم به ذکر است که هر گونه پروبیوتیک اثر خاصی در ایجاد سلامت دارد و هیچ پروبیوتیکی تمام اثرات را ندارد. گاهی پروبیوتیک ها نقش خود را با اتصال به موکوس و سطوح سلول های اپی تلیال روده ایفا می کنند. عوامل مختلفی در خصوصیت چسبندگی گونه های مختلف پروبیوتیک ها به سلول های روده دخیل هستند که از آن جمله می توان به خواص آبگریزی و آبدوستی غشای سلولی این میکروارگانیسم ها اشاره نمود. محیط های کشت مختلف بر روی ترکیب اسیدهای چرب غشای باکتری اثر دارند و این تاثیر سبب تغییر خواص آبگریزی و آبدوستی غشای این باکتری ها و در نتیجه چسبندگی آنها می شود. ناحیه معدی - روده ای، یک اکوسیستم فوق العاده پیچیده است و طولانی ترین قسمت بدن میزبان بوده که در ارتباط با محیط می باشد. این اکوسیستم شامل: GL اپی تلیوم، سلول های ایمنی، میکروفلور موجود می باشد. (Salminen S. et al., 1998) ثابت شده که میکروفلور روده ای از حداقل ۱۰۰۰ گونه مختلف تشکیل شده است که ۱۰ گونه از این باکتری ها حدود ۹۹-۹۵٪ همه باکتری ها را تشکیل می دهند. عمل بسیاری از این باکتری ها ناشناخته است، بعضی دارای اثرات زیانبار و بقیه سودمند هستند. میکروب های ساکن در این ناحیه در بسیاری از مراحل متابولیک مثل تخمیر کربوهیدرات های هضم نشده به صورت اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه، و نیز در متابولیسم لیپید و سنتز ویتامین شرکت می کنند (Shakeri, M., 1382). پروبیوتیک های ویژه ای بر توازن میکروبی و اصلاح ایمنی میزبان تاثیر می گذارند. چسبیدن و ایجاد کلنی های موقت بر سطوح روده توسط باکتری های پروبیوتیک، مرحله ای کلیدی در این عملکرد می باشد (Ouweland, A. et al 1999) بنابراین توانایی چسبیدن یک گونه پروبیوتیک به موکوس و سطوح سلول های اپی تلیال، یکی از شرایط مهم در گزینش پروبیوتیک ها است. چندین عامل در چسبندگی پروبیوتیک ها نقش دارند که یکی از آنها خاصیت آبگریزی سطح سلول باکتریایی می باشد. خواص سطحی سلول باکتری و در نتیجه اتصال آن به سلول های روده، تحت تاثیر عوامل مختلف تغییر می کند. ترکیبات موجود در محیط کشت میکروارگانیسم، تاثیر زیادی در تغییر دیواره سلولی و در نتیجه تغییر عملکرد آن دارند. تاثیر ترکیبات محیط کشت بر روی میکروارگانیسم ها در تحقیقات مختلف مشاهده شده است. Anna Bzducha و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که افزودن گلیسرول به محیط کشت مخمر پروبیوتیک ساکارومایسس سرویسیه، سبب افزایش درصد محتویات پلی ساکاریدی دیواره می شود. ساختمان دیواره مخمر پروبیوتیک یکی از عواملی است که در ایجاد خواص پروبیوتیکی آن موثر می باشد. در تحقیق Chichlowski و همکاران (۲۰۱۲)، خواص سطحی باکتری بیفیدوباکتریوم جدا شده از مدفوع نوزادان، با کشت بر روی الیگو ساکاریدهای شیر انسان، تغییر کرده و اتصال آن به سلول های روده افزایش چشمگیری یافت. این تحقیق تاثیر الیگوساکاریدها را بر روی غشاء بیفید و باکتریوم نشان می دهد. اطلاعاتی نیز مبنی بر تاثیرات اسیدهای چرب بر روی خواص فیزیکیوشیمیایی لاکتوباسیل ها و پروبیوتیک ها وجود دارد. (Tuomola, E. et al. 1998; Kirjavainen, P.V. et al., 1998; Sengupta R. et al., 2013) از طرفی، مصرف زیاد اسیدهای چرب ترانس، احتمال ابتلا به بیماریهای قلبی - عروقی را افزایش می دهد و هیچ راه موثری برای از بین بردن این اسیدهای چرب بعد از مصرف وجود ندارد. یکی از

مراحل آماده سازی نمونه ها جهت آنالیز با دستگاه کروماتوگرافی گازی

بررسی خصوصیات فیزیکی

خصوصیات آب گریزی و آب دوستی غشاء سلول باکتریائی با مقایسه گرایش سلول باکتریائی نسبت به حلال های قطبی و غیر قطبی بررسی شد. در این تحقیق اتیل استات که یک الکترون دهنده قوی است به عنوان حلال قطبی و اکتان به عنوان حلال غیر قطبی مورد استفاده قرار گرفتند. حلال غیر قطبی (اکتان) جهت تخمین خصوصیات آب گریزی باکتری ها و حلال قطبی (اتیل استات) برای تخمین خصوصیات اسید و باز (الکترون دهندگی و الکترون گیرندگی) انتخاب شدند. خصوصیات اسیدی باکتری های مورد مطالعه با مقایسه گرایش به اتیل استات بازی قطبی و اکتان غیر قطبی بررسی شد. باکتری ها در براوت ساده و براوت حاوی اسید چرب های مختلف کشت داده شده سپس با سانتریفوژ به مدت ۷ دقیقه در ۱۵۰۰ دور و ۴ درجه سانتی گراد جمع آوری شدند. بعد از آن با محلول کلرید سدیم ۰/۱۵ مولار دو بار شستشو شدند. برای اجتناب از مزاحمت های بارهای یونی، از الکترولیت های با غلظت بالا استفاده شد (برخی قطرات حلال غیر قطبی ممکن است در محلول های آبی به صورت منفی باردار شوند و در نتیجه بار سطحی سلول را بپوشانند). سپس یک میلی لیتر از نمونه برداشته شد و پس از تنظیم کدورت نمونه در ۶۰۰ نانومتر بر روی ۰/۱±۰/۲۵، کدورت مخلوط میکروبی در ۴۰۰ نانومتر اندازه گیری شد (نمونه A). ۲/۴ میلی لیتر از همین محلول میکروبی به مدت ۱ دقیقه با ۰/۴ میلی لیتر حلال مخلوط شد و به مدت ۱۵ دقیقه برای جداسازی کامل به طور ساکن قرار داده شد. سپس ۱ میلی لیتر از فاز آبی برداشته شد (نمونه A) و کدورت آن در ۴۰۰ نانومتر اندازه گیری گردید. درصد باکتری های موجود در هر حلال با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

$$\frac{A}{(40) - 1} \times 100 = \text{درصد فینیتی}$$

برای تسهیل ارزیابی خصوصیت اسیدی و بازی باکتری ها، نسبت جفت حلال ویژه اتیل استات/ اکتان محاسبه و مورد بررسی قرار گرفت (۵).

محاسبات آماری

آزمایش فاکتوریل ۴×۲ که نوع باکتری در دو سطح و نوع محیط کشت در ۴ سطح در قالب طرح کاملا تصادفی با رویه تجزیه آماری گردیدند.

برای بررسی اثر هر اسید چرب بر میزان قطبیت غشاء از تجزیه رگرسیون خطی بین X و Y استفاده گردید.

نتایج

به طوری که نتایج نشان می دهند، تأثیر محیط های کشت مختلف غنی شده از اسید چرب بر روی میزان اولئیک اسید این دو گونه باکتری (لاکتوباسیلوس و استاترتر) متفاوت بود (جدول ۲). در کل میزان اولئیک اسید باکتری های استاترتر در ۴ محیط مورد بررسی تفاوت معنی داری نداشت. اما این روند برای باکتری لاکتوباسیلوس متفاوت است. نوع باکتری بر روی میزان لینولئیک اسید مؤثر می باشد (P=۰/۰۰۴۶). با مقایسه میزان لینولئیک اسید این دو گونه باکتری، مشاهده شد که تنها در محیط های کشت ساده و اشباع اختلاف معنی دار وجود دارد و میانگین لینولئیک اسید

۱- مرحله صابونی کردن

از نمونه های باکتری به دست آمده (سلول بیوماس مرطوب) به میزان ۲۰۰ میلی گرم برداشته سپس فرایند صابونی کردن با افزودن ۱ میلی لیتر متانول بازی به هر نمونه آغاز شد (۱ قسمت از NaOH ۳/۷ مولار در متانول با یک قسمت از آب دیونیزه مخلوط شد). در لوله ها محکم بسته شده و به مدت ۵ تا ۱۰ ثانیه ورتکس شدند. سپس نمونه ها در ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه جوشانده شده و به تدریج خنک شدند و دوباره به مدت ۵ تا ۱۰ ثانیه ورتکس شده و سرانجام در حمام آب ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۵ دقیقه دیگر جوشانده شدند (ایجاد نمک سدیم اسیدهای چرب).

۲- مرحله متیله کردن

برای متیله کردن اسیدهای چرب (فرم فعلی به صورت نمک های سدیم بود)، ۲ میلی لیتر از معرف متیله کردن (HCl ۶ مولار- متانول] ۱۳:۱۱) به هر لوله افزوده شد. در لوله ها محکم بسته شده و محلول ها به مدت ۵ تا ۱۰ ثانیه ورتکس شدند سپس در حمام بخار ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شدند. پس از آن به سرعت زیر شیر آب تا دمای اتاق خنک شدند.

۳- استخراج متیل استرها

متیل استر های اسید چرب از فاز آبی اسیدی با فرایند استخراج مایع - مایع، به فاز آلی منتقل شدند. ۱/۲۵ میلی لیتر از حلال استخراج (هگزان - پترولیوم اتر [۱:۱]) به هر لوله اضافه شد. در لوله ها محکم بسته شد و به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط گردید سپس فاز آلی رویی جمع آوری و برای آنالیز GC مورد استفاده قرار گرفت.

۴- آنالیز GC باکتری های استخراج شده

پس از تبخیر حلال، اسیدهای چرب استخراج شده از سلول باکتری با ۰/۵ میلی لیتر هگزان مخلوط شده و با GC (سیستم HP ۶۸۹۰N HP) با FID (۲۵۰ درجه سانتی گراد) و با دو تکرار آنالیز گردید. دمای inlet، ۲۴۰ درجه سانتی گراد و ستون کاپیلاری سیلیکا DB-۲۳ به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۳۲ میلی متر و Split thickness ۰/۲۵ μm برای آنالیز مورد استفاده قرار گرفت. میزان Split ratio برابر ۵:۱۰۰ و نوع انژکتور Split/Splitless و دمای انژکتور ۲۴۰ درجه سانتی گراد بود. گاز حامل نیتروژن و فلوریت گاز حامل ۱/۷ ml/min بود. میزان ۱ میکرولیتر از نمونه تزریق شد. برنامه ریزی دمائی و سرعت جریان ستون به شرح زیر بود: دمای اولیه ۱۴۰ درجه سانتی گراد بود پس از ۱۰ دقیقه دما به تدریج به ۲۳۰ درجه سانتی گراد افزایش یافت. سپس ۱۷ دقیقه در این دما نگهداری شد. فشار ستون ۱۳ PSI برای ۱۰ دقیقه بود پس از آن به مدت ۵ دقیقه تا ۲۰ PSI افزایش یافت. Run time ۱۵ دقیقه بود.

آرآشیدونیک اسید برای هیچیک از باکتری‌ها و در هیچیک از محیط‌های کشت معنی‌دار نبود. در مورد باکتری‌های استارتر تفاوت قابل ملاحظه‌ای در جذب پالمیتیک اسید در محیط‌های مختلف مشاهده نشد ولی در کل اختلاف بین هر دو نوع باکتری در محیط‌های مختلف از نظر جذب اسید چرب پالمیتیک معنی‌دار نمی‌باشد. همچنین تأثیر محیط‌های کشت مختلف بر روی میزان استتاریک اسید

غشاء استارتر در محیط کشت ساده و غنی شده با اسیدهای چرب غیر اشباع بیش از لاکتوباسیلوس بود. از طرفی اختلاف بین دو باکتری در محیط‌های ساده (کنترل) و حاوی اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع و مخلوط از نظر جذب گاما لینولنیک اسید معنی‌دار نمی‌باشد. به همین ترتیب در مورد جذب آلفا لینولنیک اسید توسط باکتری‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود. میانگین جذب

جدول ۱- اثر افزودن اسیدهای چرب به محیط کشت بر شاخص قطبیت غشاء و ترکیب اسیدهای چرب در دو باکتری لاکتوباسیلوس و استارتر

| P نوع باکتری نوع محیط کشت * | P نوع محیط کشت | P نوع باکتری | SEM | استارتر ^۱ | | | | لاکتوباسیلوس رامنوزوس | | | | فراسنجه‌ها |
|--------------------------------------|----------------------|-----------------|---------|----------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|--|
| | | | | مخلوط ^۲ | غیراشباع ^۳ | اشباع ^۴ | کنترل ^۵ | مخلوط ^۲ | غیراشباع ^۳ | اشباع ^۴ | کنترل ^۵ | |
| ۰/۰۰۱۴ | ۰/۰۰۰۴ | ۰/۶۱ | ۰/۰۸۹۸ | ۱/۶۱۳ | ۰/۴۷۳ | ۰/۲۶۱ | ۰/۴۳۸ | ۰/۷۴۹ | ۰/۴۱۶ | ۰/۹۲۹ | ۰/۴۴۴ | شاخص قطبیت غشاء ^۶ |
| ۰/۹۶ | ۰/۱۰۳ | ۰/۹۰ | ۰/۰۷۶۹ | ۰/۷۸۶ | ۰/۵۰۹ | ۱/۰۲۰ | ۰/۷۶۰ | ۰/۸۴۳ | ۰/۴۸۵ | ۱/۰۶۱ | ۰/۶۰۰ | پالمیتیک اسید C16:0 (mg/g bac) |
| ۰/۰۳۶ | ۰/۱۵ | ۰/۲۰ | ۰/۰۲۲۳ | ۰/۴۵۷ | ۰/۱۵۶ | ۰/۳۱۳ | ۰/۳۰۹ | ۰/۱۹۹ | ۰/۲۴۱ | ۰/۳۰۶ | ۰/۲۴۷ | استتاریک اسید C18:0 (mg/g bac) |
| ۰/۳۱ | ۰/۶۳ | ۰/۰۰۰۱ | ۰/۰۵۳۱ | ۰/۷۳۳ | ۰/۶۳۱ | ۰/۵۸۸ | ۰/۶۷۴ | ۰/۲۷۴ | ۰/۱۶۹ | ۰/۴۷۲ | ۰/۱۶۱ | اولنیک اسید C18:1 سیسی (mg/g bac) |
| ۰/۰۲۷۰ | ۰/۱۵۷ | ۰/۰۰۴۶ | ۰/۰۰۲۱ | ۰/۰۲۳ | ۰/۰۲۰ | ۰/۰۱۲ | ۰/۰۳۱ | ۰/۰۱۴ | ۰/۰۰۵ | ۰/۰۱۸ | ۰/۰۰۶ | لینولنیک اسید C18:2 (mg/g bac) |
| ۰/۲۷ | ۰/۲۴ | ۰/۴۱ | ۰/۰۰۴۴ | ۰/۰۵۵ | ۰/۰۶۳ | ۰/۰۳۶ | ۰/۳۲ | ۰/۰۵۱ | ۰/۰۳۰ | ۰/۰۵۰ | ۰/۰۲۵ | گاما لینولنیک اسید C18:3 (mg/g bac) |
| ۰/۴۸ | ۰/۷۲ | ۰/۲۸ | ۰/۰۰۲۷ | ۰/۰۰۲ | ۰/۰۱۱ | ۰/۰۰۷ | ۰/۰۰۹ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۰۸ | ۰/۰۲۵ | ۰/۰۰۸ | آلفا لینولنیک اسید C18:3 (mg/g bac) |
| ۰/۷۶ | ۰/۴۴ | ۰/۷۴ | ۰/۰۱۲۰ | ۰/۰۴۳ | ۰/۰۴۲ | ۰/۰۶۵ | ۰/۰۴۹ | ۰/۰۶۶ | ۰/۰۳۱ | ۰/۱۱۱ | ۰/۰۲۷ | آرآشیدونیک اسید C20:4 (mg/g bac) |
| ۰/۰۱۷ | ۰/۰۶۷ | ۰/۰۱۴ | ۰/۰۸۳۱ | ۰/۷۱۶ | ۱/۶۳۸ | ۰/۶۶۸ | ۰/۸۲۰ | ۰/۷۰۲ | ۰/۵۸۹ | ۰/۷۵۱ | ۰/۵۲۶ | نسبت اسید چرب غیراشباع به اشباع |
| ۰/۸۳ | ۰/۷۳ | ۰/۰۹۵ | ۰/۰۱۱۵ | ۰/۱۵۵ | ۰/۱۷۵ | ۰/۱۳۲ | ۰/۱۵۴ | ۰/۲۱۳ | ۰/۲۰۷ | ۰/۱۹۸ | ۰/۱۶۲ | نسبت اسید چرب چندغیراشباع به یک‌غیراشباع |
| ۰/۱۷ | ۰/۱۰۸ | ۰/۰۰۷۰ | ۰/۰۱۰۷۸ | ۱/۵۷۱ | ۳/۲۰۱ | ۱/۱۰۶ | ۱/۳۰۰ | ۰/۸۶۲ | ۱/۱۳۸ | ۱/۱۶۱ | ۰/۹۰۳ | نسبت اسید چرب ۱۸ کرینه به ۱۶ کرینه |
| ۰/۰۱۸ | ۰/۷۲ | ۰/۵۹ | ۰/۰۲۷۴ | ۰/۵۷۸ | ۰/۳۶۷ | ۰/۳۵۶ | ۰/۳۹۱ | ۰/۳۴۵ | ۰/۵۲۰ | ۰/۳۷۶ | ۰/۴۰۳ | نسبت اسید چرب اشباع ۱۸ کرینه به ۱۶ کرینه |
| ۰/۵۷ | ۰/۴۸ | ۰/۰۰۲ | ۱/۲۸۵۰ | ۱۹/۴۴۸ | ۱۹/۰۱۸ | ۱۴/۵۰۵ | ۱۱/۴۰۰ | ۸/۲۸۶ | ۷/۹۵۷ | ۱۰/۲۱۳ | ۶/۰۵۶ | نسبت اسید چرب غیراشباع ۱۸ کرینه به ۱۶ کرینه |
| ۰/۶۲ | ۰/۴۲ | ۰/۰۰۱۹ | ۱/۱۸۵۵ | ۱۷/۵۱۴ | ۱۶/۹۸۸ | ۱۳/۴۷۸ | ۱۰/۳۲۰ | ۷/۲۳۹ | ۶/۹۶۶ | ۹/۱۷۶ | ۵/۳۸۳ | نسبت اسید چرب یک‌غیراشباع ۱۸ کرینه به ۱۶ کرینه |

۱: محیط کشت MRS بدون اسیدچرب اضافی

۲: محیط کشت MRS + اسیدهای چرب پالمیتیک و استتاریک (از هر یک از اسیدهای چرب به میزان ۵μg/ml به محیط‌های کشت افزوده شد)

۳: محیط کشت MRS + اسیدهای چرب آرآشیدونیک، اولنیک، لینولنیک، گاما لینولنیک، آلفا لینولنیک (از هر یک از اسیدهای چرب به میزان ۵μg/ml به محیط‌های کشت افزوده شد)

۴: محیط کشت MRS + اسیدهای چرب آرآشیدونیک، اولنیک، لینولنیک، گاما لینولنیک، آلفا لینولنیک، پالمیتیک و استتاریک (از هر یک از اسیدهای چرب به میزان ۵μg/ml به محیط‌های کشت افزوده شد)

۵: نسبت باکتری موجود در حلال قطبی (اتیل استات) به باکتری موجود در حلال غیرقطبی (اکتان)

۶: میلی گرم اسیدچرب در هر گرم باکتری

۷: استارتر: استارتر ABY1 که مخلوطی از گونه‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس LA-5، بیفیدوباکتریوم BB/2، استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس دلبروکنی زیر گونه بولگاریکوس می باشد.

به طور کلی اسیدهای چرب استناریک (برای باکتری های استارتر در محیط های غیر اشباع و مخلوط) و اولئیک (برای باکتری لاکتوباسیلوس در محیط اشباع) ($P < 0.05$) و لینولئیک اسید (برای هر دو باکتری مورد مطالعه در محیط های اشباع و ساده) جذب زیادی را نشان دادند ($P < 0.01$) ولی در مورد پالمیتیک، گاما لینولنیک، آلفا لینولنیک و آراشیدونیک اسید، جذب زیادی به باکتری ها مشاهده نشد.
آنالیز نتایج نشان داد که در محیط مخلوط، کشش باکتری استارتر به حلال قطبی اتیل استات در مقایسه با سایر محیط های کشت افزایش می یابد به طوری که باکتری استارتر در محیط کشت مخلوط، تمایل

این دو گونه باکتری (لاکتوباسیلوس و استارتر) متفاوت بود. به طور کلی نتایج آنالیز نشان داد که پالمیتیک اسید و اولئیک اسید در محیط اشباع به میزان بیشتری جذب لاکتوباسیلوس رامنوزوس شدند (جذب اولئیک اسید در محیط های ساده و غیر اشباع تقریباً یکسان بود) ولی جذب این اسیدهای چرب به باکتری های استارتر چندان قابل توجه نبوده است. از طرف دیگر استناریک اسید در محیط های مختلف اتصال چشمگیری به باکتری لاکتوباسیلوس نشان نداده است در حالی که اتصال این اسید چرب در محیط های مخلوط و غیر اشباع به باکتری های استارتر، محسوس تر می باشد (جدول ۱).

جدول ۲- میانگین شاخص قطبیت غشاء و ترکیب اسیدهای چرب در دو باکتری لاکتوباسیلوس و استارتر

| فراسنجه ها | لاکتوباسیلوس رامنوزوس | استارتر ^۲ | SEM | P نوع باکتری |
|---|---------------------------|---------------------------|--------|--------------|
| شاخص قطبیت غشاء ^۱ | ۰/۶۳۴۶۲۵ ^{aa} | ۰/۶۹۶۱۲۵ ^{ah} | ۰/۰۸۹۸ | ۰/۶۱ |
| پالمیتیک اسید ۱۶:۰ (mg/g bac) | ۰/۷۴۷۲۴۴۶ ^{ef} | ۰/۷۶۷۶۲۱۴ ^{aa} | ۰/۰۷۶۹ | ۰/۹۰ |
| استناریک اسید ۱۸:۰ (mg/g bac) | ۰/۲۴۸۳۸۷ ^{aa} | ۰/۳۹۸۸۹۱۲ ^{ab} | ۰/۰۲۲۳ | ۰/۲۰ |
| اولئیک اسید ۱۸:۱ سبسی (mg/g bac) | ۰/۲۶۸۸۵۶۴ ^{ah} | ۰/۶۵۱۲۴۰۳ ^{aa} | ۰/۰۵۳۱ | ۰/۰۰۰۱ |
| لینولئیک اسید ۱۸:۲ (mg/g bac) | ۰/۰۱۰۹۰۹۳ ^{ef} | ۰/۰۲۱۵۲۵ ^{ef} | ۰/۰۰۲۱ | ۰/۰۰۴۶ |
| گاما لینولنیک اسید ۱۸:۳ (mg/g bac) | ۰/۰۳۸۸۵۶۲۳۳ ^{aa} | ۰/۰۴۵۸۹۵۹۷۹ ^{aa} | ۰/۰۰۴۴ | ۰/۴۱ |
| آلفا لینولنیک اسید ۱۸:۳ (mg/g bac) | ۰/۰۱۳۶۵۹۸ ^{aa} | ۰/۰۰۷۷۹۸۸ ^{aa} | ۰/۰۰۲۷ | ۰/۲۸ |
| آراشیدونیک اسید ۲۰:۴ (mg/g bac) | ۰/۰۵۸۸۱۹۹ ^{aa} | ۰/۰۵۰۳۲۵۱ ^{aa} | ۰/۰۱۳۰ | ۰/۷۴ |
| نسبت اسید چرب غیر اشباع به اشباع | ۰/۶۴۱۹۳۹۶۱۸ ^{aa} | ۰/۹۷۶۷۰۸۶۱ ^{ab} | ۰/۰۸۲۱ | ۰/۰۱۴ |
| نسبت اسید چرب چند غیر اشباع به یک غیر اشباع | ۰/۱۹۴۷۳۳۷۲۴ ^{aa} | ۰/۱۵۳۶۱۶۲۰۹ ^{aa} | ۰/۰۱۱۵ | ۰/۰۹۵ |
| نسبت اسید چرب ۱۸ کربنه به ۱۶ کربنه | ۱/۰۱۶۰۲۸۴۶۲ ^{aa} | ۱/۵۴۲۸۵۱۶۰۵ ^{ab} | ۰/۱۰۷۸ | ۰/۰۰۷۰ |
| نسبت اسید چرب اشباع ۱۸ کربنه به ۱۶ کربنه | ۰/۳۸۶۰۸۹۹۵۷ ^{ab} | ۰/۴۱۲۵۹۴۴۷۳ ^{ab} | ۰/۰۲۷۴ | ۰/۵۹ |
| نسبت اسید چرب غیر اشباع ۱۸ کربنه به ۱۶ کربنه | ۸/۱۲۸۰۵۹۶۷۶ ^{aa} | ۱۵/۸۶۹۲۵۲۲۱ ^{aa} | ۱/۲۸۵۰ | ۰/۰۰۲ |
| نسبت اسید چرب یک غیر اشباع ۱۸ کربنه به ۱۶ کربنه | ۷/۱۹۱۲۸۷۸۴۱ ^{aa} | ۱۴/۳۷۹۰۳۸۳۵ ^{aa} | ۱/۱۸۵۵ | ۰/۰۰۱۹ |

۱: نسبت باکتری موجود در حلال قطبی (اتیل استات) به باکتری موجود در حلال غیر قطبی (اکتان)
۲: استارتر: استارتر ABY1 که مخلوطی از گونه های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس LA-5، بیفیدوباکتریوم BB/2، استریتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس دلبروکئی زیر گونه بولگاریکوس می باشد.

نتیجه خاصیت آب گریزی بیشتر از خود نشان داد (نمودار ۴). از نظر جذب به حلال قطبی اتیل استات و افزایش خاصیت آبدوستی نیز باکتری‌های استارتر در محیط حاوی مخلوط اسیدهای چرب و باکتری لاکتوباسیلوس در محیط حاوی اسیدهای چرب غیر اشباع، بیشترین مقادیر را از خود نشان دادند (نمودار ۵).

بحث

در این بررسی از باکتری لاکتوباسیلوس رامنوزوس به صورت مجزا و باکتری‌های بیفیدوباکتریوم و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس تحت عنوان استارتر استفاده شد. انتخاب لاکتوباسیلوس رامنوزوس به جهت بررسی‌های بعدی در تغذیه طیور باکتری‌های استارتر به دلیل استفاده در تحقیقات بعدی و بررسی تاثیر غنی‌سازی اسید چرب در مصارف انسانی بود. بنابراین در تحقیق حاضر هدف اصلی بررسی تغییر قطبیت غشاء باکتری‌ها با افزودن اسیدهای چرب مختلف در محیط کشت بود که با جذب تعدادی از این اسیدهای چرب، خواص آبدوستی و آب‌گریزی و سایر خصوصیات تکنیکی باکتری در شرایط آزمایشگاهی (که مطابق با تغییر خاصیت اتصال به سلول‌های اپی تللیال روده است) تغییر می‌کند. با توجه به این که مهمترین

بیشتری به حلال قطبی اتیل استات و تمایل بسیار کمتری به حلال غیر قطبی اکتان نشان می‌دهد که می‌توان نتیجه‌گیری نمود که باکتری استارتر در محیط کشت مخلوط خاصیت آب دوستی قابل توجهی از خود نشان می‌دهد. این در حالی است که باکتری استارتر در محیط کشت اشباع بیشترین خاصیت آب‌گریزی را دارد (جدول ۲ و ۳).

در نمودارهای ۱ و ۲، نمونه‌ای از کروماتوگرام‌های اسیدهای چرب باکتری‌های لاکتوباسیلوس رامنوزوس و مخلوط استارتر نشان داده شده است. جذب اسیدهای چرب موجود در محیط کشت به سطح سلول باکتری در کروماتوگرام‌های زیر کاملاً مشخص می‌باشد.

همانطور که نتایج نشان می‌دهند، نسبت جذب اتیل استات به اکتان (شاخص قطبیت غشاء) در باکتری لاکتوباسیلوس در محیط ساده بیشتر از سایر محیط‌ها بوده در حالی که این نسبت برای باکتری‌های استارتر در محیط حاوی مخلوط اسیدهای چرب، مقادیر بیشتری را به خود اختصاص داده است (نمودار ۳). باکتری‌های استارتر در محیط اشباع، تمایل بیشتری به حلال اکتان نشان دادند در حالی که باکتری لاکتوباسیل در محیط حاوی اسیدهای چرب غیر اشباع، تمایل بیشتری به حلال اکتان و در

جدول ۳- میانگین شاخص قطبیت غشاء و ترکیب اسیدهای چرب در چهار نوع محیط کشت

| فراسنجه‌ها | ساده ^۲ | اشباع ^۲ | غیراشباع ^۴ | مخلوط ^۵ | SEM | P |
|---|-------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|--------|--------|
| شاخص قطبیت غشاء ^۱ | ۰/۴۴۱ | ۰/۵۹۵ | ۰/۴۴۵ | ۱/۱۸۱ | ۰/۱۱۷۶ | ۰/۰۰۰۴ |
| پالمیتیک اسید C16:۰ (mg/g bac) | ۰/۶۸۰ | ۱/۰۴۱ | ۰/۴۹۷ | ۰/۸۱۹ | ۰/۱۵۰۷ | ۰/۱۰۳۸ |
| استئاریک اسید C18:۰ (mg/g bac) | ۰/۲۷۸ | ۰/۳۰۹ | ۰/۱۹۹ | ۰/۳۱۰ | ۰/۰۳۷۷ | ۰/۱۱۴۳ |
| اولئیک اسید C18:۱ سیس (mg/g bac) | ۰/۴۱۷ | ۰/۵۳۰ | ۰/۴۰۰ | ۰/۴۷۰ | ۰/۰۸۰۶ | ۰/۶۱۳۶ |
| لینولئیک اسید C18:۲ (mg/g bac) | ۰/۰۱۹ | ۰/۰۱۵ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۱۸ | ۰/۰۰۳۴ | ۰/۵۷۴۲ |
| گاما لینولئیک اسید C18:۳ (mg/g bac) | ۰/۰۲۸ | ۰/۰۴۴ | ۰/۰۴۶ | ۰/۰۵۲ | ۰/۰۰۸۴ | ۰/۲۴۳۷ |
| آلفا لینولئیک اسید C18:۳ (mg/g bac) | ۰/۰۰۸۹ | ۰/۰۱۶۱ | ۰/۰۰۹۶ | ۰/۰۰۸۶ | ۰/۰۰۵۴ | ۰/۷۱۰۶ |
| آراشیدونیک اسید C2۰:۴ (mg/g bac) | ۰/۰۳۸ | ۰/۰۸۸ | ۰/۰۳۷ | ۰/۰۵۶ | ۰/۰۲۴۹ | ۰/۴۴۴۸ |
| نسبت اسید چرب غیر اشباع به اشباع | ۰/۶۷۳ | ۰/۷۰۹ | ۱/۱۱۴ | ۰/۷۰۸ | ۰/۱۲۴۳ | ۰/۰۶۲۸ |
| نسبت اسید چرب چند غیر اشباع به یک غیر اشباع | ۰/۱۵۸ | ۰/۱۶۵ | ۰/۱۹۱ | ۰/۱۸۸ | ۰/۰۲۳۲ | ۰/۷۳۲۹ |
| نسبت اسید چرب ۱۸ کرینه به ۱۶ کرینه | ۱/۱۰۲ | ۱/۱۳۳ | ۱/۶۷۰ | ۱/۱۶۶ | ۰/۱۷۵۱ | ۰/۱۰۷۸ |
| نسبت اسید چرب اشباع ۱۸ کرینه به ۱۶ کرینه | ۰/۳۹۷ | ۰/۳۶۶ | ۰/۴۴۴ | ۰/۳۸۷ | ۰/۰۴۸۵ | ۰/۷۲۹۵ |
| نسبت اسید چرب غیر اشباع ۱۸ کرینه به ۱۶ کرینه | ۸/۷۲۸ | ۱۲/۳۵۹ | ۱۳/۴۸۸ | ۱۳/۰۷۰ | ۲۱۷۷ | ۰/۳۵۸۵ |
| نسبت اسید چرب یک غیر اشباع ۱۸ کرینه به ۱۶ کرینه | ۷/۷۵۲ | ۱۱/۳۲۷ | ۱۱/۹۷۷ | ۱۱/۶۴۳ | ۲۰۲۲ | ۰/۴۰۲۹ |

۱: نسبت باکتری موجود در حلال قطبی (اتیل استات) به باکتری موجود در حلال غیر قطبی (اکتان)

۲: محیط کشت MRS بدون اسید چرب اضافی

۳: محیط کشت MRS + اسیدهای چرب پالمیتیک و استئاریک (از هر یک از اسیدهای چرب به میزان ۵μg/ml به محیط‌های کشت افزوده شد)

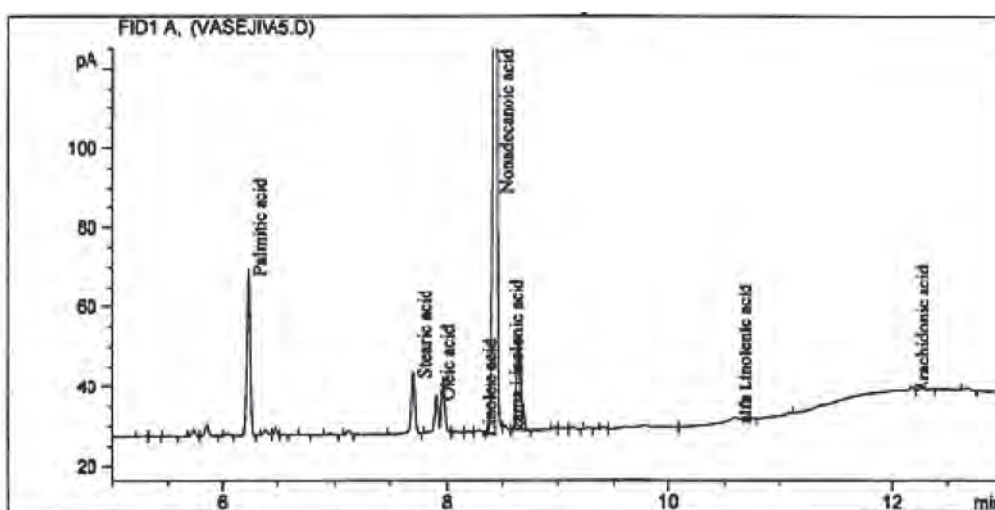
۴: محیط کشت MRS + اسیدهای چرب آراشیدونیک، اولئیک، لینولئیک، گاما لینولئیک، آلفا لینولئیک (از هر یک از اسیدهای چرب به میزان ۵μg/ml به محیط‌های کشت افزوده شد)

۵: محیط کشت MRS + اسیدهای چرب آراشیدونیک، اولئیک، لینولئیک، گاما لینولئیک، آلفا لینولئیک، پالمیتیک و استئاریک (از هر یک از اسیدهای چرب به میزان ۵μg/ml به محیط‌های کشت افزوده شد)

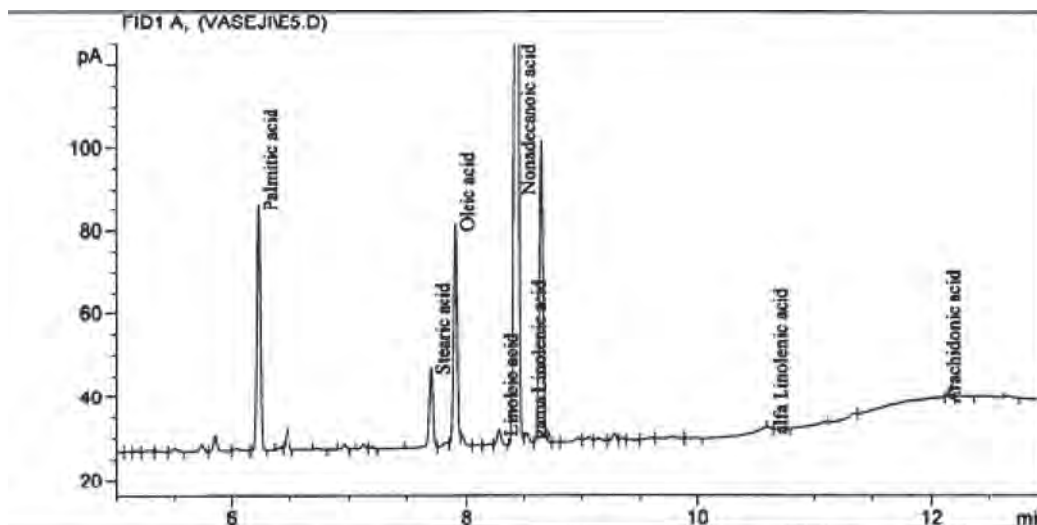
لینولنیک اسید، نیز کاهش یافت (در مقایسه با رشد در حضور اولئیک اسید). مطالعات آنها نشان داد که خواص تکنیکی پروبیوتیک می تواند توسط ترکیب غذایی محیط کشت تحت تاثیر قرار گیرد. در مطالعه ما، از خواص تکنیکی، تنها خاصیت اتصال به روده مورد بررسی قرار گرفت. ولی نتایج هماهنگی با تحقیقات ذکر شده به دست آمد. در هر صورت تغییرات فیزیکی شیمیائی در غشاء پروبیوتیک منجر به تغییر عملکردی آن ها و ایجاد شرایط سودمند تر می گردد. در تحقیقی دیگر، Ana Paula و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که افزودن مغز نیشکر، سبب افزایش محتویات اسیدهای چرب غیر اشباع پلی و مونو در پروبیوتیکهای ماست (بیفیدوباکتریوم انیمالیس زیرگونه لاکتیس، بیفیدو باکتریوم لانگوم B۱۰۵

عامل جهت مؤثر بودن پروبیوتیک ها، اتصال آن ها به غشاء روده می باشد بنابراین با انجام این تحقیق افزایش کارائی پروبیوتیک با افزودن اسید چرب مناسب محقق گردید.

در تحقیقی، مولر و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که ترکیب غشاء و مورفولوژی و خواص تکنیکی لاکتوباسیلوس جانسونی NCC533، به طور قابل توجهی توسط غنی سازی با اولئیک، لینولنیک و لینولنیک اسید، تغییر کرد (Muller J. A et al. 2011) زمانی که به محیط کشت اسیدهای چرب غیر اشباع (۱۰ $\mu\text{g/ml}$) اضافه شد، نسبت اسیدهای چرب اشباع به غیر اشباع در غشاء باکترائی تقریباً به میزان دو برابر کاهش یافت. به این ترتیب تحمل اسید و حرارت این باکتری در حضور لینولنیک و



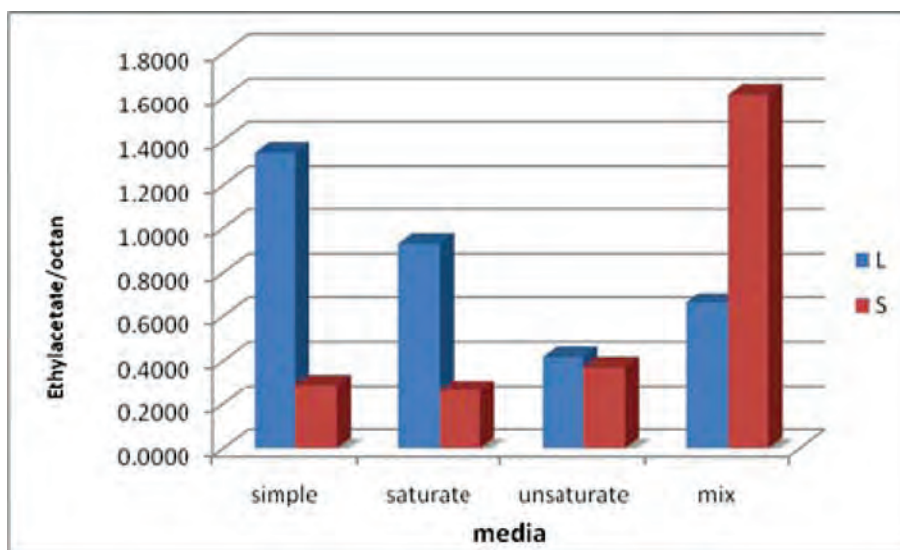
نمودار ۱- کروماتوگرام اسیدهای چرب باکتری لاکتوباسیلوس رامنوزوس



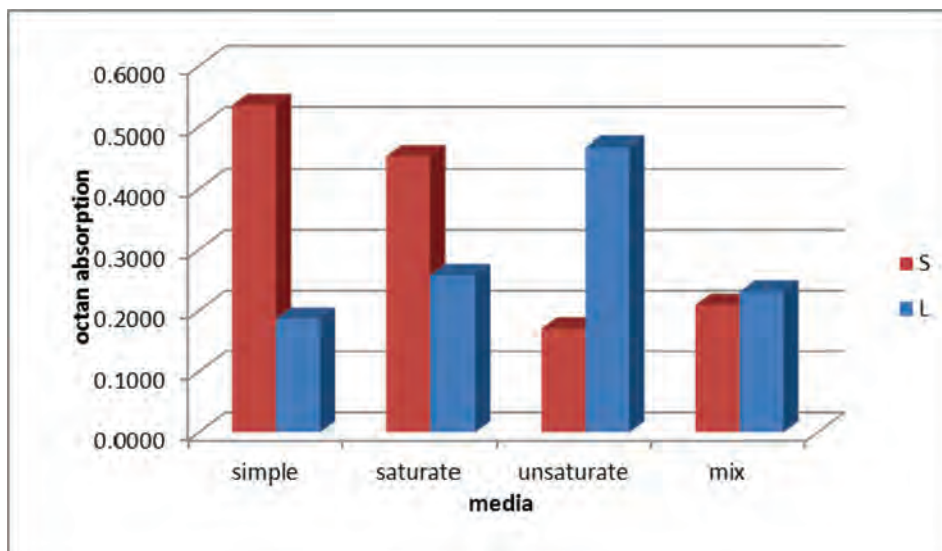
نمودار ۲- کروماتوگرام اسیدهای چرب مخلوط باکتریایی استارتر (استارتر ABY1 که مخلوطی از گونه های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس LA-5، بیفیدوباکتریوم BB/2، استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس دلبروکئی زیر گونه بولگاریکوس می باشد).

به این ترتیب نیمه عمر محصولات پروبیوتیکی را افزایش داد. Ly MH و همکاران (۲۰۰۶) و Jiménez-Flores R و همکاران (۲۰۰۸)، اتصال باکتری های پروبیوتیک به ذرات چربی شیر را گزارش کرده اند. آن ها عنوان کردند که مشخصات سطحی سلول باکتری ها تحت تاثیر اتصال غشاء به لیپیدها قرار می گیرد. به عنوان مثال هیدروفوبیسیته باکتری ها (و در نتیجه افزایش تمایل به اتصال) به میزان زیادی با اتصال به چربی ها و اسیدهای چرب شیر مرتبط می باشد (Brisson G et al.2010).
مطالعات دیگری نشان دادند که گونه های باکتریائی کشت شده می توانند به سطوح روده ای مختلف بچسبند و این اتصال به سطح روده به وسیله اسیدهای چرب آزاد مختلف تحت تاثیر قرار می گیرد.

و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس) گردید. این مطالعات نیز با تحقیق ما مطابق است. Shakirova و همکاران (۲۰۱۰) دریافتند که مقادیر هیدروفوبیسیته سطح سلول لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس LA5 و بیفیدوباکتریوم لاکتیس Bb۱۲ در پاسخ به شرایط رشدی مختلف، غلظت انواع منبع کربن و اسیدهای چرب مختلف و حضور اکسیژن، تغییر می کند. مطالعات آنها نشان داد که با کاهش کربوهیدراتها میزان هیدروفوبیسیته سطحی سلول افزایش می یابد. بنابراین میتوان با تغییر شرایط محیط خاصیت مورد نیاز را در باکتری پروبیوتیک، ایجاد نمود. Aro و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه ای نشان دادند که می توان از اسیدهای چرب جهت اینکپسولاسیون و محافظت از پروبیوتیک هائی مانند بیفیدوباکتریوم بروی استفاده کرد و



نمودار ۳- نسبت جذب اتیل استات/ اکتان توسط دو نوع باکتری لاکتوباسیل و مخلوط استارتر در محیط های کشت مختلف



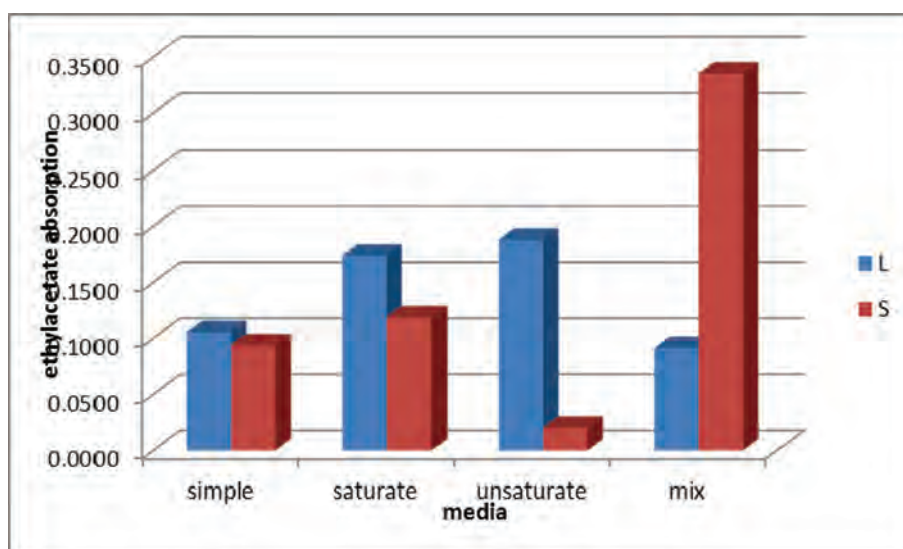
نمودار ۴- درصد جذب اکتان توسط دو نوع باکتری لاکتوباسیل و مخلوط استارتر در محیط های کشت مختلف

نسبت به آب دوست، اتصال بهتری به سلول های اپی تلیال روده ای دارند. (Wadström, T., et al. 1987) با ایجاد تغییرات جزئی در خاصیت آب گریزی نمی توان اثرات اسیدهای چرب غیر اشباع آزاد را روی اتصال باکتری به موکوس و سلول اپی تلیال نشان داد ولی می توان گفت که تغییر در ترکیب اسیدهای چرب پروبیوتیک روی فاکتورهای مرتبط با اتصال میکروبی تاثیر می گذارد و این کار با تاثیر روی سیالیت غشاء- لیپوپتید انجام می شود (Gusils, C., et al. 2002). Polak و همکاران (2014)، در مطالعه ای ترکیبات پوشش سلولی و خواص سطحی دو فنوتیپ لاکتوباسیلوس رامنوزوس (جداشده از ناحیه معدی- روده ای انسان)، توانائی این باکتری ها در اتصال به سلول های روده انسان (در شرایط *In vivo* و *In vitro*) و قابلیت تجمع با سایر باکتریها در حضور اسیدهای چرب را مورد بررسی قرار دادند. توانائی اتصال گونه های مورد بررسی در شرایط *In vitro*، روی لاین های سلولی آدنوکارسینومای انسانی، بررسی شد. نتایج این بررسی، قابلیت اتصال و تجمع بسیار بالای این باکتری های پروبیوتیک را به دلیل وجود اسیدهای چرب اختصاصی و پروتئین های سطحی، نشان داد. در تحقیق ما در شرایط *In vitro*، بررسی اتصال باکتری های مورد مطالعه در محیط های قطبی و غیر قطبی انجام شد و در نهایت از روی ایجاد خاصیت هیدروفوبیسیته، جذب باکتری به سلول های روده ای بررسی گردید. ولی در تحقیق Polak، روی سلول های لاین انسانی انجام و در نهایت نتایج مشابهی با تحقیق ما به دست آمد.

ما در این تحقیق بررسی کردیم که آیا با افزودن اسیدهای چرب مختلف خواص فیزیکی باکتری تغییر می کند؟ با مقایسه خصوصیات آب دوستی و آب گریزی گونه های باکتری استارتر و لاکتوباسیلوس، با توجه به گرایش آن ها به حلال غیرقطبی (جدول ۱)، مشخص شد که افزودن اسیدهای چرب تاثیر زیادی بر شاخص قطبیت غشاء (نسبت اتیل استات به اکتان) دارند. به این ترتیب مشاهده شد که لاکتوباسیلوس رامنوزوس در هر چهار محیط مورد آزمایش خواص غیر قطبی (در نتیجه تمایل بیشتر به اتصال

Kirjavainen, P. V., et al. 1998; Kankaanpää, P., et al. 2004; Tuomola, E. M., et al. 1998)) مرحله اتصال میکروبی تحت تاثیر نیروهای خارجی مثل نیروهای آب گریزی و استریک و نیز ساختارهای خاص مثل لیپوتکوئیک اسید، لکتین ها و پلیمرهای خارج سلولی قرار می گیرد (Gusils, C., et al. 2002).

J.L. Zhong و همکاران (2011)، تاثیر لینولئیک اسید کونژوگه موجود در محیط کشت را بر روی باکتری های مختلف از نظر اتصال به سلول های اپی تلیال روده، مورد بررسی قرار دادند. باکتری های مورد بررسی لاکتوباسیلوس پاراکازئی، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس پلانتروم بودند. لینولئیک اسید کونژوگه به محیط کشت MRS broth افزوده و نتایج مورد بررسی قرار گرفتند. گونه های مختلف باکتریائی مورد مطالعه، سطح بالای هیدروفوبیسیته و اتصال به سلول های اپی تلیال را نشان دادند. Shakirova L و همکاران (2013)، تغییر در هیدروفوبیسیته پروبیوتیک های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La5 و بیفیدوباکتریوم لاکتیس Bb12 و زنده ماننی آنها را در پاسخ به شرایط کشت مختلف و شرایط محیطی بررسی کردند. تغییرات در هیدروفوبیسیته با استفاده از روش های اسپکتروسکوپی و روش های بیوشیمیایی معمول انجام گرفت. نتایج تحقیق آنها نشان داد که ارتباط زیادی بین هیدروفوبیسیته غشاء و تغییرات در پوشش سلولی (پروتئین، لیپید و کربوهیدرات) این دو باکتری وجود داشت. علاوه بر این مشخص شد که هیدروفوبیسیته پوشش سلولی یک پارامتر مهم در اتصال سلول باکتری به اپی تلیال روده و سایر خواص باکتری دارد. در مطالعه دیگر، وقتی که باکتری ها در محیط حاوی مکمل های اسیدهای چرب غیر اشباع آزاد کشت داده شدند خاصیت آب گریزی کاهش یافت و همه گونه های باکتریائی بررسی شده در این تحقیق (لاکتوباسیلوس رامنوزوس، لاکتوباسیلوس شیروتا و لاکتوباسیلوس دلبروکئی) خاصیت پذیرندگی الکترون ضعیف داشتند که نشان دهنده طبیعت غیر اسیدی آنها بود. این محققان بر این عقیده بودند که لاکتوباسیل های آب گریز



نمودار ۵- درصد جذب اتیل استات توسط دو نوع باکتری لاکتوباسیل و مخلوط استارتر در محیط های کشت مختلف

415-422.

3- Brisson G, Payken HF, Sharpe JP, Jiménez-Flores R. Characterization of *Lactobacillus reuteri* interaction with milk fat globule membrane components in dairy products. *J Agric Food Chem* 2010;58:5612-9.

4- Bzducha-Wrobel A., Kieliszek M., Błażej S (2013). Chemical composition of the cell wall of probiotic and brewer's yeast in response to cultivation medium with glycerol as a carbon source. *Eur Food Res Technol*. DOI 10.1007/s00217-013-2016-8.

5-Chichlowski M, De Lartigue G, German JB, Raybould HE, Mills DA (2012). Bifidobacteria isolated from infants and cultured on human milk oligosaccharides affect intestinal epithelial function. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*; 55(3):321-7.

6- Di Criscio, T., A. Fratianni, R. Mignogna, L. Cinquanta, R. Coppola, E. Sorrentino, and G. Panfili (2010). Production of functional probiotic, prebiotic. *Journal of Dairy Science*.93:4555-4564.

7- Gusils, C., S. Cuozzo, F. Sesma, and S. Gonzalez. (2002). Examination of adhesive determinants in three species of *Lactobacillus* isolated from chicken. *Can. J. Microbiol*, 48, 34-42.

8- Jiménez-Flores R, Brisson G (2008). The milk fat globule membrane as an ingredient: why, how, when? *Dairy Sci Technol*;88:5-18.

9- Jiang, J., L. Björck, and R. Fonden. (1998). Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures. *J. Appl. Microbiol*, 85, 95-102.

10- Kankaanpää, P. E., S. J. Salminen, E. Isolauri, and Y. K. Lee. (2001). The influence of polyunsaturated fatty acids on probiotic growth and adhesion. *FEMS Microbiol. Lett*, 194, 149-153.

11- Kankaanpää P., Y. B., Kallio, H., Isolauri, E. and Salminen, S. (2004). Effects of polyunsaturated fatty acids in growth medium on lipid composition and on physicochemical surface properties of *Lactobacilli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 129-136.

12- Kirjavainen, P. V., A. C. Ouwehand, E. Isolauri, and S. J. Salminen. (1998). The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiol. Lett*, 167, 185-189.

13- Kimoto-Nira H., Suzuki S., Yakabe T and Suzuki C (2012). Relationships between fatty acid composition and bile tolerance in *Lactobacillus* isolates from plants and from non-plant materials. *J. Microbiol*. 58: 1396-1404.

14- Ly MH, Vo NH, Le TM, Belin JM, Waché Y (2006). Diversity of the surface properties of *Lactococci* and consequences on adhesion to food components. *Colloids Surf B Bio interfaces*;52:149-53.

15- Miyazawa K., He F., Kawase M., Kubota A., Yoda K and Hi-

با موکوس روده) را از خود نشان داد. در حالی که باکتری های استارتر در محیط مخلوط (حاوی اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع) خاصیت قطبی بالائی را نشان دادند ولی در سایر محیط ها خواص غیر قطبی داشتند (جدول ۱ و ۲) (نمودار ۳).

تمایل و کشش باکتری های استارتر به اتیل استات در محیط مخلوط، نشان دهنده گرایش کل به این حلال بازی دهنده الکترون می باشد (نمودار ۵). لاکتوباسیلوس و استارتر تقریباً به یک میزان خصوصیات اسیدی و گیرندگی الکترون را در محیط های ساده، اشباع و غیر اشباع را نشان می دهند. اما در محیط مخلوط خصوصیات اسیدی و الکترون گیرندگی استارتر کاهش می یابد در حالی که برای لاکتوباسیلوس در این محیط افزایش می یابد (نمودار ۴). با گرایش ضعیف لاکتوباسیلوس و استارتر نسبت به حلال الکترون دهنده (اتیل استات) در مقایسه با حلال غیر قطبی (اکتان)، خصوصیت الکترون گیرندگی ضعیف باکتری های مورد مطالعه را نشان می دهد. این حقیقت یعنی کشش و تمایل کمتر باکتری ها به اتیل استات نسبت به اکتان با توجه به نسبت های پائین اتیل استات به اکتان مشخص می شود.

با توجه به این که اسیدهای چرب آزاد خاصیت ضد باکتری دارند (Kankaanpää, P. E, et al.2001)، جذب اسیدهای چرب می تواند به عنوان یک مکانیسم دفع مسمومیت توسط باکتری ها تلقی شود. (Jiang, J. et al.1998) در نتیجه محیط حاوی اسید چرب در داخل روده و مشتقات التهاب زای اسیدهای چرب دوباره به وسیله میکروفلور روده متعادل می شوند. پروبیوتیک ها دارای قابلیت ضد التهابی بوده و هر یک از پروبیوتیک ها ممکن است با مکانیسم های التهاب روده را در اثر آتوپی، آلرژی غذایی و بیماری های التهابی شکمی کاهش دهد.

پاورقی ها

- 1- Functional food
- 2- Globule Leukocytes
- 3- Affinity

تشکر و قدردانی

بر خود وظیفه می دانم تا از راهنمایی ها، تلاش های صمیمانه و حمایت های ارزنده آقایان: محمد حسین شکوه زنگنه، سیروس امیری نیا، سید احمد میرهادی، محمد حسین بنابازی، سعید اسماعیل خانیان، محمد بابائی و سرکار خانم مرجان براز جانی سپاسگزاری و قدردانی نمایم.

منابع مورد استفاده

- 1-Aro H., Järvenpää E., Mäkinen J., Lauraeus M., Huopalahti R., Hietaniemi V (2013). The utilization of oat polar lipids produced by supercritical fluid technologies in the encapsulation of probiotics. *LWT - Food Science and Technology* xxx . 1-7.
- 2- Ana Paula do Espírito Santo., Roberta C. Silva., Fabiana A.S.M. Soares., Douglas Anjos, Luiz A. Gioielli., Marice N. Oliveira (2010). Açai pulp addition improves fatty acid profile and probiotic viability in yoghurt. *International Dairy Journal*. 20 :

- ramatsu M(2011). Enhancement of immunoregulatory effects of *Lactobacillus gasser* TMC0356 by heat treatment and culture medium. *Applied Microbiology* 53, 210–216.
- 16- Muller J. A ., Ross R. P., Sybesma W. F. H., Fitzgerald G. F and Stanton C(2011). Modification of the Technical Properties of *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 by Supplementing the Growth Medium with Unsaturated Fatty Acids. *Appl. Environ. Microbiol.* vol. 77 no. 19 6889-6898.
- 17- Ouwehand, A., P. Kirjavainen, C. Shortt, and S. Salminen. (1999). Probiotics: mechanisms and established effects. *Int. Dairy, J*, 9, 43-52.
- 18- Polak-Berecka M., Waško A., Paduch R., Skrzypek T., Sroka-Bartnicka A(2014). The effect of cell surface components on adhesion ability of *Lactobacillus rhamnosus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 106(4):751-62
- 19- Qinglong Wu and Nagendra P. Shah. (2014). Bacterial Growth and Cell Surface Hydrophobicity of Lactobacilli. *Journal of Food Science*. Volume 79, Issue 12, pages M2485–M2490
- 20- Remagni M C ., Paladino M ., Locci F ., Flora V. Romeo ., Zago M ., Povolò M., Contarini G ., Carminati D (2013). Cholesterol removal capability of lactic acid bacteria and related cell membrane fatty acid modifications. *Folia Microbiol* .58:443–449.
- 21- Salminen S., A. v. W., L. Morelli, P. Marteau, D. Brassart, W. M. de Vos, R. Fonden, K. Collins, G. Mogensen, S.- E. Birkeland and T. Mattila Sandholm. (1998). Demonstration of safety of probiotics-a review. *Int. J. Food Prot*, 44, 93-106.
- 22- Shakeri, M. (1382). The use sweet butter water in the production of probiotic yogurt (Master Thesis), Ferdowsi University of Mashhad.
- 23- Sahadeva, R.P.K., Leong, S.F., Chua, K. H., Tan, C.H., Chan, H.Y., Tong, E.V., Wong, S.Y.W. and *Chan, H.K. (2011). Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. *International Food Research Journal* 18(4): 1515-1522 (2011).
- 24- Sanchez, B., C. G. De Los Reyes-Gavilan, A. Margolles, and M. Gueimonde. 2009. Probiotic fermented milks: Present and future. *Int.J. Dairy Technol.* 62:472–483.
- 25- Sengupta R., Altermann E., Anderson R., McNabb W., Moughan P and Roy N(2013). The Role of Cell Surface Architecture of Lactobacilli in Host-Microbe Interactions in the Gastrointestinal Tract. *Mediators of Inflammation*. Volume 2013 , Article ID 237921, 16 pages.
- 26- Shakirova L., Auzina L., Zikmanis P., Gavare M., Grube I M (2010). Influence of growth conditions on hydrophobicity of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* cells and characteristics by FT-IR spectra. *Journal of Spectroscopy*. 24 : 3-4, 251-255
- 27- Shakirova L., Grube M., Gavare M., Auzina L., Zikmanis P (2013). *Lactobacillus acidophilus* La5 and *Bifidobacterium lactis* Bb12 cell surface hydrophobicity and survival of the cells under adverse environmental conditions. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 40:85–93.
- 28- Šuškuvić J., Blaženka Kos., Jasna Beganović., Andreja Leboš Pavunc., Ksenija Habjani and Srećko Matošić (2010). Antimicrobial Activity – The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technol. Biotechnol.* 48 (3) 296–307.
- 29- Tuomola, E. M., and S. J. Salminen. (1998). Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *Int. J. Food Microbiol*, 41, 45-51.
- 30- Vasiljević, T. and Shah, N.P. (2008). Probiotics-From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal* 18: 714-728.
- 31- Wadström, T., K. Andersson, M. Sydow, L. Axelsson, S. Lindgren, and B. Gullmar. (1987). Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. *J. Appl. Bacteriol*, 62, 513-520.
- 32- Zhong J L., Li J.Y., Zhang L., Guo C., Yi H., Zhang Y., Li Q (2011). Probiotic Characteristics of Conjugated Linoleic Acid Producing Bacteria. *Advanced Materials Research*. 345:153-147.

