نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۰۸ پاییز ۱۳۹۴
DOI:10.22034/vj.2015.101856

تغییر قطبیت غشاء باکتری های پروبیوتیک در شرایط آزمایشگاهی

• **نرگس واسجی (نویسنده مسئول)**
عضو هیئت علمی بخش پژوهش های بیوتکنولوژی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور
• **ناهید مژگانی**
عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی
• **ابوالحسن صادقی پناه**
عضو هیئت علمی بخش مدیریت پرورش دام و طیور-موسسه تحقیقات علوم دامی کشور
تاریخ دریافت: آذرماه ۹۳ تاریخ پذیرش: فروردین ۹۴
Emali: n_vaseji@asri.ir

چکیده

اغلب لاکتوباسیل های پروبیوتیک به سطوح روده می چسبند که این پدیده تحت تأثیر اسیدهای چرب قرار می گیرد . این پروژه جهت افزایش خاصیت آب گریزی سطح سلول باکتری ها و بهبود عملکرد آن ها طراحی گردید و به این منظور، محیط های کشت MRS براوث 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 آن ها و یک محیط کنترل بدون اسید چرب، جهت رشد دو نوع باکتری لاکتوباسیلوس رامنوزوس و یک استارتر تجاری مورد استفاده قرار گرفتند. چربی سلولی باکتری ها استخراج، صابونی و متیله شده و میزان اسیدهای چرب آنها با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی اندازه گیری شدند. تغییرات خاصیت آب گریزی و آب دوستی غشاء باکتری های کشت شده با استفاده از حلال های 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 می گردد و نتایج شاخص قطبیت غشاء نشان داد که محیط های حاوی مخلوط اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع بخصوص در مورد استارتر از قطبیت بیشتری برخوردار بوده و کشش بیشتری به حلال قطبی دارند و کشت استارتر در محیط اسیدهای چرب غیر اشباع باعث افزایش معنی دارنسبت 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

Emali: 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 un-saturated 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

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 وصنایع غذایی در پی طراحی و تولید محصولاتی می باشند که علاوه بر خصوصیات حسی وظاهری مطلوب، دارای خواص سلامتی بخش و تغذیه ای خاص نیز باشند.

رژیم غذایی نقش مهمی درسلامت 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 معمولا در محصولات لبنی مثل ماست و شیرهای تخمیری ویا 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 (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 (Šuškuvic J et al. 2010). از خواص این میکروارگانیسم‌ها می‌توان به مقاومت در برابر اسید و صفرا 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 کنندکه این موانع شامل آنزیم های گوارشی، اسید در معده و صفرا 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 سلول‌های ایمنی (Miyazawa K et al. 2011)، مهار پاتوژن‌ها، ایجاد تعادل میکروبی در ناحیه معدی - روده‌ای، افزایش سطح عمل سلول‌های اپی‌تلیال

(Sengupta R et al.2013) می‌باشد. 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 می‌باشد. (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 می‌دهند. 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، مرحله‌ای کلیدی در این عملکرد می‌باشد (Ouwehand, A. et al 1999) بنابراین توانائی 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 آب گریزی سطح سلول باکتریائی 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 فیزیکوشیمیائی لاکتو باسیل 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 خواص جذب اسیدهای چرب به غشاء پروبیوتیک ها علاوه بر ایجاد تغییرات فیزیکوشیمیایی در غشاء، حذف اسیدهای چرب مضر از محیط می باشد. در مطالعه ای، اثرات استفاده از الائیدیک اسید روی رشد و هیدروفوبیسیته سطحی لاکتوباسیلوس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که الائیدیک اسید می تواند خواص سطحی فیزیکوشیمیائی لاکتوباسیل را تغییر داده و از طرفی با جذب این اسید چرب سبب کاهش جذب آن در بدن می‌گردد (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 - استارتر ABY۱ (محصول شرکت CHR-Hansen): این کشت مخلوطی از گونه های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس LA-۵، بیفید و باکتریوم BB/۲، استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس دلبروکئی زیر گونه بولگاریکوس می‌باشند و به شکل بسته بندی‌های 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 می‌باشد و در ۵ + درجه سانتی گراد نیمه عمر آنها حداقل ۶ هفته می‌باشد.

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

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 وسپس محیط ها 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 (غیراشباع، 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 لاکتو باسیلوس و استارتر جداگانه در هریک 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٪ CO_2 به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. بعد از گذشت مدت زمان گرمخانه‌گذاری، سلول های باکتریائی با دور ۱۵۰۰× g به مدت ۷ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ و جمع‌آوری شده و سپس دو بار با بافرفسفات نمکی با pH برابر ۷/۴ شستشو داده شدند (جهت حذف بقایای محیط کشت). لوله های حاوی باکتری کشت شده درپوش‌گذاری شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

مراحل آماده سازی نمونه ها جهت آنالیز با دستگاه کروماتوگرافی گازی

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). درلوله 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 نمک‌های 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 ۶۸۹۰N HP Agilent امریکا) دارای دتکتور 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 مترو film thickness ۰µm/۲۵ 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 ۱میکرولیتر 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 PSI ۱۳ برای ۱۰ دقیقه بود پس از آن به مدت ۵ دقیقه تا PSI ۲۰ افزایش یافت.Run time ۱۵ دقیقه بود.

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 غیرقطبی (اکتان) جهت تخمین خصوصیات آب گریزی باکتری‌ها 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 براوث ساده و براوث 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 ۰/۰۱ ±۰/۲۵،کدورت مخلوط میکروبی در ۴۰۰ نانومتر اندازه گیری شد(نمونه A۰). 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:

$$\text{درصد فینیتی} = 100 \times [1 - (\frac{A}{A0})]$$

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 GLM 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 استارتر) متفاوت بود (جدول ۲). در کل میزان اولئیک اسید باکتری‌های استارتر در ۴ محیط مورد بررسی تفاوت معنی‌داری نداشت. اما این روند برای باکتری لاکتوباسیلوس متفاوت است. نوع باکتری بر روی میزان لینولئیک اسید مؤثر می‌باشد (P=۰/۰۰۴۶). با مقایسه میزان لینولئیک اسید این دو گونه باکتری، مشاهده شد که تنها در محیط‌های کشت ساده و اشباع اختلاف معنی‌دار وجود دارد و میانگین لینولئیک اسید

غشـاء اسـتارتر در محیط کشت ساده و غنی شـده با اسیدهای چرب غیر اشباع بیش از لاکتوباسیلوس بود.

از طرفی اختلاف بین دو باکتری در محیط های ساده (کنترل) و حاوی اسـیدهای چرب اشباع و غیر اشـباع و مخلوط از نظر جذب گاما لینولئیک اسـید معنی‌دار نمی‌باشـد. به همین ترتیب در مورد جـذب آلفا لینولئیک اسید توسط باکتری‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود. میانگین جذب آراشیدونیک اسـید برای هیچیک از باکتری‌ها و در هیچیک از محیط‌های کشـت معنی‌دار نبود. در مورد باکتری‌های استارتر تفاوت قابل ملاحظه‌ای در جذب پالمیتیک اسـید در محیط‌های مختلف مشاهده نشد ولی در کل اختلاف بین هر دو نوع باکتری در محیط های مختلف از نظر جذب اسـید چرب پالمیتیک معنی‌دار نمی‌باشد.

همچنین تأثیرمحیط‌های کشت مختلف بر روی میزان استئاریک اسید

جدول۱- اثر افزودن اسیدهای چرب به محیط کشت بر شاخص قطبیت غشاء و ترکیب اسیدهای چرب در دو باکتری لاکتوباسیلوس و استارتر

فراسنجه‌ها	لاکتوباسیلوس راسنوزوس				استارتر[۷]				SEM	P نوع باکتری	P نوع محیط کشت	P نوع باکتری * نوع محیط کشت
	کنترل[۱]	اشباع[۲]	غیراشباع[۳]	مخلوط[۴]	کنترل[۱]	اشباع[۲]	غیراشباع[۳]	مخلوط[۴]				
شاخص قطبیت غشاء[۵]	۰/۴۴۴	۰/۹۲۹	۰/۴۱۶	۰/۷۴۹	۰/۴۳۸	۰/۲۶۱	۰/۴۷۳	۱/۶۱۳	۰/۰۸۹۸	۰/۶۱	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۱۴
پالمیتیک اسید C۱۶:۰ (mg/g bac[۶])	۰/۶۰۰	۱/۰۶۱	۰/۴۸۵	۰/۸۴۳	۰/۷۶۰	۱/۰۲۰	۰/۵۰۹	۰/۷۸۶	۰/۰۷۶۹	۰/۹۰	۰/۱۰۳	۰/۹۶
استئاریک اسید C۱۸:۰ (mg/g bac[۶])	۰/۲۴۷	۰/۳۰۶	۰/۲۴۱	۰/۱۹۹	۰/۳۰۹	۰/۳۱۳	۰/۱۵۶	۰/۴۵۷	۰/۰۲۲۳	۰/۲۰	۰/۱۵	۰/۰۳۶
اولئیک اسید C۱۸:۱ سیس (mg/g bac[۶])	۰/۱۶۱	۰/۴۷۲	۰/۱۶۹	۰/۲۷۴	۰/۶۷۴	۰/۵۸۸	۰/۶۳۱	۰/۷۳۳	۰/۰۵۳۱	۰/۰۰۰۱	۰/۶۳	۰/۳۱
لینولئیک اسید C۱۸:۲ (mg/g bac[۶])	۰/۰۰۶	۰/۰۱۸	۰/۰۰۵	۰/۰۱۴	۰/۰۳۱	۰/۰۱۲	۰/۰۲۰	۰/۰۲۳	۰/۰۰۲۱	۰/۰۰۴۶	۰/۵۷	۰/۰۲۷۰
گاما لینولنیک اسید C۱۸:۳ (mg/g bac[۶])	۰/۰۲۵	۰/۰۵۰	۰/۰۳۰	۰/۰۵۱	۰۳۲	۰/۰۳۶	۰/۰۶۳	۰/۰۵۵	۰/۰۰۴۴	۰/۴۱	۰/۲۴	۰/۲۷
آلفا لینولنیک اسید C۱۸:۳ (mg/g bac[۶])	۰/۰۰۸	۰/۰۲۵	۰/۰۰۸	۰/۰۱۳	۰/۰۰۹	۰/۰۰۷	۰/۰۱۱	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲۷	۰/۲۸	۰/۷۲	۰/۴۸
آراشیدونیک اسید C۲۰:۴ (mg/g bac[۶])	۰/۰۲۷	۰/۱۱۱	۰/۰۳۱	۰/۰۶۶	۰/۰۴۹	۰/۰۶۵	۰/۰۴۲	۰/۰۴۳	۰/۰۱۲۰	۰/۷۴	۰/۴۴	۰/۷۶
نسبت اسید چرب غیراشباع به اشباع	۰/۵۲۶	۰/۷۵۱	۰/۵۸۹	۰/۷۰۲	۰/۸۲۰	۰/۶۶۸	۱/۶۳۸	۰/۷۱۶	۰/۰۸۳۱	۰/۰۱۴	۰/۰۶۷	۰/۰۱۷
نسبت اسید چرب چندغیراشباع به یک‌غیراشباع	۰/۱۶۲	۰/۱۹۸	۰/۲۰۷	۰/۲۱۳	۰/۱۵۴	۰/۱۳۲	۰/۱۷۵	۰/۱۵۵	۰/۰۱۱۵	۰/۰۹۵	۰/۷۲	۰/۸۲
نسبت اسید چرب ۱۸ کربنه به ۱۶ کربنه	۰/۹۰۳	۱/۱۶۱	۱/۱۳۸	۰/۸۶۲	۱/۳۰۰	۱/۱۰۶	۲/۲۰۱	۱/۵۷۱	۰/۱۰۷۸	۰/۰۰۷۰	۰/۱۰۸	۰/۱۷
نسبت اسید چرب اشباع ۱۸ کربنه به ۱۶ کربنه	۰/۴۰۳	۰/۳۷۶	۰/۵۲۰	۰/۳۴۵	۰/۳۹۱	۰/۳۵۶	۰/۳۶۷	۰/۵۷۸	۰/۰۲۷۴	۰/۵۹	۰/۷۲	۰/۰۱۸
نسبت اسید چرب غیراشباع ۱۸ کربنه به ۱۶ کربنه	۶/۰۵۶	۱۰/۲۱۳	۷/۹۵۷	۸/۲۸۶	۱۱/۴۰۰	۱۴/۵۰۵	۱۹/۰۱۸	۱۹/۴۴۸	۱/۲۸۵۰	۰/۰۰۲	۰/۳۸	۰/۵۷
نسبت اسید چرب یک‌غیراشباع ۱۸ کربنه به ۱۶ کربنه	۵/۳۸۳	۹/۱۷۶	۶/۹۶۶	۷/۲۳۹	۱۰/۳۲۰	۱۳/۴۷۸	۱۶/۹۸۸	۱۷/۵۱۴	۱/۱۸۵۵	۰/۰۰۱۹	۰/۴۲	۰/۶۲

۱: محیط کشت MRS بدون اسیدچرب اضافی

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

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

۴: محیط کشت MRS + اسیدهای چرب آراشیدونیک ، اولئیک ، لینولئیک ، گاما لینولنیک ، آلفا لینولنیک ، پالمیتیک و استئاریک (از هر یک از اسیدهای چرب به میزان ۵μg/ml به محیط های 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 دلبروکئی زیر گونه بولگاریکوس می باشد.

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 تقریبا یکسان بود) ولی جذب این اسیدهای چرب به باکتری‌های استارتر چندان قابل توجه نبوده است. از طرف دیگر استئاریک اسید در محیط‌های 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، محسوس‌تر می‌باشد (جدول ۱).

به طورکلی اسیدهای چرب استئاریک (برای باکتری‌های استارتر در محیط های غیر اشباع و مخلوط) و اولئیک (برای باکتری لاکتوباسیلوس در محیط اشباع) ($p < ۰/۰۵$) و لینولئیک اسید (برای هر دو باکتری مورد مطالعه در محیط های اشباع و ساده) جذب زیادی را نشان دادند ($p < ۰/۱$) ولی در مورد پالمیتیک، گاما لینولنیک، آلفا لینولنیک و آراشیدونیک اسید، جذب زیادی به باکتری‌ها 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 می‌یابد به طوری که باکتری استارتر در محیط کشت مخلوط، تمایل

جدول۲- میانگین شاخص قطبیت غشاء و ترکیب اسیدهای چرب در دو باکتری لاکتوباسیلوس و استارتر

فراسنجه‌ها	لاکتوباسیلوس رامنوزوس	استارتر[۲]	SEM	P نوع باکتری
شاخص قطبیت غشاء[۱]	۰/۶۳۴۶۲۵ aa	۰/۶۹۶۱۲۵ ab	۰/۰۸۹۸	۰/۶۱
پالمیتیک اسید C۱۶:۰ (mg/g bac[۶])	۰/۷۴۷۲۴۴۶ ef	۰/۷۶۷۶۲۱۴ aa	۰/۰۷۶۹	۰/۹۰
استئاریک اسید C۱۸:۰ (mg/g bac[۶])	۰/۲۴۸۳۸۷ aa	۰/۲۹۸۸۹۱۲ ab	۰/۰۳۲۳	۰/۲۰
اولئیک اسید C۱۸:۱ سیس (mg/g bac[۶])	۰/۲۶۸۸۵۶۴ ab	۰/۶۵۱۲۴۰۳ aa	۰/۰۵۳۱	۰/۰۰۰۱
لینولئیک اسید C۱۸:۲ (mg/g bac[۶])	۰/ ۰۱۰۹۰۹۳ ef	۰/ ۰۲۱۵۲۵ ef	۰/۰۰۲۱	۰/۰۰۴۶
گاما لینولنیک اسید C۱۸:۳ (mg/g bac[۶])	۰/۰۳۸۸۵۶۲۳۳ aa	۰/۰۴۵۸۹۵۹۷۹ aa	۰/۰۰۴۴	۰/۴۱
آلفا لینولنیک اسید C۱۸:۳ (mg/g bac[۶])	۰/۰۱۳۶۵۹۸ aa	۰/۰۰۷۷۹۸۸ aa	۰/۰۰۲۷	۰/۲۸
آراشیدونیک اسید C۲۰:۴ (mg/g bac[۶])	۰/۰۵۸۸۱۹۹ aa	۰/۰۵۰۳۲۵۱ aa	۰/۰۱۲۰	۰/۷۴
نسبت اسید چرب غیراشباع به اشباع	۰/۶۴۱۹۳۹۶۱۸ aa	۰/۹۷۶۷۰۸۶۱ ab	۰/۰۸۲۱	۰/۰۱۴
نسبت اسید چرب چندغیراشباع به یک‌غیراشباع	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 غیراشباع ۱۸ کربنه به ۱۶ کربنه	۸/۱۲۸۰۵۹۶۷۶ aa	۱۵/۸۶۹۲۵۲۲۱ aa	۱/۲۸۵۰	۰/۰۰۲
نسبت اسید چرب یک‌غیراشباع 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 غیرقطبی (اکتان)

۲: استارتر: استارتر ABY1 که مخلوطی از گونه های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس LA-5، بیفیدوباکتریوم BB/2، استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس دلبروکئی زیر گونه بولگاریکوس می‌باشد.

بیشـــتری به حلال قطبی اتیل اســـتات و تمایل بسیار کمتری به حلال غیر قطبی اکتان نشان می‌دهد که می‌توان نتیجه‌گیری نمود که باکتری استارتر در محیط کشـــت مخلوط خاصیت آب دوســـتی قابل توجهی از خود نشان می‌دهد. این در حالی اســـت که باکتری اســـتارتر در محیط کشـــت اشباع بیشترین خاصیت آب‌گریزی را دارد (جداول ۲ و ۳).

در نمودارهـــای ۱ و ۲، نمونـــه‌ای از کروماتوگرام‌های اســـیدهای چرب باکتری های لاکتوباســـیلوس رامنوزوس و مخلوط اســـتارتر نشان داده شده است. جذب اسیدهای چرب موجود در محیط کشت به سطح سلول باکتری در کروماتوگرام های زیر کاملا مشخص می‌باشد.

همانطور که نتایج نشـــان می دهند، نسبت جذب اتیل استات به اکتان (شاخص قطبیت غشاء) در باکتری لاکتوباسیلوس در محیط ساده بیشتر از ســـایر محیط ها بوده در حالی که این نســـبت برای باکتری های استارتر در محیط حاوی مخلوط اســـیدهای چرب، مقادیر بیشتری را به خود اختصاص داده است(نمودار ۳). باکتری های استارتر در محیط اشباع، تمایل بیشتری به حلال اکتان نشـــان دادنـــد در حالی که باکتری لاکتوباســـیل در محیط حاوی اســـیدهای چرب غیر اشـــباع، تمایل بیشـــتری به حلال اکتان و در نتیجه خاصیت آب گریزی بیشتر از خود نشان داد (نمودار۴). از نظر جذب به حلال قطبی اتیل اســـتات و افزایش خاصیت آبدوســـتی نیز باکتری‌های اســـتارتر در محیط حاوی مخلوط اسیدهای چرب و باکتری لاکتوباسیلوس در محیط حاوی اســـیدهای چرب غیر اشـــباع، بیشـــترین مقادیر را از خود نشان دادند (نمودار ۵).

بحث

در این بررســـی از باکتری لاکتوباســـیلوس رامنـــوزوس به صورت مجزا و باکتری‌های بیفیدوباکتریوم ولاکتوباســـیلوس اســـیدوفیلوس تحت عنوان استارتر استفاده شد. انتخاب لاکتوباسیلوس رامنوزوس به جهت بررسی‌های بعدی در تغذیه طیورو باکتری های اســـتارتر 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 اســـیدهای چرب مختلف در محیط کشـــت بود که با جذب تعدادی از این اســـیدهای چرب، خواص آبدوستی و آب‌گریزی و سایر خصوصیات تکنیکی باکتری در شـــرایط آزمایشـــگاهی (کـــه مطابق با تغییرخاصیـــت اتصال به سلول‌های اپی تلیال روده است) تغییر می‌کرد. با توجه به این که مهمترین

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

فراسنجه‌ها	ساده[۲]	اشباع[۳]	غیراشباع[۴]	مخلوط[۵]	SEM	P
شاخص قطبیت غشاء[۱]	۰/۴۴۱	۰/۵۹۵	۰/۴۴۵	۱/۱۸۱	۰/۱۱۷۶	۰/۰۰۰۴
پالمیتیک اسید C۱۶:۰ (mg/g bac[۶])	۰/۶۸۰	۱/۰۴۱	۰/۴۹۷	۰/۸۱۹	۰/۱۵۰۷	۰/۱۰۳۸
استئاریک اسید C۱۸:۰ (mg/g bac[۶])	۰/۲۷۸	۰/۳۰۹	۰/۱۹۹	۰/۳۱۰	۰/۰۳۷۷	۰/۱۱۴۳
اولئیک اسید C۱۸:۱ سیس (mg/g bac[۶])	۰/۴۱۷	۰/۵۳۰	۰/۴۰۰	۰/۴۷۰	۰/۰۸۰۶	۰/۶۱۳۶
لینولئیک اسید C۱۸:۲ (mg/g bac[۶])	۰/۰۱۹	۰/۰۱۵	۰/۰۱۳	۰/۰۱۸	۰/۰۰۳۴	۰/۵۷۴۲
گاما لینولنیک اسید C۱۸:۳ (mg/g bac[۶])	۰/۰۲۸	۰/۰۴۴	۰/۰۴۶	۰/۰۵۲	۰/۰۰۸۴	۰/۲۴۳۷
آلفا لینولنیک اسید C۱۸:۳ (mg/g bac[۶])	۰/۰۰۸۹	۰/۰۱۶۱	۰/۰۰۹۶	۰/۰۰۸۶	۰/۰۰۵۴	۰/۷۱۰۶
آراشیدونیک اسید C۲۰:۴ (mg/g bac[۶])	۰/۰۳۸	۰/۰۸۸	۰/۰۳۷	۰/۰۵۶	۰/۰۲۴۹	۰/۴۴۴۸
نسبت اسید چرب غیراشباع به اشباع	۰/۶۷۳	۰/۷۰۹	۱/۱۱۴	۰/۷۰۸	۰/۱۲۴۳	۰/۰۶۲۸
نسبت اسید چرب چندغیراشباع به یک‌غیراشباع	۰/۱۵۸	۰/۱۶۵	۰/۱۹۱	۰/۱۸۸	۰/۰۲۳۲	۰/۷۳۲۹
نسبت اسید چرب ۱۸ کربنه به ۱۶ کربنه	۱/۱۰۲	۱/۱۳۳	۱/۶۷۰	۱/۱۶۶	۰/۱۷۵۱	۰/۱۰۷۸
نسبت اسید چرب اشباع ۱۸ کربنه به ۱۶ کربنه	۰/۳۹۷	۰/۳۶۶	۰/۴۴۴	۰/۳۸۷	۰/۰۴۸۵	۰/۷۲۹۵
نسبت اسید چرب غیراشباع ۱۸ کربنه به ۱۶ کربنه	۸/۷۲۸	۱۲/۳۵۹	۱۳/۴۸۸	۱۳/۰۷۰	۲۱۷۷	۰/۳۵۸۵
نسبت اسید چرب یک‌غیراشباع ۱۸ کربنه به ۱۶ کربنه	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 غیرقطبی (اکتان)

۲: محیط کشت MRS بدون اسیدچرب اضافی

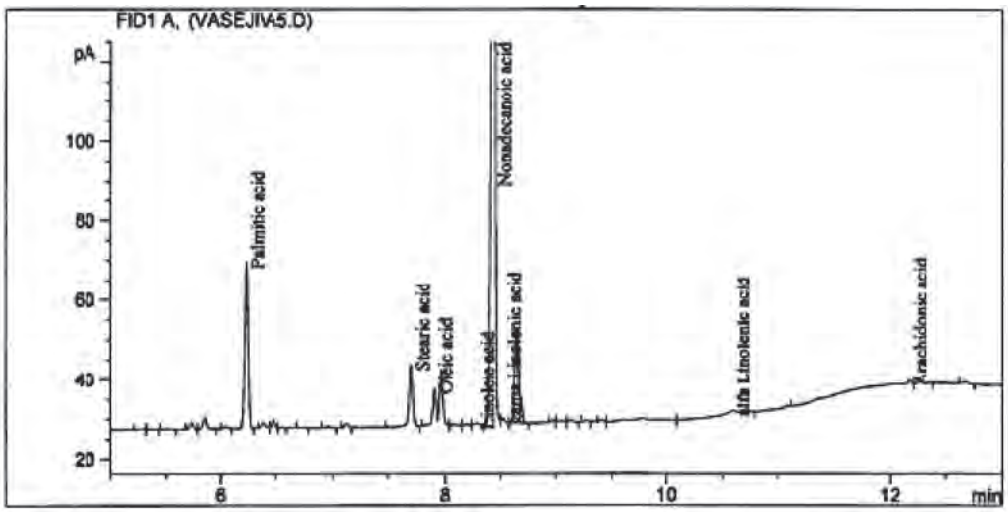
۳: محیط کشت MRS + اسیدهای چرب پالمیتیک و استئاریک (از هر یک از اسیدهای چرب به میزان ۵μg/ml به محیط های کشت افزوده شد)

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

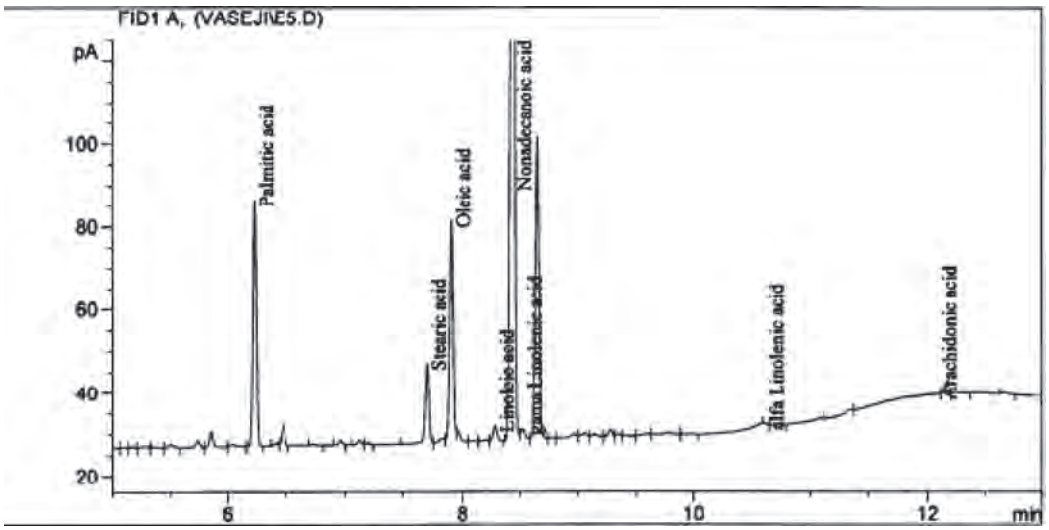
۵: محیط کشت MRS + اسیدهای چرب آراشیدونیک ، اولئیک ، لینولئیک ، گاما لینولنیک ، آلفا لینولنیک ، پالمیتیک و استئاریک (از هر یک از اسیدهای چرب به میزان ۵μg/ml به محیط های کشت افزوده شد)

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

در تحقیقی، مولر و همکاران (۲۰۱۱) نشـان دادند که ترکیب غشـاء و مورفولوژی و خواص تکنیکی لاکتوباسـیلوس جانسـونیNCC533، به طور قابل توجهی توسـط غنی سـازی با اولئیک، لینولئیک و لینولنیک اسـید، تغییر کرد (Muller J. A et al. 2011) زمانی که به محیط کشت اسیدهای چرب غیر اشـباع (۱۰ µg/ml) اضافه شـد، نسبت اسـیدهای چرب اشباع به غیر اشـباع در غشـاء باکتریائـی تقریبا به میـزان دو برابر کاهش یافت. بـه این ترتیب تحمل اسـید و حرارت این باکتری در حضـور لینولئیک و لینولنیک اسـید، نیز کاهش یافت(در مقایسـه با رشـد در حضور اولئیک اسـید). مطالعات آنها نشـان داد که خواص تکنیکـی پروبیوتیک می تواند توسـط ترکیب غذایی محیط کشـت تحت تاثیر قرار گیـرد. در مطالعه ما، از خـواص تکنیکی، تنها خاصیت اتصال به روده مورد بررسـی قرار گرفت، ولی نتایج هماهنگی با تحقیقات ذکر شـده به دسـت آمـد. در هر صورت تغییرات فیزیکو شیمیائی در غشاء پروبیوتیک منجر به تغییر عملکردی آن ها و ایجاد شـرایط سودمند تر می گردد. در تحقیقی دیگر، Ana Paula و همـکاران(۲۰۱۰) نشـان دادند که افزودن مغز نیشـکر، سـبب افزایش محتویات اسـیدهای چرب غیر اشـباع پلی و مونو در پروبیوتیکهای ماست (بیفیدوباکتریوم انیمالیس زیرگونه لاکتیس، بیفیدو باکتریوم لانگوم B۱۰۵



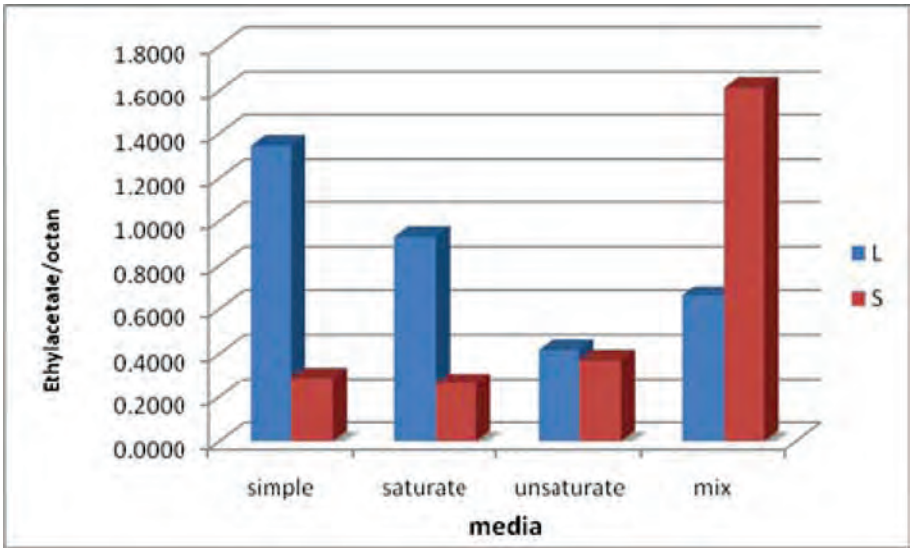
نمودار ۱- کروماتوگرام اسیدهای چرب باکتری لاکتوباسیلوس رامنوزوس



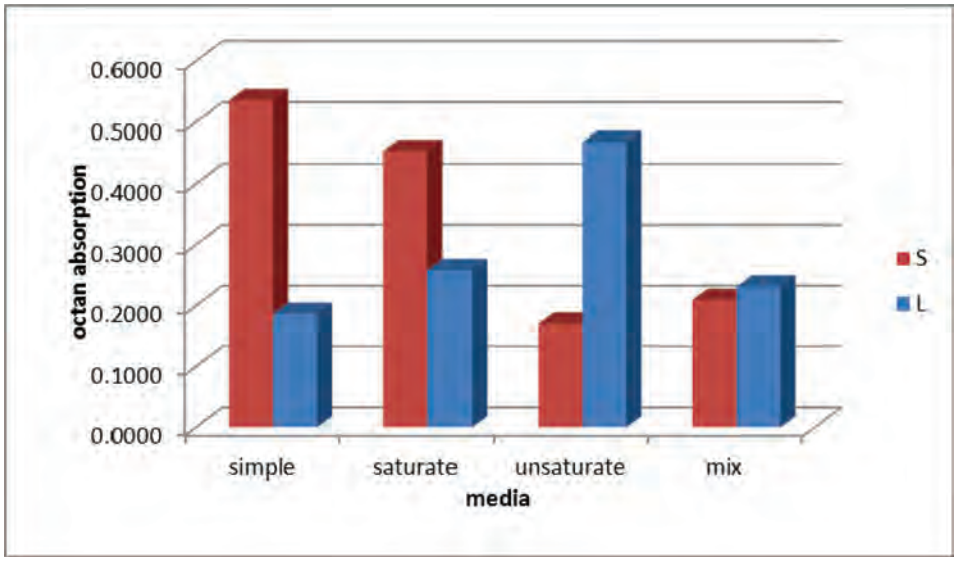
نمودار ۲- کروماتوگرام اسیدهای چرب مخلوط باکتریایی استارتر (استارتر ABY1 که مخلوطی از گونه‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس LA-5، بیفیدوباکتریوم BB/2، استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس دلبروکئی زیر گونه بولگاریکوس می‌باشد).

و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس) گردید. این مطالعات نیز با تحقیق ما مطابق است. Shakirova و همکاران(۲۰۱۰) دریافتند که مقادیر هیدروفوبیسیته سطح سلول لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس LA۵ 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 پروبیوتیک‌هائی مانند بیفیدوباکتریوم بروی استفاده کرد و 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.



نمودار۳- نسبت جذب اتیل استات/ اکتان توسط دو نوع باکتری لاکتوباسیل و مخلوط استارتر در محیط های کشت مختلف

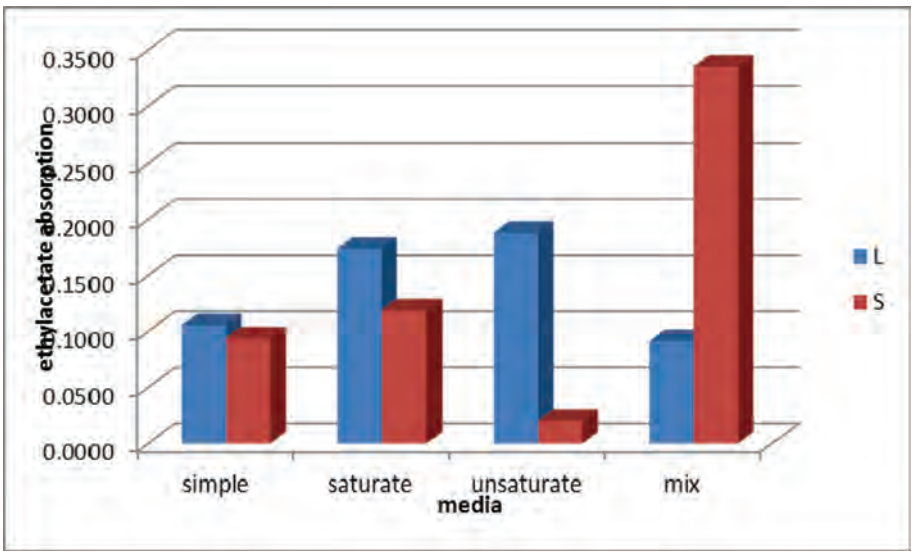


نمودار۴- درصد جذب اکتان توسط دو نوع باکتری لاکتوباسیل و مخلوط استارتر در محیط های کشت مختلف

Kirjavainen, P. V.,et al .1998; Kankaanpää, P,et al.2004; Tuo-mola, E. M.,et al.1998)) مرحلـه اتصـال میکروبی تحـت تاثیر نیروهای خارجـی مثل نیروهـای آب گریزی و اسـتریک و نیز سـاختارهای خاص مثل لیپوتکوئیک اسـید، لکتین ها و پلیمرهای خارج سـلولی قرار می‌گیرد (Gusils, C., et al. 2002).

J.L. Zhong و همکاران (۲۰۱۱)، تاثیر لینولئیک اسید کونژوگه موجود در محیط کشـت را بـر روی باکتری های مختلف از نظر اتصال به سـلول های اپی تلیال روده، مورد بررسـی قرار دادند. باکتری های مورد بررسـی لاکتوباسـیلوس پاراکازئی، لاکتوباسیلوس اسـیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم 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 همـکاران (۲۰۱۳)، تغییر در هیدروفوبیسـیته پروبیوتیک های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La۵ و بیفیدوباکتریوم لاکتیس Bb۱۲ و زنده مانی 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 بیوشـیمیایی معمـول انجام گرفت. نتایج تحقیق آنها نشـان داد کـه ارتباط زیادی بین هیدروفوبیسـیته غشـاء و تغییرات در پوشـش سـلولی(پروتئین، لیپید و کربوهیدرات) این دو باکتری وجود داشت. علاوه بر این مشـخص شـد که هیدروفوبیسیته پوشش سـلولی یک پارامتر مهم در اتصال سـلول باکتری به اپی تلیال روده و سایر خواص باکتری دارد. در مطالعـه دیگر، وقتی که باکتری ها در محیط حاوی مکمل‌های اسـیدهای چرب غیر اشـباع آزاد کشت داده شـدند خاصیت آب گریزی کاهش یافت و همه گونه های باکتریائی بررسـی شـده در این تحقیق (لاکتوباسـیلوس رامنوزوس، لاکتوباسـیلوس شیروتا و لاکتوباسـیلوس دلبروکئی) خاصیت پذیرندگی الکترون ضعیف داشـتند که نشـان دهنده طبیعت غیر اسیدی آنهـا بود. ایـن محققان بر این عقیده بودند که لاکتوباسـیل های آب گریز 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 اسـیدهای چرب غیر اشـباع آزاد را روی اتصال باکتری به موکوس و سلول اپی تلیال نشان داد ولی می توان گفت که تغییر در ترکیب اسـیدهای چرب پروبیوتیـک روی فاکتورهای مرتبط بـا اتصال میکروبی تاثیـر مـی گذارد و این کار با تاثیر روی سـیالیت غشـاء- لیپوپپتید انجام می‌شـود (Gusils, C., et al.۲۰۰۲). Polak و همکاران(۲۰۱۴)، در مطالعه ای ترکیبات پوشـش سلولی و خواص سـطحی دو فنوتیپ لاکتوباسیلوس رامنوزوس (جداشـده از ناحیه معدی- روده ای انسان)، توانائی این باکتری ها در اتصال به سـلول های روده انسـان (در شـرایط Invitro و Invivo) و قابلیت تجمع با سـایر باکتریها در حضور اسـیدهای چرب را مورد بررسی قرار دادند. توانائی اتصال گونه های مورد بررسـی در شرایط Invitro، روی لاین های سلولی آدنوکارسینومای انسـانی، بررسی شد. نتایج این بررسی، قابلیت اتصال و تجمع بسـیار بالای این باکتری های پروبیوتیک را به دلیل وجود اسـیدهای چرب اختصاصی و پروتئین های سـطحی، نشان داد. در تحقیق ما در شـرایط Invitro، بررسی اتصال باکتری های مورد مطالعه در محیط های قطبی و غیر قطبی انجام شد و در نهایت از روی ایجاد خاصیت هیدروفوبیسـیته، جذب باکتری به سلول های روده ای بررسی گردید. ولی در تحقیق Polak، روی سـلول های لاین انسـانی انجـام 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 مقایسـه خصوصیات آب دوستی وآب گریزی گونه های باکتری استارتر و لاکتوباسیلوس، با توجه به گرایش آن ها به حلال غیرقطبی (جدول ۱)، مشـخص شـدکه افزودن اسـیدهای چرب تاثیر زیادی بر شـاخص قطبیت غشـاء (نسبت اتیل استات به اکتان) دارند. به این ترتیب مشاهده شد که لاکتوباسیلوس رامنوزوس در هر چهار محیـط مورد آزمایش خواص غیر قطبی (در نتیجه تمایل بیشـتر به اتصال



نمودار۵- درصد جذب اتیل استات توسط دو نوع باکتری لاکتوباسیل و مخلوط استارتر در محیط های کشت مختلف

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

تمایل و کشـش باکتری‌های استارتر به اتیل استات در محیط مخلوط، نشـان دهنده گرایـش کل به این حلال بـازی دهنده الکترون می باشـد (نمـودار ۵). لاکتوباسـیلوس و اسـتارتر تقریبا به یک میـزان خصوصیات اسـیدی و گیرندگی الکترون را در محیط های سـاده، اشـباع و غیر اشباع را نشـان می دهند. امـا در محیط مخلوط خصوصیات اسـیدی و الکترون گیرندگی اسـتارتر کاهش می یابددر حالی که برای لاکتوباسیلوس در این محیـط افزایـش می یابد (نمـودار ۴). با گرایش ضعیف لاکتوباسـیلوس و اسـتارتر نسـبت به حلال الکترون دهنده (اتیل استات) در مقایسه با حلال غیـر قطبی(اکتـان)، خصوصیت الکتـرون گیرندگی ضعیـف باکتری های مـورد مطالعه را نشـان می دهد. این حقیقت یعنی کشـش و تمایل کمتر باکتری ها به اتیل استات نسبت به اکتان با توجه به نسبت های پائین اتیل استات به اکتان مشخص می‌شود.

بـا توجه به این که اسـیدهای چرب آزاد خاصیت ضـد باکتری دارند (Kankaanpää, P. E, et al.2001)، جـذب اسـیدهای چـرب می تواند به عنـوان یک مکانیسـم دفع مسـمومیت توسـط باکتـری ها تلقی شـود. (Jiang, J. et al.1998) در نتیجه محیط حاوی اسـید چرب در داخل روده و مشـتقات التهاب زای اسـیدهای چرب دوباره به وسیله میکروفلور روده متعادل می شوند. پروبیوتیک ها دارای قابلیت ضد التهابی بوده و هر یک از پروبیوتیک ها ممکن اسـت با مکانیسم‌هائی التهاب روده را در اثر آتوپی، آلرژی غذائی و بیماری‌های التهابی شکمی کاهش دهد.

پاورقی ها

1- Functional food

2- Globule Leukocytes

3- Affinity

تشکر و قدردانی

بر خود وظیفه می دانم تا از راهنمائی‌ها، تلاش های صمیمانه و حمایت‌های ارزنده آقایان: محمد حسـین شـکوه زنگنه، سیروس امیری نیا، سید احمد میرهادی، محمد حسـین بنابازی، سعید اسـماعیل 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 Espı´rito Santo., Roberta C. Silva., Fabiana A.S.M. Soares., Douglas Anjos, Luiz A. Gioielli., Maricˆ N. Oliveira(2010). Açai pulp addition improves fatty acid profile and probiotic viability in yoghurt. International Dairy Journal. 20 : 415–422.

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

4- Bzducha-Wro´bel A., Kieliszek M., Bła_zejak 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. Bjo¨rck, and R. Fonden. (1998). Production of conjugated linoleicacid 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- Kankaanpa¨a.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-

ramatsu M(2011). Enhancement of immunoregulatory effects of *Lactobacillus gasseri* 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., Waśko 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 ., Povolo 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., Grube1 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- Šuškuvic J., Blaženka Kos., Jasna Beganovic., Andreja Leboš Pavunc., Ksenija Habjani and Srecko Matošic (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- Vasiljevic, T. and Shah, N.P. (2008). Probiotics-From Metchnikoff to bioactives. International Dairy Journal18: 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.