● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیست‌ودوم، شمارهٔ ۶، ص ۶۰۱-۵۹۲، ۱۳۹۴

مقالهٔ پژوهشی

تأثیر مصرف نوشیدنی ماست حاوی باکتری‌های پروبیوتیک آزاد و ریزپوشانی شده بر تغییرات جمعیت این باکتری‌ها در سیستم گوارش

فاطمه شهدادی[1*]، حبیب‌اله میرزایی[2]، مهدی کاشانی‌نژاد[2]، مرتضی خمیری[2]، امان محمد ضیایی‌فر[3]، علی اکبریان[4]

خلاصه

مقدمه: باکتری‌های پروبیوتیک اثرات مثبتی در سلامت میزبان دارند، اما برای این که نقش مفیدی در بدن داشته باشند، باید بتوانند از سیستم گوارش عبور کنند و زنده بمانند. ریزپوشانی باکتری‌های پروبیوتیک می‌تواند برای افزایش بقای آن‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

روش: در این مطالعه، مدفوع ۶۰ داوطلب سالم برای بررسی تغییرات باکتری‌های پروبیوتیک در طول یک دوره ۲۸ روزه مورد آنالیز قرار گرفت. شرکت کنندگان به ۴ گروه تقسیم شدند: گروه ۱ یا گروه شاهد (۱۵ نفر) که نوشیدنی ماست حاوی باکتری‌های پروبیوتیک دریافت نکردند. گروه ۲ (۱۵ نفر) نوشیدنی ماست حاوی باکتری‌های پروبیوتیک ریزپوشانی نشده لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم انیمالیس زیرگونه لاکتیس را دریافت کردند. گروه ۳ نوشیدنی ماست حاوی باکتری‌های پروبیوتیک ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم/نشاسته مقاوم و گروه ۴ نوشیدنی ماست حاوی باکتری‌های پروبیوتیک ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم/کیتوزان مصرف کردند.

یافته‌ها: افزایش معنی‌داری در میزان باکتری‌های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم مدفوعی در هر سه گروه مصرف کننده نوشیدنی ماست نسبت به گروه ۱ (گروه شاهد) مشاهده شد که این موضوع، توانایی ساکن شدن این دو گونه باکتریایی در سیستم گوارش هم در حالت ریزپوشانی شده و هم ریزپوشانی نشده را نشان می‌دهد. جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک در گروهی که نوشیدنی ماست حاوی باکتری‌های ریزپوشانی شده دریافت کردند، بیشتر از گروه دریافت کننده باکتری‌های آزاد بود. مدفوع گروهی که از نوشیدنی ماست حاوی باکتری‌های پروبیوتیک ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم/نشاسته مقاوم استفاده کردند، دارای بیشترین میزان باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم انیمالیس زیرگونه لاکتیس (به ترتیب ۱۰۷ CFU/g × ۰/۲۶ ± ۱/۳ و ۱۰۹ CFU/g × ۰/۳۷ ± ۲/۴ در روز ۲۸) بود.

نتیجه‌گیری: مصرف نوشیدنی ماست حاوی باکتری‌های پروبیوتیک باعث افزایش این باکتری‌ها در مدفوع شد و تکنیک ریزپوشانی مورد استفاده در این پژوهش باعث افزایش پایداری هر دو گونه باکتری‌های پروبیوتیک گردید.

واژه‌های کلیدی: آنالیز مدفوعی، باکتری‌های پروبیوتیک، نوشیدنی ماست، ریزپوشانی

۱-دانشجوی دکتری صنایع غذایی، گروه صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران ۲-دانشیار، گروه صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران ۳-استادیار، گروه صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران ۴-واحد توسعه و تحقیقات، صنایع شیر ایران، تهران، ایران

*** نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک:** fatemeh.shahdadi@gmail.com

دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۷/۷ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۹۳/۱۲/۱۴ **پذیرش مقاله:** ۱۳۹۴/۱/۹

مقدمه

امروزه مصرف فـراورده‌هـای پروبیوتیـک در جهـان گسترش زیادی یافته است و ماست به دلیل خواص حسـی منحصر به فرد و ارزش سلامت بخشی که دارد، یکی از پر مصرف‌ترین و محبوب‌تـرین فـراورده‌هـای پروبیوتیـک محسوب می شود. ماست های نوشیدنی نیز یکـی از رو بـه رشدترین محصولات تخمیری در بین غذاهای فراسـودمند می باشد. ماست نوشیدنی ممکن است به صورت ماست هم زده با ویسکوزیته کم باشد و این یک کلمه عمومی اسـت که برای شیرهای تخمیری در شکل مایع به کار مـی‌رود و از طریق اضافه کردن پایدار کننده ها به ماست به هم نزده، تولیـد مـی‌شـود و بعـد از آن، همـوژنیزه (۱۰۰ kg/cm۲) می گردد و میزان ماده خشک و غلظـت آن از دوغ بیشـتر است (۱). زیست پذیری پروبیوتیک ها در یک محصـول هنگام مصرف، موضوعی مهم برای کارایی آن هـا اسـت، چون آن‌ها باید طی فراوری و مصرف محصول، سالم بمانند و از شرایط اسیدی بالای معده و آنـزیم‌هـا و نمـک‌هـای صفراوی عبور کنند. ریزپوشانی به عنوان یک فرایند نوین، اثر قابل ملاحظه‌ای در حفاظت باکتری های پروبیوتیک در برابر شرایط ذکر شده ایفـا مـی کنـد (۲). ریزپوشـانی از دیدگاه میکروب شناسی، پوشـش دادن لایـه‌ای از هیـدرو کلوئید در اطراف سلول‌های زنده می‌باشد کـه آن‌هـا را از شرایط نامساعد محیط اطراف مصون می‌دارد و میزان بقـای این سلول‌ها را بالا می‌برد (۳).

مواد مختلفی جهت ریزپوشانی باکتری های پروبیوتیک از جمله ژلاتین، کیتـوزان و غیـره مـورد اسـتفاده قـرار گرفته اند، اما ریزپوشانی به وسیله آلژینات کلسیم به دلیـل داشتن مزیت‌های متعدد، مانند غیر سمی و بی‌ضرر بودن آن برای بدن انسان، قیمت مناسب و آسانی کار با آن، به طور وسیعی برای این منظور و به خصوص بر روی باکتری های اسـیدلاکتیک انجـام گرفتـه اسـت (۵، ۴، ۲). حفاظـت پروبیوتیک‌ها توسط ریزپوشانی در دانـک‌هـای آلژینـات یکی از روش‌های افزایش بقای آن‌ها در ماست مـی‌باشـد (۶). استفاده از آلژینات به دلیل پایداری فیزیکی کم آن در حضور عوامل شلاته کننـده محـدود اسـت (۷). ترکیـب آلژینات با نشاسته به ویژه نشاسته مقـاوم، نتـایج خـوبی را نشان داده است؛ چرا که منجر به تشکیل یک پوشینه اضافی در اطراف دانک‌ها می‌شود و میزان استحکام دیواره تشکیل شده و به دنبال آن بقای باکتری‌های درون آن را بالا می‌برد (۸).

یکی از اندام های کلیدی بدن سیستم گوارشی است که تنوع میکروبی بسیار زیـادی دارد. میکـروب هـا در ایـن اکوسیستم پیچیده بر یکدیگر و بر میزبان خـود تـأثیرات متفاوتی بر جا می گذارند. تعداد باکتری در معده $۱۰^{۱}$-$۱۰^{۳}$، در ژنوم برابر $۱۰^{۷}$ و در پایان ایلئوم برابر $۱۰^{۹}$ سلول اسـت. جمعیت میکروبـی در سیسـتم گـوارش ۱۰ برابـر دیگـر بافت های انسان است. این جمعیت زیاد، نشـانگر پتانسـیل بالای متابولیکی برای هضم غذا، سـم‌زدایـی و تحریـک و تعدیل سیستم ایمنی توسط این میکروارگانیسم‌ها است (۹). بیفیدوباکتریوم‌ها بیشتر در روده بزرگ و لاکتوباسیلوس‌ها بیشتر در روده کوچک ساکن هستند (۱۰).

باکتری های مستقر در دستگاه گوارش تأثیر بسزایی بر سلامتی انسان دارد. اگر چه ترکیب میکروفلور روده ثابت است، اما توسط عوامل مختلفی مثـل سـن، رژیـم غـذایی، استرس، عوامل محیطی و مصرف داروها ممکن است تغییر کند. تغییرات قابل توجهی در فلور میکروبی روده از زمـان تولد نوزاد تا زمان بلوغ به وقوع می پیوندد. Shortt بـر روی توسعه فلور روده در آغاز تولد نـوزادان و تغییـرات آن در طول زمان رشد مطالعاتی داشته است. روده یک نوزاد تـازه متولد شده، خالی از هر نوع میکروارگانیسمی می باشد؛ امـا به سرعت بعد از تولد، رشد باکتری آغاز می‌شود. با آن که مطالعات زیادی روی اکولوژی روده صورت گرفته است، اما هنوز تنها ۴۰۰ گونه و جنس بـاکتری روده کشـت و شناسایی شده‌اند. بیشتر باکتری‌های مفید روده، باکتری‌های

میله‌ای گرم مثبت از جنس لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم هستند (۱۱).

میزان باکتری ها در مدفوع انسان بیش از 10^{12}-10^{11} سلول در گرم می‌باشد که معادل ۶۰-۵۰ درصد وزن جامد مدفوع را تشکیل می‌دهد. فلور طبیعی روده هنگام تولد یا کمی بعد از آن در روده استقرار می یابد. میکروب های طبیعی دستگاه گوارش در طول زندگی فرد تحت تأثیر منطقه جغرافیایی و رژیم غذایی تغییر می کنند (۱۲). به نظر می رسد رژیم غذایی عامل مهم تعیین اجزای فلور طبیعی روده می‌باشد. پروبیوتیک‌ها جزء باکتری‌های طبیعی سیستم گوارش می باشند که به میزان زیادی تحت تأثیر رژیم غذایی قرار می گیرند. این باکتری ها از کلنی سازی توسط باکتری‌های پاتوژن جلوگیری می کنند (۱۳).

فلور میکروبی روده در یک فرد اغلب ثابت است؛ هر چند که این فلور در افراد مختلف ممکن است متفاوت باشد. با این حال، تجویز پروبیوتیک ها هم در نوزادان تازه متولد شده و هم در بزرگسالان منجر به تغییر در پروفایل میکروبی و فعالیت های متابولیکی مدفوع می شود. هر چند این تغییرات اندک است، با این حال در صورت تجویز در شرایط پاتولوژیک، اغلب برای اصلاح روند بیماری کافی است. در اغلب شرایط، تجویز پروبیوتیک ها منجر به افزایش تعداد بیفیدوباکتریوم ها و لاکتوباسیلوس ها، کاهش pH مدفوع و کاهش در فعالیت آنزیم‌های باکتریایی می‌شود (۱۵، ۱۴).

هدف این مطالعه بررسی تأثیر مصرف نوشیدنی ماست حاوی باکتری‌های پروبیوتیک آزاد و ریزپوشانی شده بر تغییرات باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم انیمالیس زیرگونه لاکتیس در طول دوره مصرف این فراورده بود.

روش بررسی

مواد مورد استفاده در این پژوهش عبارت از باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم انیمالیس زیرگونه لاکتیس و استارتر ماست (CY۳۴۰) (Christensen- Hansen، Denmark)، سالیسین، موپیروسین، محیط کشت MRS agar (Man- Rogosa- Sharpe) و MRS broth (Merck، Germany)، نمک صفراوی و سیستئین هیدروکلرید (Sigma، USA) بود.

تولید ماست نوشیدنی

برای تولید ماست نوشیدنی، شیر (۱/۵ درصد چربی و ۱۱ درصد ماده خشک) و پایدار کننده (پکتین با درجه متیلاسیون زیاد به میزان ۰/۵ درصد) به طور کامل هموژنیزه شد و سپس در دمای $95\ ^oC$ به مدت ۱۰ دقیقه پاستوریزه و بعد تا دمای تلقیح ($40\ ^oC$) سرد گردید. سپس به آن ۱ درصد استارتر ماست افزوده شد و در دمای $40\ ^oC$ تا رسیدن به pH ۴/۴ گرم خانه گذاری شد. بعد از گرم خانه گذاری لخته ها توسط دستگاه هموژنایزر شکسته شد و سپس ml ۱۰ از سوسپانسیون باکتری‌های پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم انیمالیس زیرگونه لاکتیس) آزاد فعال شده در محیط MRS مایع و یا g ۱۰ از باکتری‌های ریزپوشانی شده به همراه آب (نسبت ۱ به ۴) به آن اضافه و به طور کامل هم زده شد تا مخلوطی یکنواخت به دست آید.

میزان باکتری‌های پروبیوتیک در نوشیدنی ماست دارای باکتری‌های آزاد ریزپوشانی شده با نشاسته مقاوم و کیتوزان به ترتیب به میزان CFU/ml ۱۰۱۰ × ۲/۸، ۳/۱ و ۳/۳ در نوشیدنی‌های ماست حاوی باکتری‌های پروبیوتیک آزاد، ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم/نشاسته مقاوم و آلژینات سدیم/کیتوزان بود (۱۶). نمونه‌ها بعد از تولید توسط کامیون یخچال‌دار مخصوص حمل فراورده‌های لبنی به کرمان انتقال داده شد.

ریزپوشانی باکتری‌ها

ریزپوشانی پروبیوتیک های مورد نظر به وسیله آلژینات و نشاسته مقاوم و همچنین آلژینات و کیتوزان (با وزن مولکولی کم، درجه استیلاسیون بیش از ۷۵ درصد) با روش اکستروژن و با دستگاه میکروانکپسولاتور چند نازلی به صورت زیر انجام گرفت:

ابتدا g ۲۰ آلژینات سدیم به ml ۲۰۰ آب مقطر اضافه و سپس استریل شد. پس از آن محلول آلژینات به مدت یک شب در یخچال قرار گرفت تا ذرات آلژینات به خوبی آب جذب کنند. روز بعد، محلول آلژینات از یخچال به محیط آزمایشگاه منتقل می شد تا با محیط هم دما شود. بعد میزان ml ۱۰ امولسیون باکتریایی تهیه شده در مرحله قبل به آلژینات اضافه گشت و سوسپانسیون حاصل توسط دستگاه میکرو انکپسولاتور چند نازلی به درون محلول کلرید کلسیم ۰/۱ مولار حاوی توین ۸۰ تزریق گردید. بعد از تشکیل دانک‌ها، g ۱۵ از آن‌ها به درون ml ۱۰۰ محلول ۱ درصد نشاسته مقاوم و کیتوزان وارد شد و با سرعت ملایم برای پوشش‌دهی به مدت ۲۰ دقیقه هم زده شدند. دانک‌های پوشش داده شده با کیتوزان و نشاسته مقاوم بعد از طی مدت زمان فرایند شسته شد و در محلول پپتون استریل (g ۱۰۰ /g ۰/۱) قرار گرفت و برای انجام آزمایش‌های مربوط در دمای ^{o}C ۴ نگهداری گردید (۸).

طراحی آزمایش و شمارش باکتری‌های پروبیوتیک در نمونه‌برداری از مدفوع

۶۰ فرد سالم از شهر کرمان برای انجام این آزمایش انتخاب شدند (جدول ۱). افراد مورد آزمایش به ۴ گروه تقسیم شدند: گروه اول شامل افرادی بود که در طول دوره نوشیدنی ماست دریافت نکردند (گروه شاهد)، گروه دوم افرادی بودند که به آن‌ها نوشیدنی ماست حاوی باکتری‌های پروبیوتیک آزاد داده شد. گروه سوم نوشیدنی ماست حاوی باکتری‌های پروبیوتیک ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم/نشاسته مقاوم و گروه چهارم نوشیدنی ماست پروبیوتیک حاوی باکتری‌های ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم/کیتوزان دریافت کردند. نمونه‌های مدفوع هر داوطلب قبل از شروع آزمایش (روز ۰) و هر ۷ روز یک بار به مدت ۲۸ روز جمع‌آوری شد و برای شمارش باکتری‌های پروبیوتیک زنده مورد بررسی قرار گرفت.

قبل از شروع آزمایش، افراد مورد آموزش قرار گرفتند و چگونگی و میزان استفاده از نوشیدنی ماست به آن‌ها آموزش داده شد. هر فرد در این آزمایش روزانه ml ۲۵۰ نوشیدنی پروبیوتیک در وعده ناهار دریافت کرد (اولین مصرف نوشیدنی یک هفته بعد از تولید و بعد از انجام آزمایش‌های کنترل کیفی صورت گرفت). در طی دوره آزمایش، افراد زندگی معمول خود را داشتند و مطابق عادت‌های خود غذا مصرف کردند. فقط از آن‌ها خواسته شد که فراورده پروبیوتیک دیگری مصرف نکنند و در صورت مصرف آنتی‌بیوتیک گزارش دهند. برای شمارش باکتریایی g ۱۰ از نمونه مدفوع به ml ۹۰ پپتون واتر اضافه شد و به طور کامل مخلوط و تا رقت ۶-۱۰ رقیق‌سازی شد. سپس ml ۱ از این محلول در محیط MRS agar حاوی سیستئین هیدروکلرید و موپیروسین (برای باکتری‌های بیفیدوباکتریوم انیمالیس) و سالیسین و ۰/۱۵ درصد نمک های صفراوی (برای باکتری های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس) کشت داده شد.

در نهایت، پلیت‌های ویژه لاکتوباسیلوس اسیدفیلوس در شرایط هوازی و پلیت‌های حاوی بیفیدوباکتریوم انیمالیس در شرایط بی‌هوازی به مدت ۷۲ ساعت در دمای ^{o}C ۳۷ گرم‌خانه‌گذاری شدند (۱۷).

فرایند ریزپوشانی در مرکز بیوتکنولوژی کشاورزی تبریز و فرایند تولید و آزمایش‌های میکروبی در آزمایشگاه میکروبیولوژی کارخانه پگاه تبریز و پگاه کرمان انجام گرفت.

جدول ۱. اطلاعات افراد در گروه‌های مختلف در ابتدای مطالعه

متغیر	گروه ۱	گروه ۲	گروه ۳	گروه ٤
میانگین سن (سال)	۲۰/۵۰	۱۸/۸۰	۲۱/۳۳	۲۵/۸۳
وزن (kg)	۳۸/۳۰	۴۵/۶۰	۳۴/۸۰	۴۰/۴۵
جنسیت زن (درصد)	۵۶	۴۲	۵۱	۶۳

تجزیه و تحلیل داده‌ها

پس از اعمال تیمارها، نتایج به دست آمده در قالب طرح به صورت تصادفی تجزیه و تحلیل شد. برای مقایسه میانگین‌ها آزمون چند دامنه‌ای Duncan و جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SAS (۲۰۰۸) استفاده شد. حد معنی‌داری در تمامی آنالیزها $P < ۰/۰۵۰$ در نظر گرفته شد و تمامی آزمایش‌ها سه بار تکرار گردید.

نتایج

تأثیر مصرف نوشیدنی ماست پروبیوتیک بر تغییرات باکتری‌های پروبیوتیک مدفوعی در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲. تأثیر مصرف نوشیدنی ماست پروبیوتیک بر جمعیت لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم‌های مدفوعی (میانگین ±انحراف معیار، CFU/g)

زمان	نوع باکتری	گروه ۱	گروه ۲	گروه ۳	گروه٤
روز ۰	لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	E۲/۴ ± ۰/۱۳ × ۱۰۵	E۳/۴ ± ۰/۲۳ × ۱۰۵	E۳/۸ ± ۰/۲ × ۱۰۵	E۲/۸ ± ۰/۱۸ × ۱۰۵
	بیفیدوباکتریوم انیمالیس	C۴/۳ ± ۰/۳۱ × ۱۰۷	C۱/۹ ± ۰/۳۳ × ۱۰۷	C۱/۸ ± ۰/۳ × ۱۰۷	C۶/۵ ± ۰/۲۰ × ۱۰۷
روز ۷	لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	E۳/۴ ± ۰/۲۲ × ۱۰۵	E۵/۴ ± ۰/۵۳ × ۱۰۵	E۷/۷ ± ۰/۱۳ × ۱۰۶	D۱/۴ ± ۰/۱۸ × ۱۰۶
	بیفیدوباکتریوم انیمالیس	C۱/۴ ± ۰/۴۲ × ۱۰۷	C۶/۸ ± ۰/۴۱ × ۱۰۷	A۲/۳ ± ۰/۱۳ × ۱۰۹	A۱/۶ ± ۰/۲۹ × ۱۰۹
روز ١٤	لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	D۱/۸ ± ۰/۲۳ × ۱۰۶	D۵/۷ ± ۰/۲۳ × ۱۰۶	C۲/۰۹ ± ۰/۳۱ × ۱۰۷	C۱/۲ ± ۰/۲۳ × ۱۰۷
	بیفیدوباکتریوم انیمالیس	C۱/۶ ± ۰/۱۴ × ۱۰۷	C۹/۷ ± ۰/۲۶ × ۱۰۷	A۸/۷ ± ۰/۲۱ × ۱۰۹	A۲/۶ ± ۰/۴۱ × ۱۰۹
روز ۲۱	لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	E۷/۴ ± ۰/۱۹ × ۱۰۵	E۸/۹ ± ۰/۲۱ × ۱۰۵	D۴/۱ ± ۰/۲۵ × ۱۰۶	E۵/۶ ± ۰/۱۲ × ۱۰۵
	بیفیدوباکتریوم انیمالیس	D۲/۹ ± ۰/۳۲ × ۱۰۶	C۸/۸ ± ۰/۴۳ × ۱۰۷	B۳/۸ ± ۰/۲۱ × ۱۰۸	B۱/۱ ± ۰/۱۱ × ۱۰۸
روز ۲۸	لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	E۶/۱ ± ۰/۲۵ × ۱۰۵	D۶/۴ ± ۰/۲۷ × ۱۰۶	C۱/۳ ± ۰/۲۶ × ۱۰۷	D۹/۲ ± ۰/۲۲ × ۱۰۶
	بیفیدوباکتریوم انیمالیس	C۵/۳ ± ۰/۳۵ × ۱۰۷	C۹/۲ ± ۰/۲۳ × ۱۰۷	A۲/۴ ± ۰/۳۷ × ۱۰۹	A۱/۵ ± ۰/۳۱ × ۱۰۹

روز ۰: قبل از مصرف، گروه ۱ (شاهد): نوشیدنی ماست معمولی (بدون باکتری‌های پروبیوتیک)، گروه ۲: نوشیدنی ماست حاوی باکتری‌های پروبیوتیک آزاد، گروه ۳: نوشیدنی ماست حاوی باکتری‌های پروبیوتیک ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم/نشاسته مقاوم و گروه ۴: نوشیدنی ماست حاوی باکتری‌های پروبیوتیک ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم/کیتوزان دریافت کردند.

همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، میزان باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس مدفوعی در گروه ۱ (گروه شاهد) تغییر معنی‌داری نشان نداد ($P > ۰/۰۵۰$). در گروه ۲ در پایان دوره مصرف فقط یک سیکل لگاریتمی افزایش داشت؛ در حالی که در باکتری بیفیدوباکتریوم انیمالیس زیرگونه لاکتیس افزایش

قابل ملاحظه‌ای مشاهده نشد. در گروه ۳، ایـن افـزایش در مورد هر دو باکتری بیش از ۲ سیکل لگاریتمی بـود و در گروه ۴ لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس یک سیکل لگاریتمی و باکتری بیفیدوباکتریوم انیمالیس دو سیکل لگاریتمی در پایان روز ۲۸ مصرف افزایش نشان داد.

بحث

تفاوت گروه‌های ۳ و ۴ که هر دو گروه باکتری‌هـای ریزپوشانی شده استفاده کرده بودند، می‌تواند به این علـت باشد که نشاسته مقاوم که در گروه ۳ به عنوان جـداره دوم استفاده شده است، در واقع نشاسته‌ای می‌باشـد کـه توسـط آنزیم‌های پـانکراس (آمـیلاز) در روده کوچـک هضـم نمی‌شود. نشاسته مقاوم، می‌تواند به روده بزرگ برسد که در آن جا تخمیر می‌شود. این ویژگی باعـث تحویـل بهتـر و آزادسازی مناسب‌تر باکتری‌ها در روده بزرگ مـی‌شـود. نشاسته مقاوم این توانایی را دارد که به عنوان پری‌بیوتیک عمل کند و باعث افزایش فعالیت و بقـای بـاکتری‌هـای پروبیوتیک شود (۱۳)؛ اما کیتوزان تأثیر منفی بر فعالیـت باکتری‌ها دارد و از رشد آن‌ها جلوگیری می‌کند. بـا ایـن وجود، چون کیتوزان توانایی زیادی برای تشکیل فیلم دارد، این ماده بیشتر به عنوان لایه خارجی در کپسول‌های آنیونی مانند آلژینات مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۱).

این نتایج با یافته‌هـای Del و همکـاران (۱۸) مطابقـت داشت. آن‌ها مدفوع ۴۴ داوطلب سـالم را بعـد از مصـرف گونـه‌هـای پروبیوتیـک لاکتوباسـیلوس پلانتـاروم و بیفیدوباکتریوم بروه ریزپوشانی شده آزاد را مورد بررسـی قرار دادند و بعد از دوره مصرف ۲۱ روزه، مشاهده کردنـد که هر دو باکتری بـه صـورت آزاد و ریزپوشـانی شـده توانایی ساکن شدن در روده را داشتند، اما بر خلاف نتـایج مطالعه ما، آن‌ها گزارش کردند کـه رونـد بقـای هـر دو باکتری آزاد و ریزپوشانی شده مشابه هم بود.

در یک مطالعه پزشکی کنترل شده، تأثیر مصرف یک ماست سین بیوتیک حـاوی بیفیـدوباکتریوم انیمـالیس و اینولین بر بازده بیفیـدوباکتریوم انیمـالیس بررسـی شـد. نمونه‌های مدفوع از ۴۶ داوطلب جمع‌آوری شد و تغییـرات میکروبی آن ها مورد بررسی قرار گرفـت. ایـن بـاکتری پروبیوتیک از نمونه های مدفوع بازیافت شد و تا دو هفتـه بعد از مصرف ماست سین بیوتیک قابل شناسایی و زنده بود (۱۹).

Larsen و همکـاران در مطالعـه‌ای پزشـکی ۷۱ فـرد بزرگسال جوان و سالم را به ۵ گروه تقسیم کردند. گروه‌ها مخلوطی از دو پروبیوتیک در ۴ غلظت ۱۰۱۱-۱۰۸ به مدت ۳ هفته دریافت کردند. آن‌ها بعد از انجام آزمایش مشـاهده کردنـد کـه بازیافـت بیفیـدوباکتریوم انیمـالیس و لاکتوباسیلوس پاراکازئی به طور معنی‌داری با افزایش میزان باکتری هـا افـزایش یافـت (۲۰). Mättö و همکـاران ۱۴ داوطلب مصرف کننده شیر تخمیر شـده را بـرای بررسـی بقـای روده‌ای و مقاومـت بیفیـدوباکتریوم انیمـالیس، لاکتوباسیلوس پاراکازئی و لاکتوباسـیلوس اسـیدوفیلوس مورد مطالعه قرار دادند. در این آزمـایش، بیفیـدوباکتریوم انیمالیس و لاکتوباسیلوس پاراکـازئی بـه خـوبی در لولـه گوارش زنده ماندند و به ترتیب، به میزان ۷۹ و ۱۰۰ درصد در مدفوع شناسایی شدند (۲۱).

Smidsrod و Skjak Brlk در مطالعه‌ای ترکیب میکروفلور روده ۱۰ فرد سالم را پس از مصرف یک محصول شـیری حاوی لاکتوباسیلوس رامنوسوس مورد بررسی قرار دادنـد. آن‌ها مشاهده کردند کـه مصـرف ایـن فـراورده میـزان لاکتوباسیلوس و انتروکوکوس مـدفوع اکثـر داوطبـان را بـدون هـیچ تـأثیری بـر دیگـر عوامـل بیوشـیمیایی و باکتریولوژیکی تغییر داد (۷). فلور میکروبی روده به طـور عمده تحت تأثیر رژیم غذایی، سن، اثرات آنتاگونیسمی یا سینرژیسمی باکتری‌ها در محیط روده می‌باشد (۲۲).

Wang و همکاران گزارش کردند که میزان باکتری‌های بیفیدوباکتریوم در مدفوع گروه‌های مورد آزمایش بدون توجه به سن با افزایش دوره مصرف مکمل پروبیوتیک خوراکی افزایش یافت؛ در حالی که افرادی که جوان بودند (با میانگین سن ۲۶ سال)، تغییرات بیشتری در جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک مدفوعی نشان دادند. پاسخ متفاوت بین گروه‌های مختلف ممکن است به دلیل عوامل وابسته به سن مانند تغییرات فیزیولوژی لوله گوارشی، عادت‌های غذایی، شیوه زندگی و ظرفیت ایمنی افراد باشد (۲۳).

Liu و همکاران نشان دادند که مصرف ماست پاستوریزه پروبیوتیک باعث افزایش لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدیوباکتریوم‌های مدوعی افراد تحت آزمایش گردید. این اثر افزایشی حتی هنگامی که سلول‌های باکتریایی پروبیوتیک توسط حرارت از بین رفتند، نیز مشاهده شد (۲۴).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که تغییر تعداد میکروفلور سیستم گوارش کودکان و بزرگسالان از طریق تغذیه امکان پذیر است. در این پژوهش مشاهده گردید که مصرف نوشیدنی ماست حاوی باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم انیمالیس زیرگونه لاکتیس هم به صورت ریزپوشانی شده و هم ریزپوشانی نشده، میزان این باکتری‌ها را در افراد مصرف کننده تغییر می‌دهد و این تغییر در هر سه گروه این آزمایش مثبت و افزایشی بود؛ اما افرادی که نوشیدنی ماست حاوی باکتری‌های ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم/نشاسته مقاوم مصرف کردند، افزایش بیشتری نشان دادند.

References

1. Fabian E, Elmadfa I. Influence of daily consumption of probiotic and conventional yoghurt on the plasma lipid profile in young healthy women. *Ann Nutr Metab* 2006; 50(4): 387-93.
2. Anal AK, Singh H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology* 2007; 18(5): 240-51.
3. Gong C, Zhang H, Wang X. Effect of shell materials on microstructure and properties of microencapsulated *n*-octadecane. *Iranian Polymer Journal* 2009; 18(6): 501-12.
4. Mortazavian A, Razavi SH, Ehsani MR, Sohrabvandi S. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology* 2007; 5(1): 1-18.
5. Kailasapathy K. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Curr Issues Intest Microbiol* 2002; 3(2): 39-48.
6. Sultana K, Godward G, Reynolds N, Arumugaswamy R, Peiris P, Kailasapathy K. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Int J Food Microbiol* 2000; 62(1-2): 47-55.
7. Smidsrod O, Skjak Brlk G. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology* 1990; 8: 71-8.
8. Homayouni A, Ehsani M, Yarmand MS, Razavi SH, Azizi A. Effect of

microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of symbiotic ice cream. *Food Chemistry* 2008; 111(1): 50-5.

9. Collins MD, Gibson GR. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am J Clin Nutr* 1999; 69(5): 1052-7.
10. El-Kholy AM, El-Shinawy SH, Meshref AMS, Korny AM. Screening of antagonistic activity of probiotic bacteria against some food-borne pathogens. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 2014; 2(2): 53-60.
11. Shortt C. The probiotic century; historical and current perspectives. *Trends Food Science and Technology* 1999; 10(1): 411-7.
12. Alander M, Mättö J, Kneifel W, Johansson M, Kögler B, Crittenden R, et al. Effect of galacto-oligosaccharide supplementation on human faecal microflora and on survival and persistence of Bifidobacterium lactis Bb-12 in the gastrointestinal tract. *International Dairy Journal* 2001; 11(10): 817-25.
13. de Filippo C, Cavalieri D, di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. Proc Natl Acad S*ci U S A* 2010; 107(33): 14691-6.
14. McCartney AL, Wenzhi W, Tannock GW. Molecular analysis of the composition of the bifidobacterial and lactobacillus microflora of humans. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62(12): 4608-13.
15. Tannock GW, Munro K, Harmsen HJ, Welling GW, Smart J, Gopal PK. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing Lactobacillus rhamnosus DR20. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(6): 2578-88.
16. Sun-Waterhouse D, Zhou J, Wadhwa SS. Drinking yoghurts with berry polyphenols added before and after fermentation. *Food Control* 2013; 32(2): 450-60.
17. Laroia S, Martin JH. Methods for enumerating and propagating Bifidobacteria. *Cultured Dairy Products Journal* 1991; 26(1): 32-3.
18. Del PM, Carmagnola S, Andorno S, Pagliarulo M, Tari R, Mogna L, et al. Evaluation of the intestinal colonization by microencapsulated probiotic bacteria in comparison with the same uncoated strains. *J Clin Gastroenterol* 2010; 44(Suppl 1): S42-S46.
19. Palaria A, Johnson-Kanda I, O'Sullivan DJ. Effect of a synbiotic yogurt on levels of fecal bifidobacteria, clostridia, and enterobacteria. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78(4): 933-40.
20. Larsen CN, Nielsen S, Kaestel P, Brockmann E, Bennedsen M, Christensen HR, et al. Dose-response study of probiotic bacteria Bifidobacterium animalis subsp lactis BB-12 and Lactobacillus paracasei subsp paracasei CRL-341 in healthy young adults. *Eur J Clin Nutr* 2006; 60(11): 1284-93.

21. Mättö J, Fondén R, Tolvanen T, von Wright A, Vilpponen-Salmela T, Satokari R, et al. Intestinal survival and persistence of probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium strains administered in triple-strain yoghurt. *International Dairy Journal* 2006; 16(10): 1174-80.

22. Lourens-Hattingh A, Viljoen BC. Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal* 2001; 11(1-2): 1-17.

23. Wang L, Zhang J, Guo Z, Kwok L, Ma C, Zhang W, et al. Effect of oral consumption of probiotic Lactobacillus planatarum P-8 on fecal microbiota, SIgA, SCFAs, and TBAs of adults of different ages. *Nutrition* 2014; 30(7-8): 776-83.

24. Liu Z, Xu Z, Han M, Guo BH. Efficacy of pasteurised yoghurt in improving chronic constipation: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *International Dairy Journal* 2015; 40: 1-5.

The Effect of Drinking Yoghurt Containing Free and Microencapsulated Probiotic Bacteria on Changes of the Population of These Bacteria in the Digestive System

Fatemeh Shahdadi,M.Sc. [1*], Habibollah Mirzaie, Ph.D. [2], Mahdi Kashaninejad, Ph.D. [2], Morteza Khomeiri, Ph.D. [2], Aman Mohammad Ziaiifar, Ph.D. [3], Ali Akbarian, Ph.D. [4]

1. Ph.D. Student in Food Science and Technology, School of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, School of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

3. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, School of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

4. Department of Research and Development, Pegah Dairy Company, Tehran, Iran

* Corresponding author; e-mail: fatemeh.shahdadi@gmail.com

(Received: 29 Sep. 2014 Accepted: 29 March 2015)

Abstract

Background & Aims: Probiotic bacteria have beneficial effects on host's health. However, one of the most important reasons which affect the probiotic activity of a microorganism is its survival during the gut transit. Microencapsulation techniques could be applied to bacteria to improve this parameter.

Methods: In this study, feces of 60 healthy volunteers were analyzed during 28-day test period to assess changes of probiotic bacteria. Participants were divided into equal 4 groups; group 1 did not receive probiotic drinking yoghurt (control); group 2 received probiotic drinking yoghurt containing free *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis,* subspecies *lactis*; group 3 recieved the same strains microencapsulated with sodium alginate/resistant starch; and group 4 received probiotic drinking yoghurt containing microencapsulated probiotic bacteria with sodium alginate/chitosan.

Results: A significant increase was recorded in the population of lactobacilli and *bifidobacteria* in the feces of participant in three groups at the end of the treatment compared with control group ($P < 0.05$ for all), confirming the ability of the 2 strains to colonize the human gut, either in a gastroprotected form or not. Participants treated with the microencapsulated bacteria reported more viability than those received not encapsulated strains. Feces of group 3 that received drinking yoghurt containing encapsulated probiotic bacteria with alginate/resistant starch had higher amount of probiotic bacterial populations, $1.3 \pm 0.26 \times 10^7$ and $2.4 \pm 0.37 \times 10^9$ cfu/g *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* subs *lactis*, respectively.

Conclusion: Consumption of the drinking yoghurts containing probiotic bacteria increased the *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis,* subspecies *lactis,* contents of the feces and encapsulation process improved stability of probiotic bacteria.

Keywords: Fecal analysis, Probiotic bacteria, Drinking yoghurt, Encapsulation

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2015; 22(6):