www.rifst.ac.ir/jrifst.aspx
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال ۱۳۹۲، جلد ۲، شماره ۴، صفحات ۳۱۱-۳۲۲

JRIFST

اثر اینولین استخراجی از کاسنی و سیب‌زمینی‌ترشی بر مقاومت به صفرا و بازدارندگی دو گونه *لاکتوباسیلوس* در برابر *اشرشیاکلی* $O_{157}:H_7$

سارا کمالی[۱]، مرضیه حسینی نژاد[۲*]، محمد الهی[۳]، مسعود یاورمنش[۳]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- استادیار گروه زیست فناوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی
* نویسنده مسئول (m.hosseininezhad@rifst.ac.ir)
۳- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۳/۱۸
تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۰/۲۰

واژه‌های کلیدی
استرس
اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$
اینولین
بازدارندگی
سین‌بیوتیک
مقاومت به صفرا

چکیده

پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها در بهبود تعادل میکروبی سیستم گوارشی نقش داشته و پتانسیل کاربردی خوبی در صنایع غذایی و حفظ سلامت عمومی دارند. بقای پروبیوتیک در طی استرس‌های گوارشی تحت تاثیر پری‌بیوتیک حامل قرار می‌گیرد. در این پژوهش اثر پری‌بیوتیکی اینولین (استخراجی از کاسنی و سیب‌زمینی‌ترشی و همچنین اینولین استاندارد آزمایشگاهی)، گلوکز و نمونه بدون کربوهیدارت بر مقاومت به صفرا و بازدارندگی بر اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ در دو گونه لاکتوباسیلوس به منظور امکان ارائه ترکیب سین‌بیوتیکی موثر، مطالعه شده است. اثر تیمارهای اینولین بر رشد و زنده‌مانی لاکتوباسیلوس کازئی PTCC 1608 و لاکتوباسیلوس رامنوسوس PTCC 1637 در غلظت‌های مختلف صفرا (صفر، ۰/۳، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد) در قالب طرح آماری فاکتوریل کاملاً تصادفی و اثر بازدارندگی به روش چاهک در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی بررسی و با نمونه‌های شاهد مقایسه شد. نتایج نشان داد که اینولین استخراجی می‌تواند بر افزایش مقاومت دو لاکتوباسیلوس به نمک‌های صفراوی موثر باشد. در عین حال با افزایش غلظت صفرا از این اثر کاسته شد و زنجیره‌های بلندتر اینولین اثر کمتری از گلوکز داشتند. با وجود اینکه گلوکز دارای بازدارندگی بیشتری بر اشرشیاکلی بود، اینولین کاسنی و استاندارد نیز بازدارندگی قابل قبولی داشتند. اینولین سیب‌زمینی‌ترشی با بالاترین درجه پلیمریزاسیون کمترین اثرات را نشان داد.

مقدمه

فلور میکروبی لاکتیکی دستگاه گوارش انسان نقش مهمی در افزایش مقاومت به تشکیل کلنی توسط پاتوژن‌ها دارد، بنابراین افزایش تعداد آن در روده موجب افزایش بازدارندگی بر باکتری‌های پاتوژن می‌شود (Vernazza *et al.*, 2006). بیفیدوباکتر و لاکتوباسیلوس به علت اثر قوی ضد پاتوژنی بیشترین گروه از باکتری‌هایی بوده که بدین منظور به مواد غذایی افزوده می‌شوند (Kolida & Gibson, 2007). از آن جا که بیفیدوباکتر نسبت به اکسیژن و گرما حساس‌تر است کاربرد آن در مواد غذایی به عنوان پروبیوتیک نسبت به لاکتوباسیلوس محدودتر بوده و همچنین قابلیت چسبندگی آن به سلول‌های اپیتلیال از لاکتوباسیلوس‌ها کمتر است (همایونی راد، ۱۳۸۷؛ Kolida *et al.*, 2002).

ترکیبات سین‌بیوتیک مخلوطی از پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها هستند که با افزایش بقاء و ورود مکمل‌های میکروبی زنده به دستگاه گوارش اثرات مثبتی بر میزبان دارند (Gibson & Roberfroid, 1995). مصرف سین‌بیوتیک می‌تواند در کاهش فرایندهای ابتلا به سرطان نقش بیشتری از مصرف پری‌بیوتیک و پروبیوتیک به تنهایی داشته باشد (Vernazza *et al.*, 2006). در حقیقت حضور پری‌بیوتیک بقاء باکتری در طول گذر از استرس‌های سیستم گوارشی مانند ترشح صفرا در روده کوچک را بهبود داده و امکان ورود پروبیوتیک به روده بزرگ را افزایش می‌دهد (Nadal *et al.*, 2010). تحقیقات Patel و همکاران (۲۰۰۴)، Michida و همکاران (۲۰۰۶) نشان داد که عصاره و فیبر غلات می‌تواند تاثیر مثبتی بر افزایش مقاومت لاکتوباسیلوس به صفرا داشته باشد. در پژوهش Brink و همکاران (۲۰۰۶)، افزودن اینولین منجر به افزایش مقاومت تعدادی از لاکتوباسیلوس‌ها به صفرا و افزایش اثر بازدارندگی آن‌ها بر پاتوژن‌ها شد. نتایج تحقیق دیگری نشان دهنده اثر مثبت فروکتان‌های اینولین بر بازدارندگی پاتوژن‌های اشرشیاکلی، کامپیلوباکتر و سالمونلا بود (Fooks & Gibson, 2002). Hernandez و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که پری‌بیوتیک‌های گالاکتو-الیگوساکارید و لاکتولوز جانشین‌های خوبی برای مونوساکاریدها در بهبود مقاومت سوش‌های لاکتوباسیلوس به شرایط گاستروانتریتی هستند.

اینولین مخلوط ناهمگنی از پلی‌مرهای خطی فروکتوز (بتا فروکتان) بوده و پراکندگی وسیعی در کربوهیدرات‌های ذخیره‌ای گیاهان دارد و از آن به طور گسترده‌ای در صنعت مواد غذایی استفاده می‌شود (Tungland, 2000). اینولین علاوه بر پری‌بیوتیک بودن، ویژگی‌های کاربردی مناسبی در فراورده‌های غذایی متفاوت مانند خصوصیت ایجاد ژل و جایگزینی چربی، بهبود دهنده طعم، حجم دهنده کم کالری در جایگزین‌های شکر و فیبر رژیمی دارد (Alistair *et al.*, 2006). دو منبع مناسب برای استخراج اینولین گیاهان دارویی سیب‌زمینی‌ترشی و کاسنی است (Lingyun *et al.*, 2007). تقریباً بیشتر پری‌بیوتیک‌ها در گیاهان حضور دارند و معمولاً مصرف روزانه آن‌ها کمتر از مقدار لازم است، بنابراین استخراج از منابع طبیعی و غنی سازی مواد غذایی با این ترکیبات می‌تواند مفید واقع شود (Voragen, 1998; Paseepheol, 2008; Wang, 2009).

این پژوهش به بررسی اثر اینولین استخراج شده از منابع گیاهی کشور (کاسنی و سیب‌زمینی‌ترشی) بر مقاومت *لاکتوباسیلوس کازئی* PTCC 1608 و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* PTCC 1637 به غلظت‌های متفاوت و فیزیولوژیک صفرا و اثر بازدارندگی این دو گونه بر پاتوژن *اشرشیاکلی* $O_{157}:H_7$ می‌پردازد. باکتری *اشرشیاکلی* $O_{157}:H_7$ به عنوان پاتوژن عمده بیماری‌زا در مواد غذایی شناخته شده است. دوز عفونی این باکتری بسیار کم بوده، به طوری که ورود کمتر از ۱۰۰ سلول و گاهی اوقات ۱۰ سلول به بدن برای ایجاد بیماری کافی است (مهدی زاده و اسکندری، ۱۳۸۹؛ Kay & Fricker, 1997). چنین تحقیقاتی می‌تواند در یافتن ترکیبات سین‌بیوتیکی موثر، مفید واقع شود.

مواد و روش‌ها

استخراج و بررسی خصوصیات اینولین

در این پژوهش از سیب‌زمینی‌ترشی (*Helianthus tuberosus*)، برداشت شده از مزارع اطراف کرج و کاسنی (*Cichorium intybus*) با بذر مجاری، پرورش داده شده در مزرعه تحقیقاتی پارک علم و فناوری خراسان رضوی، استفاده شد. پس از شستشو و پوست‌گیری، ماده اولیه خرد شده و هر کیلوگرم از آن با ۳ لیتر آب مقطر مخلوط و به مدت ۶۰ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۸۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و عصاره حاصل پس از صاف شدن به منظور خالص سازی، با هیدروکسید کلسیم ۵ درصد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد مخلوط و pH آن به ۱۲-۱۰ رسانده شد. پس از صاف کردن تحت خلاء، pH عصاره توسط اسید فسفریک ۱۰ درصد به ۸-۹ رسانده و به مدت ۳-۲ ساعت در ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و صاف شد. این مرحله دو بار تکرار گردید. پس از آن به کمک کربن فعال رنگبری صورت گرفته و بریکس عصاره توسط اواپراتور چرخشی تحت خلاء به ۴۲ رسانده شد.

در مرحله آخر کنستانتره به نسبت ۸ به۱ با اتانول ۹۹ درصد مخلوط و به منظور رسوب اینولین، به مدت ۲ روز در ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد در انتها پس از جداسازی الکل، رسوب حاصل در ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک و پودر گردید (حسینی نژاد و همکاران، ۱۳۹۱؛ Paseephol *et al.*, 2007).

به منظور بررسی ویژگی‌های انواع اینولین استخراج شده و اثر این ویژگی‌ها در مراحل بعدی تحقیق، خصوصیات اینولین اندازه‌گیری و با اینولین کاسنی استاندارد آزمایشگاهی fluka57610 مقایسه شد. اندازه‌گیری درصد کربوهیدرات کل به روش فنول سولفوریک اسید، با استفاده از گلوکز به عنوان استاندارد (Paseephol *et al.*, 2007) و قند احیاء به روش دی نیتروسالسیلیک اسید و رسم منحنی استاندارد به کمک گلوکز (Lingyun *et al.*, 2007) انجام شد. متوسط درجه پلیمریزاسیون از تقسیم کربوهیدرات کل بر قند احیاء به دست آمد (Paseephol *et al.*, 2007). برای اندازه‌گیری درصد خاکستر کل از روش (۲۰۰۰) AOAC استفاده شد. pH محلول اینولین با تهیه محلول ۱۰ درصد در آب مقطر و pH متر به دست آمد (Monila *et al.*, 2005).

تهیه محیط کشت MRS[1] براث بدون کربوهیدرات

محیط کشت MRS حاوی کربوهیدرات گلوکز است، بنابراین به منظور بررسی اثر هر کدام از کربوهیدرات‌های مورد نظر به طور مجزا، محیط MRS براث بدون کربوهیدرات حاوی اجزای ذیل تهیه شد (گرم در لیتر): پپتون کازئین ۱۰ (Biomark BI682)، آمینو اسید با پایه نیتروژن مخمر ۵ (Fluka 51483)، استات سدیم ۵، دی پتاسیم هیدروژن فسفات ۲، سولفات منیزیم ۰/۲، دی آمونیوم سیترات ۲، سولفات منگنز ۰/۵و توبین۸۰ به مقدار ۱ میلی‌لیتر (pH=۶/۲±۰/۱۱ محیط کشت) (Nira *et al.*, 2010).

بررسی اثر شرایط صفراوی

محلول ۱۰ درصد وزنی حجمی از نمک‌های صفراوی گاوی (OXgall:Fluka 70168) تهیه و با میکروفیلتر سرنگی ۰/۲ میکرومتر استریل شد. محیط‌های کشت MRS براث آماده شده، با ۲ درصد از کربوهیدرات‌های اینولین استخراجی از کاسنی، اینولین استخراجی از سیب‌زمینی‌ترشی، اینولین استاندارد آزمایشگاهی (fluka57610)، گلوکز و همچنین نمونه بدون کربوهیدرات (آب مقطر) تهیه و استریل گردید (Su *et al.*, 2007). سپس محلول نمک‌های صفراوی به محیط‌های کشت اضافه شد به طوری که غلظت نهایی نمک‌های صفراوی در محیط‌های کشت نهایی برابر با صفر، ۰/۳، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد وزنی حجمی (غلظت‌های فیزیولوژیک صفرا) شود (pH=۶/۲). پس از تزریق تعداد log cfu/ml ۷/۷۵±۰/۱۳ و log cfu/ml ۷/۵۸±۰/۱۶ از باکتری‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* PTCC 1608 و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* PTCC 1637 در زمان صفر، محیط‌های کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری و پس از ۳ ساعت شمارش سلول‌های زنده به کمک تهیه رقت و کشت سطحی بر MRS آگار در شرایط بی هوازی به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد، نتایج شمارش به صورت لگاریتمی (log_{10}cfu/ml) بیان گردید (۳ تکرار) (Ronka *et al.*, 2003; Noriega *et al.*, 2004)، همچنین دانسیته نوری[2] (جذب) پس از ۳ ساعت در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۳ تکرار) (Khalil *et al.*, 2007).

بررسی اثر بازدارندگی بر رشد *اشرشیاکلی* $O_{157}:H_7$

برای اندازه گیری دانسیته نوری و pH کشت‌های لاکتوباسیلوس، محیط‌های کشت MRS براث حاوی ۲ درصد کربوهیدرات و نمونه بدون کربوهیدرات تهیه و پس از تلقیح، به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. پس از ۴۸ ساعت مقادیر دانسیته نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر و pH اندازه‌گیری شد، این عملیات دو بار تکرار شد (Rossi *et al.*, 2005).

به منظور اندازه‌گیری هاله بازدارندگی، محیط‌های کشت براث حاوی ۲ درصد کربوهیدرات و نمونه بدون

1- De Man Rogosa & Sharp

2- Optical Density (OD)

کربوهیدرات تهیه و استریل شد. پس از تلقیح باکتری‌ها و گرمخانه‌گذاری به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، عمل سانتریفوژ کشت‌های باکتریایی در ۱۴۰۰۰ ×g به مدت ۱۰ دقیقه و در ۴ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت و سوپرناتانت (مایع رویی) جدا شد. برای اندازه‌گیری هاله بازدارندگی از روش ایجاد حفره یا چاهک[1] استفاده گردید. از کشت ۱۶ ساعته[2] *اشرشیاکلی* $O_{157}:H_7$ (NCTC 12900)، بر سطح پلیت حاوی نوترینت آگار کشت داده شد. سپس چاهک‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر بر سطح پلیت‌ها ایجاد و ۱۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت حاصل از هر یک از سوش‌های *لاکتوباسیلوس*، به چاهک‌ها تزریق شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در شرایط هوازی گرمخانه‌گذاری و قطر هاله‌های بازدارندگی اندازه‌گیری گردید (Matu *et al*., 2010). این آزمایش در دو تکرار و هر بار قطر هاله بازدارندگی دو بار اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

اثر نمک‌های صفراوی برای هر یک از باکتری‌ها، به کمک مقایسه لگاریتم شمارش سلولی در ۴ نوع کربوهیدرات و تیمار بدون کربوهیدرات در ۵ سطح نمک‌های صفراوی (صفر، ۰/۳، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد) در زمان‌های صفر و ۳ ساعت، در قالب طرح آماری فاکتوریل کاملاً تصادفی بررسی شد. در اثر بازدارندگی برای هر یک از باکتری‌ها طرح آماری کاملاً تصادفی به کار گرفته شد. آنالیز واریانس توسط نرم افزار Minitab برای هر یک از سوش‌های لاکتوباسلوس انجام گرفت و برای مقایسه میانگین از نرم افزار Mstat-C و آزمون LSD($p\leq$۰/۰۵) استفاده گردید.

نتایج و بحث

چنانچه در جدول ۱ مشاهده می‌شود، اینولین از منابع متفاوت خصوصیات متفاوتی داشته که بر مقاومت سویه‌های لاکتوباسیلوس به صفرا و همچنین بازدارندگی آن‌ها اثر می‌گذارد.

بررسی اثر شرایط صفراوی

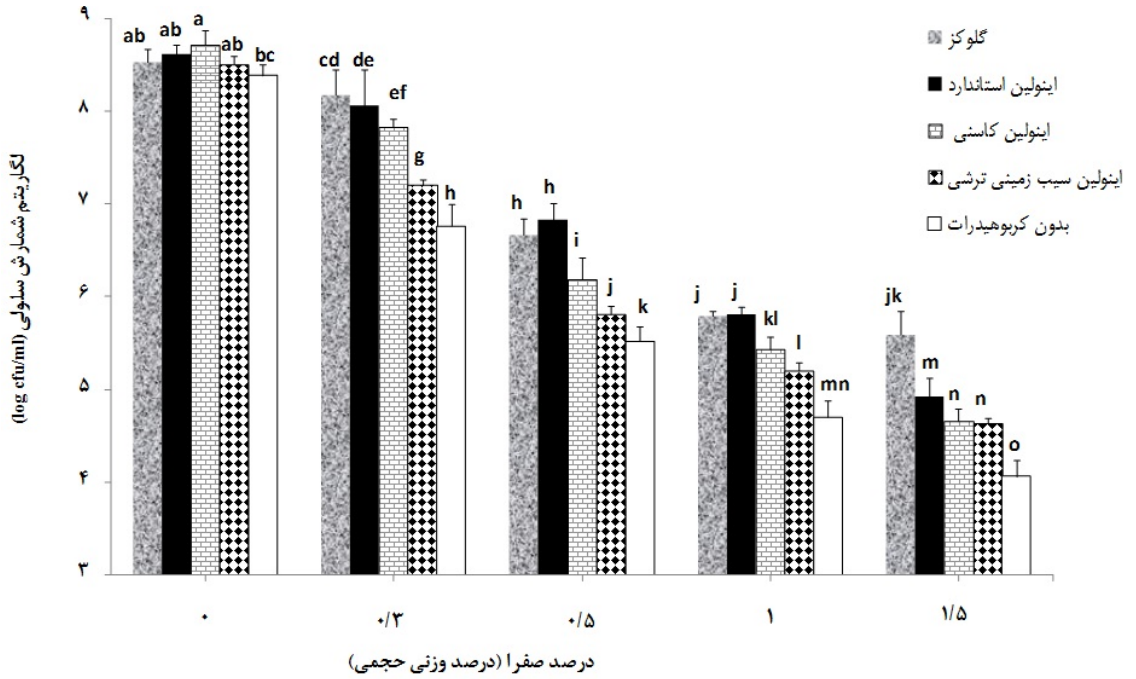
نتایج آنالیز واریانس برای هر یک از سوش‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* نشان دهنده معنی‌داری ($p\leq$۰/۰۵) فاکتورهای مورد بررسی بر لگاریتم شمارش سلول‌های زنده بود.

روند کاهشی لگاریتم شمارش سلولی در دو سویه باکتری با افزایش غلظت صفرا مشاهده می‌شود (شکل۱و ۲). در هر دو سوش *لاکتوباسیلوس* در غلظت صفر درصد صفرا، رشد معنی داری ($p\leq$۰/۰۵) نسبت به زمان اولیه در تمامی نمونه‌ها بعد از ۳ ساعت دیده می‌شود، از طرفی این رشد از لحاظ آماری بین تیمارهای مختلف معنی‌دار نبوده و با افزودن صفرا به محیط کشت و افزایش غلظت آن اثر افزودن کربوهیدرات به محیط آشکارتر شده است. در *لاکتوباسیلوس کازئی* در غلظت ۰/۳درصد صفرا در تیمارهای گلوکز و اینولین استاندارد همچنان رشد معنی‌دار باکتری نسبت به زمان اولیه مشاهده می‌شود، البته این افزایش در لگاریتم شمارش سلولی از تیمارهای بدون صفرا کمتر بود. در حالی که در *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در این غلظت هیچ‌گونه افزایشی در لگاریتم شمارش سلول‌های زنده نسبت به زمان اولیه (زمان صفر) مشاهده نشد. اثر کشندگی صفرا در غلظت ۰/۳ درصد در تیمارهای اینولین سیب‌زمینی‌ترشی و بدون کربوهیدرات در دو سوش لاکتوباسیلوس قابل مشاهده است به طوری که در این دو تیمار شمارش سلول‌های زنده نسبت به زمان اولیه کمتر شده است. به طور کلی تا غلظت ۱/۵ درصد صفرا افزودن کربوهیدرات باعث افزایش لگاریتم شمارش سلول‌های زنده شده است. در این خصوص تحقیقات متنوع نشان دهنده آن است که بقاء پروبیوتیک‌ها در حضور نمک‌های صفراوی در شرایط in vivo و in vitro تحت تاثیر مواد غذایی حامل آن‌هاست (Patel *et al*., 2004).

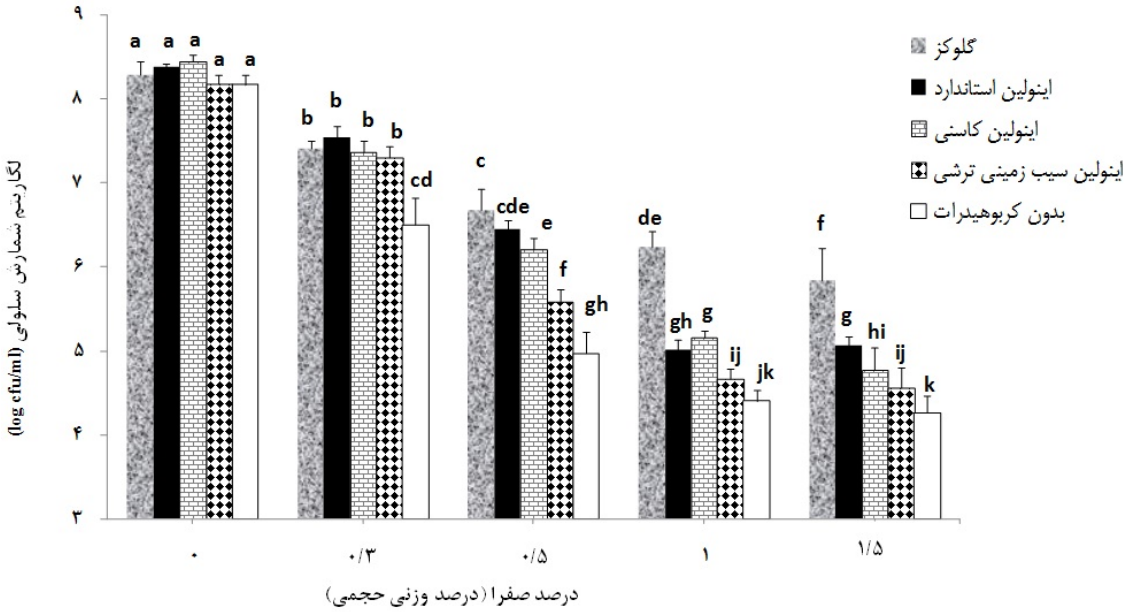
1- Well diffusion assay
2- Over night

جدول ۱- نتایج آنالیز کمی و کیفی دو اینولین استخراج شده و اینولین استاندارد

	مقدار گرم در صد گرم پودر تهیه شده			متوسط	pH محلول ۱۰ درصد
	کربوهیدرات کل	قند احیا	خاکستر کل	درجه پلیمریزاسیون	
کاسنی	۸۲/۴۲±۰/۴۷	۱/۹۶±۰/۱۹	۵/۱۹±۰/۲۱	۴۱/۹۸	۶/۶۵±۰/۰۷
سیب‌زمینی‌ترشی	۸۷/۲۲±۰/۸۲	۱/۳۹±۰/۱۳	۸/۸۷±۰/۲۹	۶۲/۶۰	۶/۹۲±۰/۰۵
استاندارد(Fluka57610)	۹۳/۵۸±۰/۲۱	۳/۸۵±۰/۰۴	۰/۵±۰/۰۲	۲۴/۰۳	۵/۸۵±۰/۰۲



شکل ۱- اثر نوع کربوهیدرات در غلظت‌های متفاوت نمک‌های صفراوی در طی زمان ۳ ساعت بر لگاریتم شمارش سلولی در *لاکتوباسیلوس کازئی* (تعداد اولیه باکتری در زمان صفر در تمام تیمارها برابر با ۷/۷۵±۰/۱۳^{F} log cfu/ml بود.)



شکل ۲- اثر نوع کربوهیدرات در غلظت‌های متفاوت نمک‌های صفراوی در طی زمان ۳ ساعت بر لگاریتم شمارش سلولی در *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (تعداد اولیه باکتری در زمان صفر در تمام تیمارها برابر با ۷/۵۸±۰/۱۶^{b} log cfu/ml بود.)

نتایج تحقیقات Perrin و همکاران (۲۰۰۰) بر روی سوش‌های بیفیدوباکتر نشان داد که حضور فروکتوالیگوساکارید در محیط کشت باکتری، تولید آنزیم‌های بتافروکتوفورانوزیداز را تحریک می‌کند. به طوری که سه سوش باکتری در حضور فروکتوالیگوساکارید (DP=۳-۵) سرعت ویژه رشدی مساوی با گلوکز و فروکتوز نشان دادند. از طرفی زنده‌مانی این سه سوش بیفیدوباکتر در نمک‌های صفراوی، در حضور فروکتوالیگوساکاریدها بیشتر از مونومرهای فروکتوز و گلوکز بود.

در پژوهش دیگری بررسی دانسیته نوری نشان داد، رشد *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[1]، *لاکتوباسیلوس کراواتوس*[2]، *لاکتوباسیلوس سالیواروس*[3] و *پدیوکوکوس پنتوزئوس*[4] در حضور نمک‌های صفراوی، با جایگزینی گلوکز با اینولین سینرژی باعث افزایش رشد می‌شود، علت این نتیجه استفاده بهتر از اینولین سینرژی به عنوان منبع کربن توسط سوش‌های لاکتوباسیلوس بیان شد (Brink *et al*., 2006).

همچنین تحقیقات Pan و همکاران (۲۰۰۹) نشان داد که افزودن گزیلوالیگوساکارید و فروکتو-الیگوساکارید به محیط کشت *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* NIT202 و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*[5] NIT200 حاوی شیره روده‌ای (۰/۳ درصد =OXgall) باعث افزایش بقاء این دو باکتری بیشتر از گلوکز می‌شود که این اثر حمایتی می‌تواند در ارتباط با تحریک رشد باکتری‌ها توسط الیگوساکاریدها باشد.

اثر بازدارندگی نمک‌های صفراوی می‌تواند مشابه اثر اسیدهای آلی (ضعیف) باشد. به طوری که پس از وارد شدن به داخل سلول و آزاد سازی یون هیدروژن، سلول به کمک فعالیت آنزیم‌های ATPas و مصرف ATP تعادل خود را حفظ می‌کند و حضور کربوهیدرات‌های قابل تخمیر برای باکتری نقش کلیدی در تولید ATP و کاهش اثرات نامطلوب نمک‌های صفراوی دارد (Patel *et al*., 2004).

1- *Lb. plantarum*
2- *Lb. cruvatus*
3- *Lb. salivarius*
4- *Pediococcus pentosaceus*
5- *Lb. acidophilus*

با افزایش غلظت صفرا و استرس، اثر افزایش متوسط درجه پلیمریزاسیون اینولین در دو باکتری آشکارتر شده است. در غلظت ۰/۵ درصد به بعد در *لاکتوباسیلوس کازئی* اثر اینولین کاسنی با متوسط درجه پلیمریزاسیون بالاتر کمتر از اینولین استاندارد است و در غلظت ۱/۵ درصد با اینولین سیب‌زمینی‌ترشی تفاوتی ندارد، در این غلظت (۱/۵ درصد) شمارش سلول‌های زنده در اینولین استاندارد هم کمتر از گلوکز به عنوان یک کربوهیدرات ساده، شده است ($p \leq$۰/۰۵). در *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* نیز با افزایش غلظت به ۱ و ۱/۵ درصد اثر اینولین استاندارد به طور معنی‌داری کمتر از گلوکز شد. تحقیقات نشان می‌دهد که اینولین با درجه پلیمریزاسیون کمتر بهتر از زنجیره‌های بلندتر تخمیر می‌شود (Bosscher *et al*., 2006). همان‌طور که در قسمت قبل توضیح داده شد، حضور کربوهیدرات قابل تخمیر در مقاومت باکتری به صفرا تاثیر گذار است. بنابراین به نظر می‌رسد که در درجه اول تخمیر بهتر گلوکز و سپس زنجیره‌های کوتاه‌تر اینولین، در مقاومت به افزایش غلظت صفرا در دو *لاکتوباسیلوس* تاثیر گذار بوده است.

لازم به ذکر است که بررسی دانسیته نوری نشان داد که در تمامی تیمارهای صفرا در دو سویه باکتری مقادیر دانسیته نوری کمتر از (۰/۲) محدوده خطی قانون بیر-لامبرت بود، تنها در *لاکتوباسیلوس کازئی* در غلظت ۰/۳ درصد صفرا در تیمارهای گلوکز و اینولین استاندارد که باکتری قادر به رشد بوده است، دانسیته نوری افزایش داشته و به ۰/۲ و کمی بالاتر رسید. با توجه به اثر صفرا بر کاهش لگاریتم شمارش سلولی چنین مسئله‌ای دور از ذهن نیست.

مقاومت به نمک‌های صفراوی در میان گونه‌ها و سوش‌های باکتری‌های اسید لاکتیک متفاوت است. نتایج بررسی مقاومت سوش‌های *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*[6] ایزوله شده از منابع حیوانی به ۰/۳ درصد OXgall، نشان دهنده درجات متفاوتی از تاثیر صفرا بر سوش‌های متفاوت بود، به طوری که سوش *SG2* دارای ۱۰۰ درصد مقاومت به صفرا (پس از ۴ ساعت)

6- *Lb. fermentum*

بوده و سوش PGM3 تنها ۱۶/۷۷ درصد مقاومت نشان داد (Lin *et al*., 2007). در پژوهش Vinderola و Reinheimer (۲۰۰۳) با افزایش غلظت صفرا اثر بازدارندگی بر سوش‌های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتر افزایش پیدا کرد و مقاومت به غلظت‌های متفاوت صفرا در *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* تفاوت داشت.

به طور کلی غلظت ۰/۱۵ تا ۰/۳ درصد نمک‌های صفراوی، به عنوان غلظت بحرانی در غربال سویه‌های پروبیوتیک پیشنهاد شده و لازم است سویه‌های پروبیوتیک که به مصرف خوراکی درمانی می‌رسند به این غلظت‌ها مقاوم باشند (Huang & Adams, 2003; Rushdy & Gomaa, 2012). در این پژوهش دو سوش *لاکتوباسیلوس* مورد بررسی مقاومت خوبی به غلظت ۰/۳ درصد نمک‌های صفراوی داشتند.

نتایج به دست آمده از این پژوهش حاکی از آن است که اینولین استخراجی از منابع مختلف می‌تواند بر مقاومت دو سوش لاکتوباسیلوس در حضور نمک‌های صفراوی تاثیر گذار باشد. در *لاکتوباسیلوس کازئی* اینولین استاندارد آزمایشگاهی تا غلظت ۱ درصد صفرا اثر مشابه به گلوکز داشت، در عین حال اینولین کاسنی در غلظت ۰/۳ درصد نیز منجر به حفظ بقاء باکتری و عدم کاهش شمارش سلولی شد، در *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در غلظت ۰/۳ درصد تمام نمونه‌های اینولین و در غلظت ۰/۵ درصد اینولین استاندارد اثری مشابه گلوکز داشته و از این غلظت‌ها به بعد اثر تیمارهای اینولین به طور معنی‌داری کمتر از گلوکز بوده است.

بررسی اثر بازدارندگی بر رشد *اشرشیاکلی* $O_{157}:H_7$ نتایج آنالیز واریانس نشان دهنده اثر معنی‌دار نوع کربوهیدرات بر فاکتورهای بررسی شده بود. در هر دو سوش *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* پس از ۴۸ ساعت بیشترین رشد و کدورت و به تبع آن کمترین مقدار pH در تیمار گلوکز مشاهده شد ($p\leq$۰/۰۵) جدول (۲) و (۳). رشد در محیط حاوی اینولین استاندارد بیشتر از اینولین استخراجی از کاسنی بود. کمترین رشد و کمترین کاهش pH در تیمارهای اینولین سیب‌زمینی‌ترشی و بدون کربوهیدرات بود و در *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* این دو تیمار تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند، در حالی که در لاکتوباسیلوس کازئی بین تیمار اینولین سیب‌زمینی‌ترشی و بدون کربوهیدرات تفاوت معنی‌داری مشاهده شد، این مسئله می‌تواند تا حدودی نشان دهنده توانایی بیشتر *لاکتوباسیلوس کازئی* در تخمیر اینولین با متوسط درجه پلیمریزاسیون بالاتر نسبت به *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* باشد. همان طور که داده‌ها نشان می‌دهد، دو سوش لاکتوباسیلوس در تیمارهای اینولین با درجه پلیمریزاسیون بالاتر رشد کمتر و به تبع آن کاهش pH کمتری نیز داشته‌اند. همچنین در پژوهش Choi و همکاران (۲۰۱۲) دانسیته نوری سویه‌های متفاوت لاکتوباسیلوس بعد از ۴۸ ساعت در حضور اینولین کمتر از گلوکز بود، در عین حال بعضی از سوش‌ها توانایی بیشتری در تخمیر اینولین نسبت به سوش‌های دیگر داشتند.

جدول ۲- تغییرات دانسیته نوری، pH و هاله بازدارندگی در *لاکتوباسیلوس کازئی*

	قطر هاله بازدارندگی* (میلی‌متر)	pH	دانسیته نوری
گلوکز	۱۹±۲/۵۸[a]	۳/۵±۰/۰۴[e]	۳/۳۶±۰/۱۲[a]
اینولین استاندارد	۱۳±۲/۱۶[b]	۴/۵۷±۰/۲۲[d]	۱/۹۲±۰/۲۸[b]
اینولین کاسنی	۹/۸۶±۰/۸۵[c]	۵/۱۶±۰/۲[c]	۱/۳±۰/۱۵[c]
اینولین سیب زمینی ترشی	-	۵/۵۷±۰/۰۴[b]	۰/۷۱±۰/۰۵[d]
بدون کربوهیدرات	-	۶/۰۳±۰/۱[a]	۰/۳۳±۰/۰۳[e]

* قطر هاله به همراه چاهک

جدول ۳- تغییرات دانسیته نوری، pH و هاله بازدارندگی در *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*

	قطر هاله بازدارندگی* (میلی متر)	pH	دانسیته نوری
گلوکز	۲۰/۵±۴/۲[a]	۳/۵۲±۰/۰۲[d]	۳/۶۱±۰/۲۵[a]
اینولین استاندارد	۱۱/۵±۱/۲۹[b]	۴/۷۹±۰/۲۶[c]	۱/۷۱±۰/۱۳[b]
اینولین کاسنی	۷/۳۶±۰/۳[c]	۵/۲۸±۰/۲۱[b]	۱/۱۵±۰/۰۷[c]
اینولین سیب زمینی ترشی	-	۵/۸۸±۰/۰۳[a]	۰/۴۸±۰/۰۵[d]
بدون کربوهیدرات	-	۶/۰۱±۰/۱۳[a]	۰/۳۰±۰/۰۳[d]

* قطر هاله به همراه چاهک

توانایی تخمیر اینولین در باکتری‌های اسید لاکتیک بستگی به حضور سیستم آنزیمی دارد که ممکن است در ژنوم سوش‌های متفاوت باکتری رمزگذاری شده یا نشده باشد و منجر به فعالیت‌های پری‌بیوتیکی متفاوت می‌شود (Huebner *et al.*, 2007).

نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری قطر هاله بازدارندگی نیز نشان دهنده بازدارندگی بیشتر سوپرناتانت حاصل از تیمار گلوکز در هر دو سوش باکتری بود، جدول(۱) و (۲)، و پس از آن به ترتیب تیمارهای اینولین استاندارد و اینولین کاسنی ($p\leq$۰/۰۵) قرار داشتند. همچنین سوپرناتانت به دست آمده از تیمارهای اینولین سیب‌زمینی‌ترشی و بدون کربوهیدرات اثر بازدارندگی نشان نداد.

بنابراین بازدارندگی بیشتر باکتری‌ها در تیمارهای مختلف تحت تاثیر رشد باکتری (دانسیته نوری) و میزان کاهش pH بوده است. به طوری که بیشترین بازدارندگی در تیمار گلوکز با بیشترین مقدار کدورت و کمترین pH دیده می‌شود، پس از آن به ترتیب اینولین استاندارد و اینولین کاسنی قرار دارند. Rushdy و Gomaa (۲۰۱۲) اظهار داشتند که کاهش pH همراه با افزایش تعداد سلول برای تولید سطوح بالایی از ترکیبات باکتریوسینی لازم است. لازم به ذکر است که در بیشتر پژوهش‌های انجام گرفته به منظور بررسی اثر بازدارندگی سوپرناتانت لاکتوباسیلوس‌ها عموماً از MRS حاوی ۲٪ گلوکز استفاده می‌شود، که در این شرایط اثر بازدارندگی دو سوش *لاکتوباسیلوس* مورد بررسی در این تحقیق مناسب بوده است. چنانچه در پژوهشی، دو سوش *لاکتوباسیلوس گاسری*[1] CECT5715 و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* CECT5716 اثر بازدارندگی بر سوش *اشرشیاکلی* $O_{157}:H_7$ نشان ندادند (Olivares *et al.*, 2006).

الیگوساکاریدها با زنجیره بلند به هیدرولیز آنزیمی بیشتری قبل از تخمیر کامل نیاز دارند که این مسأله می‌تواند بر سرعت تخمیر و تولید ترکیبات بازدارنده موثر باشد. متابولیت اصلی حاصل از تخمیر *لاکتوباسیلوس‌ها* استات و لاکتات است که منجر به کاهش pH محیط کشت می‌شود (Fooks & Gibson, 2002). نتایج تحقیقات Fooks و Gibson (۲۰۰۲) نشان داد که سوش‌های پروبیوتیک در حضور الیگوفروکتوز و مخلوط الیگوفروکتوز و گزیلو-الیگوساکارید بیشترین اثر بازدارندگی را بر سوش‌های پاتوژن از جمله اشرشیاکلی داشتند (بیشتر از گلوکز)، در عین حال بهترین رشد و بیشترین کاهش pH در سوپرناتانت حاصل از این تیمارها مشاهده شد که در بین سوش‌های مختلف، متفاوت بود. نتایج تحقیقات Rodriguez و همکاران (۲۰۰۹) نشان داد که همبستگی خوبی بین میزان بازدارندگی *اشرشیاکلی* $O_{157}:H_7$ و pH پایین محیط کشت *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* وجود دارد.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصل به نظر می‌رسد با وجود اینکه اینولین استاندارد و اینولین استخراجی از کاسنی بر مقاومت باکتری در شرایط صفراوی تاثیر گذار بودند، در نهایت اثرات بازدارندگی کمتر از گلوکز نشان دادند، که ناشی از رشد کمتر آن‌ها بر منابع متفاوت اینولین بعد از ۴۸ ساعت است. در نتایج

1- *Lb. gasseri*

مشابهی در تحقیق Brink و همکاران (۲۰۰۶) بررسی دانسیته نوری طی ۱۱ ساعت نشان دهنده اثر حمایتی اینولین سینرژی در حضور نمک‌های صفراوی بر سویه‌های مورد بررسی بود، در حالی که در تمامی تیمارها بازدارندگی گلوکز از فروکتان‌های اینولین بیشتر بود.

نتایج این تحقیق نشان داد که دو سوش مورد بررسی در حضور اینولین کاسنی و اینولین استاندارد دارای مقاومت مطلوبی نسبت به صفرا و همچنین اثر بازدارندگی قابل ملاحظه هر چند کمتر از گلوکز بودند.

از طرفی هر چند که نتایج تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که حضور کربوهیدرات‌های محلول مانند گلوکز برای مقاومت لاکتوباسیلوس ها به نمک‌های صفراوی در شرایط in vitro مهم است و همچنین گلوکز ماده مغذی کلیدی در تولید ترکیبات ضدمیکروبی در این شرایط است، اما در عمل چنین اثرات حمایتی در گلوکز در شرایط in vivo قابل مشاهده نیست، چرا که گلوکز به سرعت در روده کوچک جذب شده و نمی‌تواند منشا اثرات مثبت در قسمت‌های تحتانی دستگاه گوارش باشد. بر این اساس در شرایط in vivo رژیم غذایی باید حاوی غلظت‌های بالایی از فروکتان‌های اینولین باشد تا بتوان به نتایج ارزنده‌ای رسید (Patel *et al*., 2003; Brink *et al*., 2006). همچنین کاهش فعالیت پروبیوتیک‌ها در تخمیر فروکتان‌های بلند زنجیر در شرایط in vitro و در محیط کشت خالص به دلیل عدم امکان تقابل باکتری‌هاست، چنانچه در محیط کولن ممکن است اینولین بلند زنجیر ابتدا توسط سایر باکتری‌ها (پروبیوتیک و غیر پروبیوتیک) دپلیمریزه شده و سپس به صورت انتخابی توسط پروبیوتیک تخمیر گردد (Pompei *et al*., 2008).

بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش ترکیب سوش‌های پروبیوتیک مورد بررسی با دو اینولین استخراجی از کاسنی و یا اینولین استاندارد، می‌تواند ترکیب سین‌بیوتیکی مناسبی باشد و ممکن است بتوان با استفاده از این ترکیبات طبیعی رشد پاتوژن‌ها با منشاء غذایی را تا حدودی کنترل کرد (Ibrahim *et al*., 2008).

منابع

۱- مهدی زاده، م. و اسکندری، س. ۱۳۸۹. اشریشیاکلی (دسته‌بندی، ویژگی‌ها، بیماری‌ها و شناسائی در مواد غذائی). چاپ اول، انتشارات آموزش و ترویج کشاورزی تهران.

۲- حسینی نژاد، م. نهاردانی، م. و الهامی راد، ا. ح. ۱۳۹۱. ارزیابی و مقایسه کیفی اینولین استخراجی از کاسنی بومی ایران با اینولین حاصل از سایر منابع. نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی، ۱:۳۷-۴۴.

۳- همایونی راد، ع. ۱۳۸۷. خواص سلامت بخش غذا های فراسودمند- پروبیوتیک، پری بیوتیک و سین بیوتیک. چاپ اول، انتشارات دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تبریز، ص: ۱۵۶.

4- Alistair, M. S., Phillips, G., & Williams, A. 2006. Food polysaccharides and their applications. CRC Press, UK.

5- Association of Official Methods analysis (AOAC). 2000. Determination of ash by gravimetric method. Method 945.46. 17th ed. Washington DC: AOAC.

6- Brink, M., Todorov, S. D., Martin, J. H., Senekal, M., & Dicks, L. M. T. 2006. The effect of prebiotics on production of antimicrobial compounds, resistance to growth at low pH and in the presence of bile, and adhesion of probiotic cells to intestinal mucus. Journal of Applied Microbiology, 100: 813–820.

7- Bosscher, D., Van Loo, J., & Franck, a. 2006. Inulin and oligofructose as prebiotics in the prevention of intestinal infections and diseases. Nutrition Research Reviews, 19: 216–226.

8- Choi, H. Y., Rye, H. K., Park, K. M., Lee, E. G., Kim, S. W., & Choi, E. S. 2012. Direct lactic acid fermentation of Jerusalem artichoke tuber extract using *Lactobacillus paracasei* without acidic or enzymatic inulin hydrolysis. Bioresource Technology, 114: 745-747.

9- Drago, L., Gismondo, M. R., Lombardi, A., Haen, C. H., & Gozzini, L. 1997. Inhibition of in vitro growth of enteropathogens by new Lactobacillus isolated of human intestinal origin. FEMS Microbiology Letters, 153: 455-463.

10- Fooks, L. J., & Gibson, G. R. 2002. In vitro investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. FEMS Microbiology Ecology, 39: 67-75.

11- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microflora: introducing the concept of prebiotics. Journal of Nutrition, 125: 1401-1412.

12- Hernandez, H. O., Muthaiyan, A., Moreno, F. J., Montilla, A., Sanz, M. L., & Ricke, S.C. 2012. Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of lactobacillus. Journal of Food Microbiology, 30: 355-361.

13- Huang, y., & Adams, M. C. 2004. In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. International Journal of Food Microbiology, 91: 253-260.

14- Huebner, J., Wehling, R. L., & Hutkins, R. W. 2007. Functional activity of commercial prebiotics. International Dairy Journal, 17: 770–775.

15- Ibrahim, S. A., Yang, H., & Seo, C. W. 2008. Antimicrobial activity of Lactic acid and copperon growth of Salmonella and *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory medium and carrot juice. Food Chemistry, 109: 137–143.

16- Kay, D., & Fricker, C. 1997. Coliforms and *E. Coli*: Problems or Solution?. The Royal Society Chemistry, Cambridge.

17- Khalil, R., Mahrous, H., El-Hlafawy, K., Kamaly, K., & Franks, J., El Soda, M. 2007. Evaluation of the probiotic potential of Lactic acid bacteria isolated from faeces of breast-fed infants in Egypt. African Journal of Biotechnology, 6(7): 939-949.

18- Kolida, S., & Gibson, G. R. 2007. Prebiotic capacity of inulin-type fructans. The Journal of Nutrition, 137: 2503-2506.

19- Kolida, S., Tuohy, K., & Gibson, G. R. 2002. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. British Journal of Nutrition, 87 (Suppl. 2): 193–197.

20- Lin, W. H., Yu, B., Jang, S. H., & Tsen, H. Y. 2007. Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. Anaerobe, 13: 107–113.

21- Lingyun, W., Jianhua, W., Xiaodong, Z., Da, T., Yalin, Y., Chenggang, C., Tianhua, F., & Fan, Z. 2007. Studies on the extracting technical conditions of inulin from Jerusalem artichoke tubers. Journal of Food Engineering, 79: 1087–1093.

22- Matu, M. N., Orinda, G. O., Njagi, E. N. M., Cohen, C. R., & BuKusi, E. A. 2010. In vitro inhibitory activity of human vaginal lactobacilli against pathogenic bacteria associated with bacterial vaginosis in Kenyan women. Anaerobe, 16: 210-215.

23- Michida, H., Tamalampudi, S., Pandiella, S. S., Webb, C., Fukuda, H., & Kondo, A. 2006. Effect of cereal extracts and cereal fiber on viability of Lactobacillus Plantarum under gastrointestinal tract conditions. Biochemical Engineering Journal, 28: 73–78.

24- Molina, L. D., Navarro-Martı´nez, M. D., Melgarejo, F. R., Hiner, A. N.P., Chazarra S., & Guez-Lopez, J. N. R. 2005. Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (Cynara Scolymus L.). Journal of Phytochemistry, 66: 1476–1484.

25- Nadal, E. S., Sayas-Barberá, E., Fernández-López, J., & Pérez-Alvarez, J. A. 2010. Food Formulation to Increase Probiotic Bacteria Action or Population. . P. 335-351. In R. Watson & V. R. Preedy. (ed.) Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics. Part 22. Elsevier Inc.

26- Nira, k. H., Suzuki, C., Sasaki, K., Kobayashi, M., & Mizumachi, K. 2010. Survival of a *Lactococcus Lactis* strain varies with its carbohydrate preference under in vitro conditions simulated gastrointestinal tract. International Journal of Food Microbiology, 143: 226–229.

27- Noriega, L., Gueimonde, M., Sanchez, B., Margolles, A., & De los Reyes-Gavilan, C. G. 2004. Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low

pH and cross-resistance to bile salts in bifidobacterium. International Journal of Food Microbiology, 94(1): 79-86.

28- Olivares, M., Diaz-Ropero, M.P., Martin, R., Rodriguez, J.M., & Xaus, J. 2006. Antimicrobial potential of four Lactobacillus strains isolated from breast milk. Journal of Applied Microbiology, 101: 71-79.

29- Pan, X., Wu T., Zhang, L., Cai, L., & Song, Z. 2009. Influence of oligosaccharides on the growth and tolerance capacity of Lactobacilli to simulated stress environment. Letters in Applied Microbiology, 48: 362–367.

30- Paseephol, T., Small, D., & Sherkat, F. 2007. Process optimization for fractionating Jerusalem artichoke fructans with ethanol using response surface methodology. Journal of Food Chemistry, 104: 73–80.

31- Paseephol, T. 2008. Characterisation of prebiotic compounds from plant sources and food industry wastes: inulin from Jerusalem artichoke and Lactulose from milk concentration permeate. PhD Thesis, RMIT University, School of Applied Sciences– Food Science. Australia.

32- Patel, H. M., Pandiella, S. S., Wang, R. H., & Webb, C. 2004. Influence of malt, wheat, and barley extracts on the bile tolerance of selected strains of Lactobacilli. Journal of Food Microbiology, 21: 83–89.

33- Perrin, S., Grill, J. P., & Schneider, F. 2000. Effects of fructooligosaccharides and their monomeric components on bile salt resistance in Three Species of Bifidobacteria. Journal of Applied Microbiology, 88: 968-974.

34- Pompei, A., Cordisco, L., Raimondi, S., Amaretti, A., Pagnoni, U. M., Matteuzzi, D. & Rossi, M. 2008. In vitro comparison of the prebiotic effects of two inulin-type fructans. Anaerobe, 14: 280-286.

35- Rodriguez, E., Arques, J. L., Rodriguez, R., Peiroten, A., Landete, J. M., & Media, M. 2012. Antimicrobial properties of probiotic strains isolated from breast-fed infants. Journal of Functional Foods, 4: 542-551.

36- Ronka, E., Malinen, e., Saarela, m., Koski, M. R., Aarnikunnas, J., & Pavala, A. 2003. Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. International Journal of Food Microbiology, 83: 63-74.

37- Rossi, M., Corradini, C., Amaretti, A., Nicolini, M., Pompei, A., Zanoni, S., & Mateuzzi, D. 2005. Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by Bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. Applied and Environmental Microbiology, 71: 6150-6158.

38- Rushdy, A. A., & Gomaa, E. Z. 2012. Antimicrobial compounds produced by probiotic *Lactobacillus brevis* isolated from dairy products. Annals of Microbiology, 63: 81-90.

39- Su, P., Henriksson, A., & Mitchell, H. 2007. Selected prebiotics support the growth of probiotic mono-cultures in vitro. Anaerobe, 13: 134-139.

40- Tungland, B. C., 2000. Inulin- a comprehensive scientific review. Available at http://members.shaw.ca/duncancrow/inulin_review.html

41- Vernazza, C. L., Rabiu, B. A., & Gibson, G. R. 2006. Human colonic microbiology and the role of dietary intervention: introduction to prebiotics. P. 1-28. In G. R. Gibson., & R. A. Rastall. (ed.). Prebiotics: Development and Application. John Wiley & Sons, Ltd.

42- Vinderola, C.G. & Reinheimer, J.A. 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative in vitro study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. Food Research International, 36: 895-904.

43- Voragen, A. G. J. 1998. Technological aspects of functional food-related carbohydrates. Trends in Food Science & Technology, 9: 328-335.

44- Wang, Y. 2009. Prebiotics: present and future in food science and technology. Food Research International, 42: 8-12.

Effect of inulin extracted from chicory and Jerusalem artichoke on bile tolerance and inhibition of two *Lactobacillus* species against *E.coli* O_{157}:H_7

Sara kamali[1], Marzieh Hosseini Nezhad[2*], Mohammad Elahi[3], Masoud Yavarmanesh[3]

1- MSc. Graduated Student, Department of Food Science &Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
2- Assistant Professor, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran
* Corresponding author(m.hosseininezhad@rifst.ac.ir)
3- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

Abstract

Probiotics and prebiotics play important role in improvement of the intestinal microbial balance and have a great potential for food industry and public health. Survival of probiotics during gastric stress is influenced by the prebiotic carriers. In order to introduce effective synbiotic pairs, in this study the prebiotic influence of inulin (extracted from chicory and Jerusalem artichoke and also standard lab grade inulin), glucose and non-carbohydrate sample were assessed on bile resistance and inhibition of two Lactobacillus species against *E.coli* O_{157}:H_7. The effect of inulin treatments were studied on growth and viability of *Lactobacillus casei* PTCC 1608 and *Lactobacillus rhamnosus* PTCC 1637 under various bile salts concentrations (0, 0.3, 0.5, 1, 1.5%) in completely randomized factorial design and the inhibition effects were evaluated using well- diffusion technique in completely randomized design, and compared with controls. Results indicated that extracted inulin could be effective on enhancing the bile salts resistance of two lactobacilli. This effect was decreased by increasing in bile concentration while longer inulin chains had less effect compared to glucose. Although the most antimicrobial effects belonged to glucose, standard and chicory inulin showed acceptable antimicrobial effects as well. Inulin from Jerusalem artichoke with the highest degree of polymerization showed the least effects.

Keywords: Bile resistance, *E.coli* O_{157}:H_7, Inhibition, Inulin, Stress, Synbiotic