تاثیر لاکتوباسیلوس پلانتاروم A7 (KC355240.1) بر میزان کلسترول در محیط آزمایشگاهی

گلنوش مدنی[۱]، مریم میرلوحی[۲]، محمود یاحی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: هرچند کاهش کلسترول غذا از راه‌های مؤثر کاهش کلسترول خون است، اما اخیرا در بخش چرب شیر اجزا مؤثر در سلامتی، با خصوصیات زیست فعالی شناسایی شده‌اند که با کاهش مصرف چربی لبنی، دسترسی به منبع مهمی از ویتامین‌های محلول در چربی و اجزا زیست فعال چرب شیر محدود می‌گردد. مطالعات نشان داده که رشد گروهی از باکتری‌های لاکتیک در شیر می‌تواند در کاهش بخش مضر چربی شیر مؤثر باشد. جهت معرفی سویه لاکتوباسیلوس پلانتاروم A7 (که دارای خصوصیات پروبیوتیکی مختلفی است) به عنوان سویه‌ای بومی با قابلیت کاهش کلسترول، اطلاع از مکانسیم عمل آن ضروری به نظر می‌رسد.

روش‌ها: سویه مورد نظر در محیط کشت MRS و شیر پرچرب حاوی ۷۰ تا ۱۰۰ میکروگرم در هر میلیمتر مکعب کلسترول محلول در آب کشت گردید. سپس با جداسازی باکتری‌ها از محیط کشت یا شیر به وسیله سانتریفوژ، جداسازی بخش غیر قابل صابونی شدن چربی و اندازه‌گیری اسپکتروفوتومتریک کلسترول انجام گردید.

یافته‌ها: با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شد که تفاوت در نوع کلسترول استاندارد می‌تواند بر روش اندازه‌گیری آن موثر باشد. همچنین غلظت کلسترول در طول دوره رشد باکتری در محیط تغییری نکرده و خواص این باکتری در کاهش قابل توجه کلسترول و تری‌گلیسرید در سرم موش‌های آزمایشگاهی، با فعالیت این باکتری در محیط خارج سلولی که طی آن جذب، هضم و یا اتصال قوی یا رسوب کلسترول بر سطح باکتری را می‌توان رد یابی کرد، هماهنگی ندارد.

نتیجه گیری: این پژوهش نشان داد که روش مورد استفاده در مطالعات مشابه برای اندازه‌گیری کلسترول در محیط کشت آزمایشگاهی روش کاملا دقیقی نیست و در صورتی که تفاوت بین سویه‌های مورد آزمایش در توانایی کاهش کلسترول کمتر از ۱۰ تا ۲۰ میلی‌گرم در لیتر باشد، با این روش به سختی می‌توان سویه‌های برتر را انتخاب نمود. همچنین شاید بتوان گفت که مکانیسم‌های دیگری مانند تولید اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه که در متابولیسم کلسترول در بدن اختلال ایجاد می‌کنند، عامل اصلی تغییرات اثر بخش این سویه در موش‌های آزمایشگاهی بوده است.

واژه‌های کلیدی: سویه بومی لاکتوباسیلوس پلانتاروم A7، اورتو-فتالالدهید، اندازه‌گیری اسپکتروفوتومتریک، کلسترول

ارجاع: مدنی گلنوش، میرلوحی مریم، یاحی محمود. **تاثیر لاکتوباسیلوس پلانتاروم A7 (KC355240.1) بر میزان کلسترول در محیط آزمایشگاهی.** مجله تحقیقات نظام سلامت ۱۳۹۲؛ ویژه نامه تغذیه: ۱۶۲۱-۱۶۲۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۴/۲۲ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۷/۲۲**

۱. کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات امنیت غذایی و گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲. استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، مرکز تحقیقات امنیت غذایی و گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

(نویسنده مسؤول) Email: m_mirlohi@hlth.mui.ac.ir

۳. کارشناس، مرکز تحقیقات امنیت غذایی و گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

مقدمه

کلسترول، متابولیتی چرب با ماهیت استروئیدی است که در غشا سلول‌های بدن و در تماس با چربی‌های غشا بوده و با پلاسمای خون منتقل می‌شود. افزایش کلسترول در چرخه جریان خون، بسته به نحوه توزیع آن در لیپوپروتئین، با بروز سخت‌رگی یا تصلب شرائین (آترواسکلوروز) رابطه مستقیم دارد، به طوری که در بسیاری از مطالعات با کاهش کلسترول خون، کاهش بروز بیماری‌های قلبی مشاهده شده است. کاهش میزان چربی‌های اشباع و کلسترول در غذا و تعدیل رژیم غذایی به عنوان یکی از راه‌های مؤثر در کاهش کلسترول خون پذیرفته شده است. در این رابطه، افرادی که در معرض بیماری‌های قلبی هستند، همواره به کاهش مصرف شیر چرب و فراورده‌های چرب شیر توصیه می‌گردند. این در حالی است که اخیرا در بخش چرب شیر اجزا مؤثر در سلامتی، با خصوصیات زیست فعالی شناسایی شده‌اند که با کاهش مصرف چربی لبنی، نه تنها دسترسی به منبع مهمی از ویتامین‌های محلول در چربی خصوصا ویتامین A در رژیم غذایی محدود می‌گردد، بلکه افراد مصرف‌کننده از مصرف اجزا زیست فعال چرب شیر مانند اسیدلینولیئک مزدوج و ویتامین‌های محلول درچربی بخصوص ویتامین آ، نیز محروم می‌شوند. مطالعات نشان داده که فعالیت و رشد گروهی از باکتری‌های لاکتیک در شیر می‌تواند در کاهش بخش مضر چربی شیر شامل اسیدهای چرب اشباع و کلسترول مؤثر باشد گرچه مکانسیم این پدیده کاملا مشخص نیست (۵-۱). توانایی کاهش کلسترول خون به عنوان یکی از شاخص‌های مفید و موثر باکتری‌های پروبیوتیک شناخته شده است. با وجود اینکه مطالعات مختلف نشان داده‌اند که باکتری‌های پروبیوتیک می‌توانند به عنوان عوامل بیولوژیک در کاهش کلسترول خون عمل کنند، آنچه در بسیاری از تحقیقات بر آن تأکید شده است وابستگی اثر کاهش کلسترول به روند رشد باکتری پروبیوتیک می‌باشد. به طوری که در مواردی این اثر، اثری وابسته به رشد تلقی شده است (۸-۶). قابل ذکر است که همانگونه که ثابت شده است خصوصیات پروبیوتیکی خواصی وابسته به سویه هستند، معرفی سویه‌های پروبیوتیک برای استفاده در صنعت یا مصارف درمانی نیز، نیازمند اطلاع از خصوصیات دقیق آن‌ها در حد سویه است. سویه لاکتوباسیلوس پلانتاروم A7 (GenBank accession number: KC355240.1)، سویه‌ای بومی با قابلیت پروبیوتیکی است که از دستگاه گوارش کودک ایرانی جدا شده است (۹) و خصوصیات پروبیوتیکی از این سویه در مطالعات مختلف مشاهده شده است (۱۳-۱۰). مطالعات قبلی نشان داده که این سویه از مقاومت قابل توجهی نسبت به اسیدهای صفراوی بر خوردار است (۱۰). این خاصیت در مواردی به قابلیت تولید آنزیم هیدرولیز کننده صفرا نسبت داده شده است (۷-۶). نتایج مطالعه‌ای درون زیستی، در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، نشان داد که تلقیح باکتری فوق در رژیم غذایی حیوانات آزمایشگاهی می‌تواند منجر به تغییر فاکتورهای چربی در خون آنها شود که از آن جمله، کاهش LDL در سرم خون موش‌هایی بود که از این باکتری روزانه تغذیه می‌شدند (۱۱). از سوی دیگر، استفاده از این باکتری در شیر و ماست‌سازی به عنوان کشت همراه امکان‌پذیر بوده و نشان داده شده که در صنعت امکان استفاده از این باکتری با قدرت ماندگاری مناسب در محیط تخمیری وجود دارد (۱۲). در صورتی که بسیاری از افراد از مصرف شیر کامل و فراورده‌های آن به دلیل وجود کلسترول پرهیز می‌کنند، کاربرد این باکتری در فراوردهای لبنی تخمیری یا غیر تخمیری می‌تواند در رفع مشکلات عدم مصرف این دسته از مواد غذایی مؤثر باشد. از این رو جهت معرفی این باکتری به عنوان سویه‌ای بومی با قابلیت کاهش کلسترول، اطلاع از مکانیسم و میزان اثرگذاری آن با بررسی میزان کلسترول پیش و پس از رشد باکتری در شیر ضروری به نظر می‌رسید.

روش‌ها

آماده سازی محیط کشت:

محیط کشت MRS (مرک- آلمان) در لوله‌های ۲۰ میلی‌لیتری توزیع و در ۱۲۰ درجه سانتیگراد و فشار ۱/۲

اتمسفر استریل شد. سپس کلسترول محلول در آب (پلی اکسی اتانیل کلستریل سباسیت- شرکت سیگما) حدود ۷۰ تا ۱۰۰ میکروگرم در هر میلیمتر مکعب از محیط کشت افزوده شد. همچنین جهت بررسی اثرگذاری نوع کلسترول به کار گرفته شده، کلسترول الکلی نیز با همان غلظت‌های مطرح شده به محیط‌های مشابه افزوده شد. علاوه بر این، شیر پرچربی (حاوی سه درصد چربی)، و عصاره فیلتر شده ماست دومین محیط کشت مورد آزمایش را تشکیل داد. عصاره فیلتر شده ماست با منظور افزایش غلظت پپتیدهای قابل دسترس و افزایش قابلیت رشد باکتری لاکتوباسیلوس پلنتارم در شیر به شیر افزوده شد.

کشت باکتری:

کشت خالص باکتری لاکتوباسیلوس پلانتارم A7 از کلکسیون میکروبی دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تهیه شد. کشت فعال و تازه باکتری با دو کشت پی در پی ۱۸ ساعته از سلول‌های ذخیره شده فراهم شد. ۱٪ از محیط کشت سلولی تازه در هر یک از محیط‌های آزمایشی مورد استفاده قرار گرفت.

مراحل انجام آزمایش اندازه‌گیری کلسترول:

این آزمایش، شامل جداسازی باکتری‌ها از محیط کشت و شیر بوسیله سانتریفوژ، جداسازی بخش غیرقابل صابونی شدن چربی و اندازه‌گیری اسپکتروفوتومتریک کلسترول بود. در مورد شیر ابتدا طبق روش فلش عصاره ماده چرب استخراج شد. یک میلی‌لیتر محلول هیدرو کسید پتاسیم ۳۳ ٪ و دو میلی لیتر اتانول خالص به یک میلی‌لیتر از محیط کشت بدون سلول یا یک میلی‌لیتر از عصاره فلش شیر افزوده شد. محیط فوق به خوبی مخلوط شده و به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد. پس از سرد شدن، دو میلی‌لیتر آب مقطر و سه میلی لیتر هگزان به مخلوط فوق افزوده شده و به مدت یک دقیقه همگن شد. یک میلی‌لیتر از لایه هگزان تشکیل شده بر سطح این مخلوط، به یک لوله آزمایش خالی منتقل شده و تحت گاز N_2 تبخیر گشت. ماده باقی‌مانده در دو میلی لیتر معرف O- phtalaldehyde حل شده و پس از مخلوط شدن ۰/۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ به مخلوط افزوده و همگن شد. جذب نوری محیط فوق در ۵۵۰ نانومتر پس از گذشت ۱۰ دقیقه قرائت گردید (۱).

یافته‌ها

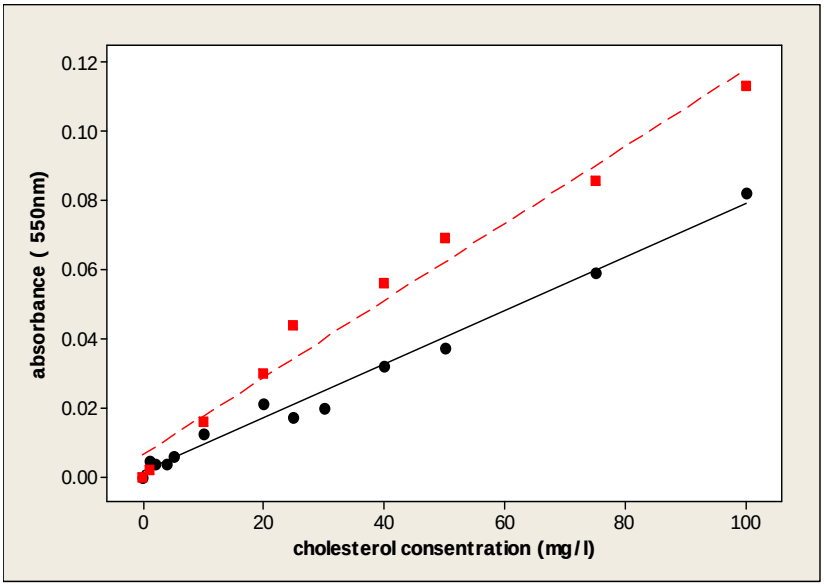
در بخش اول این تحقیق شرایط اندازه‌گیری کلسترول در محیط کشت آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. با مقایسه نمودار ۱ استاندارد جذب در ۵۵۰ نانومتر برای کلسترول در محلول الکی و کلسترول محلول در آب نشان داده شد که تفاوت در نوع کلسترول استاندارد می‌تواند بر روش اندازه‌گیری آن موثر باشد و این روش زمانی که از کلسترول محلول در آب برای اندازه‌گیری کلسترول استفاده می‌شود، به خصوص در غلظت‌های بالا تفاوت قابل توجهی را در نتایج ایجاد می‌کند. با این حال، از آنجایی که برای مشاهده فعالیت کاهش کلسترول در باکتری اختلاف مقدار کلسترول شاخص خواهد بود، می‌توان گفت که این روش همچنان قابل استفاده می‌باشد.

در بخش دوم مطالعه اثر رشد لاکتوباسیلوس پلانتاروم در محیط کشت MRS و شیر پرچرب بررسی شد.

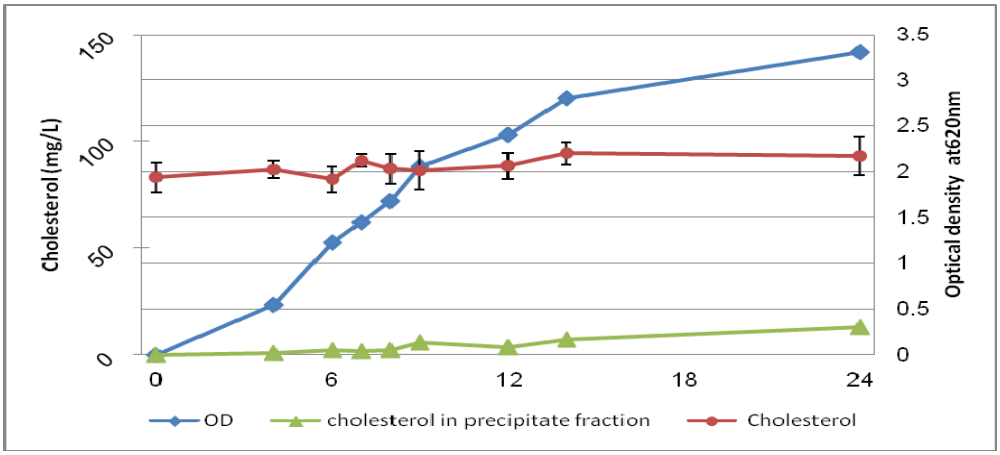
نمودار ۲، نتایج منحنی رشد باکتری در محیط MRS را در مدت ۲۴ ساعت نشان می‌دهد. بر اساس این نمودار سویه لاکتوباسیلوس پلانتاروم A7 ، در طی مدت رشد در حضور ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر از کلسترول محلول در آب روند رشد معمول را نشان داد، به صورتی که پس از گذشت ۲۰ ساعت جذب نوری محیط کشت شده در طول موج ۶۲۰ نانومتر =۳/۵ از باکتری مشاهده شد که این مقدار معادل تعداد $۱۰^{۱۰}$ باکتری در هر میلی لیتر از محیط کشت می‌باشد. در همین نمودار تغییرات غلظت کلسترول در محیط کشت بدون سلول نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود غلظت کلسترول در طول دوره رشد باکتری در محیط تغییری نکرده است، اما در رسوب سلولی در مراحل آخر رشد افزایش نسبی از غلظت کلسترول مشاهده شد.

در نمودار ۲ تغییرات جمعیت باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم A7 در طول ۷۲ ساعت رشد در شیر و تغییر غلظت کلسترول

در همان زمان نشان داده شده است. بر اساس این نمودار، پس از شش ساعت از کشت، جمعیت باکتری به تعداد 10^9 در هر میلی لیتر از شیر رسیده و پس از آن ثابت باقی مانده است. در طول این مدت هیچگونه تغییر محسوسی در غلظت کلسترول در شیر ایجاد نشده است. این نتیجه نشان می‌دهد که خواص این باکتری در کاهش قابل توجه کلسترول و تری‌گلیسیرید در سرم موش‌های آزمایشگاهی، با فعالیت این باکتری در محیط خارج سلولی که طی آن جذب، هضم و یا اتصال قوی یا رسوب کلسترول بر سطح باکتری را می‌توان ردیابی کرد هماهنگی ندارد.



نمودار ۱: مقایسه منحنی استاندارد دو کلسترول محلول در الکل (■) (R^2=97) , و کلسترول محلول در آب (●) (R^2=98.7) . هر عدد از میانگین ۶ تکرار در دو آزمایش مستقل بدست آمده است.



نمودار ۲۱- رشد باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A7 (KC355240.1) در مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت MRS و تغییرات غلظت کلسترول در طی این دوره در محیط کشت بدون سلول و رسوبات سلولی

بحث

نتایج بخش اول این مطالعه نشان داد که روش مورد استفاده در مطالعات مشابه برای اندازه‌گیری کلسترول در محیط کشت آزمایشگاهی روش کاملا دقیقی نیست و در صورتی که تفاوت بین سویه‌های مورد آزمایش در توانایی کاهش کلسترول کمتر از ۱۰ تا ۲۰ میلی‌گرم در لیتر باشد، با این روش به سختی می‌توان سویه‌های برتر را انتخاب نمود. با این حال در برخی از مطالعات این قابلیت تا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شده است. اندازه‌گیری کلسترول در مطالعات مشابه اکثرا از روش رنگ‌سنجی با استفاده از معرف ارتو فتالالدهید صورت گرفته است. این روش توسط رودل و موریس در سال۱۹۷۳برای اندازه‌گیری کلسترول در سرم خون ارزشیابی شده و به عنوان روشی با دقت مناسب معرفی شده است (۱۴). گیلیند و همکاران از این روش برای اندازه گیری کلسترول در محیط کشت آزمایشگاهی لاکتوباسیلوس ها استفاده کردند و پس از آنها دیگران این روش را مکررا به این منظور به کار گرفته‌اند (۴). یکی از مهمترین موارد تفاوت دراین مطالعات نوع کلسترول مورد استفاده به عنوان کلسترول استاندارد است. در روش اولیه از محلول الکلی کلسترول استاندارد با ۹۹٪ خلوص استفاده شده است. در صورتی که با گسترش مطالعات مشابه از مشتقات کلسترول استری شده و محلول درآب استفاده شده است.

در بخش اول این مطالعه مشخص شد که ترکیب استاندارد مورد استفاده می‌تواند بر استخراج کلسترول تاثیر گذار باشد. با این حال در ادامه این مطالعه همچنان از کلسترول محلول در آب استفاده شد. این امر به این دلیل صورت گرفت که نتایج آزمایش بر مبنی کاهش کلسترول توسط باکتری طراحی شده بود و ماهیتی نسبی داشت.

در بخش دوم مطالعه مشخص شد که باکتری مورد آزمایش برخلاف تاثیر قابل توجهی که بر کاهش کلسترول در سرم خون موش های آزمایشگاهی گذاشته بود، هیچ گونه اثری بر جذب یا هضم کلسترول در محیط کشت آزمایشگاهی و همچنین در شیر ندارد.

کاهش کلسترول خون با مصرف باکتری‌های لاکتیک به عوامل مختلفی نسبت داده شده است. برخی از این عوامل مربوط به اثر مستقیم باکتری بر کلسترول است و برخی مربوط به اثری که باکتری پس از مصرف در متابولیسم و سنتز کلسترول در بدن ایجاد می کند. جذب و هضم کلسترول و انتقال آن به غشا سلول باکتری و اتصال به آن، تولید آنزیم‌های اثرگذار بر کلسترول و اکساینده آن و تولید برخی از پروتین‌های موثر بر تخریب کلسترول، مکانسیم‌های اصلی است که در گروه اول قرار می گیرند(۱۸-۱۵).

بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که برخی از باکتری‌های لاکتیک در محیط کشت سلولی قادر به کم کردن غلظت کلسترول در محیط هستند. این کار با اندازه‌گیری غلظت کلسترول قبل و بعد از رشد کامل باکتری و معمولا ۲۰ ساعت پس از کشت باکتری در شرایط برون زیستی انجام می شود (۱). در برخی از مطالعات به دنبال این کاهش ، تغییر در الگوی اسیدهای چرب داخل سلول مشاهده شده است و در برخی حتی مشاهده میکروسکوپیک سلول، رسوب و اتصال کلسترول با سطح باکتری را نشان داده است (۱۹، ۲۰).

گروه دوم از مکانیسم‌های کاهنده کلسترول مربوط به اثر گذاری بر متابولسم کلسترول، تولید اسیدهای چرب و تولید آنزیم هیدرولیز کننده نمک‌های صفراوی است. در مورد توانایی هیدرولیز نمک‌های صفراوی می‌توان گفت که این توانایی به تولید اسیدهای چرب غیر مزدوج می‌انجامد و ذکر شده است که اسیدهای صفراوی غیر مزدوج حلالیت کمتری نسبت به انواع مزدوج داشته و کمتر در روده جذب شده و در نتیجه غلظت آنها در کبد و صفرا کاسته شده و بدن برای جبران کمبود آنها از کلسترول خون استفاده می کند(۲۱).

صفرا ترکیبی از ۸۵٪ آب ، ۱۰٪ نمک‌های صفراوی، ۳٪ رنگ‌ها و مخاط، یک٪ چربی، ۰/۷٪نمک‌های معدنی و ۰/۳ ٪ کلسترول می‌باشد. نمک‌های صفراوی، نمک‌های الکترواستاتیک تشکیل شده از اسیدهای صفراوی به همراه یک کاتیون (معمولا سدیم) می‌باشند. مهمترین اسیدهای صفراوی تشکیل دهنده در صفرای انسان تائوروکولیک اسید و

گلیکولیک اسید هستند و حدود ۸۰٪ از اسیدهای صفراوی موجود در صفرای انسان به این دو اسید نسبت داده می‌شود. این دو اسید انواعی از اسیدهای صفراوی مزدوج هستند، به صورتی که اسید چرب غیر مزودج کولیک اسید با یکی از دو اسید آمینه تائورین یا گلیسین از طریق عامل هیدروکسیل گروه کربوکسیل پیوند استری برقرار می‌کند و این دو اسید مزدوج را تشکیل می‌دهد. کولیک اسید ازکلسترول داخل بدن و در کبد تهیه می‌شود. بنابراین وجود آنزیم هیدرولیز کننده اسیدهای صفراوی باعث تشکیل کولیک اسید از مشتقات مزدوج آن شده و کاهش آن در بدن جذب بیشتر کلسترول از خون و مصرف آن در کبد را برای جبران کولیک اسید دفع شده به همراه خواهد داشت(۲۱، ۲).

اثری که باکتری با تولید آنزیم هیدرولیز کننده نمک‌های صفرا بر صفرا می‌گذارد ممکن است که این شرایط را تشدید کند. در مطالعات اولیه خارج سلولی برای ارزیابی میزان قدرت کاهش کلسترول باکتری لاکتیک از ترکیبات صفراوی استفاده شده است. گیلیند و همکاران نشان دادند که بدون وجود صفرا در محیط آزمایش هیچ یک از سویه های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس قادر به کاهش کلسترول در محیط خارج سلولی نبودند، اما در حضور صفرا برخی سویه ها به طور قابل توجهی کلسترول در محیط لوله آزمایش را کاهش دادند (۴). در بسیاری از مطالعات بعدی نیز استفاده از اکسگال که ترکیبی از صفرای گاو می‌باشد، یا اسیدهای صفراوی مختلف به این منظور مطالعه شدند. این امر اگر چه به نظر می‌رسد که برای مشابه‌سازی شرایط آزمایش با محیط داخل بدن صورت گرفته باشد، برخی از مطالعات اشاره کرده‌اند که رسوب همزمان اسیدهای صفراوی با کلسترول بر سطح باکتری بر میزان کاهش کلسترول در محیط اثر گذار است و به این ترتیب نقشی جدا از قابلیت باکتری در تولید آنزیم هیدرولیز کننده صفرا داشته باشد. با این حال بررسی منابع نشان می‌دهد که وجود صفرا در محیط آزمایش تعیین کننده نیست . برای مثال در مطالعه لیونگ و همکاران مشاهده شد که کشت در محیط MRS می‌تواند در کاهش کلسترول محیط موثر باشد ولی اضافه شدن اسیدهایی صفراوی به این محیط در کاهش غلظت کلسترول در محیط اثر قابل توجهی دارد (۱).

در مطالعه دیگری کشت باکتری لاکتو باسیلوس پلانتاروم با منشاء پنیر باعث شد تا کلسترول محیط بین ۸ تا ۱۰٪کاهش پیدا کند (۲۲). توانایی باکتری‌های لاکتیک در شرایط خارج از بدن و در محیط مواد غذایی در برخی از مطالعات مورد توجه قرار گرفته است، وجود چنین سویه‌هایی به عنوان کشت آغازگر در غذاهایی که منبعی از کلسترول محسوب می‌شوند بسیار مفید واقع می‌شود. در مطالعه حاضر ازآنجایی که بررسی فعالیت باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم در غذا برای کاهش کلسترول آن مورد نظر بود، از صفرا یا اسیدهای صفراوی در محیط کشت استفاده نشد. از این رو نتایج به دست آمده در این مطالعه تنها با نتایج مطالعات مشابهی که از صفرا در محیط کشت استفاده نکرده‌اند قابل مقایسه است.

نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر با نتایج برخی مطالعات از جمله آزمایشات گیلیند و همکاران هماهنگ است. آنها در مطالعه خود اشاره کردند که بدون حضور اسیدهای صفراوی هیچ گونه کاهشی در کلسترول محیط ایجاد نمی‌شود. اما با وجود مطالعات اخیر، شاید بتوان گفت که مکانیسم‌های دیگری مانند تولید اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه که در متابولیسم کلسترول در بدن اختلال ایجاد می‌کنند، عامل اصلی تغییرات اثر بخش این سویه در موش‌های آزمایشگاهی بوده است.

نتیجه‌گیری

با توجه به این پژوهش، به نظر می رسد روش رنگ سنجی با استفاده از معرف ارتوفتالالدهید که در مطالعات بسیاری برای اندازه گیری کلسترول در محیط کشت آزمایشگاهی مورد استفاده قرار میگیرد، روش کاملا دقیقی نیست و در صورتیکه تفاوت بین سویه های مورد آزمایش در توانایی کاهش کلسترول کمتر از ۱۰ تا ۲۰ میلی گرم در لیتر باشد، با این روش به سختی می توان سویه های برتر را انتخاب نمود. همچنین این روش به نوع کلسترول مورد استفاده به عنوان

کلسترول استاندارد نیز وابسته است. از طرف دیگر، تاثیر قابل توجه باکتری مورد آزمایش بر کاهش کلسترول در سرم خون موش های آزمایشگاهی و عدم اثرگذاری بر جذب یا هضم کلسترول در محیط کشت آزمایشگاهی و شیر، می تواند به مکانیسم های کاهنده کلسترول از طریق اختلال در متابولسم این ماده در بدن مرتبط باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل از طرح تحقیقاتی مصوب در مرکز تحقیقات امنیت غذایی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان با کد مصوب ۲۸۹۰۲۹ می‌باشد. نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را نسبت به آن مرکز محترم به دلیل فراهم نمودن امکان انجام این پژوهش ابراز می‌نمایند.

References

1. Liong M, Shah NP. Acid and Bile Tolerance and Cholesterol Removal Ability of Lactobacilli Strains. J Dairy Sci 2005; 88: 55-66.
2. Reynier MO, Monet JC, Gerolami A, Marteu C, Crotte C, Monet AM, Mathieu S. Comparative effects of cholic, chenodeoxy cholic and ursodeoxy cholic acids on Micellar solubilization and intestinal adsorption of cholesterol. J Lipid Res 1981; 22: 476-3.
3. Noh DO, Kim SH, Gilliand SE. Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of Lactobacillus ATCC 43121. J Dairy Sci 1997; 80: 3107-13.
4. Gilliand SE, Walker DK. Factors to consider when selecting a culture of Lactobacillus acidophilus as s dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in human. J Dairy Sci 1990; 73: 905- 11.
5. Dambkodi PC, Gilliand SE. Incorporation of cholesterol in to cellular membrane of Bifidobacterium Longum. J Dairy Sci 1998; 81: 1818-24.
6. Piston RL, Gilliand SE. Influence of frozen and subsequent refrigerated storage in milk on the ability of L. acidophilus to assimilate cholesterol. Cult Dairy prod J 1999; 29: 9-19.
7. Dashkevicz MP, Feighner SD. Development of a differential medium for bile salt hydrolase-active Lactobacillus spp. Appl Environ Microbiol 1989; 55: 11-16.
8. Pereira D IA, Gibson GR. cholesterol assimilation by Lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. Appl. Environ. Microbiol.l.2002, 68: 4686-4693.
9. Mirlohi M, Soleimanian zad S, Zeinodin M. Identification of lactobacilli from fecal flora of Iranian infants. Iran J Pediatr 2008; 357-63.
10. Fazeli H, Sameti A. (Antimicrobial effect of lactic probiotics isolated from the intestinal flora of children against common gastrointestinal pathogens). Iran J Infect Dis 1387; 42: 25-29. [In Persian].
11. Fazeli H, Moshtaghian J, Mirlohi M, Shirzadi M. Reduction in lipid serum parameter by incorporation of a native strain of Lactobacillus plantarum A7 in mice. IJDLD 2010; 9: 1-7.
12. Mirlohi M, Soleimanianzad S, Dokhani Sh, Sheikh-Zeinodin M. Microbial and physiochemical changes in yoghurts containing different Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus strains in association with Lactobacillus plantarum as an adjunct culture. Int J Dairy Tech 2014; 67: 246–54.
13. Mirlohi M, Soleimanian zad S, Dokhani Sh, Sheikh-Zeinodin M. Investigation of acid and bile tolerance of native lactobacilli from fecal samples and commercial probiotics through growth and survival studies. Iran J Biotechnol 2009; 7(4): 233-40.
14. Rudel LL, Morris MD. Determination of cholesterol using O- phthalaldehyde. J Lipid Res 1973; 14: 364-6.
15. Kim Y, Whang JY, Whang KY, Oh S, Kim SH. Characterization of the cholesterol reducing activity in a cell-free supernatate of Lactobacillus acidophilus ATCC43121. Biosci Biotechnol Biochem 2008; 72: 1483-90.
16. Lichtenstein AH, Goldin B. Lactic acid bacteria and intestinal drug and cholesterol metabolism. In: Salminen S, Wright AV, Ouwehand A, editors. Lactic acid bacteria microbial and functional aspects. 3th ed. New York: Marcel Dekker; 2004. p. 507-14.
17. Ooi L, Liong MT. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: A review of in vivo and in vitro findings. Int J Mol Sci 2010; 11: 2499-522.
18. Ahire JJ, Bhat AA, Thakare JM, Pawar PB, Zope DG, Jain RM, et al. Cholesterol assimilation and biotransformation by Lactobacillus helveticus. Biotechnol Lett 2012; 34: 103-7.

19. Dambekodi PC, Gilliland SE. Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of bifidobacterium longum. J Dairy Sci 1998; 81: 1818-24.
20. Noh DO, Kim SH, Gilliland SE. Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of lactobacillus acidophilus ATCC 43121. J Dairy Sci 1997; 80: 3107-13.
21. Pereira DI, McCartney AL, Gibson GR. An In vitro study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing lactobacillus fermentum strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. Appl Environ Microbiol 2003; 69: 4743-52.
22. Brashears MM, Gilliand SE, Buck LM. Bile salt deconjucation and cholesterol removal from media by Lactobacillus casei. J Dairy Sci 1998; 81: 2103-10.

Effect of Lactobacillus plantarum A7 (KC355240.1) on cholesterol-level in vitro

Golnoush Madani[1], Maryam Mirlohi[2], Mahmood Yahay[3]

Original Article

Abstract

Background: Although lowering of food cholesterol is an effective way to reduce blood cholesterol, but recently some effective health and bioactivity characteristics of the milk fat components have been identified, so by decreasing the use of milk fat, an important source of fat-soluble vitamins and bioactive components of milk is limited. Recent Studies have shown that the growth of lactic acid bacteria in milk can be effective in reducing the harmful fat in milk. Before introduction of *Lactobacillus plantarum* A7 (which has different probiotic properties) as a native species with the ability to reduce cholesterol level, it was necessary to know its mechanism of action.

Methods: The strain was cultured in MRS medium and whole milk containing 70 to 100 µg/ml of water-soluble cholesterol. By isolating the bacteria from the culture medium or milk by centrifugation, isolation of non-fat saponify part of milk and cholesterol Spectrophotometric measurement were performed.

Findings: The results indicated that the difference in standard cholesterol can be effective on measuring method. Cholesterol concentration did not change during the growth of bacteria in the media and properties of the bacterium in significant reduction of serum cholesterol and triglycerides in mice were not coordinated with activity of bacteria in the extracellular environment and its absorption, digestion or strong binding to the bacterium surface.

Conclusion: This study showed that the method used in studies for measuring cholesterol in the medium is not entirely accurate and if the difference between the tested strains' ability to reduce cholesterol is less than 10 to 20 mg per liter, this method can hardly select the best strains. Probably other mechanisms such as production of short chain fatty acids, which can cause interference on cholesterol metabolism in the body, were the main cause of the effectiveness of this strain in laboratory rats.

Keywords: Native strain of Lactobacillus plantarum A7, O-phtalaldehyde, Spectrophotometric measurement, Cholesterol

Citation: Madani Gh, Mirlohi M, Yahay M. **Effect of Lactobacillus plantarum A7 (KC355240.1) on cholesterol-level in vitro**. J Health Syst Res 2013; Nutrition supplement:1621-1629

Received date: 19/08/2013 **Accept date: 14/10/2013**

1. MSc, Food Security Research Center and Department of Food Science & Technology, School of Nutrition & Food Science, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2. Assistant Professor of food science and technology, Food Security Research Center and Department of Food Science & Technology, School of Nutrition & Food Science, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran (Corresponding Author) Email: m_mirlohi@hlth.mui.ac.ir
3. BSc. Food Security Research Center and Department of Food Science & Technology, School of Nutrition & Food Science, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran