**(مقاله پژوهشی)**

# مقایسه روند تغییرات اسیدلینولئیک کونژوگه و زنده مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی در خامه استریل تخمیری و غیر تخمیری سین بیوتیک طی زمان نگهداری

**آتوسا فرخ[۱]، محمدرضا احسانی[۲*]، نسرین مویدنیا[۳]، رضا عزیزی نژاد[۲]**

۱- دانشجوی دکترای علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- گروه علوم و صنایع غذایی ، دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع و مکانیک، واحد قزوین، دانشگاه آزاد اسلامی، قزوین،ایران .

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۰۱ تاریخ پذیرش:۱۳۹۶/۱۰/۲۶

## چکیده

هدف از این پژوهش،بررسی اثرسطوح مختلف اینولین (صفر، ۱/۵ و ۳ درصد وزنی ـ وزنی) و باکتری های پروبیوتیک شامل لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی برویژگیهای شیمیایی (pH و اسیدیته)، میزان اسید لینولئیک مزدوج و شمارش پروبیوتیک های مورد استفاده در فرمولاسیون خامه استریل تخمیری و غیرتخمیری طی روزهای اول ، پانزدهم و سی اُم در دمای (۵-۴درجه سانتی گراد)بود. نتایج نشان داد که با افزایش زمان ماندگاری نمونه های خامه، مقادیر pH کاهش و اسیدیته افزایش یافت. افزودن اینولین سبب ایجادتغییرات معنی داری برمیزانpH،اسیدیته و قابلیت زیستی سویه های پروبیوتیک شد. با افزایش سطح اینولین تا ۳ درصد، pH نمونه های خامه کاهش و اسیدیته و شمارش پروبیوتیک های مذکور افزایش یافت که این افزایش در مورد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس معنی دار بود، اگرچه تیمار حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، بالاترین میزان اسیدیته را داشت. با افزایش سطح اینولین در فرمولاسیون خامه های سین بیوتیک، میزان اسیدیته افزایش یافت و تفاوت تمام تیمارها با هم کاملاً معنی دار بود ($p<0.05$). با افزایش زمان نگهداری تا روز سی اُم، مقادیر اسیدیته تیمارهای غیرتخمیری حاوی سویه های پروبیوتیک تغییری نشان نداد و تفاوت معنی داری نیز بین تیمارها وجود نداشت ($p<0.05$). بین تیمارهای غیرتخمیری حاوی سویه های پروبیوتیک و سطوح مختلف اینولین، تفاوت معنی داری از نظر آماری برای اسیدیته وجود نداشت. با گذشت زمان نگهداری از روز اول تا سی اُم، مقادیر اسید لینولئیک مزدوج (CLA) در تیمارهای تخمیری افزایش یافت. از بین تیمارهای غیر تخمیری، میزان CLA تولید شده توسط تیمار حاوی لاکتوباسیلوس کازئی و ۳ درصد اینولین و نمونه کنترل از روز اول تا پانزدهم افزایش یافت. تعداد پروبیوتیک ها در تیمارهای غیرتخمیری به شکل معنی داری کمتر از این تعداد در تیمارهای تخمیری است. در هر دو شکل تخمیرشده و تخمیر نشده، تعداد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بیشتر از لاکتوباسیلوس کازئی بود. افزایش سطح اینولین اثر معنی داری بر افزایش تعداد پروبیوتیک ها داشت.نتایج نشان داد که افزودن پری بیوتیک هایی مانند اینولین می تواند نقش مهمی را در افزایش زنده مانی پروبیوتیک ها و بهبود ویژگی های شیمیایی خامه نظیر اسیدیته و pH ایفا نماید.

**واژه های کلیدی**: اسید لینولئیک مزدوج، اینولین، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس کازئی، خامه.

*مسوول مکاتبات: atoosafarrokh@gmail.com

## ۱- مقدمه

خامه قسمتی ازشیراست که ازنظرمقدارچربی شیرنسبتاًغنی بوده،باعمل خامه گیری ازشیرجداشده وبه حالت امولسیون چربی در شیربدون چربی میباشد. خامه براساس فاکتورهایی نظیرنوع فرآوری حرارتی،درصدچربی،بازساخته یاباز ترکیب بودن، طبیعی،اسیدی یاتخمیری بودن وغیره به انواع مختلفی طبقه بندی می شود (۱). امروزه گرایش زیادی به مصرف مواد غذایی فراسودمند[1]یعنی غذاهای دارای ارزش دارویی و تغذیه ای ویژه علاوه بر خواص تغذیه ای پایه، به وجود آمده است (۲۸). از مهمترین مواد غذایی فراسودمند می تواند به غذاهای حاوی میکروارگانیسم های پروبیوتیک اشاره کرد. پروبیوتیک ها میکروارگانیسم های زنده ای هستند که در مقادیر کافی اثرات بسیار مثبتی روی سلامت میزبان می گذارند. لاکتوباسیلوس ها و بیفیدوباکترها از مهمترین جنس های پروبیوتیک مورد استفاده در مواد غذایی می باشند (۸، ۱۰). در بین گونه های جنس لاکتوباسیلوس،لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بهترین و مهمترین باکتری مورد استفاده به تنهایی یا در ترکیب با باکتری های دیگر به عنوان باکتری تخمیر کننده و پروبیوتیک می باشد (۱۳).این باکتری در مقایسه بالاکتوباسیلوس لاکتیس[2]، لاکتوباسیلوس کازئی[3]، لاکتوباسیلوسپاراکازئی[4]، لاکتوباسیلوس رامنوزوس[5]، بیفیدوباکترها[6]و باکتری های سنتی ماست، مقاومترین گونه به شیره معده و نمک های صفراوی است (۳۴). لاکتوباسیلوساسیدوفیلوس برای رشد به محیط مغذی کاملی شامل اسیدهای آمینه فراوان، ویتامین ها، فاکتورهای رشد و کربوهیدرات های قابل تخمیر نیاز دارد (۲۳). لاکتوباسیلوس کازئییکی دیگر از پروبیوتیک های مهم در فرآورده های غذایی است که بیشترین قابلیت بقاء را در فرآورده های تخمیری لبنی به آن نسبت می دهند. این باکتری بیشتر از بقیه لاکتوباسیل های یافت شده در شیرهای تخمیری قادر به تخمیر طیف وسیعی از کربوهیدرات ها است (۳۲).به منظور افزایش میزان زنده مانی پروبیوتیک ها در سیستم های درون زیست[7] و برون زیست[8]، از ترکیبات پری بیوتیک استفاده می شود (۳). از مهمترین پری بیوتیک های طبیعی می توان به فروکتو- الیگوساکاریدها (FOSs)[9] اشاره کرد. این ترکیبات از نظر شیمیایی بتا ـ دی ـ فروکتان [10]هستند که چنانچه درچه پلیمری شدن آنها ۶۰-۲۰ باشد، اینولین نامیده می شوند. در میان ترکیبات FOS، اینولین بیشترین اثر را دارد (۱۷). اینولین دارای پیوند بتا (۱-۲) بوده و تقریباً تمام مولکول های آن به واحدهای گلوکز ختم می شود. واحدهای تشکیل دهنده آن، فروکتوز می باشد (۳۳). اینولین توسط فلور میکروبی موجود در روده بزرگ انسان تخمیر شده و تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیرو اسید بوتیریک می کند (۱۶، ۱۹، ۳۰). به آن دسته از مواد غذایی که به طور همزمان حاوی پروبیوتیک های زنده و ترکیبات پری بیوتیک هستند در اصطلاح «سین بیوتیک» می گویند (۲۱، ۲۹). هدف از این پژوهش ارزیابی روند تغییرات شیمیایی و زنده مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی در خامه استریل تخمیری و غیرتخمیری حاوی اینولین طی زمان نگهداری در در دمای ۴ درجه سانتی گراد بوده است.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مواد

خامه استریل ۳۰ درصدچربی از شرکت صنایع شیر ایران (پگاه)، سویه خالص لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس-La5 ولاکتوباسیلوس کازئی- ۴۳۱ هر دو به صورت خالص و خشک شده انجمادی از نمایندگی شرکت کریستین

1-Functional food
2-Actobacillus lactis
3-Lactobacillus casei
4-Actobacillus paracasei
5-Lactobacillus rhamnosus
6-Bifidobacteria

7-In vivo
8-In vitro
9-Fructo-oligosaccharides
10-β-D-fructan

هانسن(دانمارک) اینولین از شرکت سیگما آلدریچ (آمریکا)، گاز پک، محیط کشت Man Rogosa Sharpe (MRS) agarو قرص های آماده نمک رینگر همگی از شرکت مرک (آلمان) تهیه شد. مهمترین تجهیزات مورد استفاده شامل انکوباتورمدلED50ساخت شرکت بایندر(آلمان)، اتوکلاو ساخت شرکت هیرایما (ژاپن)، ترازوی آنالتیک با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم (شرکت کرن، آلمان) و pH متر مدل ۷۳۰ ساخت شرکت WTW (آلمان) ، سانتریفوژ یخچالدارپرکین المرمدل Z آمریکا بود.

**۲-۲- روش ها**

**۲-۲-۱- آماده سازی میکروارگانیسم ها**

سویه های پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئیبه میزان مقدار ۱ گرم از آنها به ۱۰۰ میلی لیتر از محیط MRS broth تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۶ تا ۸ ساعت گرمخانه گذاری شد، تا کشت پروبیوتیکی آماده سازی گردد. در پایان، توده زیستیحاصل به وسیله سانتریفوژ یخچال دار در g ×۳۰۰۰ برای مدت۱۰ دقیقه ودمای۴ سانتی گرادجداسازی و در دو مرحله با محلول استریل ۰/۱ درصد پپتون واتر شسته شده و در دمای ۴ سانتی گرادنگهداریشد تا از آن جهت تلقیح مستقیم استفاده گردد .جهت نمونه های تخمیری بعد از تلقیح به مدت ۴-۵ ساعت دردمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گزاری و پس از آن به یخچال انتقال یافتند(۷، ۲۲).

**۲-۲-۲- مشخصات تیمارهای مورد بررسی**

مشخصات تیمارهای مورد بررسی در پژوهش حاضر به شکل زیر بود:

**جدول۱-مشخصات تیمارهای مورد بررسی**

| کد نمونه | مشخصات |
|---|---|
| C | شاهد (بدون اینولین) |
| T1 | نمونه تخمیر نشده حاوی لاکتوباسیلوس کازئی بدون اینولین |
| $T_3$ | نمونه تخمیر نشده حاوی لاکتوباسیلوس کازئیو ۱/۵ درصد اینولین |
| $T_5$ | نمونه تخمیرنشده حاوی آزاد لاکتوباسیلوس کازئیو ۳ درصد اینولین |
| T7 | نمونه غیرتخمیریحاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس وفاقد اینولین |
| $T_9$ | نمونه تخمیرنشده حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوسو ۱/۵ درصد اینولین |
| $T_{11}$ | نمونه تخمیرنشده حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوسو ۳ درصد اینولین |
| $S_1$ | نمونه تخمیری حاوی لاکتوباسیلوس کازئی بدون اینولین |
| $S_3$ | نمونه تخمیری حاوی لاکتوباسیلوس کازئیو۱/۵ درصد اینولین |
| $S_5$ | نمونه تخمیری حاوی لاکتوباسیلوس کازئیو ۳ درصد اینولین |
| S7 | نمونه تخمیری حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوسفاقد اینولین |
| $S_9$ | نمونه تخمیری حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوسو ۱/۵ درصد اینولین |
| $S_{11}$ | نمونه تخمیری حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوسو ۳ درصد اینولین. |

**۲-۵- آزمایشات**

**۲-۵-۱- اندازه گیری pH و اسیدیته خامه**

pH خامه در طول ۳۰ روز نگهداری و طی روزهای اول، پانزدهم و سی اُم با استفاده از دستگاه pH متر اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری اسیدیته با استفاده از روش پتانسیومتری مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۲۶۸۲ انجام گردید.

**۲-۵-۲- آزمون میکروبی**

برای شمارش لاکتوباسیلوسها از محیطMRS agar استفاده شد و در نهایت،نتایج به صورت میانگینCfu/mlخامه بیان گردید (۲۷).

**۲-۵-۳- اندازی گیری اسید لینولئیک مزدوج**

تعیین میزان اسید لینولئیک مزدوج تولید شده با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی و مطابق با استانداردAOAC به شماره 969.33 انجام گرفت.(۲۶)

**۲-۵-٤-تجزیه و تحلیل آماری**

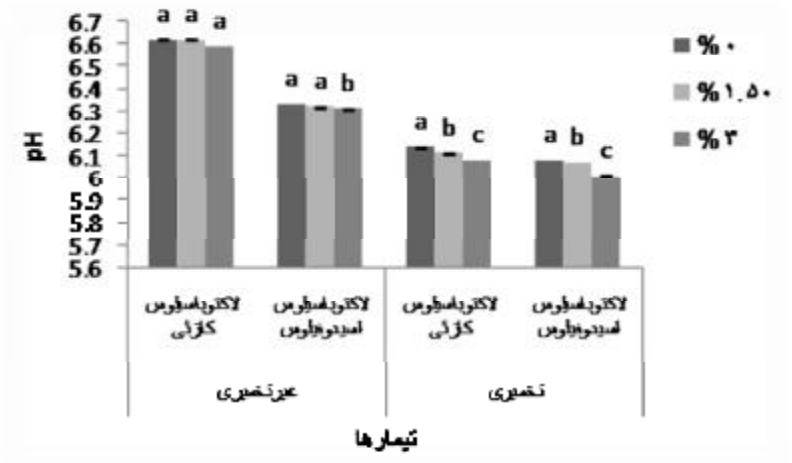
داده های بدست آمده در پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD)[1]انجام شده و میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن[2] در سطح ۵ درصد مقایسه گردید. کلیه آزمونها در سه تکرار و طی روزهای اول، پانزدهم و سی اُم انجام شد.برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ و جهت ترسیم نمودارها از نرم مایکروسافت اکسل (۲۰۱۰) استفاده گردید.تست نرمال بودن داده ها به روش کمولوگروف اسمیرنوف با نرم افزار آماری مذکور انجام شد. متغیرهای فرآیند شامل اینولین هر کدام در ۳ سطح (۰، ۱/۵ و ۳ درصد)و زمان نگهداری در ۳ سطح (۱،۱۵،۳۰ روز) می باشد که در سه تکرار انجام شد.برای ترسیم نمودارها نیز از نرم افزار Microsoft Excel 2010 استفاده شد.

## ۳- نتایج و بحث

**۳-۱- بررسی روند تغییرات pH**

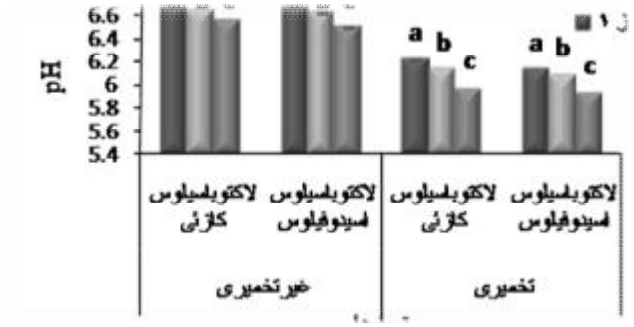
در فرآورده های تخمیری، pH یکی از فاکتورهای مهم طی تخمیر و زمان نگهداری است (۳۰). ثابت شده است که با افزودن باکتری های پروبیوتیک به فرآورده تخمیری قبل و بعد از مرحله تخمیر، هم سرعت رشد و تکثیر باکتری ها کاهش می یابد و هم بر میزان افت این باکتری ها طی دوره نگهداری در یخچال افزوده می شود، ضمن اینکه میزان pH فرآورده نیز کاهش می یابد (مرتضویان و سهراب وندی، ۱۳۸۵). بررسی های متعدد نشان داده است که اینولین موجب افزایش تحریک و رشد باکتری های پروبیوتیک و باکتری های آغازگر می شود، بنابراین، مقادیرpHبا گذشت زمان نگهداری، کاهش خواهد یافت که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت (۴). شکل۱، اثرات متقابل اینولین، فرایند تخمیر و باکتری های پروبیوتیک بر مقادیر pH را نشان می دهد. مطابق شکل ۱، مقادیر pH نمونه های تخمیری در مقایسه با غیر تخمیری به شکل معنی داری کاهش یافته است که نشان دهنده نقش مهم فرایند تخمیر در خامه می باشد.

1- Completely randomized design
2- Duncan test



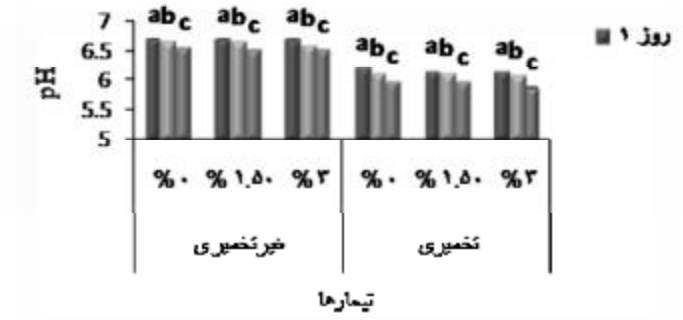

**شکل ۱- اثرات متقابل اینولین، فرایند تخمیر و باکتری های پروبیوتیک بر مقادیر pH**

پائین ترین میزان pH مربوط به نمونه خامه سین بیوتیک تخمیری (حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و ۳ درصد اینولین) بود که با تیمار تخمیری حاوی لاکتوباسیلوس کازئی و ۳ درصد اینولین تفاوت معنی داری نداشت، اما تفاوت آن با سایر تیمارها کاملاً معنی دار بود ($p<0.05$). در تیمارهای تخمیری، با افزایش سطح اینولین از صفر به ۳ درصد، مقادیر pH کاهش یافت. تیمار غیرتخمیری فاقد اینولین و حاوی لاکتوباسیلوس کازئی دارای بالاترین میزان pH بود که تفاوت معنی داری با سایر تیمارهای حاوی این سویه پروبیوتیک نداشت ($p>0.05$) (شکل۱). از مهمترین فاکتورهایی که موجب کاهش قابلیت بقای پروبیوتیک ها می شود، pH پائین و اسیدیته بالای فرآورده های پروبیوتیک تخمیری است. به طور کلی اکثر سوش های بیفیدوباکتریوم نسبت به pH< ۴/۶ حساس هستند و بهتر است pH فرآورده نهایی بالاتر از ۴/۶ نگهداشته شود. اسیدیته بالا در شرایط آزمایشگاه و در بدن موجود زنده بر قابلیت بقاء پروبیوتیک ها اثر منفی دارد (۱۱). در شکل ۲ اثرات متقابل زمان، فرایند تخمیر و باکتری های پروبیوتیک بر مقادیر pH مشخص شده است.




**شکل ۲- اثرات متقابل زمان، فرایند تخمیر و باکتری های پروبیوتیک بر مقادیر pH**

در تمام تیمارهای مورد بررسی، با افزایش زمان نگهداری، میزان pH کاهش یافت. پائین ترین و بالاترین میزان pH به ترتیب متعلق به تیمار تخمیری حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در روز سی اُم و تیمار غیرتخمیری محتوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در روز اول بود که تفاوت معنی داری با تیمارهای مورد بررسی در روز اول نداشت ($p>0.05$)(شکل۲). ویژگی های گونه ای و نژادی باکتری های پروبیوتیک در انتخاب آنها به عنوان کشت پروبیوتیک در فرآورده های مربوطه حائز اهمیّت است. گزارش شده است کهpH کمتر از ۴/۴ در زمان تخمیر و طی نگهداری، تعداد باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را به اندازه ۳ تا ۴ سیکل لگاریتمی پس از دو هفته کاهش می دهد (۱۲).مطابق شکل ۳،با افزایش زمان ماندگاری و افزایش سطح اینولین، pH تمام نمونه های خامه کاهش یافت. این نتیجه با گزارشات برخی از محققین همخوانی دارند. به عنوان مثال، Donkor (۲۰۰۷) بیان داشت که pH شیر غنی شده با فاز عبوری فرایند تولید پنیر (تراویده) در حضور اینولین کاهش معنی داری می یابد. همچنین افزودن اینولین به ماست پروبیوتیک موجب افزایش تولید اسیدلاکتیک و در نتیجه کاهش pH می گردد.



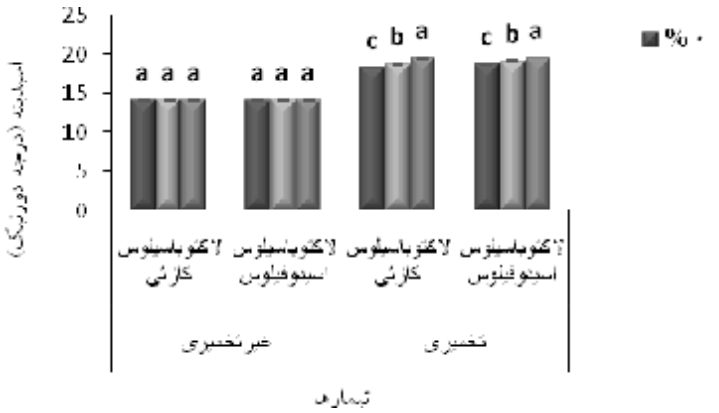

**شکل ۳- اثرات متقابل زمان، سطوح مختلف اینولین و فرایند تخمیر بر مقادیر pH**

نتایج مطالعات اکسوان[1] (۲۰۰۹)نشانداد که جایگزینی پودرشیرخشک باایزوله پروتئین سویا در نسبت های صفرتا۷۵درصد، میزانpHبستنی را نسبت به نمونه شاهد تغییر نداد، اما pH نمونه بستنی با۱۰۰درصدجایگزینی به طور معنی دار بیشتر از سایر نمونه ها بود (۵). تولید اسید لینولئیک مزدوج به تبدیل آنزیمی اسید لینولئیک وابسته است که احتمالاً به pH موجود حساس می باشد. در حین رشد سلول های باکتریایی در خامه، pH محیط توسط فرایند تخمیر اسید لاکتیکی در تیمارهای تخمیر شده به تدریج کاهش یافته و سرانجام تولید این اسید چرب توسط سلول ها متوقف می گردد. تولید اسید و ایجاد یک محیط اسیدی در خامه برای تولید اسید لینولئیک مزدوج نامطلوب ارزیابی شده است.

### ۳-۲- بررسی روند تغییرات اسیدیته

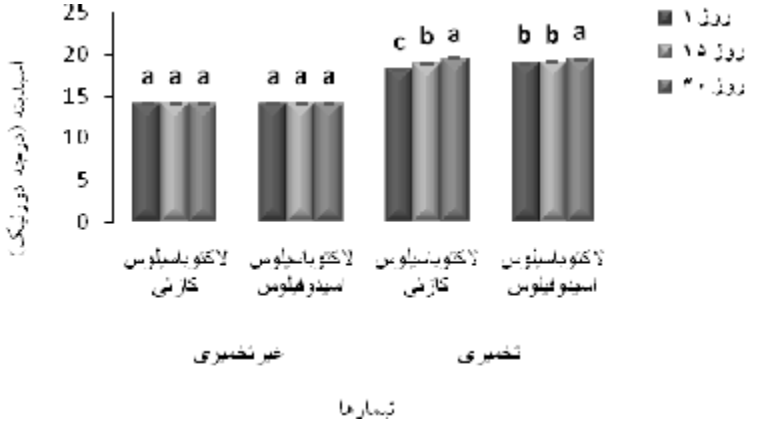
بین تیمارهای غیرتخمیری حاوی سویه های پروبیوتیک و سطوح مختلف اینولین، تفاوت معنی داری از نظر آماری برای اسیدیته وجود نداشت (شکل۴).

1-Akesowan




**شکل ٤- اثرات متقابل سطوح مختلف اینولین، فرایند تخمیر و باکتری های پروبیوتیک بر مقادیر اسیدیته**

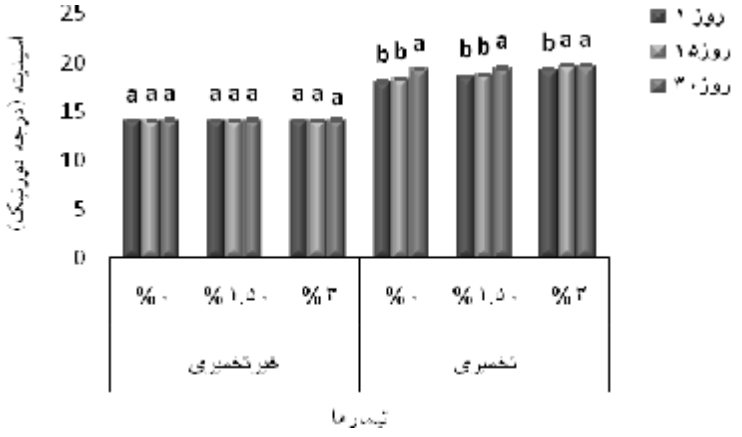
این نتیجه طبیعی و قابل انتظار است، زیرا تولید اسید لاکتیک توسط باکتری های آغازگر در فرآورده هایی نظیر ماست و پروبیوتیک ها در محصولاتی نظیر پنیر و خامه پروبیوتیک طی زمان تخمیر اتفاق می افتد. در تیمارهای تخمیری، نتایج کاملاً متفاوت بود، به طوری که با افزایش سطح اینولین در فرمولاسیون خامه های سین بیوتیک، میزان اسیدیته افزایش یافت و تفاوت تمام تیمارها با هم کاملاً معنی دار بود ($p<0.05$). علاوه بر فرایند تخمیر، اینولین در تیمارهای تخمیری به عنوان ترکیبی پری بیوتیک موجب تحریک رشد و فعالیت اسیدسازی باکتری های پروبیوتیک به ویژه لاکتوباسیلوس کازئی می شود. توان اسید سازی بالای این سویه پروبیوتیک در سیستم های برون زیست به اثبات رسیده است (۱۵، ۳۲). در شکل ۵ اثرات متقابل زمان، فرایند تخمیر و باکتری های پروبیوتیک بر مقادیر اسیدیته مشخص شده است.




**شکل ۵- اثرات متقابل زمان، فرایند تخمیر و باکتری های پروبیوتیک بر مقادیر اسیدیته**

بر این اساس، با افزایش زمان نگهداری تا روز سی اُم، مقادیر اسیدیته تیمارهای غیرتخمیری حاوی سویه های پروبیوتیک تغییری را نشان نداد و تفاوت معنی داری نیز بین تیمارها وجود نداشت ($p<0.05$). در تیمارهای تخمیری، با افزایش زمان

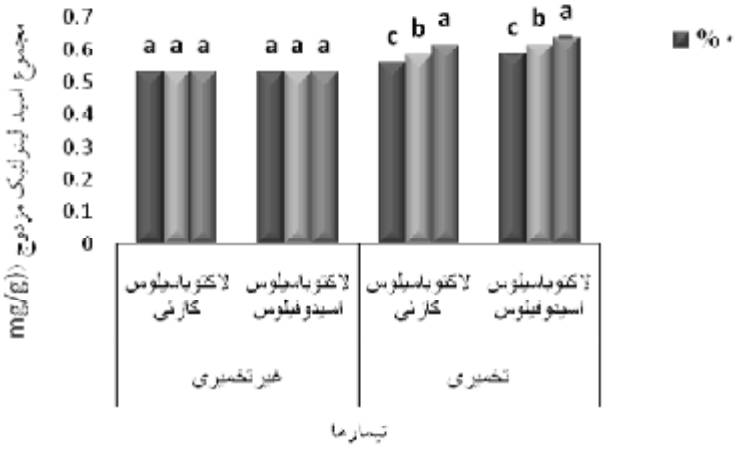
نگهداری، میزان اسیدیته افزایش یافت، اما این افزایش در تیمار حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس طی روزهای اول تا پانزدهم معنی دار نبود ($p>0.05$). رشد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در pH کمتر از ۴ تا حدود زیادی کاهش می یابد و در مواردی متوقف می شود. در مورد اسیدیته، گزارش شده است که حساسیت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به اسید در اسیدیته بیش از ۰/۶ درصد افزایش می یابد. لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس مقاومت بیشتری به اسید نسبت به بیفیدوباکتریوم بیفیدوم دارد،بنابراین انتخاب گونه های مقاوم به اسید از اهمیّت خاصی برخوردار است. همچنین گونه های لاکتوباسیلوس کازئی نسبت به لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس حساسیت کمتری به اسید دارد (۱۲).مطابق شکل ۶، افزودن اینولین در سطوح مختلف و طی زمان نگهداری از روز اول تا سی اُم، تأثیر معنی داری بر میزان اسیدیته در تیمارهای غیرتخمیری نداشت. در مقابل، در تیمارهای تخمیر شده، با افزایش زمان نگهداری و افزایش سطح اینولین تا ۳ درصد، مقادیر اسیدیته نیز افزایش یافت، اگرچه در تیمارهای محتوی ۱/۵ درصد اینولین طی روزهای اول تا پانزدهم و در تیمارهای حاوی ۳ درصد اینولین طی روزهای پانزدهم تا سی اُم از نظر آماری تفاوت معنی داری وجود نداشت ($p<0.05$).




**شکل ٦- اثرات متقابل سطوح مختلف اینولین، فرایند تخمیر و زمان بر مقادیر اسیدیته**

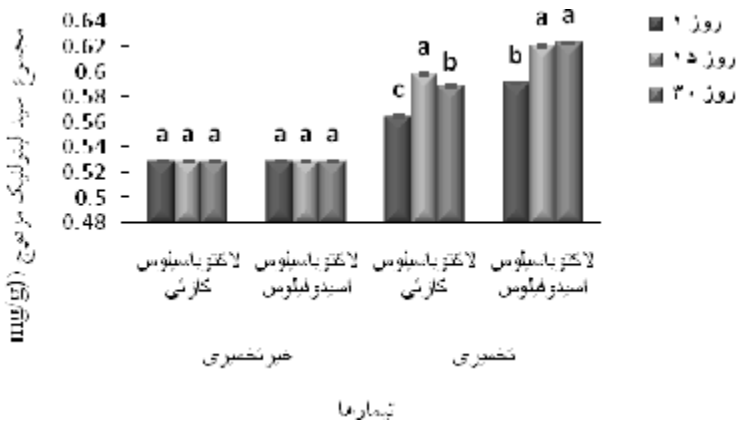
**۳-۳- بررسی روند تغییرات اسید لینولئیک مزدوج**

مطابق شکل۷، بین میزان اسید لینولئیک مزدوج تولید شده توسط تیمارهای غیرتخمیری (حاوی سطوح مختلف اینولین و هر دو سویه پروبیوتیک) تفاوت معنی داری وجود نداشت، در حالی که در تیمارهای تخمیری، با افزایش سطح اینولین میزان اسید لینولئیک مزدوج افزایش یافت و بین تیمارهای حاوی لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس تفاوت معنی داری وجود داشت ($p<0.05$). عوامل مختلفی بر روی تولید اسید لینولئیک مزدوج در مواد غذایی به ویژه فرآورده های لبنی نقش دارند. به عنوان مثال، سطوح بالای اکسیژن موجب افزایش اکسیداسیون با رادیکال آزاد در اسید لینولئیک شده و در نتیجه سطح اسید لینولئیک مزدوج افزایش می یابد. لیپولیز تولید شده توسط آنزیم های باکتریایی نیز به عنوان یکی از فرایندهای مهم در محصولات لبنی به ویژه انواع بر پایه چربی نظیر خامه، در تولید اسیدهای چرب آزاد دخالت دارد و اسید لینولئیک مزدوج نیز یکی از این ترکیبات است که نسبت به انواع استریفیه شده به اکسیداسیون حساس تر است (۲۴).



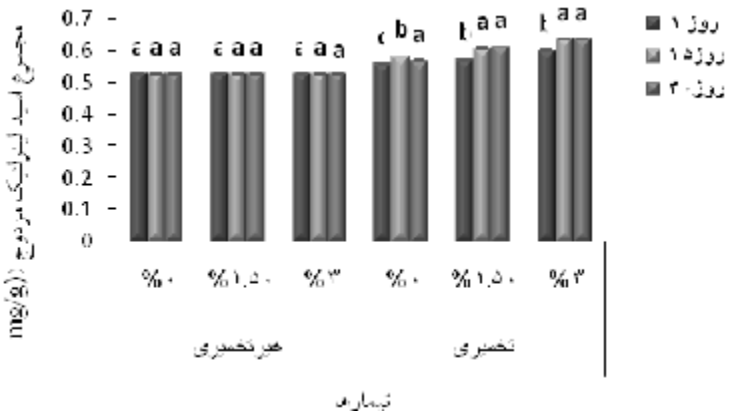

شکل۷- اثرات متقابل سطوح مختلف اینولین، فرایند تخمیر و باکتری های پروبیوتیک بر میزان اسید لینولئیک مزدوج

نتایج نشان داد که فرایند تخمیر و حضور اینولین در تیمارهای تخمیری اثر معنی داری بر میزان تولید اسید لینولئیک مزدوج دارد. اینولین به عنوان ترکیب پروبیوتیک موجب تحریک رشد و فعالیت باکتری های پروبیوتیک مورد استفاده گردید. با افزایش فعالیت این سویه ها، متابولیت های تولیدی نیز افزایش یافت.اسید لینولئیک مزدوج یکی از مهمترین ترکیبات تولید شده توسط باکتری های پروبیوتیک است که با توجه به خواص فراسودمند این اسید چرب، نقش مهمی در افزایش ویژگی های سلامتی بخش مواد غذایی و سلامت مصرف کنندگان دارد. تولید میکروبی اسید لینولئیک با استفاده از کِشت های لاکتوباسیلوس توسط برخی از محققین بررسی شده است. گزارشاتی در دست است که بسیاری از سوش های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتر قادر به تولید اسید لینولئیک مزدوج می باشند. بنابراین، این باکتری ها می توانند به منظور افزایش این اسید چرب در فرآورده های لبنی مورد استفاده قرار گیرند.




**شکل ۸- اثرات متقابل زمان، فرایند تخمیر و باکتری های پروبیوتیک بر مجموع اسید لینولئیک مزدوج**

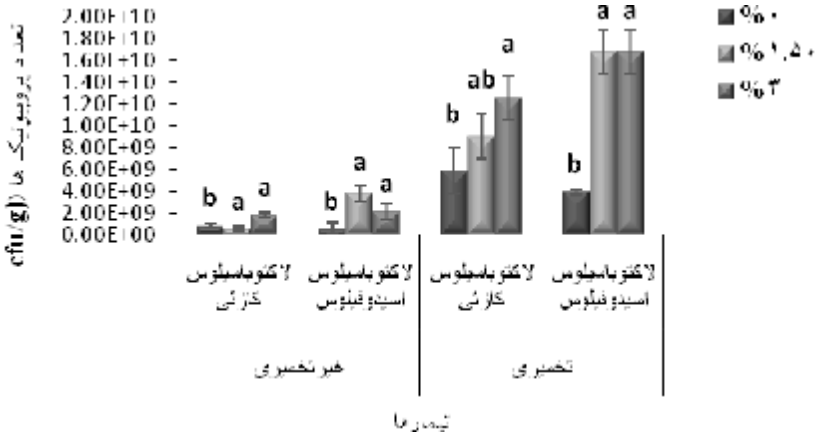
مطابق شکل۸، حضور باکتری های پروبیوتیک در تیمارهای غیرتخمیری طی زمان نگهداری نمونه های خامه، اثر معنی داری بر میزان اسید لینولئیک مزدوج نداشت و تفاوت در تیمار حاوی دو سوش مختلف پروبیوتیک، معنی دار نبود ($p<0.05$). در مقابل، در تیمارهای تخمیری با افزایش زمان ماندگاری، میزان اسید لینولئیک مزدوج تولیدی افزایش یافت و بالاترین میزان تولیدی این اسید چرب در روز سی اُم و متعلق به تیمار محتوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بود. بنابراین، زمان ماندگاری و پروبیوتیک های مورد استفاده، هر دو بر میزان تولید اسید لینولئیک مزدوج مؤثر می باشند. گزارش شده که زمان نگهداری تأثیر معنی داری بر میزان اسید لینولئیک مزدوج در خامه ترش ندارد (۳۴). در مقابل، تحقیقاتی نیز وجود دارد که بیان کرده اند فرآورده های لبنی طی فرایند تولیدشان غالباً دستخوش تخمیر میکروبی می شوند. استفاده از محیط های تخمیری متفاوت، دمای فرایند و یا دوره رسیدگی می تواند در مقدار اسید لینولئیک مزدوج محصول نهایی مؤثر باشد (۱۸). بر اساس نتایج موجود در شکل۹، سطوح مختلف اینولین و عدم تخمیر تأثیری بر میزان اسید لینولئیک مزدوج تیمارهای غیرتخمیری نداشت و تفاوت این تیمارها طی روزهای مورد آزمون (اول، پانزدهم و سی اُم) معنی دار نبود ($p>0.05$). در تیمارهای تخمیرشده، اثر متقابل زمان، تخمیر و اینولین (صفر درصد) در روزهای مورد بررسی معنی دار بود ($p<0.05$)، در حالی که این اثرات در سطوح ۱/۵ و ۳ درصد اینولین طی روزهای پانزدهم و سی اُم معنی دار نبود، اگر چه در تمام تیمارهای تخمیری، افزایش اینولین موجب افزایش میزان تولید اسید لینولئیک شد که دلایل آن مطرح گردید.




شکل۹- اثرات متقابل زمان، فرایند تخمیر و سطوح مختلف اینولین بر مجموع اسید لینولئیک مزدوج

**۳-4- بررسی زنده‌مانی باکتری های پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس)**

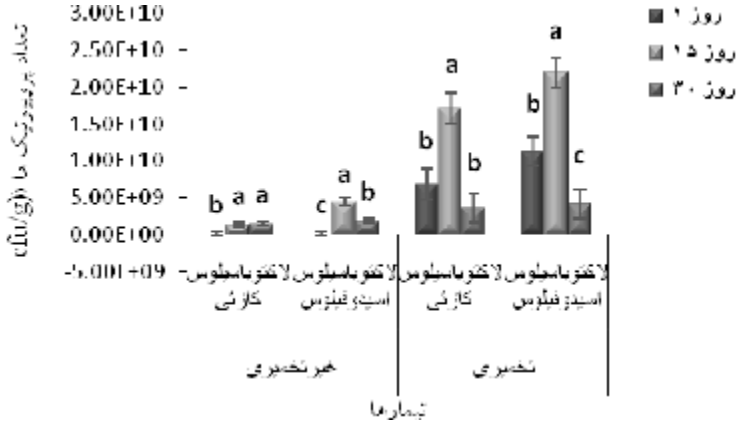
بر اساس شکل۱۰، تعداد پروبیوتیک ها در تیمارهای غیرتخمیری به شکل معنی داری کمتر از این تعداد در تیمارهای تخمیری است.تعداد اولیه پروبیوتیک ها قبل از مرحله نگهداری در یخچال یکی از عواملی است که خود به چند فاکتور نظیر حجم تلقیح، میزان تکثیر در مرحله تخمیر و مرگ و میر طی زمان تولید بستگی دارد. عامل دوم، قابلیت بقاء و زنده مانی پروبیوتیک ها در زمان نگهداری در یخچال است.



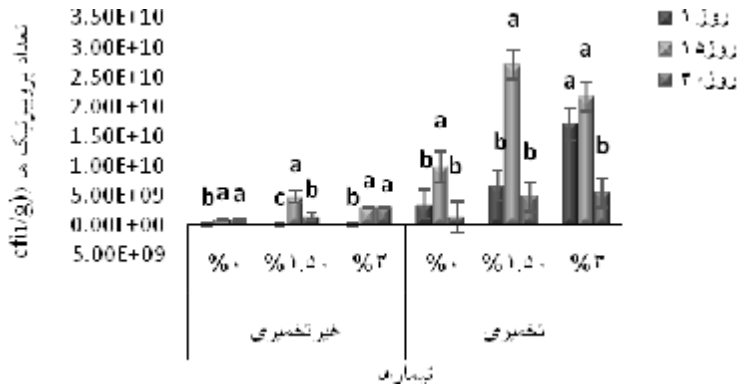

**شکل ۱۰- اثرات متقابل سطوح مختلف اینولین، فرایند تخمیر و باکتری های پروبیوتیک**

در هر دو شکل تخمیرشده و تخمیر نشده، تعداد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بیشتر از لاکتوباسیلوس کازئی بود. در تیمارهای تخمیری، اثرات متقابل اینولین، تخمیر و پروبیوتیک ها معنی دار نبود ($p>0.05$)، اما در تیمارهای تخمیری به جز در تیمارهای حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و سطوح ۱/۵ و ۳ درصد اینولین، این اثرات کاملاً معنی دار بود ($p<0.05$). ضمن اینکه، دو تیمار اخیر بالاترین میزان شمارش را داشتند. بنابراین، افزایش سطح

اینولین اثر معنی داری بر افزایش تعداد پروبیوتیک ها داشت. نتایج مطالعات Chen و همکاران (۲۰۰۵) نشان داد که میزان زنده مانی باکتری‌های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم در شرایط شبیه سازی شده دستگاه گوارشی در صورت استفاده از پری بیوتیک‌ها (فروکتواولیگوساکاریدها) چندین بار بیشتر از شرایط مشابه بدون پری بیوتیک بود که با نتایج این تحقیق اگر چه در محیط برون زیست، مطابقت کامل دارد (۱۲). در تیمار غیرتخمیری حاوی لاکتوباسیلوس کازئی طی روزهای پانزدهم و سی اُم تفاوت معنی داری مشاهده نشد، در حالی که در سایر تیمارهای تخمیرنشده، تفاوت از نظر آماری کاملاً معنی دار بود ($p<0.05$).در مورد تیمارهای تخمیر شده، به جز تیمار حاوی لاکتوباسیلوس کازئی در روز اول و سی اُم، بین سایر تیمارها تفاوت معنی داری وجود داشت ($p<0.05$) و بالاترین تعداد پروبیوتیک مربوط به تیمار حاوی لاکتوباسیلوس کازئی در روز پانزدهم بود. با گذشت زمان از روز پانزدهم تا سی اُم در تیمارهای تخمیر شده، تعداد پروبیوتیک ها کاهش معنی داری داشت (شکل۱۱). مهمترین دلیل را می توان در تولید بیش از حد اسید با گذشت زمان ماندگاری تیمارها طی فرایند تخمیر دانست که در فرآورده های تخمیری به ویژه انواع ماست، به پدیده «بیش اسید سازی» یا «پیش اسید سازی» معروف است (۲۴). این پدیده غالباً به دلیل رشد کنترل نشده آغازگرها و یا پروبیوتیک ها در ماده غذایی تخمیری است که در pH پائین رخ می دهد. زنده مانی پروبیوتیک های مورد بررسی به pH محیط نیز بستگی دارد. گزارشات نشان داده است که لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در pH کمتر از ۴، رشد خوبی ندارد، اگر چه میزان رشد این سویه بهتر از اغلب پروبیوتیک های مورد استفاده در فرمولاسیون فرآورده های لبنی و نیز آغازگرهای ویژه ماست است.بر اساس شکل۱۲، تیمارهای تخمیر شده محتوی سطوح مختلف اینولین، تعداد پروبیوتیک های بیشتری داشتند که این تعداد در روز پانزدهم به بیشترین میزان خود رسید و بعد از آن تا پایان زمان نگهداری، به تدریج کاسته شد تا جایی که تفاوت شمارش پروبیوتیک ها در روز پانزدهم و سی اُم کاملاً معنی دار بود ($p<0.05$). مهمترین دلیل را می توان به حضور اینولین نسبت داد. در واقع اینولین به عنوان یکی از مهمترین ترکیبات پری بیوتیکی، نوعی منبع کربن و انرژی برای باکتری های پروبیوتیک بوده و باعث افزایش بقاء آن ها در محصول می گردد (۲۵).




**شکل ۱۱- اثرات متقابل زمان، فرایند تخمیر و باکتری های پروبیوتیک**




**شکل ۱۲- اثرات متقابل سطوح مختلف اینولین، فرایند تخمیر و زمان بر تعداد باکتری های پروبیوتیک**

در تحقیقی مشابه، گلستانی و همکاران (۱۳۹۵) با بررسی اثر اینولین بر زنده مانی باکتری های پروبیوتیک و خصوصیات فیزیکوشیمیایی و حسی بستنی سینبیوتیک تخمیری و غیر تخمیری گزارش دادند که قابلیت زیستی باکتری های پروبیوتیک نمونه های بستنی حاوی ۲ درصد اینولین به طور معنی داری بالاتر از نمونه های حاوی ۱ درصد اینولین و فاقد آن بود. در این نمونه ها تعداد باکتری های پروبیوتیک در روز اول پس از تولید log cfu/ml ۶/۹ بود که پس از گذشت ۱۶ هفته به log cfu/ml ۶/۸۳ رسید (۲). Akin و همکاران (۲۰۰۷) نیز بستنی سین بیوتیک حاوی اینولین (سطوح ۱ و ۲٪) تولید کرده و اظهار داشتند که افزودن اینولین باعث بهبود زنده مانی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس شده و تعدادشان با افزایش اینولین افزایش پیدا کرد که علت آن به تأثیر پری بیوتیکی اینولین مربوط می باشد (۶). نقش تخمیر را نمی توان در زنده مانی پروبیوتیک های مورد بررسی به ویژه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس نادیده گرفت. در فرآورده های تخمیری، دمای گرمخانه گذاری بر هر دو شاخص مدت زمان تخمیر و قابلیت زیستی پروبیوتیک ها اثر معنادار دارد. دمای بهینه رشد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوسبرابر با $^{o}C$۴۲-۴۰است. تحقیقات نشان داده است که کوتاه شدن زمان تخمیر در صورت استفاده از تلقیح همزمان یک کشت کمکی در کنار باکتری های پروبیوتیک امکان پذیر است. نوع و درصد تلقیح کشت کمکی، ترکیب شیر پایه اولیه (ماده جامد و غنی سازی) و دمای گرمخانه گذاری، سه عامل مهم در رشد باکتریایی و اسید سازی شیر تلقیحی طی گرمخانه گذاری هستند (۳۰).

## ٤- نتیجه گیری

در این پژوهش، اینولین به عنوان ترکیب پری بیوتیک به فرمولاسیون خامه حاویلاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ولاکتوباسیلوس کازئی اضافه شد. نتایج نشان داد که بکارگیری سطوح بالاتر (۳ درصد) اینولین موجب افزایش تعداد باکتری های مذکور بویژه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس شده و اسیدیته و pH نیز به ترتیب افزایش و کاهش می یابد. سطوح بالاتر اینولین موجب تحریک بیشتر پروبیوتیک ها و در نتیجه افزایش فعالیت متابولیکی و اسید سازی آنها می گردد. به همین دلیل، در تیمارهای حاوی اینولین بیشتر، اسیدیته افزایش معنی داری داشت، اگر چه پروبیوتیک ها بویژه سویه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در محیط با اسیدیته بالا هم رشد نموده و تعداد بیشتری را در پایان زمان نگهداری تیمارهای خامه نشان داد.با گذشت زمان نگهداری مقادیر اسید لینولئیک مزدوج در تیمارهای تخمیری افزایش یافت. نتایج نشان داد که فرایند تخمیر و حضور سویه های پروبیوتیک

لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی نقش مهمی در تولید اسید لینولئیک مزدوج دارد. و میتوان از آن به عنوان یک محصول فراسودمند و سین بیوتیک درنظر گرفته شود.

## ۵- منابع


۱. غلامحسین پور،ع.ا.ومظاهری تهرانی،م. ۱۳۹۰. استفاده از کنسانتره پروتئینی شیر در تولید خامه کم چرب و ارزیابی خواص فیزیکوشیمیایی وحسی آن. نشریه پژوهش های علوم و صنایع غذایی ایران، جلد۷، شماره۲، صفحات۱۷۸-۱۷۲.

۲. گلستانی،م.، پوراحمد،ر. و مهدوی عادلی،ح.ر. ۱۳۹۵. اثر اینولین بر زنده مانی باکتری های پروبیوتیک، خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و حسی بستنی سین بیوتیک تخمیری و غیرتخمیری. فصلنامه علوم غذایی و تغذیه، سال سیزدهم، شماره سوم، صفحات۳۲-۲۵

۳. مرتضویان، ا. م. و سهراب وندی، س. ۱۳۸۵، مروری بر پروبیوتیک ها و فرآورده های غذایی پروبیوتیک، انتشارات اتا، تهران.

٤. یگانه زاد، س.، مظاهری تهرانی، م.، شهیدی، ف. و زایر زاده، ا. ۱۳۸۸. بررسی اثر شیر سویا بر زنده ماندن باکتری های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و ویژگی های فیزیکوشیمیایی و ارگانولپتیک ماست پروبیوتیک، مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، شماره (۱).

5. Akesowan. A. 2009. Influence of Soy Protein Isolate on Physical and Sensory Properties of Ice Cream. *Thai Journal of Agricultural Science*, 42(1): 1-6.
6. Akin,M.B., Akin.M.S. andKirmaci, Z. 2007. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. *FoodChemistry*,104: 93-99
7. Allan, P. L., Truelstrp, H. &Daulson. A. T. 2008. Micro structural studies of probiotic bacteria- loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and an hydrous fixation. LWT 41: 101-108.
8. Anal, A. K. and Singh, H. 2007. Recent advanced in microencapsulation of probiotic for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology*, 18: 240-251.
9. Banni, S., Murru, E., Angioni, E., Carta, G.&Melis, M. P. 2002. Conjugated linoleicacid isomers: good for everything. *Sciencesdes Aliments*, 22: 371-380.
10. Buriti, F. C. A., Okazaki. T. Y., Alegro, J. H. A. and Saad, S. M. I. 2007. Effect of a probiotic mixed culture on texture profile and sensory performance of minas fresh cheese in comparison with the traditional products. *Archivos Latinoa mericanos De Nutricion*, 57: (2), 179-185.
11. Champagne, C. P., N. J. Gardner, and D. Roy. 2005. Challenges inthe addition of probiotic cultures to foods. Crit. Rev. *Food Sci.Nutr*. 45:61–84.
12. Chen,Y.C., K.S. Son, B.J. Min, J.H. Cho, O.S. Kwon, I.H. Kim.2005. Effects of dietary probiotic on growth performance nutrients digestibility blood characteristics and fecal noxious gas content in growing pigs Asian Australas J AnimSci, 18 (10), pp. 1464-1468.
13. Csutak, E. 2006. Influence of raw milk quality on Lactobacillus acidophilus multiplication and probiotic yogurt production. *Lucrari Stiintifice*, 52:604-609.
14. Donkor, O. N., Nilmini, S. L. I., Stolic, P., Vasilgevic, T. and Shah, N. P. 2007. Survival and activity of selected probiotic organism in set – type yoghurt *during cold storage. International Dairy Journal*, 17: 92-151.
15. Fernandes, R., 2009, Microbiology handbook dairy products, Biddles Ltd., King's Lynn, 37-39. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.11.030.

16. Gibson, G.R., Rastal, R.A. and Fuller, R.2003. The health benefits of probiotic and prebiotic. Gut Flora, Nutrition, Immunity and Health, Blackwell Publishing, Oxford, 52-76.
17. Glibowski,P. and Glibowska, A. 2009. Effect of calcium chloride on rheological properties and structure of inulin-whey protein gels. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 54: 349-353.
18. Gnadig, S.; Chamba, J.F.; Perread, E.; Chappaz, S.; Chardigny, J.M.; Rickert, R.; Steinhart, H.; Sebedio, J.L. 2004. Influence of manufacturing conditions on the conjugated linoleic acid content and the isomer composition in ripened French Emmental cheese. *Journal of Dairy Research* 71: 367-371.
19. Golob, T., Micovic, E., Bertoncely, J. and Jamnik, M. 2004. Sensory acceptability of chocolate with inulin. *Acta Agriculture Slovenica*, 83 (2): 221-231.
20. Iyer, R. N. and Hittinahalli, V. 2008. Modified Pap method to among methicillin resistant Staphylococcus aureus isolates tertiary care hospital. Indian *Journal of Medical Microbiology*, 26 (2):176-179.
21. Khurana, H.K.andKanawjia, S.K. 2007. Recent trends in development of fermented milks. *Current Nutrition & Food Science*, 3: 91-108.
22. Krasaekoopt, W., Bhandari, B. &Deeth, H. C. 2006. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage LWT,( 39): 177–183.
23. Lengkey, H. A. W. and Adriani, L. 2009. Effects of milk fermented with Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium on Lactic acid and acetic acid content and on Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa. Biotechnology in Animal Husbandry, 25, (5-6), 719-724.
24. Lin, H., Boylston, T.D., Chang, M.J., Luedecke, L.O., Schultz, T.D. 1995. Survey of the conjugated linoleic acid contents of dairy products. *J. Dairy Sci.*, 78. 2358-2365.
25. Mohammadi N, Ahari H, Fahimdanesh M, Zanjani MAK, Anvar A, Shokri E. Survival of alginateprebiotic microencapsulated Lactobacillus acidophilus in mayonnaise sauce. *Iranian J Vet Med* 2012; 6(4): 259-264.
26. Plaza, B. L., Bermejo, L. M., Weber, T. K.,Parra, P., Serra, F. & Hernandez, M. 2013.Effects of milk supplementation withconjugated linoleic acid on weight control andbody composition in healthy overweightpeople. *Nutr Hosp*. 28: 2090-2098.
27. Rodriguez, J. and Moullac,G. 2000. State of the art ofimmunological tools and health control of penaeid shrimp. Aquaculture, 191:109-119.
28. Shah, N.P.2004. Probiotics and prebiotic. Agro Food Industry Hi-Technology, 15, (1), 13-16.
29. Shi, J., Mazza, G. and Maguer, M.L.2002. Functional foods, Biochemical and processing aspects. CRC press, New York, 1-417.
30. Tamime , A.Y. and Robinson, R.K. 1999. Yogurt science and technology. CRC Press, Boca Raton.
31. Tharmaraj, N. and Shah, N.P. 2003. Selective enumeration of Lactobacillus de lbrueckii ssp. Bulgaricus, Streptococcus thermophilus, Lactobacillus acidophilus, Bifidobacteria, Lactobacillus casei, Lactobacillus rhamnosus, and Propionibacteria. *Journal of Dairy Science Association*, 86: 2288-2296.
32. Vahcic, N. and Hruskar,M.2000. Slovenian fermented milk with probiotics, Zootehnika , 76:41-46.
33. Veghte, R. H. 2000. Roxlor international supplier of fine functional food ingredients, Technical Information, 1-10.
34. Vinderola,C.G. and Reinheimer, J.A. 2002. Culture media enumeration of Bifido bacterium bifidum and Lactobacillus acidophilus in the

presence of yogurt bacteria. *Ineternational Dairy Journal*, 9, 497-505.

(Original Research Paper)

# Comparison of Chemical and Viability Changes Trend of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in Fermented and Sweet Sterile Cream Synbiotic Containing Different Levels of Inulin During Storage

**Atoosa Farrokh[1], Mohammad Reza Ehsani[2]*, Nasrin Moayed Nia[3], Reza Azizi Nezhad[4]**

1- Ph.D. Student of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3- Department of Food Science and Technology, Faculty of Mechanical and Industrial Engineering, Qazvin Branch, Islamic Azad University, Qazvin, Iran.

Received:22/11/2017 Accepted: 16/01/2018

**Abstract**

The aim of this study was to evaluate the effect of various levels of inulin (0, 1.5 and 3 wt%) and probiotic bacteria including *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus caesi* on chemical properties (pH and acidity), conjugated linoleic acid and probiotic count The products used in the formulation of cream, fermentative and non-fermented milk were in the first, fifteenth and thirtieth day (4-5 ° C). The results showed that increasing the shelf life of cream samples, pH decreased and acidity increased. Adding inulin caused significant changes in pH, acidity and bioavailability of probiotic strains. By increasing the level of inulin to 3%, the pH of the cream samples decreased, and the acidity and probiotic count increased, which was significant in *Lactobacillus acidophilus*, although the treatment containing *Lactobacillus acidophilus* had the highest acidity. Increasing the level of inulin in the formulation of synbiotic creams increased acidity and the difference between all treatments was significant ($p < 0.05$). With increasing storage time until the 30th day, acidity values of non-fermented treatments containing probiotic strains did not change and there was no significant difference between treatments ($p<0.05$). There was no statistically significant difference in acidity between non-fermented treatments containing probiotic strains and different levels of inulin. As time passed from one to thirty days, the amount of conjugated linoleic acid (CLA) increased in fermentation treatments. Among non-fermented treatments, the CLA produced by *Lactobacillus casei* and 3% inulin and control samples increased from one to fifteen days. The number of probiotics in the non-fermented treatments is significantly less than that in fermented treatments. In both fermented and non-fermented forms, the number of *Lactobacillus acidophilus* was higher than that of *Lactobacillus casei.* Increasing of inulin levels had a significant effect on the increase in the number of probiotics. The results showed that the addition of prebiotics, such as inulin, could play an important role in increasing the viability of probiotics and improving the chemical properties of the cream, such as acidity and pH.

**Keywords**: Conjugated Linoleic Acid, Inulin, *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei,* Cream.

*Corresponding Author: atoosafarrokh@gmail.com