اثر ترتیب تلقیح کشت های میکروبی و درجه حرارت گرمخانه گذاری بر ماست پروبیوتیک حاوی لاکتوباسیلوس کازئی

نفیسه دهقانی[a]، رضوان پوراحمد[b*]، نبی اله نعمتی[c]

[a] دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین – پیشوا، ورامین، ایران
[b] استادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین – پیشوا، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی، ورامین، ایران
[c] دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین – پیشوا، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت، ورامین، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۱۱/۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۱۲/۱۰

چکیده

مقدمه: *لاکتوباسیلوس کازئی* یکی از باکتری های پروبیوتیکی است که پتانسیل کاربردی ویژه‌ای در تولید فراورده‌های شیری پروبیوتیکی مانند ماست دارد، لذا با توجه به مقبولیت مصرف بالای ماست و خواص مثبت بسیار پروبیوتیک‌ها جهت تولید ماست پروبیوتیکی حاوی *لاکتوباسیلوس کازئی*، اثر ترتیب تلقیح کشت‌های میکروبی و درجه حرارت گرمخانه گذاری بر کیفیت و زنده مانی پروبیوتیک‌ها در چنین محصولی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق اثر ترتیب تلقیح (تلقیح همزمان باکتری های ماست و *لاکتوباسیلوس کازئی*، تلقیح اولیه باکتری‌های ماست و تلقیح ثانویه *لاکتوباسیلوس کازئی*، تلقیح اولیه *لاکتوباسیلوس کازئی* و تلقیح ثانویه باکتری‌های ماست) و دمای گرمخانه‌گذاری (۳۷°C و ۴۰°C) مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های ماست از نقطه نظر pH، اسیدیته، درصد آب اندازی (سینرزیس)، شمارش باکتری پروبیوتیک و خواص حسی (طعم، رنگ، بافت) مورد ارزیابی قرار گرفته و با نمونه شاهد (ماست فاقد باکتری‌های پروبیوتیک) مقایسه گردیدند. در مرحله بعد بهترین نمونه‌ها از نظر کیفیت حسی انتخاب گردیده و به مدت ۲۱ روز در دمای ۴°C نگهداری شدند و طی این مدت از نظر خواص فیزیکوشیمیایی و شمارش باکتری پروبیوتیک مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که کشت همزمان باکتری‌های ماست و *لاکتوباسیلوس کازئی* در دو دمای ۳۷°C و ۴۰°C بهترین خواص حسی را موجب می‌شود. نتایج حاصل از ارزیابی های صورت گرفته بر روی نمونه‌های انتخاب شده در طول دوره نگهداری در سرما نشان داد که، نمونه ماست گرمخانه‌گذاری شده در دمای ۳۷°C کمترین درصد آب اندازی و بیشترین تعداد باکتری پروبیوتیک زنده را در پایان دوره نگهداری داشت. کمترین میزان pH و بالاترین مقدار اسیدیته نیز به نمونه ماست گرمخانه‌گذاری شده در دمای ۴۰°C مربوط می شد.

نتیجه‌گیری: بررسی حاضر نشان داد که کشت توأم باکتری‌های ماست و *لاکتوباسیلوس کازئی* در دمای ۳۷°C منجر به کیفیت بهتر محصول از نظر ظاهری و زنده مانی باکتری‌های پروبیوتیک می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: *ترتیب تلقیح، دمای گرمخانه گذاری، لاکتوباسیلوس کازئی، ماست پروبیوتیک*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: rjpourahmad@yahoo.com

jftn.srbiau.ac.ir

مقدمه

ماست یک فراورده شیری است که به وسیله تخمیر لاکتیکی توسط دو باکتری آغازگر ماست، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس*[1] و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*[2] به دست می‌آید (Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001). در حال حاضر ماست پروبیوتیک یکی از پرمصرف‌ترین فراورده‌های شیری در جهان است که علت آن ارزش سلامتی بخش ویژه آن است. از خواص سلامت بخش پروبیوتیک‌ها می‌توان به بهبود هضم لاکتوز (Shah, 2007)، بهبود جذب کلسیم، سنتز ویتامین ها و پروتئین‌ها (Rasdhari *et al*., 2008)، تحریک و ارتقاء سیستم ایمنی بدن (Isolauri *et al*., 2001)، کاهش سطح کلسترول سرم خون (Begley *et al*., 2006; Liong & Shah, 2005)، کاهش تظاهرات آلرژیک (Viljanen *et al*., 2005)، جلوگیری از انواع سرطان (Rafter, 2002)، بهبود تعادل میکروبی روده (Vasiljevic & Shah, 2008)، جلوگیری از رشد و فعالیت میکروب‌های بیماریزا (Fayol-Messaoudi *et al*., 2005)، افزایش ارزش تغذیه‌ای (Vasiljevic & Shah, 2008) و... اشاره کرد. *لاکتوباسیلوس کازئی* یک باکتری گرم مثبت، مزوفیل، میله‌ای شکل، میکروآئروفیل، کاتالاز منفی و بدون اسپور بوده (مرتضویان و سهراب‌وندی، ۱۳۸۵) که قابلیت بقاء بالایی در فراورده‌های تخمیری شیری دارد (Rasdhari *et al*., 2008). اسید لاکتیک تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس کازئی* از نوع L^+ است و به ونکومایسین مقاوم می‌باشد. این باکتری نسبت به *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* مقاومت کمتری به شیره معده و نمک‌های صفراوی دارد (مرتضویان و سهراب‌وندی، ۱۳۸۵). فعالیت این باکتری بیش از بقیه لاکتوباسیلوس‌های یافت شده در فرآورده‌های تخمیری شیر بوده و قادر به تخمیر طیف وسیعی از کربوهیدرات‌های موجود در محیط است. این باکتری به صورت منفرد و یا در ترکیب با پروبیوتیک‌های دیگر، جهت دستیابی به ویژگی‌های مطلوب تغذیه‌ای، ارگانولپتیکی و تکنولوژیکی، به ماست اضافه می‌شود (Vahcic & Hruskar, 2000). از ویژگی‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* کمک به تقویت سیستم ایمنی، بهبود کارکرد سالم سلولی و کمک به رشد باکتری‌های مفید در دستگاه روده‌ای می‌باشد (Aryana & McGrew, 2007). برخی مطالعات نشان داده است که *لاکتوباسیلوس کازئی* توانایی کاهش فعالیت آنزیمی مضر مانند بتاگلوکورونیداز و نیتروردوکتاز و گلیکوکولیک اسید هیدرولاز را دارا می‌باشد (Guerin-Danan, 1998; Aryana and McGrew, 2007). همچنین از آن برای تولید صنعتی اسیدلاکتیک از آب پنیر از طریق بهره‌گیری از روش راکدسازی[3] سلول‌ها بر پایه‌هایی همچون آگار، پلی آکریل آمید،[4] ژل پکتات کلسیم، آلژینات و دانک‌های کیتوزان اصلاح شده شیمیایی[5] استفاده شده است (مرتضویان و سهراب وندی، ۱۳۸۵). تحقیقات عده‌ای از دانشمندان خاصیت آنتی‌اکسیدانی *لاکتوباسیلوس کازئی* را اثبات کرده است (Saide & Gilliland, 2005).

هدف از این تحقیق بررسی اثر ترتیب تلقیح کشت های میکروبی و درجه حرارت گرمخانه گذاری بر خواص کیفی ماست پروبیوتیک حاوی *لاکتوباسیلوس کازئی* است.

مواد و روش ها

- مواد مصرفی

الف) شیر: شیر خام ۱/۵٪چربی با ماده خشک ۱۲-۱۱٪ و شیرخشک بدون چربی و آنتی بیوتیک منفی جهت تولید شیربازسازی شده از کارخانه پگاه تهران تهیه شد.

ب) کشت های آغازگر میکروبی: سویه‌های میکروبی مورد استفاده شامل کشت ترکیبی ماست با مشخصه YC-X11 حاوی *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیر گونه *بولگاریکوس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و کشت تک سویه پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس کازئی* LC-01، هر دو به صورت خشک شده انجمادی و از نوع DVS، از نمایندگی شرکت کریستین هانسن[6] دانمارک تهیه گردید.

ج) محیط‌های کشت میکروبی: شامل محیط کشت MRS Broth و Agar-agar از نمایندگی شرکت مرک[7] آلمان تهیه گردید. آنتی‌بیوتیک ونکومایسین محصول شرکت سیگما[8] آمریکا برای غنی کردن محیط کشت

[1] *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*
[2] *Streptococcus thermophilus*
[3] Immobilization
[4] Polyacrylamide
[5] Chemically modified chitosan beads
[6] CHR-Hansen
[7] MERCK
[8] Sigma

jftn.srbiau.ac.ir

استفاده شد. از قرص‌های رینگر (مرک آلمان)، به منظور تهیه سرم‌های رقت و از گازپک (مرک آلمان)، جهت بی‌هوازی کردن محیط استفاده شد.

- **روش تهیه مایه کشت اولیه**

به منظور فعال‌سازی اولیه *لاکتوباسیلوس کازئی*، ابتدا مقدار ۱۰۰ گرم شیر خشک بدون چربی در ۹۰۰ سی‌سی آب مقطر حل گردید (W/V). سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای حدود ۹۰°C حرارت داده شد، بلافاصله با استفاده از آب سرد دمای آن به حدود ۴۲ درجه سانتی‌گراد رسانده شد. سپس به مقدار ۰/۳ گرم از گرانول‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* به داخل شیر اضافه گردید و به طور کامل از طریق به هم زدن یکنواخت شد تا گرانول‌ها به طور کامل در داخل شیر حل‌شود. سپس شیر حاصله در حمام آب ۴۲ درجه‌سانتی‌گراد قرار گرفت. اسیدیته این شیر در ابتدای گرمخانه‌گذاری و درساعات متوالی گرمخانه اندازه گیری گردید. سپس از شیر حاصله زمانیکه اسیدیته آن به حدود ۸۲ درجه دورنیک رسید به عنوان مایه کشت مقدماتی[1] استفاده شد (میرزائی و کریم، ۱۳۸۳). کشت استارتر ماست نیز در یک لیتر شیرخشک بازسازی شده به طور کامل حل گردید، سپس از این شیر به عنوان مایه کشت استفاده شد.

- **روش تولید ماست پروبیوتیک**

به روی شیر خام مورد استفاده تیمار حرارتی (۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه) اعمال گردید. پس از توزیع آن در ظروفی به حجم ۱۰۰ سی‌سی، تلقیح آنها با کشت‌های میکروبی مربوطه در دمای ۴۳-۴۲ درجه سانتی‌گراد، به قرار زیر صورت گرفت:

الف) مایه YC-X11 به میزان ۱۰ میلی لیتر (برابر ۱٪)

ب) مایه LC-01 به میزان ۶ میلی لیتر

نمونه های شیرهای تلقیح شده (۶ نمونه) به همراه نوع مایه تلقیحی و زمان گرمخانه گذاری در جدول ۱ آورده شده است. شیرهای تلقیح شده بر اساس نوع مایه مورد استفاده در آنها تا رسیدن به pH= ۴/۷-۴/۸ در گرمخانه۳۷ و یا ۴۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند.

- **فاکتورهای مورد آزمون**

اندازه گیری pH:

اندازه گیری این شاخص با استفاده از pH متر (METTLER TOLEDO، آلمان)، در نمونه، مطابق با دستور العمل شماره ۲۸۵۲ استاندارد ملی ایران انجام گرفت.

اندازه گیری اسیدیته:

اسیدیته بر اساس درجه دورنیک و با استفاده از سود $\frac{1}{9}$ نرمال و معرف فنل فتالئین در نمونه، مطابق با دستور العمل شماره ۲۸۵۲ استاندارد ملی ایران انجام گرفت.

جدول۱- معرفی تیمارهای مورد استفاده در تحقیق

شماره	کد نمونه	ترتیب تلقیح کشت های میکروبی	دمای گرمخانه گذاری
۱	YC(1)	تلقیح همزمان باکتری‌های ماست و *لاکتوباسیلوس کازئی*	۳۷°C تا رسیدن به pH = ۴/۸
۲	C-Y(1)	تلقیح اولیه *لاکتوباسیلوس کازئی* تا رسیدن به pH =۵/۶ و سپس تلقیح ثانویه باکتری‌های ماست	۳۷°C تا رسیدن به pH = ۴/۸
۳	Y-C(1)	تلقیح اولیه باکتری‌های ماست تا رسیدن به pH =۵/۶ و سپس تلقیح ثانویه *لاکتوباسیلوس کازئی*	۳۷°C تا رسیدن به pH = ۴/۸
۴	YC(2)	تلقیح همزمان باکتری‌های ماست و *لاکتوباسیلوس کازئی*	۴۰°C تا رسیدن به pH = ۴/۸
۵	C-Y(2)	تلقیح اولیه *لاکتوباسیلوس کازئی* تا رسیدن به pH =۵/۶ و سپس تلقیح ثانویه باکتری‌های ماست	۴۰°C تا رسیدن به pH = ۴/۸
۶	Y-C(2)	تلقیح اولیه باکتری‌های ماست تا رسیدن به pH =۵/۶ و سپس تلقیح ثانویه *لاکتوباسیلوس کازئی*	۴۰°C تا رسیدن به pH = ۴/۸
۷	Co	نمونه ماست کنترل(بدون پروبیوتیک)	۴۰°C تا رسیدن به pH = ۴/۸

Y: نشاندهنده کشت های استارتر ماست معمولی (YX-X11) می‌باشد.

[1] Pre-culture

jftn.srbiau.ac.ir

سنجش آب اندازی یا جدا شدن سِرُم:

جهت اندازه‌گیری میزان آب‌اندازی یا سینرزیس، ۴۰-۳۰ گرم از نمونه ماست در لوله‌های سانتریفیوژ وزن شد و سپس لوله‌ها در سانتریفیوژ با دور g × ۲۲۲ به مدت۱۰ دقیقه در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. بعد از سانتریفیوژ کردن، سرم آزاد شده که در بالای لوله آزمایش قرار داشت در یک ارلن ریخته شد و وزن مایع شفاف اندازه‌گیری شد و از تقسیم میزان آب آزاد شده به میزان ماست اولیه مقدار آب‌اندازی به صورت درصد محاسبه گردید (Unal *et al*., 2003).

- **آزمون میکروبی**

آزمون میکروبی شامل کشت نمونه‌ها در محیط MRS Vancomycin agar به روش پورپلیت[1] و مطابق روش استاندارد صفحه‌ای[2] صورت گرفت. به این شکل که ابتدا رقت‌های مناسبی از نمونه در محلول رینگر استریل، تهیه شده و بعد از انجام کشت، پلیت‌ها به گرمخانه ۳۷°C منتقل شدند. شمارش‌کلنی بعد از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری انجام گردید (Tharmaraj & Shah, 2003)

- **ارزیابی ویژگی های حسی ماست پروبیوتیک**

به منظور ارزیابی حسی نمونه‌ها از۷ نفر ارزیاب آموزش دیده استفاده شد. به این صورت که ظروف ۱۰۰ گرمی حاوی ماست به‌صورت تصادفی شماره‌گذاری گردید و به صورت تصادفی در اختیار اعضای گروه ارزیاب قرار گرفت. برای فاکتورهای «عطر و بو» و «طعم ومزه» درجه‌بندی ۱۰ تایی (۱۰ به‌معنای حداکثر امتیاز) و برای فاکتورهای «بافت» و «رنگ و ظاهر» درجه‌بندی ۵ تایی (۵ به‌معنای حداکثر امتیاز) در نظر گرفته شد (Aryana and McGrew, 2007).

- **تجزیه و تحلیل آماری**

تمامی آزمایشات در سه تکرار انجام گرفت و داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS 16 با احتساب دامنه اطمینان ۹۵٪ آنالیز شدند. میانگین تیمارها نیز با روش دانکن مقایسه گردید.

یافته ها

- **زمان گرمخانه گذاری**

جدول ۲، زمان گرمخانه گذاری نمونه های مختلف را برای رسیدن به pH=۴/۸ نشان می‌دهد. مطابق جدول ۲، نمونه ۵ بیشترین زمان گرمخانه گذاری را داشته که به طور معنی‌داری از زمان گرمخانه‌گذاری سایر نمونه‌ها بیشتر بود ($p\leq$۰/۰۵). سپس تیمار ۶ بیشترین زمان گرمخانه‌گذاری را داشته که به طور معنی‌داری با نمونه ۵ تفاوت داشت ($p\leq$۰/۰۵).کمترین زمان گرمخانه‌گذاری به نمونه ۱ اختصاص داشت. از طرفی زمان گرمخانه گذاری نمونه ۱ با زمان گرمخانه‌گذاری نمونه‌های ۳، ۵ و ۶ اختلاف معنی‌داری داشتند ($p\leq$۰/۰۵).

- **جمعیت باکتری پروبیوتیک**

مطابق جدول ۳، بالاترین جمعیت لاکتوباسیلوس کازئی در نمونه ۲ ملاحظه گردید که به طور قابل ملاحظه و معنی‌داری بیشتر از مقدار آن در سایر نمونه‌ها بود. کمترین جمعیت این باکتری پروبیوتیکی نیز مربوط به نمونه ۶ بود که البته از لحاظ آماری هیچ تفاوت معنی‌داری در جمعیت لاکتوباسیلوس کازئی این نمونه و سایر نمونه‌ها (به جز نمونه ۲) وجود نداشت.

جدول ۲- زمان گرمخانه گذاری نمونه های ماست پروبیوتیک برای رسیدن به pH=٤/٨ (میانگین ± انحراف معیار)

تیمارها	زمان گرمخانه گذاری(برحسب دقیقه)
۱	۲۱۶/۷±۱/۸۹^{d}
۲	۲۴۳±۰/۵۷^{cd}
۳	۲۶۰±۱/۷۳^{bc}
۴	۲۳۰±۱/۷۳^{cd}
۵	۳۲۰±۳/۴۶^{a}
۶	۲۸۳±۲/۳۱^{b}
۷	۲۳۱/۶۷±۰/۷۶^{cd}

* حروف مشابه نشان دهنده عدم معنی دار بودن است($p>0.05$).

[1] Pour Plate

[2] Standard Plate

jftn.srbiau.ac.ir

جدول ۳- جمعیت *لاکتوباسیلوس کازئی* در ماست پروبیوتیک در خاتمه گرمخانه گذاری (میانگین ± انحراف معیار)

تیمارها	جمعیت *لاکتوباسیلوس کازئی* (*cfu / ml*)
۱	$۳/۴۵\times۱۰^{۷}\pm۰/۲۱۷^{b}$
۲	$۶/۹۰\times۱۰^{۷}\pm۰/۲۹۲^{a}$
۳	$۲/۵۷\times۱۰^{۷}\pm۰/۱۰۹^{b}$
۴	$۱/۷۶\times۱۰^{۷}\pm۰/۰۵۶^{b}$
۵	$۱/۹۳\times۱۰^{۷}\pm۰/۰۷۷^{b}$
۶	$۱/۹۰\times۱۰^{۷}\pm۰/۰۶۸^{b}$

* حروف مشابه نشان دهنده عدم معنی دار بودن است($p>0.05$).

جدول ٤- امتیازات حاصل از ارزیابی طعم، بافت و رنگ نمونه های ماست پروبیوتیک بعد از تولید (میانگین ± انحراف معیار)

تیمارها	شاخص ها		
	طعم و مزه	رنگ و ظاهر	بافت
۱	$۷/۵۷\pm۰/۱۳۴^{a}$	$۳/۸۶\pm۰/۰۹۴^{a}$	$۴/۵\pm۰/۰۵۱^{a}$
۲	$۴/۴۳\pm۰/۱۲۲^{b}$	$۳\pm۰/۱۲۴^{a}$	$۱/۷۹\pm۰/۰۶۹^{b}$
۳	$۴/۶۴\pm۰/۰۸۴^{ab}$	$۳/۵۷\pm۰/۱۰۸^{a}$	$۱/۷۹\pm۰/۰۵۷^{b}$
۴	$۷\pm۰/۱۱۰^{ab}$	$۴/۵۷\pm۰/۰۶۴^{a}$	$۴/۵\pm۰/۰۶۵^{a}$
۵	$۴/۸۶\pm۰/۱۷۴^{ab}$	$۳/۹۳\pm۰/۰۹۱^{a}$	$۲/۱۴\pm۰/۰۶۶^{b}$
۶	$۴/۶۴\pm۰/۱۶۵^{ab}$	$۳/۵۷\pm۰/۱۰۸^{a}$	$۲\pm۰/۰۷۸^{b}$
۷	$۷/۴۳\pm۰/۱۲۸^{a}$	$۴/۸۶\pm۰/۱۰۹^{a}$	$۴/۴۳\pm۰/۰۵۱^{a}$

* حروف مشابه نشان دهنده عدم معنی دار بودن است($p>0.05$).

a) طعم و مزه: بیشترین نمره طعم و مزه ارزیاب‌ها به نمونه ماست ۱ داده شد که از نظر عددی با نمونه ماست شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. کمترین نمره نیز به نمونه ماست ۲ داده شد که تفاوت معنی‌داری با نمونه ۱ و نمونه ماست کنترل داشت ($p\leq۰/۰۵$).

b) رنگ و ظاهر: در ارتباط با رنگ و ظاهر نمونه ها نیز می‌توان گفت تفاوت معنی‌داری وجود نداشت و تمام نمونه‌ها از نظر رنگ در یک سطح قرار داشتند.

c) بافت: بالاترین امتیاز ارزیاب ها به نمونه ماست شاهد اختصاص یافت.بین نمونه‌های ۲، ۳، ۵ و ۶ نیز تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. هرچند بین این نمونه‌ها و نمونه شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($p\leq۰/۰۵$).

از آنجایی که نتایج به دست آمده از ارزیابی صورت گرفته حاکی از مقبولیت بیشتر نمونه‌های ماست ۱ و ۴ در بین سایر نمونه‌ها (به جز شاهد) بود، لذا این نمونه‌ها انتخاب شده و در یک دوره نگهداری ۲۱روزه در دمای ۴درجه سانتیگراد(در فرجه های زمانی ۷ روزه) مورد ارزیابی های pH، اسیدیته، درصد آب اندازی و جمعیت باکتری پروبیوتیک قرار گرفتند.

- ارزیابی حسی

در جدول ۴ امتیازات حاصل از ارزیابی طعم، بافت و رنگ نمونه‌های ماست پروبیوتیک بعد از تولید مشاهده می‌شود.

- تغییرات pH نمونه‌های ماست پروبیوتیک طی دوره نگهداری

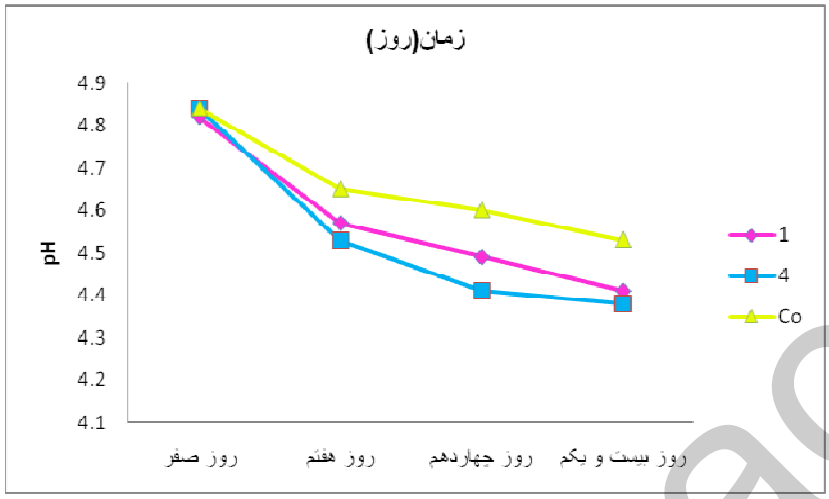
در نمودار ۱ منحنی تغییرات pH نمونه‌های ماست پروبیوتیک طی نگهداری در سرما مشخص شده است. مقادیر pH نمونه‌های ماست پروبیوتیک در روز تولید و هفتم تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد. کاهش pH تا پایان هفته اول تند بوده ولی از روز هفتم به بعد این کاهش از سرعت کمتری برخوردار است. در روز چهاردهم، بین نمونه ۱ و نمونه شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($p\leq۰/۰۵$). pH نمونه ۴ از سایر نمونه‌ها کمتر بود. در روز بیست و یکم، بالاترین میانگین pH (۴/۵۳)، مربوط به ماست شاهد بود که بانمونه ۱ تفاوت معنی‌داری نشان داد ($p \leq ۰/۰۵$)، در مقابل بین نمونه‌های ۱ و ۴ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. بین نمونه ۱ و نمونه شاهد نیز تفاوت معنی داری مشاهده نشد.

- تغییرات اسیدیته نمونه های ماست پروبیوتیک طی دوره نگهداری

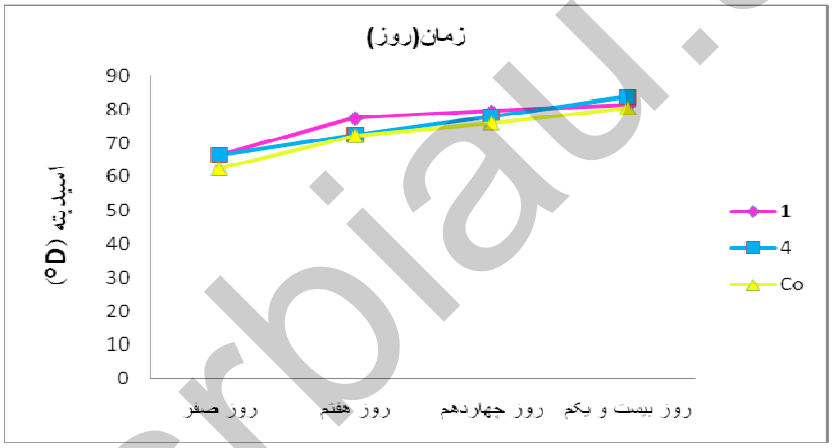
منحنی تغییرات اسیدیته نمونه‌های مورد بررسی طی دوره نگهداری در نمودار ۲ نشان داده شده است. در این نمودار روند صعودی اسیدیته نمونه‌ها بخوبی رویت می‌گردد. در روز هفتم، بیشترین اسیدیته مربوط به نمونه ماست ۱ می‌باشد که البته از نظر آماری با بقیه نمونه‌ها اختلاف معنی‌دار آماری نداشت. در پایان دوره نگهداری بین نمونه‌های ماست از نظر اسیدیته تفاوت معنی‌دار وجود نداشت، به عبارتی اختلاف اسیدیته بین نمونه‌ها معنی‌دار نبود ($p>۰/۰۵$).

jftn.srbiau.ac.ir

نمونه ماست ۴ از سایر نمونه‌های ماست اسیدیته بیشتری دارد. همچنین روند تغییرات اسیدیته در نمونه ماست شاهد ملایم تر بوده، به عبارتی میزان ترش شدن آن کمتر است. در روز بیست و یکم نیز این نمونه دارای کمترین اسیدیته می‌باشد.



نمودار ۱- منحنی تغییرات pH طی دوره نگهداری نمونه های انتخابی در ٤°C



نمودار ۲- منحنی تغییرات اسیدیته طی دوره نگهداری نمونه‌های انتخابی در ٤°C

جدول ٥- میزان آب اندازی نمونه‌های ماست انتخاب شده (برحسب درصد) طی دوره نگهداری در ٤°C(میانگین ± انحراف معیار)

نمونه ماست/ دوره	روز صفر	روز هفتم	روز چهاردهم	روز بیست و یکم
۱	۲/۵۹±۰/۰۶۲^{a}	۳/۲۴±۰/۰۸۹^{ab}	۳/۵۶±۰/۱۱۳^{b}	۴/۷۴±۰/۱۷۸^{b}
۴	۴/۰۴±۰/۱۳۰^{a}	۶/۰۹±۰/۲۵^{a}	۸/۳۲±۰/۱۳۶^{a}	۱۱/۷۷±۰/۲۲۰^{a}
Co	۱/۱۵±۰/۰۲۵^{a}	۲/۰۴±۰/۰۱۲^{b}	۲/۴۴±۰/۰۲۸^{b}	۳/۱۲±۰/۰۱۷^{b}

* حروف مشابه نشان دهنده عدم معنی دار بودن است($p>0.05$).

جدول ٦-جمعیت باکتری پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس کازئی (cfu / ml) در نمونه‌های پروبیوتیکی انتخاب شده طی دوره نگهداری در ٤°C (میانگین ± انحراف معیار)

نمونه ماست/ دوره	روز صفر	روز هفتم	روز چهاردهم	روز بیست و یکم
۱	۳/۴۵×۱۰^{۷}±۰/۲۱۷^{a}	۲/۱۷×۱۰^{۷}±۰/۰۷۳^{a}	۱/۷۵×۱۰^{۷}±۰/۰۶۱^{a}	۹/۲×۱۰^{۶}±۰/۰۵۱^{a}
۴	۱/۶۷×۱۰^{۷}±۰/۰۵۶^{a}	۹/۵×۱۰^{۶}±۰/۰۷۳^{a}	۷/۴×۱۰^{۶}±۰/۰۰۳^{a}	۴/۰×۱۰^{۵}±۰/۰۰۲^{a}

* حروف مشابه نشان دهنده عدم معنی دار بودن است($p>0.05$).

jftn.srbiau.ac.ir

- تغییرات میزان آب‌اندازی نمونه‌های ماست پروبیوتیک طی دوره نگهداری

نتایج به دست آمده از سنجش آب‌اندازی یا سینرزیس نمونه‌های ماست پروبیوتیک در طول نگهداری در جدول ۵ مشخص شده است.

در روز صفر تفاوت معنی‌داری بین درصد آب‌اندازی نمونه‌های ماست دیده نشد. در روز هفتم، بیشترین درصد آب‌اندازی مربوط به نمونه ماست ۲ بود که با نمونه ماست شاهد تفاوت معنی‌داری داشت ($p\leq۰/۰۵$)، ولی با نمونه ماست ۱ اختلاف معنی‌داری نداشت. اختلاف درصد آب‌اندازی بین نمونه‌های شاهد و ۱ نیز در روز هفتم معنی‌دار نبود. نمونه ماست ۴ در بین سایر نمونه‌ها بیشترین درصد آب اندازی را در روزهای هفتم، چهاردهم و بیست ویکم داشت که البته اختلافات مذکور در روزهای چهاردهم و بیست و یکم معنی‌دار بودند ($p\leq۰/۰۵$). کمترین درصد آب اندازی در روزهای هفتم، چهاردهم و بیست و یکم مربوط به نمونه شاهد بود که البته این مقادیر اختلاف معنی‌داری را با درصد آب اندازی نمونه ۱ نداشتند.

در روز چهاردهم نیز نمونه ماست۴ بیشترین درصد آب‌اندازی را داشت که با سایر نمونه‌ها تفاوت معنی‌داری داشت ($p\leq۰/۰۵$). در این روز نیز بین نمونه ماست شاهد و نمونه ۱ تفاوت معنی‌داری دیده نشد. بیشترین درصد آب‌اندازی در روز بیست و یکم، مربوط به نمونه ماست۴ بود که با نمونه ماست ۱ و نمونه شاهد تفاوت معنی‌داری داشت ($p\leq۰/۰۵$). نمونه شاهد در روزهای هفتم، چهاردهم و بیست و یکم کمترین درصد آب اندازی را داشت ولی با نمونه ماست ۱ تفاوت معنی داری مشاهده نشد.

- تغییرات جمعیت لاکتوباسیلوس کازئی در نمونه‌های ماست پروبیوتیک طی دوره نگهداری

نتایج حاصل از شمارش تعداد باکتری‌های پروبیوتیک ماست در طول نگهداری در یخچال در جدول ۶ مشخص گردیده است.

طبق اطلاعات به دست آمده از جدول ۶، تفاوت معنی‌داری در تعداد باکتری‌های پروبیوتیک در طول دوره نگهداری مشاهده نشد. هر چند تفاوت معنی‌داری ($p\leq۰/۰۵$) در میانگین کل باکتری‌های پروبیوتیک در روز صفر با روزهای چهاردهم و بیست ویکم مشاهده شد. میانگین کل باکتری‌های پروبیوتیک در روز هفتم، چهاردهم و بیست ویکم تفاوت معنی داری را نشان نداد.

بحث

در این مطالعه تأثیر ۶ تیمار مختلف، بر اساس روابط همیاری و پادیاری زیستی موجود در آنها بر بهبود قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها و خواص حسی فراورده بررسی شد. بر اساس نتایج به دست آمده بعد از تولید، بین نمونه‌های ماست از نظر pH تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. اسیدیته و آب‌اندازی نمونه‌های ماست نیز بعد از تولید تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. از نظر شمارش باکتری‌های پروبیوتیک، نمونه ۲ بیشترین تعداد باکتری را داشته و در مقابل کمترین تعداد باکتری به نمونه ماست ۴ اختصاص داشت. تمام نمونه‌های ماست تولید شده در نهایت به وسیله گروه ارزیاب آموزش دیده تحت ارزشیابی حسی قرار گرفت.

با توجه به نتایج آماری و ارزشیابی حسی، از نظر رنگ و ظاهر نمونه‌ها، اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. بنابراین طبق نتایج جدول ۴، کمترین امتیاز ارزیاب ها در صفات طعم، بافت و ساختار به نمونه‌های ماست ۲، ۳، ۵ و ۶ تعلق گرفت و لذا از بین ۶ نمونه تولیدی ۲ نمونه ماست ۱ و۴ انتخاب شدند. در مرحله بعد آزمون‌های فیزیکوشیمیایی و شمارش باکتری‌های پروبیوتیک در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ برای نمونه‌های منتخب انجام گرفته و با نمونه شاهد مقایسه گردید.

- اثر دوره نگهداری بر pH

باتوجه به نتایج به دست آمده، کاهش pH درنمونه ۱ طی دوره نگهداری تا روز بیست ویکم معنی‌دار نیست ($p>۰/۰۵$). در نمونه ۴، pH در روز هفتم کاهش می یابد ولی این کاهش در مقایسه با روز صفر معنی‌دار نیست ($p>۰/۰۵$)، اما در روزهای چهاردهم و بیست و یکم و در مقایسه با نمونه شاهد کاهش معنی‌داری در مقدار pH دیده می‌شود ($p\leq۰/۰۵$). در روز بیست و یکم، بالاترین میانگین Ph مربوط به نمونه شاهد بود که با نمونه ۱ تفاوت معنی‌داری نداشت ($p>۰/۰۵$)، در مقابل بین pH نمونه‌های شاهد و ۴ تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($p\leq۰/۰۵$). به این ترتیب می توان فعالیت بیشتر *لاکتوباسیلوس کازئی* در دمای $40^{\circ}C$، تولید اسید بیشتر طی نگهداری و کاهش pH را نتیجه گرفت. همچنین

jfn.srbiau.ac.ir

بعید است کاهش pH بر بقاء میکروارگانیسم‌ها در pH نهایی تأثیر داشته باشد (Akalin *et al*., 2004). در یک بررسی مشابه کاهش pH طی دوره نگهداری، تأثیری بر بقاء *لاکتوباسیلوس کازئی* L26 نداشت (Donkor *et al*., 2006). به طور کلی pH کمتر فراورده منجر به تغییرات بیشترpH طی دوره نگهداری می‌شود (Donkor *et al*., 2006). نمونه ۴ نیز که کمترین pH را در روز هفتم داشت، بیشترین کاهش pH و کمترین جمعیت میکروبی را طی دوره نگهداری نشان‌داد، اما تفاوت معنی‌داری با نمونه ۱ نداشت ($p>۰/۰۵$). در یک بررسی مشابه نیز، کاهش pH ماست محتوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* تأثیری در جمعیت میکروبی آن‌ها نداشت (Shah, 2000).

- اثر دوره نگهداری بر اسیدیته

در این مطالعه، نمونه ۴ بیشترین مقدار اسیدیته را طی نگهداری داشت ولی این تفاوت با نمونه شاهد معنی‌دار نبود ($p>۰/۰۵$). در این مطالعه تغییرات غلظت اسیدلاکتیک مستقل از کاهش pH نمونه‌های ماست است. در یک بررسی مشابه تغییرات غلظت اسیدلاکتیک در نمونه ماست پروبیوتیک محتوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* توسط HPLC مورد مطالعه قرار گرفت. در این مطالعه نیز غلظت اسیدلاکتیک نمونه شاهد در روز اول تا پایان دوره نگهداری تفاوت معنی‌داری نداشت ($p>۰/۰۵$) (Donkor *et al*., 2006). افزایش اسیدیته ماست پروبیوتیک در نتیجه رشد *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* طی دوره نگهداری است. بررسی‌ها نشان دهنده فعالیت باکتری‌های ماست تا انتهای دوره نگهداری محصول می‌باشد (Akalin *et al*., 2004).

- اثر دوره نگهداری بر آب‌اندازی

در این مطالعه، افزایش درصد آب‌اندازی در تمام نمونه‌ها با افزایش زمان[1] ماندگاری مشاهده شد (Aryana and McGrew, 2007). افزایش درصد آب اندازی نمونه ۱، طی نگهداری و در مقایسه با نمونه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت ($p>۰/۰۵$). افزایش درصد آب اندازی نمونه ۴ نیز معنی‌دار نبود ($p>۰/۰۵$)، اما در مقایسه با نمونه شاهد از روز هفتم تا روز بیست ویکم تفاوت معنی‌داری داشت ($p\leq۰/۰۵$). این امر را می‌توان به توانایی کمتر *لاکتوباسیلوس کازئی* در نگهداری آب در شبکه ژلی در دمای بالاو pH کمتر فراورده نسبت داد. بررسی‌های سایر محققین نشان داده که به طور کلی با افزایش طول دوره نگهداری ماست معمولی و پروبیوتیک، درصد آب اندازی افزایش می‌یابد ولی طبق مطالعات انجام شده، این روند در ماست پروبیوتیک محتوی ترکیبات پری‌بیوتیکی افزایش کمتری دارد (Aryana and McGrew, 2007). در یک بررسی کاهش درصد آب اندازی ماست پروبیوتیک حاوی *لاکتوباسیلوس کازئی* در حضور مخلوط لاکتولوز و اینولین به اثبات رسیده است (Paseephol, 2008).

- اثر دوره نگهداری بر بقاء باکتری‌های پروبیوتیک

الف) تخمیر دو مرحله‌ای: همانطور که در جدول۳ مشاهده می‌شود، نمونه ماست ۲ بیشترین جمعیت *لاکتوباسیلوس کازئی* را بلافاصله بعد از تخمیر داشته است. سپس نمونه ماست ۱ حاوی بیشترین جمعیت باکتری پروبیوتیک بوده که البته با سایر نمونه‌ها تفاوت معنی‌داری نداشته است ($p>۰/۰۵$). در صورت امکان پروبیوتیک باید قادر به رشد در طول تخمیر باشد که این باعث افزایش تعداد کلی باکتری‌ها می‌شود و از طرف دیگر باعث می‌شود که باکتری هر چه بیشتر به محیط محصول عادت نماید. بررسی‌های سایر محققین نشان داده است که پروبیوتیک باید قبل و یا همزمان با مایه به ترکیب غذایی افزوده گردد (Kailasapathy and Rybka, 1997). برخی محققین تأثیر تخمیر دو مرحله‌ای را بر بقاء باکتری‌های پروبیوتیک مطالعه کردند. تخمیر ابتدایی به مدت دو ساعت میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک و به دنبال آن تخمیر توسط آغازگرهای ماست انجام شد (Shah & Lankaputhra, 1997). این روش به باکتری‌های پروبیوتیک اجازه می‌دهد که در مرحله پایانی فاز تأخیری[1] یا در ابتدای فاز لگاریتمی[2] خود قرار گیرند و در نتیجه توانایی رقابت با استارهای ماست را پیدا کنند، که این امر منجر به افزایش تعداد آن‌ها می‌شود (Shah & Lankaputhra, 1997). این روش

[1] Lag phase

[2] Log phase

jfn.srbiau.ac.ir

اجازه استفاده از نژادهایی از باکتری‌های پروبیوتیک که درحضور ارگانیسم‌های دیگر رشد نمی‌کنند را می دهد. هر چند بقای پروبیوتیک‌ها در این روش نیز تضمین نمی‌شود (Vasiljevic and Shah, 2008). نتایج یک مطالعه نشان می‌دهد در طول پاساژ مرحله اول *لاکتوباسیلوس کازئی* به محیط عادت کرده و رشد و فعالیت مناسب خود را پیدا نموده و توانایی رقابت یا همزیستی با مایه ماست را پیدا کرده است (میرزائی و کریم،۱۳۸۳). نتایج بررسی‌های سایر محققین نشان داده است که اثرات سلامت بخش کشت توأم استارترهای ماست و *لاکتوباسیلوس کازئی* در شیرهای تخمیری نسبت به کشت منفرد *لاکتوباسیلوس کازئی* در این فرآورده‌ها بیشتر است (Djouzi *et al*., 1997).

ب) خاصیت آنتاگونیسم بین گروه‌های مختلف میکروبی: نتایج جدول ۶ نشان می‌دهد که در نمونه ماست۱ که دارای بیشترین میزان بقاء باکتری پروبیوتیک بوده بعد از ۲۱ روز نگهداری، بقاء باکتری پروبیوتیک کاهش داشته است، نتایج تحقیقات محققین دیگر نیز کاهش تعداد پروبیوتیک ها را در طول نگهداری ثابت کرده است که این کاهش بسته به نوع ماست و نوع آغازگر متفاوت است (Vasiljevic and Shah, 2008; Vinderola *et al*, 2000). اگرچه در بین باکتری‌های پروبیوتیک، بیشترین میزان بقاء را به *لاکتوباسیلوس کازئی* نسبت می‌دهند ولی تولید مقادیر زیاد اسید توسط این باکتری و نیز باکتری‌های آغازگر ماست و عدم وجود ترکیبات مغذی و محرک رشد از دلایل کاهش معنی‌دار تعداد باکتری مذکور در طول دوره نگهداری است (میرزائی و همکاران، ۱۳۸۸). بقای باکتری‌های پروبیوتیک ممکن است توسط متابولیت‌های تولید شده توسط استارترها، مانند اسیدلاکتیک، پراکسید هیدروژن و باکتریوسین‌ها و مواد بازدارنده رشد نیز تحت تأثیر قرار بگیرد (Mattila-Sandholm *et al*., 2001).

نتیجه گیری

لاکتوباسیلوس کازئی از مهم‌ترین و متداول‌ترین باکتری‌های پروبیوتیکی می‌باشد که امروزه در فرمولاسیون فراورده‌های غذایی لبنی به کار می‌رود. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که برای دستیابی به ویژگی‌های مطلوب فراوری بهتر است از کشت توأم باکتری‌های آغازگر ماست و *لاکتوباسیلوس کازئی* در دمای $37^{\circ}C$ استفاده گردد زیرا بالاترین جمعیت پروبیوتیکی فعال و کمترین درصد آب‌اندازی در کنار طعم و بافت مناسب محصول بدست می‌آید.

منابع

مرتضویان، ا.م. و سهراب وندی، س. (۱۳۸۵). پروبیوتیک‌ها و فرآورده‌های غذایی پروبیوتیک، انتشارات اتا، چاپ اول.

میرزائی، ح. و گیتی، ک. (۱۳۸۳). مطالعه امکان تولید یک فرآورده پروبیوتیکی شیر با استفاده از کشت کمکی لاکتو باسیلوس کازئی. مجله علوم دامپزشکی ایران، سال اول، شماره۱.

میرزائی، ح.، گیتی، ک. و سودی، م. (۱۳۸۴). مطالعه تاثیر دکستروز، والین، گلیسین، تیامین و دماهای مختلف بر سرعت رشد لاکتوباسیلوس کازئی در شیر. مجله علوم و صنایع غذایی ایران، سال دوم، شماره ۱.

Akalin, A. S., Fenderya, S. & Akbulut, N. (2004). Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharids during refrigerated storage. International Journal of Food Science, 39,613-621.

Aryana, K. J. & McGrew, P. (2007). Quality attributes of yogurt with *lactobacillus casei* and various prebiotics.LWT, 40,1808-1814.

Begley, M., Hill, C., & Gahan, C. G. M. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics.Applied and Environmental Microbiology, 72, 1729-1783

Djouzi, Z., Andrieux, C., Degivry, M. C., Bouley, C. & Szylit, O. (1997). The Association of Yogurt Starters with *Lactobacillus casei* DN 114.001 in Fermented Milk Alters the composition and Metbolism of Intestinal Microflora in Germ-Free Rats and in Human Flora-Associated Rats. Journal of Nutrition, 127, 2260-2266.

Donkor, O. N., Henriksson, A., Vasiljevic, T. & Shah, N. P. (2006). Effect of acidification on the activity of probitics in yoghurt during cold storage. International Dairy Journal, 16, 1881-1889

Fayol-Messaoudi, D., Berger, C. N., Coconnier-Polter, M. H., Lievin-Le Moal, V. & Servin, A, L. (2005). pH, lactic acid, and non-lactic acid-dependent activities of probiotic *Lactobacilli* against *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium*. Applied and Environmental Microbiology, 71, 6008-6013.

ifrnsbiau.ac.ir

Guerin-Danon, C., Chabanet, C., Pedone, C., Popot, F., Vaisside, P., Bouley, C., Szylit, O. & Andrieux, C. (1998). Milk fermented with yogurt cultures and *Lactobacillus casei* compared with yogurt and gelled milk: influence on intestinal microflora in healthy infants. American Journal of Clinical Nutrition, 67, 111-117.

Isolauri, E., Sutas, Y., Kankaapaa, P., Arvilommi, H. & Salminen, S. (2001). Probiotics: Effects on immunity. American Journal of Clinical Nutrition, 73, 444S-450S.

Kailasapathy, K., and Rybka, S.(1997). *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* ssp.-Their therapeutic potential and survival in yoghurt.Australian Journal of Dairy Technology, 52, 28-35

Liong, M. & Shah, N. P. (2005). Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains.Journal of Dairy Science, 88, 55-66.

Lourens-Hattingh, A. & Viljoen, B. C. (2001). Yoghurt as probiotic carrier food. Review article. International Dairy Journal, 11, 1-17

Mattila-Sandholm, T., Myllarinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fonden, R. & Saarela, M. (2002). Technological challenges for future probiotic foods. International Dairy Journal, 12, 173-182.

Oliveira, M. N., Sodini, I., Remeuf, F. & Corrieu, G. (2001). Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. International Dairy Journal, 11, 935-942.

Paseephol, T. (2008). Characterisation of prebiotic compounds from plant sources and food industry wastes. Inulin from Jerusalem artichoke and Lactulose from milk concentration permeate, 1-21.

Rafter, J. (2002). Lactic acid bacteria and cancer: Mechanistic perspective.British Journal of Nutrition, 88 (Suppl.), S89-S94.

Rasdhari, M., Parekh, T., Dave, N., Patel, V. & Subhash, R. (2008). Evaluation of various physic-chemical Properties of Hibiscus safdariffa and *L. casei* incorporated probiotic yogurt. Pakistan Journal of Biological Sciences, 11, (17), 2101-2108.

Saide, J. A. O. & Gilliland, S. E. (2005). Antioxidative activity of Lactobacilli measured by oxygen radical absorbance capacity. Journal of Dairy Science, 88, (4), 1352-1357.

Shah, N. P. (2007). Functional cultures and health benefits. International Dairy Journal, 17, 1262-1277

Shah, N. P. (2000). Probiotic bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. Journal of Dairy Science, 83, 894-907.

Shah, N. P. & Lankaputhra, W. E. V. (1997). Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* ssp. In yoghurt. International Dairy Journal, 7, 349-356.

Tharmaraj, N. & Shah, N. P. (2003). Selective Enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*,*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Propionibacteria*, Journal of Dairy Science, 86, 2288-2296.

Unal, B., Metin, S. & Iski, N. D. (2003). Use of response surface methodology to describe the combined effect of storage time, locust bean gum and dry matter of milk on the physical properties of low-fat set yoghurt. International Dairy Journal, 13, 909-916.

Vahcic, N. &Hruskar, M. (2000). Slovenian fermented milk with probiotics, Zootehnika, 76, 41-46.

Vasiljevic, T. & Shah, N. P. (2008). Probiotics-From Metchnikoff to bioactives. International Dairy Journal, 18, 714-728.

Viljanen, M., Kuitunen, M., Haahtela, T., Juntunen-Backman, K., Korpela, R. & Savilahti, E. (2005). Probiotic effects on faecal inflammatory markers and on faecal IgAin food allergic atopic eczema/dermatitis syndrome infants.Pediatric Allergy and Immunology, 16, 65-71.

Vinderola, C. G., and Reinheimer, J. A. (2000). Enumeration of *lactobacillus casei* in the presence of *Lactobacillus acidophilus*, *bifidobacterium* and lactic starter bacteria in fermented dairy products. International Dairy Journal, 10, 271-275.

Vinderola, C. G., Bailo, N. & Rienheimer, J. A. (2000). Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. Food Research International, 33, 97-102.

ifrt.srbiau.ac.ir