Archive of SID

بررسی زنده ماندن میکروب های لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدو باکتریوم بیفیدوم و شمارش آن ها در شیر و ماست پروبیوتیکی

محمد حسین مرحمتی زاده [۱*]، سارا رضازاده [۲]، نجمه نجف زاده [۳]، آیدا شهبازی [۳]

۱ـ گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون ـ ایران.
۲ـ دانش آموخته مهندسی صنایع غذایی و عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون ـ ایران.
۳ـ دانشجوی زیست شناسی سلولی مولکولی گرایش میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون ـ ایران.
*نویسنده مسئول: Dr_mhmz@yahoo.com

چکیده

در این پژوهش ضمن تولید فرآورده های حاوی باکتری پروبیوتیک لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس وبیفیدوباکتریوم بیفیدوم به‌شکل جداگانه ومخلوط درشیر و ماست به بررسی ومقایسه آن‌ها با یکدیگر پرداختیم. به نمونه اول شیر، باکتری لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس تلقیح شد، نمونه دوم باکتری بیفیدو باکتریوم بیفیدوم و به نمونه سوم باکتری‌های لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس- بیفیدو باکتریوم بیفیدوم به صورت مشترک به عنوان استارتر افزوده گردید و سپس به گرمخانه انتقال داده شد. پس از اینکه اسیدیته نمونه‌ها به ۴۲ درجه دورنیک رسید، محصولات به یخچال انتقال داده‌شدند. در پاساژ دوم ازشیر پروبیوتیکی تولیدشده در مرحله اول ماست پروبیوتیکی تولیدشد ودر طی گرمخانه‌گذاری وطی نگهداری در یخچال زنده بودن باکتری‌ها در فرآورده مورد بررسی قرارگرفت وبه صورت مستقیم شمارش گردید. نتیجه این تحقیق به این صورت بود که طی ۲۰ روز نگهداری فرآورده‌های پروبیوتیکی میکروب‌ها به‌صورت زنده باقی می‌مانند وحرکت باکتری‌ها در زیر میکروسکوپ نشان دهنده زنده بودن میکروب‌ها است و میزان آن‌ها در واحد گرم 10^{10} میکروب بود که از حداقل مورد نظر ۳ بلوگ بالاتر بود. سرعت رشد و میزان ماندگاری باکتری‌ها در نمونه‌های حاوی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بیشتر از نمونه‌های حاوی باکتری یفیدوباکتریوم بیفیدوم بود. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، ۱۳۸۸، دوره ۵، شماره ۱، ۵۱-۴۷.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، بیفیدوباکتریوم بیفیدوم، شمارش میکروبی.

Studying on survival Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum microbes and count them in probiotical milk and yoghurt

Marhamatizadeh, M.H.[1*], Rezazadeh, S.[2], Najafzadeh, N.[3], Shahbazi, A.[3]

[1] *Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicinc, Islamic Azad University, Kazeroon Branch, Kazeroon- Iran.*

[2] *Graduated of Food Sciences, Young Researchers Club, Islamic Azad University, Kazeroon Branch, Kazeroon- Iran.*

[3] *Graduated of biology Division of microbiology, Islamic Azad University, Kazeroon Branch, Kazeroon- Iran.*

Abstract

In this study in addition to produce probiotic products of milk and yogurt containg Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum in combination and separately, we comtared them together.To the first sample Lactobacillus acidophilus had injected to the milk and to the second sample Bifidobacterium bifidum and tired one Lactobacillus acidophilus - Bifidobacterium bifidum added jointly as a starter and then they put in to the 38 degree incubation. When the pH idices reached to 42 degree of Dournic, the product put in to the refrigerator. In the second stage from the produced milk in the first stage the probiotic yogurt was made. And during the incubation and the being in the refrigerator, microbial activation was studied and counted directly. The results was that the microbes are alive after keeping them for 20 days, and the action and movement of bacteria's showed that they are still alive and the amount of them in each gram unit was 1010 microbe, that was 3 log more then the minimum amount whitest needed. ***et.J.of Islamic.Azad.Univ., Garmsar Branch. 5,1:47-51, 2009.***

Keywords: Probiotic, Lactobacillus acidophilus, Biphidobacterium biphidum.

مقدمه

پروبیوتیک‌ها که معنای «به خاطر زندگی» را دارند، قرن‌هاست که به عنوان اجزای طبیعی برای غذاهای بهبود دهنده سلامت مورد مصرف می‌باشند. نقش مثبت عدیده‌ای از باکتری‌ها در مبحث سلامت برای اولین بار توسط یک دانشمند روسی معروف به پدر ایمن شناسی نوین و برنده جایزه نوبل، به نام مچنیکوف، در اوایل قرن بیستم مطرح گردیده است او معتقد بود که:

" این امکان وجود دارد که فلور میکروبی روده را با تجویز میکروب‌های شناخته شده مفید، در مقابل میکروب‌های مضر، تقویت و مورد حمایت قرار دهد" (۲).

پروبیوتیک‌ها، نوعی مکمل غذایی هستند که از باکتری‌ها و قارچ های بالقوه مفید تشکیل شده اند. تفاوت پروبیوتیک با سایر ریززنده‌ها که ممکن است دارای خواص سلامت بخش برای میزبان باشند در این خاصیت نهفته است که اثرات سلامت بخش پروبیوتیک‌ها از طریق فعالیت زیستی آن‌ها در داخل بدن، پس از استقرار در بخش های مختلف ایجاد می شود (۲).

www.SID.ir

Archive of SID

لذا این فرآورده غذایی جزء غذاهای فرا ویژه یا هدفمند طبقه‌بندی می‌شوند. زیرا علاوه بر ارزش تغذیه‌ای، اثرات درمانی و سلامت بخشی چون مهار عفونت‌های دستگاه گوارش، کاهش سطح کلسترول خون، تقویت سیستم ایمنی، افزایش سطح تحمل لاکتوز و فعالیت ضد سرطانی بر خوردار می‌باشد (۷).

مصرف فرآورده‌های پروبیوتیک در مقایسه با سایر شیوه‌های دریافت پروبیوتیک‌ها هم‌چون کار گذاری موضعی یا مصرف خوراکی از طریق مکمل - خواری (مانند داروها) دست کم به سه دلیل از مقبولیت بیشتر نزد عموم برخوردار است؛ نخست آن که مردم کمتر به مصرف مواد دارویی تمایل نشان می‌دهند، دوم آن که جنبه حسی مصرف فرآورده‌های غذایی اثر حمایت کننده بر پروبیوتیک‌ها دارند. از این رو فن‌آوری تولید فرآورده‌های پروبیوتیک اهمیت بنیادین دارد (۴).

قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها در فرآورده‌های غذایی در درجه اول اهمیت قرار دارد و ارزش اساسی آن‌ها محسوب می‌شود، زیرا خواص سلامت بخش فرآورده به تعداد سلول‌های زنده در g یا ml فرآورده در هنگام مصرف و البته میزان مصرف در روز یا هفته وابسته است. در تمامی فرآورده‌های پروبیوتیک، شاخص BV یا ارزش زیستی به مفهوم تعداد سلول‌های زنده و فعال پروبیوتیک در گرم یا میلی‌لیتر فرآورده، ارزش اساسی آن‌ها را شامل می‌شود. شاخص BV باید به اندازه کافی بالا باشد تا پس از مصرف، با توجه به نوع فرآورده، تعداد کافی سلول‌های زنده پروبیوتیک به محیط روده راه یابند (۱، ۴).

لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم باید زیست پذیری خود را در غذای حامل حفظ کنند تا به میزان "حداقل" در حین مصرف برسند. این ملاک بسیار اساسی و مهم برای تمام فرآورده‌هایی است که با ادعای سودمندی برای سلامتی فروخته می‌شوند. زیست‌پذیری باکتری‌های پروبیوتیک در طی زمان نگهداری طولانی در دمای یخچال راضی کننده نمی‌باشد (۱).

مواد و روش‌کار

۱- مایه لاکتیک حاوی باکتری لیوفیلیزه لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس (*Lactibacillus acidophilus*) و بیفیدو باکتریوم بیفیدوم (*Bifidobacterium bifidum*) به صورت کشت آغاز گر تک سویه تجاری از شرکت CHR Hansen

۲- شیر استریلیزه ۱/۵ درصد چربی

۳- مایه ماست موجود در بازار

پاساژ اول: کشت میکروب‌های پروبیوتیک در شیر

ابتدا ۴ ظرف یک لیتری تهیه شد و به هر ظرف مقدار یک لیتر شیر استریلیزه ۱/۵ درصد چربی افزوده شد. ظرف اول به عنوان شاهد در نظر گرفته شد (فاقد باکتری پروبیوتیکی)، به ظرف دوم ۰/۶۶ گرم در لیتر طبق توصیه شرکت تولید کننده برای بدست آوردن ماده غذایی پروبیوتیکی حاوی بیش از 10^7 عدد میکروب لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در گرم، به ظرف سوم ۰/۶۶ گرم در لیتر بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم و به ظرف چهارم مخلوطی از هر دو باکتری فوق به نسبت‌های مساوی (هر کدام ۰/۳۳ گرم در لیتر) به عنوان استارتر به طور مستقیم به شیر افزوده و به هم زده شد و سپس در گرمخانه ۳۸ درجه سانتیگراد قرار داده و طی ساعات مختلف شمارش میکروبی انجام گرفته شد تا رسیدن به اسیدیته ۴۲ درجه دورنیک (۵).

پاساژ دوم: تهیه ماست پروبیوتیک

به منظور تولید ماست حاوی باکتری‌های پروبیوتیکی در این مرحله پس از تهیه ۴ ظرف مقدار یک لیتر شیر استریلیزه ۱/۵ درصد چربی و ۱۰ گرم مایه ماست افزوده گردید، ظرف اول به عنوان شاهد در نظر گرفته شد (فاقد باکتری پروبیوتیک)، به ظرف دوم میزان ۱۰ گرم از نمونه ی شیر حاوی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، به ظرف سوم میزان ۱۰ گرم از نمونه‌ی شیر حاوی باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و به ظرف چهارم میزان ۱۰ گرم از مخلوط دو باکتری فوق افزوده شد.

سپس نمونه‌ها به گرمخانه ۳۸ درجه سانتیگراد انتقال داده شد و اسیدیته طی ساعات متوالی اندازه‌گیری شد. زمانی که اسیدیته ۹۰ درجه دورنیک رسید، ماست‌های تولید شده از گرمخانه خارج و به یخچال انتقال داده شد. پس از آن شمارش میکروبی طی ساعات مختلف صورت گرفت. شمارش میکروبی در طول گرمخانه گذاری به منظور تشخیص سرعت رشد باکتری‌ها انجام گرفت شمارش میکروبی در هر مرحله با استفاده از روش شمارش مستقیم انجام شد (۳).

در مرحله بعد به منظور شمارش میکروبی در محصول با دوز پایین‌تر میکروب، ۰/۳۳ گرم باکتری لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم به صورت مجزا استفاده شد. در نمونه مشترک از هر میکروب به میزان ۰/۱۶۵ گرم کشت داده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

جدول ۱ شمارش میکروبی پاساژ اول با دوز پایین را نشان می‌دهد.

اسیدیته شیر حاوی لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس ۵۲ درجه دورنیک و شیر حاوی بیفیدو باکتریوم بیفیدوم ۵۰ درجه دورنیک و شیر حاوی لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس- بیفیدو باکتریوم بیفیدوم ۵۰ درجه دورنیک بود.

شمارش میکروبی در زمان یخچال‌گذاری در جدول ۲ نشان داده شده است. جدول ۳ شمارش میکروبی پاساژ دوم با دوز ۰/۳۳ گرم در لیتر را نشان می‌دهد.

جدول ۱ - شمارش میکروبی پاساژ اول با دوز ۰/۳۳ گرم در لیتر

زمان شمارش میکروب	۲ ساعت پس از افزودن استارتر	۵ ساعت پس از افزودن ستارتر
L.a	۷×۱۰^{۱۰}	۱۱×۱۰^{۱۰}
B.b	۵×۱۰^{۱۰}	۵×۱۰^{۱۰}
L.a & B.b	۷×۱۰^{۱۰}	۴×۱۰^{۱۰}

اسیدیته لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس ۵۲ درجه دورنیک، بیفیدو باکتریوم بیفیدو ۵۰ درجه دورنیک و لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس - بیفیدو باکتریوم بیفیدوم ۵۰ درجه دورنیک بود.

در زمان یخچال گذاری شمارش میکروبی باز هم انجام گرفت و نتیجه آن :

جدول ۲ - شمارش میکروبی نمونه‌های پاساژ اول در یخچال

زمان شمارش میکروب	L.a	B.b	L.a & B.b
۱۸ ساعت پس از افزودن استارتر	۹×۱۰^{۱۰}	۷×۱۰^{۱۰}	۷×۱۰^{۱۰}

جدول ۳ - شمارش میکروبی پاساژ دوم با دوز ۰/۳۳ گرم میکروب در لیتر طی ۱۰ روز نگهداری

زمان (روز) میکروب	شاهد	L.a	B.b	L.a &B.b
۱	۱×۱۰^{۱۱}	۱×۱۰^{۱۱}	۵×۱۰^{۱۰}	۷×۱۰^{۱۰}
۳	۱×۱۰^{۱۱}	۲×۱۰^{۱۱}	۴×۱۰^{۱۰}	۵×۱۰^{۱۰}
۴	۱×۱۰^{۱۱}	۱×۱۰^{۱۱}	۷×۱۰^{۱۰}	۱×۱۱^{۱۰}
۷	۱×۱۰^{۱۱}	۲×۱۰^{۱۱}	۱×۱۱^{۱۰}	۱×۱۱^{۱۰}
۱۰	۱×۱۰^{۱۱}	۱×۱۰^{۱۱}	۹×۱۰^{۱۰}	۹×۱۰^{۱۰}

بحث و نتیجه‌گیری

در حال حاضر، ماست مقبول ترین و پر مصرف ترین فرآورده پروبیوتیک در جهان است. علت آن خواص حسی منحصر به فرد این فرآورده از یک سو و ارزش سلامت بخش آن از سوی دیگر است. به طور کلی، ماست به دلیل اسیدیته بالا و pH پایین، محیط مناسبی برای حفظ و انتقال پروبیوتیک‌ها به بدن نیست و در مقابل پنیر و سایر فرآورده های لبنی با pH بالاتر می توانند از نقطه نظر یاد شده موثر باشند. این موضوع به ویژه در مورد بیفیدو باکتریوم‌ها از اهمیت نخست بر خوردار است. با این وجود، مصرف زیاد ماست، این فراورده را به مهم‌ترین و مرسوم ترین فراورده لبنی مبدل ساخته است. از این رو تولید ماست پروبیوتیک با خواص کیفی بهینه از دیدگاه قابلیت زیستی، مدت زمان تخمیر (مدت زمان گرمخانه گذاری) خواص حسی و ارزش اقتصادی اهمیت فراوان دارد (۴،۶).

ماست پروبیوتیک به لحاظ ظاهری شبیه به ماست معمولی است اما هر گرم از آن حداقل دارای ۱۰ باکتری پروبیوتیک زنده غیر از باکتری‌های بولگاریس و ترموفیلوس موجود در ماست معمولی است. از نظر تغذیه‌ای مصرف آن سبب پاسخگوئی به نیازهای مربوط به اسید آمینه و اسیدهای چرب اساسی مورد نیاز بدن می‌شود. ضمناً فعالیت باکتری‌های پروبیوتیک سبب افزایش دسترسی بیولوژیک بدن به یون‌ها شده که از این طریق کلسیم، آهن، منیزیم، مس، سدیم و... بهتر جذب می‌شوند. ماست پروبیوتیک از نظر انواع ویتامین‌ها مثل ویتامین C، A، ریبوفلاوین، تیامین، بیوتین، اسیدفولیک، توکوفرول و... بسیار غنی تر از شیر و ماست معمولی است (۲).

تغییرات حاصله در شیر و ماست، حاوی باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدو باکتریوم بیفیدوم از نظر شاخص‌های اسیدیته، و قابلیت زیستی باکتری‌های پروبیوتیکی برای رسیدن به اسیدیته ۴۲ درجه دورنیک (شیر) و ۹۰ درجه دورنیک (ماست) در گرمخانه ۳۸ درجه سانتیگراد در زمان تولید و طی مدت زمان ماندگاری در یخچال ثبت گردید. اعداد اسیدیته بر حسب درجه دورنیک در ساعات اولیه تقریباً ثابت بودند که به علت شروع نشدن فعالیت پروبیوتیک‌ها ارزیابی گردید.

در طی تولید شیر پروبیوتیکی با دوز پایین باکتری‌های لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس، بیفیدو باکتریوم بیفیدوم و مخلوط لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس - بیفیدو باکتریوم بیفیدوم به شیر ۱/۵ درصد چربی، رشد باکتری‌های لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس با

www.SID.ir

Archive of SID

توجه به تعداد میکروب‌های شمارش شده بالاتر از بیفیدو باکتریوم بیفیدوم و مخلوط حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدو باکتریوم بیفیدوم بود.

آمار نشان می‌دهند که به طور کلی میزان افت بیفیدو باکتریوم‌ها در مقایسه با لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس و سایر پروبیوتیک‌های اسید لاکتیک بیشتر و میزان رشد و تکثیر آن در فرآورده کمتر است. این موضوع را می‌توان به حساسیت بیشتر این جنس نسبت به اکسیژن، اسیدیته بالا و PH پایین، نیاز به مکمل‌های رشد یعنی ازت آلی کوچک مولکول و ویتامین‌ها و نیاز به پتانسیل احیای پایین نسبت داد (۴).

از شیرهای حاوی باکتری‌های پروبیوتیک نگهداری شده در یخچال ماست درست شد. پس از آن شمارش میکروبی طی ساعات مختلف صورت گرفت. شمارش میکروبی در طول گرمخانه گذاری به منظور تشخیص سرعت رشد باکتری‌ها انجام گرفت که در این میان لاکتو باسیلوس اسیدو فیلوس بیشترین میزان میکروب و پس از آن مخلوط لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس - بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و سپس بیفیدو باکتریوم بیفیدوم بیشترین میزان میکروب ها را در چند روز متوالی دارا بودند. حرکت باکتری ها در زیر میکروسکوپ نشان دهنده زنده بودن میکروب‌ها حتی بعد از ۲۰ روز ماندگاری در محصول بود که در نمونه حاوی لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس بیشترین فعالیت را دارا بود.

به رغم پیشرفت های چشمگیر در زمینه پروبیوتیک ها و تولید فرآورده های پروبیوتیک، هنوز خط - معیاری واحد و جهانی در مورد این فرآورده ها وجود ندارد. با این وجود برخی از کشورها نظیر ژاپن دارای خط - معیاری مشخص و جدی در این ارتباط هستند (۱۰). تعداد سلول های زنده پروبیوتیک در هر گرم یا میلی لیتر از فرآورده در لحظه مصرف، ارزش اساسی فرآورده‌های پروبیوتیک را شامل می‌شود؛ از این رو که تعیین کننده کارآیی این محصولات است. شاخص یاد شده ارزش زیستی (BV^{4}) فرآورده و کمینه آن برخورداری فرآورده از اثرات دارویی ادعا شده کمینه ارزش زیستی (MBV)[5] نامیده می‌شود. مهمترین پیشنهاد و خط - معیار در ارتباط با شاخص MBV فرآورده‌های پروبیوتیک توسط IDF، 10^{7} است.

مشکلات تولید ماست پروبیوتیک را می‌توان در سه دسته تقسیم بندی کرد؛ از دست رفتن قابلیت زیستی یا بقا پروبیوتیک‌ها در مرحله تولید و نگهداری، پایین بودن سرعت تخمیر (بالا بودن زمان گرمخانه گذاری) نسبت به ماست معمولی و رضایت بخش نبودن خواص حسی فرآورده نهایی در مقایسه با ماست معمولی (۱).

حداقل میزان باکتری در فرآورده های پروبیوتیک 10^{7} است در حالی که در این مطالعه میزان باکتری 10^{10} میکروب بود و در نمونه حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به 10^{11} رسید، بنابراین خواص مورد نظر میکروب‌های پروبیوتیکی را در مصرف کننده به وجود می‌آورند.

به طور کلی رشد بیفیدو باکتر به‌عنوان گونه منفرد در محیط شیر به دلیل نقصان پروتئوکافتی بسیار کند است (۱).

مدینا و همکاران در ۱۹۹۵ گزارش کرده‌اند که میزان افت بیفیدوباکتریوم‌ها در کشت‌های مخلوط پروبیوتیک بیشتر از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس است (۹).

اصطلاح (پروبیوتیک‌ها) زمانی که آن‌ها را به عنوان فاکتورهای پیش برنده رشد شناختند، برای اولین بار در سال ۱۹۶۵ توسط Lilly و Stillwell به کار برده شد. برخلاف آنتی بیوتیک‌ها، پروبیوتیک‌ها به عنوان فاکتورهای مشتق شده ی میکروبی، باعث تحریک رشد سایر میکروارگانیسم‌ها می‌شوند (۲).

کایلاساپاتی (Kailasapathy) و ریبکا (Rybka) در سال ۱۹۹۷ پیشنهاد نمودند که پروبیوتیک باید قبل و یا همزمان با مایه به ترکیب غذایی افزوده گردد. اگر پروبیوتیک بعد از تخمیر اضافه گردد هیچ‌گونه رشدی مشاهده نمی‌گردد. این موضوع نیز تا حدودی اهمیت سرعت بالای رشد پروبیوتیک در مرحله ابتدایی گرمخانه‌گذاری را نشان می‌دهد زیرا مایه ماست دارای سرعت رشد بالایی است و به سرعت بر لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس غلبه می‌نماید، مگر اینکه در طول پاساژ مرحله اول، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به محیط عادت کرده و رشد و فعالیت مناسب خود را پیدا نموده باشد و توانایی رقابت یا همزیستی با مایه ماست را پیدا کرده باشد (۸).

منابع

۱- خسروی دارانی، ک. کوشکی، م ر (۱۳۸۷) پروبیوتیک‌ها در شیر و فرآورده های آن، انتشارات مرز دانش، چاپ اول، صفحه ۱۲-۱.

۲- شاکری، م. (۱۳۸۲) استفاده از پساب کره شیرین در تولید ماست پروبیوتیک، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه فردوسی مشهد.

www.SID.ir

Archive of SID

۳ـ فرخنده، ع. (۱۳۷۷) روش های آزمایش شیر و فرآورده های آن، چاپ چهارم، انتشارات دانشگاه تهران، صفحه: ۲۷۰-۲۶۶.

۴ـ مرتضویان، ا م. سهراب وندی، س. (۱۳۸۵) پروبیوتیک و فرآورده‌های غذایی پروبیوتیک، انتشارات اتا، چاپ اول، صفحه۲۰۲-۱۵۲.

۵ـ موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران (۱۳۸۵) شیر و فرآورده‌های آن. تعیین اسیدیته و pH- روش آزمون، استاندارد ملی شماره ۹۹۸۵.

6. Gardiner, G., Stanton, C., Lynch, P. B., Collins, J. K., Fitzgerald, G., Ross, R. P. (1999) Yogurt as probiotic carrier food. *Journal of Dairy Science*, **82**: 1379.
7. Gomes, A. M. P., Malkata, F.X. (1999) Probiotic bacteria: saftety, fuctional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 10-139.
8. Kailasapathy, K. Rybka, S. (1997) L.acidophilus and Bifidobacterium ssp-their therapeutic potential and survival yoghurt. *Aust.J. Dairy Thechnol*, **52:** 28-35.
9. Medina, L. M., Jordano, R. (1995) Growth and metabolism of selected strains of probiotics bacteria in milk. *Journal of Food protection*, 58-70.
10. Modler, H. W., McKeller, R. C., Yaguchi, M. (1990) Role of microorganisms in food production and preservation, Candidan Institute of Food Science and Technology, 23-29.

www.SID.ir