مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال هفتم، شماره ۵، ویژه‌نامه زمستان ۱۳۹۱، صفحات ۱۵۸-۱۴۹

بررسی ویژگی‌های میکروبی، بیوشیمیایی و حسی ماست سویای پروبیوتیک

رضا محمدی[۱]، ابوالفضل روزی طلب[۲]، زهرا شاه عباس پور[۳]، سید امیرمحمد مرتضویان[۴]

۱- کمیته تحقیقات دانشجویان، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد مهندسی کشاورزی- علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین، ایران
۳- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه غیرانتفاعی رودکی تنکابن، ایران
۴- نویسنده مسئول: دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، پست الکترونیکی: mortazvn@sbmu.ac.ir

چکیده

سابقه و هدف: در سال‌های اخیر، مصرف غذاهای فراسودمند به‌دلیل افزایش آگاهی مردم و ارزش تغذیه‌ای این محصولات، افزایش یافته است. تولید ماست سویای پروبیوتیک پتانسیل فراسودمند بودن آن را دو چندان خواهد کرد. هدف از این پژوهش، بررسی ویژگی‌های میکروبی، بیوشیمیایی و حسی ماست سویای پروبیوتیک می‌باشد.

مواد و روش‌ها: نسبت‌های مختلف شیرگاو به‌شیرسویا (۱۰۰:۰، ۷۵:۲۵، ۵۰:۵۰، ۲۵:۷۵، ۰:۱۰۰) با استفاده از بازسازی پودر شیر بدون چربی تهیه شدند و دو نوع باکتری آغازگر ABY1 و ABY2 (که حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA-5 و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* Bb-12 همراه با باکتری‌های معمولی ماست) به‌آن‌ها تلقیح شد. شاخص‌های pH، اسیدیته قابل تیتر، پتانسیل احیا، مقادیر اسید لاکتیک و اسید استیک، قابلیت زیستی باکتری‌های پروبیوتیک و ارزیابی حسی نمونه‌ها بررسی شد.

یافته‌ها: نسبت مساوی شیرگاو به‌شیرسویا، کشت شده با باکتری آغازگر ABY-1 بیش‌ترین قابلیت زیستی را داشتند ($p<۰/۰۵$). بالاترین ویژگی‌های حسی، مربوط به تیمارهایی با بالاترین نسبت شیرگاو و تلقیح شده با باکتری ABY-1 بود. پس از آن، تیمار حاوی نسبت مساوی شیرگاو به شیرسویا (۵۰:۵۰-ABY-1) سومین رتبه در پذیرش کلی داشت ($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: نسبت مساوی شیرگاو به شیرسویا بالاترین سرعت تغییرات بیوشیمیایی را نشان داد و با افزایش میزان شیرسویا، قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها به‌دلیل حضور ترکیبات پری‌بیوتیکی سویا و کاهش فعالیت پروتئولیتیکی باکترهای آغازگر ماست، افزایش یافت.

واژگان کلیدی: *بیفیدباکتریوم لاکتیس، پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*

مقدمه

امروزه، مقبولیت و مصرف فراورده‌های پروبیوتیک در کشورهای جهان به‌ویژه اروپا، ایالات متحده و ژاپن رواج چشمگیر یافته است. پروبیوتیک‌ها ریز زنده‌های (باکتری و مخمر) زنده‌ای می‌باشند که با استقرار در بخش‌های مختلف بدن (اساساً روده)، با عمل زیستی خود، عمدتاً از طریق حفظ و بهبود توازن میکروبی روده، سبب ایجاد خواص سلامت بخش برای میزبان می‌شوند. گونه *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* مهم‌ترین و پرمصرف‌ترین گونه لاکتوباسیلوس و به‌همراه بیفیدوباکتریوم‌ها، مهم‌ترین ریززنده پروبیوتیک به‌شمار می‌آید (۲، ۱). ویژگی‌های سلامت بخشی مانند خواص ضد سرطان‌زایی، ضد جهش‌زایی، ضد عفونتی، تحریک سیستم ایمنی، کاهش‌دهندگی کلسترول سرم، افزایش ارزش تغذیه‌ای غذا، درمان انواع اسهال، عفونت‌های دستگاه گوارش و دستگاه ادرای تناسلی به این ریززنده‌ها نسبت داده می‌شود (۳). در میان فراورده‌های غذایی پروبیوتیک، فراورده‌های لبنی پروبیوتیک به‌ویژه فراورده‌های تخمیری لبنی از پذیرش و مصرف بیشتری برخوردار هستند. امروزه فراورده‌های تخمیری پروبیوتیک حدود ۲۵٪ از کل فراورده‌های تخمیری را شامل می‌شوند. ماست پذیرفته شده‌ترین و پرکاربردترین فراورده پروبیوتیک در جهان است. در تمامی فراورده‌های پروبیوتیک، « ارزش زیستی-BV »، یعنی تعداد سلول‌های زنده و فعال پروبیوتیک در گرم یا

میلی لیتر فراورده، ارزش اساسی آن‌ها محسوب می‌شود. شاخص BV باید به‌اندازه کافی بالا باشد تا پس از مصرف تعداد کافی سلول زنده به‌محیط روده راه یابد. به‌منظور دستیابی به‌اثرات سلامت بخش پروبیوتیک‌ها، کمینه ارزش دارویی 10^6ml cfu/ در فراورده نهایی پیشنهاد شده است (۲). در میان فراورده‌های پروبیوتیک تخمیری، ماست به‌دلیل اسیدیته بالا و pH پایین، محیط مناسبی برای انتقال پروبیوتیک‌ها به‌بدن نیست (۵). این موضوع به‌ویژه در خصوص بیفیدوباکتریوم‌ها از اهمیت ویژه برخوردار است (۲). بنابراین، یکی از مسائل این تحقیق دستیابی به‌قابلیت زیستی قابل قبول پروبیوتیک‌ها در محصول نهایی می‌باشد. لوبیای سویا به دلیل خواص سلامت بخش تغذیه‌ای (ارزش پروتئینی و املاح) و دارویی (نظیر کاهش سطح کلسترول سرم، کاهش میزان تری گلیسیریدها، خواص ضدسرطانی، بهبود متابولیسم چربی‌ها، پیش‌گیری از عوارض پوکی استخوان و اختلالات یائسگی) و هم‌چنین ویژگی‌های عملکردی مناسبی که پروتئین‌های آن به‌ساختار غذا می‌دهند (همانند ژلاتینه شدن، امولسیون سازی، ایجاد کف و آب‌گیری) سبب می‌شود تولید ماست بر پایه شیر سویا با استفاده از میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، به‌خاطر افزایش پتانسیل فراویژه بودن آن، از جذابیت تکنولوژیک و صنعتی بالایی برخوردار باشد (۴). مزایای دیگری مانند کاهش قندهای نفخ‌زای سویا و افزایش مقدار ایزوفلاون‌های آزاد در سویا پس از تخمیر (۵)، هم‌چنین ویژگی هایی نظیر مناسب بودن سوبسترایی برای رشد و تکثیر پروبیوتیک‌ها در محصول و قابلیت پروبیوتیک-حفاظ بودن مناسب از نظر ساختاری در برابر عوامل خطرزای محیط یعنی شرایط اسیدی، pH پایین فراورده و معده و هم‌چنین صفرای روده نیز به‌ماست پروبیوتیک تهیه شده از شیرسویا نسبت داده شده است (۶). بنابراین تولید فراورده‌های تخمیری از جمله ماست بر پایه شیر سویا با استفاده از میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، ضمن رفع نقایص مربوط به‌طعم لوبیایی ناشی از ترکیبات هگزانال و پنتانال و نفخ ناشی از الیگوساکاریدهای غیر قابل هضم، پتانسیل فراویژه بودن آن را به‌طور چشم‌گیر افزایش می‌دهد و می‌تواند به‌عنوان یک ماده غذایی سلامت بخش در رژیم غذایی روزانه مردم به‌کار رود (۷).

با توجه به‌اهمیت دو فاکتور نسبت شیرگاو به‌شیرسویا و نوع باکتری‌های پروبیوتیک در تولید ماست سویای تخمیری، این مطالعه با هدف بررسی تأثیر این دو فاکتور بر زنده مانی مناسب ریزنده‌های پروبیوتیک در فراورده نهایی (ضمن دستیابی به‌خواص حسی بهینه) طراحی و انجام شد.

مواد و روش‌ها

کشت‌های منجمد شده تجاری DVS شامل باکتری‌های آغازگر *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA-5، *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* Bb-12، *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* می‌باشد که با نام‌های تجاری ABY-1 و ABY-2 شناخته شده است و توسط شرکت کریستین هنسن از کشور دانمارک فراهم شد. روش تهیه نمونه‌ها به‌شرح زیر می‌باشد:

در این پژوهش ۱۰ تیمار بررسی شد، که هر تیمار در سه تکرار انجام گرفت. اثر پنج نسبت شیرگاو به‌شیر سویا (۱۰۰:۰، ۷۵:۲۵، ۵۰:۵۰، ۲۵:۷۵، ۰:۱۰۰) و دو نوع کشت آغازگر مخلوط ABY-1 و ABY-2 (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA-5، بیفیدوباکتریم لاکتیس Bb-12 و باکتری‌های ماست؛ *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس*) مورد بررسی قرار گرفت، بدین ترتیب که ابتدا نسبت‌های گوناگون شیر سویا و شیر خشک بدون چربی با باز سازی پودر شیر بدون چربی تهیه شد. سپس تیمارها تحت فرآیند گرمایی (۸۵°C به‌مدت زمان ۳۰ min) قرار گرفتند. پس از سرد کردن نمونه‌ها تا دمای تلقیح (۴۱°C)، آغازگرها (باکتری‌های پروبیوتیک و باکتری‌های ماست) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده تلقیح شدند. در ادامه نمونه‌ها در دمای ۴۰°C مورد گرم‌خانه‌گذاری قرار گرفتند و در pH۴/۵±۰/۰۲ از گرم‌خانه خارج شده و سرد شدند (در دو مرحله: ابتدا به‌سرعت تا ۱۵°C و سپس تا ۵°C). درحین تخمیر، نمونه‌ها هر ۳۰ دقیقه یک بار تا رسیدن به‌pH نهایی از نظر اسیدیته، pH و پتانسیل احیا مورد ارزیابی قرار گرفتند. در پایان تخمیر برای تعیین قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها، از نمونه‌ها کشت میکروبی تهیه شد.

آزمون میکروبی

شمارش اختصاصی پروبیوتیک‌ها: شمارش زنده پروبیوتیک‌ها (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA-5 و *بیفیدباکتریوم لاکتیس* Bb-12) با استفاده از محیط کشت MRS-bile آگار (MRS آگار و bile به‌ترتیب ساخت شرکت Merck از کشور آلمان و شرکت Sigma-Aldrich از کشور آمریکا) مطابق با روش مرتضویان و همکاران (۲۰۰۶) انجام شد. پلیت‌ها در شرایط هوازی و بی هوازی در دمای (۳۷°C)

به‌مدت زمان دست کم ۷۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. شرایط بی‌هوازی با استفاده از جار بی‌هوازی و گازپک تیپ A ایجاد شد.

آزمون‌های شیمیایی: pH و پتانسیل احیا: در دمای اتاق با استفاده از pH متر HANNA مجهز به‌الکترود MA235 ساخت کشور ایتالیا اندازه‌گیری شد. سرعت متوسط افت pH و افزایش پتانسیل احیا طی تخمیر بر طبق روش مرتضویان و همکاران در سال ۲۰۱۰ اندازه‌گیری شد (۹).

اسیدیته قابل تیتر: ۱۰ میلی لیتر نمونه با ۱۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط و با سود ۰/۱ نرمال در حضور معرف فنل فتالئین تیتر شد. مقدار این شاخص برحسب درجه دورنیک تعیین شد (۹).

مقادیر اسید استیک و اسید لاکتیک: درصد اسید استیک و اسید لاکتیک نمونه‌ها توسط دستگاه HPLC مدل Cecil, CE4200 ساخت کشور آمریکا اندازه‌گیری شد (۹).

ارزیابی حسی: ویژگی‌های حسی شامل طعم، بافت و ظاهر (رنگ و دو فاز شدن) مورد ارزیابی قرار گرفتند. این آزمون توسط ۱۰ نفر ارزیاب آموزش دیده کارخانه مکسوی جهت تعیین تیمار بهینه انجام گرفت. امتیازدهی به‌شیوه مقیاس ۵ نقطه‌ای شامل: غیر قابل مصرف= ۰، غیرقابل قبول= ۱، قابل قبول= ۲، مطلوب=۳ و عالی=۴ انجام شد. ضرایب ۶ برای طعم، ۳ برای بافت و ۲ برای ظاهر هر یک از تیمارها در نظر گرفته شد (۱۰).

ارزیابی آماری: برای بررسی آماری نتایج از آزمون فاکتوریل در غالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد و کلیه آزمون‌ها در سه تکرار انجام شدند. تجزیه وتحلیل آماری با استفاده از نرم افزار minitab 14 و آزمون آماری دانکن انجام شد. نمودارها به‌کمک نرم افزار Excel رسم شد. ($p<۰/۰۵$) به‌معنی وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در نظر گرفته شد.

اختصارات اسامی تیمارها بدین شرح می‌باشد:

T1 : ۱۰۰٪ شیر لبنی تلقیح شده با آغازگر ABY-1

T2: ۷۵٪ شیر لبنی و ۲۵٪ شیر سویا تلقیح شده با آغازگر ABY-1

T3: ۵۰٪ شیر لبنی و ۵۰٪ شیر سویا تلقیح شده با آغازگر ABY-1

T4: ۲۵٪ شیر لبنی و ۷۵٪ شیر سویا تلقیح شده با آغازگر ABY-1

T5: ۱۰۰٪ شیر سویا تلقیح شده با آغازگر ABY-1

T6: ۱۰۰٪ شیر لبنی تلقیح شده با آغازگر ABY-2

T7: ۷۵٪ شیر لبنی و ۲۵٪ شیر سویا تلقیح شده با آغازگر ABY-2

T8: ۵۰٪ شیر گاو و ۵۰٪ شیر سویا تلقیح شده با آغازگر ABY-2

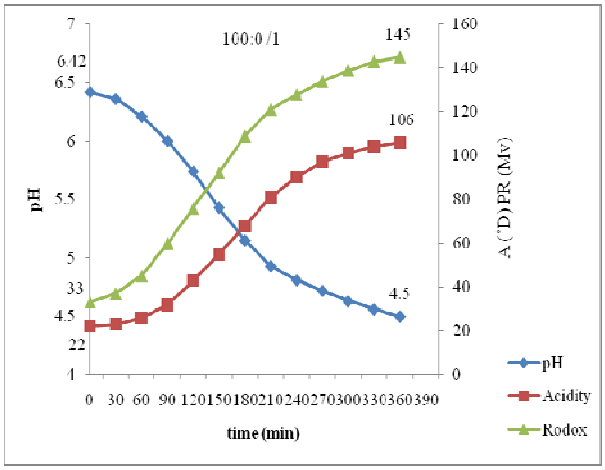
T9: ۲۵٪ شیر لبنی و ۷۵٪ شیر سویا تلقیح شده با آغازگر ABY-2

T10: ۱۰۰٪ شیر سویا تلقیح شده با آغازگر ABY-2

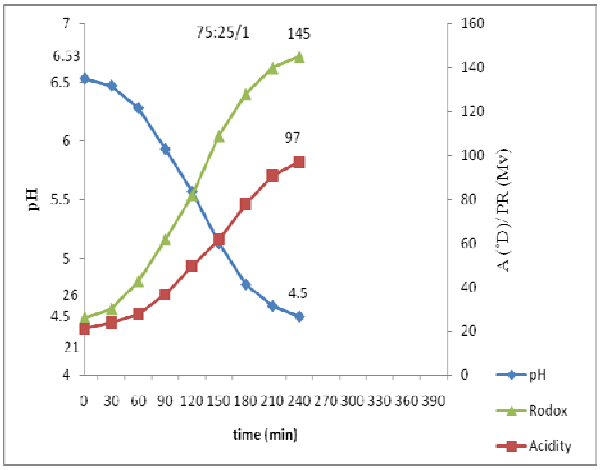
یافته‌ها

تغییرات بیوشیمیایی: همان‌گونه که در شکل‌های ۱. الف تا ۱.د مشاهده می‌شود، در همه تیمارها سه مرحله مشخص نمایان است؛ فازهای کمون یا پیش- لگاریتمی، لگاریتمی و ثابت رشد. این نواحی با توجه به تغییر زیاد شیب نمودارها در شکل‌های ذکر شده مشخص می‌شود. بر اساس شکل ۱.الف تیمار T1 دارای طولانی‌ترین دوره ثابت رشد (۱۵۰ دقیقه) بین تمامی تیمارهای مورد بررسی بوده و نشان دهنده این نکته است که محیط به‌سرعت برای باکتری‌های آغازگر نامساعد شده است. در ۹۰ دقیقه اول سرعت افت pH، افزایش اسیدیته اندک است که از یک سو می‌تواند به‌علت قرارگیری باکتری‌های آغازگر در فاز کمون و موجود نبودن پروتئین‌های ساده، آنزیم‌های پروتئیناز و پپتیداز به‌میزان کافی در محیط شیر لبنی و از سوی دیگر بالا بودن ظرفیت بافری باشد. مطابق شکل ۱.پ در تیمار T3 نقطه اوج کاهش pH، افزایش اسیدیته و پتانسیل احیا در دقایق ۹۰-۶۰ از آغاز گرم‌خانه‌گذاری می‌باشد و نسبت به‌تیمار T1 کاهش یافته است که نشان می‌دهد در اثر کاهش میزان شیر لبنی و کازئین ظرفیت بافری محیط نیز کاهش یافته که موجب افزایش سرعت افت pH می‌شود. کمترین زمان گرم‌خانه‌گذاری در تیمار T3 (۲۲۰ دقیقه) مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). کوتاه‌ترین فاز ثابت رشد نیز مربوط به‌این تیمار می‌باشد (۴۰ دقیقه). طبق شکل ۱.ج در تیمار T6 نقطه اوج کاهش pH، افزایش اسیدیته و پتانسیل احیا در دقایق ۲۷۰-۲۴۰ از آغاز گرم‌خانه‌گذاری می‌باشد و طولانی‌ترین زمان گرم‌خانه‌گذاری (۳۹۰ دقیقه) در این تیمار قابل مشاهده می‌باشد ($p<۰/۰۵$). در ۱۲۰ دقیقه اول سرعت افت pH، افزایش اسیدیته اندک است، هم‌چنین فاز کمون طولانی‌تر و به‌مدت ۱۲۰دقیقه می‌باشد که به‌علت ضعف باکتری‌های ماست در آغازگر ABY-2 (نسبت به‌آغازگر ABY-1) در مصرف مواد مغذی محیط و نیاز بیشتر به‌ترکیبات کمکی رشد که در شیر در دسترس نیستند و

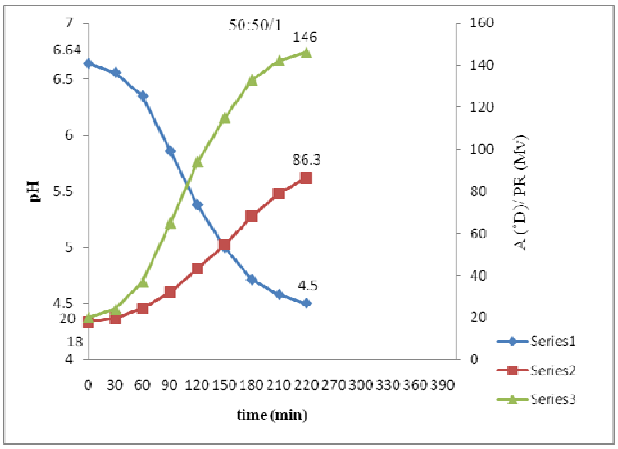
هم‌چنین بالا بودن ظرفیت بافری شیر لبنی می‌باشد. بر اساس شکل ۱.چ فاز لگاریتمی درتیمار T7 در دقیقه ۲۴۰-۹۰ از آغاز زمان گرم‌خانه‌گذاری به‌مدت ۱۵۰دقیقه می‌باشد که طولانی‌ترین فاز لگاریتمی بین تمامی تیمارهای مورد بررسی است و اشاره به‌آن دارد که در اثر فعالیت ضعیف‌تر باکتری‌های ماست در آغازگر ABY-2 سرعت تولید اسید و متابولیت‌ها نسبت به آغازگر ABY-1 کمتر است در نتیجه فاز رشد برای مدت بیشتری ادامه می‌یابد.



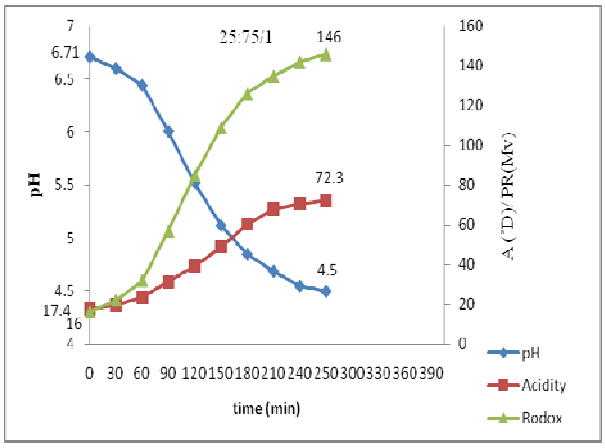
شکل ۱. الف- تغییرات pH، اسیدیته و پتانسیل احیا در تیمار T1 طی تخمیر



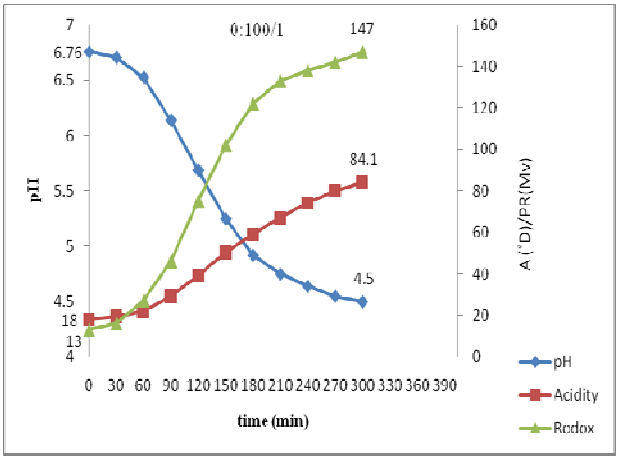
شکل ۱. ب- تغییرات pH، اسیدیته و پتانسیل احیا در تیمار T2 طی تخمیر



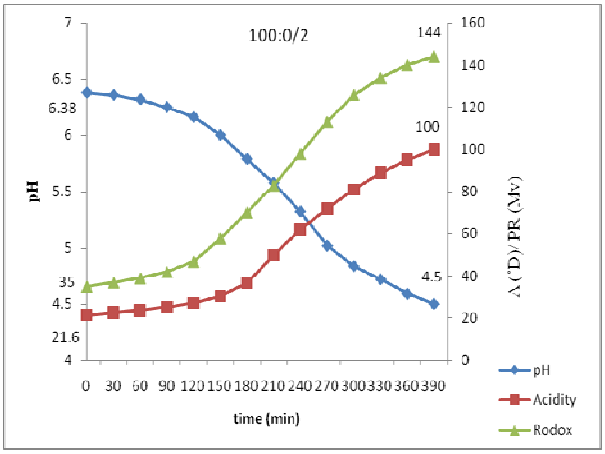
شکل ۱.پ- تغییرات pH، اسیدیته و پتانسیل احیا در تیمارT3 طی تخمیر



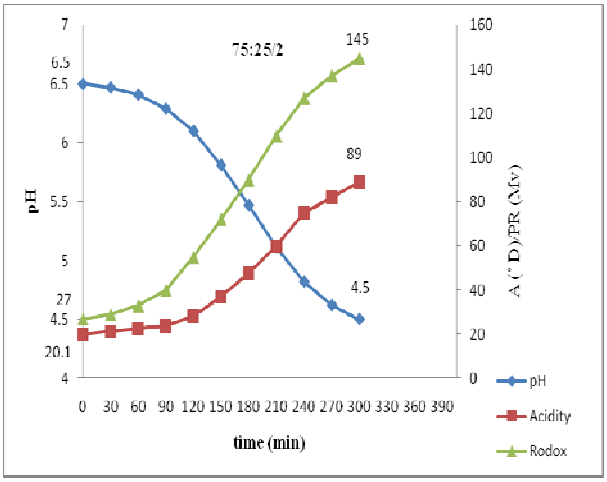
شکل ۱.ت- تغییرات pH، اسیدیته و پتانسیل احیا در تیمار T4 طی تخمیر



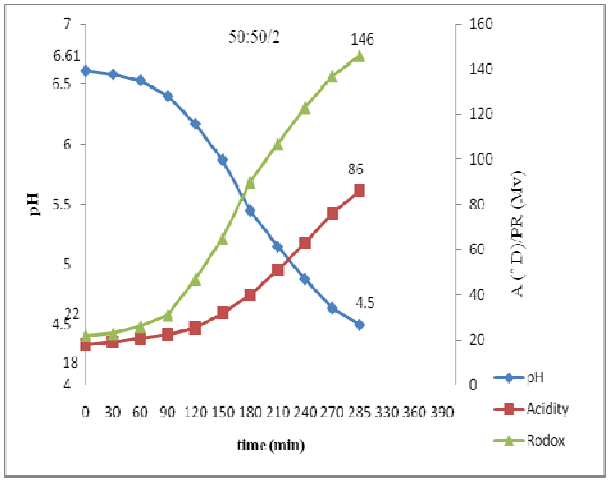
شکل ۱.ث- تغییرات pH، اسیدیته و پتانسیل احیا در تیمار T5 طی تخمیر



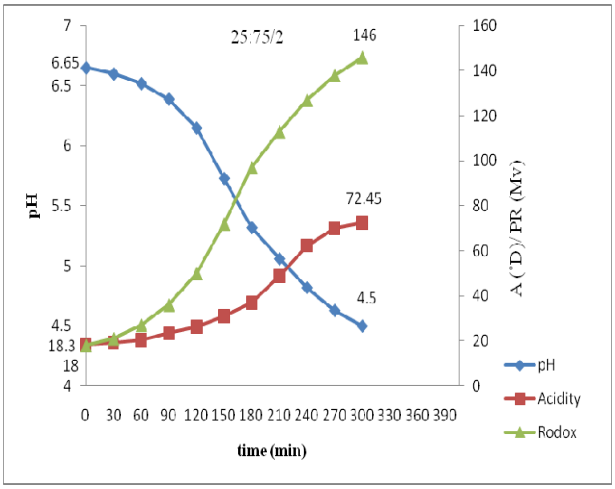
شکل ۱.ج- تغییرات pH، اسیدیته و پتانسیل احیا در تیمار T6 طی تخمیر



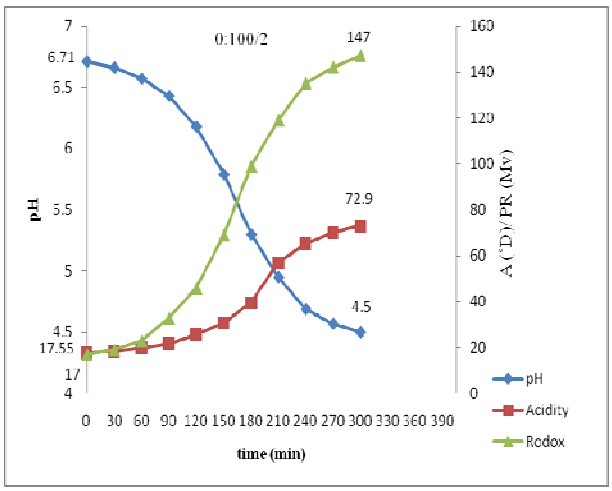
شکل ۱.چ- تغییرات pH، اسیدیته و پتانسیل احیا در تیمار T7 طی تخمیر



شکل ۱.ح- تغییرات pH، اسیدیته و پتانسیل در تیمار T8 طی تخمیر



شکل ۱.خ- تغییرات pH، اسیدیته و پتانسیل احیا در تیمار T9 طی تخمیر



شکل ۱.د- تغییرات pH، اسیدیته و پتانسیل در تیمار T10 طی تخمیر

جدول ۱ نشان دهنده میانگین سرعت متوسط افت pH، سرعت متوسط افزایش اسیدیته قابل تیتر و پتانسیل احیا، مدت زمان گرم‌خانه‌گذاری، اسیدیته قابل تیتر نهایی و مقادیر اسیدهای لاکتیک و استیک (درصد) تیمارها در پایان تخمیر می‌باشد. براساس جدول ۱ و با مقایسه تمامی ویژگی‌های نوع استارتر و نسبت‌های مختلف شیر لبنی و شیر سویا و اثر آن بر روی ویژگی‌های بیوشمیایی، تیمار T3 بیش‌ترین سرعت افت pH را در بین تمامی تیمارها نشان داد ($p<۰/۰۵$). بیش‌ترین سرعت افزایش اسیدیته و پتانسیل احیا نیز به‌ترتیب مربوط به‌تیمارهای T2 و T3 می‌باشد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها دارند ($p<۰/۰۵$). کمترین سرعت افت pH و افزایش پتانسیل احیا مربوط به‌تیمار T6 می‌باشد ($p<۰/۰۵$). تیمار T1 دارای بیش‌ترین میزان اسیدیته نهایی و کمترین میزان اسیدیته نهایی در تیمار T4 مشاهده شد، هرچند که بین تیمارهای T4, T9, T10 اختلاف معنی‌دار وجود نداشت ($p>۰/۰۵$). این نتایج نشان می‌دهد با افزایش نسبت سویا در سوبسترا از میزان اسیدیته نهایی کاسته می‌شود و میزان شیر سویای اضافه شده تأثیر بیشتری نسبت به‌نوع استارتر مورد استفاده در ویژگی‌های بیوشیمیایی طی تخمیر داشته است. Farnwort و همکاران نیز در سال ۲۰۰۷ با پژوهش و بررسی رشد بیفیدوباکتریوم‌ها و پروبیوتیک همراه با آغازگر ماست در ماست سویا به‌این نتیجه رسیدند که به‌دلیل پایین‌تر بودن ظرفیت بافری شیر سویا نسبت به‌شیر گاو، pH سریعتر افت می‌کند (۱۱).

جدول۱. سرعت متوسط افت pH، افزایش اسیدیته و افزایش پتانسیل احیا، زمان گرم‌خانه‌گذاری، اسیدیته نهایی و درصدهای اسید لاکتیک و اسید استیک در تیمارهای مختلف در پایان تخمیر*

تیمارها		شاخص ها						
نسبت شیر گاو به‌شیر سویا	سرعت افت pH (دقیقه)	سرعت افزایش اسید (درجه دورنیک/ دقیقه)	سرعت افزایش پتانسیل احیا (میلی ولت/ دقیقه)	زمان گرم‌خانه‌گذاری (دقیقه)	اسیدیته نهایی (درجه دورنیک)	زمان اوج تخمیر (دقیقه)	درصد اسید لاکتیک	درصد اسید استیک
T1	^{e}۰/۰۰۵	^{c}۰/۲۳	^{e}۰/۳۲	^{b}۳۶۰	^{a}۱۰۶	۱۲۰-۱۵۰	^{a}۰/۹	^{e}۰/۱۴
T2	^{b}۰/۰۰۸	^{a}۰/۳۲	^{ab}۰/۴۹	^{f}۲۴۰	^{b}۹۷	۱۲۰-۱۵۰	^{b}۰/۸۱	^{g}۰/۰۷
T3	^{a}۰/۰۰۹	^{b}۰/۲۷	^{a}۰/۵۲	^{g}۲۲۰	^{c}۸۶/۳	۶۰-۹۰	^{c}۰/۶۶	^{c}۰/۲۲
T4	^{b}۰/۰۰۸	^{cd}۰/۲۱	^{a}۰/۵۱	^{e}۲۵۰	^{e}۷۲/۳	۹۰-۱۲۰	^{d}۰/۵۶	^{b}۰/۲۶
T5	^{d}۰/۰۰۶	^{d}۰/۱۹	^{c}۰/۴۲	^{c}۳۰۰	^{cd}۸۴/۱	۹۰-۱۲۰	^{e}۰/۵۲	^{a}۰/۳۰
T6	^{f}۰/۰۰۴	^{cd}۰/۲۰	^{f}۰/۲۸	^{a}۳۹۰	^{ab}۱۰۰	۲۴۰-۲۷۰	^{ab}۰/۸۷	^{e}۰/۱۲
T7	^{d}۰/۰۰۶	^{c}۰/۲۳	^{cd}۰/۴۱	^{c}۳۰۰	^{c}۸۹	۱۸۰-۲۱۰	^{c}۰/۷۱	^{cd}۰/۱۷
T8	^{c}۰/۰۰۷	^{c}۰/۲۳	^{c}۰/۴۲	^{d}۲۸۵	^{c}۸۶	۱۵۰-۱۸۰	^{c}۰/۶۹	^{e}۰/۱۵
T9	^{c}۰/۰۰۷	^{cd}۰/۲۰	^{c}۰/۴۴	^{c}۳۰۰	^{e}۷۲/۵	۱۲۰-۱۵۰	^{e}۰/۵۱	^{cd}۰/۱۹
T10	^{d}۰/۰۰۶	^{d}۰/۱۸	^{ab}۰/۴۶	^{c}۳۰۰	^{e}۷۲/۹	۱۵۰-۱۸۰	^{d}۰/۵۵	^{d}۰/۱۶

*میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند، بطور معنی‌دار با یکدیگر تفاوت دارند ($p<۰/۰۵$).

بین تیمارهای مورد بررسی در میزان تولید اسید لاکتیک، تیمار T1 بالاترین میزان اسید لاکتیک را دارا است ($p<۰/۰۵$)، که در اثر رشد زیاد باکتری *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* به علت مهیا بودن شرایط زیستی (وجود لاکتوز به‌میزان زیاد) برای آن‌ها می‌باشد (۱۲). کمترین میزان اسید لاکتیک هم مربوط به‌تیمارهای T5, T9 می‌باشد، که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها دارند ($p<۰/۰۵$). علت آن افزایش میزان شیر سویا و در نتیجه فقر محیط از لحاظ کربوهیدرات‌های قابل تخمیر برای *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* به‌عنوان عامل اصلی تولید اسید می‌باشد. بین تمامی تیمارها بیش‌ترین میزان اسید استیک مربوط به‌تیمار T5 می‌باشد ($p<۰/۰۵$)، در مقابل کمترین میزان اسید استیک در تیمار T2 مشاهده می‌شود ($p<۰/۰۵$). از آنجائی‌که اسید استیک از محصولات اصلی تخمیر توسط *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*Bb-12 می‌باشد، نشان می‌دهد با افزایش نسبت شیر سویا، محیط برای رشد بیفیدوباکتریوم‌ها مساعدتر شده و در نتیجه میزان اسید استیک افزایش می‌یابد. در تیمار T2 همان‌طور که قبلاً شرح داده شد شرایط برای رشد بیفیدوباکتریوم‌ها مساعد نبوده و در نتیجه در رقابت با *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* این ریززنده‌ها قادر به‌رقابت نیستند و در نتیجه متابولیت‌های آن‌ها نیز کاهش چشم‌گیر می‌یابد (۱۲).

شاخص‌های میکروبیولوژیک: بر اساس جدول۲ بالاترین قابلیت زیستی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA-5 در تیمار T9مشاهده شد ($p<۰/۰۵$) و کمترین قابلیت زیستی هم مربوط به‌تیمارهای T6 است ($p<۰/۰۵$)، که نشان می‌دهد به دلیل ضعیف‌تر بودن فعالیت پروتئولیتیکی باکتری‌های ماست آغازگرهای ABY-2 (بنا بر مستندات شرکت کریستین هنسن) برای رشد به‌مواد کمکی رشد بیشتری نیاز دارند اما با افزایش نسبت شیرسویا و تامین مواد غذایی کمکی، رشد و بقا پروبیوتیک‌ها افزایش می‌یابد. بیش‌ترین قابلیت زیستی برای بیفیدوباکتریوم‌ها مربوط به‌تیمار T9 و پس از آن T3 می‌باشد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشتند ($p<۰/۰۵$)، علت آن است که *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*Bb-12 برای بقا و رشد به‌هر دو نوع مواد کمکی رشد شیر سویا و شیر لبنی (ویتامین‌های گروهB) در یک نسبت بهینه نیازمند است. کمترین قابلیت زیستی برای *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* Bb-12 مربوط به‌تیمار T6 بود، که حاکی از آن است که بیفیدوباکتریوم‌ها در آغازگرهای ABY-2 رشد کمتری دارند و نیاز به‌مواد مغذی رشد آن‌ها افزایش می‌یابد، زیرا از یک سو بدلیل رشد کمتر باکتری‌های ماست در آغازگرهای ABY 2 نسبت به ABY-1، از خاصیت پروئتولیتیک باکتری‌های ماست کاسته شده و محیط دچار فقر مواد کمکی رشد و مواد نیتروژنی آزاد می‌شود (که خود باعث کاهش رشد بیفیدوباکتریوم‌ها می‌شود) ازسوی دیگر همین دلایل سبب طولانی‌تر شدن فاز کمون و ثابت رشد می‌شود و متعاقب آن طولانی تر شدن فاز ثابت رشد خود می‌تواند منجر به مرگ بیشتر پروبیوتیک‌ها شود (۲). ارزیابی حسی تیمارها در پایان تخمیر در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول۲. قابلیت زیستی ریزنده‌های پروبیوتیک شاخص نسبت رشد در تیمارهای مختلف در پایان تخمیر*

تیمارها		جمعیت اولیه (log cfu/mL)			جمعیت نهایی (log cfu/mL)		GPI		
نسبت شیر گاو به‌شیر سویا	pH	A**	B	A+B	A	B	A+B	A	B	A+B
T1	۴/۵	۷/۴۷	۷/۸۴	۸/۰۰	^{bB}۸/۱۷	^{bA}۸/۳۱	۸/۶۱^{a}	۱/۰۹	۱/۰۷	۱/۰۷
T2	۴/۵	۷/۴۷	۷/۸۴	۸/۰۰	^{deB}۷/۲۹	^{cdA}۸/۱۴	۸/۱۹^{d}	۰/۹۷	۱/۰۴	۱/۰۲
T3	۴/۵	۷/۴۷	۷/۸۴	۸/۰۰	^{cB}۷/۵۶	^{abA}۸/۳۶	۸/۳۷^{c}	۱/۰۱	۱/۰۶	۱/۰۴
T4	۴/۵	۷/۴۷	۷/۸۴	۸/۰۰	^{dB}۷/۳۹	^{cA}۸/۲۰	۸/۲۶^{cd}	۰/۹۸	۱/۰۲	۱/۰۳
T5	۴/۵	۷/۴۷	۷/۸۴	۸/۰۰	^{cB}۷/۵۶	^{cdA}۸/۱۴	۸/۲۴^{d}	۱/۰۱	۱/۰۴	۱/۰۳
T6	۴/۵	۷/۴۷	۷/۸۴	۸/۰۰	^{fB}۷/۰۰	^{fA}۷/۵۴	۷/۶۵^{e}	۰/۹۳	۰/۹۶	۰/۹۵
T7	۴/۵	۷/۴۷	۷/۸۴	۸/۰۰	^{abB}۸/۲۱	^{bA}۸/۳۱	۸/۵۹^{a}	۱/۰۹	۱/۰۶	۱/۰۷
T8	۴/۵	۷/۴۷	۷/۸۴	۸/۰۰	^{cA}۸/۱۷	^{cA}۸/۱۷	۸/۲۶^{cd}	۱/۰۰	۱/۰۴	۱/۰۳
T9	۴/۵	۷/۴۷	۷/۸۴	۸/۰۰	^{aA}۸/۳۹	^{aA}۸/۳۹	۸/۶۲^{a}	۱/۱۱	۱/۰۷	۱/۰۷
T10	۴/۵	۷/۴۷	۷/۸۴	۸/۰۰	^{eA}۸/۰۰	^{eA}۸/۰۰	۸/۵۰^{a}	۱/۱۱	۱/۰۲	۱/۰۶

*میانگین‌هایی که با حروف کوچک و بزرگ انگلیسی نشان داده شده‌اند بطور معنادار ($p<۰/۰۵$) با یکدیگر متفاوتند.

**(A: لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس LA-5)، (B: بیفیدوباکتریوم لاکتیس Bb-12)، (GPI: ضریب رشد)

جدول۳. ارزیابی حسی تیمارها در پایان تخمیر*

تیمار ها	شاخص ها			
نسبت شیر گاو به‌شیر سویا	ظاهر	بافت	طعم و مزه	امتیاز نهایی
T1	^{a}۸/۸	^{a}۱۳/۲	^{a}۲۸/۵	^{a}۵۶/۸
T2	^{b}۶/۸	^{b}۱۰/۸	^{c}۱۴/۴	^{d}۳۲
T3	^{ab}۸	^{b}۱۰/۸	^{b}۱۸	^{c}۳۶/۸
T4	^{d}۴/۴	^{de}۶/۶	^{f}۸/۴	^{h}۱۹/۴
T5	^{bc}۴	^{d}۸/۴	^{e}۱۰/۸	^{fg}۲۵/۲
T6	^{ab}۷/۲	^{ab}۱۲	^{a}۲۸/۸	^{b}۴۸/۴
T7	^{b}۶/۴	^{c}۹/۶	^{bc}۱۵/۶	^{d}۳۱/۶
T8	^{b}۶/۴	^{bc}۱۰/۲	^{e}۱۵/۶	^{f}۲۷/۴
T9	^{c}۵/۲	^{d}۷/۸	^{ef}۱۰/۸	^{h}۲۱/۴
T10	^{b}۷/۱	^{b}۱۰/۸	^{cd}۸/۴	^{de}۳۰

*میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند، به‌طور معنی‌دار با یکدیگر تفاوت دارند. ($p<۰/۰۵$)

بحث

Chou و همکاران نیز در سال ۲۰۰۰ دریافتند که اضافه کردن مکمل هایی مانند ایزومالتوالیگوساکاریدها، گلوگز و گالاکتوز، و الیگوساکاریدهای سویا سبب افزایش تعداد بیفیدوباکتریوم‌ها می‌شود (۱۳). در پژوهشی Wang و همکاران در سال ۲۰۰۳ گزارش کردند که شیر سویا قادر است همزمان شرایط را برای رشد بیفیدوباکتریوم‌ها و هم‌چنین *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* فراهم کند (۱۴). هم‌چنین Shah در سال ۲۰۰۵ گزارش کرد که شمار پروبیوتیک‌ها در مقایسه با زمانی که همراه با آغازگرهای ماست کشت شده باشند به‌اندازه دو سیکل لگاریتمی بالاتر است (۱۵). از لحاظ مجموع پروبیوتیک‌ها، بیش‌ترین قابلیت زیستی مربوط به‌تیمار T9 می‌باشد ($p<۰/۰۵$). این یافته‌ها نشان می‌دهد که وجود مواد پری‌بیوتیکی در شیر سویا موجب تقویت رشد پروبیوتیک‌ها می‌شود. کمترین قابلیت زیستی مجموع پروبیوتیک‌ها در تیمار T6 مشاهده می‌شود ($p<۰/۰۵$)، که نشان از کمبود مواد کمکی رشد در دسترس برای باکتری‌های ABY-2 و هم‌چنین نیاز بالاتر به‌مواد مغذی شیر لبنی و توانایی کمتر آن‌ها در استفاده از این مواد می‌باشد، از این‌رو با افزایش مواد کمکی رشد شیر سویا میزان بقا افزایش می‌یابد. بالا بودن بقا

و شمار پروبیوتیک‌ها در تیمار T1 نشان از سازگاری بهتر باکتری ABY-1 با محیط شیر لبنی می‌باشد. به طور کلی به دلیل فعالیت بالای باکتری‌ها و هم‌چنین مغذی بودن محیط در تمامی تیمارها، شمار باکتری‌ها در محدوده نرمال بوده و در تیمارهایی که بطور کامل از شیر لبنی تولید شده اند میزان بقای *ل. اسیدوفیلوس* LA-5 بیشتر است که نشان می‌دهد این باکتری نسبت به‌شرایط اسیدی محیط حتی در اسیدیته‌های بالا هم مقاومت بیشتری نسبت به *ب. لاکتیس* Bb-12 دارد. با افزایش میزان شیر سویا در سوبسترا ضریب رشد و بقا بیفیدوباکتریوم‌ها افزایش می‌یابد که از یک سو نشان می‌دهد نیاز و توانایی بیفیدوباکتریوم به‌مواد کمکی رشد از جمله قندهای α-گالاکتوزیدازی (رافینوز، استاکیوز) و استفاده از آن در سوبسترا بیشتر می‌باشد، از سوی دیگر یکی از محصولات جانبی تخمیر بیفیدوباکتریوم‌ها اسید استیک می‌باشد که میزان آن در محیط افزایش می‌یابد که اثر معکوسی بر قابلیت زیستی لاکتوباسیلوس‌ها دارد. این یافته‌ها با نتایج تحقیق Shah در سال ۱۹۹۷ مطابقت داشتند (۱۶). همچنین Dave and Shah در سال ۱۹۹۷ دریافتند قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها به‌در دسترس بودن مواد مغذی، فاکتورهای رشد، بازدارنده‌ها، غلظت مواد محلول (فشار اسمزی)، حجم تلقیح، دمای گرم‌خانه‌گذاری، زمان تخمیر و دمای نگهداری نیز بستگی دارد (۱۷). بررسی اثر نسبت‌ها در قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها نشان می‌دهد، بین تیمارهای T1,T2 در تعداد *ل. اسیدوفیلوس* LA-5 و *ب. لاکتیس* Bb-12 و مجموع پروبیوتیک‌ها اختلاف معنی‌دار وجود داشت ($p<۰/۰۵$)، آز آن جا که در اثر مغذی بودن محیط در تیمار T2 به‌دلیل حضور مواد کمکی رشد شیر سویا و هم‌چنین وجود کربوهیدرات قابل تخمیر (به‌ویژه لاکتوز) به‌میزان کافی در شیر لبنی باکتری‌های ماست با سرعت بالایی رشد می‌کنند. از این رو به‌دلیل کوتاه‌تر بودن زمان تخمیر T2 زمان کافی برای رشد پروبیوتیک‌ها وجود ندارد، به طوری‌که در شرایطی که باکتری‌های پروبیوتیک به‌تازگی وارد فاز لگاریتمی شده‌اند، باکتری‌های ماست به‌سرعت تولید اسید کرده و pH محیط را کاهش می‌دهند. با توجه به‌ضریب رشد GPI میزان بقای *ل. اسیدوفیلوس* LA-5 (به علت مقاومت بیشتر به‌اسیدهای آلی و شرایط نامساعد محیطی) بیشتر بوده که با مطالعه Mortazavian و همکاران در سال ۲۰۰۶ هماهنگ است (۱۸).

ارزیابی حسی: تیمار T1 دارای بیش‌ترین میزان پذیرش کلی می‌باشد و بعد از آن تیمار T6 قرار دارد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها دارند ($p<۰/۰۵$). تیمار T4 کمترین پذیرش را در بین تمامی تیمارها دارا است ($p<۰/۰۵$). بین تیمارهای T2,T7 در ظاهر، طعم و پذیرش کلی اختلاف معنی‌دار وجود ندارد ($p>۰/۰۵$) اما از نظر بافت اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($p<۰/۰۵$) و آغازگر ABY-1 بافت بهتری را ایجاد می‌کند. بین تیمار T3,T8 در ظاهر، مزه و بافت اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، اما میزان پذیرش کلی در تیمارT3 بالاتر است. بین تیمارهای T4,T9 در بافت اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد، اما T9 به دلیل کاهش میزان آب اندازی، بافت بهتری ایجاد کرد و نشان می‌دهد که ABY-2 در نسبت‌های بالای شیرسویا قادر است در اثر افزوده شدن ماده خشک در سوبسترا بافت و ظاهر بهتری با آب اندازی کمتر را ایجاد کند. در طعم محصول اختلاف معنی‌داری وجود داشت که نشان دهنده این نکته است که در نسبت‌های بالای شیرسویا باکتری‌های آغازگرABY-1 به‌علت توانایی بالاتر (به علت فعال‌تر بودن باکتری‌های ماست این آغازگر) اسید بیشتری تولید کرده که باعث کاهش طعم گسی (در اثر اختلاط شیر سویا و شیر لبنی بوجود می‌آید) می‌شود (۲). بین تیمار T5,T10 در ظاهر اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد، ولی به‌دلیل کاهش آب‌اندازی در تیمارهای با آغازگر ABY-2 در تیمار T10 بافت بهتری ایجاد شد ($p<۰/۰۵$). استفاده از شیر سویا و شیر لبنی به طور معنی‌دار باعث افزایش پذیرش کلی محصول شدند ($p<۰/۰۵$). هم استارتر و نسبت‌های شیر سویا به‌شیر لبنی روی ویژگی‌های بیوشیمیایی طی دوره تخمیر و ویژگی‌های حسی و قابلیت زیستی در پایان تخمیر و دوره نگهداری کاملاً موثر بوده و اثر نسبت‌های شیر سویا به‌شیر لبنی بر روی این ویژگی‌ها بیشتر است (۲۰، ۱۹).

با توجه به پژوهش انجام شده هر دو متغیر نوع کشت پروبیوتیک و نسبت شیر سویا به شیر گاو بر روی ویژگی‌های بیوشیمیایی اثر معنی‌دار داشته ولی با توجه اندازه‌گیری شاخص‌ها میزان تأثیرگذاری نسبت‌ها از نوع استارتر بیشتر است.

سپاسگزاری

این مقاله از پایان‌نامه دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی استخراج شده‌است. بدینوسیله از کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی به دلیل حمایت‌های مالی تشکر می‌شود.

References

1. Wang HA, Murphy P. Mass balance study of isoflavones during soybean processing. J Agri Food Chem 1996; 44: 2377-83.
2. Mortazavian AM, Sohrabvandi S. Probiotics and food probiotic products; based on dairy Probiotic products; Eta Publication: Tehran, Iran 2006; p.54-155. [In Persian].
3. Champagne CP, Gurdner H. Effect of storage in fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. Food Res Int 2008; 41: 539-543.
4. Coward LB. Genistein, daidzein, and their diets. J Agri Food Chem 1993; 41: 1961-1967.
5. Donkor ON, Henrikson A, Shah NP. α-galactosidase and proteolitic activities of selected probiotic and dairy cultured in fermented soymilk. Food Chem 2007; 104: 10-20.
6. Lee SY, Morr CV, Seo A. Comparison of milk-based and soymilk-based yogurt. J Food Sci 1990; 55: 532-36.
7. Shah NP. Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. J of Dairy Sci 2000; 83: 849-907.
8. Mortazavian AM, Ehsani MR, Mousavi SM, Sohrabvandi S, Reinheimer J. Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic microorganism in yogurt. Int J Dairy Techol 2007; 17: 123-127.
9. Mortazavian AM, Khosrokhavar R, Rastgar H. Effect of dry matter standardization order on biochemical and microbiological characteristics of Doogh (Iranian fermented milk drink). Ital J Food Sci 2010; 22: 99-103.
10. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Milk and milk products; Types of flavoured yoghurt. ISIRI no 4046. First revision, Karaj: ISIRI; 1997. [In Persian].
11. Farnworth E, mainville I, Desjardinsa P, Champagne B. Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in soy yoghurt formulation. Int J Food Microbiol 2007; 53: 174-181.
12. Liu JR, Lin CW. Production of kefir from soymilk with or without added glucose, lactose, or sucrose. J Food Sci 2000; 65: 716-719.
13. Chou CC, Hou JW. Growth of bifidobacteria in soymilk and their survival in the fermented soymilk drink during storage. Food Chem 2000; 56: 113-121.
14. Wang YC, Yu RC, Chou CC. Suger and acid contents in soymilk fermented with lactic acid bacteria alone or simultaneously with bifidobacteria. Food Microbiol 2003; 20: 333-338.
15. Shah NP. B-glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium lactis and Lactobacillus casei in soymilk. Int J Food Sci 2005; 44: 66-75.
16. Shah NP. Bifidobacteria: characteristics and potential for application in fermented milk products. Milchwissenschaft 1997; 52: 16-21.
17. Dave RI, Shah NP. Viability of yogurt and probiotic bacteria in yogurts made from commercial starter cultures. Int Dairy J 1997; 7: 31-4.
18. Mortazavian AM, Sohrabvandi S, Mousavi SM, Reinheimer JA. Combined effects of temperature-related variables on the variables on the viability of probiotics in yogurt. Aust J Dairy Technol 2006; 61: 248-52.
19. Olubamiva AO, Kolapo AL. Production of yoghurt from cow and soy composite milk using starter cultuer from diffrent sources. J applied Biosci 2008; 6: 158-63.
20. Ostlie HM, Helland MH, Narvhus JA. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk. Int J Food Microbiol 2003; 87: 17– 27.

Study of microbiological, biochemical and organoleptic properties in the probiotic soy yoghurt

Mohammadi R[1], Rouzitalab A[2], Shahabbaspour Z[3], Mortazavian AM[4]*

1- Students' Research Committee, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty ofNutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences,Tehran,Iran.

2- MSc in Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

3- Instructor of Food Science and Technology, Rudaki Institute, Tonekabon, Iran.

*4- *Corresponding author: Associate prof, Dept. of Food Science and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Email: mortazvn@sbmu.ac.ir*

Abstract

Background and Objectives: Worldwide, the demand for consumption of functional foods is growing rapidly due to the increased awareness of the consumers from the impact of food on healthProduction of soy based probiotic yoghurt will improve the functional potential. The aim of this study was to assess the effect of cow's milk to soymilk proportion and type of probiotic starins on qualitative aspects of soy based probiotic yoghurt.

Materials and Methods: proportions of cow's milk to soymilk (100:0, 75:25, 50:50, 75:25, 0:100) were prepared using reconstituted skim milk powder, and two type of mix starter culture (ABY-1 and ABY-2 that contains *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *bifidobacterium Lactis Bb-12* and traditional yoghurt starter culture) were inoculated. pH, titratable acidity and redox potential parameters, amounts of lactic acid and acetic acid and viability of probiotics and sensory attributes of samples were analysed.
Results: probiotic bacteria in starter culture ABY-1 in proportion of (50:50) had the highest viability ($p<0.05$). The greatest sensory properties were related to the treatments which had the highest proportion of cow's milk and then it was treatment of cultured with starter culture ABY-1 and proportion of 50% of cow's milk to 50% of soymilk (50:50-ABY-1) which was set in third grade in total acceptance manner ($p<0.05$).

Conclusion: The equal proportion of cow's milk to soymilk represented the highest biochemical changes, and with adding amount of soymilk, viability of probiotics increased probably due to the presence of prebiotics ingredients of soy and proteolitic activity decline of yoghurt starter cultures.

Keywords: *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, Probiotic