مقاله علمی پژوهشی/ نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۳۲ شماره ۳/ سال ۱۴۰۱/ صفحات ۷۷ تا ۹۱
DOI: 10.22034/FR.2022.43070.1778

بررسی اثر سویه‌های پروبیوتیک بومی *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* بر ویژگی‌های شیمیایی، میکروبی و حسی دوغ طی زمان نگهداری

محمد نوشاد*[۱]، بهروز علیزاده بهبهانی[۲] و محمد حجتی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۹/۹/۸ تاریخ پذیرش: ۴۰۰/۵/۲۰

[۱] دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ایران
[۲] استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ایران
[۳] استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ایران
* مسئول مکاتبات: Email: Noshad@asnrukh.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: باکتری‌های پروبیوتیک، میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در صورت مصرف در مقادیر کافی، می‌توانند اثرات مثبتی بر بدن میزبان ایجاد نمایند. محصولات غذایی عملگرا مانند ماست و دوغ می‌توانند حامل‌های مناسبی برای انتقال این باکتری‌ها به سلول‌های اپی‌تلیال روده باشد. **روش کار**: در این مطالعه، سویه‌های پروبیوتیک *لاکتوبا سیلوس دلبروکی* و *پدیوکوکوس پنتوزا سئوس* جهت تولید دوغ سنتی ایرانی مورد ا ستفاده قرار گرفتند. همچنین اثرات این دو باکتری بر ویژگی‌های شیمیایی، میکروبی و حسی دوغ طی ۲۱ روز نگهداری در دماهای ٤ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. **نتایج**: نمونه های دوغ تلقیح شده با تعداد $۱۰^{۸}$ CFU/ml از باکتری های *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* نسبت به نمونه دوغ شاهد، کاهش بیشتری در pH در هر دو دمای ٤ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد ایجاد نمودند. طی ۲۱ روز نگهداری نمونه‌ها در ٤ درجه سانتی‌گراد، رشد کلی‌فرم و کپک و مخمر در نمونه‌های دوغ پروبیوتیک مشاهده نشد. هچنین طی نگهداری نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد سویه‌های *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* کاهش معنی‌داری در رشد کلی‌فرم، کپک و مخمر در مقایسه با نمونه شاهد ایجاد نمودند. نتایج ارزیابی حسی نشان داد که نمونه‌های دوغ تلقیح شده با سویه‌های *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* امتیاز بیشتری در پذیرش دهانی، طعم، رایحه و پذیرش کلی نسبت به نمونه دوغ شاهد داشتند. **نتیجه‌گیری نهایی**: به دلیل تاثیر مثبت سویه‌های *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* بر ویژگی‌های شیمیایی، میکروبی وحسی دوغ‌های تولید شده، می‌توان از آن‌ها به‌عنوان کشت همراه در تولید فرآورده‌های لبنی تخمیری استفاده کرد.

واژگان کلیدی: نوشیدنی سنتی ایرانی، نوشیدنی لبنی تخمیرشده، باکتریهای پروبیوتیک، نگهداری سرد

مقدمه

توجه به مواد غذایی مفید و سلامتی‌زا برای تامین نیازهای غذایی بشر از دیرباز مورد توجه بوده است که در این بین غذاهای تخمیری جایگاه ویژه‌ای دارند. جهت انجام تخمیر، وجود باکتری‌های اسید لاکتیک ضروری می‌باشد. از آنجا که باکتری‌های اسید لاکتیک جزئی از فلور طبیعی شیر خام می‌باشند، شیر و فراورده‌های لبنی وابسته از دیرباز به عنوان بخشی از رژیم غذایی مطرح بوده اند (بلتران- بارینتوس ۲۰۱۶). مطابق تعریفی که فدراسیون بین المللی محصولات لبنی (IDF)[۱]و سازمان جهانی استاندارد (ISO)[۲]در سال ۲۰۰۸ ارائه نموده است، باکتری‌های اسید لاکتیک، باکتری‌هایی گرم مثبت، کاتالاز منفی، بدون حرکت، فاقد توانایی تولید اسپور، احیا نیترات منفی و سیتوکروم اکسیداز منفی هستند که فاقد توانایی ذوب ژلاتین و تولید اندول هستند. باکتری‌های اسید لاکتیک در فرایند تخمیر نقش داشته و محصول نهایی عمده‌ی حاصل از مصرف کربوهیدرات توسط آن‌ها، اسید لاکتیک است (جوکوویچ و همکاران ۲۰۰۸). اولین بار واژه پروبیوتیک در اوایل قرن ۲۰ مطرح شد و اولین مطالعات بالینی نیز بر روی اثربخشی باکتری‌های پروبیوتیک در بهبود یبوست انجام گرفته است. باکتری های پروبیوتیک به باکتری های اطلاق می شوند که زمانیکه در تعداد مشخصی و به صورت مداوم مصرف شوند، می‌توانند تاثیرات مثبتی بر بدن فرد مصرف کننده ایجاد نمایند. از اثرات مثبت این باکتری‌ها می‌توان به این موارد اشاره داشت: کاهش مقاومت لاکتوز، جلوگیری از سرطان کولون، روده باریک، کبد و پستان، کاهش کلسترول خون، بهبود و تقویت سیستم ایمنی و جلوگیری از عفونت، درمان و پیشگیری از اسهال حاد، کاهش التهابات روده‌ای، کاهش آلرژی غذایی یا اگزما در کودکان، بهبود جذب مواد معدنی و ویتامین‌ها و جلوگیری از رشد و تکثیر باکتری‌های مضر (کالرو و همکاران ۲۰۲۰؛ نوشاد و همکاران ۱۴۰۰). فراورده‌های پروبیوتیک به دو گروه محصولات تخمیری و غیرتخمیری تقسیم می‌شوند. دوغ محصولی تخمیری بوده که در ایران و برخی از کشورهای همسایه از جمله ترکیه طرفداران فراوانی دارد و می‌توان آن را جزو ماست‌های نوشیدنی با ویسکوزیته پایین محسوب نمود. دوغ حاصل تخمیر لاکتیکی شیر بوده و معمولاً از مخلوط کردن ماست، آب، ادویه‌جاتی نظیر آویشن، خیار و عصاره سیر و عصاره‌هایی از گیاهان محلی تولید می شود. تولید دوغ پروبیوتیک به علت اسیدیته بالا و pH پایین آن، با محدودیت‌هایی روبرو است که زنده‌مانی سویه مورد استفاده را تحت الشعاع قرار می‌دهد؛ به‌طوریکه در فراورده های پروبیوتیکی مانند شیر شیرین تعداد باکتری‌های پروبیوتیک شمارش شده، ده برابر بیشتر از فراورده‌های تخمیری است (حکمت و مک‌ماهون ۱۹۹۲؛ کرمی ۲۰۱۷). فراورده های مشابهی نظیر آیران[۳]در کشور ترکیه، لبن[۴]در کشورهای عربی، تن[۵] در کشور ارمنستان و لاسی[۶]در جنوب آسیا تولید و مصرف می‌شود و ممکن است در نسبت رقیق‌سازی، فلور لاکتیکی، ویژگی‌های بافتی، محتوای پروتئین و چربی و خواص ارگانولپتیکی با دوغ ایرانی متفاوت باشند (کیانی و همکاران ۲۰۱۰؛ کاباک و دابسون ۲۰۱۱). با توجه به میزان بالای تولید و مصرف سالیانه دوغ در ایران، افزایش کیفیت آن و ایجاد خواص سلامتی‌زا با افزودن سویه های پروبیوتیک بومی می‌تواند باعث افزایش ارزش تغذیه‌ای و بازار پسندی این محصول گردد. هدف از این مطالعه، بررسی زنده‌مانی سویه پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* در دوغ و همچنین تاثیر آن بر ویژگی های شیمیایی،

[۱] International Dairy Federation
[۲] International Standard Organization
[۳] Ayran
[۴] Laban
[۵] Than
[۶] Lassi

میکروبی و حسی محصول در طول دوره نگهداری است.

مواد و روش‌ها

فعال‌سازی باکتری و تهیه دوغ

دو سویه *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* که در پژوهشی دیگر از دوغ محلی شهرستان بهبهان جداسازی و شناسایی شده و از نظر پتانسیل پروبیوتیکی و تکنولوژیکی مورد تایید قرار گرفته بودند، برای تهیه دوغ مورد استفاده قرار گرفتند. شیر کامل حاوی ۸۷ درصد آب، ۳/۵ درصد پروتئین، ۳/۷ درصد چربی و pH= ٦/٥ تحت فرایند ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفته و سپس تا دمای تلقیح خنک شد. پس از رسیدن به دمای ٤٢ درجه سانتی‌گراد، استارتر سنتی ماست YF-333 (شرکت کریستین هانسن، دانمارک) به میزان یک درصد و همینطور سویه‌های *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* به تعداد 10^8 CFU/ml به‌عنوان کشت همراه اضافه و تا رسیدن به pH=٤/٢ تا ٤/٦ گرمخانه‌گذاری در همین دما ادامه پیدا کرد. پس از یک روز، ماست تولید شده با همراه آب (۵۰ درصد حجمی-حجمی) و همینطور ۱ درصد نمک طعام مخلوط و فرایند پاستوریزاسیون (٦٠درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه) بر روی آن‌ها صورت گرفت. نمونه‌ها پس از فرایند حرارتی در دمای ٤ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد طی ٦٠ روز نگهداری شده و آزمون‌های شیمیایی، میکروبی و حسی برروی آن‌ها انجام پذیرفت. همچنین نمونه‌ای فاقد باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *پدیوکوکوس پنتوزا سئوس* تهیه و به‌عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد (احمدی و همکاران، ۱۳۹۱).

اندازه‌گیری pH

pH در روزهای ۱، ۷، ١٤ و ۲۱ با استفاده از pH متر Lab 827 (متروم، سوییس) اندازه‌گیری شد (رادو و همکاران ۲۰۱۰).

شمارش میکروبی

جهت شمارش میکروبی، ۲۵ میلی‌لیتر نمونه با ۲۲۵ میلی‌لیتر محلول سیترات سدیم ۰/۲ درصد استریل مخلوط شد و پس از همگن‌سازی، به عنوان رقت 10^{-1} در نظر گرفته شد. سری‌های رقت تا 10^{-7} با افزودن یک میلی‌لیتر از هر لوله آزمایش به لوله حاوی ۹ میلی‌لیتر محلول استریل رینگر تهیه شد. جهت شمارش کلی میکروبی از محیط کشت پلیت کانت آگار[1] به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، جهت شمارش کپک و مخمر از محیط کشت اختصاصی YGC[2] و گرمخانه‌گذاری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ٥ روز و جهت شمارش کلی‌فرم‌ها از محیط کشت ویولت رد بایل آگار[3] و گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت استفاده شد (نجفی و خداپرست ۲۰۰۹).

ارزیابی حسی

ویژگی‌های مختلف نمونه‌های دوغ در طی دوره نگهداری به روش هدونیک ۹ نقطه‌ای تعیین شد. تعداد ۲۰ ارزیاب با استفاده از آزمایش تشخیص درجه یا سطح کیفیت تعیین گردیدند. از هر تیمار تعداد ۲۰ نمونه یکسان تهیه و همراه با فرم مخصوصی دارای مقیاس هدونیک ۹ نقطه‌ای، به داوران داده شد تا با توجه به ذائقه و نظر خود فرم‌ها را تکمیل کنند و برای هر یک از ویژگی‌های احساس دهانی، طعم، رایحه و پذیرش کلی از معادل ۹ برای کیفیت مطلوب و ۱ برای کیفیت نامطلوب، امتیازدهی انجام شد. ارزیابان برای شستشوی دهان خود بین نمونه‌ها از آب استفاده نمودند (سوکولیس و همکاران ۲۰۱۰).

---

[1] Plate Count Agar

[2] Yeast extract Glucose Chloramphenicol

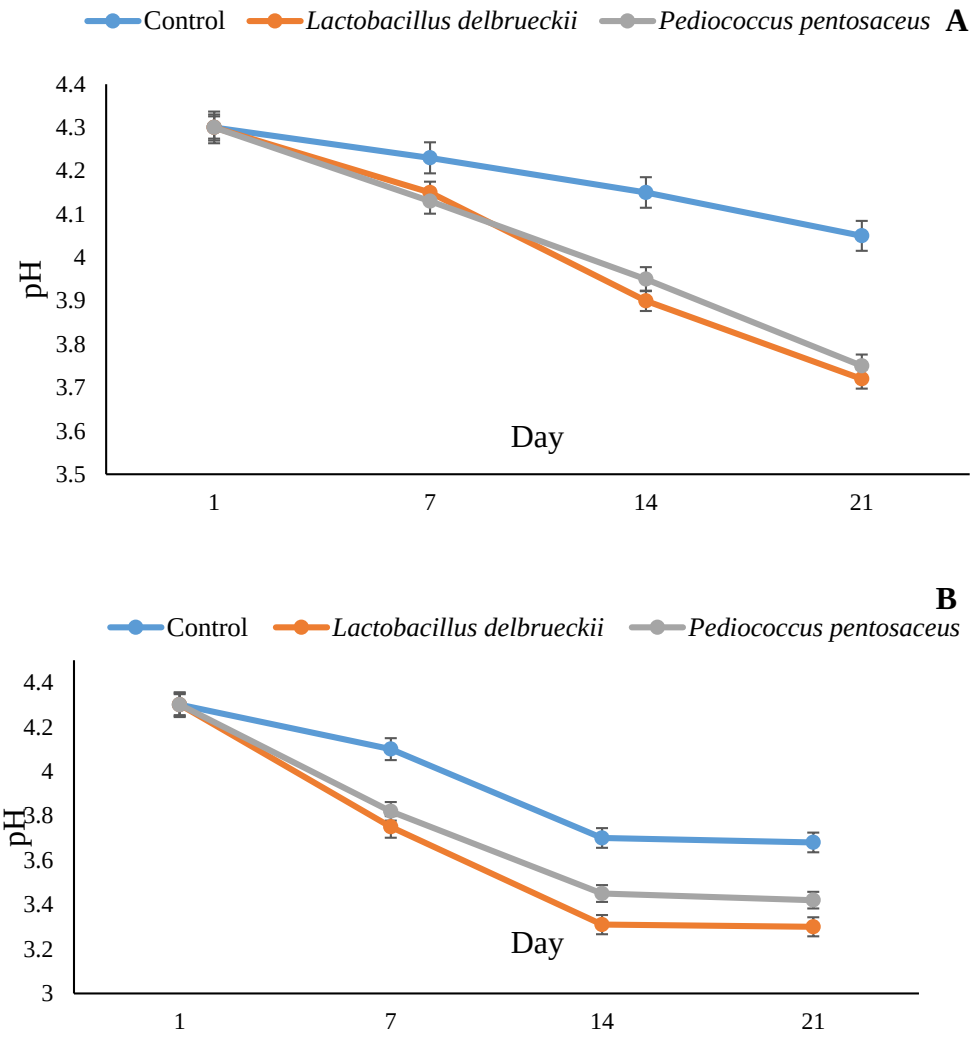
[3] Violet Red Bile agar

آنالیز آماری

تمامی نمونه ها در ۳ تکرار تولید شـــده و مورد آزمون قرار گرفته اســـت. تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به تیمارها با اســـتفاده از آزمون ANOVA در نرم افزار SPSS انجام گردید. هم چنین برای مقایســـه میانگین ها از روش آزمون چند دامنه ای دانکن و در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

ارزیابی ویژگی‌های شیمیایی: بر اساس نتایج به دست آمده، نوع سویه (*لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *پدیوکوکوس پنتوزاســـئوس*)، دمـای نگهـداری (٤ و ٢٥ درجـه سـانتی‌گراد) و همینطور زمان نگهداری (۲۱ روز) اثرات معنی‌داری در تغییرات pH نمونه‌های مختلف دوغ داشت (شکل ۱).

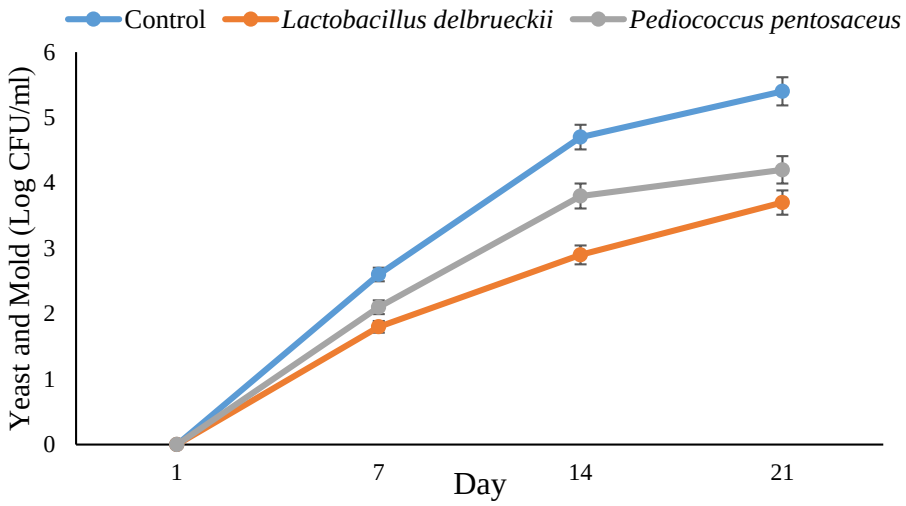


شکل ۱- اثر سویه‌های *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* بر pH دوغ طی دوره نگهداری A) دمای ۴ درجه سانتی‌گراد؛ B) دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

Figure 1- Effect of *Lactobacillus delbrueckii* and *Pediococcus pentosaceus* on Doogh pH during storage at A) 4ºC; B) 25ºC

سرعت کاهش pH در نمونه حاوی *لاکتوباسیلوس دلبروکی* که در دمای ۲۵ درجه نگهداری می شد، نسبت به نمونه شاهد و همینطور باکتری *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* سریع‌تر بود. *لاکتوباسیلوس دلبروکی* بعد از ۲۱ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد حدود یک واحد کاهش pH ایجاد نمود درحالیکه میزان کاهش pH در دوغ نگهداری شده در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد حدود ۵۰ درصد این مقدار بود. برای سویه *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* کاهش pH بعد از ۲۱ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ۰/۹ واحد بود درحالیکه این مقدار برای دمای ٤ درجه سانتی‌گراد حدود ۰/۵ واحد مشاهده شد. باکتری‌های پروبیوتیک pH محیط را تا حد تحمل کاهش داده و پس ازآن میزان تغییرات pH معنی‌دار نیست. به عنوان مثال *لاکتوباسیلوس دلبروکی* بعد از ١٤ روز pH دوغ را از ٤/٣ به ٣/٣١ کاهش داد ولی از روز ١٤ تا ٢١ میزان کاهش pH ۰/۱ واحد بود. با افزایش تعداد روز های نگهداری (بیشتر از دو ماه)، امکان افزایش pH محصول وجود دارد زیرا در مراحل ابتدایی باکتری‌ها از لاکتوز و منابع قندی برای رشد و تولید اسید لاکتیک استفاده می‌نمایند اما با اتمام منابع قندی باکتری از منابع پروتئینی و همینطور اسیدهای آلی استفاده نموده که باعث افزایش میزان pH می‌گردد (ایزدی مهر و همکاران ۱۳۹۷). در تحقیق پیشین، ویژگی های تکنولوژیکی این دو سویه مورد مطالعه قرار گرفته بودند و نتایج نشان دهنده مقاومت حرارتی این دو سویه بود که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. به‌نظر می‌رسد بعد از پاستوریزاسیون نهایی، سویه‌های *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* پتانسیل تحمل حرارت را دارا بوده و باعث کاهش pH شدند. **ارزیابی آزمون‌های میکروبی**

نتایج نشان داد اثر نوع سویه، دما و زمان بر جلوگیری از رشد کپک و مخمر معنی‌دار است (شکل ۲). طی ۲۱ روز از نگهداری نمونه‌ها در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد، رشد کپک مخمر مشاهده نشد. اگرچه برای نمونه‌هایی که در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۱ روز نگهداری شدند، رشد کپک و مخمر وجود داشت ولی استفاده از سویه های *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *پدیوکوکوس پنتوزا سئوس* توانست رشد کپک و مخمر را نسبت به نمونه شاهد کاهش دهد. در انتهای روز ۲۱ از شروع زمان نگهداری، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* دو سیکل لگاریتمی از تعداد کپک و مخمر را کاهش داد (در مقایسه با نمونه شاهد) در حالیکه این عدد برای *پدیوکوکوس پنتوزا سئوس* یک سیکل لگاریتمی مشاهده شد. ایزدی‌مهر و همکاران (۱۳۹۷) گزارش کردند در دوغ های تیمار شده با سویه های انتروکوکوس پروبیوتیک که طی ۵۰ روز در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند هیچگونه رشد قارچی مشاهده نشد. اگرچه در نمونه‌هایی که در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند با افزایش زمان، تعداد کپک و مخمر افزایش یافت به‌طوریکه تعداد آن ها در آخرین روز نگهداری به‌طور صعودی افزایش و از حد استاندارد ملی ایران نیز بیشتر بود. رشد کپک مخمر در محصولات غذایی به صورت مستقیم با زمان نگهداری و شرایط ماده غذایی در ارتباط است. تحقیقات متعددی اثرات ضد قارچی باکتری‌های اسید لاکتیک را به اثبات رسانده‌اند؛ اسیدهای آلی مانند اسید لاکتیک، اسید استیک، اسید فرمیک، اسید فنیل لاکتیک، اسید کاپرولییک، همینطور متابولیت های باکتریایی از قبیل کربن دی اکسید، پراکسید هیدروژن، اتانول، دی‌استیل، دی پپتیدهای حلقوی، اسیدهای چرب هیدروکسیل، ریوترین و ریوتری سیلین، از جمله ترکیبات ضد میکروبی و به‌ویژه ضد قارچی هستند که به وسیله باکتری‌های اسید لاکتیک تولید و باعث افزایش زمان ماندگاری محصول می‌گردند (دالی و همکاران ۲۰۱۰).



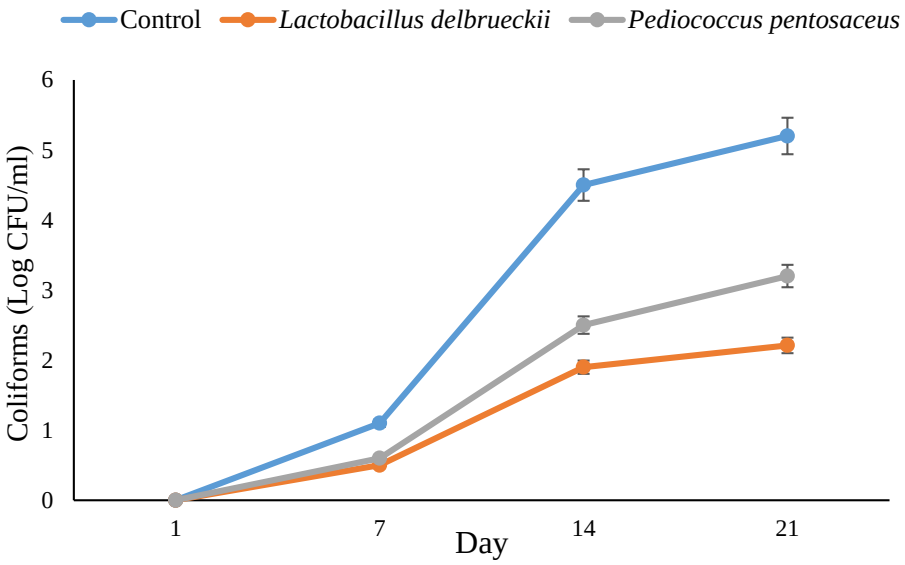
شکل ۲- اثر سویه‌های *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* بر شمارش کپک و مخمر دوغ طی دوره نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

Figure 2- Effect of *Lactobacillus delbrueckii* and *Pediococcus pentosaceus* on mold and yeast population during storage at 25ºC

لایتیلا و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* علیه قارچ *فوزاریوم* اثر ضد قارچی دارد. ارگین و همکاران (۲۰۱۰) جدایه‌های اسید لاکتیک را از مدفوع کودکان ۱۵-۵ ساله جدا نموده و اثرات ضد قارچی آن‌ها علیه سویه‌های متفاوتی از *کاندیدا* از قبیل *کاندیدا آلبیکنز*، *کاندیدا پاراپسیلوسیس* و *کاندیدا فاماتا* را اثبات کردند. مگ‌ناسون و همکاران (۲۰۰۳) اثر ضدقارچی ۱۲۰۰ سویه اسید لاکتیک را علیه قارچ های مختلفی از جمله *آسپرژیلوس فومیگاتوس* مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که ۱۰ در صد از آن‌ها اثر مهارکنندگی و ٤ درصد اثر کشندگی بر قارچ‌ها دارند. همچنین بیان شد بیشترین اثر ضدقارچی مربوط به *لاکتوباسیلوس کورینه‌فورمیس* است. اثر ضد قارچی باکتری‌های اسیدلاکتیک در محصولات مختلف نیز مورد بررسی قرار گرفته است. ولگاری و همکاران (۲۰۱۰) اثر ضد قارچی باکتری‌های *لوکونوستوک*، *انتروکوکوس* و *لاکتوباسیلوس* را بر طیف وسیعی از قارچ‌ها از جمله *دباریومایسس*، *پنی‌سیلیوم* و *ساکارومیسس* مورد بررسی قرار دادند و گزارش نمودند استفاده از عصاره سلولی *لاکتوباسیلوس پارا کازئی*، *لاکتو باسیلوس فرمنتوم* و *پدیوکوکوس پنتوزا سئوس*، می‌تواند ر شد قارچ‌ها را در پنیر نگهداری شده در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد، ۲۰-۱۹ روز و در پنیر نگهداری شده در دمای ۳۰-۲۰ درجه سانتی‌گراد، ٦-۱۲ روز به تاخیر اندازد. چو نگ و همکاران (۲۰۱٤) استفاده از باکتری‌های اسیدلاکتیک را در نوعی پنیر مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند رشد کپک *پنیسیلیوم* در پنیری که حاوی باکتری اسید لاکتیک بود، در مقایسه با نمونه شاهد کاهش یافت و زمان ماندگاری از ١٤ رز به ۲۵ روز افزایش یافت.

کلی‌فرم به گروهی از باکتری های خانواده انتروباکتریا سه گفته می شود که دارای توانایی خا صی در تخمیر قند لاکتوز باشند. از پایه‌ای و اساسی‌ترین آز مایشات تعیین آلودگی باکتر یایی منبع آب و غذا، آزمایش شمارش کلی‌فرم‌ها می‌باشد که توسط سازمان سلامت و بهدا شت جهانی در سال ۱۹۱٤ برای خانواده

انتروباکتریاسه برگزیده شد (هرورت و همکاران ۲۰۱۷). نتایج نشان داد نمونه‌هایی که در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند، هیچ‌گونه رشد کلی‌فرمی در آن‌ها مشاهده نشد. رشد کلی‌فرم‌ها بستگی به شرایط نگهداری ماده غذایی و همینطور ماهیت آن دارد اما به‌طور کلی، در دمای زیر ٦ درجه سانتی‌گراد کند می‌باشد. در نمونه‌های دوغی که در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند، اثر باکتری‌های *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* در کاهش رشد کلی‌فرم‌ها نسبت به نمونه شاهد معنی‌دار بود (شکل ۳). بیشترین اثر بازدارندگی مربوط به *لاکتوباسیلوس دلبروکی* بود که رشد کلی‌فرم‌ها را نسبت به نمونه شاهد ۳ سیکل لگاریتمی کاهش داد. همچنین *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* نیز توانست ۲ سیکل از تعداد کلی‌فرم‌ها را نسبت به نمونه شاهد بکاهد (شکل ۳).

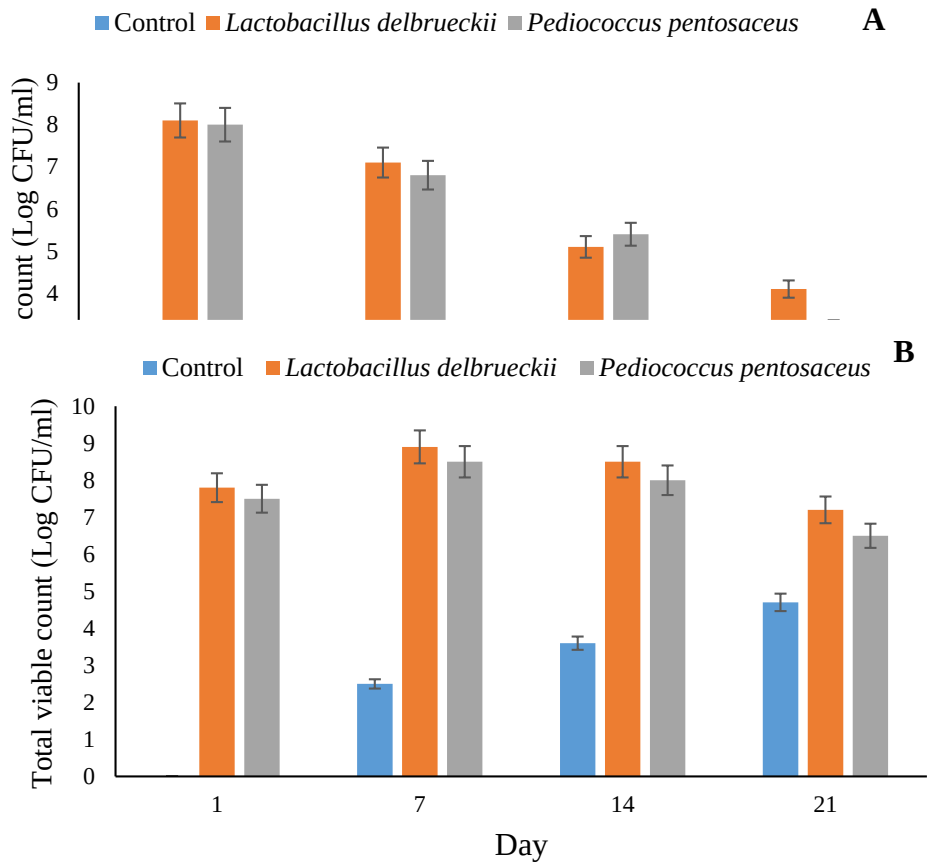


شکل ۳- اثر سویه‌های *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* بر شمارش کلی‌فرم‌ها دوغ طی دوره نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

Figure 3- Effect of *Lactobacillus delbrueckii* and *Pediococcus pentosaceus* on coliforms counting during storage at 25ºC

ایزدی مهر و همکاران (۱۳۹۷) گزارش نمودند نمونه‌های دوغی که دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند، تا روز ٤۰ هیچگونه رشد کلی‌فرمی در آن‌ها مشاهده نشد. همچنین بیان داشتند در نمونه‌هایی که در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند، در روز اول رشد کلی‌فرم دیده نشد اما در روزهای بعد و با رشد کلی‌فرم‌ها، اثر سویه‌های *انتروکوکوس* در کنترل افزایش تعداد کلی‌فرم‌ها نسبت به نمونه شاهد معنی‌دار بود. احسان‌نیا و سنجابی (۲۰۱٦) ویژگی‌های میکروبی پنیر فرآوری شده پروبیوتیک در حین نگهداری در یخچال را مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند ۲۰ در صد از تعداد کلی‌فرم‌ها و ٦۷ درصد از تعداد کپک و مخمرها در حین نگهداری در دمای یخچال از بین رفتند. حافظ و همکاران (۲۰۱۹) اثر باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس کازئی* را در بهبود کیفیت پنیر نرم و مهار رشد میکروب‌های پاتوژن را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد این باکتری‌ها اثری ضد میکروبی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی* O157:H7 و *باسیلوس سرئوس* داشتند.

در این پژوهش شمارش کلی میکروبی نیز در روزهای مختلف صورت گرفت (شکل ٤) و نتایج نشان داد نگهداری دوغ در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد باعث کاهش تعداد باکتری های تلقیح شده در طی دوره نگهداری می‌شود. یکی از علل این کاهش در تعداد را می‌توان به دمای نگهداری مربوط دانست. شرایط یخچالی برای رشد باکتری‌های مزوفیلیک و تکثیر آن‌ها مساعد نیست؛ بنابراین بعد از چند روز کاهش در تعداد جمعیت میکروبی مشاهده شد و بیشترین میزان کاهش در هفته چهارم مشاهده گردید. در دوغ‌های نگهداری شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، تعداد باکتری‌ها در هفته دوم در مقایسه با هفته اول افزایش پیدا کرد؛ در هفته سوم کاهش اندکی در تعداد باکتری‌ها نسبت به هفته دوم شاهد بودیم که علت آن افزایش pH محیط و عدم توانایی باکتری‌ها در تکثیر و رشد بود. بیشترین میزان کاهش در تعداد باکتری نیز در روز ۲۱ از شروع زمان نگهداری مشاهده شد که نسبت به هفته دوم، حدود دو سیکل لگاریتمی کاهش در تعداد باکتری وجود داشت.



شکل ۴- شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در دوغ طی دوره نگهداری در دمای الف)۴ و ب)۲۵ درجه سانتی‌گراد

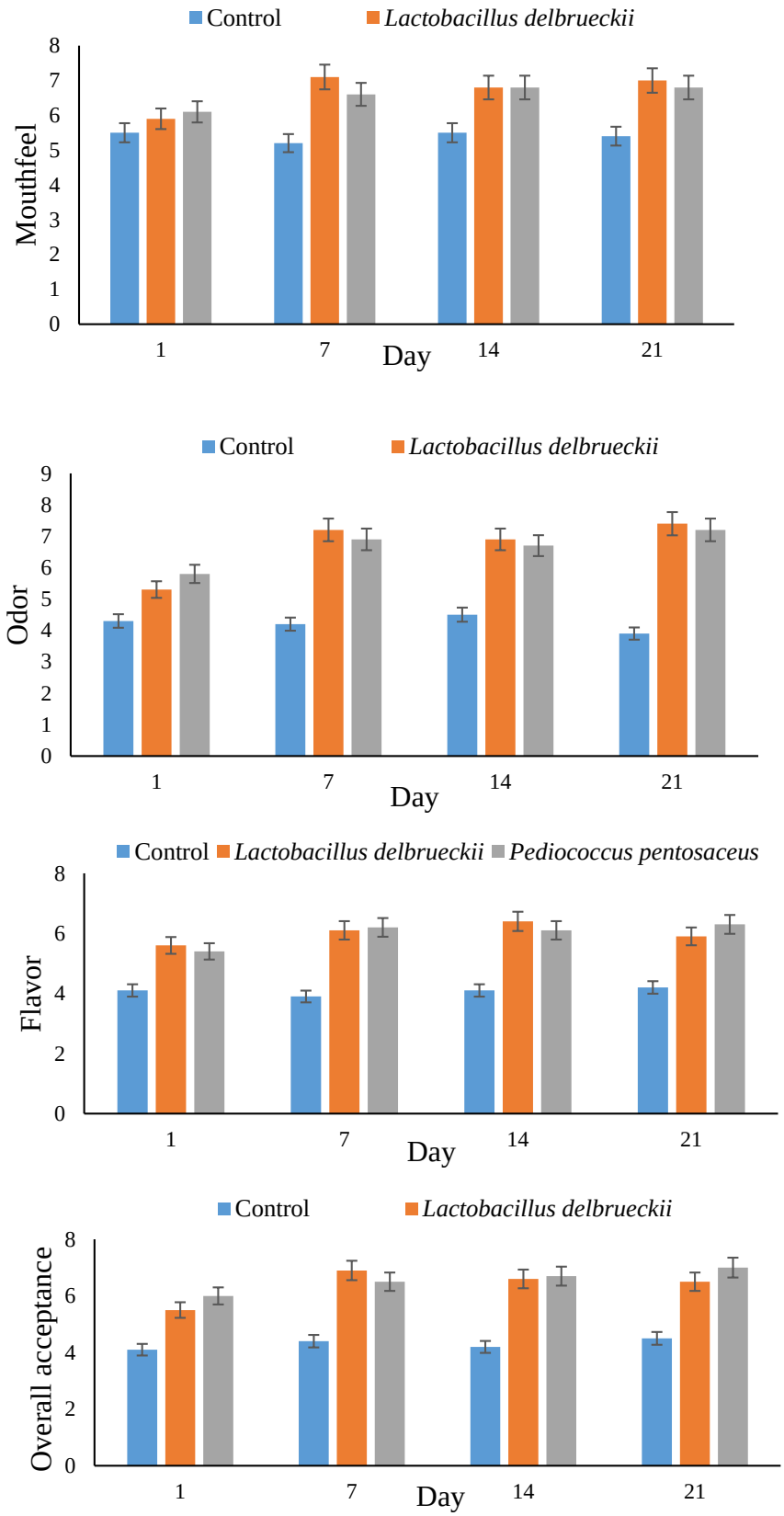
Figure 4- Total count of microorganisms in Doogh during storage at A) 4ºC, B) 25ºC

ایزدی مهر و همکاران (۱۳۹۷) گزارش دادند با افزایش شرایط اسیدی رشد در دوغ، رشد سویه‌های *انتروکوک*، در محدوده ۲۰ الی ٤٠ روز، کاهش یافت. سارانتینوپولوس و همکاران (۲۰۰۲) تأثیر سویه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* به‌عنوان کشت همراه بر ویژگی‌های میکروبی پنیر فتا را مورد بررسی قرار دادند که نتایج نشان داد طی ۱۵ روز اول تعداد باکتری‌های *انتروکوکوس فاسیوم* در پنیر افزایش پیدا می‌کند. دینی

و همکاران (۱۳۹۲) اثر دماهای گرمخانه گذاری، نگهداری و pH نهایی محصول بر زنده مانی باکتری‌های پروبیوتیک و خواص حسی در دوغ پروبیوتیک را بررسی کردند و گزارش دادند بیشترین میزان مرگ و میر این باکتری در هفته اول نگهداری مشاهده شد. همچنین میزان مرگ و میر در هفته های دوم و سوم کاهش یافت به‌طوری که بیشترین زنده‌مانی در هفته سوم مشاهده شد و علت آن را سازگاری تدریجی باکتری با شرایط سخت محیطی بیان کردند.

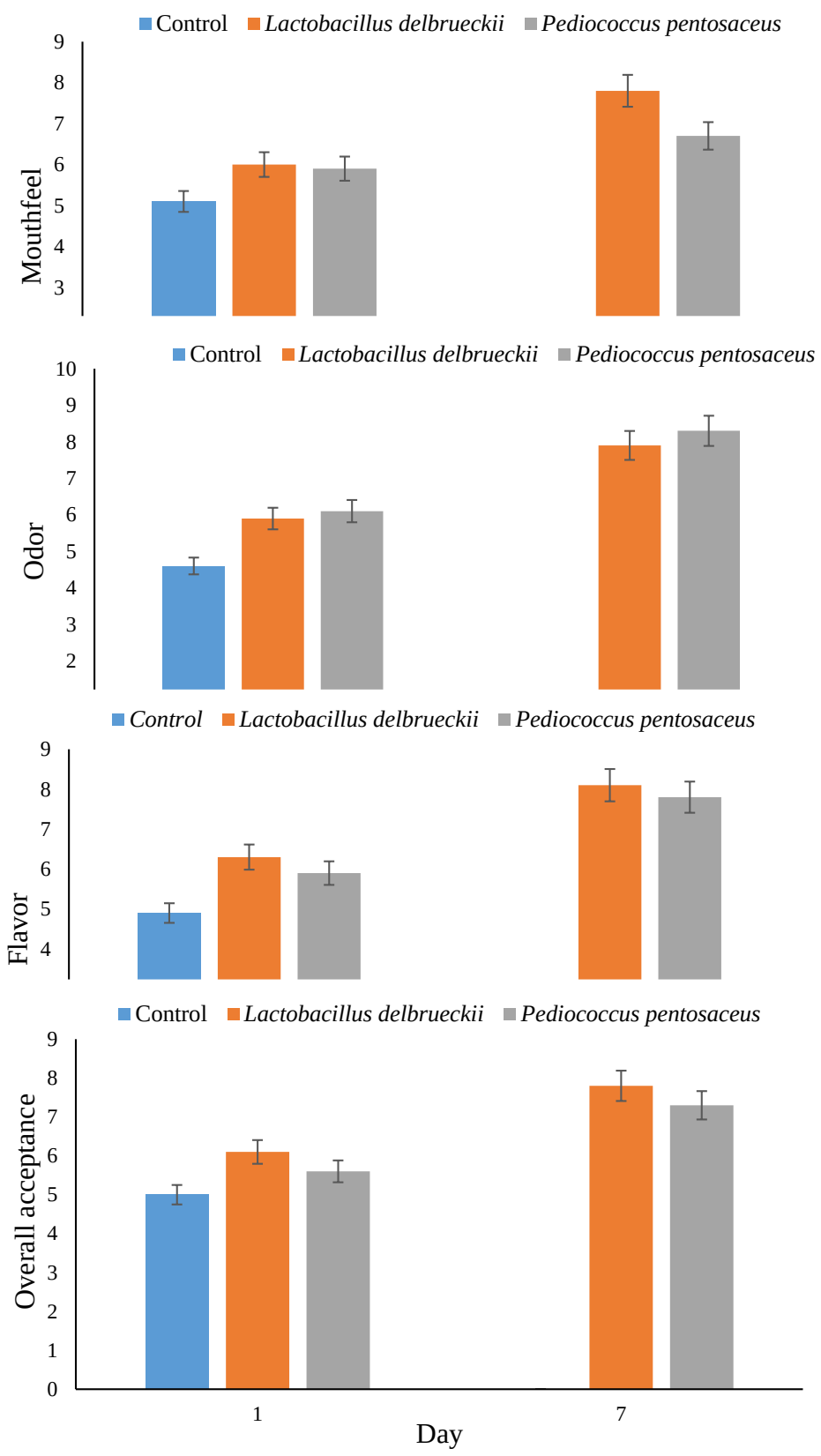
ارزیابی حسی

نتایج ارزیابی حسی (احساس دهانی، بو، طعم و پذیرش کلی) نمو نه های دوغ پروبیوت یک نگ هداری شده در دماهای ٤ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد در شکل‌های ٥ و ٦ نشان داده شده است. اگر چه علت اصلی توصیه به مصرف فراورده‌های پروبیوتیکی خاصیت درمانی آن‌ها است اما خواص حسی که به‌واسطه حضور این باکتری‌ها ایجاد می‌گردد در مشتری پسندی و فروش محصول بسیار حائز اهمیت می باشد. در میان محصولات عملگرا، فرآورده‌های تخمیری از جمله ماست پروبیوتیک به دلیل خواص حسی مطلوب از مقبولیت جهانی برخوردار ا ست. در شکل ٥ تاثیر نوع تیمارها بر خواص حسی نمونه‌های دوغ از قبیل احساس دهانی، طعم، رایحه و پذیرش کلی نشان داده شده است. *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* ارگانیسم‌های هموفرمانتاتیوی هستند که محصول نهایی تخمیر توسط آن‌ها اسید لاکتیک است و می‌توانند در فرایند رسیدن فراورده های مختلف لبنی و توسعه ویژگی‌های حسی آن از طریق فعالیت لیپولیتیک، پروتئولیتیک و تولید ترکیبات فراری مثل دی‌استیل، استالدئید و استوئین نقش داشته باشند (هاتی و همکاران ۲۰۱۳). از آنجا که حد کلیفرم ها در دوغ ۱۰ CFU/ml است، لذا در ارتباط با نمونه‌های نگهداری شده در دمای ۲۵ در جه سانتی‌گراد امکان ارز یابی حسی برای محصولاتی که بیش از یک هفته از نگهداری آن ها می‌گذ شت وجود ندا شت. همچنین امکان ارزیابی حسی تیمار شاهد نیز فقط در روز اول نگهداری (دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) وجود داشت. در تمامی آیتم‌های بررسی شده در ارتباط با پذیرش محصول، نمونه‌هایی که دارای باکتری‌های لاکتوباسیلوس دلبروکی و پدیوکوکوس پنتوزاسئوس بودند مقبولیت بیشتری داشته و امتیاز بالاتری توسط ارزیابان دریافت کردند. طعم، رایحه و پذیرش کلی محصول در نمو نه های نگهداری شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در هفته اول نگهداری، به صورت معنی‌داری بیشتر از نمونه‌های نگهداری شده در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد بود که می‌توان این موضوع را به فعالیت بیشتر باکتری‌ها در دمای ۲۵ درجه و تولید ترکیبات شرکت کننده در عطر و طعم نسبت داد. سارانتینوپولوس و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند سویه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* که به عنوان کشت مکمل در تولید پنیر فتا استفاده شد، با تولید ترکیبات فراری نظیر اتانول، استات، استون، استوئین و دی‌استیل تأثیر مثبتی روی طعم، آروما، رنگ و ساختار محصول ایجاد کردند. ابراهیم زادگان و همکاران (۱۳۹۳) گزارش کردند نمونه‌های دوغ حاوی باکتری پروبیوتیک نسبت به نمونه کنترل به‌طور معنی‌داری بیشترین امتیاز طعم را کسب نمودند. احمدی و همکاران (۱۳۹۱) بیان کردند در نمونه‌هایی که باکتری‌های بیفیدوباکتریوم به همراه باکتری‌های استارتر ماست گرمخانه‌گذاری شده بودند، بیشترین امتیاز در پذیرش طعم، ظاهر و احساس دهانی، ثبت شد. در این تیمارها پس از فرآیند تخمیر، دوغ تحت هیچ فرآیند فیزیکی قرار نگرفته بود و این موضوع باعث افزایش قوام و گرانروی دوغ و احساس دهانی بهتر و لطافت بیشتر بافت در دهان گردید.



شکل ۵- نتایج ارزیابی حسی نمونه های دوغ پروبیوتیک طی نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

Figure 5- Sensory evaluation results of probiotic doogh samples during storage time at 4ºC



شکل ۶- نتایج ارزیابی حسی نمونه های دوغ پروبیوتیک طی نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

Figure 6- Sensory evaluation results of probiotic Doogh samples during storage time at 25ºC

نتیجه‌گیری کلی

هدف از این مطالعه، بررسی زنده مانی باکتری های پروبیوتیک *لاکتو باسیلوس دلبروکی* و *پدیوکوکوس پنتوزا سئوس* در دوغ بود. همچنین تاثیر این سویه‌ها بر ویژگی های شیمیایی، میکروبی و حسی دوغ مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد هر دو سویه توانستند در هفته اول نگهداری در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد زنده‌مانی مطلوبی داشته باشند. اگر چه طی دو هفته بعد، تعداد آن ها کاهش پیدا کرد. همچنین زمانیکه نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند، باکتری‌ها از نظر زنده‌مانی شرایط بهتری داشتند و تعداد آن‌ها تا هفته سوم افزایش یافت و در هفته آخر نیز کاهش معنی‌داری پیدا نکرد. باکتری *لاکتوباسیلوس دلبروکی* پتانسیل بالاتری در کاهش pH نمونه‌ها داشت، همچنین اثر محافظتی آن در جلوگیری از رشد کلی‌فرم و کپک و مخمر نیز بهتر ارزیابی شد. از نظر ویژگی‌های حسی مانند احساس دهانی، طعم، رایحه و پذیرش کلی اثر دوغ‌های پروبیوتیک نسبت به نمونه کنترل معنی‌دار بود. بنابراین باکتری‌های پروبیوتیک مورد استفاده در این تحقیق نه تنها تأثیر نامطلوب بر خواص شیمیایی، میکروبی و حسی نداشتند بلکه موجب بهبود خواص دوغ نیز گردیدند. لذا باکتری های *لاکتو باسیلوس دلبروکی* و *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* می‌توانند پس از انجام آزمون‌های تکمیلی، گزینه مناسبی برای استفاده‌های صنعتی در این حوزه مطرح شوند.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت های مالی طرح پژوهشی شماره ۹۹۱/۰۷ که این مقاله مستخرج از آن می باشد صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

منابع مورد استفاده

ابراهیم زادگان س, زمردی ش. ۱۳۹۳. زنده مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (LAFTI-L10) و بیفیدوباکتریوم لاکتیس (LAFTI-B94) و تاثیر آنها بر خواص کیفی و ریزساختاری دوغ. نشریه پژوهشهای صنایع غذایی، ۲٤ (۳): ۵۳۱-۵٤۱.

احمدی ا, محمدی ر, روحی م, مرتضویان ا, خسروی دارانی ک, شادنوش م. ۱۳۹۱. بررسی قابلیت زیستی دو گونه بومی بیفیدوباکتریوم در دوغ پروبیوتیک. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۵: ۱-۱۰.

ایزدی‌مهر ز, یاورمنش م, حبیبی نجفی , عدالتیان دوم م. ۱۳۹۷. بررسی تاثیر سویه های انتروکوکوس فاسیوم زیرگونه فاسیوم بر ویژگیهای شیمیایی، میکروبی و حسی دوغ طی زمان نگهداری. میکروبیولوژی کاربردی در صنایع غذایی، ٤ (۳): ۵۰-٦۲.

امیری عقدایی سیدسهیل, اعلمی مهران. تاثیر موسیلاژ دانه ریحان بر ویژگی های رئولوژیکی و پایداری دوغ. ۱۳۹۰. مجله علمی پژوهشی علوم و فناوری غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار، ۳: ۱۷-۲٤.

دینی ع, رضوی ه, ابراهیم زاده موسوی م ع. ۱۳۹۲. تاثیر دماهای گرمخانه گذاری، نگهداری و pH نهایی محصول بر زنده مانی باکتری های پروبیوتیک و خواص حسی در دوغ پروبیوتیک. نشریه پژوهش های صنایع غذایی، ۲۳ (۳): ۳٦۷-۳۸۰.

نوشاد م، علیزاده بهبهانی ب، حجتی م. ۱٤۰۰. بررسی ویژگی های پروبیوتیکی و تکنولوژیکی باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از دوغ محلی بهبهان. نشریه |پژوهش های صنایع غذایی، ۳۱ (٤): ۱۸٦-۱٦۹.

Beltrán-Barrientos LM, Hernández-Mendoza A, Torres-Llanez MJ, González-Córdova AF, Vallejo-Córdoba B. 2016. Invited review: Fermented milk as antihypertensive functional food. Journal of dairy science, 99(6):4099-110.

Calero CD, Rincón EO, Marqueta PM. 2020. Probiotics, prebiotics and synbiotics: useful for athletes and active individuals? A systematic review. Beneficial Microbes, 27;11(2):135-49.

Cheong EY, Sandhu A, Jayabalan J, Le TT, Nhiep NT, Ho HT, Zwielehner J, Bansal N, Turner MS. 2014. Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould Penicillium commune and their potential as biopreservatives in cheese. Food Control, 46:91-7.

Dalié DK, Deschamps AM, Richard-Forget F. 2010. Lactic acid bacteria–Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. Food control, 21(4):370-80.

Ehsannia S, Sanjabi MR. 2016. Physicochemical, microbiological and spoilage analysis of probiotic processed cheese analogues with reduced emulsifying salts during refrigerated storage. Journal of food science and technology, 53(2):996-1003.

Ergin, K., Şener, T., Belgin, E. 2010. Anti-fungal effects of Lactobacillus Spp. bacteria on candida yeast. Kafkas Universitesi Vetteriner Fakultesi Dergisi, 16, 6, 1061-1064.

Hafez Y, Sobeih A, Mansour N. 2019. Pivotal role of lactobacillus strains in improvement of soft cheese quality and inhibiting the growth of harmful and dangerous bacterial pathogens. Slovenian Veterinary Research, 56(22-Suppl).

Hati S, Mandal S, Prajapati JB. 2013. Novel starters for value added fermented dairy products. Current Research in Nutrition and Food Science Journal, 1(1):83-91.

Hekmat S, McMAHON DJ. 1992. Survival of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum in ice cream for use as a probiotic food. Journal of dairy science, 75(6):1415-22.

Hervert CJ, Martin NH, Boor KJ, Wiedmann M. 2017. Survival and detection of coliforms, Enterobacteriaceae, and gram-negative bacteria in Greek yogurt. Journal of dairy science, 100(2):950-60.

Jokovic N, Nikolic M, Begovic J, Jovcic B, Savic D, Topisirovic L. 2008. A survey of the lactic acid bacteria isolated from Serbian artisanal dairy product kajmak. International journal of food microbiology,127(3):305-11.

Kabak B, Dobson AD. 2011. An introduction to the traditional fermented foods and beverages of Turkey. Critical reviews in food science and nutrition, 51(3):248-60.

Kiani H, Mousavi ME, Razavi H, Morris ER. 2010. Effect of gellan, alone and in combination with high-methoxy pectin, on the structure and stability of doogh, a yogurt-based Iranian drink. Food Hydrocolloids, 24(8):744-54.

Laitila A, Alakomi HL, Raaska L, Mattila-Sandholm T, Haikara A. 2002. Antifungal activities of two Lactobacillus plantarum strains against Fusarium moulds in vitro and in malting of barley. Journal of Applied Microbiology, 93(4):566-76.

Magnusson J, Ström K, Roos S, Sjögren J, Schnürer J. 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. FEMS microbiology letters, 1;219(1):129-35.

Najafi MB, Khodaparast MH. 2009. Efficacy of ozone to reduce microbial populations in date fruits. Food control, 20(1):27-30.

Radoi A, Moscone D, Palleschi G. 2010. Sensing the lactic acid in probiotic yogurts using an L-lactate biosensor coupled with a microdialysis fiber inserted in a flow analysis system. Analytical letters, 43(7-8):1301-9.

Sarantinopoulos P, Kalantzopoulos G, Tsakalidou E. 2002. Effect of Enterococcus faecium on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. International Journal of Food Microbiology, 76(1-2):93-105.

Soukoulis C, Lyroni E, Tzia C. 2010. Sensory profiling and hedonic judgement of probiotic ice cream as a function of hydrocolloids, yogurt and milk fat content. LWT-Food Science and Technology, 43(9):1351-8.

Voulgari K, Hatzikamari M, Delepoglou A, Georgakopoulos P, Litopoulou-Tzanetaki E, Tzanetakis N. 2010. Antifungal activity of non-starter lactic acid bacteria isolates from dairy products. Food Control, 21(2):136-42.

Journal of Food Research, 2022,32(3):77-91
https://foodresearch.tabrizu.ac.ir

© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)

DOI: 10.22034/FR.2022.43070.1778

Investigation the effects of the native probiotic strains of *Lactobacillus delbrueckii* and *Pediococcus pentosaceus* on the chemical, microbial and sensory properties of Doogh during storage

M Noshad[1*], B Alizadeh Behbahani[2] and M Hojjati[3]

Received: November 28, 2020 Accepted: August 11, 2021

[1] Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Iran
[3] Professor, Department of Food Science and Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Iran
*Corresponding author: Email: Noshad@asnruk.ac.ir

Background: Probiotic bacteria are live microorganisms which have beneficial effects on the host body, if consumed at sufficient amounts. Some positive effects of such bacteria are as follows: reduction of lactose intolerance, inhibition of colon, intestine, liver and breast cancers, reduction of blood cholesterol, improving and boosting the immune system, infection prevention, treating and inhibiting from acute diarrhea, reduction of intestinal inflammation, reduction of food allergies or Eczema in children, improving the absorption of minerals and vitamins, and prevention of the growth and replication of harmful bacteria. In addition to longer shelf life, fermented foods have flavor and odor characteristics which are directly or indirectly associated with the fermenting microorganisms. In many cases, the vitamin content of fermented foods and the digestibility of raw materials are increased. Moreover, fermentation decreases the toxicity of some food ingredients. Functional food products such as yoghurt and Doogh could be appropriate carriers for the transfer of such bacteria to the intestinal epithelial cells. The purpose of this research is to examine the viability of the probiotic strains of *Lactobacillus delbrueckii* and *Pediococcus pentosaceus* in Doogh as well as investigating their effects on the chemical, microbial and sensory properties of this dairy product during storage.
material and methods: In this study, the probiotic strains of *L. delbrueckii* and *P. pentosaceus* were used to produce Iranian traditional Doogh. pH was measured on the 1st, 7th, 14th and 21st day using the Lab827 pH meter (Metrohm, Switzerland). For microbial count, 25 ml of the sample was mixed with 225 ml of sterile sodium citrate 0.2% and considered to be 10^{-1} dilution after homogenization. The dilution series up to 10^{-7} were prepared by adding 1 ml of the content of each test tube to 9 ml of the sterile ringer solution. For the microbial total count, plate count agar was applied at 37°C for 48 h. For the yeast and mold count, yeast extract glucose chloramphenicol was utilized at 25°C for 5 days, and for the coliform count, violet red bile agar was employed along with incubation at 37°C for 48 h. Various properties of the Doogh samples were determined using 9-point hedonic scale during storage. A number of 20 panelists were chosen according to the degree diagnosis or quality level test. A number of 20 samples were prepared from each treatment and given to the panelists with a form

scaled with 9 points (9=desirable, 1=undesirable) to fill it out considering their own tastes and comments. The sensory properties were as follows: mouthfeel, flavor, odor and overall acceptability. **Results and discussion**: The results revealed that *L. delbrueckii* reduced the pH about 1 unit after 21 days of storage at 25°C, while the reduction of pH in the Doogh stored at 4°C was about 50% of this value. For *P. pentosaceus*, the pH reduction was equal to 0.9 and 0.5 after 21 days of storage at 25 and 4°C respectively. During the 21 days of storage of the samples at 4°C, no growth of molds and yeasts was observed. Although molds and yeast could grow in the samples stored at 25°C for 21 days, application of *L. delbrueckii* and *P. pentosaceus* could decrease their growth relative to the control. On the 21st day, *L. delbrueckii* reduced two logarithmic cycles of the molds and yeasts (compared with the control), while *P. pentosaceus* decreased one logarithmic cycle. The results also showed that no coliform growth was observed in the samples stored at 4°C. Coliform growth depends on the food nature and its storage conditions. In general, coliforms grow slowly at temperatures under 6°C. In the doogh samples stored at 25°C, the decreasing effects of *L. delbrueckii* and *P. pentosaceus* were significant on the coliform growth, compared with the control. In this study, the microbial total count was also performed on different days and the results demonstrated that Doogh storage at 4°C caused a decrease in the number of the inoculated bacteria during storage. One of the reasons behind this could be the storage temperature. Refrigerated storage is not suitable for the growth and replication of mesophilic bacteria. Therefore, a decrease in the microbial population was observed after some days and the greatest reduction occurred in the fourth week. In the Doogh samples stored at 25°C, the number of bacteria increased in the second week relative to the first one. In the third week, a slight reduction was observed in the bacterial count, compared with the second week. This could be ascribed to the increase in the sample pH and the inability of the bacteria to replicate and grow. The largest reduction in the number of the bacteria was observed on the 21st day of storage which was about two logarithmic cycles lower than the second week. The results of the sensory evaluation showed that the Doogh samples inoculated with *L. delbrueckii* and *P. pentosaceus* achieved higher scores in terms of mouthfeel, flavor, odor and overall acceptability in comparison with the control.
Conclusion: *L. delbrueckii* was more potent in reducing the samples pH. In addition, its protective effect was more pronounced in preventing the growth of coliforms, molds and yeasts. On the sensory properties, including mouthfeel, flavor, odor and overall acceptability, the effects of the probiotic Doogh samples were significant compared with the control. As a result, the probiotic bacteria used in this research not only did not have undesirable effects on the chemical, microbial and sensory properties of Doogh, but also improved them. In conclusion, *L. delbrueckii* and *P. pediococcus* could be appropriate candidates for industrial uses in this area after complementary experiments.

Keywords: Traditional Iranian drink, Fermented dairy beverage, probiotic bacteria, cold storage