



جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran

سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

Institute of Standards and Industrial Research of Iran



استاندارد ملی ایران

۱۱۳۲۵

چاپ اول

ISIRI

11325

1st.edition

ماست پروبیوتیک -
ویژگی ها و روش های آزمون

**Probiotic yogurt-
Specifications and test methods**

ICS:67.100.99

به نام خدا

آشنایی با مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه های مختلف در کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان مؤسسه* صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف کنندگان، صادرکنندگان و وارد کنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان های دولتی و غیر دولتی حاصل می شود. پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال می شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادهای در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان های علاقه مند و ذیصلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می کنند در کمیته ملی طرح و بررسی و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می شود که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی ایران شماره ۵ تدوین و در کمیته ملی استاندارد مربوط که مؤسسه استاندارد تشکیل می دهد به تصویب رسیده باشد.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد (ISO)^۱ کمیسیون بین المللی الکتروتکنیک (IEC)^۲ و سازمان بین المللی اندازه شناسی قانونی (OIML)^۳ است و به عنوان تنها رابط^۴ کمیسیون کدکس غذایی (CAC)^۵ در کشور فعالیت می کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی های خاص کشور، از آخرین پیشرفتهای علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بینالمللی بهره گیری می شود.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و / یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری نماید. مؤسسه می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه بندی آن را اجباری نماید. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سا زمانها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدور گواهی سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست محیطی، آزمایشگاه ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، مؤسسه استاندارد این گونه سازمان ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تأیید صلاحیت به آن ها اعطا و بر عملکرد آنها نظارت می کند. ترویج دستگاه بین المللی یکاها، کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این مؤسسه است.

* مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

1- International Organization for Standardization

2 - International Electro technical Commission

3- International Organization for Legal Metrology (Organization International de Metrology Legal)

4 - Contact point

5 - Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد
«ماست پروبیوتیک - ویژگی‌ها و روش‌های آزمون»

رئیس:

دبیریان، شهریار
(دکترای تخصصی بهداشت مواد غذایی)

نمایندگی:

شرکت صنایع شیر ایران - پگاه

دبیر:

مرتضویان، سیدامیرمحمد
(دکترای تخصصی صنایع غذایی- لبنی)

دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده علوم
تغذیه و صنایع غذایی

اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

ابراهیمی، غلامحسن
(لیسانس صنایع غذایی)

سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

امجدی گلپایگانی، مهنوش
(لیسانس تغذیه)

دبیرخانه فدراسیون بین‌المللی شیر (IDF) - ایران

امیری، لیلا
(لیسانس صنایع غذایی)

شرکت شیر پاستوریزه پگاه تهران

بابایی، پرینا
(فوق لیسانس صنایع غذایی)

شرکت شیر پاستوریزه پگاه تهران

بادامچی، فرهاد
(لیسانس تغذیه)

سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

برازندگان، خسرو
(فوق لیسانس صنایع غذایی)

سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

ثباتی، علی
(فوق لیسانس صنایع غذایی)

شرکت شیر پاستوریزه پگاه تهران

حیدرپور، مژگان

سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

(فوق لیسانس میکروبیولوژی)

شرکت لبنیات پاک

دولت خواه‌نژاد، محمدرضا

(لیسانس صنایع غذایی)

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، اداره کل
آزمایشگاه‌های کنترل غذا و دارو

رحیمی‌فرد، ناهید
(دکترای تخصصی میکروبیولوژی)

وزارت بهداشت، معاونت غذا و دارو، اداره کل نظارت بر مواد غذایی،
آشامیدنی، آرایشی و بهداشتی

سایه‌وند، حمید
(فوق لیسانس صنایع غذایی)

شرکت پیشگامان پخش صدیق (نمایندگی «کریستین-هنسن»)

ظهیرا قدم، حسین
(فوق لیسانس صنایع غذایی)

شرکت «اینترکول» (نمایندگی «دنيسكو»)

علیزاده، حسن
(فوق لیسانس صنایع غذایی)

شرکت صنایع شیر ایران - پگاه

منطقی، عبدالمطلب
(لیسانس صنایع غذایی)

شرکت شان دشت (پاژن)

لیبره، آنژلا
(فوق لیسانس میکروبیولوژی)

فهرست مندرجات

صفحه	عنوان
ج	آشنایی با مؤسسه استاندارد
د	کمیسیون فنی تدوین استاندارد
ز	پیش‌گفتار
ح	مقدمه
۱	۱ هدف و دامنه کاربرد
۱	۲ مراجع الزامی
۲	۳ اصطلاحات و تعاریف
۵	۴ طبقه‌بندی
۵	۵ اجزای تشکیل‌دهنده اصلی
۷	۶ اجزای تشکیل‌دهنده اختیاری
۷	۷ ویژگی‌ها
۱۰	۸ نمونه‌برداری
۱۰	۹ روش‌های آزمون
۱۰	۱۰ بسته‌بندی
۱۱	۱۱ نشانه‌گذاری
۱۴	۱۲ پیوست الزامی

پیش‌گفتار

استاندارد «ماست پروبیوتیک- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون» نخستین بار در سال ۱۳۸۷ به‌وسیله دانشکده تغذیه و صنایع غذایی/ انستیتوی تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تدوین شد و در هشتصد و بیست و پنجمین اجلاس کمیته ملی استاندارد خوراک و فرآورده‌های کشاورزی مورخ ۸۷/۱۲/۱۱ تصویب شد. اینک، استاندارد یادشده به استناد بند ۱ ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران مصوب بهمن ماه سال ۱۳۷۱، به‌عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدیدنظر خواهد شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدیدنظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی استفاده کرد.

منابع و مواخذه‌ای که برای تهیه این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته است به شرح زیر است:

۱- مرتضویان، امیرمحمد و سهراب‌وندی، سارا. پروبیوتیک‌ها و فرآورده‌های غذایی پروبیوتیک. انتشارات انا، تهران، ایران، ۱۳۸۳.

3. ISO/DIS 29981/IDF 220, Enumeration of presumptive bifidobacteria
4. ISO/DIS 20128/IDF 192, Milk products-Enumeration of presumptive *Lactobacillus acidophilus* on selective medium-colony count technique at 37°C.
5. CAC/RCP 206: 1999, Codex General Standard for the Use of Dairy Terms.
6. CAC/RCP 243: 2003, Codex Standard for Fermented Milks.
7. Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food: 2002, London, Ontario, Canada.
8. Anon. Enumeration of probiotic bacteria in fermented milk products. Chr-Hansen Guidelines, 2007.
9. Mortazavian, AM., Ehsani, MR., Reinheimer, J. and Sohrabvandi, S. MRS-bile agar: Its suitability for enumeration of mixed probiotic cultures in cultured dairy products. *Milchwissenschaft*, 62, 270-272.
10. Tamime, AY. *Probiotic Dairy Products*. Blackwell Publishing Ltd, UK, 2005.

مقدمه

امروزه، مقبولیت و مصرف فرآورده‌های پروبیوتیک در کشورهای جهان به‌ویژه اروپا، ایالات متحده و ژاپن رواج چشمگیر یافته است، طوری که بیش از ۹۰ فرآورده غذایی پروبیوتیک حاوی *لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس*^۱ و بیفیدوباکتریوم^۲ ها در سرتاسر جهان تولید می‌شود، بیش از ۵۳ فرآورده لبنی پروبیوتیک در ژاپن به مصرف می‌رسد، بیشتر ماست‌های تولید شده در بازارهای آمریکا پس از دهه ۱۹۷۰ حاوی باکتری *ل.اسیدوفیلوس* هستند، در کشورهای اروپایی همچون فرانسه، آلمان و سوئد، فرآورده‌های تخمیری پروبیوتیک حدود ۲۵٪ از کل فرآورده‌های تخمیری را شامل می‌شوند، بیش از ۴۵ کارخانه لبنی در اروپا، فقط به تولید فرآورده‌های پروبیوتیک بیفیدو - اسیدوفیلوس^۳ می‌پردازند، حدود ۴۳ فرآورده تخمیری پروبیوتیک خنک شده^۴ در انگلستان به فروش می‌رسد و فرآورده‌های پروبیوتیک فراوان نظیر شیرهای تخمیری، پنیرهای نرم، فرآورده‌های غیرلبنی با پایه سویا و معلقه‌های تغلیظ شده میکروبی^۵ در بازارهای انگلستان موجود است. در بسیاری از کشورهای اروپایی، آفریقای شمالی و آسیایی، انواع گوناگونی از فرآورده‌های پروبیوتیک شامل شیرهای تخمیری، شیرهای تازه، ماست، دسرهای منجمد و پنیر در حال تولید و مصرف است. در دو-سه دهه گذشته، فرآورده‌های تجاری پروبیوتیک عرضه شده به بازار از رشد جهشی برخوردار بوده‌اند. در امریکای شمالی، محبوبیت شیرهای تخمیری پروبیوتیک کمتر از کشورهای اروپایی است، از این رو سایر فرآورده‌های لبنی مانند پنیر و/یا فرآورده‌های غیرلبنی پروبیوتیک به‌طور فزاینده موضوع پژوهش و تولید قرار گرفته‌اند. در اروپا، ماست پروبیوتیک پرطرفدارترین فرآورده پروبیوتیک است.

در میان فرآورده‌های غذایی پروبیوتیک، در کل، ماست‌های پروبیوتیک از پرطرفدارترین این محصولات به‌شمار می‌آیند و ماست‌های گوناگون به منظور درمان عفونت‌های روده‌ای به‌ویژه اسهال و عفونت‌های باکتریایی و مخمری دستگاه تناسلی تولید شده‌اند. گذشته از خواص دارویی این فرآورده، اسیدسازی کمتر طی دوران نگهداری (طعم ملایم)^۶ و بیشتر بودن مقدار اسید لاکتیک نوع $L(+)$ نسبت به $D(-)$ در فرآورده (برخلاف ماست‌های سنتی یا ساده)^۷ نیز در افزایش مقبولیت این ماست‌ها سهیم بوده است.

لازم به اشاره است که فرآورده‌های پروبیوتیک، از جمله ماست‌های پروبیوتیک، در دسته فرآورده‌های فراویژه^۸ فراویژه^۸ قرار می‌گیرند.

1. *Lactobacillus acidophilus*
2. Bifidobacteria
3. Bifido-acidophilus
4. Chilled-fermented probiotic products
5. Concentrated-cell suspensions
6. Mild flavor
7. Traditional/plane yogurt
8. Functional products

«ماست پروبیوتیک - ویژگی ها و روش های آزمون»

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد تعیین ویژگی های میکروبیولوژیک، شیمیایی و حسی، نمونه برداری، روش های آزمون، بسته بندی، نشانه گذاری و شرایط نگهداری و حمل «ماست پروبیوتیک ساده»^۱ است. این استاندارد برای ماست های پروبیوتیک ساده تولید شده در واحدهای تولیدی مجاز کاربرد دارد و برای سایر انواع ماست پروبیوتیک (همچون ماست های پروبیوتیک طعم دار و میوه ای) کاربرد ندارد.

۲ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد ملی به آن ها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب، آن مقررات جزئی از این استاندارد ملی محسوب می شوند. چنانچه به مدرکی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه ها و تجدیدنظرهای بعدی آن مورد نظر این استاندارد ملی نیست. در ارتباط با مدارکی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن ها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه های بعدی آن ها مورد نظر است. استفاده از مراجع زیر برای این استاندارد الزامی است:

- ۱-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱۶۴: شیر خام- ویژگی ها و روش های آزمون
- ۲-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۵۳: پنیر و پنیر های فرآیند شده- تعیین ماده خشک کل
- ۳-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۵۳: ویژگی های آب آشامیدنی
- ۴-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۲۰۱۲: شیر خشک- ویژگی ها
- ۵-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱۹۱: خامه پاستوریزه و فرادما- ویژگی ها و روش های آزمون
- ۶-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۴۴۴۸: کازئین و کازئینات- ویژگی ها
- ۷-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۳۲۶: شیر و فرآورده های آن- نمونه برداری
- ۸-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۷۰۳۹: شیر و فرآورده های آن- نمونه گیری بازرسی به روش وصفی ها

- ۲-۹ استاندارد ملی ایران شماره ۲۸۵۲: شیر و فرآورده های آن- تعیین اسیدیته و pH
- ۲-۱۰ استاندارد ملی ایران شماره ۹۴۹: امولسیفایرها و استابیلایزرهای مصرفی در مواد خوراکی
- ۲-۱۱ استاندارد ملی ایران شماره (۱ و ۲)- ۵۴۸۶: روش جداسازی، شناسایی و شمارش کلی فرم ها
- ۲-۱۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱-۱۰۸۹۹: روش جستجو و شمارش قارچها (کپکها و مخمرها) به شمارش پرگنه در ۲۵°C
- ۲-۱۳ استاندارد ملی ایران شماره ۳-۶۸۰۶: روش شناسایی و شمارش استافیلوکوکوس
- ۲-۱۴ استاندارد ملی ایران شماره ۶۹۵: ماست- ویژگی ها و روش های آزمون
- ۲-۱۵ استاندارد ملی ایران شماره ۴۶۹۱: اصول کلی ارزیابی حسی شیر و فرآورده های آن
- ۲-۱۶ استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۱۱: آب آشامیدنی- ویژگی های میکروبیولوژیک
- ۲-۱۷ استاندارد ملی ایران شماره ۵۲۳۴: روش جداسازی، شناسایی و شمارش /شریشیا کلای
- ۲-۱۸ استاندارد ملی ایران شماره ۲۱۳۵: ویژگی های عمومی برچسب بسته بندی در مواد غذایی
- ۲-۱۹ استاندارد ملی ایران شماره ۲۴۰۶: میکروبیولوژی شیر و فرآورده های آن- ویژگی ها
- ۲-۲۰ استاندارد ملی ایران شماره ۴۴۷۰: برچسب گذاری مواد غذایی از پیش بسته بندی شده
- ۲-۲۱ استاندارد ملی ایران شماره ۴۷۱۱: ادعاهای تغذیه ای در برچسب گذاری مواد غذایی
- ۲-۲۲ استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹: آیین کاربرد روش های عمومی میکروبیولوژی
- ۲-۲۳ استاندارد ملی ایران شماره ۱-۸۹۲۳: آماده کردن نمونه های ماده غذایی و شمارش میکروارگانیسم های مختلف
- ۲-۲۴ استاندارد ملی ایران شماره ۱-۸۶۶۳: میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- راهنمای عمومی تضمین کیفیت ساخت محیط های کشت- قسمت اول- راهنمای عمومی تضمین کیفیت برای آماده سازی محیط های کشت در آزمایشگاه
- ۲-۲۵ استاندارد ملی ایران شماره ۲-۸۶۶۳: میکروبیولوژی خوراک انسان و دام- راهنمای آماده سازی و تولید محیط های کشت- قسمت دوم- راهنمای عملی برای آزمون محیط های کشت
- ۲-۲۶ استاندارد ملی ایران شماره ۷۰۴۰: شیر و فرآورده های آن- نمونه گیری بازرسی به روش متغیرها

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد، اصطلاحات و تعاریف زیر به کار می‌رود:

۱-۳

ماست پروبیوتیک ساده

ماست تولیدشده به وسیله میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک با/ بدون استفاده از باکتری‌های سنتی ماست^۱ (استریتوکوکوس ترموفیلوس^۲ و لاکتوباسیلوس دلبروئه‌کی‌یی زیرگونه بولگاریکوس^۳) است که مواد تشکیل‌دهنده و ویژگی‌های آن با مشخصات مندرج در بندهای ۵ و ۶ این استاندارد مطابقت کند.

یادآوری - منظور از واژه «ماست پروبیوتیک» در این استاندارد، «ماست پروبیوتیک ساده» است.

۲-۳

پروبیوتیک‌ها^۴

میکروارگانیسم‌های (باکتری و مخمر) زنده^۵ و فعالی^۶ (زنده-فعال یا فعال-زی)^۷ که با استقرار در بخش‌های مختلف بدن (اساساً روده) به تعداد مناسب، با فعالیت زیستی خود، عمدتاً از طریق حفظ و بهبود توازن فلور میکروبی روده میان میکروارگانیسم‌های سودمند و زیان‌بخش، دربردارنده خواص سلامت‌بخش برای میزبان^۸ هستند.

لازم به اشاره است که واژه «پروبیوتیک» در زبان لاتین به معنای «حیات‌بخش» است و از نظر مفهوم در مقابل واژه «آنتی‌بیوتیک» به معنای «ضدحیات» قرار دارد.

۳-۳

پری‌بیوتیک‌ها^۹

ترکیبات هضم‌ناپذیر^۱ یا هضم‌پذیر اندک در برابر آنزیم‌های گوارشی بدن انسان (اساساً ترکیبات الیگوساکاریدی^۲) هستند که رشد و/یا فعالیت میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک را به طور انتخابی تحریک می‌کنند. از جمله این ترکیبات می‌توان به فروکتوالیگوساکاریدها^۳ (مانند اینولین^۴) اشاره کرد.

-
- 1- Traditional yogurt bacteria
 - 2- *Streptococcus thermophilus*
 - 3- *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*
 - 4- Probiotics
 - 5- Live
 - 6- Active
 - 7- Viable
 - 8- Host
 - 9- Prebiotics

۴-۳

سین بیوتیک‌ها^۵

فرآورده‌هایی که به‌طور توأم دارای پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها هستند. کاربرد توأم دو عامل یادشده با هدف ایجاد هم‌افزایی^۶ در اثرات سلامت‌بخش آن‌ها صورت می‌گیرد.

۵-۳

قابلیت زیستی^۷

درجه زنده و فعال بودن میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در محصول نهایی است. این ویژگی اغلب از راه شمارش تعداد سلول‌های زنده و فعال پروبیوتیک در محیط کشت تعیین می‌شود.

۶-۳

ترکیب کشت^۸

عبارت از نوع و درصد (نسبت) میکروارگانیسم‌های به‌کاررفته در کشت آغازگر^۹ است.

۷-۳

خواص سلامت‌بخش عمومی و اختصاصی^{۱۰} فرآورده‌های پروبیوتیک

مطابق با نظر قریب به اتفاق منابع و مراجع علمی و قانونی، خواص سلامت‌بخش تصریح شده در بند ۱۰-۸ این استاندارد، خواص سلامت‌بخش عمومی دانسته شده‌اند، بدین‌معنا که دارای اثراتی کلی و عمومی بوده و اثرات آن‌ها به اندازه داروها زودپرواز، موثر و مشخص نیست. درمقابل، فرآورده‌های پروبیوتیک با خواص سلامت‌بخش اختصاصی، دارای اثرات درمانی قوی‌تر، زودپروازتر و مشخص‌تر هستند. برای مثال، در حال حاضر، ماست‌های گوناگون به‌منظور درمان عفونت‌های روده‌ای به‌ویژه اسهال و عفونت‌های باکتریایی و مخمری دستگاه تناسلی، مورد تولید و مصرف دارند.

10- indigestible

11- Oligosaccharide

12. Fructooligosaccharides

13. Inulin

۲- Synbiotics

2- Synergy

3- Viability

4- Culture composition

5- Starter culture

6- General- and specific health benefits

۸-۳

شیر ماست‌سازی

شیری که برای تولید ماست به کار می‌رود.

یادآوری - منظور از شیر در این استاندارد، «شیر گاو» است.

۹-۳

ترکیبات ناروان‌ساز^۱

ترکیباتی که سبب افزایش ناروانی^۲ یا گرانروی^۳ سیال می‌شوند.

۱۰-۳

ترکیبات مشابه طبیعی^۴

ترکیبات شیمیایی ساختگی^۵ که فرمول آن‌ها با مواد شیمیایی موجود در طبیعت مطابقت داشته باشد.

۱۱-۳

میکروارگانسیم‌های آغازگر^۶

میکروارگانسیم‌هایی که به صورت انتخابی و هدفمند به محیط‌های پایه غذایی برای شروع فرآیند تخمیر، عموماً پس از از بین بردن میکروارگانسیم‌های ناخواسته بومی^۷، اضافه می‌شوند.

۴ طبقه‌بندی

ماست پروبیوتیک از نظر چربی و ماده خشک، (مطابق با استاندارد ملی ایران: ۶۹۵) به شرح زیر طبقه‌بندی می‌شود:

۱-۴- ماست پروبیوتیک بدون چربی

۲-۴- ماست پروبیوتیک کم‌چرب

۳-۴- ماست پروبیوتیک نیم‌چرب

۴-۴- ماست پروبیوتیک پرچرب

۵-۴- ماست پروبیوتیک خامه‌ای

۱- Thickening agents/thickeners

۲- Thickness

۳- Viscosity

۴- Nature identical

۵- Synthetic

۶- Starter microorganisms

۷- Native/indigenous

- ۴-۶- ماست پروبیوتیک چکیده کم چرب
- ۴-۷- ماست پروبیوتیک چکیده نیم چرب
- ۴-۸- ماست پروبیوتیک چکیده پرچرب
- ۴-۹- ماست پروبیوتیک چکیده خامه‌ای

یادآوری ۲- منظور از واژه "ماست" در بالا، "ماست غیر چکیده" است.

۵ اجزای تشکیل دهنده اصلی

اجزای تشکیل دهنده اصلی ماست پروبیوتیک به شرح زیر هستند:

۵-۱ شیر خام (طبق استاندارد ملی ایران شماره ۱۶۴). شیر مورد استفاده می‌تواند تازه^۱ یا بازساخته^۲ باشد.

یادآوری ۱- شیر ماست‌سازی باید مورد فرآیند گرمایی مناسب و کافی (برای مثال: ۱۵-۱۰ min / ۹۵°C، ۲۰-۱۵ min / ۹۰°C یا ۳۰ min / ۸۵°C؛ بسته به ویژگی‌های شیر و خواص مورد انتظار از محصول نهایی) قرار گیرد.

یادآوری ۲- جایگزین کردن پاره‌ای یا کامل چربی شیر با انواع دیگر چربی با منشا غیرشیری در ماست پروبیوتیک ساده ممنوع است.

۵-۲ میکروارگانسیم/میکروارگانسیم‌های آغازگر یا غیرآغازگر (افزوده شده پس از تخمیر) پروبیوتیک
 ۵-۳ آب آشامیدنی (طبق استانداردهای ملی ایران شماره‌های ۱۰۱۱ و ۱۰۵۳)، در صورت استفاده از شیر بازساخته.

۵-۴ انواع پودر شیر شامل "کامل"^۳، "کم چرب"^۴ و "بدون چربی"^۵ (طبق استاندارد ملی ایران شماره ۲۰۱۲) در صورت استاندارد کردن ماده خشک شیر ماست‌سازی با روش افزودن پودر شیر یا در صورت استفاده از شیر بازساخته.

۵-۵ خامه پاستوریزه یا فرادما (طبق استاندارد ملی ایران شماره ۱۹۱) در صورت استفاده برای استاندارد کردن چربی شیر ماست‌سازی.

یادآوری - جنس‌ها، گونه‌ها و سویه‌های میکروارگانسیم‌های پروبیوتیک مورد استفاده باید به تایید مراجع قانونی و ذی‌صلاح کشور* برسد.

۱- Fresh

۲- Reconstituted

۳- Whole milk powder (WMP)

۴- Partly skimmed milk powder (PSMP)

۵- Skimmed-/skim milk powder (SMP)

۶ اجزای تشکیل دهنده اختیاری

اجزای تشکیل دهنده اختیاری ماست پروبیوتیک به شرح زیر هستند:

- ۱-۶ باکتری‌های آغازگر سنتی ماست شامل /استرپتوکوکوس ترموفیلوس یا لاکتوباسیلوس دلبرونه کی‌یی زیرگونه بولگاریکوس یا هر دو
- ۲-۶ پس آب کره/دوغ کره^۱ یا پودر آن
- ۳-۶ آب پنیر تخمیر شده یا تخمیر نشده و انواع مشتقات آن مانند پودر آب پنیر^۲، تغلیظ شده پروتئین آب پنیر^۳ یا پودر آن و تفکیک شده پروتئین آب پنیر^۴ یا پودر آن
- ۴-۶ انواع مشتقات کازئینی (طبق استاندارد ملی ایران شماره ۴۴۴۸)
- ۵-۶ ترکیب اجزای اشاره شده در بندهای ۲-۵ و ۳-۵
- ۶-۶ روغن کره^۵ و چربی شیر بدون آب^۶
- ۷-۶ مواد افزودنی غیرشیری از جمله شامل ترکیبات قوام‌دهنده بافت^۷ یا ناروان‌ساز^۸، ترکیبات ضدسرمدهی/ضدآب‌اندازی (مطابق با بند ۶-۲-۵ این استاندارد) و ترکیبات پری‌بیوتیک.

یادآوری ۱- کاربرد هر نوع ماده افزودنی غیرشیری از نظر نوع و غلظت باید به تأیید مراجع قانونی و ذی‌صلاح کشور برسد.

یادآوری ۲- استفاده از مواد قوام‌دهنده بافت/ ناروان‌ساز و ترکیبات ضدسرمدهی با منشا غیرشیری فقط در ماست‌های پروبیوتیک بدون چربی و کم‌چرب (بند ۷-۲-۱) مجاز است.

۷ ویژگی‌ها

۱-۷ ویژگی‌های حسی

ویژگی‌های ارزیابی حسی ماست پروبیوتیک باید مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۶۹۵ باشد.

* منظور از مراجع قانونی و ذی‌صلاح کشور، در حال حاضر، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی است.

- ۱- Butter milk
- ۲- Whey powder
- ۳- Whey protein concentrate
- ۴- Whey protein isolate
- ۵- Butter fat/butter oil
- ۶- Anhydrous milk fat
- ۷- Texture stabilizers
- ۸- Thickeners/thickening agents

۲-۷ ویژگی های شیمیایی

ویژگی های شیمیایی ماست پروبیوتیک باید به شرح زیر باشد:

۲-۷-۱ بر اساس مقدار چربی، ویژگی های انواع ماست پروبیوتیک به شرح جدول ۱ است.

جدول ۱- انواع ماست پروبیوتیک از نظر مقدار چربی

نوع ماست	حدود مقدار چربی
ماست پروبیوتیک بدون چربی	< ۰٫۵٪
ماست پروبیوتیک کم چرب	< ۱٫۵٪ تا ≥ ۰٫۵٪
ماست پروبیوتیک میان چرب	< ۳٫۰٪ تا ≥ ۱٫۵٪
ماست پروبیوتیک پر چرب	< ۶٫۰٪ تا ≥ ۳٫۰٪
ماست پروبیوتیک خامه ای	≥ ۶٫۰٪
ماست پروبیوتیک چکیده بدون چربی	< ۰٫۵٪
ماست پروبیوتیک چکیده کم چرب	< ۱٫۵٪ تا ≥ ۰٫۵٪
ماست پروبیوتیک چکیده میان چرب	< ۳٫۵٪ تا ≥ ۱٫۵٪
ماست پروبیوتیک چکیده پر چرب	< ۷٫۰٪ تا ≥ ۳٫۵٪
ماست پروبیوتیک چکیده خامه ای	≥ ۷٫۰٪

۲-۲-۷ بر اساس مواد جامد بدون چربی شیری (MSNF)^۱ (وزنی/وزنی، بر پایه مرطوب)، ویژگی های انواع ماست پروبیوتیک با درصد چربی مشخص به شرح جدول ۲ است.

یادآوری - منظور از واژه "ماست" بدون پسوند "چکیده" در بالا، "ماست غیر چکیده" است.

۲-۲-۷ pH دوغ نباید از ۴٫۵ بیشتر باشد.

۲-۲-۴ مقدار اسیدیته قابل سنجش ماست نباید از ۰٫۷٪ (بر حسب درصد وزنی/وزنی اسید لاکتیک) کمتر باشد.

۲-۲-۵ ترکیبات قوام دهنده بافت یا ناروان سازها و ترکیبات ضد سرم دهی مورد استفاده در ماست باید از نوع طبیعی یا مشابه طبیعی^۲ بوده و کاربرد آنها مطابق با یادآوری های ۱ و ۲ در بند ۵ این استاندارد صورت گیرد. کاربرد این ترکیبات حداکثر به میزان ۱٪ (وزنی/وزنی، بر پایه مرطوب) مجاز است.

^۱- Milk solid nonfat

^۲- Nature identical

جدول ۲- انواع ماست پروبیوتیک از نظر درصد ماده خشک بدون چربی شیری

نوع ماست	حدود مقدار ماده خشک بدون چربی شیری
ماست پروبیوتیک بدون چربی	$\geq 10.5\%$
ماست پروبیوتیک کم چرب	$\geq 9.5\%$
ماست پروبیوتیک میان چرب	$\geq 9.0\%$
ماست پروبیوتیک پر چرب	$\geq 8.5\%$
ماست پروبیوتیک خامه‌ای	$\geq 8.5\%$
ماست پروبیوتیک چکیده بدون چربی	$\geq 15\%$
ماست پروبیوتیک چکیده کم چرب	$\geq 14.0\%$
ماست پروبیوتیک چکیده میان چرب	$\geq 13.0\%$
ماست پروبیوتیک چکیده پر چرب	$\geq 12.0\%$
ماست پروبیوتیک چکیده خامه‌ای	$\geq 12.0\%$

۶-۲-۷ غلظت انواع آلاینده‌ها (همچون شیمیایی، میکوتوکسین‌ها، آفت‌کش‌ها، پادزیست‌ها، فلزات سنگین، هورمون‌ها و باقی‌مانده مواد شست‌وشودهنده و سترون‌کننده) در دوغ پروبیوتیک باید مطابق با حدود مجاز اعلام‌شده از سوی مراجع قانونی و ذی‌صلاح کشور* باشد.

۳-۷ ویژگی‌های میکروبیولوژیک

قابلیت زیستی (شمارش زنده)^۱ هر یک از سویه‌های پروبیوتیک به‌کاررفته در ماست پروبیوتیک تا پایان تاریخ انقضای مصرف نباید از 10^6 cfu/g کمتر باشد.

ویژگی‌های شمارش آلودگی میکروبی ماست پروبیوتیک باید مطابق با جدول ۳ باشد.

جدول ۳- ویژگی‌های شمارش آلودگی میکروبی در ماست پروبیوتیک

نوع میکروارگانیزم‌ها	مقدار/حدود قابل قبول
کلی‌فرم‌ها	حداکثر: 10 cfu/g
اشریشیا کلای	منفی در هر گرم
کپک و مخمر	حداکثر: 100 cfu/g
استافیلوکوکوس‌های کواگلاز مثبت	منفی در هر گرم

1. Viable count

*منظور از مراجع قانونی و ذی‌صلاح کشور، در حال حاضر، وزارت بهداشت، در مان و آموزش پزشکی است.

۸ نمونه برداری

نمونه برداری از ماست باید طبق استانداردهای ملی ایران شماره‌های ۳۲۶، ۷۰۳۹ و ۷۰۴۰ انجام شود.

۹ روش‌های آزمون

روش‌های آزمون ویژگی‌های ماست پروبیوتیک باید به شرح زیر باشد:

۹-۱ ویژگی‌های میکروبیولوژیک

قابلیت زیستی (شمارش زنده) هر یک از میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک به کاررفته در ماست پروبیوتیک باید مطابق با روش‌های قیدشده در پیوست الزامی الف باشد. تولید ماست پروبیوتیک با ترکیب کشت‌هایی به جز آنچه روش‌های تعیین شمارش زنده آن‌ها در پیوست الزامی الف اشاره شده است، باید با اخذ مجوز از مراجع قانونی و ذی‌صلاح کشور*^۱ باشد. روش‌های آزمون ویژگی‌های آلودگی میکروبی ماست پروبیوتیک باید مطابق با روش‌های قیدشده در استاندارد ملی ایران شماره ۶۹۵ (جدول شماره ۲) باشد.

۹-۲ ویژگی‌های شیمیایی

روش‌های آزمون شیمیایی ماست پروبیوتیک باید مطابق با روش‌های قیدشده در استاندارد ملی ایران شماره ۶۹۵ (جدول شماره ۲) باشد.

۹-۳ ارزیابی حسی

ارزیابی حسی ماست پروبیوتیک باید مطابق با روش قید شده در استاندارد ملی ایران شماره ۶۹۵ صورت گیرد.

۱۰ بسته‌بندی

بسته‌بندی ماست پروبیوتیک باید دارای ویژگی‌های کیفی زیر باشد:

* منظور از مراجع قانونی و ذی‌صلاح کشور، در حال حاضر، وزارت بهداشت، در مان و آموزش پزشکی است.

۱-۱۰ مواد به کارفته در ظروف بسته‌بندی ماست پروبیوتیک باید از نظر آلاینده‌های شیمیایی، ویژگی‌های میکروبیولوژیک و محیط‌زیستی باید از ضوابط مراجع قانونی و ذی‌صلاح کشور* پیروی کند.

۲-۱۰ بسته‌بندی ماست پروبیوتیک از نظر کارآیی باید دارای ویژگی‌های زیر باشد: مقاوم به اسیدهای آلی و pH پایین، درزبندی^۱ غیرقابل نفوذ به عوامل خارجی و غیرقابل نشت (تراوش)^۲ در برابر محتوای بسته، نفوذپذیری (تراوایی) تا اندازه ممکن اندک به اکسیژن (به ویژه در ماست‌های با چربی بالا) و بخار آب، نفوذپذیری اندک به نور (به ویژه در ماست‌های با چربی بالا)، استحکام مکانیکی کافی و آسان-مصرف.

۳-۱۰ ماست پروبیوتیک باید در ظرف یک‌بارمصرف بازگشت‌ناپذیر^۳ به کارخانه بسته‌بندی شود.

۴-۱۰ دربندی ماست پروبیوتیک تا پیش از مصرف باید غیرقابل تصرف (پلمپ‌شده) باشد.

۵-۱۰ حجم مجاز بسته‌بندی ماست پروبیوتیک حداکثر ۳۰۰۰ g است. بسته‌بندی در اوزان بزرگتر باید با اخذ مجوز از مراجع قانونی و ذی‌صلاح کشور انجام پذیرد.

یادآوری ۱- ظروف مورد استفاده برای مراکز عمده مصرف (ظروف فله) و به ویژه مراکز درمانی کشور باید به تائید مراجع قانونی و ذی‌صلاح کشور* برسد. همچنین غیرقابل تصرف (پلمپ‌شده) بوده و از ویژگی‌های نشانه‌گذاری مطابق با بند ۱۰ برخوردار باشد.

یادآوری ۲- جنس مواد بسته‌بندی مورد استفاده باید به تائید مراجع قانونی و ذی‌صلاح کشور* برسد.

۱۱ نشانه‌گذاری

آگاهی‌های زیر باید روی هر ظرف به طور واضح و خوانا، برای مصارف داخلی به زبان فارسی و برای صادرات به زبان انگلیسی یا به زبان کشور خریدار، با استفاده از جوهر غیرسمی و پاک‌نشدنی نوشته، چاپ یا برجسب شود:

۱-۱۱ نام و نوع فرآورده (برای مثال، «ماست پروبیوتیک کم‌چرب» یا «ماست پروبیوتیک چکیده کم‌چرب»).

یادآوری ۱- ذکر عبارات «با خواص سلامت‌بخش عمومی» یا «با خواص سلامت‌بخش اختصاصی» مطابق با توضیحات بند ۴-۱۱، ضروری است.

منظور از مراجع قانونی و ذی‌صلاح کشور، در حال حاضر، وزارت بهداشت، در مان و آموزش پزشکی است.

- 1- Sealing
- 2- Leak/leakage
- 3- Non-reusable

۱۱-۲ نام و نشانی تولیدکننده و علامت تجاری آن

۱۱-۳ مواد تشکیل‌دهنده (مطابق با بندهای ۶ و ۷ این استاندارد)

۱۱-۳-۱ نوع میکروارگانسیم‌های مورد استفاده (ضرورتاً، جنس و گونه)، از جمله میکروارگانسیم‌های پروبیوتیک، باید مورد اشاره قرار گیرد. در صورت استفاده از باکتری‌های سنتی ماست، ذکر عبارت «باکتری‌های سنتی ماست» و در صورت استفاده از یکی از آنها، ذکر نام آن در ترکیب کشت میکروبی ضروری است. نام میکروارگانسیم‌های مورد استفاده در خصوص ماست‌های پروبیوتیک تولیدشده برای مصرف داخلی باید به زبان فارسی نوشته شود.

۱۱-۳-۲ در صورت تولید ماست پروبیوتیک با خواص سلامت‌بخش اختصاصی، علاوه بر جنس و گونه، ذکر سویه‌های پروبیوتیک نیز ضروری است.

۱۱-۳-۳ تولیدکننده می‌تواند کمینه قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها را با ذکر عبارت «حداقل تعداد سلول‌های زنده و فعال پروبیوتیک در هر گرم (یا در هر میلی‌لیتر) از ماست = 10^6 » مشخص کند. این حد شمارش باید تا پایان اتمام تاریخ انقضای مصرف حفظ شود.

۱۱-۳-۴ تولیدکننده می‌تواند مقدار مصرف توصیه‌شده ماست پروبیوتیک برای برخورداری از خواص سلامت‌بخش ادعا شده را به صورت گرم/ میلی‌لیتر در روز/ هفته ذکر کند.

۱۱-۳-۵ چنانچه مصرف ماست پروبیوتیک به اندازه‌ای مشخص ممکن است در بر دارنده اثرات احتمالی مضر برای قشر خاصی از مصرف‌کنندگان باشد، ذکر عبارت هشداردهنده مناسب ضروری است. این اثرات باید به وسیله مراجع قانونی و ذی‌صلاح کشور^۱ تایید شده باشند.

۱۱-۳-۶ در صورت استفاده از ترکیبات پری‌بیوتیک در فرمول ماست پروبیوتیک، ذکر عبارت «حاوی ترکیبات پری‌بیوتیک» روی برچسب بلامانع است.

۱۱-۳-۷ ذکر درصد ماده خشک بدون چربی و درصد چربی ماست پروبیوتیک روی برچسب ضروری است.

۱۱-۳-۸ ذکر عبارات «ترکیب (های) مجاز ضدسرم‌دهی» و/ یا «ترکیب (های) مجاز قوام‌دهنده/ ناروان ساز» در صورت استفاده از هر یک از آنها در ترکیب تشکیل دهنده، الزامی است.

یادآوری ۲- ذکر عبارت کلی «افزودنی‌های مجاز» یا «افزودنی‌های مجاز خوراکی» بدون تصریح نوع ترکیب ممنوع است.

۱۱-۴ ادعا/ ادعاهای سلامت‌بخش^۲ عمومی با ذکر عینی کلیشه- عبارت زیر:

«خواص سلامت‌بخش عمومی: بهبود سلامت و کارایی سیستم گوارشی، تنظیم و تقویت سیستم ایمنی، کاهش کلسترول، کاهش عوارض عدم تحمل لاکتوز، افزایش ارزش تغذیه‌ای غذا»

* منظور از مراجع قانونی و ذی‌صلاح کشور، در حال حاضر، وزارت بهداشت، در مان و آموزش پزشکی است.

۱۱-۴-۱ (مهم) - ارائه هرگونه ادعای سلامت‌بخش دیگر به جز عناوین قیدشده در بند ۱۰-۸ این استاندارد، فرآورده پروبیوتیک را مشمول خواص سلامت‌بخش اختصاصی می‌کند و بدون کسب مجوز از مراجع قانونی و ذی صلاح کشور*^۱ ممنوع است.

۱۱-۴-۲ (مهم) - در صورتیکه چربی ماست پروبیوتیک بیشتر از ۱۰٪ باشد، استفاده از عنوان «کاهش کلسترول» در ارتباط با خواص سلامت‌بخش عمومی (بند ۱۱-۸ این استاندارد) مجاز نیست.

۱۱-۵ نشانی تماس و ارتباط با تولیدکننده

۱۱-۶ وزن خالص بر حسب سیستم متریک همراه با حد رواداری^۲

۱۱-۷ شماره پروانه ساخت از وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی

۱۱-۸ شماره سری ساخت

۱۱-۹ تاریخ تولید به «روز و ماه و سال»

۱۱-۱۰ تاریخ انقضای قابلیت مصرف (بیشینه ماندگاری) به «روز و ماه و سال»

۱۱-۱۱ عبارت «در یخچال نگهداری شود»

۱۱-۱۲ عبارت «ساخت ایران»

* منظور از مراجع قانونی و ذی صلاح کشور، در حال حاضر، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی است.

پیوست الف (الزامی)

تعیین شمارش زنده باکتری‌های پروبیوتیک

کشت‌های پروبیوتیک در فرآورده‌های غذایی ممکن است از نوع کشت منفرد^۱ (حاوی یک نوع گونه پروبیوتیک) یا کشت مخلوط^۲ (حاوی دست‌کم دو گونه پروبیوتیک) باشند. این کشت‌ها همچنین ممکن است دارای یک یا هر دو گونه باکتری‌های سنتی ماست (بند ۶) باشند. وجود هر دو باکتری سنتی ماست در ترکیب کشت، با نشانه «Y» مشخص می‌شود. برای نشان دادن وجود استرپتوکوکوس ترموفیلوس یا لاکتوباسیلوس دلبرونه‌کی‌یی زیرگونه بولگاریکوس در ترکیب کشت به تنهایی، به ترتیب از نشانه‌های «T» و «b» استفاده می‌شود. نشانه‌های مربوط به باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس کازیبی و انواع گونه‌های بیفیدوباکتریوم به ترتیب «A»، «C» و «B» هستند. برای مثال، نشانه «ABY» بر وجود همزمان باکتری‌های ل. اسیدوفیلوس، بیفیدوباکتریوم و باکتری‌های سنتی ماست و نشانه «ABCT» بر وجود همزمان باکتری‌های ل. اسیدوفیلوس، بیفیدوباکتریوم، ل. کازیبی و استرپتوکوکوس ترموفیلوس در ترکیب کشت دلالت دارد. در زیر، محیط‌های کشت و روش‌های شمارش برخی از مهمترین ترکیبات کشت پروبیوتیک در فرآورده‌های لبنی مورد اشاره قرار گرفته‌است:

الف-۱ کشت گونه منفرد (تک-گونه) پروبیوتیک بدون حضور/در حضور باکتری‌های سنتی ماست

برای شمارش فقط یک گونه پروبیوتیک، از محیط کشت MRS-آگار^۳ استفاده می‌شود. کلنی‌های رشد کرده نمایانگر گونه مورد نظر هستند.

در تهیه محیط کشت MRS-آگار، از اطلاعات قیدشده روی برچسب بسته بندی محیط کشت (از نظر مقدار پودر وزن شده محیط کشت و شرایط اتوکلاو کردن) و استانداردهای ملی ایران شماره‌های ۱-۸۶۶۳ و ۲-۸۶۶۳ استفاده کنید.

شیوه کشت‌دادن، پلیت-ریز^۴ و شرایط گرمخانه‌گذاری، بی‌هوازی برای بیفیدوباکتریوم‌ها و بی‌هوازی یا هوازی برای لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیک و دمای ۳۷ درجه سلیسیوس به مدت‌زمان دست‌کم ۷۲ ساعت است.

-
1. Single culture
 2. Mixed culture
 3. De Man Rogosa and Sharpe agar
 4. Pour plate

یادآوری ۱- به طور کلی، توصیه بر آن است که ریخت شناسی^۱ کلنی‌های مربوط به هر سویه پروبیوتیک از راه آزمون میکروسکوپی^۲ مورد شناسایی و صحه گذاری قرار گیرد.

یادآوری ۲- در تهیه محیط کشت MRS- آگار از اطلاعات قیدشده روی برچسب بسته‌بندی محیط کشت و استانداردهای ملی ایران شماره های ۱-۸۶۶۳ و ۲-۸۶۶۳ استفاده کنید.

برای شمارش یک گونه پروبیوتیک در حضور باکتری(های) سنتی ماست، از محیط کشت MRS- بایل- آگار^۳ استفاده می‌شود. بایل (صفر) از رشد باکتری‌های سنتی ماست جلوگیری کرده و کلنی‌های رشد یافته نمایانگر گونه موردنظر هستند.

برای تهیه محیط کشت MRS- بایل آگار، بایل (Sigma-Bovin, Oxgall) به مقدار ۰٫۱۵٪ (W/V)، پیش از اتوکلاو کردن، به محیط کشت MRS- آگار اضافه می‌شود و مطابق با شرایط محیط کشت یادشده (درج شده در برچسب محیط کشت) مورد اتوکلاو کردن قرار می‌گیرد. شیوه کشت دادن و شرایط گرمخانه‌گذاری این محیط مشابه محیط MRS - آگار است.

الف- ۲ کشت لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازویی به طور مخلوط، بدون حضور/در حضور باکتری‌های سنتی ماست

ل. /اسیدوفیلوس در محیط کشت MRS- آگار ایجاد کلنی‌هایی با ظاهر و قوام خامه‌ای^۴ می‌کند. در شرایط هوایی، این باکتری دو نوع کلنی پدید می‌آورد (شکل ۱). نوع نخست شامل کلنی‌های گرد و نسبتاً بزرگ (در محدوده قطر تقریبی ۲ میلی‌متر تا ۳٫۲ میلی‌متر) با ناحیه پیرامونی هاله- مانند (شبیه به شکل هاله نوری اطراف خورشید) است. کلنی‌های نوع دوم کوچکتر (۲٫۴ میلی‌متر تا ۰٫۵ میلی‌متر) و با اشکال نامنظم هستند (شکل ۱).

در شرایط بی‌هوازی، ل. /اسیدوفیلوس دو نوع کلنی ایجاد می‌کند (شکل ۲). کلنی‌های نوع نخست با دارا بودن ویژگی گرد و نسبتاً بزرگ (۱٫۸ میلی‌متر تا ۱ میلی‌متر) با هاله پیرامونی بوتِه- خار- مانند مشخص می‌شوند. کلنی‌های نوع دوم نسبتاً کوچک (۰٫۷۵ میلی‌متر تا ۰٫۴۵ میلی‌متر) و به شکل خارپشت- مانند هستند. ضمایم خار- مانند ممکن است در سرتاسر محیط پراکنده شده باشند (شکل ۲). ل. کازویی در محیط کشت MRS- آگار کلنی‌های سفید، گرد (یا بیضوی در شرایط زاویه دید مایل) و خامه‌ای با اطراف هموار (مشابه دانه‌های عدس) ایجاد می‌کند. محدوده قطر آن‌ها از ۰٫۵ میلی‌متر تا ۳ میلی‌متر متغیر است. برخی از کلنی‌ها دارای حلقه شفاف محیطی به صورت کامل یا جزئی هستند (شکل ۳). گرد بودن و هموار بودن اطراف آن‌ها بارزترین ویژگی افتراق کلنی‌های این باکتری در محیط

1. Morphology
2. Microscopy
3. MRS-bile agar
4. Creamy

کشت MRS- آگار از باکتری *L. اسیدوفیلوس* است. برخی کلنی‌ها ممکن است به صورت هم- آمیخته^۱ دیده شوند (شکل ۳).

شمارش افتراقی^۲ کشت ترکیبی *L. اسیدوفیلوس* و *L. کازی*، مطابق با توضیحات بالا در ارتباط با شکل کلنی‌ها، با استفاده از محیط کشت MRS- آگار، در شرایط بی‌هوازی یا هوازی صورت می‌گیرد. شرایط بی‌هوازی، افتراق پذیری بهتری ایجاد می‌شود. در حضور باکتری‌های سنتی ماست، از محیط کشت MRS- بایل- آگار استفاده می‌شود.

تهیه محیط‌های کشت یادشده و شرایط گرمخانه‌گذاری مطابق با توضیحات بند الف-۱ صورت می‌گیرد.

الف-۳ کشت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس یا لاکتوباسیلوس کازی، در حضور یکی از گونه‌های بیفیدوباکتریوم، بدون حضور/در حضور باکتری‌های سنتی ماست

بیفیدوباکتریوم‌ها در شرایط هوازی قادر به رشد نیستند. شکل کلنی‌های آن‌ها (به‌ویژه، بیفیدوباکتریوم *انیمالیس* زیرگونه لاکتیس) در شرایط بی‌هوازی همانند کلنی‌های *L. اسیدوفیلوس* در همین شرایط (بند الف-۳) بوده و از آن‌ها قابل تفکیک نیست (شکل ۲).

شمارش انتخابی^۳ باکتری *L. کازی* در کشت مخلوط بیفیدوباکتریوم (یکی از گونه‌ها) و *L. کازی*، با استفاده از محیط کشت MRS- آگار، در شرایط هوازی صورت می‌گیرد. در شرایط بی‌هوازی، کلنی‌های بیفیدوباکتریوم، با توجه به ویژگی‌های مربوط (شکل ۲)، شمارش می‌شوند. یادآوری می‌شود که شکل کلنی‌های بیفیدوباکتریوم در شرایط بی‌هوازی همانند کلنی‌های *L. اسیدوفیلوس* در همین شرایط است (بند الف-۳). در حضور باکتری‌های سنتی ماست، از محیط کشت MRS- بایل- آگار استفاده می‌شود.

تهیه محیط‌های کشت یادشده و شرایط گرمخانه‌گذاری مطابق با توضیحات بند الف-۱ صورت می‌گیرد. شمارش انتخابی باکتری‌های *L. اسیدوفیلوس* در کشت مخلوط بیفیدوباکتریوم (یکی از گونه‌ها) و *L. اسیدوفیلوس*، با استفاده از محیط کشت MRS- آگار، در شرایط هوازی صورت می‌گیرد (بیفیدوباکتریوم‌ها در شرایط هوازی قادر به رشد نیستند). در حضور باکتری‌های سنتی ماست، از محیط کشت MRS- بایل- آگار استفاده می‌شود.

تهیه محیط‌های کشت یادشده و شرایط گرمخانه‌گذاری مطابق با توضیحات بند الف-۱ صورت می‌گیرد. شمارش انتخابی گونه‌های بیفیدوباکتریوم در کشت مخلوط بیفیدوباکتریوم (یکی از گونه‌ها) و *L. اسیدوفیلوس*، با استفاده از محیط کشت MRS- آگار حاوی افزودنی‌های محلول آبگوشت سیستمین هیدروکلرید^۴ (۵ میلی لیتر بر لیتر محیط کشت) و محلول آبگوشت میوپیروسین^۵ (۲٫۵ میلی لیتر بر لیتر

1. Coalesced
2. Differential
3. Selective
4. Cystein hydrochloride
5. Mupirocin

محیط کشت) انجام می‌شود. میوپیروسین از رشد اغلب باکتری‌های اسید لاکتیک (از جمله *L. اسیدوفیلوس* و باکتری‌های سنتی ماست) جلوگیری می‌کند. شیوه کشت دادن، پلیت-ریز و شرایط گرمخانه‌گذاری، بی‌هوازی و دمای ۳۷ درجه سلیسیوس به مدت زمان دست‌کم ۷۲ ساعت است. محلول آب‌گوشت سیستئین هیدروکلورید شامل ۱۰ گرم سیستئین هیدروکلورید (Merck No 2839) و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و محلول آب‌گوشت میوپیروسین شامل ۱۰۰ میلی‌گرم لیتیوم-میوپیروسین^۱ و ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر است.

یادآوری ۱- محلول آب‌گوشت سیستئین هیدروکلورید باید اتوکلاو شده و محلول آب‌گوشت میوپیروسین از راه فیلتر کردن (فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر) استریل شود.

یادآوری ۲- محلول آب‌گوشت سیستئین هیدروکلورید باید در دمای اتاق نگهداری شود و به مدت دو ماه به شرط ایجادنشدن رسوب قابل نگهداری است. در صورتی که محلول آب‌گوشت میوپیروسین بلافاصله به مصرف نمی‌رسد، باید در سرما-لوله‌های استریل کوچک^۲ در دمای ۲۰- درجه سلیسیوس نگهداری شود.

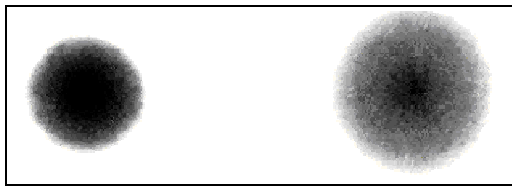
یادآوری ۳- وقتی محلول‌های آب‌گوشت سیستئین هیدروکلورید و آب‌گوشت میوپیروسین به محیط کشت آگار اضافه می‌شوند، محیط مخلوط باید بلافاصله به مصرف برسد.

-
1. Li-Mupirocin
 2. Small sterile cryotubes

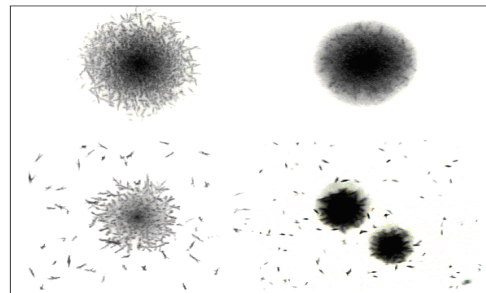
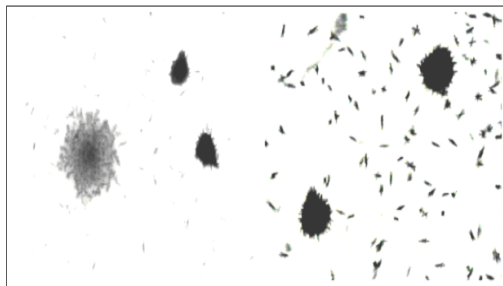
جدول الف-۱- محیط کشت‌ها و شرایط گرمخانه‌گذاری سلول‌های زنده برخی از مهمترین ترکیبات کشت پروبیوتیک

شرایط گرمخانه‌گذاری	محیط کشت مورد استفاده	نوع ترکیب کشت
هوازی یا بی‌هوازی/۳۷°C/۷۲ h	MRS-A	A
هوازی یا بی‌هوازی/۳۷°C/۷۲ h	MRS-A	C
بی‌هوازی/۳۷°C/۷۲ h	MRS-A	B
هوازی یا بی‌هوازی/۳۷°C/۷۲ h	MRS-BA	AY
هوازی یا بی‌هوازی/۳۷°C/۷۲ h	MRS-BA	CY
بی‌هوازی/۳۷°C/۷۲ h	MRS-BA	BY
هوازی یا بی‌هوازی/۳۷°C/۷۲ h	MRS-BA	AT
هوازی یا بی‌هوازی/۳۷°C/۷۲ h	MRS-BA	CT
بی‌هوازی/۳۷°C/۷۲ h	MRS-BA	BT
هوازی و بی‌هوازی/۳۷°C/۷۲ h	MRS-A و MRS-C/M-A	AB
بی‌هوازی (ترجیحا) یا هوازی/۳۷°C/۷۲ h	MRS-A	AC
هوازی و بی‌هوازی/۳۷°C/۷۲ h	MRS-A	BC
هوازی و بی‌هوازی/۳۷°C/۷۲ h	MRS-BA و MRS-C/M-A	ABY
بی‌هوازی (ترجیحا) یا هوازی/۳۷°C/۷۲ h	MRS-BA	ACY
هوازی و بی‌هوازی/۳۷°C/۷۲ h	MRS-BA	BCY
هوازی و بی‌هوازی/۳۷°C/۷۲ h	MRS-BA و MRS-C/M-A	ABT
بی‌هوازی (ترجیحا) یا هوازی/۳۷°C/۷۲ h	MRS-BA	ACT
هوازی و بی‌هوازی/۳۷°C/۷۲ h	MRS-BA	BCT
هوازی و بی‌هوازی/۳۷°C/۷۲ h	MRS-A و MRS-C/M-A	ABC
هوازی و بی‌هوازی/۳۷°C/۷۲ h	MRS-BA و MRS-C/M-A	ABCY
هوازی و بی‌هوازی/۳۷°C/۷۲ h	MRS-BA و MRS-C/M-A	ABCT

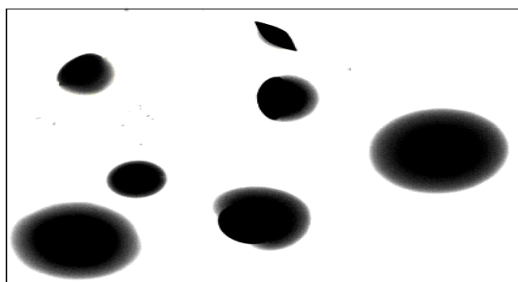
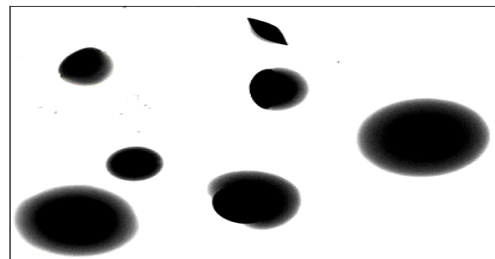
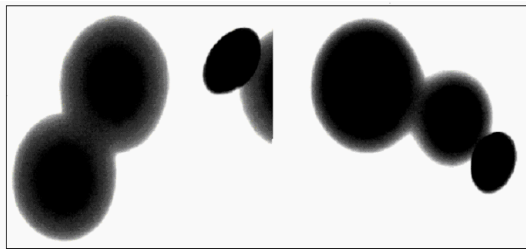
* A = ل. اسیدوفیلوس؛ B = بیفیدوباکتریوم‌ها؛ C = ل. کازی؛ Y = باکتری های سنتی ماست؛ T = ل. ترموفیلوس؛
MRS = MRS-A - آگار؛ MRS = MRS-BA - بایل - آگار؛ MRS = MRS-C/M-A - سیستین هیدروکلورید/ میوپروسین - آگار.



شکل ۱ - شکل کلنی‌های *ل. اسیدوفیلوس* در شرایط هوازی. کلنی‌های نوع اول (سمت چپ)؛ کلنی‌هایی نوع دوم (سمت راست).



شکل ۲ - شکل کلنی‌های *ل. اسیدوفیلوس* یا *بیفیدوباکتریوم* در شرایط بی‌هوازی.



شکل ۳ - شکل کلنی‌های *ل. کازی* در شرایط هوازی یا بی‌هوازی.