

مقایسه اثر مصرف نوعی ماست پروبیوتیک و ماست معمولی بر سطح کلسترول سرم افراد مبتلا به هیپرکلسترولمی خفیف تا متوسط

عسل عطایی جعفری^۱، فریده طاهباز^۲، حمید علوی مجد^۳، حسن جودکی^۴

چکیده

مقدمه: بیماری‌های قلبی عروقی، مهمترین عامل مرگ و میر در کشور هستند و هیپرکلسترولمی از عوامل خطر اصلی این بیماری‌ها محسوب می‌شود. تا حدس می‌توان این مشکل را با تغییراتی در برنامه غذایی و از جمله مصرف فرآورده های لبنی تخمیری و پروبیوتیک‌ها، کاهش داد. این تحقیق به منظور مقایسه اثر مصرف ماست معمولی و نوعی ماست پروبیوتیک بر سطح کلسترول سرم افراد مبتلا به هیپرکلسترولمی خفیف تا متوسط انجام شد.

روش‌ها: مطالعه به روش کارآزمایی بالینی متقاطع تصادفی بر روی ۱۴ فرد ۶۵-۴۰ سال با سطح کلسترول سرم ۳۰۰-۲۰۰ mg/dl انجام شد. از این افراد خواسته شد به مدت ۲ هفته، از ماست و دوغ استفاده نکنند و روزانه ۳۰۰ گرم شیر به رژیم خود اضافه کنند. پس از آن، بطور تصادفی به دو گروه برای دریافت روزانه ۳۰۰ گرم ماست معمولی (تخمیر شده توسط باکتری‌های استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس) یا ماست پروبیوتیک (دارای دو باکتری موجود در ماست معمولی، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس) بصورت جایگزین شیر اضافه شده به رژیم، تقسیم شدند. ۶ هفته پس از مصرف این دو نوع ماست، دوره استراحت به مدت ۷ هفته برقرار شد و سپس گروه‌ها با هم جابجا شدند و مطالعه، ۶ هفته دیگر ادامه یافت. در شروع (پس از پایان ۲ هفته عدم مصرف ماست) و پایان هر مرحله از مطالعه، اندازه گیری های تن سنجی، یاد آمد غذایی ۳ روزه و اندازه گیری سطح چربی های خون انجام شد.

یافته‌ها: مقایسه وزن، BMI و عوامل مداخله گر رژیمی در طول دو دوره مصرف ماست معمولی و ماست پروبیوتیک، تفاوت معنی داری را نشان نداد. مصرف ماست پروبیوتیک در مقایسه با ماست معمولی، موجب کاهش معنی داری در سطح کلسترول تام سرم گردید ($P=0/049$). مقایسه سایر شاخص های چربی خون، تفاوت معنی داری را بین این دو دوره نشان نداد.

نتیجه گیری: مصرف ماست حاوی دو باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس در مقایسه با ماست معمولی، موجب کاهش سطح کلسترول تام در افراد مبتلا به هیپرکلسترولمی خفیف تا متوسط می‌شود.

واژگان کلیدی: ماست، پروبیوتیک‌ها، لاکتوباسیلوس، بیفیدوباکتر، چربی های خون

۱- مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- گروه تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۳- گروه آمار، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۴- آزمایشگاه تحقیق و توسعه، شرکت سهامی صنایع شیر ایران (پگاه)

***نشانی:** خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم؛ تلفن: ۳-۸۸۰۲۶۹۰۲

نمبر: ۸۸۰۲۹۳۹۹؛ پست الکترونیک: emrc@sina.tums.ac.ir

مقدمه

بیماری‌های قلبی عروقی مهمترین عامل مرگ در بسیاری از کشورهای دنیا [۱] و همچنین در ایران هستند، به طوری که طبق آمار موجود، حدود ۴۰ درصد از مرگ و میرها در کشور را به خود اختصاص داده‌اند [۲]. یکی از مهمترین عوامل خطر این بیماری‌ها، هیپرکلسترولمی است [۳]. طبق بررسی‌های انجام شده در ایران، شیوع هیپرکلسترولمی در افراد بالاتر از ۱۵ سال، ۱۱/۱٪ گزارش شده است [۴]. از آنجا که هر ۱٪ کاهش غلظت کلسترول سرم موجب ۳-۲٪ کاهش خطر بیماری‌های کرونر قلبی می‌شود [۵]، بنابراین کاهش کلسترول خون یکی از راه‌هایی است که به کمک آن می‌توان تا حد زیادی از میزان مرگ و میر ناشی از این بیماری در کشور کاست.

امروزه رژیم‌های درمانی و یا مداخله غذایی به عنوان اولین راه برای کاهش سطح کلسترول خون توصیه شده‌اند و در مواردی که این امر مفید واقع نشود، از داروهای کاهنده کلسترول استفاده می‌شود [۵]. برخی انواع میکروارگانیزم‌ها به نام پروبیوتیک‌ها در غذا به عنوان جزئی از رژیم محسوب می‌شوند که می‌توانند اثرات سودمندی بر سلامت داشته باشند. پروبیوتیک به مکمل میکروبی زنده موجود در غذا گفته می‌شود که از طریق ایجاد تعادل میکروبی در روده، اثرات مفیدی بر میزبان خود اعمال می‌نماید [۶].

باکتری‌های مولد اسید لاکتیک، به ویژه لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم، به طور عادی جزئی از اکوسیستم پیچیده دستگاه گوارش را تشکیل می‌دهند که بدلیل اثرات مفید آنها بر سلامت، به عنوان پروبیوتیک مطرح می‌باشند [۷]. کاهش کلسترول خون یکی از فوایدی است که به این باکتریها نسبت داده می‌شود.

Mann و Sporry، اولین کسانی بودند که نشان دادند مصرف شیر تخمیر شده می‌تواند موجب کاهش غلظت کلسترول سرم (در قبیله آفریقایی Massai) شود [۸]. از آن زمان مطالعات بسیاری به منظور شناخت رابطه مصرف شیر تخمیر شده و غلظت کلسترول سرم انجام شده، لیکن هنوز نقش کاهنده کلسترول لبنیات تخمیری و پروبیوتیک‌ها ثابت نشده است. نتایج این مطالعات، از ایجاد کاهش معنی

دار در سطح کلسترول سرم [۹-۱۲]، تا اثر خنثی [۱۳ و ۱۴] و یا حتی افزایش سطح کلسترول سرم [۱۵ و ۱۶] متغیر بوده است. علت این نتایج متناقض را می‌توان در نحوه طراحی مطالعات، تفاوت در مقدار دریافت شیر تخمیر شده و مهمتر از همه، تفاوت در گونه [۱۷] و سویه باکتری اسیدلاکتیک مورد استفاده [۱۸] جستجو کرد.

سازوکار دقیق اثر این باکتری‌ها بر کاهش کلسترول خون هنوز مشخص نیست، اما احتمال می‌رود که بدلیل اثر بر سامانه آنزیمی به حرکت در آورنده کلسترول در کبد، افزایش دفع کلسترول در مدفوع، مهار جذب کلسترول از طریق اتصال کلسترول به سلول باکتری‌های اسیدلاکتیک و بالاخره جذب کلسترول توسط این باکتری‌ها صورت گیرد [۱۹].

بدلیل آنکه شرایط میزبان و جامعه مورد مطالعه در نتیجه حاصل بسیار مؤثر می‌باشد [۲۰]، لازم است اثرات بالینی این باکتری‌ها در جامعه ما مورد مطالعه قرار گیرد و لذا این تحقیق با هدف مقایسه اثر مصرف ۶ هفته‌ای نوعی ماست پروبیوتیک حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس بر سطح چربی‌های خون افراد مبتلا به هیپرکلسترولمی خفیف تا متوسط و مقایسه آن با اثرات مصرف ماست معمولی انجام شد.

روش‌ها

تحقیق به روش کار آزمایشی بالینی از نوع متقاطع تصادفی و یک سوکور انجام شد. با درج آگهی محلی و مراجعه به چند آزمایشگاه تشخیص طبی، افراد ۶۵-۴۰ سال با سطح کلسترول تام ۳۰۰-۲۰۰ mg/dl و تری گلیسرید کمتر از ۴۰۰ mg/dl که موافقت نامه کتبی را برای همکاری در این پروژه امضا کردند، انتخاب شدند. کلیه این افراد از نظر عدم ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی، کلیوی، دیابت، هیپوتیروئیدیسم، و نیز عدم مصرف داروهای کاهنده چربی خون حداقل از ۲ ماه قبل و سایر داروهای اثرگذار بر سطح چربی خون، مکمل فیبر، مولتی ویتامین و مکمل کلسیم مورد پرسش قرار گرفتند.

به منظور انجام آزمایش‌های اولیه، از شرکت کنندگان دعوت به عمل آمد که یک روز خاص به آزمایشگاه انستیتو تغذیه

جهت تجزیه و تحلیل داده های تحقیق، از برنامه آماری SPSS (version 10.0) استفاده شد. جهت مقایسه متغیرهای کمی بین دو دوره از آزمون t زوج استفاده شد، بدین طریق که در مورد هر شاخص، ابتدا تفاضل پایان دوره مصرف ماست معمولی از شروع آن و تفاضل پایان دوره مصرف ماست پروبیوتیک از شروع آن محاسبه گردید. سپس میان این دو تفاضل، آزمون t زوج انجام شد و P کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد. به این ترتیب، تأثیر دو نوع ماست مذکور بر سطح شاخص های خونی مقایسه گردید.

یافته‌ها

تحقیق بر روی ۱۴ بیمار شامل ۱۰ زن و ۴ مرد انجام شد. در مرحله اول، ۷ نفر در گروه مصرف کننده ماست معمولی و ۷ نفر در گروه مصرف کننده ماست پروبیوتیک قرار گرفتند و در مرحله دوم، جایجا شدند. میانگین سن افراد، $6/8 \pm 50/5$ سال بود. سایر مشخصات اولیه این افراد در جدول ۱ ارائه شده است.

مقایسه تغییرات وزن و BMI و عوامل مداخله گر رژیم، تفاوتی را بین دو دوره مصرف ماست معمولی و ماست پروبیوتیک نشان نداد (داده ها نشان داده نشده است).

در دوره مصرف ماست پروبیوتیک، نسبت به دوره مصرف ماست معمولی، سطح کلسترول تام سرم بطور معنی داری کاهش یافت ($P=0/049$) و مقایسه سایر شاخص های چربی خون در این دو دوره، تفاوت معنی داری نداشت (جدول ۲).

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که مصرف ماست پروبیوتیک در مقایسه با ماست معمولی، موجب کاهش معنی دار سطح کلسترول تام می گردد ($P=0/049$) و مقایسه سایر شاخص های تحت بررسی، تفاوت معنی داری را نشان نداد. از آنجا که دو باکتری ماست دارای مقاومت اندکی نسبت به نمک های صفراوی و PH اسیدی معده می باشند [۲۳]،

مراجعه کنند. قد و وزن با استفاده از ترازوی دارای قدسنج Seca با حداقل پوشش و بدون کفش با روش های استاندارد اندازه گیری شد و با استفاده از این دو شاخص، BMI محاسبه گردید [۲۱]. بیمارانی که BMI بالاتر از 30 kg/m^2 داشتند از مطالعه حذف شدند. آموزش های لازم مبنی بر عدم تغییر رژیم غذایی و میزان فعالیت بدنی در طی مدت مداخله به آنها ارائه شده و به منظور حذف اثرات احتمالی مصرف ماست بر فراسنج های لیپیدی، از آنها خواسته شد به مدت دو هفته، ماست یا دوغ مصرف نکنند و ۳۰۰ گرم شیر با ۲/۵٪ چربی به رژیم معمول خود اضافه کنند. پس از آن، ۵ cc خون در حال ناشتا گرفته شد و غلظت سرمی کلسترول تام، HDL-C و تری گلیسیرید به روش آنزیماتیک اندازه گیری شد و LDL-C با استفاده از فرمول Friedewald محاسبه گردید [۲۲]. جهت تعیین دریافت غذایی این افراد، یادآمد ۲۴-ساعته خوراک برای ۳ روز متوالی ثبت شد. پس از آن، بطور تصادفی در یکی از گروه های مصرف کننده ماست معمولی و ماست پروبیوتیک قرار گرفتند و از آنان خواسته شد به مدت ۶ هفته، روزانه ۳۰۰ گرم از ماست های تحویل داده شده را مصرف کنند و از هیچ نوع ماست یا دوغ دیگری استفاده نکنند. این مقدار ماست، جایگزین ۳۰۰ گرم شیری بود که به رژیم آنان اضافه شده بود. ماست ها هر هفته یکبار در بسته های مشابه تحویل بیماران داده می شد و افراد از نوع آن اطلاعی نداشتند (یک سو کور). در پایان هفته ۶، اندازه گیری غلظت لیپیدهای خون و ثبت غذای ۳ روز، تکرار شد.

پس از ۷ هفته استراحت^۱ دو گروه جایجا شدند و مطالعه ۶ هفته دیگر ادامه یافت. هر دو نوع ماست حاوی ۲/۵٪ چربی بودند. جهت تولید ماست معمولی، از باکتری های آغازگر معمولی ماست یعنی استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس استفاده شد. ماست پروبیوتیک علاوه بر این دو باکتری، دارای دو باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس نیز بود. ماست ها هر هفته یکبار در کارخانه صنایع شیر تهران تهیه و در اختیار افراد قرار داده می شدند.

¹ wash-out

جدول ۱- میانگین و انحراف معیار مشخصات اولیه افراد مورد بررسی در شروع مطالعه (n = ۱۴)

شاخص	Mean ± SD
وزن (kg)	۶۷/۷ ± ۷/۸
قد (متر)	۱/۶ ± ۰/۰
BMI (kg/m ²)	۲۶/۱ ± ۲/۹
کلسترول تام (mg/dl)	۲۲۰/۰ ± ۲۷/۴
LDL-C (mg/dl)	۱۳۹/۴ ± ۳۰/۱
HDL-C (mg/dl)	۴۰/۶ ± ۱۱/۷
تری گلیسرید (mg/dl)	۲۰۰/۴ ± ۷۵/۱

جدول ۲- مقایسه تغییرات سطح شاخص های لیپیدی سرم در دوره مصرف ماست معمولی و ماست پروبیوتیک (n = ۱۴)

نتیجه آزمون paired t-test	دوره مصرف ماست پروبیوتیک	دوره مصرف ماست معمولی	Δ شاخص
P = ۰/۰۴۹	-۱۲/۳ ± ۹/۹	+۱۳/۹ ± ۳۹/۷	Δ کلسترول تام (mg/dl)
P = ۰/۱۰۶	+۰/۵ ± ۵/۸	+۵/۹ ± ۷/۹	Δ HDL-C (mg/dl)
P = ۰/۱۰۶	-۸/۸ ± ۲۰/۱	+۱۰/۱ ± ۳۸/۱	Δ LDL-C (mg/dl)
P = ۰/۶۴۲	-۲۰/۰ ± ۶۰/۵	-۱۰/۶ ± ۳۰/۶	Δ تری گلیسرید (mg/dl)

داده ها بصورت Mean ± SD می باشند.

Δ = تغییرات نسبت به شروع هر دوره

فاسیوم و دو سویه از استرپتوکوکوس ترموفیلوس) پرداخته اند، کاهش معنی داری در سطح کلسترول تام و LDL-C سرم پس از مدتی کوتاه مشاهده شد [۱۰]. با این وجود، در مطالعاتی که از شیر تخمیر شده با سویه های مختلف لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس استفاده شد، تأثیری بر سطح کلسترول تام و LDL-C مشاهده نگردید [۲۵ و ۱۰]. این در حالیست که Schaafsma و همکاران، کاهش معنی داری در سطح کلسترول تام و LDL-C سرم متعاقب مصرف نوعی فرآورده لبنی سین بیوتیک تخمیر شده با سویه ای از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و حاوی فروکتوالیگوساکارید مشاهده کردند [۲۶].

در حین گذر از لوله گوارش زنده نمی مانند و به همین جهت خاصیت پروبیوتیک نخواهند داشت. به همین دلیل، کاهش سطح کلسترول تام سرم به دنبال مصرف ماست پروبیوتیک را می توان به وجود دو باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس در آن نسبت داد که در برابر اسید و صفرا مقاومت بالایی داشته [۲۴] و احتمالاً با جذب کلسترول و اسیدهای صفراوی و همچنین دکنزورگه کردن و مهار جذب اسیدهای صفراوی، موجب کاهش سطح کلسترول می شوند. در مطالعاتی که به بررسی اثرات هیپوکلسترولمیک Gaio (نوعی شیر تخمیر شده پروبیوتیک حاوی استرپتوکوکوس

بنابراین چنانچه گونه و یا سویه ای از یک نوع باکتری اثر کاهنده کلسترولی نداشته باشد، استفاده از دوز بالای آن نیز بی تأثیر خواهد بود. اما عکس این مطلب می تواند صحیح باشد؛ یعنی چنانچه یک نوع باکتری بتواند موجب بهبود شاخص های تحت بررسی شود، می توان به مقایسه دوزهای مختلف آن بر شاخص های مورد نظر پرداخت. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، مصرف ماست پروبیوتیک در مقایسه با ماست معمولی، موجب کاهش معنی دار سطح کلسترول تام سرم در افراد مبتلا به هیپرکلسترولمی خفیف تا متوسط می گردد و پیش بینی می شود با انجام مطالعه ای روی تعداد نمونه آماری بیشتر و استفاده از دوز بالاتر باکتری های پروبیوتیک، کاهش سطح LDL-C نیز معنی دار خواهد بود. بنابراین، مصرف این نوع ماست پروبیوتیک توسط افراد مبتلا به هیپرکلسترولمی توصیه می شود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از شرکت سهامی صنایع شیر ایران (پگاه) که هزینه انجام این پژوهش و امکانات لازم جهت تولید ماست های مورد آزمایش را تقبل نمود، تشکر و قدردانی می نماید.

معنی دار نبودن کاهش سطح LDL-C در مطالعه حاضر، احتمالاً بدلیل کافی نبودن تعداد نمونه به منظور دستیابی به قدرت آماری مطلوب بوده است. بنابراین احتمال می رود که انجام چنین مطالعه ای روی تعداد نمونه های بیشتر، با کاهش معنی دار سطح LDL-C همراه باشد. از سوی دیگر، دوز باکتری پروبیوتیک مورد استفاده از اهمیت خاصی برخوردار است. تاکنون دوز مورد نیاز باکتری های پروبیوتیک به منظور ایجاد اثرات سلامت بخش آنها بررسی نشده است. با این وجود، پیشنهاد شده که بر اساس سویه مورد استفاده و همچنین بیماری مورد هدف، این مقدار باید 10^{11} - 10^8 cfu/g باشد [۲۷]. بنابراین با در نظر گرفتن مصرف روزانه ۱۰۰ گرم از فرآورده لبنی پروبیوتیک، می بایست 10^9 - 10^6 cfu/g باکتری پروبیوتیک را در زمان مصرف دارا باشد. در مطالعه حاضر، ماست پروبیوتیک حاوی حداقل تعداد باکتری های پروبیوتیک توصیه شده در بالا بوده است و احتمال می رود که با تلقیح دوز بیشتری از کشت آغازگر پروبیوتیک در داخل شیر به منظور افزایش تعداد این نوع باکتری ها، اثر این نوع ماست بر کاهش سطح کلسترول تام و LDL-C بیشتر خواهد بود.

مآخذ

1. National Center for Health Statistics and the American Heart Association . Facts about cardiovascular disease. Circulation 1992; 85: A 103.
2. سازمان مدیریت و برنامه ریزی کشور (۱۳۷۱). سالنامه آماری کشور ۱۳۷۰. مرکز آمار ایران، تهران.
3. Kannel WB, Castelli WP, Gordon T. Serum cholesterol, lipoproteins and the risk of coronary heart disease, The Framingham study. Ann Intern Med 1997; 74: 1.
4. محمد، کاظم. نوربالا، احمد علی: بررسی سلامت و بیماری در ایران (کل کشور). تهران: وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی و مرکز ملی تحقیقات علوم پزشکی کشور، خرداد ۸۰.
5. NCEP Expert Panel. Summary of the second report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation , and treatment of high blood cholesterol in adults. JAMA 1993; 23: 3015-23.
6. Fuller R. probiotics in man and animals. J appl Bacteriol 1989; 66: 365-78.
7. Mitsuoka T. The human gastrointestinal tract. In: Wood, B.J.B. The lactic acid bacteria in health and disease, Hardcover, 2nd edition. London. 1992: 69-114.
8. Mann GV, Sporry A. Studies of a surfactant and cholesterolemia in the Massai. Am J Clin Nutr. 1974; 27: 464-9.
9. Anderson JW, Gilliland SE. Effect of fermented milk (yogurt) containing Lactobacillus acidophilus L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. J Am Coll Nutr. 1999; 18: 43-50.
10. Agerholm-Larsen L, Raben A, Haulrik N, Hansen AS, Manders M, Astrup A. Effect of 8 week intake of probiotic milk products on risk factors for cardiovascular diseases. Eur J Clin Nutr. 2000; 54: 88-97.

11. Bertolami MC, Faludi AA, Batlouni M. Evaluation of the effects of a new fermented milk product (Gaio) on primary hypercholesterolemia. *Eur J Clin Nutr.* 1999; 53: 97-101.
12. Agerbaek M, Gerdes LU, Richelsen B. hypocholesterolemic effect of a new fermented milk product in healthy middle-aged men. *Eur J Clin Nutr* 1995; 49: 346-52.
13. Trapp CL, Chang CC, Halpern GM, Keen CL, Gershwin ME. The influence of chronic yogurt consumption on population of young and elderly adults. *Int J Immunother.* 1993; 9: 53-64.
14. De Roos NM, Schouten G, Katan MB. Yogurt enriched with *Lactobacillus acidophilus* does not lower blood lipids in healthy men and women with normal to borderline high serum cholesterol levels. *Eur J Clin Nutr* 1999; 53: 277-80.
15. McNamara DJ, Lowell AE, Sabb JE. Effect of yogurt intake on plasma lipid and lipoprotein levels in normolipidemic males. *Atherosclerosis* 1989; 79: 167-71.
16. Mikes Z, Ferencik M, Jahnova E, Ebringer L, Ciznar I. Hypocholesterolemic and immunostimulatory effect of orally applied *Enterococcus faecium* M-74 in man. *Folia Microbiol.* 1995; 40: 639-46 .
17. Taranto Mp, Medici M, Perdigon G, Ruiz Hordogo AP, Valdez GF. Evidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice. *J Dairy Sci.* 1998; 81: 2336-40.
18. Usman HA, Hosono A. Effect of administration of *Lactobacillus gasseri* on serum lipids and fecal steroids in hypercholesterolemic rats. *J Dairy Sci.* 2000; 83: 1705-11.
19. Pereira DIH, Gibson GR. Cholesterol assimilation by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria isolated from the human gut. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68: 4689-93.
20. Sanders ME. Probiotics, A publication of of the Institute of Food Technologists' expert panel on Food Safety and Nutrition. *Food Technol.* 1999; 53: 67-77.
21. Hammond KA. Dietary and clinical assessment. In: Mahan LK., Escott-Stump S. Food, Nutrition & Diet Therapy, 11th edition, Philadelphia. Saunders; 2004: 407-35.
22. Friedwald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of Low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparation ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972; 18: 499-502.
23. Harvenaar R, Minekus M. Stimulated assimilation. *Dairy Ind Int* 1996; 61: 17-23.
24. Itoh T. Functional benefits from lactic acid bacteria used in cultured milk. *Anim Sci Technol* 1992; 63: 1276-89.
25. Thompson LU, Jenkins DJA, Amer MA, Reichert R, Jenkins A, Kamulsky J. Effect of fermented and unfermented milks on serum cholesterol. *Am J Clin Nutr* 1982; 36: 1106-11.
26. Schaafsma G, Meuling WJA, Van Dokkum W, Bouley C. Effects of a milk product, fermented by *Lactobacillus acidophilus* and with fructo-oligosaccharides added, on blood lipids in male volunteers. *Eur J Clin Nutr.* 1998; 52: 436-40.
27. Vanderhoof JA, Young RJ. Use of probiotics in childhood gastrointestinal disorders. *J Paediatric Gastroenterol and Nutr.* 1998; 27: 323-32.