# بررسی بقای *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کواگولانس* در بستنی‌های پروبیوتیک و سین‌بیوتیک کم‌چرب

**مجید هاشمی[۱و۲]، حمیدرضا قیصری[۳]، سید شهرام شکرفروش*[۴]**

۱- دانشگاه شیراز، دانشجوی دکتری بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، شیراز، ایران.
۲- مربی پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس، شیراز، ایران.
۳- دانشگاه شیراز، دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، شیراز، ایران.
۴- دانشگاه شیراز، استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، شیراز، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: shekar@shirazu.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹۲/۹/۲۸ پذیرش نهایی: ۹۳/۳/۷)

## چکیده

**در این مطالعه بقای *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کواگولانس* بعد از انجماد و در طی ۹۰ روز نگه‌داری در دمای ۱۸- درجه سلسیوس در بستنی‌های پروبیوتیک و سین‌بیوتیک کم‌چرب مورد مطالعه قرار گرفت. علاوه بر یک گروه کنترل که بستنی معمولی بود، دو ترکیب بستنی پروبیوتیک با استفاده از *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کواگولانس* و دو ترکیب بستنی سین‌بیوتیک که علاوه بر میکروارگانیسم، ۵ درصد مقدار چربی با اینولین جایگزین شده بود، تهیه شد. اگرچه مقدار چربی در بستنی‌های سین‌بیوتیک بطور معنی‌داری ($p<۰/۰۱$) پایین‌تر از بستنی‌های پروبیوتیک و کنترل بود اما مقدار ماده خشک این بستنی‌ها با هم تفاوت معنی‌داری نداشت. شمارش تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کواگولانس* بیش‌تر از حد توصیه شده ۶ واحد لگاریتمی پرگنه در هر گرم بستنی در تمامی نمونه‌های بستنی‌های پروبیوتیک و سین‌بیوتیک در دوره نگه‌داری به مدت ۹۰ روز بود. میزان بقای *باسیلوس کواگولانس* چه بعد از فرآیند انجماد و چه در انتهای دوره نگه‌داری بستنی در شرایط انجماد بالاتر از *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بود. اینولین اثر محافظتی روی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در دوره نگه‌داری نداشت. با توجه به این‌که نسبت بالایی از میکروارگانسیم‌های پروبیوتیک برای یک دوره طولانی قادر به زنده ماندن در بستنی‌های تولیدی بودند، بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که این فرآورده شیری منجمد پتانسیل بالایی برای استفاده به عنوان یک غذای فراسودمند دارد.**

**واژه‌های کلیدی:** *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *باسیلوس کواگولانس*، بستنی، پروبیوتیک، سین‌بیوتیک

## مقدمه

پروبیوتیک‌ها، میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که اگر در مقادیر مناسب تجویز شوند آثار مفیدی بر سلامت میزبان خواهند داشت (Granato *et al*., 2010). غذاهای پروبیوتیک غذاهایی هستند که حاوی میکروارگانیسم‌های زنده بوده و با خوردن آنها سلامت مصرف‌کنندگان از طریق بهبود تعادل میکروفلور روده افزایش می‌یابد (Wang *et al*., 2004). شکی نیست که غذاهای شیری بهترین حامل‌های شناخته شده برای پروبیوتیک‌ها می‌باشند (Granato*et al*., 2010) و بستنی به عنوان یک محصول شیری قابلیت این را دارد که به عنوان یک حامل برای رساندن پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها به بدن مورد استفاده قرار گیرد (Cruz *et al*., 2009). مهمترین ملاک برای تعیین موفقیت محصول دارای پروبیوتیک میزان بقای میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک آن در طول نگه‌داری محصول می‌باشد (Heenan *et al*., 2004).

*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* شناخته‌شده‌ترین باکتری است که به عنوان پروبیوتیک استفاده می‌شود و تعدادی از محققان کاربرد موفقیت‌آمیز آن را در بستنی گزارش کردند (Magarinos *et al*., 2007; Akalin and Erisir, 2008; Turgu and Cakmakci, 2009). توانایی زنده ماندن لاکتوباسیلوس‌ها با کاهش pH در معده و برخورد با نمک‌های صفراوی در بدن مصرف‌کنندگان تحت تأثیر قرار می‌گیرد. در مقابل، پروبیوتیک‌های باسیلوس مثل *باسیلوس کواگولانس* که برای مصرف طولانی مدت انسان بی‌خطر شناخته شده است، قادراست که شرایط معده را تحمل کرده و کل باکتری‌های خورده شده بدون تغییر به روده کوچک برسد (Endres *et al*., 2009).

انواع محصولات که دارای *باسیلوس کواگولانس* هستند به شکل تجاری برای مصارف انسانی به شکل مکمل‌های غذایی و برای مصارف دامی به شکل محرک‌های رشد وجود دارند (Hong *et al*., 2005; Cutting, 2011)، اما گزارشی در ارتباط با استفاده از این میکروارگانیسم‌ها در غذاهای شیری به ویژه بستنی وجود ندارد.

بستنی به عنوان یک محصول شیری پر انرژی شناخته می‌شود و جایگزینی مواد پری‌بیوتیکی مثل اینولین بجای چربی در بستنی‌های پروبیوتیک می‌تواند به تولید یک محصول سالم‌تر تحت عنوان سین‌بیوتیک منجر شود (Lum and Albrecht, 2008). هدف از این مطالعه مقایسه میزان بقای *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کواگولانس* بعد از تبدیل آمیخته بستنی پروبیوتیک و سین‌بیوتیک کم‌چرب به بستنی سخت و در طول ۹۰ روز نگه‌داری بستنی در ۱۸- درجه سلسیوس می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### طرح آزمایش و سویه‌های پروبیوتیک

این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد. چهار ترکیب آزمایشی بستنی‌های پروبیوتیک و سین‌بیوتیک تهیه و با یک گروه کنترل که بستنی معمولی بود مورد مقایسه قرار گرفت. دو ترکیب بستنی پروبیوتیک با استفاده از *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کواگولانس* تهیه شد. *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (با نام تجاری LA-5®) (Chr. Hansen, Hørsholm, Denmark)، در زمان خرید بصورت خشک شده انجمادی (Direct Vat Set) بود و بر اساس توصیه شرکت سازنده تا زمان مصرف در شرایط انجماد (۱۸-

درجه سلسیوس) نگه‌داری گردید. *باسیلوس کواگولانس* به شکل پودر از گروه علوم صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز دریافت شد. در ترکیب بستنی‌های سین‌بیوتیک علاوه بر میکروارگانیسم پروبیوتیک، اینولین به جای ۵ درصد چربی گیاهی جایگزین شد. هر کدام از تیمارها در سه تکرار تهیه و مورد آزمایش قرار گرفت.

**مواد لازم برای تهیه بستنی**

ترکیب آمیخته بستنی‌های پروبیوتیک داری ۷۲/۶ درصد (وزنی/وزنی) شیر گاو پاستوریزه (با میانگین ۳/۵ درصد چربی)، ۱ درصد پودر شیر خشک بدون چربی، ۱/۲۵ درصد پودر پروتئین آب پنیر، ۵/۴ درصد روغن گیاهی، ۱۹ درصد شکر، ۰/۱ درصد وانیلین، ۰/۲۵ درصد کربوکسی متیل سلولز و ۰/۴ درصد پانیسول بود که همگی از کارخانه بستنی خوشمزه (ب.ب.کا، شیراز، ایران) دریافت شد. اینولین مورد استفاده در ترکیب بستنی‌های سین‌بیوتیک از نوع اینولین با عملکرد بالا (BeneoTM HP, Orafti, Oreye, Belgium) با درجه متوسط پلیمریزاسیون ≤ ۲۳ بود.

**ساخت بستنی**

اجزای لازم برای ساخت ۲ کیلوگرم بستنی در هر گروه توزین گردید. ابتدا شیر تا حدود ۴۵ درجه سلسیوس گرم شد و سپس بقیه اجزاء که کاملاً با هم مخلوط شده بودند به آن اضافه شد و بخوبی هم‌زده شد. گرم کردن ابتدایی شیر به منظور حل شدن بهتر اجزاء به ویژه اینولین در شیر بود. سپس آمیخته در دمای ۸۵ درجه سلسیوس به مدت زمان ۱۵ دقیقه پاستوریزه شد. بعد از خنک شدن آمیخته پاستوریزه تا حدود ۴۵ درجه سلسیوس، با استفاده از مخلوط کن (Tefal, Model 6790, Brazil)، آمیخته کاملاً همگن شد. سپس با هدف گذشتن دوره رسیدن، آمیخته به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس نگه‌داری شد. پس از طی دوره رسیدن، آمیخته به درجه حرارت اتاق رسانیده شد و وانیلین و باکتری پروبیوتیک به تیمارهای مربوطه اضافه شد. جهت تلقیح باکتری‌ها، با هدف دستیابی به یک جمعیت پروبیوتیکی اولیه حدود ۸-۷ واحد لگاریتمی پرگنه در هر گرم (Log cfu/g) آمیخته، مقدار ۱ گرم به ازای هر کیلوگرم مخلوط بستنی از پودر منجمد حاوی باکتری توزین و بعد از رقیق کردن در ۵۰ میلی‌لیتر شیر گاو پاستوریزه به مخلوط اضافه شده و کاملاً هم‌زده شد. سپس آمیخته در دستگاه بستنی‌ساز (Shanghahi Lisong, Model: BQL-12Y, China) اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه توسط دستگاه زده شد تا آمیخته تبدیل به بستنی نرم شد. بستنی تولیدی در لیوان‌های پلاستیکی اضافه گردید و پس از ثبت کد و تاریخ تولید بر روی بدنه لیوان‌ها، در سردخانه ۱۸- درجه سلسیوس نگه‌داری شد.

**شمارش میکروارگانیسم‌های پروبیوتیکی**

عمل کشت و شمارش پروبیوتیک‌ها روی تمامی نمونه‌های بستنی‌های پروبیوتیکی و سین‌بیوتیکی به صورت دوتایی از هر بار تولید روی آمیخته بستنی قبل از انجماد و یک روز پس از انجماد بستنی و به صورت ماهیانه تا انتهای دوره نگه‌داری محصول در ۱۸- درجه سلسیوس انجام شد. برای شمارش باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* از محیط کشت MRS agar (DeMan-Rogosa-Sharpe agar, Merck, Darmstadt,Germany) حاوی ۱۰ گرم در لیتر سوربیتول (Merck, Darmstadt, Germany) استفاده شد و پرگنه‌ها بعد از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سلسیوس و شرایط بی‌هوازی، شمارش شدند

(Tharmaraj and Shah, 2003). برای شمارش باکتری‌های *باسیلوس کواگولانس* از محیط کشت NYSM agar استفاده شد. ترکیب محیط NYSM agar شامل گلوگز (۱۰ گرم در لیتر)، پپتون از کازئین (۵ گرم در لیتر)، کلرید سدیم (۵ گرم در لیتر)، عصاره مخمر (۰/۵ گرم در لیتر)، عصاره بیف (۳ گرم در لیتر)، کلرید منیزیم (۰/۲ گرم در لیتر)، کلرید کلسیم (۰/۱ گرم در لیتر) و کلرید منگنز (۰/۰۱ گرم در لیتر) بود که در آزمایشگاه با مخلوط کردن ترکیبات فوق ساخته شد. تمام مواد مذکور بجز گلوگز به اندازه لازم توزین و با هم مخلوط شده و با آب مقطر به حجم رسانده و توسط دستگاه اتوکلاو ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون شد. با هدف جلوگیری از واکنش میلارد، گلوگز به طور جداگانه سترون گردید و پس از اتمام سترون‌سازی به بقیه محیط افزوده شد. پس از کشت، گرمخانه‌گذاری در دمای۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت در شرایط هوازی انجام شد (ضیایی، ۱۳۹۱).

**اندازه‌گیری پارامترهای شیمیایی بستنی**

نمونه‌های بستنی ۳ روز بعد از نگه‌داری در ۱۸- درجه سلسیوس مورد آزمایشات شیمیایی قرار گرفتند. برای اندازه‌گیری ماده خشک ابتدا درجه حرارت نمونه‌ها به ۲ ± ۲۰ درجه سلسیوس رسانده شد و نمونه‌ها کاملاً همگن گردیدند. ظروف مخصوص نمونه که از قبل به مدت ۳۰ دقیقه در آون ۱۰۰ تا ۱۱۰ درجه سلسیوس خشک شده بودند به دقت توزین شدند و سپس ۲/۵ تا ۳ گرم از هر یک از نمونه‌ها در ظروف اضافه شد. سپس ظروف حاوی نمونه در آون ۲ ± ۱۰۲ درجه سلیسیوس به مدت ۳ ساعت قرار داده شدند و پس از سرد کردن در دسیکاتور و توزین مجدد آنها، محاسبه درصد ماده خشک نمونه‌ها انجام شد (AOAC, 2005). چربی نمونه‌های بستنی با استفاده از روش ژربر اندازه‌گیری شد. مقدار pH در نمونه‌های بستنی ذوب شده با استفاده از pH متر در دمای اتاق انجام شد (Model 350 pH meter, Jenway, England). اسیدیته با روش تیتراسیون و با استفاده از هیدروکسید سدیم ۰/۱ نرمال و فنل‌فتالئین به عنوان شاخص انجام شد (AOAC, 2005).

**تجزیه وتحلیل آماری**

داده‌های بدست آمده توسط نرم‌افزار آماری SPSS نگارش ۱۶ (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) ثبت و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. به منظور بررسی روند تغییرات جمعیت باکتریایی در تیمارهای مربوطه از رویه تجزیه واریانس (ANOVA) برای آزمون‌های تکرار شونده استفاده شد و با آزمون تی اختلاف بین بقای میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک مورد بررسی قرار گرفت. تغییرات پارامترهای شیمیایی در تیمارهای مختلف با استفاده از رویه تجزیه واریانس یک طرفه بررسی شد. در مواردی که اثر معنی‌داری بین تیمارها وجود داشت، میانگین‌ها با آزمون دانکن (Duncan's test) مقایسه شد.

## یافته‌ها

شمارش میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک زنده درجدول ۱ تغییرات در شمارش *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کواگولانس* در آمیخته‌ها و بستنی‌های پروبیوتیک و سین‌بیوتیک بعد از فرآیند انجماد و بعد از یک روز نگه‌داری در فریزر نشان داده شده است. تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و

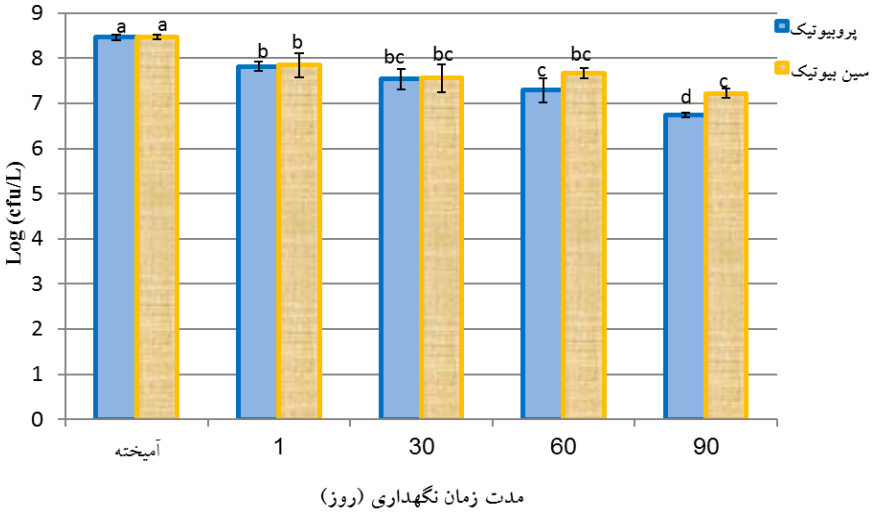
*باسیلوس کواگولانس* ۰/۰۶ ± ۸/۴۶ و ۰/۰۷ ± ۷/۴۱ Log cfu/g در آمیخته‌های بستنی بود. تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کواگولانس* در آمیخته‌های بستنی پروبیوتیک و سین‌بیوتیک اختلاف معنی‌داری نداشت.

جدول ۱- تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کواگولانس* (Log cfu/g) در آمیخته قبل از انجماد و بستنی نگه‌داری شده در ۱۸- درجه سلسیوس به مدت یک روز (میانگین ± انحراف معیار)

| بستنی | میکروارگانیسم | قبل از انجماد | بعد از انجماد | میزان زنده‌مانی (درصد) |
|---|---|---|---|---|
| پروبیوتیک | *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* | ۸/۴۶ ± ۰/۰۶$^{a}$ | ۷/۸۲ ± ۰/۱۰$^{b}$ | ۹۲/۴۳ |
| | *باسیلوس کواگولانس* | ۷/۴۱ ± ۰/۰۷$^{a}$ | ۷/۲۳± ۰/۱۱$^{a}$ | ۹۷/۵۷ |
| سین‌بیوتیک | *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* | ۸/۴۷ ± ۰/۰۵$^{a}$ | ۷/۸۵± ۰/۲۷$^{b}$ | ۹۲/۶۸ |
| | *باسیلوس کواگولانس* | ۷/۵۷± ۰/۰۷$^{a}$ | ۷/۳۵± ۰/۲۸$^{a}$ | ۹۸/۷۹ |

a-b میانگین‌ها در هر ردیف با حروف مختلف دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($p<۰/۰۵$)

بعد از انجماد تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بطور معنی‌داری کاهش یافت و به ترتیب به ۷/۸۲ و ۷/۸۵ Log cfu/g در بستنی‌های پروبیوتیک و سین‌بیوتیک رسید ($p<۰/۰۱$). شمارش *باسیلوس کواگولانس* در مرحله انجماد تحت تاثیر قرار نگرفت و به ۷/۲۳ و ۷/۳۵ Log cfu/g در بستنی‌های پروبیوتیک و سین‌بیوتیک رسید. تعداد باکتری‌ها در همه تیمارها بعد از ۳۰ روز نگه‌داری در ۱۸- درجه سلسیوس تغییر معنی‌داری نداشت. کاهش معنی‌دار دیگری ($p=۰/۰۱$) در شمارش *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در طول نگه‌داری در ۱۸- درجه سلسیوس رخ داد و تعداد آن بعد از ۶۰ روز به ۷/۲۹ Log cfu/g در بستنی‌های پروبیوتیک رسید (نمودار ۱).

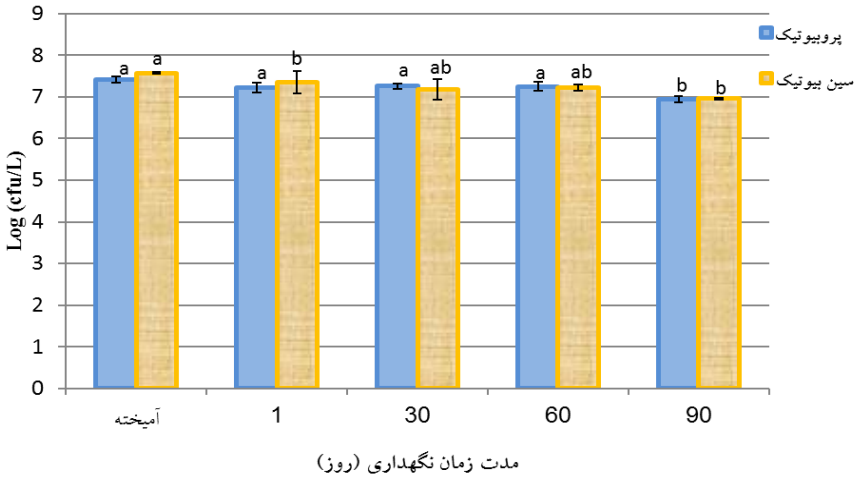



نمودار ۱- میانگین و انحراف معیار تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (واحد لگاریتمی تعداد پرگنه در گرم) در نمونه‌های آمیخته و بستنی

a-d میانگین‌ها در هر نوع بستنی با حروف مختلف دارای تفاوت معنی‌داری هستند ($p<۰/۰۵$)

تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در انتهای دوره نگه‌داری در بستنی‌های پروبیوتیک و سین بیوتیک به ترتیب به ۶/۷۴ و ۷/۲۲ Log cfu/g رسید که نسبت به روز اول دارای کاهش معنی‌داری بود (p<۰/۰۱).

تعداد *باسیلوس کواگولانس* در بستنی‌های پروبیوتیک و سین بیوتیک در طی نگه‌داری در ۱۸- درجه سلسیوس به مدت ۶۰ روز تقریباً ثابت بود اما در ۳۰ روز آخر نگه‌داری دچار یک کاهش معنی‌داری (p<۰/۰۵) نسبت به روز اول شد (نمودار ۲).




نمودار ۲- میانگین و انحراف معیار تعداد *باسیلوس کواگولانس* (واحد لگاریتمی تعداد پرگنه در گرم) در نمونه‌های آمیخته و بستنی

a-b میانگین‌ها در هر نوع بستنی با حروف مختلف دارای تفاوت معنی‌داری هستند (p <۰/۰۵).

میزان بقای *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کواگولانس* در طول ۹۰ روز نگه‌داری در شرایط انجماد در جدول ۲ نشان داده شده است. هر دو پروبیوتیک در این مدت یک کاهش تدریجی را داشتند (به ترتیب برای *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کواگولانس*، ۱۳/۸ درصد و ۳/۷۹ درصد در بستنی‌های پروبیوتیک و ۸/۰۳ درصد و ۵/۳۱ درصد در بستنی‌های سین‌بیوتیک). میزان بقای نهایی بعد از تولید بستنی و ۹۰ روز نگه‌داری در شرایط انجماد به ترتیب در بستنی‌های پروبیوتیک و سین بیوتیک ۷۸/۶۲ درصد و ۸۴/۶۵ درصد برای *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و ۹۳/۷۸ درصد و ۹۱/۷۸ درصد برای *باسیلوس کواگولانس* بدست آمد.

جدول ۲- درصد زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کواگولانس* در بستنی در طی نگه‌داری در ۱۸- درجه سلسیوس

| بستنی | میکروارگانیسم | زمان نگه‌داری (روز) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | ۱ | ۳۰ | ۶۰ | ۹۰ |
| پروبیوتیک | *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* | ۱۰۰ | ۹۶/۴۲ | ۹۳/۲۲ | ۸۶/۱۹ |
| | *باسیلوس کواگولانس* | ۱۰۰ | ۱۰۰/۴۱ | ۱۰۰/۲۸ | ۹۶/۲۱ |
| سین‌بیوتیک | *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* | ۱۰۰ | ۹۶/۱۸ | ۹۷/۷۱ | ۹۱/۹۷ |
| | *باسیلوس کواگولانس* | ۱۰۰ | ۹۷/۵۵ | ۹۸/۲۳ | ۹۴/۶۹ |

**خصوصیات شیمیایی**

خصوصیات شیمیایی بستنی‌های تولید شده در جدول ۳ نمایش داده شده است. اگرچه اختلاف معنی‌داری بین مقدار چربی در تیمارهای مختلف دیده می‌شود (p=۰/۰۰۱)، اما مقدار ماده خشک، pH و اسیدیته در بستنی‌های مختلف، اختلاف معنی‌داری نداشتند (p>۰/۰۵).

جدول ۳- میانگین و انحراف معیار پارامترهای شیمیایی در بستنی‌های مورد آزمایش ۳ روز بعد از نگه‌داری در ۱۸- درجه سلسیوس

| بستنی | میکروارگانیسم | ماده خشک (درصد) | چربی (درصد) | pH | اسیدیته (درصد) |
|---|---|---|---|---|---|
| کنترل | - | ۳۶/۵۵ ± ۰/۱۶[a] | ۷/۸۰ ± ۰/۳۰[a] | ۶/۷۶ ± ۰/۲۹[a] | ۰/۲۲ ± ۰/۰۱[a] |
| پروبیوتیک | *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* | ۳۵/۹۰ ± ۱/۲۲[a] | ۷/۸۰ ± ۰/۲۰[a] | ۶/۴۳ ± ۰/۰۷[a] | ۰/۲۱ ± ۰/۰۵[a] |
| | *باسیلوس کواگولانس* | ۳۵/۷۹ ± ۰/۵۲[a] | ۷/۷۳ ± ۰/۲۵[a] | ۶/۴۸ ± ۰/۲۹[a] | ۰/۱۶ ± ۰/۰۴[a] |
| سین‌بیوتیک | *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* | ۳۶/۰۰ ± ۱/۴۳[a] | ۳/۰۰ ± ۰/۳۰[b] | ۶/۵۲ ± ۰/۱۱[a] | ۰/۲۰ ± ۰/۰۵[a] |
| | *باسیلوس کواگولانس* | ۳۵/۷۳ ± ۰/۸۹[a] | ۲/۷۷ ± ۰/۴۰[b] | ۶/۵۲ ± ۰/۲۹[a] | ۰/۱۶ ± ۰/۰۲[a] |

a-b میانگین‌ها در هر ستون با حروف مختلف دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (p <۰/۰۵)

## بحث و نتیجه‌گیری

کاهش در تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در طول فرآیند انجماد احتمالاً ناشی از مرگ تعدادی از سلول‌های باکتری در اثر صدمات سلولی در این مرحله می‌باشد. تشکیل کریستال‌های یخ، پاره شدن دیواره سلولی بوسیله تیغه‌های دستگاه بستنی‌ساز و وارد شدن هوا به داخل آمیخته می‌تواند باعث صدمه سلولی در طی فرآیند مخلوط کردن و انجماد شود (Turgu and Cakmakci, 2009; Cruz *et al.*, 2009; Homayouni *et al.*, 2012). یافته‌های این مطالعه با نتایج سایر محققان که کاهش معنی‌داری در شمارش باکتری طی فرآیند انجماد گزارش کردند مطابقت دارد (Hekmat and McMahon, 1992; Magarinos *et al.*, 2007; Akalin and Erisir, 2008; Nousia et *al.*, 2010). برخی دیگر از محققان اگرچه کاهشی در شمارش لاکتوباسیلوس در طی فرآیند انجماد را گزارش کردند اما این کاهش در مقایسه با جمعیت لاکتوباسیلوس در آمیخته معنی‌داری نبود (Turgu and Cakmakci, 2009 و عبقری، ۱۳۸۷). این اختلافات می‌تواند در اثر اختلاف در فن‌آوری تولید، تفاوت ترکیبات و اختلاف pH آمیخته‌ها باشد. اسپور باکتری‌ها مقاومت مشخصی را به انواع شرایط سخت مثل نیروی مکانیکی دارد واین مسئله می‌تواند دلیلی برای قابلیت زنده‌مانی بیشتر *باسیلوس کواگولانس* در طی فرآیند انجماد باشد.

کاهش در تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در طول نگه‌داری در دمای انجماد با یافته‌های Akin و همکاران (2007) و Hekmat و McMahon (1992) همخوانی دارد اما با نتایج سایر محققان در تناقض است (Magarinos *et al.*, 2007; Turgu and Cakmakci, 2009; Akalin and Erisir, 2008). اختلاف در سویه‌های لاکتوباسیلوس مورد استفاده، دمای نگه‌داری مختلف، ترکیبات و pH متفاوت در بستنی‌های تولیدی در مطالعات مختلف می‌تواند منشاء این اختلافات باشد.

کاهش تعداد *باسیلوس کواگولانس* در انتهای دوره نگه‌داری نسبت به روز اول نیز می‌تواند ناشی از مرگ تدریجی سلول‌های آسیب‌دیده در زمان نگه‌داری باشد.

عدم تاثیر معنی‌داری ($p>0/05$) جایگزینی چربی به‌وسیله اینولین در بستنی‌های سین‌بیوتیک روی تعداد باکتری‌های زنده مانده در طول ۹۰ روز نگه‌داری بستنی با یافته‌های Akalin و Erisir (2008) مطابقت دارد. تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کواگولانس* در تمامی نمونه‌های بستنی‌های پروبیوتیک و سین‌بیوتیک بالاتر از حد توصیه شده ۶ Log cfu/g بود. این تعداد، کمینه تعداد پروبیوتیک در غذا می‌باشد که می‌تواند اثرات مفیدی را بر روی سلامت مصرف‌کننده داشته باشد (Hekmat and McMahon, 1992).

جایگزینی چربی گیاهی با اینولین در بستنی‌های سین‌بیوتیک اثر معنی‌داری بر روی مقادیر pH و اسیدیته در مقایسه با بستنی‌های پروبیوتیک نداشت. اگرچه یافته‌های تحقیق حاضر با یافته‌های Akalin و Erisir (2008) که پس از استفاده از *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و اینولین مقدار pH و اسیدلاکتیک مشابه‌ای را بستنی پروبیوتیک و سین بیوتیک گزارش کردند، مطابقت دارد، اما در مطالعه این محققان سطح چربی در همه‌ی تیمارها مشابه بود. در تحقیق دیگری نیز مشخص شد که سطح ۵ یا ۱۰ درصد خامه در بستنی پروبیوتیک تاثیر معنی‌داری روی pH و مقدار اسیدلاکتیک ندارد (Turgut and Cakmakci, 2009).

در پایان با توجه به زنده ماندن درصد بالایی از میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک برای مدت زمان طولانی در بستنی می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد این محصول شیری منجمد قابلیت استفاده به عنوان یک غذای فراسودمند را دارد. از آنجا که بقای *باسیلوس کواگولانس* هم بعد از فرآیند انجماد و هم در طول نگه‌داری در شرایط انجماد بالاتر بود، لذا استفاده از این پروبیوتیک در بستنی نسبت به لاکتوباسیلوس ارجحیت دارد.

## منابع


- ضیایی، اسماعیل (۱۳۹۱). بهینه کردن شرایط تخمیر غیر مداوم و نیمه مداوم برای رشد باکتری *باسیلوس کواگولانس* و تولید پودر پروبیوتیک با استفاده از خشک کن پاششی. پایان نامه کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز.
- عبقری، علی؛ شیخ زین‌الدین، محمود؛ سلیمانیان‌زاده، صبیحه و دخانی، شهرام (۱۳۸۷). ارزیابی بقای *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در یک بستنی غیرتخمیری. هیجدهمین کنگره علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران، ۲۴ و ۲۵ مهر ۸۷.

- Akalin, A.S. and Erisir, D. (2008). Effects of inulin and oligofructose on the rheological characteristics and probiotic culture survival in low-fat probiotic ice cream. Journal of Food Science, 73(4):184-188.
- Akin, M.B., Akin, M.S. and Kirmaci, Z. (2007). Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice cream. Food Chemistry, 104: 93-99.

- AOAC (2005). Official methods of analysis, 18th editions. Association of Official Analytical Chemists, Washington.
- Cruz, A.G., Antunes, A.E.C., Sousa, A.L.O.P., Faria, J.A.F. and Saad, S.M.I. (2009). Ice cream as a probiotic food carrier. Food Research International, 42: 1233-1239.
- Cutting, S.M. (2011). *Bacillus* probiotics. Food Microbiology, 28: 214-220.
- Endres, J.R., Clewell, A., Jade, K.A., Farber, T., Hauswirth, J. and Schauss, A.G. (2009). Safety assessment of a proprietary preparation of a novel probiotic, *Bacillus coagulans*, as a food ingredient. Food and Chemical Toxicology, 47: 1231-1238.
- Granato, D., Branco, G.F., Cruz, A.G., Faria, J.deA.F. and Shah, N.P. (2010). Probiotic dairy products as functional foods. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 9: 455-470.
- Heenan, C.N., Adams, M.C., Hosken, R.W. and Fleet, G.H. (2004). Survival and sensory acceptability of probiotic micro-organisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. LWT-Food Science and Technology, 37: 461-466.
- Hekmat, S. and McMahon, D.J. (1992). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacteriumbifidum* in ice cream for use as a probiotic food. Journal of Dairy Science, 75: 1415-1422.
- Homayouni, A., Azizi, A., Javadi, M., Mahdipour, S. and Ejtahed, H. (2012). Factors influencing probiotic survival in ice cream: A review. International Journal of Dairy Science, 7(1): 1-10.
- Hong, H.A., Duc, L.H. and Cutting, S.M. (2005). The use of bacterial spore formers as probiotics. FEMS Microbiology Reviews, 29: 813-835.
- Lum, A.K. and Albrecht, J.A. (2008). Sensory evaluation of ice cream made with prebiotic ingredients. RURALS: Review of Undergraduate Research in Agricultural and Life Sciences, 3(1):1-9.
- Magarinos, H., Selaive, S., Costa, M., Flores, M. and Pizarro, O. (2007). Viability of probiotic micro-organisms (*Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacteriumanimalis* subsp. *lactis* Bb-12) in ice cream. International Journal of Dairy Technology, 60(2): 128-134.
- Nousia, F.G., Androulakis, P.I. and Fletouris, D.J. (2010). Survival of *Lactobacillus acidophilus* LMGP-21381 in probiotic ice cream and its influence on sensory acceptability. International Journal of Dairy Technology, 64(1): 130-136.
- Turgut, T. and Cakmakci, S. (2009). Investigation of the possible use of probiotics in ice cream manufacture. International Journal of Dairy Technology, 62(3): 444-451.
- Tharmaraj, N. and Shah, N.P. (2003). Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Propionibacteria*. Journal of Dairy Science, 86: 2288-2296.
- Wang, K.Y., Li, S.N., Liu, C.S., Perng, D.S., Su, Y.C., Wu, D.C., Jan, C.M., Lai, C.H., Wang, T.N. and Wang, W.M. (2004). Effects of ingesting Lactobacillus- and Bifidobacterium-containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. American Journal of Clinical Nutrition, 80: 737-741.

# Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bacillus coagulans* in probiotic and low-fat synbiotic ice-creams

**Hashemi, M.[1,2], Gheisari, H.R.[3], Shekarforoush, S.S.[4*]**

1-Ph.D. Student, Department of Food Hygiene, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran.
2- Researcher, Department of Animal Sciences, Research Center for Agriculture and Natural Resource of Fars Province, Shiraz, Iran.
3- Associated professor, Department of Food Hygiene, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran.
4-Professor, Department of Food Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran.
*Corresponding author email: shekar@shirazu.ac.ir
(Received: 2013/12/19 Accepted: 2014/5/28)

## Abstract

In this study, survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bacillus coagulans* after freezing and during 90 days of storage at -18°C in probiotic and low-fat synbiotic ice-cream was evaluated. Addition to a control group (which was ordinary ice-cream), two probiotic ice-creams were formulated using *L. acidophilus* and *B. coagulans* and two synbiotic ice-creams were prepared using the aforementioned microorganisms but replacing 5% of milk-fat with inulin. The total solids of the ice-cream mixes did not differ significantly, however there was a significant difference ($p<0.01$) between their fat contents. The viable counts of *L. acidophilus* and *B. coagulans* were higher than the recommended minimum limit of 6 log cfu/g in all probiotic and synbiotic ice-creams during the 90-days of frozen storage. The survival rate either after freezing or at the end of frozen storage was higher in the samples with *B. coagulans*. Inulin had not preservative effect on probiotic microorganisms during frozen storage. Moreover, survival of high populations of probiotic microorganisms for a long time revealed that ice-cream has a great potential to be a functional food.

**Key words:** *Lactobacillus acidophilus, Bacillus coagulans,* Ice-cream, Probiotic, Synbiotic