

بررسی زنده‌مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در بستنی کاکائویی حاوی شیرین‌کننده استویا

گلناز اسحق‌ی ماکوئی^۱، محمد حسین موثق^{۲*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شبستر، ایران

۲- دکتری تخصصی بهداشت مواد غذایی، استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شبستر، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۶/۰۶/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۲۷)

چکیده

بستنی خوراکی بسیار معروفی است که در سراسر دنیا خواهان دارد. برخی ویژگی‌های بستنی این پیشنهاد را می‌دهد که این دسر پرفرمدار می‌تواند به عنوان یک ماده غذایی پروبیوتیک فراسودمند عمل کند. در این مطالعه امکان تولید بستنی کاکائویی پروبیوتیک با استفاده از شیرین‌کننده طبیعی استویا بررسی شد. شیرین‌کننده استویا در مقادیر ۰، ۱۰، ۲۵ و ۵۰٪ با شکر پایه فرمولاسیون بستنی در نمونه‌های حاوی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس جایگزین گردید و نمونه‌ها از نظر زنده‌مانی باکتری، اسیدیته، pH و ارزیابی حسی در سه تکرار در دوره‌های زمانی ۱، ۷ و ۱۴ روزه مورد آزمون قرار گرفتند. بیشترین تعداد باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در نمونه‌های حاوی ۱۰٪ و ۵۰٪ به ترتیب حاوی $9/49 \pm 0/20 \log \text{cfu/g}$ و $9/19 \pm 0/20$ بود. شمارش تعداد باکتری در تمامی نمونه‌ها بالاتر از میزان تعیین شده در طول دوره نگهداری بود. افزایش استویا در فرمولاسیون منجر به کاهش ویژگی‌های حسی نمونه‌ها شد. به نظر می‌رسد بستنی حاوی استویا می‌تواند به عنوان یک حامل برای باکتری‌های پروبیوتیک استفاده شود.

کلید واژگان: استویا، بستنی کاکائویی، پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

۱- مقدمه

بستنی منبع خوبی از اسیدهای آمینه ضروری، پروتئین‌های شیر، ویتامین‌ها و مواد معدنی است و اجزای تشکیل‌دهنده آن به‌خوبی توسط بدن هضم و جذب می‌شوند [۱]. در سرتاسر جهان تمایل افراد برای استفاده از محصولات سودمند در حال افزایش است [۲]. استویا که نام علمی آن استویا ربائودیانا برتونی^۱ می‌باشد، در آمریکای جنوبی رشد می‌کند، سالم و فاقد کالری بوده و به‌عنوان جایگزین طبیعی برای شکر و شیرین‌کننده‌های دیگر، از مدت‌ها قبل در بازار مصرف برخی کشورها مورد استفاده قرار می‌گیرد [۳]. یک گرم از پودر استویا برابر با دو قاشق شکر می‌باشد (یک قاشق شکر برابر است با ۴/۲ گرم) [۴].

ربائودیوزید A^۲ و استویوزید^۳ دو استویول گلوکوزید^۴ غالب یافت شده در استویا می‌باشند [۵]. با توجه به متابولیسم استویوزید و ربائودیازید A، آنزیم‌های گوارشی (آلفا آمیلاز، پپسین، پانکراتین) بر طبق شواهد مشاهده‌شده در مطالعات آزمایشگاهی قادر به تجزیه مواد فوق نیستند. با توجه به این‌که به میزان کم جذب می‌شوند، استویول گلوکوزیدها در فرم هیدرولیز نشده به قولون می‌رسند و در روده توسط فلور میکروبی به استویول تخمیر می‌شوند. بنابراین استویول گلیکوزیدها دارای خواص پری‌بیوتیکی هستند [۶].

نتایج مطالعات متعدد نشان‌دهنده این است که مصرف مواد غذایی حاوی میکروارگانیسم‌های مفید که از آن‌ها تحت عنوان پروبیوتیک یاد می‌شود، کمک فراوانی به بقاء و نگهداری میکروبی‌های فلور روده و توازن میکروبی آن کرده و منجر به ارتقای سلامت فرد می‌گردد. در سال‌های اخیر باکتری‌های پروبیوتیک به انواع مواد غذایی افزوده می‌شوند که در این میان فرآورده‌های شیری نقش مهمی را برای حمل این باکتری‌ها ایفا می‌کنند. مصرف منظم تعداد مناسبی از باکتری‌های پروبیوتیک که «حداقل درمانی» نامیده می‌شود، برای مشاهده اثرات آن بر روی ارتقای سلامتی فرد مصرف‌کننده ضرورت دارد. برای این

منظور لازم است روزانه بیش از ۱۰۰ گرم ماده غذایی حاوی حداقل ۱۰^۶ CFU/g باکتری پروبیوتیک مصرف شود. همچنین بررسی زنده ماندن این میکروارگانیسم‌ها در مدت نگهداری تا زمان مصرف موضوع بسیار مهمی است [۶]. بیشتر پروبیوتیک‌ها متعلق به گروه بزرگی از باکتری‌های اصلی فلور میکروبی روده انسان هستند [۷]. لاکتوباسیلوس / اسیدوفیلوس^۵ معروفترین باکتری است که به‌عنوان پروبیوتیک استفاده می‌شود و برخی از محققان کاربرد موفقیت‌آمیز آن را در بستنی گزارش نموده‌اند [۸].

در مطالعه‌ای که توسط هاشمی و همکاران انجام شده است بقای لاکتوباسیلوس / اسیدوفیلوس و باسیلوس کوآگولانس بعد از انجماد و در طی ۹۰ روز نگهداری در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد در بستنی‌های پروبیوتیک و سین بیوتیک کم‌چرب مورد مطالعه قرار گرفته است. نتایج نشان داده است که تعداد باکتری لاکتوباسیلوس / اسیدوفیلوس در طی ۹۰ روز نگهداری در شرایط منجمد حد قابل قبولی داشت و بستنی پتانسیل بالایی برای استفاده به عنوان یک غذای فراسودمند را دارد [۸].

فاکتورهایی وجود دارد که نشان می‌دهد بستنی و دسرهای منجمد قابلیت بالایی دارند که به‌عنوان یک حامل غذایی برای باکتری‌های پروبیوتیک عمل کنند. اولاً، همه بستنی خود به‌عنوان یک محصول غذایی بسیار مفید مورد توجه قرار می‌گیرد. بستنی شامل مقدار فراوانی مواد مغذی نظیر چربی شیر، پروتئین‌ها، ویتامین‌ها، مواد معدنی می‌باشد. همچنین، بستنی به‌راحتی می‌تواند توسط مواد متفاوتی، رنگی و یا طعمی گردد. بنابراین، اگر مواد عمل‌گرا، رنگ یا طعم غیرقابل قبول داشته باشند، به‌راحتی می‌توان از طریق افزودن رنگ یا طعم‌دهنده‌ها مجاز نظیر پودر کاکائو آن را پوشش داد [۹]. همچنین امروزه استفاده از مواد غذایی با کالری بالا منجر به بروز مشکلاتی از نظیر افزایش وزن و بیماری‌های غیرواگیردار نظیر افزایش فشار خون و بیماری دیابت در افراد می‌گردد. هدف از این مطالعه بررسی زنده‌مانی لاکتوباسیلوس / اسیدوفیلوس در بستنی کاکائویی حاوی شیرین‌کننده استویا و تولید بستنی پروبیوتیک کم‌کالری می‌باشد.

5. *Lactobacillus acidophilus*

1. *Stevia rebaudiana bertonii*
 2. Rebaudioside A
 3. Stevioside
 4. Steviol glycosides

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد اولیه

شیر خام گاو

- شکر (گلستان تهران)

- کربوکسی متیل سلولز

- پودر کاکائو (فرمند)

- پودر قند استویوزید ۹۵ درصد (شرکت استویا پک -تهران)

- باکتری بیفیدوباکتریوم انیمالیس زیر گونه لاکتیس (BB12)

شرکت هانسن دانمارک

- باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (LA5) شرکت هانسن

دانمارک

۲-۲- انتخاب باکتری پروبیوتیک

در این پژوهش سلول‌های زنده لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

(LA5) به صورت تک سویه، خالص و خشک شده

انجمادی خریداری شده از شرکت هانسن

(CHR- Hansen) مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۳- معادل‌سازی شکر و استویوزید در

فرمولاسیون

با توجه به اینکه هر هزار کیلوگرم برگ خشک‌شده استویا

حاوی ۶۰-۷۰ کیلوگرم استویوزید است و آن‌همان‌نظر شیرینی

معادل ۲۱۰۰۰ کیلوگرم شکر می‌باشد. بنابراین ۱ کیلوگرم شکر

با ۰/۰۰۲۸۵ کیلوگرم استویوزید معادل‌سازی شده بود.

۲-۳-۱- فرمولاسیون سطح ۰٪ (نمونه کنترل)

برای فرمولاسیون ۱۰۰۰ گرم از نمونه بستنی ۷۵۰ گرم شیر،

۲۴۴ گرم شکر، ۴ گرم کاکائو، ۳ گرم کربوکسی متیل سلولز

استفاده شده بود.

۲-۳-۲- فرمولاسیون سطح ۱۰٪

برای فرمولاسیون این نمونه بستنی، تمام موارد مشابه نمونه

کنترل بود و تنها تفاوت در مقدار شکر و استویوزید بود که

۲۴/۴ گرم شکر حذف شده بود و معادل ۰/۰۶۹ گرم استویوزید

جایگزین شده بود.

۲-۳-۳- فرمولاسیون سطح ۲۵٪

برای فرمولاسیون این نمونه بستنی، تمام موارد مشابه نمونه

کنترل بود و تنها تفاوت در مقدار شکر و استویوزید بود که

۶۱ گرم شکر حذف شده بود و معادل ۰/۱۷۳ گرم استویوزید

جایگزین شده بود.

۲-۳-۴- فرمولاسیون سطح ۵۰٪

برای فرمولاسیون این نمونه بستنی، تمام موارد مشابه نمونه

کنترل بود و تنها تفاوت در مقدار شکر و استویوزید بود که

۱۲۲ گرم شکر حذف شده بود و معادل ۰/۳۴۷ گرم استویوزید

جایگزین شده بود.

۲-۴- تولید بستنی

به‌منظور تولید بستنی ابتدا شیر تا دمای ۱۰۵ درجه

سانتی‌گراد حرارت داده شد و سپس کربوکسی متیل سلولز با

پودر کاکائو، شکر و پودر استویا در ۴ سطح جایگزینی ۰، ۱۰،

۲۵ و ۵۰٪ مخلوط و به آرامی به شیر اضافه شد. سپس مخلوط

حاصل تا دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد خنک شد. مقدار ۰/۱۵

گرم از باکتری لیوفیلیزه که حاوی $10^{13.14}$ CFU/g باکتری

در هر گرم بود به ۲۰ میلی‌لیتر شیر خنک شده افزوده شد و به

ازای هر ۲۰۰ گرم بستنی ۴ میلی‌لیتر از شیر حاوی باکتری به

مخلوط بستنی اضافه شد. قبل از انتقال مایع بستنی به دستگاه

بستنی‌ساز، مخلوط به مدت دو ساعت در یخچال با دمای ۴ درجه

سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس مایع بستنی در دستگاه بستنی‌ساز

ریخته شد و به مدت ۲۰ تا ۲۵ دقیقه مخلوط شد. بعد از تهیه

بستنی، بستنی در ظروف پلاستیکی توزیع و بسته‌بندی گردید.

نمونه‌ها برای طی نمودن مرحله سخت شدن در فریزر با دمای

۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و آزمون ارزیابی حسی،

تعیین میزان pH، اسیدیته و تعداد باکتری لاکتوباسیلوس

اسیدوفیلوس در روزهای ۱، ۷ و ۱۴ نگهداری بر روی نمونه‌ها

انجام شد [۱۰].

۲-۵- pH

اندازه‌گیری pH توسط دستگاه pH متر (مدل HORIBA)

انجام گرفت. بدین ترتیب که نمونه بستنی را داخل یک بشر

۲-۸- آنالیز میکروبی نمونه‌ها

برای بررسی میزان زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس از محیط کشت De Man, Rogosa and Sharpe Agar استفاده شد [۱۵]. به منظور شمارش باکتری، رقت‌های سریال ده برابر از نمونه‌ها تهیه گردید و سپس در محیط کشت MRS Agar به صورت پلپت کشت انجام شد و پلپت‌ها در داخل جار بی‌هوازی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. پلپت حاوی ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی به عنوان پلپت قابل شمارش در نظر گرفته شد. [۱۵].

۲-۹- روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمایش بر پایه طرح بلوک کاملاً تصادفی^۶ با ۴ تیمار (۱۰٪، ۲۵٪، ۵۰٪ و نمونه کنترل) در ۳ تکرار در ۳ دوره زمانی یک، ۷ و ۱۴ روزه اجرا شد. تجزیه آماری بر طبق طرح پیشنهادی با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 (2000) تجزیه و تحلیل شد و مقایسه میانگین تیمارهای مختلف با آزمون توکی در سطح $P < 0.05$ انجام شد. نمودارها به وسیله نرم‌افزار اکسل رسم گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- pH، اسیدیته و زنده‌مانی باکتری

لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس

نتایج حاصل از جایگزینی استویا بر ویژگی‌های محصول در جدول‌های مقایسه میانگین شماره ۱ و ۲ ارائه شده است. با توجه به جدول ۱ بین گروه‌های تیماری از نظر اسیدیته و زنده‌مانی باکتری اختلاف معنی‌دار وجود داشت و از نظر pH اختلاف معنی‌دار نبود. بین زمان‌های مختلف ارزیابی از نظر میزان pH اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید ولی از نظر میزان اسیدیته و زنده‌مانی باکتری اختلاف معنی‌دار نبود ($P < 0.05$).

ریخته شد. الکتروود pH متر را پس از کالیبراسیون و تنظیم دمای نمونه در ۲۰ درجه سلسیوس، داخل آن قرار داده شد و pH آن یادداشت گردید [۱۱].

۲-۶- اسیدیته

برای اندازه‌گیری اسیدیته نمونه‌ها از روش پتانسیومتری استفاده شد [۱۲ و ۱۳]. در یک بشر حدود ۱۰ میلی‌لیتر ۰/۰۱ ± ۱۰ گرم از آزمایش توزین و به آن حدود ۱۰ میلی‌لیتر آب افزوده و مخلوط شد. الکتروود pH متر در داخل محلول پراکنده قرار داده شد. از محلول هیدروکسید سدیم، در حین هم زدن برای عیارسنجی محتوای بشر استفاده شد تا pH آن در ۰/۰۱ ± ۸/۳۰ به مدت زمان ۵-۴ ثانیه ثابت باقی ماند. حجم محلول هیدروکسید سدیم مصرفی برحسب میلی‌لیتر، با دقت کمینه ۰/۰۵ میلی‌لیتر، ثبت شد.

$$= \frac{V \times 10}{m} \text{ اسیدیته}$$

V حجم هیدروکسید سدیم برحسب میلی‌لیتر استفاده شده برای عیارسنجی و m وزن آزمون برحسب گرم می‌باشد. نتایج آزمون تا دو رقم اعشاری بیان شد [۱۳].

۲-۷- ارزیابی حسی نمونه‌ها

ارزیابی حسی بستنی از نظر وضع ظاهری، بافت و شکل، طعم (بو و مزه) و ویژگی‌های آب شدن انجام گرفت.

جهت آزمون‌های حسی از ده نفر ارزیاب (۵ زن و ۵ مرد) با سنین مختلف استفاده شد. قبل از شروع کار ارزیاب‌های انتخابی تحت آموزش‌های اولیه قرار گرفتند. در این آزمون، نمونه‌های بستنی منجمد شده بر اساس چهار ویژگی رنگ و شکل ظاهری، بافت، عطر و طعم و شیرینی در پنج سطح (خیلی خوب، خوب، قابل قبول، ضعیف، غیرقابل قبول) ارزیابی شدند. امتیاز معادل برای خیلی خوب (۵)، خوب (۴)، قابل قبول (۳)، ضعیف (۲) و غیرقابل قبول (۱) در نظر گرفته شد [۱۴].

Table 1 Average comparison of Stevia and storage periods (days) in pH, acidity and viability of *L. acidophilus*

Stevia	pH	Acidity	Viability of LA5 (LogCFU/g)
100% Sugar	6.73	1.17 ^{bc}	7.43 ^b
90% sugar, 10% Stevia	6.74	1.10 ^c	8.45 ^a
75% sugar, 25% Stevia	6.78	1.21 ^{ab}	8.60 ^a
50% sugar, 50% Stevia	6.79	1.26 ^a	8.13 ^a
SEM	0.0228	0.0226	0.189
P _{value}	0.22	0.0064	0.0098
storage periods (days)			
1	6.78	1.01 ^b	7.83 ^b
7	6.76	1.25 ^a	8.09 ^b
14	6.74	1.29 ^a	8.54 ^a
SEM	0.009	0.020	0.104
P _{value}	0.158	0.0001	0.0007

Averages that have a common code do not have a significant difference ($P \leq 0.05$)**Table 2** Comparison of the average interaction effect (Stevia $\times$ days) on pH, acidity and viability of *L. acidophilus*

Combined treatment (Stevia $\times$ days)		pH	Acidity	Viability of LA5 (LogCFU/g)
100% Sugar	1	6.78	0.95	7.49 ^{de}
90% sugar, 10% Stevia	1	6.76	0.98	7.50 ^{de}
75% sugar, 25% Stevia	1	6.82	1.07	8.70 ^{ab}
50% sugar, 50% Stevia	1	6.78	1.04	7.62 ^{cd}
100% Sugar	7	6.72	1.22	7.47 ^{de}
90% sugar, 10% Stevia	7	6.73	1.17	8.37 ^{bc}
75% sugar, 25% Stevia	7	6.75	1.28	8.94 ^{ab}
50% sugar, 50% Stevia	7	6.82	1.35	7.59 ^{cde}
100% Sugar	14	6.68	1.33	7.32 ^e
90% sugar, 10% Stevia	14	6.74	1.16	9.49 ^a
75% sugar, 25% Stevia	14	6.77	1.27	8.17 ^{bcd}
50% sugar, 50% Stevia	14	6.78	1.39	9.19 ^a
SEM		0.0216	0.04	0.208
P _{value}		0.179	0.186	0.0001

Averages that have a common code do not have a significant difference. ($P \leq 0.05$)

که نشان می‌دهد اثر سطوح استویا در زمان‌های مختلف یکسان نبود.

۳-۲- ویژگی‌های حسی

نتایج حاصل از جایگزینی استویا بر ویژگی‌های حسی نمونه‌های بستنی حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در

با توجه به جدول ۲ اثر متقابل سطوح مختلف استویا در طول زمان نگهداری برای هر دو صفات میزان pH و اسیدیته معنی‌دار نبود، که نشان می‌دهد اثر سطوح مختلف استویا در زمان‌های مختلف یکسان بود. ولی اثر متقابل سطوح استویا در طول زمان نگهداری بر روی زنده‌مانی باکتری دارای اختلاف معنی‌دار بود

جدول‌های مقایسه میانگین ۳ و ۴ ارایه شده است. بین سطوح استویا در همه ویژگی‌های حسی به‌غیراز بافت و احساس دهانی اختلاف معنی‌دار نبوده و در این ویژگی اختلاف معنی‌دار بود. بین زمان‌های مختلف ارزیابی نیز در کلیه

Table 3 Average comparison of Stevia and storage periods (days) in the sensory characteristics of samples

Stevia	Flavor & Aroma	Sweetness	Appearance & Colour	Texture
100% Sugar	4.05	4.50	3.45	4.55 ^a
90% sugar, 10% Stevia	3.80	4.55	3.40	3.50 ^c
75% sugar, 25% Stevia	3.95	4.30	3.30	3.85 ^b
50% sugar, 50% Stevia	3.70	4.25	3.30	3.70 ^{bc}
SEM	0.146	0.227	0.161	0.103
P _{value}	0.347	0.383	0.883	0.0001
storage periods (days)				
7	3.975	4.45	3.52 ^a	3.87
14	3.775	4.35	3.20 ^b	3.92
SEM	0.0785	0.0776	0.067	0.10
P _{value}	0.080	0.369	0.0015	0.7266

Averages that have a common code do not have a significant difference. ($P \leq 0.05$)

Table 4 Comparison of the average interaction effect (Stevia $\times$ days) in the sensory characteristics of samples

Combined treatment (Stevia $\times$ days)	Flavor & Aroma	Sweetness	Appearance & Colour	Texture
100% Sugar	4.20	4.60	3.60	4.70 ^a
90% sugar, 10% Stevia	3.80	4.60	3.70	3.80 ^{bc}
75% sugar, 25% Stevia	4.10	4.30	3.50	3.40 ^{cd}
50% sugar, 50% Stevia	3.80	4.30	3.30	3.60 ^{cd}
100% Sugar	3.90	4.40	3.30	4.40 ^a
90% sugar, 10% Stevia	3.80	4.50	3.10	3.20 ^d
75% sugar, 25% Stevia	3.80	4.30	3.10	4.30 ^{ab}
50% sugar, 50% Stevia	3.60	4.20	3.30	3.80 ^{bc}
SEM	0.157	0.155	0.134	0.20
P _{value}	0.7506	0.9367	0.1754	0.0038

Averages that have a common code do not have a significant difference. ($P \leq 0.05$)

۲/۲۳ Log cfu/g کاهش یافت که با نتایج این مطالعه مطابقت ندارد [۱۶]. حکمت و مک ماهون (۱۹۹۲) مشاهده نمودند که میزان این باکتری در طی ۱۷ هفته نگهداری نمونه‌های بستنی در ۲۹- درجه سانتی‌گراد کاهش داشته است، که مغایر با نتایج این مطالعه بود [۱۷].

روحی و همکاران در بررسی زنده‌مانی لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس در شیرکائو سین بیوتیک طی ۲۱ روز نگهداری در دمای یخچالی مشاهده نمودند، که تا روز ۱۴ نگهداری افزایش داشت، که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد [۱۸]. این تفاوت‌های می‌تواند به علت تفاوت در فن‌آوری تولید، نوع ترکیبات، دمای مختلف نگهداری و اختلاف pH آمیخته‌ها باشد.

اثر متقابل سطوح مختلف استویا در زمان برای ویژگی بافت بستنی معنی‌دار بود که نشان می‌دهد اثر سطوح مختلف استویا در طول زمان نگهداری یکسان نبود ولی اثر متقابل در صفات عطر و طعم، شیرینی و ظاهر و رنگ غیر معنی‌دار بود. بیشترین تعداد باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس در روز چهاردهم در سطوح استویای ۱۰٪ و ۵۰٪ به ترتیب $9/49 \pm 0/20$ LogCFU/g و $9/20 \pm 0/20$ LogCFU/g بود. تعداد باکتری در تیمارهای فوق با سایر سطوح تیماری اختلاف معنی‌دار نشان داد (جدول ۲). سالم و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه زنده‌مانی چند گونه پروبیوتیکی در بستنی نشان دادند که میزان زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس طی ۱۲ هفته نگهداری به میزان

کمترین میزان باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس در روز چهاردهم در نمونه کنترل به تعداد $7/32 \pm 0/20 \text{ LogCFU/g}$ بود (جدول ۲) و در نمونه های کنترل و ۲۵٪ استویا تعداد باکتری طی ۱۴ روز کاهش یافته بود.

همایونی و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی رشد زنده مانیاکتری های لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس کازئی^۷، بیفیدوباکتریوم بیفیدوم^۸ و بیفیدوباکتریوم لانگوم^۹ در شرایط مشابه بستنی نتیجه گرفتند که زنده مانیاکتری های پروبیوتیک استفاده شده در بستنی ممکن است متأثر از فشار اسمزی وابسته به ساکارز باشد و پایداری به فشار اسمزی ساکارز، یک فاکتور وابسته به گونه باشد و باعث کاهش میزان باکتری در مدت نگهداری گردد. به نظر می رسد که مورد فوق با نتایج حاصل از نمونه کنترل این بررسی مطابقت دارد [۱۹].

هاشمی و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی نشان دادند که پس از نگهداری نمونه های بستنی پروبیوتیک در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد تا ۳۰ روز تغییر معنی داری در تعداد باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس مشاهده نشد، در حالی که در مطالعه کنونی تعداد باکتری در ۱۴ روز نگهداری در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد افزایش معنی داری نشان داد [۸].

طبق مطالعه عبقری و همکاران جمعیت اولیه باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس طی ۱۲ هفته نگهداری در ۱۹- درجه سانتی گراد کاهش داشت، که با نتایج حاصل مطابقت دارد [۱].

در تمامی نمونه ها در طی مدت ۱۴ روز نگهداری میزان زنده مانیاکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس بیشتر از مقدار توصیه شده $\log\text{CFU/gv}$ بود و به نظر می رسد که با توجه به نتایج حاصل از فلاح (۲۰۱۴) و آقایی و همکاران (۲۰۱۵) اثر ضد باکتریایی استویا مرتبط با میزان مصرفی آن در فرآورده می باشد و برای بروز این ویژگی میزان استفاده از استویا اهمیت فراوانی دارد [۲۰ و ۲۱].

لاکتوباسیلوس ها دارای آنزیم های بتا-گالاکتوزیداز و یا بتا-فسفوگالاکتوزیداز هستند که باعث توانایی این میکروارگانیسم هادر استفاده از لاکتوز می شوند [۲۲]. بر اساس نتایج حاصل از مطالعه کونوا و همکاران (۲۰۱۳) مشاهده شده است که باکتری های لاکتوباسیل و بیفیدوباکتر ها قادر به

مصرف ربانودپازید آ و استویول گلیکوزیدز از استویا ربانودیانا به عنوان منبع کربن می باشند [۵].

برخی از محصولات لبنی مثل بستنی در فرمولاسیون خود دارای مقادیر مختلفی شکر (ساکارز) هستند. زنده مانیاکتری های پروبیوتیکی مورد استفاده در این محصولات ممکن است تحت تأثیر فشار اسمزی ناشی از ساکارز واقع شود [۲۳].

کوچوکچتین و همکاران (۲۰۱۶) در بررسی سه روش متفاوت برای بستنی پروبیوتیک نشان دادند که زنده مانیاکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس در بستنی، در روش هایی که در آن مخلوط بستنی توسط این باکتری قبل از انجماد تخمیر می شد نسبت به روشی که عمل تخمیر صورت نمی گرفت، بعد از ۹۰ روز نگهداری بالاتر از حد توصیه شده بود [۲۴].

با توجه به جدول های ۱ و ۲ بین سطوح مختلف استویا و اثر متقابل سطوح استویا در طول زمان نگهداری از نظر pH اختلاف معنی دار نبود که نشان می دهد که اثر سطوح مختلف استویا در زمان های مختلف یکسان بود. هاشمی و همکاران نشان دادند که pH بستنی های مختلف اختلاف معنی داری نداشتند که با نتایج مطالعه کنونی مطابقت داشت [۸]. عبقری و همکاران (۱۳۸۷) نشان دادند که pH بستنی در مراحل رسیدن، انجماد و نگهداری، به طور معنی داری تغییر نکرده است که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد [۱].

بین زمان های مختلف ارزیابی در میزان pH اختلاف معنی دار وجود نداشت (جدول ۱). عبقری و همکاران (۱۳۸۷) در نتایج خود نشان دادند که میزان pH مخلوط بستنی با افزودن باکتری به طور معنی داری ($P < 0/05$) کاهش پیدا کرد، که با نتایج این بررسی مطابقت ندارد [۱].

۳-۵- ارزیابی تغییرات اسیدیته

نتایج نشان می دهد بین سطوح مختلف استویا و زمان های مختلف نگهداری از نظر اسیدیته اختلاف معنی دار وجود داشت (جدول ۱). اثر متقابل سطوح مختلف استویا در طول زمان نگهداری برای اسیدیته معنی دار نبود که نشان می دهد اثر تیمارها در زمان های مختلف یکسان بود (جدول ۲). اسیدیته در طول ۱۴ روز نگهداری افزایش معنی داری را نشان داد (جدول ۲). عبقری و همکاران (۱۳۸۷) در نتایج خود نشان دادند که اسیدیته مخلوط بستنی با افزودن باکتری به طور معنی داری ($P < 0/05$) کاهش پیدا کرد، که با نتایج این بررسی مطابقت ندارد [۱].

7. *Lactobacillus casei*
8. *Bifidobacterium bifidum*
9. *Bifidobacterium longum*

ویجایاگیتا و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که در بستنی پروبیوتیک تهیه‌شده با لاکتوباسیلوس / اسیدوفیلوس میزان اسیدیته به‌صورت معنی‌داری افزایش یافته بود، که با نتایج حاصل مطابقت دارد [۲۵]. ویسی و همکاران (۱۳۹۳) در بررسی میزان بقای باکتری‌های لاکتوباسیلوس / اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس در ماست‌های پروبیوتیک مشاهده نمودند که میزان اسیدیته، از ابتدا تا انتهای مطالعه به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت، که با بررسی حاضر مطابقت داشت [۲۶]. به نظر می‌رسد با توجه به خصوصیات باکتری مورد استفاده افزایش اسیدیته در طول زمان نگهداری قابل توجیه باشد همچنین از طرف دیگر استویا خصوصیات ضد میکروبی نیز دارد که می‌تواند با افزایش مدت زمان نگهداری از افزایش تعداد باکتری جلوگیری نماید.

سطوح مختلف استویا بر روی ویژگی عطر و طعم نمونه‌ها تأثیر معنی‌داری نداشت که با نتایج حاصل از اوزدمیر و همکاران (۲۰۱۵) که تولید بستنی با استفاده از شیرین‌کننده استویا را بررسی نمودند، مطابقت دارد [۲۷]. مقبولیت نمونه فاقد استویوزید از نظر عطر و طعم بیشتر از سایر نمونه‌ها با امتیاز ۴/۰۵ بود. غلامعلیزاده و صفری (۱۳۹۲) در نتایج خود نشان دادند که بیشترین مقبولیت از نظر عطر و طعم مربوط به نمونه حاوی ۵۰٪ استویا بود که با نتایج این بررسی مطابقت نداشت [۲۸]. از نظر شیرینی بین نمونه‌ها با سطوح مختلف استویا اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید و بیشترین مقبولیت مربوط به نمونه ۲ با ۱۰٪ استویا بود (جدول ۳). در مطالعه ای، غلامعلیزاده و صفری نشان دادند که بین سه نمونه کنترل و نمونه‌های حاوی ۲۵٪ و ۵۰٪ استویا تفاوت معنی‌داری وجود نداشت، که با نتایج مطالعه کنونی همخوانی داشت [۲۸].

در هیچ‌یک از نمونه‌ها از نظر ظاهر و رنگ اختلاف معنی‌داری نبود (جدول ۳) که می‌توان گفت این ویژگی تنها متأثر از رنگ پودر کاکائو به‌کاررفته در فرمولاسیون بستنی بود که این نتایج با مشاهدات غلامعلیزاده و صفری (۱۳۹۲) مطابقت داشت [۲۸]. بیشترین مقبولیت در این ویژگی در نمونه کنترل بود (جدول ۳). علیزاده و همکاران در بررسی تأثیر استویا بر ویژگی‌های بستنی مشاهده نمودند که مقدار متفاوت استویا و ساکارز منجر به تفاوت در رنگ محصولات نگردید که مطابق با نتایج مطالعه کنونی باشد [۲۹].

بین زمان‌های مختلف در این ویژگی اختلاف معنی‌دار بود و بیشترین امتیاز مربوط به روز هفتم نمونه‌برداری بود (جدول ۳).

بین سطوح مختلف استویا در زمان از نظر ویژگی بافت و احساس دهانی اختلاف معنی‌داری بود که نشان می‌دهد اثر سطوح مختلف استویا در زمان‌های مختلف یکسان نبود (جدول ۴).

نتایج ارزیابی حسی در مطالعه غلامعلیزاده و صفری نشان داد که تفاوت معنی‌دار در ویژگی بافت و احساس دهانی نمونه‌ها می‌تواند ناشی از کاهش ماده خشک کل در نمونه‌ها با کاهش مقدار شکر باشد که منجر به تضعیف بافت و احساس دهانی می‌شود، که با نتایج این مطالعه نیز مطابقت دارد و دلایل می‌تواند قابل تعمیم باشد [۲۸]. همچنین اختلاف معنی‌دار نمونه‌های حاوی ۱۰، ۲۵ و ۵۰ درصد استویا با نمونه کنترل می‌تواند مربوط به خطای دستگاه بستنی‌ساز خانگی و کاهش کارایی مطلوب در عمل سرد کردن مخلوط بستنی در حین هم زدن از نمونه ۱ به نمونه ۴ باشد (جدول ۴). ویژگی‌های حسی تمامی نمونه‌ها در طی ۱۴ روز نگهداری کاهش یافته بود.

در مطالعه آراندا و همکاران بر روی اثرات جایگزینی استویا با شکر بر روی ویژگی‌های حسی، نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌دار در بین نمونه‌های مختلف از نظر میزان استویا بر روی ویژگی‌های حسی مشاهده نگردید [۳۰].

ویجایاگیتا و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه‌ای که انجام دادند نشان دادند که با افزایش درصد باکتری لاکتوباسیلوس / اسیدوفیلوس از ۱٪ به ۲٪ در فرمولاسیون بستنی ویژگی‌های طعم، بافت و رنگ نمونه‌ها کاهش یافته بود، که با توجه به افزایش تعداد باکتری در این مطالعه طی مدت نگهداری با نتایج حاضر مطابقت دارد [۲۵].

سالم و همکاران (۲۰۰۵) طی یک تحقیق تولید بستنی پروبیوتیک با استفاده از باکتری‌های لاکتوباسیلوس / اسیدوفیلوس، بیفیدوباکتریوم بیفیدوم، لاکتوباسیلوس روتری^{۱۰}، لاکتوباسیلوس گازری^{۱۱} و لاکتوباسیلوس رامنوس^{۱۲} طی ۱۲ هفته نگهداری در فریزر اظهار داشتند که تمام نمونه‌های بستنی امتیاز بالایی در ارزیابی ارگانولپتیک به دست آوردند و در تمام نمونه‌ها طعم پروبیوتیک مشخص گزارش نگردید [۱۶].

بستنی می‌تواند به‌عنوان حامل مناسب، باقابلیت ماندگاری طولانی، جهت حمل باکتری‌های سودمند مورد نظر و رساندن آن به مصرف‌کننده استفاده شود. عواملی نظیر اسیدیته کم

10. *Lactobacillus reuteri*11. *Lactobacillus gasseri*12. *Lactobacillus rhamnosus*

- [2] Otroshy, M., Mokhtari, A., (2014), Health benefits of Stevia. Esfahan, Nossoh, 9-24.
- [3] Simonsohn, B., (1954), Stevia. Khatami, H., Tehran, Yarane Alavi, 9-23.
- [4] Yogiraj R., Anantrao N., Pritam K., Shaddha S., (2014), Preparation of ice-cream using natural sweetener Stevia. Food Science Research Journal, 5(1): 30-33.
- [5] Kunova, G., Rada, V., Vidailac, A., Lisova, I., (2014), Utilization of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) by Lactobacilli and Bifidobacteria in in vitro conditions. Folia Microbiol, 59(3): 251-255.
- [6] Khosravi Darani, K., Koshaki, M., (2008), Probiotics in milk and Dairy product. Tehran, Marze Danesh.
- [7] Bonyadi, F., Tukmechi, A., Mohebalian, H., (2014), An overview of probiotics and their role in managements of cancer. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences, 24 (122): 128-140.
- [8] Hashemi, M., Geisari, H., Shekar Forosh, Sh., (2013), Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bacillus coagulance* in low fat probiotic and sinbiotic ice cream. 3 (3): 57-65.
- [9] Lin, T., Gruen, I., (2012), Sensory analysis, instrumental analysis and consumers' acceptance toward multifunctional ice creams. A Dissertation presented to the Faculty of the Graduate School at the University of Missouri.
- [10] Maghsoudi, S., (2011), The technology of ice cream produsing. Tehran, Elm Keshavarzi Iran, 111-113.
- [11] Institute of Standards and Industrial Research of Iran, (2006), Milk and milk products – determination of titrable acidity and value pH – test method. ISIRI 2852.
- [12] Institute of Standards and Industrial Research of Iran, (2008), Ice cream – specifications and test methods. ISIRI 2450.
- [13] Institute of Standards and Industrial Research of Iran, (2013), Fermented milks – determination of titrable acidity – potentiometric method. ISIRI 5222.
- [14] Institute of Standards and Industrial Research of Iran, (1998), Ice cream- Sensory evaluation method. ISIRI 4937.
- [15] Institute of Standards and Industrial Research of Iran, (2007), Milk products – Enumeration of presumptive *Lactobacillus acidophilus* on a selective medium – Colony-count technique at 37°C. ISIRI 9616.

بستنی، محتویات زیاد چربی و ماده جامد بدون چربی، حضور حباب‌های هوا که رشد کریستال‌های یخ را کنترل می‌کنند و حضور کازئین، ساکارز و لاکتوز در مخلوط بستنی که طی انجماد می‌توانند اثر حفاظتی بر روی باکتری‌ها داشته باشند، از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر بقای مطلوب باکتری‌ها محسوب می‌شوند[۱].

۴- نتیجه گیری

بستنی به دلیل داشتن ماده خشک بالا و pH خنثی، غذای مناسبی برای توزیع پروبیوتیک‌ها در بین مصرف‌کنندگان است. این مطالعه نشان داد که افزودن باکتری‌های پروبیوتیک به مخلوط اولیه بستنی بلافاصله قبل از انجماد، روش مناسبی برای تولید بستنی پروبیوتیک می‌باشد و تغییرات محسوسی در ویژگی‌های حسی محصول در مقایسه با بستنی معمولی ایجاد نمی‌کند. درنهایت می‌توان گفت که استفاده از باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس در مخلوط بستنی کاکائویی حاوی استویا در جهت تولید بستنی پروبیوتیک با کالری کمتر امکان‌پذیر می‌باشد. امید است در آینده تحقیقات تکمیلی با استفاده از گونه‌ها و سوش‌های دیگر باکتری‌های پروبیوتیک و همچنین سایر شیرین‌کننده‌های کم‌کالری و یا پری بیوتیک‌ها انجام گیرد.

۵- تقدیر و تشکر

مقاله حاضر مستخرج از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد، رشته علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر می‌باشد. نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از مساعدت‌های آقای دکتر امیررضا احمدزاده جهت انجام آنالیزهای آماری و خانم مهندس افسانه صفری در انجام این تحقیق تشکر و قدردانی نمایند.

۶- منابع

- [1] Abghari, A., Sheikh-Zeinaddin, M., Soleimanian-Zad, S., Dokhani, S., (2008), Survival of *Lactobacillus acidophilus* in a non-fermented ice cream. 18th National Congress on Food Technology, Mashhad, Iran.

- environmental sciences, Malaysia, Institute of Saramad Hamayesh Karin.
- [24] Kucukcetin, A., Ayse Asci, A., Comak Gocer, E.M., Muammer, D., Atamer, Z., Hinrichs, J., (2016), Viability of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 incorporated into ice cream using three different methods. Dairy Science and Technology, 96(4), 477-487.
- [25] Vijayageetha, V., Khursheed Begum, Sk., Kotilinga Reddy, Y., (2011), Thechnology and Quality attributes of Porobiotic of Ice cream. Tamilnadu Journal of Veterinary & Animal Sciences, 7 (6) 299-302.
- [26] Veisy, M., Vakili, M., Jarrahzadeh, M., Delaviz, A., Hordani, A., Mohammadi, F., (2013), Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in probiotic Yogurt. Journal of Medical Science Jondi Shapour, 13 (3): 364-357.
- [27] Ozdemir, C., Arslaner, A., Ozdemir, S., Allahyari, M., (2015), The production of ice cream using stevia as a sweetener. Journal of Food Science and Technology, 52(11): 7545-7548.
- [28] Gholamalizadeh, F., Safari, A., (2015), Evaluation of replacement sweetener Stevia on physicochemical and organoleptic properties of traditional ice cream. M.Sc thesis on Agricultural – Food Science and Technology, Islamic Azad University, Shabestar.
- [29] Alizadeh, M., Azizi-Lalabadi, M., Kheirouri S., (2014), Impact of Using Stevia on Physicochemical, Sensory, Rheology and Glycemic Index of Soft Ice Cream. Food and Nutrition Sciences, 5(4): 390-396.
- [30] Aranda-Gonzalez, I., Perera-Pacheco, M., Barbosa-Martín, E., Betancur-Ancona, D., (2016), Replacing sugar with *S. rebaudiana* extracts on the physicochemical and sensory properties of strawberry ice cream. Ciencia Rural, 46(4): 604-609.
- [16] Salem, M.M.E., Fathi, F.A., Awa, R.A., (2005), Production of Probiotic Ice cream. Polish Journal of Food Nutritional Sciences, 14/55(3): 267–271.
- [17] Hekmat, SH., McMahon, D.J., (1992), Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in Ice Cream for Use as a Probiotic Food. Journal of Dairy Science, 75(6): 1415-1422.
- [18] Rouhi, M., Mohammadi, R., Sarlak, Z., Taslimi, A., Zabihzadeh, M., Mortazavian, AM., (2015), Study on the biochemical, microbiological and sensory characteristics of symbiotic chocolate milk. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology, 10(2): 47-58.
- [19] Homayouni, A., Ehsani, M.R., Azizi, A., Razavi, S.H., Yarmand, M.S., (2008), Growth and survival of some probiotic strains in simulated Ice cream conditions. Journal of Applied Sciences, 8 (2): 379-382.
- [20] Fallah Shojaee, M., (2013) Antioxidant and antimicrobial properties of leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni and it's effect on dairy desserts, M.Sc.Thesis University of Agricultural sciences, Gorgan.
- [21] Agaei Hosein-abadi, F., Mohammadi Sichani, M., Karbasizadeh, V., Mofid, M., (2014), Effect of Stevioside and *Stevia rebaudiana* on growth of *Streptococcus mutans*. Academic Journal of Lorestan University of Medical Sciences, 16 (1): 72-79.
- [22] Premi, L., Sandine, W., Elliker, P., (1972), Lacto-hydrolyzing enzymes of *Lactobacillus* species. Journal of Applied Microbiology. 24 (1): 51-57.
- [23] Ashrafi Yorganlo, R., Ehsani, A., Javanmard, N., Hasanpour Tasoji, N., (2015), Investigation of the Factors Influencing Probiotic Survival in Ice cream. Booklet summary of international conference on advanced research in agricultural and

Viability of *Lactobacillus acidophilus* in the cocoa ice cream containing sweetener Stevia

Eshaghi Makouei, G.¹, Movassagh, M. H.^{2*}

1. MSc Student in Food Science and Technology, Department of Food Science and Technology, Shabestar Branch, Islamic Azad University, Shabestar, Iran

2. Assistant Professor, Department of Food Hygiene and Food Quality Control, Faculty of Food Science And Technology, Shabestar Branch, Islamic Azad University, Shabestar, Iran

(Received: 2017/09/21 Accepted:2018/01/17)

Ice cream is a very popular meal and is demanded all over the world. Some ice cream attributes suggest that this popular dessert can act as a functional probiotic food. This study; evaluated the possibility of producing probiotic cocoa ice cream, using Stevia as a natural sweetener. Stevia was replaced with 0, 10, 25 and 50% sugar-based ice cream formulations in samples containing *Lactobacillus acidophilus*, and the samples were tested for bacterial viability, acidity, pH and sensory evaluation in three replications in storage period of 1, 7 and 14 days. The highest count of *Lactobacillus acidophilus* in 10% and 50% samples contained 9.49 ± 0.20 and 9.19 ± 0.20 log CFU/g, respectively. The bacteria count in all samples was higher than the amount determined during the storage period. Increasing the amount of Stevia in the formulation resulted to a decrease in the sensory properties of the samples. Ice cream containing stevia seems to be used as a carrier for probiotic bacteria.

Keywords: Stevia, Cocoa ice cream, Probiotic, *Lactobacillus acidophilus*

* Corresponding Author E-Mail Address: movassagh2@yahoo.com