



## زنده‌مانی بیفیدوباکتریوم انیمالیس زیرگونه لاکتیس در بستنی کاکائویی حاوی شیرین‌کننده استویا

گلناز اسحق‌ی ماکویی<sup>۱</sup>، محمد حسین موثق<sup>۲\*</sup>

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

۲- دکتری تخصصی بهداشت مواد غذایی، دانشیار گروه دامپزشکی، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شبستر، ایران.

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ‌های مقاله :	بستنی به دلیل قابلیت زیاد بقای پروبیوتیک‌ها در آن و پرتفردار بودن آن به سبب خواص حسی ویژه، محیط مناسبی برای انتقال پروبیوتیک‌ها به بدن است. هدف از این مطالعه بررسی امکان تولید بستنی کاکائویی پروبیوتیک با استفاده از استویا می‌باشد. میزان شکر در فرمولاسیون پایه بستنی در درصدهای مختلف ۰، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ با شیرین‌کننده استویا در نمونه‌های حاوی باکتری بیفیدوباکتریوم انیمالیس زیرگونه لاکتیس جایگزین شد و نمونه‌ها در دوره‌های زمانی ۱، ۷ و ۱۴ روزه از نظر زنده‌مانی باکتری، میزان اسیدیته، pH و ارزیابی حسی در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین تعداد باکتری در نمونه حاوی ۵۰ درصد استویا در روز یک به میزان $10^{5.6} \pm 0.17$ Log cfu/g بود. شمارش تعداد باکتری در تمامی نمونه‌ها بیشتر از حد مطلوب در طول دوره نگهداری بود. همچنین افزایش درصد استویا در نمونه‌ها باعث کاهش ویژگی‌های حسی نمونه‌ها گردید. با توجه به نتایج حاصله برای تولید بستنی با کالری کم می‌توان بستنی کاکائویی حاوی ۵۰ درصد استویا را برای تولید پیشنهاد داد.
کلمات کلیدی: بستنی کاکائویی، استویا، پروبیوتیک، بیفیدوباکتریوم انیمالیس زیرگونه لاکتیس.	
DOI: 10.52547/fsct.18.09.06	
* مسئول مکاتبات: movassagh2@yahoo.com	

## ۱- مقدمه

بستنی به‌عنوان یک محصول پرطرفدار در بین مصرف‌کنندگان فرآورده‌های لبنی محسوب می‌شود. در بین مصرف‌کنندگان کودکان بیشترین تمایل را به استفاده از این محصول دارند [۱]. در میان ترکیبات بستنی، شیرین‌کننده‌ها نقش مهمی را در خواص حسی بستنی دارند. به دلایل اقتصادی و رئولوژیکی، ساکارز بیشترین کاربرد را به‌عنوان شیرین‌کننده در فرآورده‌های بستنی دارد. با این وجود مصرف فراوان ساکارز مضرات زیادی دارد. بنابراین در دهه اخیر، شیرین‌کننده‌های مصنوعی به‌عنوان جایگزین ساکارز پیشنهاد شده است [۲]. یکی از جایگزین‌های طبیعی شکر که موردپسند واقع شده است استویا می‌باشد. استویا ریائودیانا<sup>۱</sup> یک گیاه شیرین‌کننده چندساله از خانواده آستراسیا<sup>۲</sup> با منشأ آمریکای جنوبی است [۳]. پودر استویا ۳۰۰-۲۰۰ مرتبه شیرین‌تر از ساکارز است [۴]. برگ‌های استویا حاوی مخلوطی از استویوزیدها هستند که به‌عنوان منابع مناسب فیبر، مواد معدنی و اسیدهای آمینه ضروری در رژیم غذایی محسوب می‌شوند. امروزه به علت ساختار شیمیایی استویا و وجود مواد فوتوشیمیایی ارتقادهنده سلامت، استویا به‌عنوان جایگزین برای ساکارز موردتوجه قرار گرفته است [۵]. جذب کم در قسمت ابتدای روده گوارش، عدم تجزیه توسط آنزیم‌های گوارشی و مصرف توسط فلور میکروبی روده سبب این باور شده است که استویا ممکن است ویژگی‌های پری‌بیوتیکی داشته باشد [۳]. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که اگر در مقادیر مناسب تجویز شوند آثار مفیدی بر سلامت میزبان خواهند داشت [۶]. غذاهایی که حاوی این باکتری‌ها هستند در زمره غذاهای عمل‌گرا یا فراویژه قرار می‌گیرند و بر طبق توصیه فدراسیون بین‌المللی فرآورده‌های لبنی، این غذاها باید حاوی  $10^6$  Log cfu/g باکتری پروبیوتیک باشند و مصرف‌کننده بایستی حداقل ۱۰۰ گرم در روز از این غذا را مصرف بکند تا اثرات مفید این دسته از غذاها مشاهده گردد [۷].

بعضی از این میکروارگانیسم‌ها سویه‌های انتخابی باکتری‌های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم هستند [۸]. شکی نیست که

غذاهای شیری بهترین حامل‌های شناخته‌شده برای پروبیوتیک‌ها می‌باشند و بستنی به‌عنوان یک محصول شیری قابلیت این را دارد که به‌عنوان یک حامل برای رساندن پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها به بدن مورد استفاده قرار گیرد [۶].

بنابراین هدف از این مطالعه بررسی زنده‌مانی بیفیدوباکتریوم انیمالیس زیرگونه لاکتیس<sup>۳</sup> در بستنی کاکائویی سستی حاوی شیرین‌کننده استویا می‌باشد و کاهش میزان کالری بستنی مصرفی می‌باشد.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- انتخاب باکتری پروبیوتیک

در این تحقیق سلول‌های زنده بیفیدوباکتریوم انیمالیس زیرگونه لاکتیس (BB12) به‌صورت تک‌سویه، خالص و خشک‌شده انجمادی از شرکت هانسن (CHR-Hansen-Denmark) خریداری شد.

### ۲-۲- تولید بستنی

برای تهیه بستنی کربوکسی متیل سلولز، پودر کاکائو، شکر و یا پودر قند استویوزید در چهار سطح متفاوت صفر، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ درصد با شیر حرارت داده شده مخلوط و حل شد و سپس خنک گردید. مقدار ۰/۱۵ گرم از باکتری که حاوی Log cfu/g ۱۳/۸۷ باکتری بود به ۲۰ میلی‌لیتر شیر خنک شده افزوده و به ازای هر ۲۰۰ گرم بستنی چهار میلی‌لیتر از شیر حاوی باکتری به مخلوط بستنی افزوده و مخلوط گردید. مایه بستنی در فریزر قرار داده شد و سپس به مدت ۲۰ تا ۲۵ دقیقه در دستگاه بستنی‌ساز هم زده شد تا بستنی اصطلاحاً ببندد. سپس بسته‌بندی و کد‌گذاری شد، و در فریزر در دمای ۱۸- درجه سلسیوس جهت طی مرحله سخت شدن تا زمان انجام ارزیابی‌های حسی، تعیین pH، اسیدیته و میزان بقای باکتری نگهداری گردیدند [۹].

برای معادل‌سازی شکر و استویوزید در فرمولاسیون بستنی، یک کیلوگرم شکر با ۰/۰۰۲۸۵ کیلوگرم استویوزید معادل‌سازی شده بود [۹]. فرمولاسیون سطوح مختلف استویا و شکر در نمونه‌های بستنی در جدول ۱ نشان داده شده است.

1. *Stevia rebaudiana*  
2. *Asteraceae*

3. *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*

**Table 1** Formulation of different levels of stevia and sugar in ice cream samples

Ice cream samples (1000g)	Milk (g)	Stevia(g)	Sugar(g)	Cocoa(g)	Carboxymethyl cellulose (g)
100% Sugar (Control)	750	-	244	4	3
90% Sugar, 10% Stevia	750	0.069	219.6	4	3
75% Sugar, 25% Stevia	750	0.173	183	4	3
50% Sugar, 50% Stevia	750	0.347	122	4	3

(خیلی خوب، خوب، قابل قبول، ضعیف، غیرقابل قبول) مورد ارزیابی قرار گرفتند. بالاترین امتیاز برای خیلی خوب (۵) و کمترین امتیاز برای غیرقابل قبول (۱) در نظر گرفته شد [۱۳].

## ۲-۶- آنالیز میکروبی نمونه‌ها

برای تعیین میزان زنده‌مانی باکتری بیفیدوباکتریوم انیمالیس زیرگونه لاکتیس از محیط کشت Reinforced Clostridial Agar (Merck-Germany) استفاده شد [۱۴]. رقت‌های سریال از نمونه‌ها تهیه شد و برای کشت استفاده شد. کشت‌ها در داخل جار بی‌هوازی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری گردید و بعد از گرمخانه گذاری شمارش کلنی‌ها انجام پذیرفت. برای شمارش پلیت‌هایی در نظر گرفته شد که حاوی ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی بودند [۱۵].

## ۲-۷- روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمایش بر پایه طرح  $CRD^k$  با چهار تیمار (۱۰، ۲۵، ۵۰ درصد و نمونه شاهد) در سه تکرار در سه دوره زمانی ۱، ۷ و ۱۴ روز اجرا شد. تجزیه آماری بر طبق طرح پیشنهادی با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 (2000) تجزیه و تحلیل شد و مقایسه میانگین نمونه‌های مختلف با آزمون توکی در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

## ۳- نتایج و بحث

### ۳-۱- زنده‌مانی باکتری بیفیدوباکتریوم انیمالیس، میزان pH و اسیدیته

نتایج حاصل از جایگزینی استویا در جداول ۲ و ۳ نشان داده شده است.

با توجه به جدول (۲) می‌توان نتیجه گرفت که بین سطوح مختلف استویا و بین زمان‌های مختلف ارزیابی از نظر تعداد باکتری‌ها اختلاف معنی‌دار وجود دارد ( $P < 0.01$ ).

## ۲-۳- pH

اندازه‌گیری pH توسط دستگاه pH متر (HORIBA- Japan) انجام گرفت. بدین ترتیب که نمونه بستنی را داخل یک بشر ریخته و در حمام آب گرم ۴۰ درجه سلسیوس به آرامی هم زده شد تا هوای آن خارج گشت و همگن و یکنواخت شد. الکتروود pH متر را پس از کالیبراسیون و تنظیم دمای نمونه در ۲۰ درجه سلسیوس، داخل آن قرار داده و میزان pH آن یادداشت گردید [۱۰].

## ۲-۴- اسیدیته

برای اندازه‌گیری اسیدیته نمونه‌ها از روش پتانسیومتری استفاده شد [۱۱ و ۱۲]. در یک بشر ۵۰ میلی‌لیتری، حدود  $0.1 \pm 0.1$  گرم از نمونه توزین و به آن حدود ۱۰ میلی‌لیتر آب افزوده 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  $0.1 \pm 0.30$  به مدت زمان چهار تا پنج ثانیه ثابت باقی ماند. حجم محلول هیدروکسید سدیم مصرفی برحسب میلی‌لیتر، با دقت کمینه  $0.05$  میلی‌لیتر ثبت شد.

اسیدیته قابل عیار سنجی (I)، برحسب میلی مول‌های هیدروکسید سدیم در ۱۰۰ گرم، با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

$$I = V \times 10 / m$$

که در آن 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 [۱۲].

## ۲-۵- ارزیابی حسی نمونه‌ها

برای ارزیابی حسی بستنی ویژگی‌های وضع ظاهری، بافت و شکل، طعم (بو و مزه) و خواص آب شدن در نظر گرفته شد. جهت آزمون‌های حسی از روش هدونیک استفاده شد. بدین منظور ده نفر ارزیاب (پنج زن و پنج مرد) با سنین مختلف استفاده شد. نمونه‌های بستنی بر اساس چهار ویژگی رنگ و شکل ظاهری، بافت، عطر و طعم و شیرینی در پنج سطح

**Table 2** Comparison of the mean of different levels of stevia and time in terms of pH, acidity and survival of *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*

Stevia	pH	Acidity	Survival of <i>Bifidobacterium</i> (Log CFU/g)
100% Sugar	6.48	1.33 <sup>b</sup>	8.54 <sup>c</sup>
90% Sugar, 10% Stevia	6.41	1.37 <sup>b</sup>	9.15 <sup>b</sup>
75% Sugar, 25% Stevia	6.56	1.32 <sup>b</sup>	8.73 <sup>c</sup>
50% Sugar, 50% Stevia	6.55	1.59 <sup>a</sup>	9.71 <sup>a</sup>
SEM	0.128	0.36	0.125
P <sub>value</sub>	0.83	0.002	0.0008
storage period (day)			
1	6.66	1.52 <sup>a</sup>	9.27 <sup>a</sup>
7	6.33	1.38 <sup>b</sup>	9.34 <sup>a</sup>
14	6.52	1.32 <sup>b</sup>	8.47 <sup>b</sup>
SEM	0.10	0.025	0.075
P <sub>value</sub>	0.09	0.0002	0.0001

The means that have a same word do not differ significantly. ( $P \leq 0.05$ )**Table 3** Comparison of mean interaction (stevia  $\times$  time) on pH, acidity and survival of *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*

Stevia	Day	pH	Acidity	Survival of <i>Bifidobacterium</i> (Log CFU/g)
100% Sugar	1	6.71	1.44	8.84 <sup>cd</sup>
90% Sugar, 10% Stevia	1	6.88	1.51	8.77 <sup>cd</sup>
75% Sugar, 25% Stevia	1	6.49	1.38	8.92 <sup>d</sup>
50% Sugar, 50% Stevia	1	6.55	1.73	10.56 <sup>a</sup>
100% Sugar	7	6.44	1.28	9.01 <sup>bcd</sup>
90% Sugar, 10% Stevia	7	5.80	1.30	9.55 <sup>b</sup>
75% Sugar, 25% Stevia	7	6.53	1.35	9.39 <sup>bc</sup>
50% Sugar, 50% Stevia	7	6.53	1.58	9.42 <sup>bc</sup>
100% Sugar	14	6.30	1.27	7.78 <sup>c</sup>
90% Sugar, 10% Stevia	14	6.55	1.30	9.11 <sup>bcd</sup>
75% Sugar, 25% Stevia	14	6.65	1.23	7.89 <sup>c</sup>
50% Sugar, 50% Stevia	14	6.57	1.47	9.15 <sup>bcd</sup>
SEM		0.235	0.061	0.17
P <sub>value</sub>		0.12	0.64	0.0001

The means that have a same word do not differ significantly. ( $P \leq 0.05$ )

میزان باکتری بیفیدوباکتریوم/انیمالیس در نمونه شاهد و نمونه-های حاوی ۱۰ و ۲۵ استویا در هفته اول افزایش و طی هفته دوم کاهش داشته بود.

بین سطوح مختلف استویا و بین زمان‌های مختلف ارزیابی از نظر میزان pH و اثر متقابل سطوح استویا در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری نیز برای ویژگی pH اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید که نشان می‌دهد اثر سطوح مختلف استویا در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری یکسان می‌باشد (جدول ۱ و ۲). میزان pH در روز چهاردهم نسبت به روز اول ارزیابی کاهش داشته بود.

همچنین اثر متقابل سطح استویا در زمان در تعداد باکتری‌ها دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد ( $P < 0.01$ ) که نشان می‌دهد اثر مختلف استویا در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری بر تعداد باکتری یکسان نیست (جدول ۳).

بیشترین تعداد باکتری بیفیدوباکتریوم/انیمالیس در نمونه روز اول سطح استویا ۵۰ درصد مشاهده گردید. تعداد باکتری در این نمونه بستنی  $10.56 \pm 0.17$  Log cfu/g بود. باگذشت زمان تعداد باکتری کاهش یافته بود ولی حتی در روز چهاردهم در تمام سطوح استویا تعداد باکتری بیش از میزان توصیه‌شده ( $6$  Log cfu/g) بود (جدول ۳).

با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد که با جایگزینی شکر توسط استویا بین سطوح مختلف استویا و بین زمان‌های مختلف ارزیابی از نظر اسیدیته اختلاف معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) وجود دارد (جدول ۱). اثر متقابل سطوح مختلف استویا در زمان‌های نمونه‌برداری برای اسیدیته معنی‌دار نیست که نشان

می‌دهد اثر سطوح مختلف استویا در زمان‌های مختلف یکسان می‌باشد (جدول ۳).

### ۳-۲- ارزیابی حسی

نتایج حاصل از جایگزینی استویا بر ویژگی‌های حسی بستنی حاوی بیفیدوباکتریوم انیمالیس زیرگونه لاکتیس در جداول ۴ و ۵ نشان داده شده است.

**Table 4** Average comparison of Stevia and storage periods (days) on the sensory properties of samples

Stevia	Flavor & Aroma	Sweetness	Appearance & Color	Texture
100% Sugar	3.90 <sup>ab</sup>	4.05	3.45	4.15 <sup>a</sup>
90% Sugar, 10% Stevia	4.30 <sup>a</sup>	4.30	3.30	3.45 <sup>b</sup>
75% Sugar, 25% Stevia	4.35 <sup>a</sup>	4.35	3.30	3.45 <sup>b</sup>
50% Sugar, 50% Stevia	3.95 <sup>b</sup>	4.05	3.30	3.20 <sup>b</sup>
SEM	0.115	0.163	0.183	0.194
P <sub>value</sub>	0.013	0.42	0.91	0.0094
storage periods (days)				
7	3.88 <sup>b</sup>	4.05 <sup>b</sup>	3.10 <sup>b</sup>	3.40 <sup>b</sup>
14	4.38 <sup>a</sup>	4.33 <sup>a</sup>	3.58 <sup>a</sup>	3.73 <sup>a</sup>
SEM	0.093	0.095	0.098	0.082
P <sub>value</sub>	0.0006	0.047	0.0016	0.0083

The means that have a same word do not differ significantly. ( $P \leq 0.05$ )

**Table 5** Comparison of the average interaction effect (Stevia  $\times$  days) on the sensory properties of samples

Stevia	Day	Flavor & Aroma	Sweetness	Appearance & Color	Texture
100% Sugar	7	3.40	3.80	3.30	3.80 <sup>bc</sup>
90% Sugar, 10% Stevia	7	4	4.10	2.90	3.00 <sup>d</sup>
75% Sugar, 25% Stevia	7	4.20	4.40	3.00	3.50 <sup>bcd</sup>
50% Sugar, 50% Stevia	7	3.90	3.90	3.20	3.30 <sup>bcd</sup>
100% Sugar	14	4.40	4.30	3.60	4.50 <sup>a</sup>
90% Sugar, 10% Stevia	14	4.60	4.50	3.70	3.90 <sup>ab</sup>
75% Sugar, 25% Stevia	14	4.50	4.30	3.60	3.40 <sup>bcd</sup>
50% Sugar, 50% Stevia	14	4.00	4.20	3.40	3.10 <sup>cd</sup>
SEM		0.187	0.189	0.196	0.164
P <sub>value</sub>		0.108	0.35	0.384	0.027

The means that have a same word do not differ significantly. ( $P \leq 0.05$ )

بین اثر سطوح مختلف استویا در ویژگی عطر و طعم اختلاف معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) وجود داشت. از نظر ویژگی بافت و احساس دهانی اختلاف معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) وجود داشت و در ویژگی‌های شیرینی و ظاهر و رنگ اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید (جدول ۴). بین زمان‌های مختلف ارزیابی از نظر ویژگی‌های حسی اختلاف معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) وجود داشت (جدول ۵).

اثر متقابل سطوح مختلف استویا در زمان‌های مختلف نمونه-برداری برای ویژگی بافت و احساس دهانی معنی‌دار می‌باشد ( $P < 0.01$ ) که نشان می‌دهد اثر سطوح مختلف استویا در زمان‌های مختلف یکسان نیست ولی اثر متقابل در سایر ویژگی‌ها غیر معنی‌دار بود (جدول ۵).

در مطالعه اسحقی و موثق (۲۰۱۸) در مورد میزان زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس* در بستنی حاوی استویا بیشترین تعداد باکتری در نمونه‌های حاوی ۱۰ و ۵۰ درصد استویا بود که در مطالعه کنونی نیز نمونه حاوی ۵۰ درصد استویا بالاترین تعداد باکتری را نشان داد. [۹].

در مطالعه ارسال‌ر و همکاران (۲۰۱۹) افزودن استویا باعث کاهش تعداد باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک در نمونه بستنی ماست شده بود ولی در تمام نمونه‌ها نظیر نتایج مطالعه کنونی، تعداد باکتری‌های پروبیوتیک بیش از میزان توصیه‌شده ( $6 \text{ Log cfu/g}$ ) بود [۱۶].

روحی و همکاران (۲۰۱۵) در بررسی زنده‌مانی گونه‌های بیفیدوباکتریوم در شیرکاکائو سین بیوتیک طی ۲۱ روز نگهداری در دمای یخچالی مشاهده نمودند، که قابلیت زیستی بعد از روز ۷ نگهداری یخچالی کاهش داشت، که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد. در نمونه بستنی حاوی ۵۰ درصد استویا قابلیت زیستی باکتری بیفیدوباکتریوم انیمالیس در مدت نگهداری کاهش داشت [۱۷].

همایونی راد و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی زنده‌مانی بیفیدوباکتریوم لاکتیس<sup>۱</sup> در بستنی طی ۱۸۰ روز نگهداری در ۲۰- درجه سلسیوس شاهد کاهش در قابلیت زیستی باکتری بودند، که با نتایج حاصل مطابقت دارد [۱۸].

ویسی و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی میزان زنده‌مانی بیفیدوباکتریوم در ماست مشاهده کردند که تعداد باکتری در تمام نمونه‌ها در طول ۲۱ روز نگهداری به صورت معناداری کاهش یافت که با نتایج حاصل مطابقت دارد [۱۹].

فاوارو و همکاران (۲۰۰۶) مشاهده نمودند که بیفیدوباکتریوم بیفیدوم<sup>۷</sup> و بیفیدوباکتریوم لاکتیس در بستنی تخمیری با کشت استارتر ماست غنی‌شده با ویتامین C در طی ۱۵ هفته نگهداری در دمای ۱۸- درجه سلسیوس تغییر معنی‌داری نداشتند، که با نتایج این بررسی مغایرت دارد [۲۰].

شین و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند که بیفیدوباکترها و سایر باکتری‌های پروبیوتیک در ماست‌های تجارتي طی ۳۵ روز نگهداری به میزان ۳ لگاریتم کاهش یافته بود، که مطابق با نتایج مطالعه کنونی می‌باشد [۲۱].

در مطالعه روحی و همکاران میزان باکتری بیفیدوباکتریوم انیمالیس زیرگونه لاکتیس طی ۱۴ روز نگهداری در دمای ۱۸- درجه سلسیوس کاهش معنی‌داری داشت. به طوری که بیشترین تعداد باکتری در نمونه بستنی روز اول با سطح استویا ۵۰ درصد مشاهده گردید. اثرات ضد میکروبی اسیدهای آلی تولیدشده طی هفته اول نگهداری می‌تواند مسئول کاهش قابلیت زیستی بیفیدوباکتریوم‌ها پس از هفته اول باشد [۱۷]. افزایش اسید سبب اکسیداسیون بسیاری از ترکیبات مولکولی سلول مانند اسید چرب، پروتئین و اسیدنوکلوئیک شده و در نهایت منجر به تخریب سلول باکتری می‌گردد [۲۲]. استرس مکانیکی ناشی از مخلوط کردن و مراحل انجماد و همچنین ترکیب اکسیژن در مخلوط، ممکن است منجر به کاهش بیشتر در تعداد باکتری‌ها شود [۲۳].

رشد و بقای میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک مانند دیگر ارگانیسم‌ها تحت تأثیر دمای محیط اطراف است. آن‌ها به دلیل صدمه‌های وارده بر دیواره سلولی‌شان یا پاره شدن غشاء آن‌ها توسط کریستال‌های یخ تشکیل‌شده در محیط بیرون سلول می‌توانند آسیب ببینند. این احتمال وجود دارد که غشاء سلول‌ها با تشکیل کریستال‌های یخ درون سلولی و یا غلیظ شدن محیط بیرون سلولی پاره شوند. سرعت دهیدراته شدن سلول‌های میکروبی به میزان نفوذپذیری غشاء سلولی و محیط سطحی اطراف سلول که به شکل و اندازه سلول مرتبط است بستگی دارد. شایان‌ذکر است که اندازه کریستال‌های یخ با افزایش سرعت انجماد کاهش می‌یابد و کریستال‌های یخ درون سلولی بزرگ‌تر باعث آسیب بیشتر به سلول‌ها می‌شوند. بستنی‌های حاوی پروبیوتیک نوعی غذای منجمد هستند، بنابراین انجماد سریع مخلوط بعد از تلقیح با میکروارگانیسم‌ها تحت کنترل دقیق دمای نگهداری به حفظ بقای این میکروارگانیسم‌های شفاف‌بخش با میزان پیشنهادی که فعالیت بازدارندگی دارند کمک می‌کند [۲۴].

شیرین‌کننده‌ها (مانند لاکتوز و به‌ویژه ساکارز) که به عنوان ماده اصلی در دسرهای لبنی و بستنی استفاده می‌شود، تأثیر متفاوتی بر میزان زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در محصولات منجمد دارد. این مواد می‌توانند زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها از طریق فشار اسمزی مؤثر بر بقای سلول، کاهش دهند. همچنین می‌توانند در همان زمان زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها را به صورت یک عامل حفاظت‌کننده در برابر سرما افزایش دهند. نتیجه نهایی بستگی

5. *Lactobacillus acidophilus*6. *Bifidobacterium lactis*7. *Bifidobacterium bifidum*

به نوع و غلظت شیرین کننده‌ها، نوع میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، دما، سرعت انجماد و زمان نگهداری دارد. اثبات شده است که پلی ساکاریدهای زنجیر کوتاه نسبت به پلی ساکاریدهای زنجیر بلند اثر محافظتی بیشتری در برابر سرما دارند. پلی ساکاریدهای کوتاه زنجیر که با عنوان ترکیبات پری بیوتیک شناخته می‌شوند اثرات مفید بیشتری بر مقاومت پروبیوتیک‌ها دارند [۲۵].

آنزیم‌های متابولیک حاصل از پروبیوتیک‌های مرده ممکن است توانایی تخمیر سلول‌های زنده باقی مانده و سازگار شده را افزایش دهند که منجر به تغییرات بیوشیمیایی بیشتر شده و می‌تواند باعث کاهش مداوم و بیشتری در قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها شود [۱۷]. نمونه‌ها بیشترین تغییرات را در شاخص pH طی مدت نگهداری داشتند، که همین امر خود می‌تواند باعث نامناسب شدن محیط برای ماندگاری پروبیوتیک‌ها و کاهش قابلیت زیستی آن‌ها شود [۱۷].

مطالعه‌ای توسط کایلا ساپتی (۲۰۰۶) نشان داد که pH در طول مدت زمان نگهداری لاکتوباسیلوس / اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم کاهش یافت که مرتبط با فعالیت تخمیری باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک می‌باشد که با نتایج حاصل مطابقت دارد [۲۶].

اوزدمیر و همکاران (۲۰۱۵) تأثیر افزودن استویا بر ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و حسی بستنی را در چهار نمونه بستنی با استفاده از ساکارز و استویا به عنوان شیرین کننده (ساده + ساکارز، کاکائو + ساکارز، ساده + استویا، کاکائو + استویا) مورد ارزیابی قرار دادند. میزان pH نمونه‌ها حدود ۶/۵۰ و ۶/۶۲ بود که مطابق با نتایج این مطالعه می‌باشد [۲۷].

بیشترین میزان اسیدیته ۱/۵۹ در نمونه حاوی ۵۰ درصد استویا بود که تفاوت معنی داری با سایر نمونه‌ها دارد که با توجه به تعداد بالای باکتری در نمونه حاوی ۵۰ درصد استویا، تفاوت در اسیدیته می‌تواند ناشی از میزان استویا و فعالیت باکتری‌ها باشد (جدول ۱). کاهش اسیدیته در طی ۱۴ روز نگهداری در دمای ۱۸- درجه سلسیوس نیز می‌تواند در نتیجه کاهش تعداد باکتری‌ها در این مدت در کلیه نمونه‌ها باشد.

ویسی و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی میزان زنده ماندن بیفیدوباکتریوم در ماست مشاهده کردند میزان اسیدیته در تمام نمونه‌ها، از ابتدا تا انتهای مطالعه به صورت معنی داری افزایش یافت که با نتایج حاصل مغایرت دارد [۱۹].

در مطالعه غلامعلی زاده و صفری (۲۰۱۵) اسیدیته نمونه بستنی حاوی ۵۰ درصد استویا تفاوت معنی داری با نمونه شاهد و نمونه حاوی ۲۵ درصد استویا داشت و کمتر از بقیه نمونه‌ها بود که با نتایج مطالعه کنونی مطابقت ندارد [۲۸].

با توجه به جدول ۳ نمونه بستنی حاوی ۲۵ درصد استویا با امتیاز ۴/۳۵ و نمونه حاوی ۱۰ درصد استویا با امتیاز ۴/۳۰ بیشترین امتیاز را از نظر ویژگی عطر و طعم کسب نمودند که نشان می‌دهد افزایش میزان استویا تا ۲۵ درصد باعث بهبود ویژگی عطر و طعم نمونه‌ها گردیده است ولی در نمونه حاوی ۵۰ درصد استویا با امتیاز ۳/۹۵ افزایش استویا باعث افت در امتیاز این ویژگی گردیده است. بیشترین مقبولیت شیرینی در نمونه بستنی حاوی ۲۵ درصد استویا با امتیاز ۴/۳۵ کسب گردید که با ایجاد پس طعم تلخی با افزایش درصد استویا به ۵۰ درصد می‌تواند مرتبط باشد.

علیزاده و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که پس طعم تلخ مشکل اصلی در رابطه با بیشتر شیرین کننده‌ها می‌باشد که کاربرد آن‌ها را در غلظت‌های بالا را محدود می‌کند. علاوه بر این به نظر می‌رسد پس طعم تلخ استویوزید استمرار بیشتری در مقایسه با سایر شیرین کننده‌های طبیعی و مصنوعی داشته باشد، که با نتایج این بررسی مطابقت دارد [۲].

یوگیراج و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که امتیاز حسی نمونه‌های بستنی حاوی ۲/۲۵ درصد استویا بیشتر از نمونه‌های حاوی ۲/۵ درصد بود. همچنین نتیجه گرفتند که افزایش میزان استویا افزوده شده به نمونه‌های بستنی کیفیت حسی را کاهش می‌دهد، که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد [۲۹].

بیفیدوباکتری‌ها به نسبت دو به سه اسیدلاکتیک و اسیداستیک تولید می‌کنند. طعم و بوی اسیداستیک برای محصولات لبنی به عنوان طعم پروبیوتیکی بسیار نامطلوب است و ممکن است نیاز به استفاده از طعم دهنده باشد تا اثر آن را کاهش داده و یا کاملاً بپوشاند. با این وجود شایان ذکر است، محصولاتی شبیه بستنی پروبیوتیک غیر تخمیری معمولاً مشکلات حاصل از متابولیسم میکروبی را هنگامی که در دمای خیلی پایین (کمتر از ۱۸- درجه سلسیوس) نگهداری می‌شوند را ندارد. چون واکنش‌های بیوشیمیایی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک به حداقل می‌رسد [۲۴].

سطوح مختلف استویا تأثیر معنی داری بر ویژگی‌های حسی رنگ و ظاهر نمونه‌های بستنی نداشت که می‌توان نتیجه گرفت

حضور باکتری‌ها و استویا تأثیری بر رنگ و ظاهر نمونه‌ها نداشته و این ویژگی تنها متأثر از کاکائوی به‌کاررفته در فرمولاسیون بستنی می‌باشد.

علیزاده و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که مقدار متفاوت از استویا و ساکارز منجر به تفاوت در رنگ بستنی نشد که مطابق با نتایج این بررسی بود [۲]. در مطالعه غلامعلی‌زاده و صفری (۲۰۱۵) شکر و استویوزید تأثیری بر رنگ نمونه‌های بستنی نداشت و این ویژگی به میزان زعفران مورد استفاده در نمونه‌ها بستگی داشت که مطابق با نتایج حاصل از این بررسی می‌باشد [۲۸].

بهترین نمونه بستنی از نظر ویژگی بافت و احساس دهانی مربوط به نمونه شاهد با امتیاز ۴/۱۵ بود (جدول ۳). افت این ویژگی در سه نمونه بعدی می‌تواند متأثر از فاصله زمانی تهیه مخلوط تا ترکیب در دستگاه بستنی‌ساز باشد. همچنین باگذشت زمان کارایی دستگاه از نظر مایع خنک‌کننده کاهش یافته که باعث ایجاد تفاوت در بافت نمونه‌ها می‌گردد. با توجه به تهیه نمونه‌ها با دستگاه بستنی‌ساز خانگی انجام آزمایش‌های بیشتر در مورد تأثیر استویا بر بافت نمونه‌ها در سطح صنعتی نیاز می‌باشد. در طول مدت نگهداری تمامی ویژگی‌های حسی نمونه‌ها افزایش داشته است.

سالم و همکاران (۲۰۰۵) طی یک تحقیق تولید بستنی پروبیوتیک با استفاده از باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*، *لاکتوباسیلوس روتری*<sup>۸</sup>، *لاکتوباسیلوس گازری*<sup>۹</sup> و *لاکتوباسیلوس رامنوس*<sup>۱۰</sup> طی ۱۲ هفته نگهداری در فریزر اظهار داشتند که تمام نمونه‌های بستنی امتیاز بالایی در ارزیابی حسی به دست آوردند و در تمام نمونه‌ها طعم پروبیوتیک غالب نبود که نتایج آن‌ها با بررسی حاضر مطابقت دارد [۳۰].

## ۴- نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج حاصله برای تولید بستنی با کالری کم می‌توان بستنی کاکائویی حاوی ۵۰ درصد استویا را برای تولید پیشنهاد داد. فاکتورهایی وجود دارد که نشان می‌دهد بستنی و دسرهای منجمد پتانسیل بالایی دارند که به‌عنوان یک حامل غذایی برای مواد اولیه عمل‌گرا عمل کنند. اول از همه، بستنی

خود به‌عنوان یک محصول غذایی بسیار مفید مورد توجه قرار می‌گیرد. بستنی شامل مقدار زیادی مواد مغذی مانند چربی شیر، پروتئین‌ها، ویتامین‌ها، مواد معدنی می‌باشد. همچنین، بستنی به‌راحتی می‌تواند رنگی و یا طعمی شود. بنابراین، اگر مواد عمل‌گرا هرگونه رنگ یا طعم غیرقابل قبول داشته باشند، به‌راحتی می‌توان از طریق افزودن هرگونه رنگ یا طعم‌دهنده‌ها آن را پوشش داد [۳۱]. بر اساس نتایج حاصل از این بررسی، می‌توان با استفاده از باکتری *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* و شیرین‌کننده طبیعی استویا در جهت تولید یک محصول فراسودمند با ارزش تغذیه‌ای بالا و میزان کالری کمتر بهره جست. امید است در آینده بررسی‌های بیشتری در جهت تکمیل نتایج این مطالعه در سطح صنعتی و با استفاده از سایر گونه‌ها و سوش‌های پروبیوتیک و همچنین دیگر شیرین‌کننده‌های طبیعی (نظیر عسل) و یا پری بیوتیک‌ها انجام گیرد. البته امروزه بر روی استفاده از پلی‌ساکاریدها (نظیر اینولین، پلی‌دکستروز و مالتودکستروز) به‌جای چربی در فرآورده‌های لبنی مطالعاتی انجام گرفته است و گام‌هایی برای تولید محصولات لبنی سین‌بیوتیک برداشته شده است [۳۲].

## ۵- سپاس‌گزاری

مقاله حاضر مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر است. نویسندگان مقاله بر خود واجب می‌دانند که از مساعدت آقای دکتر علیرضا احمدزاده جهت انجام آنالیزهای آماری و خانم مهندس صفری برای همکاری در انجام تحقیق تشکر و قدردانی نمایند.

## ۶- منابع

- [1] Salehian, M., Salehifar, E., Esfahanizadeh, M., Karimzadeh, L., Rezaei, R., Molanejad, M., (2013), Microbial Contamination in Traditional Ice cream and Effective Factors. *Journal of Mazandaran University of Medical*, 23(99): 28-33.
- [2] 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.

8. *Lactobacillus reuteri*

9. *Lactobacillus gasseri*

10. *Lactobacillus rhamnosus*



- presumptive bifidobacteria- colony count technique at 37° C. No. 2450.
- [15] Movassagh, M.H. 2017. Practical manual of food safety, 1<sup>st</sup> publication, Islamic Azad University Press, 36-51.
- [16] Arslaner, A., Salik, M.A., Ozdemir, S., Akkose, A., (2019), Yogurt ice cream sweetened with sucrose, stevia and honey: Some quality and thermal properties, Czech Journal of Food Science, 37(6): 446-455.
- [17] Rouhi, M., Mohammadi, R., Sarlak, Z., Taslimi, A., Zabihzadeh, M., Mortazavian, A.M., (2015), Study on the biochemical, microbiological and sensory characteristics of symbiotic chocolate milk. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology, 10(2): 47-58.
- [18] Homayouni Rad, A., Yarmand, M. S., Ehsani, M. R., Azizi, A., (2008), Growth and survival of some probiotic strains in simulated Ice cream conditions. Journal of Applied Sciences, 8 (2): 379-382.
- [19] Veissi, M., Vakili, M., Jarahzadeh, M., Delaviz, E., Hardani, A., Mohammadi, F., (2014), Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in probiotic Yogurt. Jundishapur Journal of Medical Science, 13 (3): 357-364.
- [20] Favaro-Trindade, C.S., Bernardi, S., Bodini, R.B., De Carvalho Balieiro, J.C. De Almeida, E., (2006), Sensory Acceptability and Stability of Probiotic Microorganisms and Vitamin C in Fermented Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) Ice Cream. Journal of Food Science .71(6): 492-495.
- [21] Shin, H.S., Lee, J.H., Pestka, J.J., Ustunol, Z., (2000), Growth and viability of commercial *Bifidobacterium* spp. in skim milk containing oligosaccharides and inulin. Journal of Food Science, 65(5): 884-887.
- [22] Pan, X., Chen, F., Wu, T., Tang, H., Zhao, Z., (2009), The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT, Food Control, 20(6): 598-602.
- [23] Hagen, M., Narvhus, J.A., (1999), Production of ice cream containing probiotic bacteria. *Milchwissenschaft*, 54(5): 265-268.
- [24] Sakhavatizadeh, S., Bagheri, M., (2011), Ice cream as a probiotic food. Iranian Food Science and Technology Congress, Islamic Azad University, Quchan Branch.
- [25] Mohammadi, R., Mortazavian, A.M., Khosrokhavar, R., Gomes da Cruz, A., [3] Kunova, G., Rada, V., Vidaillac, 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.
- [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] Bahnas, M.W., Abbas, K.A., Metry, W.A., Neimate, A.H.E., (2019), A novel bio-fermented beverages from dairy by-products based with papaya pulp and stevia leaves, *Journal of Food and Dairy Science*, 10(2): 467-472.
- [6] 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.
- [7] Pourjafar, H., Mirzaei, H., Ghasemnejad, R., Homayouni Rad, A., (2011), Study of Morphological and Protective Characteristics of beads obtained from Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* Probiotic as a Predominant and Natural flora in human gut. *Journal of Army University of Medical Science*, 9(4): 233-240.
- [8] 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.
- [9] Eshaghi Makoei, G., & Movassagh, M.H., (2018), Viability of *Lactobacillus acidophilus* in the cocoa ice cream containing sweetener Stevia. *Journal of Food Science and Technology*, 15(82): 73-83.
- [10] Institute of Standards and Industrial Research of Iran, (2006), Milk and milk products – determination of titrable acidity and value pH – test method. ISIRI 2852.
- [11] Institute of Standards and Industrial Research of Iran, (2008), Ice cream – specifications and test methods. ISIRI 2450.
- [12] Institute of Standards and Industrial Research of Iran, (2013), Fermented milks – determination of titrable acidity – potentiometric method. ISIRI 5222.
- [13] Institute of Standards and Industrial Research of Iran, (1999), Ice cream- Sensory evaluation method. ISIRI 4937.
- [14] Iranian National Standards Organization, 2011. Milk products- enumeration of

- [29] Yogiraj R., Anantrao N., Pritam K., Sharddha S., (2014), Preparation of ice-cream using natural sweetener Stevia. Food Science Research Journal, 5(1): 30-33.
- [30] 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.
- [31] Lin, T.N., (2012), Sensory analysis, instrumental analysis and consumers 'acceptance toward multifunctional ice creams. Thesis of Ph.D. University of Missouri.
- [32] Bisar, G.H., El-Saadany, K., Khattab, A., El-Kholey, W.M., (2015), Implementing Maltodextrin, Polydextrose and Inulin in Making a Synbiotic Fermented Dairy Product, British Microbiology Research Journal, 8(5): 585-603.
- (2011), Probiotic ice cream: viability of probiotic bacteria and sensory properties. Annals of microbiology. 61(3): 411-424.
- [26] Kailasapathy, K., (2006), Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. LWT - Food Science Technology, 39(10): 1221-1227.
- [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.



## Viability of *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* in cocoa ice cream containing sweetener Stevia

Eshaghi Makouei, G. <sup>1</sup>, Movassagh, M. H. <sup>2\*</sup>

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

2. Associate Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shabestar Branch, Islamic Azad University, Shabestar, Iran.

### ARTICLE INFO

#### Article History:

Received 2021/ 02/ 06

Accepted 2021/ 07/ 13

#### Keywords:

Stevia,  
Cocoa ice cream,  
Probiotic,  
*Bifidobacterium animalis subsp Lactis*.

DOI: 10.52547/fsct.18.09.06

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

### ABSTRACT

Ice cream, because of its ability to survive probiotics in it and is popular due to its sensory properties, is a good environment for transmitting probiotics to the body. The purpose of this study was to investigate the possibility of producing probiotic cacao ice cream using Stevia. For this purpose, stevia was replaced with 0, 10, 25, and 50% sugar-based ice cream formulation in samples containing *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*, and the samples were tested for bacterial viability, acidity, pH, and sensory evaluation in three replication in period time 1, 7, and 14 days. The highest levels of *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* in 50% stevia on first day of storage was  $10.56 \pm 0.06$  Log cfu/g. The count of bacteria in all samples was more than optimal and determined during the storage period. Also, increasing the percentage of stevia, reduced the sensory properties of the samples. According to the results of the current study, for the production of low-calorie ice cream, cocoa ice cream containing 50% stevia can be suggested for production.