مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

بررسی زنده‌مانی سویه‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، بیفیدوباکتریوم و استرپتوکوکوس ترموفیلوس و تاثیر آن‌ها بر خواص حسی شکلات تلخ پروبیوتیک نگهداری در دمای اتاق و یخچال به مدت ۱۸۰ روز

نیما مباهی[1*]

۱- گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰ /۰۴/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۰۱

کلمات کلیدی:

پروبیوتیک،

شکلات تلخ،

زنده مانی،

خواص حسی.

DOI: 10.52547/fsct.18.121.10

DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.121.21.5

*مسئول مکاتبات:

n.mobahi@iau-ntb.ac.ir

چکیده

افزایش آگاهی جامعه نسبت به مزایای پیشگیری فراورده‌های فراسودمند موجب شده تا محصولات غذایی که محبوبیت زیاد و مصرف فراگیری دارند توسط محققین جهت بهبود سلامت جامعه انتخاب شوند. در این تحقیق شکلات تلخ پروبیوتیک[1] با استفاده از افزودن باکتری‌های *Bifidobacterium, UABla-12™* ،*Lactobacillus acidophilus, DDS-1®* و *Streptococcus thermophilus (TH-4®)* به شکل ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم و نشاسته مقاوم ذرت به شکلات تلخ ۶۰٪ تولید شده و زنده مانی پروبیوتیک‌ها و نیز تأثیر حضور این باکتری‌ها بر روی ویژگی‌های حسی شکلات در طول بازه نگهداری ۱۸۰ روزه در دو دمای ۴ °C و ۲۵ °C (با هدف تعیین دمای ذخیره سازی) با عبور از شبیه ساز دستگاه گوارش و هنگام تحویل به روده‌ها ارزیابی شد. در طی دوره نگهداری جمعیت هر سه سویه نسبت به خود و دیگر سویه‌ها در دو دمای نگهداری دارای تفاوت معنی‌دار و با کاهش همراه بود ($P<0/05$). نگهداری محصول در دمای ۴ °C موجب زنده مانی جمعیت بیفیدوباکتریوم در سطح ۷ log cfu/g و در دو سویه دیگر در سطح ۸ log cfu/g و در دمای ۲۵ °C نیز ۷ log cfu/g بود که نشان از حفظ شرایط پروبیوتیک محصول در هر دو دما داشت. همچنین نتایج نشان داد که افزودن این سه سویه از باکتری‌های پروبیوتیک تأثیر معنی داری ($P<0/05$) بر ویژگی‌های حسی شکلات تلخ با توجه به دو دمای نگهداری نگذاشته اما نگهداری در دمای ۲۵ °C در نمونه‌های کنترل و پروبیوتیک‌ها موجب افت کیفیت حسی شکلات شد. لذا نگهداری شکلات تلخ پروبیوتیک در دمای ۴ °C می‌تواند موجب شود تا این محصول به مدت حداقل ۶ ماه ماندگاری داشته و به عنوان یک محصول فراسودمند به بازار مصرف ارائه شود.

1. Probiotic Dark Chocolate (PDC)

۱- مقدمه

شکلات یکی از محبوب ترین محصولات شیرینی سازی در جهان است که از دانه گیاهی به نام کاکائو[۲] که نوع تغییر یافته کلمه کوکوآ[۳] و نشأت گرفته از زبان‌های مایایی و آزتکی می‌باشد به دست می‌آید. به طور معمول در یک فرآیند پیچیده و چند مرحله ای که شامل مخلوط کردن و بارگیری[۴]، بهبود بافت[۵]، کنچ کردن[۶]، مشروط کردن دمایی[۷]، قالب گیری[۸]، خنک کردن[۹]، جدا کردن از قالب[۱۰] و بسته بندی[۱۱] توسط دستگاه‌های خودکار تولید می شود [۱-۳]. این محصول دارای ویژگی‌های منحصر به فردی بوده که علت اصلی آن حضور فاز پراکنده پودر کاکائو، شکر و دیگر افزودنی‌های پودری یا دانه‌ای شکل در فاز پیوسته چربی (کره کاکائو) است که علاوه بر امکان افزودن مواد اولیه گوناگون مانند دانه‌های روغنی خشکبار (پسته، فندوق، بادام و غیره)، میوه‌های خشک (کشمش، پودر نارگیل و غیره) و همچنین ایجاد امکان غنی سازی با دیگر مواد غذایی که ارزش بالایی در حفظ سلامتی ما دارند (مانند دانه یا روغن بزرک، فیبرهای فراسودمند و غیره)، پروفایل عطر و طعم بی نظیری را نیز تشکیل می‌دهد [٤]. همین ساختار امکان این را فراهم ساخته تا امروزه محققین تلاش کنند تا مواد غذایی مورد استفاده را به شکل یک مجموعه تامین کننده موارد مورد نیاز بدن نظیر تامین انرژی و یا عاملی جهت پیشگیری از بیماری‌های گوناگون در آورند. در این راستا افزودن برخی اجزای طبیعی که خاصیت پیشگیری و یا درمان بیماری‌ها را دارند در محصولات بیشتر و بیشتر شده و از سوی دیگر افزایش آگاهی از ارتباط بین رژیم غذایی با این محصولات و حفظ سلامتی در بین مصرف کنندگان در سراسر جهان نیز در حال افزایش است [٥]. افزایش بیماری‌های قلبی و عروقی[۱۲]، دستگاه تناسلی و مجاری ادرار زنان[۱۳]، دستگاه گوارش[۱٤] به ویژه بیماری التهابی روده[۱٥] و سایر بیماری‌هایی که با رژیم غذایی در ارتباط هستند موجب شده تا میزان علاقه مصرف کنندگان به استفاده از محصولات پیشگیرانه و فراسودمند[۱٦] در تغذیه آنان روز افزون شود. محصول فراسودمند افزون بر ارزش تغذیه ای پایه، دست کم دارای یک خاصیت مشخص و به اثبات رسیده جهت ارتقا سلامت و پیشگیری کننده /کاهش دهنده یک بیماری است [٦]. امروزه محصولات فراسودمند بر حسب نوع ماده اولیه، ویژگی‌ها و تاثیر آن بر بیماری‌های گوناگون به گروه‌های زیادی از خوراکی‌ها تقسیم می‌شوند اما مهمترین ویژگی همه آن‌ها می‌بایست این باشد که ظاهر ماده غذایی مورد نظر را حفظ کرده و ماهیت، ویژگی‌های حسی و استانداردهای تولید محصول را تغییر نداده باشد. یکی از گسترده‌ترین گروه‌های فراسودمند مجموعه میکرواورگانیسم‌های پروبیوتیک[۱۷] می‌باشند. پروبیوتیکها را می‌توان به عنوان میکروارگانیسم‌های زنده (باکتریها و/یا مخمرها) تعریف کرد که برای بدن انسان یا حیوانات فواید سلامتی را به ویژه در حفظ و یا بهبود تعادل فلور میکروبی محیط دستگاه گوارش و روده فراهم می‌آورند [۷-۱۱]. از ویژگی‌های محصولات پروبیوتیک این است که می توانند در گستره وسیعی از محصولات و به اشکال گوناگون، به عنوان مکمل غذایی، قرص‌های دارویی و یا استفاده از آن در فرمولاسیون محصولات غذایی مورد مصرف قرار گیرند [۱۲]. یکی از پرکاربردترین گونه‌های پروبیوتیک‌ها باکتری‌های گروه لاکتیکی[۱۸] به نام باکتری‌های لاکتوباسیلوس[۱۹] هستند که خود به جنس‌های مختلف تقسیم می‌شوند. این باکتری‌ها طی قرون متمادی در تخمیر محصولات غذایی نقش اساسی داشته و در تهیه ماست، پنیر، دوغ و دیگر محصولات لبنی در منطقه خاورمیانه سابقه مصرف بیش از ۱۰۰۰ ساله دارند. نتایج مطالعات پیشین اما علاوه بر تاثیر این باکتری‌ها بر کیفیت محصولات غذایی نشان از نقش مثبت و بهبود دهندگی لاکتوباسیل‌ها در سیستم ایمنی، کاهش فشار و کلسترول خون و بهبود کارکرد دستگاه گوارش داشته و خاصیت ضد سرطان رحم و مجاری ادرار در بانوان را نیز دارا می‌باشند [۱۳-۱٤]. اما لاکتوباسیل‌ها نیز مانند هر میکرواورگانیسم دیگری

2. Cacao
3 Cocoa
4. Mixing
5. Refining
6. Conching
7. Tempering
8. Molding
9. Cooling
10. Demolding
11. Packaging
12. cardiovascular disease
13. women's uterine diseases
14. digestion

15. inflammatory bowel disease (IBD)
16. Functional Food
17. Probiotics
18. Lactic acid Bacteria (LAB)
19. Lactobacillus bacteria

دارای حساسیت زنده مانی و عمر مفید بوده که شرایط حضور آن‌ها را در فرآیندهای حرارتی و ذخیره سازی دشوار می‌کند. طبق استانداردهای ایران و سازمان غذاو دارو ایالات متحده آمریکا تا زمانی که جمعیت میکروبها به کمتر از 10^6 تا 10^7 cfu/gr نرسد دارای خاصیت پروبیوتیکی و اثر گذاری کافی می‌باشند [۱۵]. اعتقاد بر این است که لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس[20] میکرو فلور روده انسان را تقویت کرده و پس از مصرف آنتی‌بیوتیک موجب تثبیت آن می‌شود [۱۶-۱۷]. بیفیدوباکترها[21] از دیگر گونه‌های مورد استفاده به جهت بهبود سیستم ایمنی بدن است و در محصولات پروبیوتیک نقش پر رنگ و حضور فراوان داشته و علائم عفونت های تنفسی را کاهش و در بهبود آن نقش مهمی داشته [۱۸]. استرپتوکوکوس ترموفیلوس[22] یکی دیگر از مهمترین بخش‌های فلورهای میکروبی در دستگاه گوارش و به ویژه در روده انسان و گروهی از پروبیوتیک‌ها است که برای ارتقا سلامت انسان در نظر گرفته می‌شوند [۱۹-۲۲]. آنها همچنین می‌توانند نقش مهمی در تعادل میکروارگانیسم‌های روده‌ای داشته باشند [۲۳-۲۵]. حامل‌های سنتی باکتری‌های پروبیوتیک بیشتر محصولات لبنی و به ویژه ماست بوده است. اما مشکلات زیاد ناشی از مصرف محصولات لبنی از جمله عدم تحمل لاکتوز، مقدار کلسترول بالا، پروتئین‌های آلرژی زا موجود در شیر و لبنیات و مهمتر از همه، ماندگاری نسبتاً کوتاه مدت استفاده از آن‌ها را محدود می‌کند. بنابراین تولید محصول جدید و غیر لبنی با پروبیوتیک‌ها از اهمیت بیشتری برخوردار می شود. تاکنون چند تلاش برای تولید محصولات شکلات پروبیوتیک انجام شده است که همگی در راستای بهبود کیفیت و تولید این محصول بوده اند [۲۶-۲۸].

در این تحقیق سعی شده تا با تولید سه نوع شکلات تلخ پروبیوتیک که با حضور سه سویه پروبیوتیک مذکور که با کمک نشاسته مقاوم ذرت و آلژینات سدیم ریزپوشانی و در دمای اتاق و یخچال نگهداری شده اند، میزان زنده مانی باکتری‌ها را پس از عبور از سیستم شبیه سازی دستگاه گوارش و نیز خواص حسی شکلات‌ها را هنگام مصرف بررسی کنیم.

20. Lactobacillus acidophilus
21. Bifidobacterium animalis subsp. Lactis
22. Streptococcus subsp. thermophilus

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه باکتری‌ها و محیط کشت آن‌ها

۲-۱-۱-تهیه و کشت باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

باکتری پروبیوتیک *Lactobacillus acidophilus*, *DDS-1*® (شرکت *Danisco*- کشور دانمارک) به شکل خشک انجمادی تهیه شد را به جهت فعال کردن به ۲۰ میلی لیتر محیط کشت MRS-Broth[23] (شرکت *Merck*-کشور آلمان) در دمای ۳۷ °C افزوده و به مدت ۲٤ ساعت کشت شد و در ادامه به ۹۰ میلی لیتر از همان محیط کشت منتقل گشت تا در شرایط تکثیر قرار گیرد. سپس بایومس پروبیوتیک در اواخر فاز لگاریتمی با سانتریفیوژ (شرکت *Sigma*- کشور آلمان) در ٦۰۰ گرم به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ °C جداسازی و برداشت شد. در مرحله بعد دو بار در محلول استریل ۰/۹% سالین (۹٪ کلرید سدیم یا ۹ گرم NaCl در یک لیتر آب) (شرکت *Merck* – آلمان) تحت شرایط مشابه سانتریفیوژ و شسته شد. بعد برای لیوفیلیزه کردن باکتری‌ها از روش Fonseca و همکاران (۲۰۱۵) استفاده شد. تعداد باکتری‌ها پیش از لیوفیلیزه شدن شمارش و سپس مرحله ریز پوشانی انجام انجام گرفت [۱۳].

۲-۱-۲-تهیه و کشت باکاری بیفیدوباکتریوم لاکتیس

باکتری پروبیوتیک *Bifidobacterium*, *UABla-12*™ (شرکت *Danisco*- کشور دانمارک) در دمای ۳۷ °c به مدت ۲٤ ساعت در محیط کشت TOS-propionate agar medium و MUP (شرکت *Merck* – آلمان) کشت شد. بایومس پروبیوتیک در اواخر فاز لگاریتمی با سانتریفیوژ (شرکت *Sigma*- کشور آلمان) در ٦۰۰ گرم به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ °c برداشت می شود. سپس دو بار در محلول استریل ۰/۹% سالین (۹ ٪ کلرید سدیم یا ۹ گرم NaCl در یک لیتر آب) (شرکت *Merck*-آلمان) تحت شرایط مشابه سانتریفیوژ شسته خواهد شد و درآب دیونیزه (شرکت *Merck*- کشور آلمان) رقیق گشته تا در فرایند بعدی مورد استفاده قرار گیرند. در مرحله بعد برای لیوفیلیزه کردن باکتری‌ها از روش Fonseca و

23. De Man, Rogosa and Sharpe agar

همکاران (۲۰۱۵) استفاده شد. تعداد باکتری‌ها پیش از لیوفیلیزه شدن شمارش و سپس مرحله ریز پوشانی انجام انجام گرفت [۱۳، ۲۹].

۲-۱-۳- تهیه و کشت باکتری استرپتوکوکوس ترموفیلوس

باکتری پروبیوتیک *Streptococcus thermophilus, TH-4*®(شرکت *Danisco*- کشور دانمارک) در دمای ۳۷ °C به مدت ۲٤ ساعت در محیط کشت M17 broth (شرکت *Merck* – آلمان) کشت شد. بایومس پروبیوتیک در اواخر فاز لگاریتمی با سانتریفیوژ (شرکت *Sigma*- کشور آلمان) در ٦۰۰ گرم به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ °C برداشت شد. سپس دو بار در محلول استریل ۰/۹% سالین (۰/۹٪ کلرید سدیم یا ۹ گرم NaClدر یک لیتر آب) (شرکت *Merck*-آلمان) تحت شرایط مشابه سانتریفیوژ شسته و درآب دیونیزه شده رقیق گشته تا در فرایند بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. تعداد باکتری‌ها پیش از جداسازی و شست و شوی، تعیین و سپس بر اساس تعداد کلونی آن، مرحله بعدی انجام گرفت [۱۳].

۲-۲- انجام روش ریزپوشانی باکتری‌ها[۲٤]

ریزپوشانی پروبیوتیک ها به صورت جداگانه برای هر باکتری و با استفاده از روش امولسیون و در شرایط استریل انجام شد. ابتدا ۳ گرم آلژینات سدیم (شرکت *Sigma-Aldrich*- ایالات متحده آمریکا) و ۲ گرم نشاسته مقاوم ذرت (شرکت *national starch* – انگلستان) به آرامی به ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه و پس از حل شدن در اتوکلاو استریل شد. پس از هم دمایی محلول با محیط، محلول آلژینات با سوسپانسیون میکروبی ۰/۰۱ ٪ به مدت ۵ دقیقه مخلوط گردیده تا همگن شوند. برای تشکیل امولسیون، مخلوط حاصل به۵۰۰ میلی لیتر روغن ذرت (شرکت اویلا- ایران) حاوی ۲ درصد امولسیفایر توئین ۸۰ (شرکت*Sigma-Aldrich*- ایالات متحده آمریکا) افزوده و با همزن مغناطیسی (شرکت شیمی فن- ایران) به مدت ۳۰ دقیقه و سرعت ۵۰۰ rpm یکنواخت گشت. جهت تشکیل کپسول‌ها به محلول مورد نظر کلرید کلسیم ۰/۱ مولار اضافه و پس از ۳۰ دقیقه که کپسول‌ها ته نشین شدند به منظور جداسازی کپسول‌ها از سانتریفوژ (شرکت *Sigma*- کشور آلمان) با سرعت ۳۵۰ گرم به مدت۱۰ دقیقه استفاده شد. کپسول‌های جدا شده با محلول آب پپتونه ۰/۱ شسته و در دمای ٤ °C نگهداری شدند [۲۹].

۲-۳-تهیه شکلات تلخ

شکل ۱ روند تهیه شکلات تلخ پروبیوتیک را شرح می‌دهد. پودر کاکائو (شرکت *Altinmarka*- کشور ترکیه)، کره کاکائو (شرکت *Altinmarka*- کشور ترکیه)، شکر (شرکت نیشکر هفت تپه- ایران)، وانیل (شرکت *Polar Bear*- کشور چین)، لسیتین سویا (شرکت *Fismer Lecithin*- کشور بلژیک) کربونات سدیم (گروه صنعتی کاوه – کشور ایران) و نمک ید دار (شرکت گلها- کشور ایران) را درون میکسر[۲۵] (گریندر) ویژه شکلات ریخته و به مدت ۲۷۰ دقیقه در دمای ۵۵ ° C مخلوط نمودیم. در مرحله بهبود بافت به جهت کاهش اندازه ذرات شکلات به ریفاینر[۲٦] از نوع بالمیل[۲۷] (شرکت *Whiener*- آلمان) منتقل و به مدت ۱۸۰ دقیقه چرخش داده شدند. سپس برای بهبود پروفایل عطر طعم شکلات در دستگاه ورز دهنده یا کنچ[۲۸] (شرکت *Caotech*- کشور هلند) در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۲ ساعت ورز داده شده و بعد به مخزن همزن و المنت دار (شرکت *Whiener*- آلمان) منتقل و تا مرحله بعد نگهداری کرده تا دمای آن به ٤۵ °C کاهش یابد. سپس با دستگاه مشروط کننده شکلات[۲۹] (شرکت *Sollich*- کشور آلمان) محصول را تمپر کرده و پس از رسیدن به دمای ۲٦/۵ °C ، با باکتری‌های تهیه و ریز پوشانی شده (بخش‌های ۲-۱ و ۲-۲) مخلوط و توسط دستگاه قالب گیری (شرکت *Sollich*- کشور آلمان) در قالب‌های جنس پلی کربنات[۳۰] (به وزن هر قالب ٦ گرم از شکلات) ریخته و به مدت ٤۰ دقیقه در تونل خنک کننده (شرکت *Whiener*- آلمان) به دمای ٤ °C رسید. سپس نمونه‌ها از قالب جدا و با استفاده از پلی اتیلن با چگالی کم[۳۱] بسته بندی و در دو دمای اتاق (۲۵ °C) و یخچال (٤ °C) به مدت ۱۸۰ روز نگهداری کردیم [۳۰-۳۲] (جدول ۱).

24. Encapsulation procedure

25. Grinder
26. Refiner
27. Ball-Mill
28. Conche
29. Tempering Machine
30. Polycarbonate chocolate mold
31. Low-density polyethylene (LDPE)

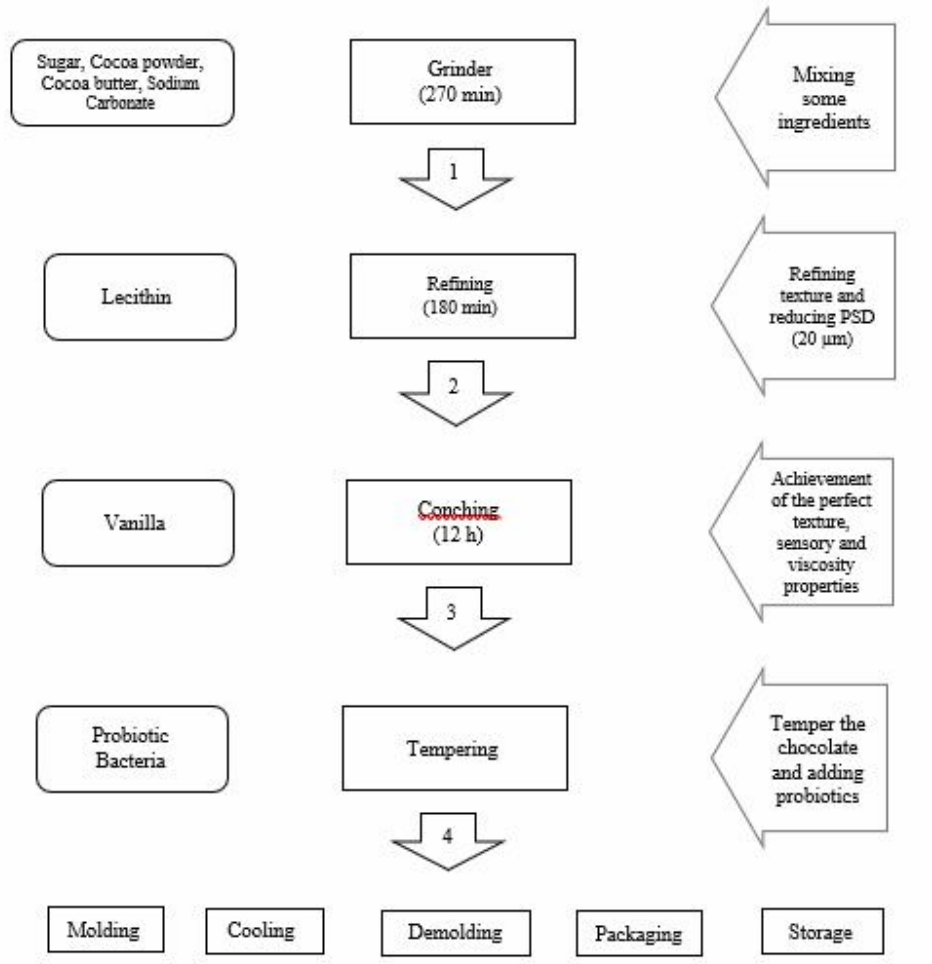


Fig 1 Scheme of Scheme of Probiotic Dark Chocolate (PDC) manufacturing process (adapted from 1).

Table 1 The abbreviations, the percentage and the ingredients of samples*.

Abbreviation	*Lactobacillus acidophilus*, *DDS-1*® (Wt. %)	*Bifidobacterium*, *UABla-12*™ (Wt. %)	*Streptococcus thermophilus*, *TH-4*® (Wt. %)	Cocoa Powder (Wt. %)	Cocoa Butter (Wt. %)	Sugar (Wt. %)	Lecithin (Wt. %)	Salt, vanilla, Sodium Carbonate (Wt. %)
PDC-L.a	1	0	0	21	34	40	0.3	3.7
PDC-B.U	0	1	0	21	34	40	0.3	3.7
PDC-S.t	0	0	1	21	34	40	0.3	3.7

* Probiotic Dark Chocolate- Lactobacillus acidophilus (PDC-L.a), Probiotic Dark Chocolate- Bifidobacterium (PDC-B.U),
Probiotic Dark Chocolate- Streptococcus thermophilus (PDC-S.t)

۲-٤-شبیه سازی و بررسی بخش گوارش

برای شبیه سازی بزاق دهان ابتدا هر عدد شکلات تلخ پروبیوتیک به ۳۰ میلی لیتر الکترولیت استریل منتقل و سپس با محلول شبه بزاق (٦/٢gr/l از NaCl، gr/l ٢/٢ از KCl، gr/l ٠/٢٢ از $CaCl_2$، gr/l ١/٢ از $NaHCO_3$) به همراه٪ ٠/٠١ لیزوزیم در کیسه Stomacher برای ۲ دقیقه قرار گرفت. در مرحله شبیه ساز محیط معده، محلول شکلاتی حاصل از مرحله قبل پس از خروج از مرحله بزاقی در ۳۰ میلی لیتر الکترولیت محلول حاوی

پپسین ۰/۳ ٪ و mol/L ۱ از HCl در انکوباتور و در دمای ۳۷ °C برای ۱ ساعت قرار گرفت تا pH به ۲ کاهش یافت. اطمینان از این کاهش با سنجش pH حاصل شد. برای شبیه سازی استرس روده pH با کمک محلول اشباع بیکربنات سدیم به ۷/۵ برگشته و در ادامه محلول شکلاتی حاصل از مرحله پیشین در ۳۰ میلی لیتر محلول الکترولیتی استریل حاوی ۰/۴۵٪ نمک صفرایی و ۰/۱ ٪ پانکراتین در شرایط بی هوازی در دمای ۳۷ °C به مدت ٤ ساعت قرار گرفت. در نهایت تعداد میکروب‌ها با آزمون میکروبی اندازه‌گیری شد [٤٠].

۲-۵- مواد آزمایشگاهی

تمام آزمون‌های میکروبی در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه تهران انجام و مواد مورد نیاز در این آزمون‌ها از شرکت *Merck* ساخته شده در کشور آلمان و شرکت *Sigma-Aldrich* ساخته شده در کشور ایالات متحده آمریکا تهیه شدند. آزمون حسی نیز به کمک کارکنان بخش دپارتمان تحقیقات و توسعه کارخانه کیان شکلات کیمیا (شکلات پارمیدا) انجام شد.

۲-٦-آزمون میکروبی و بررسی زنده مانی

۲-٦-۱-آزمون میکروبی و شمارش باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

نسبت ۲۰۰ml از محیط کشت MRS Agar ، ۰/۱ ml از محلول کلیندامایسین و ۱ ml از محلول سیپروفلوکساسین را با هم مخلوط کرده و پس از آنکه در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ °C استریل کردیم، ۹ گرم از آن را بر روی پلیت ریخته و غلظت ۰/۱ را با استفاده از بافر پپتون آبی[32] تهیه و ۱ میلی لیتر از آن را به همراه 1g از نمونه شکلات حاوی این باکتری بر روی محیط کشت گذاشته و پس از جذب نمونه توسط محیط کشت، پلیت‌ها در شرایط هوازی در دمای ۳۷ ° C به مدت ۷۲ ساعت و به طور وارونه گرمخانه گذاری شدند. سپس با کمک کلونی شمار تعداد کلونی ها مورد شمارش و ثبت قرار گرفتند [۱۳].

۲-٦-۲-آزمون میکروبی و شمارش باکتری بیفیدوباکتریوم لاکتیس

۹۰ گرم PBW محلول را در ارلن ۲۵۰ml توزین کرده و پس از سترون سازی، ۱۰ گرم نمونه را به آن افزوده و در حمام آب گرم تا دمای ٤٥ °C رسیده و ۵ دقیقه در همان حالت قرار گرفت. بعد ۱ گرم از این محیط کشت را به ۹ گرم محیط کشت TOS-propionate agar medium و MUP افزوده شد و مانند بخش ۲-٦-۱ گرمخانه گذاری و تعداد کلونی‌ها شمارش شدند.

۲-٦-۳-آزمون میکروبی و شمارش باکتری استرپتوکوکوس ترموفیلوس

آماده سازی محیط کشت، تلقیح و شمارش باکتری استرپتوکوکوس ترموفیلوس مانند بخش ۲-٦-۱ محیط کشت آماده سازی، تلقیح و شمارش انجام شد [۱۳، ۱۹].

۲-۷- آزمون حسی شکلات تلخ فراسودمند

بررسی کیفیت حسی نمونه‌های شکلات تلخ پروبیوتیک در حین ذخیره سازی با استفاده از روش ارزیابی حسی شکلات تعیین شد. بر اساس جدول ۲ ارزیابی خصوصیات حسی با تعیین سه ویژگی اصلی که شامل ظاهر (رنگ، براقیت سطح، فرم و صافی و یک دست بودن سطح)، عطر (بو و طعم) و نیز خصوصیات بافت (خواص مکانیکی، هندسی، سطحی و سایر خصوصیات دینامیکی) انجام شد. برای هر یک از خواص حسی انتخاب شده ضریب وزنی[33] بر اساس تأثیر هر یک از ویژگی ها بر کیفیت کلی حسی شکلات تعیین و در جدول ۲ ذکر شد. همچنین با هدف تعیین امتیازات، نمراتی از ضعیف‌ترین برابر ۱ تا بهترین برابر ۵ اختصاص داده شد. نمرات داده شده توسط هر فرد در انتها جمع مجموع آن‌ها از ۱ تا ۵ در ضرایب وزنی ضرب و به عنوان امتیاز آن بخش قرار گرفت. کیفیت نمونه‌ها بسته به دامنه نمره اختصاص داده شده توسط ارزیابان تعیین شد. محصولاتی که با کمتر از ۲/۵ امتیاز مورد ارزیابی قرار گرفتند بعنوان غیر قابل قبول در نظر گرفته شده، امتیازات هر بخش در محدوده ۲/۵ الی ۳/۵ محصولات با کیفیت خوب ، ۳/۵ الی ٤/۵ با کیفیت بسیار خوب و ٤/۵ الی ۵ محصولات با درجه کیفی عالی بودند. برای عینی سازی و اطمینان از قابلیت اطمینان آنالیز حسی انجام مراحل صحیح انتخاب، آموزش و تأیید ارزیابان (تحلیل گران حسی)

32. Peptone buffer water (PBW)

33. Weight coefficient (WC)

ضروری است. در این مطالعه ۱۰ ارزیاب متخصص به عنوان هیئت داوران ارزیابی حسی شکلات تلخ پروبیوتیک شرکت کردند که ۵ مورد از آنها برای ارزیابی محصولات انتخاب شده آموزش دیده بودند (مطابق استاندارد ایزو ۸۵۸۶-۱، ۱۹۹۳) و ۵ نفر دیگر دارای وضعیت متخصصانی بودند که آموزش مشخص شده توسط استاندارد ایزو ۲-۸۵۸۶ را گذرانده اند. تجزیه و تحلیل حسی نمونه‌های شکلات در پایان روزهای ۰، ۷، ۳۰، ۹۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ از تاریخ تولید شکلات در طی ذخیره سازی انجام شد. به منظور جلوگیری از هرگونه تأثیر منفی محیط بر خصوصیات بافتی و شکل ظاهری نمونه های شکلات، آزمون از نمونه‌هایی که در دمای اتاق (۲۰ درجه سانتی گراد) به مدت ۱ ساعت نگهداری شده بودند انجام شد [۳۳-۳۵].

Table 2 Sensory evaluation of the probiotic chocolate quality by scoring procedure (adapted from 33)

Sensory properties	(WC)	Description of evaluated property	Description of evaluated property	Scores
APPEARANCE	2.00	■Color	Characteristic form and color (depending on cocoa-parts content), smooth and shiny surface, clear engraving,	**5.00**
			A slight deviation from the characteristic shape, color and surface, engraving less pronounced	**4.00**
		■Gloss	Noticeable deviation from the characteristic shape, color and gloss, noticeable fingerprints on the surface, presence of air bubbles	**3.00**
		■Form	More pronounced form deviations, absence of gloss, surface partially white or gray, presence of cuttings	**2.00**
		■Surface	Marked variation from the characteristic shape – deformed shape, surface white or gray, higher damages; poor engraving	**1.00**
TEXTURE	2.00	■MECHANICAL PROPERTIES Hardness Brittleness Chewiness Adhesiveness	Characteristical hardness and uniform, brittle snap, chewiness and (non)adhesion	**5.00**
			A slight deviation from the inherent hardness and snap, very good chewiness, slight adhesion	**4.00**
			Noticeable deviation from the characteristic hardness and snap in the presence of air bubbles in the breakage, good chewiness, more pronounced adhesion	**3.00**
			Clearly marked deviation of distinctive hardness and snap with the occurrence of fat bloom, clearly expressed crumbliness and adhesion, satisfactory chewiness	**2.00**
			Very pronounced hardness and crumbliness, presence of the fat bloom in the breakage, chewiness very bad and extremely strong adhesion	**1.00**

	2.50	■GEOMETRIC PROPERTIES Sandiness	Typical sandiness or absence of sandiness – characteristic smooth texture	**5.00**
			A slight deviation from the typical sandiness/smooth texture	**4.00**
			Noticeable deviation from the typical sandiness/smooth texture	**3.00**
			Clearly pronounced sandiness or coarse texture	**2.00**
			Very pronounced sandiness or coarse texture	**1.00**
	0.50	■SURFACE PROPERTIES Wetness Greasiness	The absence of segregated water/fat on the surface	**5.00**
			Slight segregation of water/fat on the surface	**4.00**
			Noticeable segregation of water/fat on the surface	**3.00**
			Clearly pronounced segregation of water/fat on the surface	**2.00**
			Very pronounced segregation of water/fat on the surface	**1.00**
	2.00	■OTHER DYNAMIC PROPERTIES Melting	Characteristical, gradual melting	**5.00**
			A slight deviation from characteristical, gradual melting	**4.00**
			Noticeable deviation from the characteristical, gradual melting	**3.00**
			Clearly pronounced deviation from the characteristical, gradual melting	**2.00**
			Very pronounced deviation from the characteristical, gradual melting – very slow or very fast melting	**1.00**
AROMA	4.00	■ODOR & Taste	Distinctive, rounded, aromatic odor	**5.00**
			Characteristical, less rounded, aromatic odor	**4.00**
			Characteristical, poorer rounded, weakly aromatic odor	**3.00**
	7.00		Not characteristically, sourish,musty odor	**2.00**
			Foreign, sourish, stale, moldy odor	**1.00**

۲-۸- تجزیه و تحلیل آماری

طراحی آزمایش‌ها با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با انجام ۳ بار تکرار (n=۳) صورت گرفت. تفاوت های معنی داری در زنده مانی باکتری‌ها با استفاده از آزمون post hoc Tukey's HSD در سطح $p < ۰/۰۵$، با کمک نرم افزار SPSS نسخه ۲۶ محاسبه شد. همچنین از روش سطح پاسخ (RSM) برای ارزیابی تعداد و زنده مانی پروبیوتیک‌ها، مدت زمان نگهداری و تاثیر دمای ذخیره بر روی زنده ماندن استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- زنده مانی باکتری‌ها

نتایج به دست آمده در این آزمایش برای زنده مانی هر سه سویه *Lactobacillus acidophilus*, DDS-1® *Bifidobacterium*, UABla-12™ و *Streptococcus thermophilus* (TH-4®) در شکلات تلخ پس از شبیه سازی دستگاه گوارش و هنگام تحویل به انتهای روده به عنوان محل اصلی جذب در شکل‌های ۲ الی ٤ نشان داده شده که به طور کلی خوب گزارش و بیشترین تعداد سلول‌های زنده از سویه‌های مذکور را در سطح log cfu/g ۹ در نگهداری در دمای ٤ °C در روز اول و هفتم و کمترین آن log cfu/g ۸ برای دو سویه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس و cfu/g ۷ برای بیفیدوباکتریوم در انتهای طول دوره ذخیره سازی در روز ۱۸۰ بود. در دمای ۲۵ °C نیز در هر سه سویه بیشترین تعداد کلونی مربوط به روز اول در سطح log cfu/g ۹ و کمترین آن در انتهای روز ۱۸۰ در سطح log cfu/g ۷ بود (شکل ۱-۳).

نتایج تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون HSD Tukey (شکل ۱) نشان می دهد در طول ذخیره سازی در دماهای ٤ و ۲۵ درجه سلسیوس از نظر آماری اختلاف معنی داری ($p<۰/۰۵$) در تعداد سلول‌های زنده لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس وجود دارد و این کاهش تعداد با افزایش زمان نیز از نظر آماری معنی دار بود. اما با توجه به حداقل کلونی مورد نیاز برای این که یک محصول پروبیوتیک لبنی باشد log cfu/g ٦-۷ است و در مورد محصولاتی مانند شکلات به اثر بخشی آن بر روی انسان باید توجه کرد که تا به حال بررسی موضوعی بر روی شکلات پروبیوتیک و تاثیر آن بر انسان انجام نشده است در نتیجه مانند دیگر محصولات به عنوان حداقل log cfu/g ٦-۷ استناد می‌کنیم لذا محصولاتی که در دمای اتاق و یخچال پس از ٦ ماه ماندگاری در دمای محیط دارای شرایط احراز عنوان پروبیوتیک است. در مقایسه زنده مانی طول دوره نگهداری هر سه سویه دارای رفتاری شبیه به یک دیگر بوده اما برخلاف سویه لاکتوباسیسوس اسیدوفیلوس که سرعت کاهش جمعیت آن بسیار کند و در نتیجه زنده مانی بالاتری را نشان داد، کاهش جمعیت زنده سویه‌های استروپتوکوکوس ترموفیلوس و بیفیدوباکتریوم دارای اندک سرعت بیشتری در تعداد سلولهای فعال بودند. در ابتدا و روز صفر تعداد باکتری‌ها سطح log cfu/g ۹ را نشان داند که این میزان ۷ روز پس از تولید همچنان در همان سطح باقی مانده بود. در دوره ذخیره سازی ۳۰ روزه در دمای ۲۵ °C شاهد کاهش زنده مانی هر سه سویه بودیم و سطح هر سه باکتری به log cfu/g ۸ کاهش یافت در حالی که این مقدار در دمای ٤ °C جمعیت پروبیوتیک‌ها log cfu/g ۹ بود. مطابق شکل‌های ۲ تا ٤، در طول ۹۰ روز ذخیره سازی این رقم برای دمای یخچال نیز کاهش نشان داده و به log cfu/g ۸ رسید که در مقایسه با دوره پیشین خود تغییرات معنی دار بود. این کاهش جزئی طی سه ماه نگهداری را می‌توان به عدم دسترسی به رطوبت آزاد و نیز در دسترس نبودن مواد مغذی دانست [۱۳]. در دوره ۹۰ روزه جمعیت سویه‌ها تغییرات معنی داری را نشان نداده و هر سه باکتری جمعیتی برابر با log cfu/g ۸ در دمای یخچال و در دمای اتاق را نشان دادند. این تغییرات در دوره بعد و تا روز ۱۵۰ نیز یکسان بود و هر سه باکتری در دمای ٤ °C همچنان زنده مانی log cfu/g ۸ را نشان دادن اما در دمای محیط ۲۵ °c با کاهش معنی دار جمعیت فعال خود روربرو و به log cfu/g ۷ کاهش یافتند. در۳۰روز پایانی تغییرات تا حدودی متفاوت بوده و در دمای ٤ °C باکتری‌های لاکتوباسیلوسس اسیدوفیلوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس جمعیت بدون تغییر معنی داری در log cfu/g ۸ ماندند در حالی که جمعیت بیفیدوباکتریوم با کاهش معنی دار به سطح log cfu/g ۷ رسید. در دمای ۲۵ °C اما هر سه باکتری در جمعیت خود تفاوت معنی داری را نسبت به دوره قبل نشان نداده و زنده مانی همان سطح log cfu/g ۷ را داشتند. براساس تحقیق Lalic˘ic´-Petronijevic (۲۰۱۵) [۱۳] تمام نمونه‌های شکلات تجزیه و تحلیل شده نشان دادند که اگرچه دارای عنوان پروبیوتیک هستند اما تعداد سلول آنان در شرایط دمای اتاق کمتر از سطح لازم برای دستیابی به یک اثر درمانی در زمان مصرف پس از ۱۸۰ روز است. در نتیجه، عملکرد شکلات حاوی پروبیوتیک به ۱۸۰ روز از تاریخ تولید محدود می شود با توجه به اینکه طبق گفته های Doleyres و همکاران (۲۰۰۵) و Bernardeau و همکاران(۲۰۰٦)، همچنین Nag و همکاران (۲۰۱۳) حداقل تعداد باکتریهای پروبیوتیک در زمان

مصرف باید بیشتر یا مساوی 10^6 cfu/g باشد تا اثرات درمانی حاصل شود [۳۶-۳۸].

اولین عامل مهم حفظ جمعیت سویه‌های پروبیوتیک در سطح قابل قبول مبحث میکروکپسوله کردن باکتریها است. در تحقیق Lalic˘ic´-Petronijevic (۲۰۱۵) [۱۳] با توجه به عدم کپسوله کردن باکتری‌ها و افزودن آن‌ها به شکل آزاد در شکلات کاهش فلور جمعیت آن‌ها با سرعت بیشتری اتفاق افتاد. از دیگر عواملی که تا حدودی زیادی بر زنده مانی پروبیوتیک تاثیر گذاشت روش تولید شکلات بود. با توجه به قرار گرفتن محصول در برخی بخش‌های فرآیند فرآیند تولید در دمای بالا و استرس حرارتی (در گریندر معادل $45^{\circ}c$ و در کنچ حدود $75^{\circ}c$) و نیز فشار مکانیکی بر شکلات در حین تولید (فشاری معادل ۱bar یا ۱۰۰kPa در بالمیل)، افزودن سویه ها در گام و دمای مناسب در فرایند بسیار با اهمیت است. دمای حدود $26^{\circ}c$ درجه مرحله مشروط کردن دمایی در کنار توجه به اندک فشار مکانیکی وارده به محصول بهترین مرحله برای افزودن باکتری‌ها است. هرچند با این وجود سلول‌های پروبیوتیک تحت فشارها و استرس‌های دیگری نظیر قرار گرفتن در معرض اکسیژن، غلظت قند ۳۹ درصدی، اثرات اسمزی و برش مکانیکی قرار دارند که همه این موارد بر تعداد سلول‌های پروبیوتیک فعال تأثیر گذاشته و می‌تواند باعث کاهش احتمال زنده ماندن آنها، هم در طول تولید و هم در دوره ذخیره سازی شود [۳۹-۴۰]. این عوامل قطعاً در کاهش تدریجی سلول‌های زنده پروبیوتیک مورد استفاده در مطالعه ما نقش داشته اند. این امر به ویژه در مورد بیفیدوباکتریوم ها صادق است زیرا آنها برای رشد و بقا اغلب به یک ماده مغذی خاص و شرایط محیطی خاص نیاز دارند [۴۱]. علاوه بر این اگر چه شکلات یک محصول جامد با تخلخل کم و محیطی با نفوذ کم هوا به درون آن است اما به دلیل سطح وسیع در تمام وجوه هندسی ممکن است برخی از سلولهای باکتریایی در معرض اثرات مخرب اکسیژن قرار بگیرند که باعث کاهش تعداد سلولهای زنده باکتری‌ها می شود. هر چند درون شکلات فاقد امکان دسترسی اکسیژن بوده و بخش اعظم جمعیتی سویه‌ها زنده مانی قابل قبولی را نشان داده اند. از سوی دیگر استفاده از شکر و عدم جایگزینی آن با دیگر شیرین کننده‌ها که می‌توانند منجر به افزایش فشار اسمزی شوند که این مورد نیز می‌تواند در کاهش تعداد سلول ها تأثیر بگذارد. همچنین استفاده از بسته بندی با نفوذ پذیری حداقلی در مورد اکسیژن توانست بر حفظ این زنده مانی اثر مثبت بگذارد.

با وجود عملکرد قابل قبول شکلات به عنوان میزان باکتری‌های پروبیوتیک ترکیب شده برای مدت ۱۸۰ روز باید تأکید کرد پایداری محصولات لبنی تخمیر شده به عنوان متداول ترین حامل‌های پروبیوتیک با فاصله زیاد هنوز بهترین انتخاب است. اما نکته مهم عدم ماندگاری این محصولات لبنی به مدت مشابه ۱۸۰ روزه (۶ ماه) است که از این دیدگاه تولید شکلات‌های تلخ پروبیوتیک پیشرفت در گسترش و دسترس بودن این باکتری‌های مفید را نشان می دهد. باید یادآور شد که سازمان‌های استاندارد کشورهایی نظیر کانادا و ایتالیا میزان ۹ لگاریتم کلونی در مصرف روزانه[34] از باکتری‌های پروبیوتیک را حداقل مقدار مصرف آن‌ها می‌داند نتایج فوق در مورد تعداد سلول‌های پروبیوتیک زنده به ۶ گرم شکلات اشاره دارد و مقدار مصرف شکلات بر اساس پیشنهاد سازمان بهداشت جهانی حدود ۲۰ الی ۲۵ گرم است. بنابراین با مصرف ۱۰ تا ۱۲ گرم شکلات تلخ پروبیوتیک، تعداد باکتریهای مفید وارد شده ۲ برابر افزایش یافته که مطمئناً یک مزیت محسوب و مقدار مورد نیاز روزانه پروبیوتیک بدن را تامین می‌کند [۴۲-۴۳]. همانطور که پیشتر نیز ذکر شد، شکلات تلخ پروبیوتیک مزایای مضاعفی دارند: الف) ماندگاری بیشتر در مقایسه با محصولات سنتی (لبنی) با باکتری‌های پروبیوتیک ، ب) محافظت بهتر از پروبیوتیک ها در حین انتقال از طریق معده و کارایی موثرتر در روده به دلیل محتوای چربی بالا محصول که با یافته های Maillard و همکاران (۲۰۰۸) و Possemiers و همکاران (۲۰۱۰) برابری دارد [۴۴-۴۵].

34. log cfu/serving or day

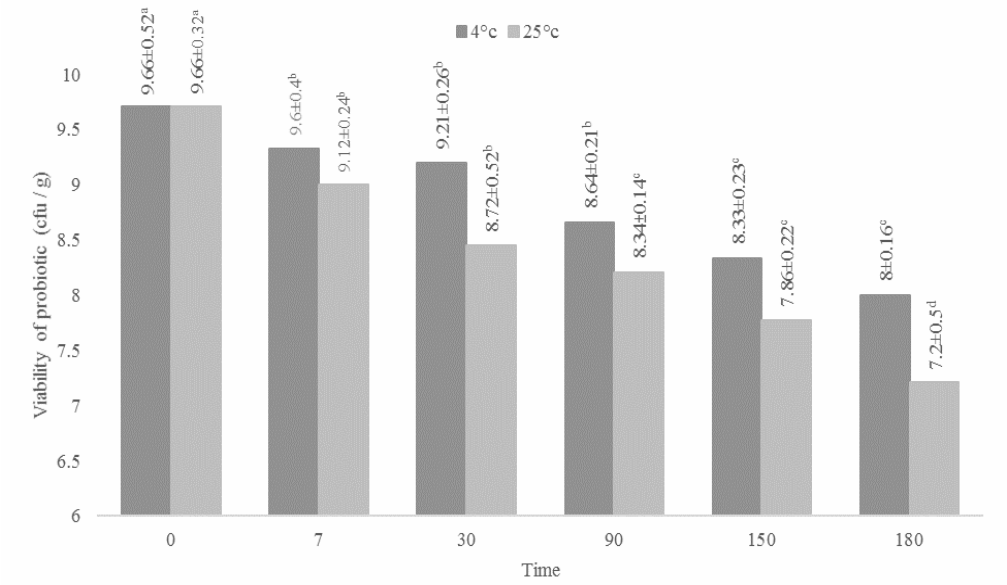


Fig 2 survival of encapsulated probiotic cells of *L. acidophilus NCFM*® (cfu/g) in dark chocolate during storage at 4 °C and 25 °C. Number of replications: n = 3. (The values per column show the differences in the content of the tested parameters dark chocolates with probiotic strain *L. acidophilus NCFM*®; Values with the same letters per column do not differ significantly at p <0.05.)

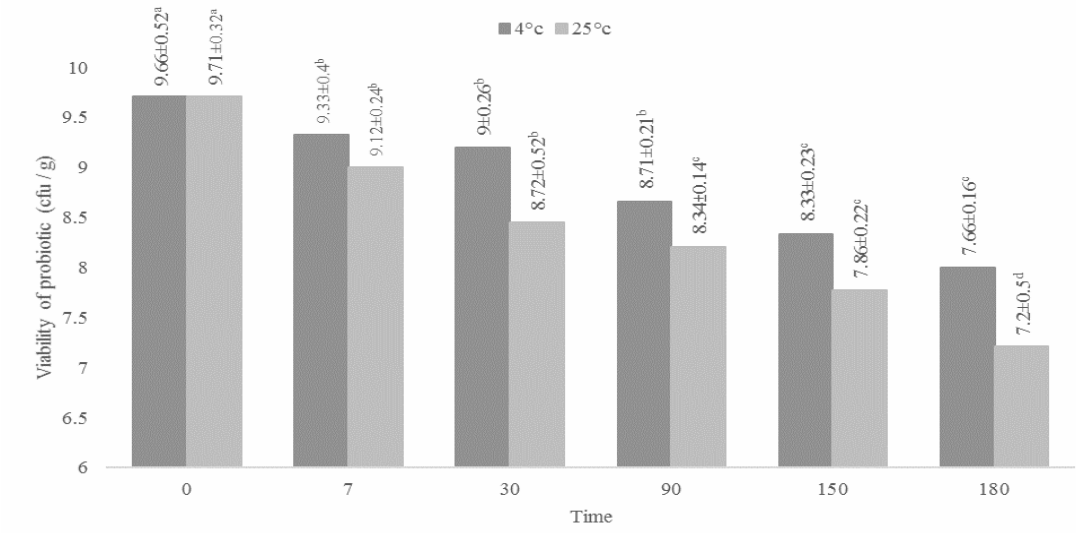


Fig 3 survival of encapsulated probiotic cells of *Bifidobacterium*, UABla-12™ (cfu/g) in dark chocolate during storage at 4 °C and 25 °C. Number of replications: n = 3. (The values per column show the differences in the content of the tested parameters dark chocolates with probiotic strain *Bifidobacterium*, UABla-12™; Values with the same letters per column do not differ significantly at p <0.05.)

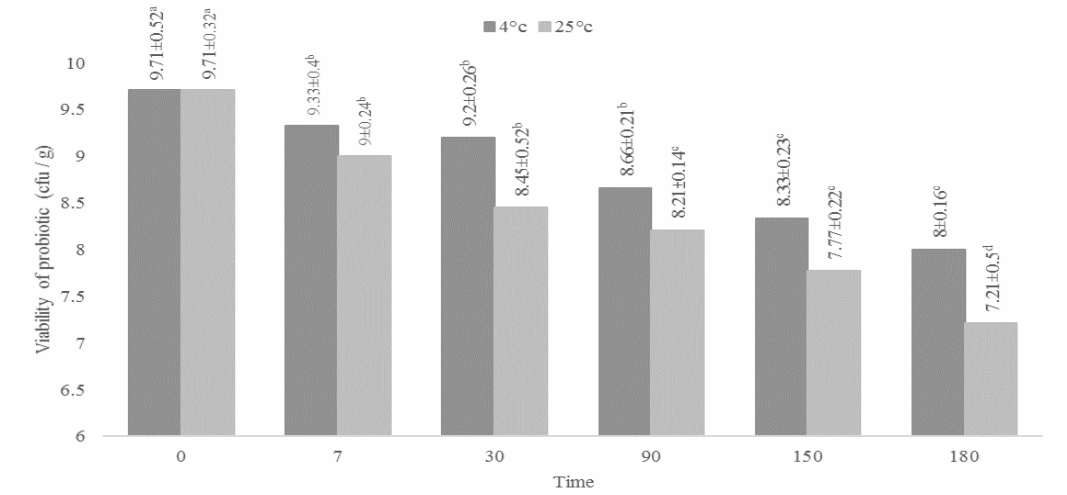


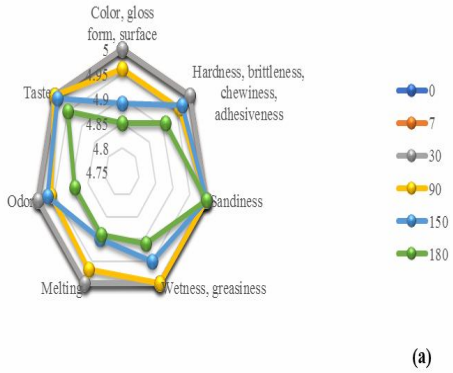
Fig. 4. survival of encapsulated probiotic cells of *Streptococcus thermophilus (TH-4®)* (cfu/g) in dark chocolate during storage at 4 °C and 25 °C. Number of replications: n = 3. (The values per column show the differences in the content of the tested parameters dark chocolates with probiotic strain *Streptococcus thermophilus (TH-4®)*; Values with the same letters per column do not differ significantly at p <0.05.)

۳-۲- ارزیابی حسی

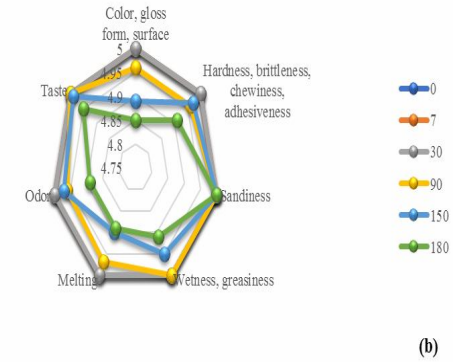
طبق جدول مقایسه میانگین و بر اساس نتایج ارزیابی حسی شکلات‌های تلخ پروبیوتیک در مدت زمان ذخیره سازی ۱۸۰ روزه می توان نتیجه گرفت که همه نمونه‌های تجزیه و تحلیل شده در هر شش دوره آزمایش در گروه کیفیت حسی عالی (بالای ٤/٥) طبقه بندی شده اند. تغییرات بررسی شده بین نمونه‌های پروبیوتیک و نمونه کنترل معنی دار نبود (p<۰/۰۵). در حین ارزیابی شکل ظاهری، اعضای هیئت ارزیابی عدم حضور حباب هوا، پدیده شکوفه چربی و لکه حاصل از رطوبت و شکر و نیز از دست دادن براقیت را حتی پس از ۱۸۰ روز نگهداری مناسب دانسته و با میانگین نمره ۵ تفاوت معنی داری را مابین شکلات تلخ پروبیوتیک (هر سه باکتری) و شکلات تلخ ندانستند. از بین خصوصیات بافتی مهمترین ویژگی خاصیت شنی شدن شکلات بود که تفاوت معنی داری در شنی شدن نمونه‌های کنترل و شکلات تلخ پروبیوتیک و ماسه وجود نداشت و هیچ گونه حس شنی شدن در دهان ایجاد نشد (p<۰/۰۵). این را می توان به دانه بندی و اندازه ذرات کوچک باکتری‌ها نسبت داد و نیز عدم واکنش و ایجاد پیوندهای ایجاد کننده یک مجموعه بزرگتر اما در دیگر تحقیقات مانند Lalicˇic´-Petronijevic (۲۰۱۵) [۱۳] که از پروبیوتیک‌های بزرگتر مانند *Dophilus* بهره برده بودند موجب ایجاد حس شنی شده که در هنگام ارزیابی‌های حسی مشخص شد و نیز علت دیگر ایجاد این حس در دهان پراکندگی ناکافی محیط‌های کشت اضافه شده به شکلات است زیرا گاهی اوقات استفاده نکردن از نوع لیوفیلیزه باکتری حضور این حس در دهان را امکان پذیر می‌سازد. از مهمترین نتیجه‌های تجزیه و تحلیل، عدم حضور طعم و بوی خارجی و نامطبوع در هیچ یک از انواع آنالیز شکلات تلخ پروبیوتیک در طول دوره نگهداری است. به طور کلی قوی بودن پروفایل عطر و طعم شکلات و لیوفیلیزه کردن به شکل اصولی و عدم حضور محیط کشت در شکلات بر این مورد نیط اثر گذاشته و شکلات تلخ پروبیوتیک را فاقد هرگونه رایحه و مزه نامطبوع می کند [۱۳، ٤٦-٤٨].

دانش کنونی تأثیر افزودن پروبیوتیک بر خواص حسی محصولاتی مانند شکلات را به طور کامل مشخص نکرده است. با توجه به این احتمال که باکتریهای پروبیوتیک باعث شکوفایی چربی می شوند و یا با دانه بندی آنها بر خصوصیات بافتی تأثیر می گذارد، شکلات و به ویژه بافت شکلات با پروبیوتیک‌ها در آزمایش حاضر به طور دقیق مورد بررسی قرار گرفت. متابولیسم پروبیوتیک‌ها می تواند منجر به تولید اجزایی شود که ممکن است به طعم و رایحه محصول اثر منفی بگذارن مانند ظهور عطر و

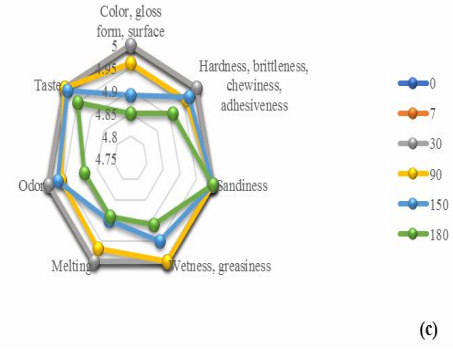
طعم به اصطلاح سرکه ای یا ترش که به ویژه از باکتری‌های اسیدوفیلوس نشأت می‌گیرد [۴۹]. اگرچه در آزمایش حاضر از باکتریهای پروبیوتیک در حالت متابولیکی غیرفعال و لیوفیلیزه استفاده شده است اما ارزیابی طعم و بوی شکلات‌های تلخ پروبیوتیک به عنوان مهمترین پارامتر حساسیت حسی با توجه به مقبولیت قابل قبول توسط مصرف کنندگان و تأثیر تجاری بالقوه محصولات است [۵۰].



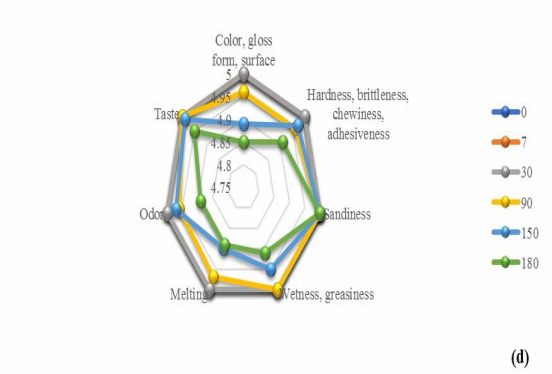
(a)



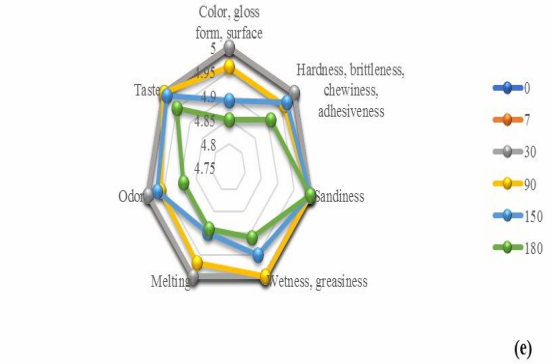
(b)



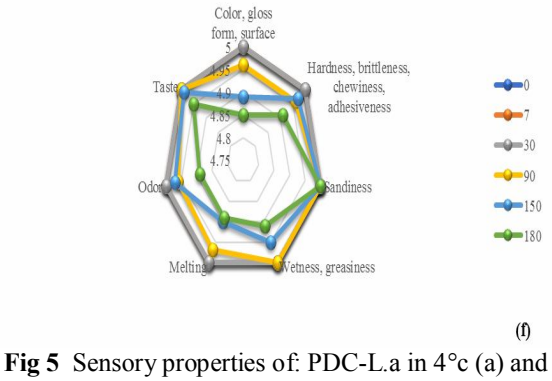
(c)



(d)



(e)



(f)

Fig 5 Sensory properties of: PDC-L.a in 4°c (a) and 25°c (b), PDC-U.B in 4°c (c) and 25°c (d) and PDC-S.t in 4°c (e) and 25°c (f) during storage of 180 days.

٤- نتیجه گیری

در مطالعه حاضر شکلات تلخ ۶۰٪ با موفقیت با سویه های پروبیوتیک باکتری‌های *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium*, *UABla-12™* *DDS-1®* و *Streptococcus thermophilus (TH-4®)* ترکیب شده و تشکیل شکلات تلخ پروبیوتیک را دادند. هر سه سویه از باکتری‌های پروبیوتیک از نظر زنده ماندن شکلات تلخ در دو دمای ٤ °C و ۲۵ °C نتایج مشابه و قابل قبولی داشتند به طوری

که تا پایان ۱۸۰ روز ویژگی محصول فراسودمند و شکلات تلخ پروبیوتیک را نشان دادند، اما مشخص شد که نگهداری در دمای ٤ °C منجر به زنده مانی جمعیت بیشتری از هر سه سویه شد. اما نکته مهم این است که نتایج این تحقیق تأیید می‌کند شکلات تلخ پروبیوتیک بدون نگرانی از افت شدید جمعیت باکتری‌ها و خروج محصول از شرایط پروبیوتیکی در دمای اتاق قابل نگهداری است. از مهمترین علت‌های زنده مانی بالای سویه‌ها می‌توان به افزودن آن‌ها در مرحله پیش از قالب گیری که دمای شکلات کمترین دمای القایی (حدود ۲٦ °C) را دارد، اشاره کرد که پروبیوتیک‌ها را از تنش حرارتی و فشار مراحل مختلف دور نگه داشت. همچنین افزودن سویه‌های پروبیوتیک در شکلات تلخ منجر به تغییر اساسی در ویژگی‌های حسی آن نشده و شکلات تلخ کیفیت حسی بسیار خوبی را در تمام دوره های آزمایش نشان دادند که این عامل به لیوفیلیزه بودن کامل باکتری‌ها و عدم حضور محیط کشت در آن اشاره دارد. هرچند شکلات تلخی که در دمای اتاق نگهداری شده بود از نظر خواص حسی دارای کیفیت پایین‌تری نسبت به نوع نگهداری شده در یخچال بود. لذا در کل تولید این نوع شکلات امکان پذیر بوده و می‌توان آن را در صنعت شکلات سازی وارد کرد. همچنین نتایج این کار نشان داد که ترکیبی از باکتری‌های پروبیوتیک و شکلات تلخ نشان دهنده مسیر امیدوار کننده به سمت تشکیل محصولات جدید فراسودمند است که دارای طعم لذت بخش و اثرات بهبود دهندگی سلامت می‌باشند.

۵- منابع

[1] Afoakwa, E. O. 2010. Chocolate Science and Technology, Blackwell, Oxford, United Kingdom.

[2] Beckett, S. T. 2009. Industrial chocolate manufacture and use (4th ed.). Oxford, UK: Blackwell Publishing.

[3] Bolenz, S., Holm, M., & Langkrar, C. 2014. Improving particle size distribution and flow properties of milk chocolate produced by ball mill and blending. European Food Research and Technology, 238, 139–147.

[4] Afoakwa, E. O., Paterson, A. Afoakwa, E. O., Paterson, A. & Fowler, M. 2007a. Factors influencing rheological and textural qualities in chocolate – a review. Trends in Food Science and Technology. 18,290–298.

[5] Harwood, M. L. 2013. A novel method to assess consumer acceptance of bitterness inchocolate products (p. 123). Thesis in The Pennsylvania State University the Graduate School College of Agricultural Sciences, US.

[6] http://www.fda.gov/Food/LabelingNutrition/LabelClaims/QualifiedHealthClaims/ucm109462.htm

[7] de Morais, M. G. da Silva. B. V. 2015. de Morais. E. G. Vieira Costa, J. A. 2015. Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. BioMed Research International.

[8] Mortazavian, A, M. Sohrabvandi, S (2006) Probiotics and food probiotic products; based on dairy probiotic products. Eta, Tehran. Lactobacillus casei

[9] Robinson, R. K. 2002. Microbiology of therapeutic milks (ed) Dairy microbiology handbook. Wiley, New York, 431–478.

[10] Shah, N. P. 2007. Functional cultures and health benefits. Int Dairy J 17:1262–1277.

[11] Iravani, S. Korbekandi, H. Mirmohammadi, S. V. 2015. Technology and potential applications of probiotic encapsulation in fermented milk products. J Food Sci Technol. v.52(8); 2015 Aug.

[12] Lenfestey, M. W. Josef Neu, J. 2017. Probiotics in Newborns and Children. 64(6):1271-1289.

[13] Lalicˇic´-Petonijevic´, J. 2013. Sensory, Antioxidant and Rheological Properties of Different Types of Chocolates with Probiotics, PhD thesis, Faculty of Agriculture, University of Belgrade, Serbia (in Serbian).

[14] Karamese, M. Aydin, H. Sengul, E. Gelen, V. Sevim, C. Ustek, D. 2016. The immunostimulatory effect of lactic acid bacteria in a rat model, Iran. J. Immunol. 13 (3), 220-228.

[15] Morais, G. C., Morais, A. R., André Bolini, H. M. 2015. Prebiotic and diet/light chocolate dairy dessert: Chemical composition, sensory profiling and relationship with consumer expectation. LWT - Food Science and Technology 62 (1): 424-430.

[16] Díaz-Muñiz, I., Banavara, D. S., Budinich, M. F., Rankin, S.A., Dudley, E. G., Steele, J.

L. 2006. Lactobacillus casei metabolic potential to utilize citrate as an energy source in ripening cheese: a bioinformatics approach. J. Appl. Microbiol. 872–882.

[17] Engelbrekston, A. L., Korzenik, J. R., Sanders, M. E., Clement, B. G., Leyer, G., Klaenhammer, T. R., & Kitts, C. L. (2006). Analysis of treatment effects on the microbial ecology of the human intestine. *FEMS Microbiology Ecology*, *57*, 239–250.

[18] Lalicˇic´-Petronijevic´, J. Popov-Raljic´, J. Obradovic´, D. Radulovic´, Z. Paunovic´, D. Petrušic´, D. Pezo, L. 2015. Viability of probiotic strains *Lactobacillus acidophilus* NCFM® and *Bifidobacterium lactis* HN019 and their impact on sensory and rheological properties of milk and dark chocolates during storage for 180 days. Journal of Functional Foods 15. 541–550.

[19] Lu, Y. Huang, L. Yang, T. Lv, F. Lu, Z. 2017. Optimization of a cryoprotective medium to increase the viability of freeze-dried Streptococcus thermophilus by response surface methodology. LWT - Food Science and Technology. 80. 92-97.

[20] Brant, J., Kurt, S., Sarah, O., Jun, G. Y., & Todd, K. 2013. Identification of extracellular surface-layer associated proteins in lactobacillus acidophilusncfm. Microbiology-sgm, 159(Pt 11), 2269-2282.

[21] Ouwehand, A. C., ten Bruggencate, S. J., Schonewille, A. J., Alhoniemi, E., Forssten, S. D., & Bovee-Oudenhoven, I. M. (2014). Lactobacillus acidophilus supplementation in human subjects and their resistance to enterotoxigenic Escherichia coli infection. British Journal of Nutrition, 111(3), 465-73.

[22] Hymes, J. P., Johnson, B. R., Barrangou, R., & Klaenhammer, T. R. (2016). Functional analysis of an s-layer-associated fibronectin-binding protein in lactobacillus acidophilus ncfm. Applied & Environmental Microbiology, 82(9), 2676-2685.

[23] Arora, T., Anastasovska, J., Gibson, G., Tuohy, K., Sharma, R. K., & Bell, J., et al. 2012. Effect of lactobacillus acidophilus ncdc supplementation on the progression of obesity in diet-induced obese mice. British Journal of Nutrition, 108(8), 1382-9.

[24] Sohail, A., Turner, M. S., & Coombes, A. 2013. The viability of lactobacillus rhamnosus gg and lactobacillus acidophilus ncfm following double encapsulation in alginate and maltodextrin. Food and Bioprocess Technology, 6(10), 2763-2769.

[25] Mu, R. J., Ni, Y., Wang, L., Yuan, Y., Yan, Z., Pang, J., et al. 2017. Fabrication of ordered konjac glucomannan microfiber arrays via facile microfluidic spinning method. Materials Letters, 196, 410-413.

[26] Chetana, R., Reddy, S. R. Y., & Negi, P. S. (2013). Preparation and properties of probiotic chocolate using yoghurt powder. *Food and Nutrition Sciences*, *4*, 276–281.

[27] Nebesny, E., Zyzelewicz, D., Motyl, I., & Libudzisz, Z. (2007). Dark chocolates supplemented with *Lactobacillys* strains. *European Food Research Technology*, *225*, 33–42.

[28] Patel, P., Parekh, T., & Subhash, R. (2008). Development of probiotic and symbiotic chocolate mousse: A functional food. *Biotechnology (Reading, Mass.)*, *7*(4), 769–774.

[29] Homayouni, A. Azizi, A. Ehsani, M.R. Yarmand, M.S. Razavi, S. H. 2008. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. Food Chemistry. 111. 50–55.

[30] Afoakwa, E. O., Paterson, A. Afoakwa, E. O., Paterson, A. & Fowler, M. 2007a. Factors influencing rheological and textural qualities in chocolate – a review. Trends in Food Science and Technology. 18,290–298.

[31] Gültekin-Ozgüven, M. Berktas, I. Beraat, O. 2016. Influence of processing conditions on procyanidin profiles and antioxidant capacity of chocolates: Optimization of dark chocolate manufacturing by response surface methodology. LWT - Food Science and Technology 66: 252-259.

[32] Beckett, S. T. 1999. Industrial chocolate manufacture and use (3rd ed.). Blackwell. Oxford, United Kingdom.

[33] Lalicˇic´-Petonijevic´, J. 2015. Sensory, Antioxidant and Rheological Properties of Different Types of Chocolates with Probiotics, PhD thesis, Faculty of Agriculture, University of Belgrade, Serbia.

[34] ISO 8586-1. 1993. Sensory analysis, General guidance for the selection, training

and monitoring of assessors — Part 1: Selected assessors

[35] ISO 8586-2. 2008. Sensory analysis, General guidance for the selection, training and monitoring of assessors — Part 2: Expert sensory assessors

[36] Doleyres, Y., & Lacroix, C. 2005. Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. *International Dairy Journal*, *15*(10), 973–988.

[37] Bernardeau, M., Guguen, M., & Vernoux, J. P. 2006. Beneficial lactobacilli in food and feed: Long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiology Review*, *30*, 487–513.

[38] Nag, A., & Das, S. 2013. Improving ambient temperature stability of probiotics with stress adaptation and fluidized bed drying. *Journal of Functional Foods*, *5*, 170–177.

[39] Crittenden, R. 2009. Incorporating probiotics into foods. In Y. K. Lee & S. Salminen (Eds.), *Handbook of probiotics and prebiotics* (pp. 58–75). Hoboken, NJ: JohnWiley & Sons, Inc.

[40] Saarela, M., Rantala, M., Hallamaa, K., Nohynek, L., Virkajarvi, I., & Matto, J. 2004. Stationary-phase acid and heat treatments for improvement of the viability of probiotic lactobacilli and bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, *96*, 1205– 1214.

[41] Lahtinen, S. J., Ouwehand, A. C., Salminen, S. J., Forssell, P., & Myllarinen, P. 2007. Effect of starch- and lipid-based encapsulation on the culture ability of two *Bifidobacterium longum* strains. *Letters in Applied Microbiology*, *44*, 500–505.

[42] Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., et al. 2014. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology, 11, 506e514.

[43] Konar, N. Toker, O. S. Oba, S. Sagdic. O. 2016. Improving functionality of chocolate: A review on probiotic, prebiotic, and/or synbiotic characteristics. Trends in Food Science & Technology. 49. 35-44

[44] Maillard, M., & Landuyt, A. 2008. Chocolate: An ideal carrier for probiotics. *Teknoscienze*, *19*(3), 13–15.

[45] Possemiers, S., Marzorati, M., Verstraete, W., & Van derWiele, T. 2010. Bacteria and chocolate: A successful combination for probiotic delivery. *International Journal of Food Microbiology*, *141*, 97–103.

[46] Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., & Ryan, A. 2009. Matrix effects on flavour volatiles release in dark chocolates varying in particle size distribution and fat content using GC–mass spectrometry and GC–olfactometry. *Food Chemistry*, *113*, 208– 215.

[47] Nightingale, L. M., Lee, S.-Y., & Engeseth, N. J. 2011. Impact of storage on dark chocolate: Texture and polymorphic changes. *Journal of Food Science*, *76*(1), 142–153.

[48] Tournier, C., Sulmont-Rosse, C., & Guichard, E. 2007. Flavour perception: Aroma, taste and texture interactions. *Food*, *1*(2), 246–257, Global Science Books, ISSN 1749–7140.

[49] Mohammadi, R., Mortazavian, A. M., Khosrokhavar, R., & Da Cruz, A. G. 2011. Probiotic ice cream: Viability of probiotic bacteria and sensory properties. *Annals of Microbiology*, *61*, 411–424.

[50] Heenan, C. N., Adams, M. C., Hosken, R. W., & Fleet, G. H. 2004. Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a non–fermented frozen vegetarian dessert. *LWT – Food Science and Technology*, *37*, 461–466.

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Study of survival of probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* and *Streptococcus thermophilus* and their effect on sensory properties of probiotic dark chocolate during storage at room temperature and refrigerated for 180 days

Mobahi, N. [1*]

1. Department of Food Science and Technology, Faculty of Maritime Sciences and Technologies, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

ARTICIE INFO

Article History:

Received 2021/ 07/ 20
Accepted 2021/ 11/ 22

Keywords:

Probiotics,
Dark Chocolate,
Survival,
Sensory Properties.

DOI: 10.52547/fsct.18.121.15

DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.121.21.5

*Corresponding Author E-Mail:
n.mobahi@iau-ntb.ac.ir

ABSTRACT

Increasing public awareness of the benefits of preventing functonal products has led to the selection of food products that are very popular and widely consumed by researchers to improve public health. In this study, probiotic dark chocolate (PDC) Was enriched with *actobacillus acidophilus*, *DDS-1*®, Bifidobacterium, *UABla-12* ™ and *Streptococcus thermophilus* TH-4® in the form of microencapsulation with sodium alginate and resistant corn starch to 60% dark chocolate. Production and survival of probiotics and the effect of the presence of these bacteria on the sensory properties of chocolate during a 180-day storage period at 4°C and 25°C (with the aim of determining the storage temperature) by passing through the gastrointestinal simulator and when Intestinal delivery was assessed. During the population maintenance period, all three strains had a significant difference with themselves and other strains in the two storage temperatures and were associated with a decrease ($P < 0.05$). Storage of the product at 4°C caused the survival of Bifidobacterium population at 7 log cfu/g level, in the other two strains at 8 log cfu / g level and at 25°C 7 log cfu/g, which indicates the maintenance of probiotic conditions the product was at both temperatures. The results also showed that the addition of these three strains of probiotic bacteria did not have a significant effect ($P < 0.05$) on the sensory properties of dark chocolate due to two storage temperatures, but storage at 25°C in control and probiotic samples reduced sensory quality. Therefore, storing probiotic dark chocolate at a temperature of 4 °C can make this product last for at least 6 months and be presented to the consumer market as a useful product.