ارزیابی زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* درشکلات پروبیوتیک در طی شش ماه نگهداری در دمای انباری و یخچالی

محبوبه مهربان رودبنه[1]، عزیز همایونی‌راد[2*]، سید رفیع عارف‌حسینی[3]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذائی، دانشکده تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۲- دانشیارگروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۳- استادیارگروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۳/٤/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۲٤)

چکیده

امروزه با توجه به نیاز انسان‌ها به غذاهای فراسودمند و پروبیوتیک و گسترش استفاده از آن‌ها در رژیم‌های غذایی، توجه خاصی به سمت تولید و توسعه محصولات پروبیوتیک مبذول گشته است که می‌توانند نقش مهمی در ارتقای سلامتی جامعه ایفا نماید. تحقیقات نشان داده‌اند که شکلات حامل مناسبی برای میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک می‌باشد.در این مطالعه،شکلات پروبیوتیک حاوی *لاکتوباسیلوس کازئی* تولید شد و برخی از فاکتورهای فیزیکوشیمیائی شامل pHو فعالیت آبی(a_w) به همراه ارزیابی زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی*مورد بررسی قرار گرفتند.افزودن *لاکتوباسیلوس کازئی* به شکلات تأثیر نامطلوب و معنی‌داری بر روی پارامترهای فیزیکوشیمیایی pH و فعالیت آبیدر طول مدت زمان نگهداریش ماهه در دو دمای متفاوت اتاق و یخچالی، نداشته است ($P>۰/۰۵$).بر اساس نتایج به دست آمده، مقدار فعالیت آبی در شکلات پروبیوتیک بطور معنی‌داری بیشتر از شکلات کنترل بوده است ($P<۰/۰۵$). همچنین تأثیر معنی‌داری بر زنده مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* در شکلات پروبیوتیک طی شش ماه نگهداری در دماهای ۲۲ °C و ٤ °C مشاهده نگردید ($P>۰/۰۵$). یافته‌های بدست آمده نشان می‌دهند که شکلات پروبیوتیک حاصله می‌تواند در دمای محیطی نگهداری شود بدون اینکه هیچگونه تغییر نامطلوبی در ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن ایجاد شود. همچنین طی دوره نگهداری شش ماهه در دماهای ۲۲ °C و ٤ °C، با اینکه کاهش جزئی در تعداد باکتری پروبیوتیک رخ داده است اما این کاهش در حدی نیست که شمارش پروبیوتیک ها در نهایت از $۱۰^{۸}$CFU/g پائین‌تر بیاید و بنابراینبهعنوانمحصول فراسودمند پروبیوتیکشناختهمی‌شود.

کلید واژگان: شکلات، پروبیوتیک، زنده‌مانی، *لاکتوباسیلوس کازئی*

*مسئول مکاتبات: homayounia@tbzmed.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-28]

۱- مقدمه

مصرف محصولات غذایی حاوی باکتری‌های زنده‌ی اسیدلاکتیکی(LAB)، به ویژه محصولات پروبیوتیک، دارای اثرات سلامت بخش برای مصرف‌کنندگان از طریق بهبود عملکرد سیستم گوارشی، تقویت سیستم ایمنی، کاهش کلسترول خون و خواص ضد سرطانی می‌باشد. اثر گذاری خواص مفید LAB وابسته به گونه‌ی مورد استفاده، میزان مصرف و دوز موثر باکتری در محصولاست. تعداد سلول‌های زنده‌ی LAB در پایان تاریخ مصرف محصول باید در حدود 10^6تا 10^7 CFU در یک میلی‌لیتر یا یک گرم از محصول باشد [۱و۲].

باکتری‌های اسید لاکتیکی برای قرن‌ها در تولید مواد غذایی تخمیر شده، مخصوصاً در صنایع لبنی مورد استفاده قرار گرفت. همچنین کاربرد LAB در تولید بعضی از انواع سوسیس‌ها، محصولات نانوایی و انواعی از سبزیجات فرآوری‌شده نیز مورد توجه قرارگرفت [۳]. افزایش تقاضا برای تولید محصولات حاوی باکتری‌های زنده ی اسید لاکتیکی، علی الخصوص پروبیوتیک‌ها، مطالعات را به سمت یافتن مواد غذایی دیگری که ویژگی‌های لازم برای میزبانی پروبیوتیک‌ها را داشته باشند، سوق داد.

شیرینی‌جات بطور طبیعی میزبان باکتری‌های اسید لاکتیکی نیستند، با این‌حال ساختار لیپیدی کره‌ی کاکائوی موجود در شکلات خواص محافظتی خوبی برای باکتری‌های پروبیوتیک از خود نشانداده است [٤]. موارد قابل توجه در ساخت شکلاتپ روبیوتیک، مانند زمان و نحوه‌ی افزودن باکتری پروبیوتیک، گونه‌ی مورد استفاده و دوز مصرفی آن، تکنولوژی ساخت و شرایط نگهداری محصول تا زمان مصرف، در مطالعات متعددی مورد بررسی قرارگرفته است.

هدف از این مطالعه تولید شکلات پروبیوتیک حاوی لاکتوباسیلوس‌کازئی و بررسی زنده‌مانی آن‌ها در شرایط نگهداری متفاوت (دمای محیط و یخچال) طی دوره نگهداری ٦ ماهه بود. همچنین برخی از ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی شکلات شاملpH و فعالیت آبی مورد ارزیابی قرار گرفت تا بتوان نشان داد که افزودن *لاکتوباسیلوسکازئی* تأثیر سوئی بر روی ویژگی‌های شکلات تولیدی نداشته است و همچنین محدوده‌ی تغییرات این پارامترهای فیزیکوشیمیایی طی مدت زمان نگهداری تأثیر نامطلوبی بر روی زنده‌مانی *لاکتوباسیلوسکازئی* در شکلات پروبیوتیک نداشته و تعداد آن‌ها در سطح فراسودمندی حفظ شده است که می‌تواند اثرات سودمند سلامتی را برای مصرف کنندگان تأمین نماید.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- انتخاب باکتری پروبیوتیک

در این تحقیق سلول‌های زنده *لاکتوباسیلوس کازئی* (*Lactobacillus casei 431*)به صورت تک سویه، خالص و خشک شده انجمادی خریداری شده از شرکت هنسن دانمارک (CHR-Hansen Denmark) مورد استفاده قرارگرفت.

۲-۲- تولید شکلات

در این تحقیق، شکلات اریچ مغزدار فندقی که در پایلوت شرکت شکوه شاد شانجان (شکلات آی‌سودا) تولید شد، مورد بررسی قرار گرفت. برای تهیه این شکلات، مواد اولیه شامل پودر کاکائو، پودر شکر، لسیتین، وانیلین و کره کاکائو پس از توزین با ترازوی آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۱ گرم، به دستگاه خمیرگیر ریخته شد و به مدت ۱۵ الی ۲۰ دقیقه توسط پره‌های دستگاه مخلوط گردید. دمای مواد در هنگام مخلوط شدن در این دستگاه در حدود ٤٠°C بود. سپس این مواد به والس[1]وارد شد. این دستگاه دارای غلطک‌هایی با دمای تقریبی۲۸°C-۲٦ می‌باشدکه عمل همزدن وکاهش اندازه ذرات را بصورت همزمان انجام می‌دهد. درادامه و برای انجام عمل کانچ[2]، مواد در بالمیل آزمایشگاهی که دارای مخزنی با حجم ۳۰ کیلوگرم است، وارد شدند. دمای مواد در این مرحله در حدود٤۲°C و مدت زمان آن درحدود ٥-٤ ساعت بود. سپس عمل تمپرینگ در طی مدت ۳۰-۲۰ دقیقهبرروی مواد انجام شد تا مواد با دمای کمتر از ۳۰ °C برای قالب‌گیری آماده شوند. از آنجائی‌که باکتری پروبیوتیک نسبت به دماهای بالایی که

1. Refining
2. Conching

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-28]

در مراحل تولید شکلات اعمال می‌گردد حساس است، در این تحقیق باکتری را قبل از قالب‌گیری، درون مغزی اضافه کردیم و سپس تزریق مغزی به داخل شکلات و قالب‌گیری صورت گرفت. برای ساخت مغزی شکلات پودر شکر، روغن، شیرخشک، وانیل، پودر کاکائو، لسیتین و پودر فندق داخل بالمیل آزمایشگاهی مخلوط شده و سپس مغزی به دو قسمت شاهد و نمونه تقسیم شد. باکتری لیوفیلیزه *لاکتوباسیلوس کازئی* به میزان ۳ گرم داخل ۵۰mL شیر استریل حل شد، به مواد افزوده و مخلوط گردید تا بتواند سطح فراسودمندی یعنی میزان 10^7 CFU/g را در فرآورده نهایی پروبیوتیک طی دوره نگهداری و مصرف آن تأمین نماید. سپس نمونه‌های شکلات کنترل و پروبیوتیک قالب‌گیری شده و در فویل آلومینیومی پیچیده شدند. برای نمایش نمونه‌های شکلات کنترل[1] و شکلات پروبیوتیک[2] به ترتیب از حروف اختصاری C.Ch و P.Ch استفاده گردید.

pH -۳-۲

اندازه‌گیری pH، توسط دستگاه pH متر (مدل pH 211 میکرو پروسسور، شرکت Hanna، آلمان) انجام گرفت. بدین ترتیب که ابتدا در حدود ۱۰ گرم از نمونه‌ی آسیاب شده‌ی مغزی شکلات را با ۱۰۰mL آب مقطر مخلوط کرده و به مدت ۲۰ دقیقه به حال خود گذاشتیم تا ته‌نشین شود. سپس pH محلول فوقانی را با pH متری که توسط محلول‌های بافر ٤ و ٧ کالیبره شده بود، اندازه گیری نمودیم.

فعالیت آبی (a_w) -٤-۲

برای اندازه گیری فعالیت آبی نمونه‌های شکلات، از دستگاه a_w سنج (مدل ms1، شرکت Novasina، سوئیس) استفاده گردید. در حدود ۱۲ گرم مغزی شکلات را در داخل محل مخصوص قرارگیری نمونه قرار داده و پس از ۲ دقیقه، عدد مربوط به فعالیت آبی از روی مانیتور دستگاه خوانده شده و گزارش گردید.

آنالیز میکروبی نمونه‌ها -۵-۲

ابتدا نمونه‌ای از شکلات پروبیوتیک تولید شده در کارخانه با محلول فیزیولوژیکی سالین (به غلظت ۸/۵ گرم نمک در لیتر) مخلوط می‌گردد و سپس رقت‌های 10^{-1}، 10^{-2}، 10^{-3}، 10^{-4}، 10^{-5}، 10^{-6}، 10^{-7}، 10^{-8}، 10^{-9}، 10^{-10} آماده شده و در محیط کشت MRS-agar کشت می‌شود و سپس در دمای ۳۷°C انکوبه - گردید. تعداد باکتری‌های زنده پس از گذشت ۷۲ ساعت زیر دستگاه کلنی کانتر شمارش گردید.

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها -٦-۲

طراحی آزمایش‌ها با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار انجام گرفت. برای بررسی تفاوت معنی‌داری بین میانگین داده‌های پارامترهای فیزیکوشیمیایی شکلات تغییرات طی دوره نگهداری به مدت ٦ ماه، از دستورالعمل مربوط به آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) در سطح ۰/۰۵ استفاده شد و همچنین برای ارزیابی تغییرات تعداد و زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس‌کازئی در شکلات پروبیوتیک، روش T-Test مورد استفاده قرار گرفت. کلیه آزمون‌ها در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفتند و تجزیه و تحلیل آماری داده ها توسط SPSS17 انجام شد.

۳- یافته‌ها

ارزیابی تغییرات pH -۱-۳

نتایج آزمون pH برای نمونه‌های شکلات در جدول (۱) آورده شده است. پس از آنالیز آماری و بر اساس یافته‌های نشان داده شده در جدول مذکور، مشاهده می‌شود که در طی دوره نگهداری تفاوت معنی‌داری بین مقادیر pH نمونه‌های شکلات معمولی و پروبیوتیک در دماهای ۲۲°C و ٤°C وجود ندارد($P> ۰/۰۵$).

1. Control Chocolate
2. Probiotic Chocolate

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-28]

جدول ۱ میانگین مقادیر pH در شکلات معمولی (C.Ch) و شکلات پروبیوتیک (P.Ch) در دماهای مختلف۲۲˚C و٤˚C طی مدت زمان نگهداری

گروه	دوره نگهداری (روز)									
	۱	۷	۱٤	۲۱	۲۸	٦۰	۹۰	۱۲۰	۱٥۰	۱۸۰
C.Ch 4˚C	٦/٦۸±۰/۰٤^{aAB}	٦/٦۸±۰/۰۲^{aAB}	٦/٦۹±۰/۰۲^{aB}	٦/٦۸±۰/۰٤^{aAB}	٦/٦۷±۰/۰۳^{aAB}	٦/٦۷±۰/۰۱^{aAB}	٦/٦۷±۰/۰٥^{aAB}	٦/٦٦±۰/۰۲^{aA}	٦/٦٦±۰/۰۳^{aAB}	٦/٦٥±۰/۰۳^{aA}
C.Ch 22˚C	٦/٦۸±۰/۰۳^{aABC}	٦/۷۰±۰/۰۱^{aBC}	٦/٦٦±۰/۰۲^{aAB}	٦/٦۸±۰/۰۳^{aABC}	٦/٦٦±۰/۰۲^{aAB}	٦/٦۹±۰/۰۲^{aABC}	٦/٦۷±۰/۰۳^{aABC}	٦/٦٥±۰/۰۲^{aA}	٦/٦٥±۰/۰۳^{aABC}	٦/٦۹±۰/۰۳^{aC}
P.Ch 4˚C	٦/٦٥±۰/۰۸^{aA}	٦/٦٤±۰/۰۸^{aA}	٦/٦٤±۰/۰۸^{aA}	٦/٦٤±۰/۰۷^{aA}	٦/٦۸±۰/۰۲^{aA}	٦/٦۳±۰/۰٦^{aA}	٦/٦۱±۰/۰۹^{aA}	٦/٦٤±۰/۰۷^{aA}	٦/٦٤±۰/۰۷^{aA}	٦/٦٥±۰/۰۸^{aA}
P.Ch 22˚C	٦/٦٦±۰/۰۳^{aAB}	٦/٦۳±۰/۰٦^{aAB}	٦/٦۳±۰/۰٦^{aAB}	٦/٦۷±۰/۰٥^{aAB}	٦/٦٥±۰/۰۸^{aAB}	٦/٦۸±۰/۰۳^{aAB}	٦/٦۳±۰/۰۸^{aAB}	٦/٦٦±۰/۰۱^{aAB}	٦/٦٦±۰/۰۱^{aA}	٦/٦۷±۰/۰۲^{aAB}

* میانگین±انحراف معیار (n=3)

** حروف کوچک متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف معنی دار در سطح α=0.05 توسط آزمون توکی (Tukey)و حروف بزرگ متفاوت در هر ردیف بیانگر اختلاف معنی دار در سطح α=0.05 توسط آزمون حداقل تفاوت معنی دار یا LSD (Least Significant Difference) می باشد.

۳-۲- ارزیابی تغییرات فعالیت آبی (a_w)

نتایج اندازه گیری فعالیت آبی نمونه‌ها در جدول (۲) نشان داده شده است.

پس از بررسی نتایج بدست آمده از آنالیز آماری مشخص شد کهطی دوره نگهداری تفاوت معنی‌داری در میزان فعالیت آبی بین نمونه‌های شکلات کنترل و پروبیوتیک وجود دارد (P< ۰/۰۵) و مقدار آن در نمونه‌های شکلات پروبیوتیک بیشتر از شکلات کنترل می‌باشد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-28]

جدول ۲ میانگین مقادیر فعالیت آبی در شکلات معمولی (C.Ch) و شکلات پروبیوتیک (P.Ch) در دماهای مختلف۲۲°C و٤°C طی دوره نگهداری

گروه	دوره نگهداری (روز)									
	۱	۷	١٤	۲۱	۲۸	٦٠	۹۰	۱۲۰	۱۵۰	۱۸۰
C.Ch 4 °C	۰/۲۰±۰/۰۱^{aA}	۰/۲۱±۰/۰۱^{aA}	۰/۲۰±۰/۰۱^{aA}	۰/۲۱±۰/۰۲^{aAB}	۰/۲۱±۰/۰۱^{aAB}	۰/۲۲±۰/۰۱^{aAB}	۰/۲۲±۰/۰۱^{aAB}	۰/۲۲±۰/۰۱^{aAB}	۰/۲۳±۰/۰۱^{aAB}	۰/۲۳±۰/۰۱^{aAB}
C.Ch 22 °C	۰/۲۰±۰/۰۱^{aA}	۰/۲۰±۰/۰۱^{aA}	۰/۲۱±۰/۰۱^{aA}	۰/۲۰±۰/۰۱^{aA}	۰/۲۰±۰/۰۱^{aA}	۰/۲۲±۰/۰۱^{aAB}	۰/۲۲±۰/۰۱^{aB}	۰/۲۲±۰/۰۱^{aAB}	۰/۲۳±۰/۰۱^{aB}	۰/۲۳±۰/۰۱^{aB}
P.Ch 4 °C	۰/۲۷±۰/۰۱^{bA}	۰/۲۷±۰/۰۱^{bA}	۰/۲۷±۰/۰۱^{bA}	۰/۲۸±۰/۰۱^{bA}	۰/۲۷±۰/۰۱^{bA}	۰/۲۸±۰/۰۱^{bA}	۰/۲۷±۰/۰۱^{bA}	۰/۲۷±۰/۰۱^{bA}	۰/۲۷±۰/۰۱^{bA}	۰/۲۷±۰/۰۱^{bA}
P.Ch 22 °C	۰/۲۷±۰/۰۱^{bA}	۰/۲۷±۰/۰۱^{bA}	۰/۲۷±۰/۰۱^{bA}	۰/۲٦±۰/۰۱^{bA}	۰/۲٦±۰/۰۱^{bA}	۰/۲۷±۰/۰۱^{bA}	۰/۲۷±۰/۰۱^{bA}	۰/۲۷±۰/۰۱^{bA}	۰/۲۷±۰/۰۱^{bA}	۰/۲۷±۰/۰۱^{bA}

* میانگین±انحراف معیار (n=3)

** حروف کوچک متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف معنی دار در سطح α=0.05 توسط آزمون توکی (Tukey)و حروف بزرگ متفاوت در هر ردیف بیانگر اختلاف معنی دار در سطح α=0.05 توسط آزمون حداقل تفاوت معنی دار یا LSD (Least Significant Difference) می باشد.

همچنین نتایج حاصله نشان دادند کهدر طول مدت شش ماه نگهداری، فعالیت آبی نمونه شکلات کنترل (C.Ch 4 °C و C.Ch 22 °C) افزایش معنی‌داری داشته است (P< ۰/۰۵). در حالیکه تغییرات معنی‌داری در میزان فعالیت آبی نمونه‌های شکلات پروبیوتیک در هر دو دمای نگهداری یعنی نمونه‌های P.Ch 4 °C و P.Ch 4 °Cطی مدت نگهداری وجود نداشته است (P> ۰/۰۵).

۳-۳- بررسی زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس کازئی*

بر اساس نتایج حاصله که در جدول ۳ نشان داده شده است، تعداد باکتری‌ها در نمونه‌های شکلات پروبیوتیک نگهداری شده در دمای C ۲۲° به میزان خیلی ناچیزی کمتر از نمونه‌های دمای٤°C بوده است که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبوده است (P> ۰/۰۵). همچنین کاهش جزئی در تعداد باکتری‌ها در روزهای مختلف دوره نگهداری و در هر یک از دو دمای ٤°C و ۲۲°C، مشاهده شد که از نظر آماری معنی‌دار نمی باشد (P> ۰/۰۵).

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-28]

جدول ۳ میانگین تعداد باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* (Log CFU/g) در شکلات معمولی (C.Ch) و شکلات پروبیوتیک (P.Ch) در دماهای مختلف ۲۲ و ٤ °C طی دوره نگهداری

گروه	دوره نگهداری (روز)									
	۱	۷	١٤	۲۱	۲۸	٦۰	۹۰	۱۲۰	۱۵۰	۱۸۰
P.Ch 4 °C	۹/۷±۰/٦^{aB}	۹/۳±۰/٦^{aAB}	۹/۰±۰/^{aAB}	۸/۷±۰/٦^{aAB}	۸/۳±۰/٦^{aAB}	۸/۰±۰/^{aA}	۸/۳±۰/٦^{aAB}	۸/۳±۰/٦^{aAB}	۸/۰±۱/۰^{aA}	۸/۳±۰/٦^{aAB}
P.Ch 22 °C	۹/۳±۰/٦^{aA}	۸/۷±۰/٦^{aA}	۸/۳±۰/٦^{aA}	۸/۳±۰/٦^{aA}	۸/۳±۰/٦^{aA}	۸/۰±۱/۰^{aA}	۸/۳±۰/٦^{aA}	۸/۰±۱/۰^{aA}	۸/۰±۰/۰^{aA}	۸/۰±۱/۰^{aA}

* میانگین±انحراف معیار (n=3)

** حروف کوچک متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف معنی دار در سطح $\alpha=0.05$ توسط آزمون تی برای نمونه های مستقل و حروف بزرگ متفاوت در هر ردیف بیانگر اختلاف معنی دار در سطح $\alpha=0.05$ توسط آزمون آزمون تی برای نمونه های زوجی می باشد.

٤- تفسیر و تحلیل نتایج

شناخت هر چه بیشتر مراحل تولید و نکات تکنولوژیکی در مورد فرآورده‌های پروبیوتیکی در حین‌تولیدونیز طی مدت زمان نگهداری آن‌ها، منجر به شناخت هرچه بیشتر محدودیت‌های تولید و برطرف نمودن آن‌ها و نیز گشاینده‌ی دریچه‌های بیشتری به سوی صنعتی شدن محصولات پروبیوتیک و ارتقای سطح سلامتی جامعه خواهد شد.

pH یکی از مهمترین خصوصیات فیزیکوشیمیایی محصول می‌باشد که افزایش یا کاهش آن تأثیر فراوانی در فساد و ماندگاری محصول دارد. بررسی تغییرات pH نمونه‌های شکلات از دو منظر دارای اهمیت است. اول اینکه در طول نگهداری محصول، محدوده pH نمونه‌ها در حدود ٦/٦ تا ٦/٧ بود (جدول ۱)؛ لذا با محدوده‌ی pH اپتیمم برای رشد *لاکتوباسیلوس کازئی*(pH=٤-۵) فاصله داشته و مانع از فعال‌سازی پروبیوتیک-ها در مغزی شکلات شد. دوم اینکه تغییرات pH یکی از فاکتورهای تأثیرگذار بر کیفیت محصول، فساد و ماندگاری آن است و افزودن پروبیوتیک مذکور اثر منفی بر این پارامتر نداشت. همانطور که در جدول (۱) مشاهده می‌شود، تفاوت معنی‌داری بین مقادیر pH اندازه‌گیری شده‌ینمونه‌های شکلات پروبیوتیک و کنترل طی مدت زمان نگهداری در دمای محیط و یخچالی وجود ندارد. با این حال مشاهده شده بود که در طی دوره نگهداری، مقادیر pH برای نمونه های شکلات کنترل (C.Ch) به میزان بسیار ناچیزی بیشتر از شکلات پروبیوتیک (P.Ch) می‌باشد؛ که علت این امر می‌تواند مربوط به افزایش یافتن مقادیر فعالیت آبی (a_w) در شکلات معمولی طی دوره نگهداری بوده که منجر به کاهش غلظت H^+ و بنابراین افزایش pH می‌شود.دلیل دیگر می‌تواند ناشی از فعالیت برخی از لاکتوباسیلوس‌ها و یا آزاد شدن متابولیت‌هایی از آن‌ها باشد که سبب افزایش اسیدیته محصول و کم‌شدن مقدارpH در شکلات پروبیوتیک نسبت به شکلات معمولی می‌شود.

همچنین بر اساس نتایج مطالعه انجام شده توسط Beresford و همکارانش در سال ۲۰۰۱، میزان pH بهینه برای رشد اغلب باکتری‌ها نزدیک به pH خنثی می‌باشد و رشد آنها در مقادیر pH کمتر از ۵ خنثی می‌شود [۵]. بنابراین، کاهش در میزان pH نمونه‌های شکلات پروبیوتیک مورد بررسی در تحقیق حاضر به اندازه‌ای نیست که منجر به آسیب رساندن به زنده‌مانی لاکتوباسیلوس‌های موجود در شکلات پروبیوتیک شوند.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-28]

مقادیر pH در طی دوره نگهداری برای نمونه‌های شکلات پروبیوتیک در هر دو دمای ۲۲ °C و ٤ °C تقریبا روند ثابتی را نشان می‌دهند. ولی از آنجائیکه مقدار فعالیت آبی در شکلات پروبیوتیک کمی بالاتر از شکلات معمولی بوده است، در نتیجه این مقدار از فعالیت آبی باعث تعدیل غلظت یونهای H^+ در شکلات پروبیوتیک و ثابت ماندن مقدار pH در آن گردیده است. درمطالعه‌ای که توسط Aragon-Alegro و همکارانش در سال۲۰۰۷ انجام شده بود نشان داده شد که طی مدت زمان نگهداری، مقادیر اسیدیته نمونه‌های موس شکلاتی کنترل، پروبیوتیک و پری‌بیوتیک افزایش و متعاقبا مقادیر pH کاهش یافته بود، که این مسأله در مورد موس شکلاتی پروبیوتیک غنی شده با پری‌بیوتیک اینولین نمایان‌تر بود. بعد از زمان ۲۸ روز نگهداری، مقدار pH در موس شکلاتی پروبیوتیک در مقایسه با موس شکلاتی معمولی کاهش بیشتری یافته بود که احتمالاً به علت حضور لاکتوباسیلوس پاراکازئی (*L. paracasei*) بعنوان باکتری پروبیوتیک مورد استفاده بوده است [٦].

فعالیت آبی (a_w) نیز یکی از مهمترین خصوصیات فیزیکوشیمیایی محصول می‌باشد که اطلاع از میزان این فاکتور می‌تواند باعث جلوگیری از خسارت و بنابراین منجر به آسیب کمتری به محصول می‌گردد. میزان فعالیت آبی یکی از پارامترهایی است که بر رشد میکروارگانیسم ها اثر گذاشته و از اهمیت ویژه‌ای در نگهداری مواد غذایی برخوردار است. میزان فعالیت آبی شکلات به علت مقدار چربی و شکر فراوان، بسیار کم بوده (حدود ۰/۳) و رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها را محدود ساخته است که این موضوع در ماندگاری محصول مؤثر است[۸].

نتایج ارایه شده در جدول (۲) نشان دادند که شکلات پروبیوتیک نسبت به شکلات معمولی دارای فعالیت آبی بالاتری می‌باشد اما به قدری نیست که بتواند موجب فعالیت باکتری پروبیوتیک در شکلات گردد. در مطالعه‌ای که توسط Budryn و همکارانش در سال ۲۰۰۷ انجام شده بود، مشاهده شد که در روکش‌های شکلاتی بیسکوئیت‌ها که با مقادیر متفاوتی از LAB غنی سازی شده‌اند، بیشترین میزان a_w در بیسکوئیت‌های دارای ۳۵٪ روکش شکلات و در محصول تازه غیرپروبیوتیک می‌باشد. همچنین در بررسی‌ای که روی محصول آب نبات (Candy) انجام شده بود، در محصول تازه و دارای میزان ۲۵٪ روکش شکلات حاوی پروبیوتیک، بیشترین مقدار a_w مشاهده گردید. بطور کلی میزان فعالیت آبی در مورد آب‌نبات و بیسکوئیت پوشش‌دهی شده با ضخامت متوسطی از شکلات پروبیوتیک، نسبتا بالا بوده است [۹].

بررسی تغییرات فعالیت آبی نمونه‌های شکلات نشان می دهد که فعالیت آبی نمونه‌های شکلات کنترل (C.Ch) در هر دو دمای نگهداری ۲۲°C و٤°C طی مدت زمان نگهداری شش ماهه بطور معنی‌داری افزایش یافته بود که این موضوع می‌تواند به‌علت کریستالیزاسیون مجدد ساکارز موجود در شکلات باشد که باعث آزادسازی آب و در نتیجه افزایش فعالیت آبی محصول در طی نگهداری شود. این نتیجه با نتایج حاصل از مطالعه Budryn و همکارانش در سال ۲۰۰۷ که بر روی پوشش شکلاتی پروبیوتیک در بیسکوئیت و آب‌نبات انجام شده بود، مطابقت دارد [۹]. شکلات جزء محصولاتی می‌باشدکه با افزایش a_w میزان آسیب به محصول بیشتر و فساد محصول تسریع می‌شود و به همین جهت ضروری است که به مقدار a_w توجه زیادی مبذول گردد[۷].

محدوده‌ی فعالیت آبی در بررسی حاضر در محدوده ۰/۲۰ تا ۰/۲۸ متغیر بوده است که تفاوت معنی‌داری در مقادیر فعالیت آبی نمونه‌های شکلات پروبیوتیک در هیچ کدام از دماها طی زمان نگهداری مشاهده نگردید. در مطالعه‌ای که بر روی روکش‌های شکلاتی پروبیوتیک (غنی شده با LAB) صورت گرفته بود، فعالیت آبی نمونه‌ها در طول مدت زمان نگهداری با توجه به ضخامت روکش محصول روند متفاوتی داشتند. نکته‌ی قابل توجه محدوده‌ی تغییرات فعالیت آبی است که در تحقیق فوق برای بیسکوئیت و آب نبات به ترتیب در حدود ۰/۲۱ تا ۰/۳٤ و ۰/۲۲۹ تا ۰/۳۳۸ متغیر بوده است. این حدود از فعالیت آبی اجازه‌ی فعال شدن به پروبیوتیک‌های موجود در شکلات را نداده و در نتیجه پروبیوتیک‌ها در مرحله‌ی نیمه فعال آنابیوسیس باقی مانده و در طول مدت نگهداری محصول زنده‌مانی و پایداری بالایی از خود نشان دادند [۱۰].

نتایج بسیاری از تحقیقات نشان داده است که زنده‌مانی باکتری-های اسیدلاکتیک در برخی از فرآورده های قنادی بطور ویژه ای بالا می‌باشد. همچنین محتوای بسیار پایین آب یا رطوبت در این

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-28]

گروه از محصولات، یعنی داشتن فعالیت آبی پایین (کمتر از ۰/٦)، غلظت بالای کربوهیدرات‌ها و به ویژه ساکاروز و دسترسی پایین به اکسیژن منجر شده است که بعنوان حامل مناسبی برای انتقال باکتری‌های اسید لاکتیک به بدن انسان مطرح باشند. زنده-مانی باکتری‌های اسید لاکتیک به نوع سویه اسید لاکتیک، فرم و حالت ورود آنها به داخل محصول غذایی، ترکیب اجزاء تشکیل دهنده محصول (بویژه نوع چربی)، شرایط تولید و نحوه دریافت این فرآورده قنادی و همچنین مدت زمان و شرایط نگهداری آن بستگی دارد [۱۱].

در مطالعه‌ای که بر روی موس شکلاتی پروبیوتیک صورت گرفته بود، نشان داده شد که در طی مدت نگهداری به مدت ۲۸ روز و در دمای یخچالی$^{\circ}C$ ۵، جمعیت میکروبی *L. paracasei* در تعداد بالاتر از Log CFU/g ۷ قرار گرفته بود. این نتایج نشان می دهند که *L. paracasei* پایداری خوبی در شکلات داشته و همچنین شرایط مناسبی برای پروبیوتیک‌ها در موس شکلاتی طی نگهداری برقرار شده است که منجر به افزایش تعداد پروبیوتیک-ها در این فرآورده شده است[٦].

در تحقیق حاضر، با گذشت زمان و طی دوره نگهداری ٦ ماهه در دماهای $^{\circ}C$ ۲۲و $^{\circ}C$ ٤، با اینکه کاهش جزئی در تعداد باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی*رخ داده است، اما این کاهش در حدی نیست که شمارش پروبیوتیک‌ها در نهایت از$CFU/g^{٨}$۱۰ پائین تر بیاید.علت این پدیده را می‌توان اینگونه توضیح داد که پس از افزودن پروبیوتیک‌ها (بصورت لیوفیلیزه که در آن باکتری-ها حالت نیمه فعال دارند) به مغزی شکلات، باکتری‌ها داخل محصول جامدی به دام می‌افتند که به هیچ عنوان قابلیت انتشار گاز را ندارد. حتی سلول‌های پروبیوتیک در سطح مغزی شکلات نیز به اکسیژن دسترسی ندارند چون با لایه‌ای از شکلات پوشش داده شده‌اند.پوشش شکلاتی روی مغزی و نیز پوشش فویل آلومینیوم، از تماس پروبیوتیک‌ها با اکسیژن و نیز تأثیر رطوبت جلوگیری می‌کند.همچنین به‌علت درصد بالای چربی و شیرین‌کننده، محتوای رطوبت در محیط شکلات بسیار پائین است و پروبیوتیک‌ها قادر به رشد و نمو نیستند. شیر و چربی موجود در مغزی شکلات نیز از سلول‌های پروبیوتیک حمایت می‌کند[۱۲].

نتایج مطالعه ما با نتایج بدست آمده توسط Da Silva و همکارانش در سال ۲۰۱۳ همخوانی دارد، بطوریکه آن‌ها نشان دادند، شمارش تعداد باکتری‌های *L.Casei* در نوعی فرنی شکلاتی طی مدت نگهداری ۱۵ روز بیشتر از $CFU/g^{٩}$۱۰بوده است [۱۳]. در یکی از مطالعات پیشین، نتایج نشان داده‌اند که پوشش‌دهی پروبیوتیک ها در شکلات به عنوان یک راه حل بسیار مناسب برای محافظت از باکتری‌های پروبیوتیک در برابر شرایط و استرس محیطی برای انتقال بهینه و مناسب آن‌ها به بدن می‌باشد [۱۹-۱٤]. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که شکلات حامل مناسبی برای انتقال باکتری‌های پروبیوتیک و اثرات سودمند آن‌ها به بدن انسان می‌باشد.

در مجموع، افزودن *لاکتوباسیلوس کازئی* تأثیرات نامطلوبی بر روی پارامترهای فیزیکوشیمایی pH و فعالیت آبی نداشته است. همچنین نتایج زنده مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* در شکلات مغزدار تولید شده نشان دادند که محصول نهایی مطابق تعریف فدراسیون جهانی لبنیات[1] با در برداشتن بیش از$CFU/g^{٧}$۱۰باکتری زنده *لاکتوباسیلوس کازئی* به عنوان فرآورده پروبیوتیک به شمار می‌رود و نیازی به نگهداری در شرایط دمایی یخچال نمی‌باشد.

۵- سپاسگزاری

بدین وسیله از شرکت شکوه شاد شانجان به خاطر تأمین مواد اولیه و انجام برخی از آزمایشات و نیز دانشکده تغذیه دانشگاه علوم پزشکی تبریز که امکانات اجرایی این طرح پژوهشی را فراهم نموده است، تشکر می‌شود.

٦- منابع

[1] Yoon K.y., Woodams E.E., Hang Y.D., Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresource technology*, 2006;(97):1427-1430.

[2] Stanton C., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Van Sinderen D., Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolism. *Current opinion in biotechnology*, 2005;(16):198-203.

1. IDF

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-28]

[3] Lahtinen S, Ouwehand A, Salminen S, Forssell P, Myllärinen P. Effect of starch-and lipid-based encapsulation on the culturability of two Bifidobacterium longum strains. *Letters in applied microbiology*. 2007;44(5):500-5.
[4] Aragon-Alegro LC, Alarcon Alegro JH, Roberta Cardarelli H, Chih Chiu M, Isay Saad SM. Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. *LWT-Food Science and technology*. 2007;40(4):669-75.
[5] Beresford TP, Fitzsimons NA, Brennan NL, Cogan TM. Recent advances in cheese microbiology. *International dairy journal*. 2001;11(4):259-74.
[6]Aragon-Alegro LC, Alarcon Alegro JH, Roberta Cardarelli H, Chih Chiu M, Isay Saad SM. Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. *LWT-Food Science and technology*. 2007;40(4):669-75.
[7] Żyżelewicz D, Nebesny E, Krysiak W, Budryn G, Motyl I, Libudzisz Z. Spreadable product for bread of probiotic properties and preparation thereof. *Polish patent application*: 3881582009in polish. 2009.
[8] Zyzelewicz D., Nebesny E., Motyl I. and Libudzisz Z., Effect of milk chocolate supplementation with lyophilised lactobacillus cells on its attributes, *Czech journal food science*, 2010;28(5):392-406.
[9] Budryn G, Nebesny E, Żyżelewicz D, Krysiak W, Motyl I, Libudzisz Z. Confectionery product of sugar-fat cores. *Polish patent application*: 3841542007in polish. 2007.
[10] Saarela M, Mogensen G, Fondén R, Mättö J, Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of biotechnology*. 2000;84(3):197-215.
[11] Shah N. Probiotics and prebiotics. *Agroculture Food industry High Technology*. 2004;15(1):13-7.
[12] Nebesny E, Żyżelewicz D, Motyl I, Libudzisz Z. Dark chocolates supplemented with Lactobacillus strains. *European Food Research and Technology*. 2007;225(1):33-42.
[13] da Silva AS, Honjoya ER, Inay OM, de Rezende Costa M, de Souza CHB, de Santana EHW, et al. Viability of Lactobacillus casei in chocolate flan and its survival to simulated gastrointestinal conditions. *Semina: Ciências Agrárias*. 2013;33(6Supl2):3163-70.
[14] Possemiers S, Marzorati M, Verstraete W, Van de Wiele T. Bacteria and chocolate: a successful combination for probiotic delivery. *International journal of food microbiology*. 2010;141(1):97-103.
[15] Homayouni Rad A, Vaghef Mehrabany E, Alipoor B, Vaghef Mehrabany L, Javadi M. Do probiotics act more efficiently in foods than in supplements? *Nutrition.* 2012; 28: 733-6.
[16] Homayouni Rad A, Vaghef Mehrabany E. Which are more important: Prebiotics or probiotics? *Nutrition.* 2012; 28: 1196-7.
[17] Homayouni, A., Ehsani, M.R., Azizi, A., Razavi, S.H., Yarmand M.S. Growth and survival of some probiotic strains in simulated ice cream conditions. *Journal of Applied Sciences*. 2008: 8, 379-382.
[18] Homayouni, A., Azizi, A., Javadi, M., Mahdipour, S., Ejtahed H., Factors influencing probiotic survival in ice cream: a review. *International Journal of Dairy Science*. 2012: 7, 1-10.
[19] Homayouni A. Letter to the editor. *Food Chemistry*. 2009; 114.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-28]

Assessing the survival of *Lactobacillus casei* in probioticchocolate during 6 months in ambientandrefrigerated temperatures

MehrbanRoudbaneh, M. [1], Homayouni Rad, A. [2*], ArefHosseyni, S. R. [3]

1. M.Sc in Food Science and Technology, Faculty of Nutrition, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
2. Associate Prof, Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Nutrition, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
3. Assistant Prof, Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Nutrition, Tabriz University of MedicalSciences, Tabriz, Iran.

(Received: 93/4/29 Accepted: 93/10/24)

Nowadays, regarding to human need to functional and probiotic foods and the extend use of these foods, considerable attention is donated to production and development of probiotic products which eventually can play an important role in improvement of society health.Additionally, investigations have identified the chocolate as a proper carrier for probiotics. In the present study,probiotic chocolate containing *Lactobacillus casei* was manufactured and then some of physicochemical parameters including pH and water activity (a_w) together with survival assessment of *Lactobacilluscasei* in chocolate were investigated.Addition of *Lactobacillus casei* to chocolate haven't had any adverse and significant effects on physicochemical parameters such as pH and water activity during 6-month storage time at ambient and refrigerated temperatures ($P>0.05$). According to obtained results, the amount of water activity in probiotic chocolate was higher than control chocolate ($P<0.05$). Moreover, the survival of *Lactobacillus casei* in probiotic chocolate didn't changed significantly during 6 months storage at two different temperatures of 4 and 22 ˚C ($P>0.05$).The obtained results declared that the enriched chocolate with *Lactobacillus casei* can be stored at ambient temperature without having any unfavorable changes in its physicochemical properties such as pH and water activity. Also, even with slight decrease in population of probiotic bacteria of *Lactobacillus casei* during the 6-month storage time at temperatures of 4 and 22 ˚C, but the final product which included 10^8 CFU/g probiotic cells can be considered as a functional probiotic foodstuff.

Keywords: Chocolate, Probiotic, Survival, *Lactobacillus casei*

* Corresponding Author E-Mail Address: homayounia@tbzmed.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-28]