

## ارزیابی زنده‌مانی لاکتوباسیلوس کازئی در شکلات پروبیوتیک در طی شش ماه نگهداری در دمای انباری و یخچالی

محبوبه مهربان رودبند<sup>۱</sup>، عزیز همایونی‌راد<sup>۲\*</sup>، سید رفیع عارف حسینی<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۳- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۲۴)

### 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 نمایند. 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 فیزیوشیمیایی شامل pH و 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 فیزیوشیمیایی pH و فعالیت آبی در طول مدت زمان نگهداری شش ماهه در دو دمای متفاوت اتاق و یخچالی، نداشته است ( $P > 0/05$ ). بر اساس نتایج به دست آمده، مقدار فعالیت آبی در شکلات پروبیوتیک بطور معنی‌داری بیشتر از شکلات کنترل بوده است ( $P < 0/05$ ). همچنین تأثیر معنی‌داری بر زنده‌مانی لاکتوباسیلوس کازئی در شکلات پروبیوتیک طی شش ماه نگهداری در دماهای  $22^{\circ}\text{C}$  و  $4^{\circ}\text{C}$  مشاهده نگردید ( $P > 0/05$ ). یافته‌های بدست آمده نشان می‌دهند که شکلات پروبیوتیک حاصله می‌تواند در دمای محیطی نگهداری شود بدون اینکه هیچگونه تغییر نامطلوبی در ویژگی‌های فیزیوشیمیایی آن ایجاد شود. همچنین طی دوره نگهداری شش ماهه در دماهای  $22^{\circ}\text{C}$  و  $4^{\circ}\text{C}$ ، با اینکه کاهش جزئی در تعداد باکتری پروبیوتیک رخ داده است اما این کاهش در حدی نیست که شمارش پروبیوتیک‌ها در نهایت از  $10^4\text{CFU/g}$  پائین‌تر بیاید و بنابراین به عنوان محصول فراسودمند پروبیوتیک شناخته می‌شود.

کلید واژگان: شکلات، پروبیوتیک، زنده‌مانی، لاکتوباسیلوس کازئی

\*مسئول مکاتبات: homayounia@tbzmed.ac.ir

## 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 محصول است. تعداد سلول‌های زنده‌ی LAB در پایان تاریخ مصرف محصول باید در حدود  $10^7$  تا  $10^9$  CFU در یک میلی‌لیتر یا یک گرم از محصول باشد [۲۱].

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 نانویی و انواعی از سبزیجات فرآوری‌شده نیز مورد توجه قرار گرفت [۳]. افزایش تقاضا برای تولید محصولات حاوی باکتری‌های زنده‌ی اسید لاکتیکی، علی‌الخصوص 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 این حال ساختار لیپیدی کره‌ی کاکائوی موجود در شکلات خواص محافظتی خوبی برای باکتری‌های پروبیوتیک از خود نشان داده است [۴]. موارد قابل توجه در ساخت شکلات پروبیوتیک، 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 قرار گرفته است.

هدف از این مطالعه تولید شکلات پروبیوتیک حاوی لاکتوباسیلوس کازئی و بررسی زنده‌مانی آن‌ها در شرایط نگهداری متفاوت (دمای محیط و یخچال) طی دوره نگهداری ۶ ماهه بود. همچنین برخی از ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی شکلات شامل pH و فعالیت آبی مورد ارزیابی قرار گرفت تا بتوان نشان داد که افزودن لاکتوباسیلوس کازئی 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 لاکتوباسیلوس کازئی در شکلات پروبیوتیک نداشته و تعداد آن‌ها در سطح فراسودمندی حفظ شده است که می‌تواند اثرات سودمند سلامتی را برای مصرف‌کنندگان 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 قرار گرفت.

### 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  $0/01$  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  $40^{\circ}\text{C}$  بود. سپس این مواد به والس وارد شد. این دستگاه دارای غلطک‌هایی با دمای تقریبی  $28-26^{\circ}\text{C}$  می‌باشد که عمل همزدن و کاهش اندازه ذرات را بصورت همزمان انجام می‌دهد. در ادامه و برای انجام عمل کانچ، مواد در بالمیل آزمایشگاهی که دارای مخزنی با حجم ۳۰ کیلوگرم است، وارد شدند. دمای مواد در این مرحله در حدود  $42^{\circ}\text{C}$  و مدت زمان آن در حدود ۴-۵ ساعت بود. سپس عمل تمپرینگ در طی مدت ۲۰-۳۰ دقیقه بر روی مواد انجام شد تا مواد با دمای کمتر از  $30^{\circ}\text{C}$  برای قالب‌گیری آماده شوند. از آنجائی که باکتری پروبیوتیک نسبت به دماهای بالایی که

## ۲-۵- آنالیز میکروبی نمونه‌ها

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  $37^{\circ}\text{C}$  انکوبه - گردید. تعداد باکتری‌های زنده پس از گذشت ۷۲ ساعت زیر دستگاه کلنی کانتر شمارش گردید.

## ۲-۶- روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

طراحی آزمایش‌ها با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام گرفت. برای بررسی تفاوت معنی‌داری بین میانگین داده‌های پارامترهای فیزیوشیمیایی شکلات تغییرات طی دوره نگهداری به مدت ۶ ماه، از دستورالعمل مربوط به آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) در سطح ۰/۰۵ استفاده شد و همچنین برای ارزیابی تغییرات تعداد و زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی در شکلات پروبیوتیک، روش T-Test مورد استفاده قرار گرفت. کلیه آزمون‌ها در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفتند و تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها توسط SPSS17 انجام شد.

## ۳- یافته‌ها

### ۳-۱- ارزیابی تغییرات pH

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  $22^{\circ}\text{C}$  و  $4^{\circ}\text{C}$  وجود ندارد ( $P > 0/05$ ).

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 ۵۰ mL 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<sup>۱</sup> و شکلات پروبیوتیک<sup>۲</sup> به ترتیب از حروف اختصاری C.Ch و P.Ch استفاده گردید.

### ۲-۳- pH

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 ۱۰۰ mL 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 ۴ و ۷ کالیبره شده بود، اندازه‌گیری نمودیم.

### ۲-۴- فعالیت آبی ( $a_w$ )

برای اندازه‌گیری فعالیت آبی نمونه‌های شکلات، از دستگاه  $a_w$  سنچ (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.

1. Control Chocolate
2. Probiotic Chocolate

جدول ۱ میانگین مقادیر pH در شکلات معمولی (C.Ch) و شکلات پروبیوتیک (P.Ch) در دماهای مختلف ۲۲°C و ۴°C طی مدت زمان نگهداری

گروه	دوره نگهداری (روز)									
	۱۸۰	۱۵۰	۱۲۰	۹۰	۶۰	۲۸	۲۱	۱۴	۷	۱
C.Ch 4°C	۶/۶۵±۰/۰۳ <sup>aA</sup>	۶/۶۶±۰/۰۲ <sup>aAB</sup>	۶/۶۶±۰/۰۲ <sup>aA</sup>	۶/۶۸±۰/۰۵ <sup>aAB</sup>	۶/۶۷±۰/۰۱ <sup>aAB</sup>	۶/۶۷±۰/۰۳ <sup>aAB</sup>	۶/۶۸±۰/۰۴ <sup>aAB</sup>	۶/۶۹±۰/۰۲ <sup>aAB</sup>	۶/۶۸±۰/۰۲ <sup>aAB</sup>	۶/۶۸±۰/۰۴ <sup>aAB</sup>
C.Ch 22°C	۶/۶۹±۰/۰۳ <sup>aC</sup>	۶/۶۵±۰/۰۲ <sup>aABC</sup>	۶/۶۵±۰/۰۲ <sup>aA</sup>	۶/۶۷±۰/۰۳ <sup>aABC</sup>	۶/۶۹±۰/۰۲ <sup>aABC</sup>	۶/۶۶±۰/۰۲ <sup>aAB</sup>	۶/۶۸±۰/۰۳ <sup>aABC</sup>	۶/۶۶±۰/۰۲ <sup>aAB</sup>	۶/۷۰±۰/۰۱ <sup>aBC</sup>	۶/۶۸±۰/۰۲ <sup>aABC</sup>
P.Ch 4°C	۶/۶۵±۰/۰۸ <sup>aA</sup>	۶/۶۴±۰/۰۷ <sup>aA</sup>	۶/۶۴±۰/۰۷ <sup>aA</sup>	۶/۶۱±۰/۰۹ <sup>aA</sup>	۶/۶۳±۰/۰۶ <sup>aA</sup>	۶/۶۸±۰/۰۲ <sup>aA</sup>	۶/۶۴±۰/۰۷ <sup>aA</sup>	۶/۶۴±۰/۰۸ <sup>aA</sup>	۶/۶۴±۰/۰۸ <sup>aA</sup>	۶/۶۵±۰/۰۸ <sup>aA</sup>
P.Ch 22°C	۶/۶۷±۰/۰۲ <sup>aAB</sup>	۶/۶۶±۰/۰۱ <sup>aA</sup>	۶/۶۶±۰/۰۱ <sup>aAB</sup>	۶/۶۳±۰/۰۸ <sup>aAB</sup>	۶/۶۸±۰/۰۳ <sup>aB</sup>	۶/۶۵±۰/۰۸ <sup>aAB</sup>	۶/۶۷±۰/۰۵ <sup>aAB</sup>	۶/۶۳±۰/۰۲ <sup>aAB</sup>	۶/۶۳±۰/۰۲ <sup>aAB</sup>	۶/۶۶±۰/۰۳ <sup>aAB</sup>

\* میانگین ± انحراف معیار (n=3)

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

پس از بررسی نتایج بدست آمده از آنالیز آماری مشخص شد که طی دوره نگهداری تفاوت معنی‌داری در میزان فعالیت آبی بین نمونه‌های شکلات کنترل و پروبیوتیک وجود دارد ( $P < 0.05$ ) و مقدار آن در نمونه‌های شکلات پروبیوتیک بیشتر از شکلات کنترل می‌باشد.

### ۲-۳- ارزیابی تغییرات فعالیت آبی ( $a_w$ )

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

جدول ۲ میانگین مقادیر فعالیت آبی در شکلات معمولی (C.Ch) و شکلات پروبیوتیک (P.Ch) در دماهای مختلف ۲۲°C و ۴°C طی دوره نگهداری

گروه	دوره نگهداری (روز)									
	۱۸۰	۱۵۰	۱۲۰	۹۰	۶۰	۲۸	۲۱	۱۴	۷	۱
C.Ch 4 °C	۰/۲۳±۰/۰۱ <sup>ab</sup>	۰/۲۳±۰/۰۱ <sup>aAB</sup>	۰/۲۲±۰/۰۱ <sup>aAB</sup>	۰/۲۲±۰/۰۱ <sup>aAB</sup>	۰/۲۲±۰/۰۱ <sup>aAB</sup>	۰/۲۱±۰/۰۱ <sup>aAB</sup>	۰/۲۱±۰/۰۱ <sup>aAB</sup>	۰/۲۰±۰/۰۱ <sup>aA</sup>	۰/۲۱±۰/۰۱ <sup>aA</sup>	۰/۲۰±۰/۰۱ <sup>aA</sup>
C.Ch 22 °C	۰/۲۳±۰/۰۱ <sup>ab</sup>	۰/۲۳±۰/۰۱ <sup>ab</sup>	۰/۲۲±۰/۰۱ <sup>aAB</sup>	۰/۲۲±۰/۰۱ <sup>ab</sup>	۰/۲۲±۰/۰۱ <sup>aAB</sup>	۰/۲۰±۰/۰۱ <sup>aA</sup>	۰/۲۰±۰/۰۱ <sup>aA</sup>	۰/۲۱±۰/۰۱ <sup>aA</sup>	۰/۲۰±۰/۰۱ <sup>aA</sup>	۰/۲۰±۰/۰۱ <sup>aA</sup>
P.Ch 4 °C	۰/۲۷±۰/۰۱ <sup>bA</sup>	۰/۲۷±۰/۰۱ <sup>bA</sup>	۰/۲۷±۰/۰۱ <sup>bA</sup>	۰/۲۷±۰/۰۱ <sup>bA</sup>	۰/۲۸±۰/۰۱ <sup>bA</sup>	۰/۲۷±۰/۰۱ <sup>bA</sup>	۰/۲۸±۰/۰۱ <sup>bA</sup>	۰/۲۷±۰/۰۱ <sup>bA</sup>	۰/۲۷±۰/۰۱ <sup>bA</sup>	۰/۲۷±۰/۰۱ <sup>bA</sup>
P.Ch 22 °C	۰/۲۷±۰/۰۱ <sup>bA</sup>	۰/۲۷±۰/۰۱ <sup>bA</sup>	۰/۲۷±۰/۰۱ <sup>bA</sup>	۰/۲۷±۰/۰۱ <sup>bA</sup>	۰/۲۷±۰/۰۱ <sup>bA</sup>	۰/۲۶±۰/۰۱ <sup>bA</sup>	۰/۲۸±۰/۰۱ <sup>bA</sup>	۰/۲۷±۰/۰۱ <sup>bA</sup>	۰/۲۷±۰/۰۱ <sup>bA</sup>	۰/۲۷±۰/۰۱ <sup>bA</sup>

\* میانگین  $\pm$  انحراف معیار (n=3)

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

### 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 ۲۲°C به میزان خیلی ناچیزی کمتر از نمونه‌های دمای ۴°C بوده است که این اختلاف از نظر آماری معنی دار نبوده است ( $P > 0.05$ ). همچنین کاهش جزئی در تعداد باکتری‌ها در روزهای مختلف دوره نگهداری و در هر یک از دو دمای ۴°C و ۲۲°C مشاهده شد که از نظر آماری معنی دار نمی باشد ( $P > 0.05$ ).

همچنین نتایج حاصله نشان دادند که در طول مدت شش ماه نگهداری، فعالیت آبی نمونه شکلات کنترل (C.Ch 4 °C) و (C.Ch 22 °C) افزایش معنی داری داشته است ( $P < 0.05$ ). در حالیکه تغییرات معنی داری در میزان فعالیت آبی نمونه‌های شکلات پروبیوتیک در هر دو دمای نگهداری یعنی نمونه‌های P.Ch 4 °C و P.Ch 4 °C طی مدت نگهداری وجود نداشته است ( $P > 0.05$ ).

جدول ۳ میانگین تعداد باکتری لاکتوباسیلوس کازئی (Log CFU/g) در شکلات معمولی (C.Ch) و شکلات پروبیوتیک (P.Ch)

در دماهای مختلف ۲۲ °C و ۴ °C طی دوره نگهداری

دوره نگهداری (روز)		گروه								
۱۸۰	۱۵۰	۱۲۰	۹۰	۶۰	۲۸	۲۱	۱۴	۷	۱	
$8.3 \pm 0.3^{a,AB}$	$8.0 \pm 0.1^{a,A}$	$8.3 \pm 0.3^{a,AB}$	$8.3 \pm 0.3^{a,AB}$	$8.0 \pm 0.1^{a,A}$	$8.3 \pm 0.3^{a,AB}$	$8.3 \pm 0.3^{a,AB}$	$9.0 \pm 0.1^{a,AB}$	$9.3 \pm 0.3^{a,AB}$	$9.3 \pm 0.3^{a,AB}$	P.Ch 4 °C
$8.0 \pm 0.1^{a,A}$	$8.0 \pm 0.1^{a,A}$	$8.0 \pm 0.1^{a,A}$	$8.3 \pm 0.3^{a,AB}$	$8.0 \pm 0.1^{a,A}$	$8.3 \pm 0.3^{a,AB}$	$8.3 \pm 0.3^{a,AB}$	$8.3 \pm 0.3^{a,AB}$	$8.3 \pm 0.3^{a,AB}$	$9.3 \pm 0.3^{a,AB}$	P.Ch 22 °C

\* میانگین  $\pm$  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 تی برای نمونه های زوجی می باشد.

#### ۴- تفسیر و تحلیل نتایج

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) می باشد؛ که علت این امر می تواند 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 می شود. دلیل دیگر می تواند ناشی از فعالیت برخی از لاکتوباسیلوس ها و یا آزاد شدن متابولیت هایی از آنها باشد که سبب افزایش اسیدیته محصول و کم شدن مقدار pH در شکلات پروبیوتیک نسبت به شکلات معمولی می شود.

همچنین بر اساس نتایج مطالعه انجام شده توسط Beresford و همکارانش در سال ۲۰۰۱، میزان pH بهینه برای رشد اغلب باکتری ها نزدیک به pH خنثی می باشد و رشد آنها در مقادیر pH کمتر از ۵ خنثی می شود [۵]. بنابراین، کاهش در میزان pH نمونه های شکلات پروبیوتیک مورد بررسی در تحقیق حاضر به اندازه ای نیست که منجر به آسیب رساندن به زنده مانندی لاکتوباسیلوس های موجود در شکلات پروبیوتیک شوند.

شناخت هر چه بیشتر مراحل تولید و نکات تکنولوژیکی در مورد فرآورده های پروبیوتیکی در حین تولید و نیز طی مدت زمان نگهداری آنها، منجر به شناخت هر چه بیشتر محدودیت های تولید و برطرف نمودن آنها و نیز گشاینده های دریچه های بیشتری به سوی صنعتی شدن محصولات پروبیوتیک و ارتقای سطح سلامتی جامعه خواهد شد.

pH یکی از مهمترین خصوصیات فیزیکوشیمیایی محصول می باشد که افزایش یا کاهش آن تأثیر فراوانی در فساد و ماندگاری محصول دارد. بررسی تغییرات pH نمونه های شکلات از دو منظر دارای اهمیت است. اول اینکه در طول نگهداری محصول، محدوده pH نمونه ها در حدود ۶/۶ تا ۶/۷ بود (جدول ۱)؛ لذا با محدوده pH اپتیمم برای رشد لاکتوباسیلوس کازئی (pH=۴-۵) فاصله داشته و مانع از فعال سازی 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 می شود، تفاوت معنی داری بین مقادیر pH اندازه گیری شده بین نمونه های شکلات پروبیوتیک و

در محصول تازه و دارای میزان ۲۵٪ روکش شکلات حاوی پروبیوتیک، بیشترین مقدار  $a_w$  مشاهده گردید. بطور کلی میزان فعالیت آبی در مورد آب نبات و بیسکوئیت پوشش دهی شده با ضخامت متوسطی از شکلات پروبیوتیک، نسبتاً بالا بوده است [۹].

بررسی تغییرات فعالیت آبی نمونه‌های شکلات نشان می‌دهد که فعالیت آبی نمونه‌های شکلات کنترل (C.Ch) در هر دو دمای نگهداری  $22^{\circ}\text{C}$  و  $4^{\circ}\text{C}$  طی مدت زمان نگهداری شش ماهه بطور معنی‌داری افزایش یافته بود که این موضوع می‌تواند به علت 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 آب نبات انجام شده بود، مطابقت دارد [۹]. شکلات جزء محصولاتی می‌باشد که 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 ۰/۳۴ 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 آنابایوسیس 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 باکتری‌های اسیدلاکتیک در برخی از فرآورده‌های قنادی بطور ویژه‌ای بالا می‌باشد. همچنین محتوای بسیار پایین آب یا رطوبت در این

مقادیر pH در طی دوره نگهداری برای نمونه‌های شکلات پروبیوتیک در هر دو دمای  $22^{\circ}\text{C}$  و  $4^{\circ}\text{C}$  تقریباً 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  $\text{H}^+$  در شکلات پروبیوتیک و ثابت ماندن مقدار pH در آن گردیده است. در مطالعه‌ای که توسط Aragon-Alegro و همکارانش در سال ۲۰۰۷ انجام شده بود نشان داده شد که طی مدت زمان نگهداری، مقادیر اسیدیته نمونه‌های موس شکلاتی کنترل، پروبیوتیک و پری‌بیوتیک افزایش و متعاقباً 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 پاراکازنی (*L. paracasei*) بعنوان باکتری پروبیوتیک مورد استفاده بوده است [۶].

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 میکروارگانیسم‌ها 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 غیر پروبیوتیک می‌باشد. همچنین در بررسی‌ای که روی محصول آب نبات (Candy) انجام شده بود،

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  $10^4$  CFU/g بوده است [۱۳]. در یکی از مطالعات پیشین، نتایج نشان داده‌اند که پوشش‌دهی پروبیوتیک‌ها 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 [۱۹-۱۴]. 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 فیزیوشیمیایی pH و فعالیت آبی نداشته است. همچنین نتایج زنده‌مانی لاکتوباسیلوس کازئی در شکلات مغزدار تولید شده نشان دادند که محصول نهایی مطابق تعریف فدراسیون جهانی لبنیات<sup>۱</sup> با در برداشتن بیش از  $10^7$  CFU/g باکتری 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.

## ۶- 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.

گروه از محصولات، یعنی داشتن فعالیت آبی پایین (کمتر از ۰/۶)، 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 (بوژه 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 شکلاتی پروبیوتیک صورت گرفته بود، نشان داده شد که در طی مدت نگهداری به مدت ۲۸ روز و در دمای یخچالی  $5^{\circ}\text{C}$ ، جمعیت میکروبی *L. paracasei* در تعداد بالاتر از  $7 \text{ Log CFU/g}$  قرار گرفته بود. این نتایج نشان می‌دهند 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 پروبیوتیک‌ها در این فرآورده شده است [۶].

در تحقیق حاضر، با گذشت زمان و طی دوره نگهداری ۶ ماهه در دماهای  $22^{\circ}\text{C}$  و  $4^{\circ}\text{C}$ ، 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  $10^4$  CFU/g پائین تر بیاید. علت این پدیده را می‌توان اینگونه توضیح داد که پس از افزودن پروبیوتیک‌ها (بصورت لیوفیلیزه که در آن باکتری‌ها 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 به علت 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].



- [11] Shah N. Probiotics and prebiotics. *Agroculture Food industry High Technology*. 2004;15(1):13-7.
- [12] Nebesny E, Żyzelewicz 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.
- [3] Lahtinen S, Ouwehand A, Salminen S, Forsell 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] Żyzelewicz 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, Żyzelewicz 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.

## Assessing the survival of *Lactobacillus casei* in probiotic chocolate during 6 months in ambient and refrigerated temperatures

Mehrban Roudbaneh, M. <sup>1</sup>, Homayouni Rad, A. <sup>2\*</sup>, Aref Hosseini, S. R. <sup>3</sup>

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 Medical Sciences, 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 *Lactobacillus casei* 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