نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذایی
جلد ششم، شماره دوم، ۹۳
۷۹-۶۳
http://ejfpp.gau.ac.ir

بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی، رئولوژیکی و حسی شکلات پروبیوتیک

محبوبه مهربان رودبنه[۱]، *عزیز همایونی راد[۲] و سیدرفیع عارف‌حسینی[۳]

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

تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۲۹

چکیده

هدف فن‌آوری مواد غذایی، تولید محصولاتی با کیفیت بالاتر و ارزش تغذیه‌ای بیشتر می‌باشد. درسال‌های اخیر، تولید غذاهای پروبیوتیک به‌دلیل داشتن اثرات سلامت‌بخش، توجه بسیاری را به‌خود جلب نموده است. شکلات از مواد غذایی غیرلبنی است که خواص محافظتی خوبی برای گونه‌های پروبیوتیکی از خود نشان داده است. در این مطالعه، ابتدا مقداری شکلات پروبیوتیک حاوی *لاکتوباسیلوس*کازیی تولید شد و فاکتورهای فیزیکو شیمیایی که شامل مواد جامد کل، a_w، و اسیدیته، و فاکتورهای رئولوژیکی که خودشامل سختی بافت و ویسکوزیته می‌باشد، و نیز ویژگی‌های ارگانولپتیکی محصول مورد بررسی قرار گرفت. با بررسی ویژگی‌های فیزیکو شیمیایی، رئولوژیکی و ارگانولپتیکی مشخص شد که در طول مدت شش ماه نگهداری در دو دمای اتاق و یخچالی، تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های شکلات کنترل و پروبیوتیک وجود ندارد ($P>0/05$). تنها تفاوت معنی‌دار در پارامتر فعالیت آبی (a_w) بود که بر اساس نتایج به‌دست آمده مقدار آن در شکلات پروبیوتیک بیشتر از شکلات کنترل بود ($P<0/05$). همچنین مدت زمان نگهداری تأثیر معنی‌داری بر هیچ‌کدام از ویژگی‌های شکلات پروبیوتیک نداشته است ($P>0/05$). دماهای نگهداری متفاوت (۲۲ درجه سانتی‌گراد و ٤ درجه سانتی‌گراد) نیز اثر معنی‌داری بر خصوصیات بررسی‌شده شکلات پروبیوتیک تولیدی نداشت ($P>0/05$). بنا بر این افزودن *لاکتوباسیلوس*کازیی به شکلات، تأثیری بر ویژگی‌های فیزیکو شیمیایی، رئولوژیکی و ارگانولپتیکی آن، پس از تولید و نیز در زمان نگهداری نمی‌گذارد. لذا

*نویسنده مسئول: homayounia@tbzmed.ac.ir

تولید شکلات پروبیوتیک در ابعاد صنعتی، بدون نیاز به تغییر در فرآیند تولید، اثر نامطلوبی بر مشتری‌پسندی محصول نگذاشته و می‌تواند باعث توزیع پروبیوتیک‌ها در بین مصرف‌کنندگان شود.

واژه‌های کلیدی: *لاکتوباسیلوس کازئی*، پروبیوتیک، شکلات

مقدمه

پروبیوتیک‌ها بخش عظیمی از باکتری‌های روده‌ای را به خود اختصاص داده و در سلامت انسان نقش مهمی دارند. خواص سلامت بخش پروبیوتیک‌ها شامل هر دو جنبه پیش‌گیری و درمان (تغذیه‌ای و دارویی) است. به‌طور کلی از پروبیوتیک‌ها برای درمان بسیاری از اختلالات انسان مثل عدم تحمل لاکتوز، اسهال، آلرژی‌های غذایی، عفونت روده‌ای، یبوست، هپاتیت[۱]، نفخ، کولیت[۲]، اسیدی‌شدن معده، کلسترول بالای خون و سرطان استفاده می‌شود (کوربو و همکاران، ۲۰۰۱). از مهم‌ترین گونه‌های پروبیوتیکی که اغلب مصرف انسانی دارند می‌توان به چهار دسته باکتری‌ها که عبارتند از اسیدلاکتیک متعلق به جنس لاکتوباسیلوس، باکتری اسیدلاکتیک متعلق به جنس بیفیدوباکتریوم، سایرباکتری‌های اسیدلاکتیک و بالاخره باکتری‌های غیرلاکتیک اشاره کرد. اغلب پروبیوتیک‌ها به دو جنس *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتریوم* تعلق دارند (دانکور و همکاران، ۲۰۰۶).

امروزه پروبیوتیک‌ها علاوه‌بر محصولات لبنی، در موادغذایی غیرلبنی، نظیر انواع غلات صبحانه، غذای کودک، آب‌میوه‌ها، چیپس و انواع شکلات‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (هولزاپفل و همکاران، ۲۰۰۶). شکلات به‌عنوان یک غذای منحصر به‌فرد و خوشمزه، یکی از منابع مهم مواد فعال بیولوژیکی است که اثر آنتی‌اکسیدانی ویژه‌ای را در بدن انسان نشان می‌گذارد و بر سلامت اعضای مختلف بدن به‌ویژه قلب و عروق تأثیر مثبت دارد (فوکس و همکاران، ۲۰۰۲). نتایج بسیاری از تحقیقات نشان داده است که زنده‌مانی باکتری‌های اسیدلاکتیک در برخی از فرآورده‌های قنادی به‌طور ویژه‌ای بالا می‌باشد. همچنین محتوای بسیار پایین رطوبت در این گروه از محصولات، یعنی داشتن فعالیت آبی پایین (کمتر از ۰/۶)، غلظت بالای کربوهیدرات‌ها و به‌ویژه ساکاروز و دسترسی پایین به اکسیژن منجر شده است که به‌عنوان حامل مناسبی برای انتقال

۱- Hepaticencephalopathy

۲- Colitis

باکتری‌های اسیدلاکتیک به بدن انسان مطرح باشند (زیزلویچ و همکاران، ۲۰۱۲). *لاکتوباسیلوس کازیی*، یکی از مهم‌ترین گونه‌های پروبیوتیکی است که کاربرد وسیعی در فرآورده‌های غذایی پیدا کرده است. این باکتری در روده کوچک انسان زندگی می‌کند، مقاومت خوبی در برابر شیره معده و نمک‌های صفراوی دارد و زنده‌مانی آن در فرآورده‌های لبنی بیشتر از سایر گونه‌هاست (همایونی، ۲۰۰۸) .

در بسیاری از مطالعات انجام شده، از گونه‌های *لاکتوباسیلوس کازیی* و پاراکازایی به‌صورت لیوفیلیزه شده و تثبیت شده بر روی پودر شیر خشک به روش انجمادی و یا در شکلات تلخ به‌صورت پودر ماست خشک شده به روش پاششی استفاده شده است (نبسنی و همکاران، ۲۰۰۵). بررسی‌ها نشان داده‌اند که شکلات، به‌دلیل داشتن میزان a_w بسیار پایین (در حدود ۰/۲)، محیط اولیه مناسبی برای پروبیوتیک‌ها محسوب می‌شود. در این میزان از a_w، امکان رشد و تکثیر هیچ باکتری گرم مثبتی از جمله پروبیوتیک‌ها وجود ندارد، لذا این باکتری‌ها در فاز آنابیوسیس رشد، باقی می‌مانند که در محصولات پروبیوتیک به‌عنوان شرایط ایده‌آل محسوب می‌شود (ریچل و همکاران، ۲۰۰۱).

هدف از پژوهش حاضر این است که اثر افزودن *لاکتوباسیلوس کازیی* بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، رئولوژیکی و ارگانولپتیکی شکلات، پس از شش ماه نگهداری محصول در دماهای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و ٤ درجه سانتی‌گراد بررسی شود. تولید این نوع شکلات با به‌کارگیری باکتری‌های اسید لاکتیک که شامل گونه‌های پروبیوتیک آن می‌باشد، دستیابی ارزشمند و موفقی در تولید فرآورده‌های غیر لبنی به‌شمار می‌رود.

مواد و روش‌ها

انتخاب باکتری پروبیوتیک: پس از بررسی منابع، گونه پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس* کازیی (٤٣١) جهت استفاده در این تحقیق انتخاب شد. این باکتری به‌صورت خالص و خشک شده انجمادی از شرکت هنسن دانمارک خریداری شد.

تولید شکلات: در این تحقیق، شکلات اریچ مغزدار فندقی که در پایلوت شرکت شکوه شاد شانجان (شکلات آی‌سودا) تولید شده، 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 به‌مدت ۱۵ الی ۲۰ دقیقه توسط پره‌های دستگاه مخلوط گردید. دمای مواد در هنگام مخلوط شدن در این دستگاه در حدود ٤٠ درجه سانتی‌گراد بود. سپس این مواد به والس[۱] وارد شد. این دستگاه دارای غلطک‌هایی با دمای تقریبی ۲۸-۲٦ درجه سانتی‌گراد می‌باشد که عمل هم‌زدن و کاهش اندازه ذرات را به‌صورت هم‌زمان انجام می‌دهد. در ادامه و برای انجام عمل کانچ[۲]، مواد به بالمیل آزمایشگاهی که دارای مخزنی با حجم ۳۰ کیلوگرم است، وارد شدند. دیواره داخلی این مخزن دارای برجستگی‌هایی است که هم‌زمان با چرخش پره‌های داخلی دستگاه و تماس شکلات به سطح داخلی مخزن، به ریزترشدن اجزای شکلات کمک می‌کند. دمای مواد در این مرحله در حدود ٤٢ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان آن در حدود ٥-٤ ساعت بود. سپس عمل تمپرینگ در طی مدت ۳۰-۲۰ دقیقه بر روی مواد انجام شد تا مواد با دمای کمتر از ۳۰ درجه سانتی‌گراد برای قالب‌گیری آماده شوند.

افزودن باکتری پروبیوتیک به شکلات: از آن جایی‌که باکتری پروبیوتیک نسبت به دماهای بالایی که 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 درداخل بالمیل آزمایشگاهی مخلوط گردید و سپس مغزی به دو قسمت شاهد و نمونه تقسیم شد. باکتری لیوفیلیزه *لاکتوباسیلوس کازیی* به مقدار ۳ گرم داخل ٥٠mL شیر استریل حل شد، سپس به مواد افزوده وبا آن مخلوط گردید تا بتواند سطح عمل‌گرایی 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 بسته‌بندی مخصوص کارخانه که شامل یک فویل آلومینیومی بود، پیچیده شدند. برای نمایش نمونه‌های شکلات کنترل[۳] و شکلات پروبیوتیک[٤] به‌ترتیب از حروف اختصاری C.Ch و P.Ch استفاده گردید.

۱- Refining

۲- Conching

۳- Control Chocolate

٤- Probiotic Chocolate

محتوای مواد جامد کل: محتوای مواد جامد کل با روش وزن‌سنجی حرارتی[1] مورد آزمون قرار گرفت. در این روش ابتدا ۵ گرم از مغزی شکلات، به‌مدت ۳ الی ۵ ساعت در آون با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از رسیدن به وزن ثابت، مقدار رطوبت آن محاسبه شد. با قرار دادن این مقدار رطوبت در رابطه زیر، محتوای مواد جامد کل در مغزی شکلات به‌دست آمد:

مقدار رطوبت−۱۰۰= محتوای مواد جامد کل

فعالیت آبی (a_w): فعالیت آبی، توسط دستگاه a_w سنج (مدل ms1، شرکت نواسینا، سوئیس) واقع در آزمایشگاه کنترل کیفی شرکت شکوه شاد شانجان (شکلات آی‌سودا)، اندازه‌گیری شد. در حدود ۱۲ گرم مغزی شکلات، داخل محل مخصوص قرار گرفت و بعد از حدود ۲ دقیقه عدد مربوط به فعالیت آبی از روی مانیتور دستگاه خوانده شد.

اسیدیته: ۵ گرم از نمونه مغزی شکلات را در ارلن مایر ۵۰۰ میلی لیتر‌یخته و۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر به آن افزودیم. سپس مخلوط فوق را از صافی رد کرده و چند قطره معرف فنل فتالئین به آن افزودیم؛ آنگاه آن را با سود ۰/۱ نرمال تاهنگام ایجاد رنگ صورتی پایدار تیتر کردیم. چون شکلات به صورت جامد است و در آب حل نمی‌شود، بشر محتوی مخلوط را روی اجاق به مدت چند دقیقه حرارت دادیم تا محلول یکنواختی حاصل شود. میزان اسیدیته محصول براساس فرمول زیر قابل ارزیابی است (آراگون آلگرو، ۲۰۰۷).

وزن نمونه ÷ (۱۰۰ × ۰/۰۰٦٤× میلی‌لیتر سود ۰/۱ نرمال)

اسیدیته‌ی یک میلی‌لیتر سود ۰/۱ نرمال معادل ۰/۰۰٦٤ گرم اسید سیتریک است.

سختی بافت: قطعات شکلات در ابعاد ۱۰×۲۰×۱۰۰ میلی‌متر آماده شد و پس از ٦ ساعت نگهداری در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد، داخل انکوباتور قرار گرفت. سپس نمونه‌های آماده شده برای اندازه‌گیری سختی، توسط دستگاه بافت‌سنج (مدل H50KS، ساخت شرکت هانسفیلد انگلستان) مجهز به سمباده ته صاف ۱/٦ میلی‌متری و سرعت نفوذ ۱/۵ میلی‌متر بر ثانیه تحت آزمون نفوذ قرار گرفت و نیروی حداکثر در عمق ٦ میلی‌متری به‌عنوان شاخص سختی گزارش شد.

ویسکوزیته: برای اندازه‌گیری ویسکوزیته نمونه‌های شکلات، از دستگاه ویسکومتر (Viscostar plus، شرکت فانگیلب، اسپانیا) استفاده شد. ابتدا ۲۰۰ mL از شکلات و مغزی را جداگانه در بشر ریخته و بعد

۱- Thermo gravimetric method

از توزین در بن‌ماری سیال نمودیم؛ سپس با اسپندل شماره ۳ دستگاه مقدار ویسکوزیته در دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد.

ارزیابی حسی: نمونه‌های شکلات با کدهای سه رقمی به‌طور تصادفی شماره‌گذاری شد و همراه با پرسشنامه در اختیار ٤٠ نفر ارزیاب از دانشجویان دانشگاه علوم پزشکی تبریز که آموزش‌های لازم را در این زمینه دیده بودند، قرار گرفت. در این برگه‌ها ویژگی‌های کیفی شامل رنگ، طعم و مزه، تردی، سختی بافت و پذیرش کلی بر اساس استاندارد ملی به شماره ٦٠٨ بیان شده و از ارزیابان خواسته شد براساس آزمون هدونیک پنج سطحی از کیفیت بسیار مطلوب (عالی) تا کیفیت بسیار نامطلوب (بد) نمونه‌ها را مورد ارزیابی قرار دهند (براساس استانداردهای ملی به شماره ٣٤٤٢، ٢٤٤٢ و ٣٥٨٠).

تجزیه و تحلیل آماری: طراحی آزمایش‌ها با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام گرفت. میانگین داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه[1] در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ مورد آزمون قرار گرفتند و در صورت معنی‌دار بودن از آزمون توکی[2] برای تعیین تفاوت میانگین‌ها استفاده شد. همچنین برای بررسی تفاوت معنی‌داری هر یک از نمونه‌های شکلات در طی دوره نگهداری از روش تحلیل واریانس اندازه‌های تکراری (ANOVA-GLM) بر اساس حداقل تفاوت معنی‌داری یا LSD استفاده گردید. برای مشخص نمودن تفاوت معنی‌داری میانگین، نتایج آزمون‌های حسی از روش ناپارامتری فریدمن برای مقایسه بین نمونه‌ها و آزمون ویلکاکسون[3]، و برای مقایسه یک نمونه در مراحل مختلف زمانی استفاده گردید. تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 17 و در سطح معنی‌داری $P<۰/۰۵$ انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

بررسی تغییرات محتوای مواد جامد کل: نتایج میانگین مقادیر محتوای مواد جامد کل برای نمونه‌های شکلات کنترل (C.Ch) و پروبیوتیک (P.Ch) طی مدت ارزیابی شش ماهه و در دو دمای نگهداری در جدول ۱ آورده شده است.

۱- ANOVA-one way

۲- Turkey

۳- Wilcoxon

جدول ۱. میانگین مقادیر محتوای مواد جامد کل در شکلات معمولی (C.Ch) و شکلات پروبیوتیک (P.Ch) در دماهای مختلف ۲۲ و ٤ درجه سانتی‌گراد طی دوره نگهداری.

گروه	دوره نگهداری (روز)									
	۱	۷	١٤	۲۱	۲۸	٦۰	۹۰	۱۲۰	۱۵۰	۱۸۰
C.Ch 4°C	۹۹/۸۷±۰/۰٦aA	۹۹/۸۷±۰/۰٦aA	۹۹/۸۷±۰/۰٦aA	۹۹/۸۳±۰/۰٦aA	۹۹/۹±۰ aA	۹۹/۸۷±۰/۰٦aA	۹۹/۹±۰aA	۹۹/۹±۰ aA	۹۹/۸۷±۰/۰٦aA	۹۹/۸۷±۰/۰٦aA
C.Ch 22°C	۹۹/۸۷±۰/۰٦aA	۹۹/۸۳±۰/۰٦aA	۹۹/۸۷±۰/۰٦aA	۹۹/۷۷±۰/۰٦aA	۹۹/۸۳±۰/۰٦aA	۹۹/۸۷±۰/۰٦aA	۹۹/۸۳±۰/۰٦aA	۹۹/۸±۰/۱ aA	۹۹/۹±۰ aA	۹۹/۸۳±۰/۰٦aA
P.Ch 4°C	۹۹/۸±۰/۱ aA	۹۹/۸±۰/۱ aA	۹۹/۸±۰ aA	۹۹/۷۳±۰/۰٦aA	۹۹/۸±۰ aA	۹۹/۸±۰/۱ aA	۹۹/۸۳±۰/۰٦aA	۹۹/۸±۰/۱ aA	۹۹/۸±۰/۱ aA	۹۹/۷۳±۰/۰٦aA
P.Ch 22°C	۹۹/۸±۰ aA	۹۹/۸±۰ aA	۹۹/۸±۰/۱ aA	۹۹/۸±۰/۱ aA	۹۹/۸۳±۰/۰٦aA	۹۹/۸۳±۰/۰٦aA	۹۹/۸±۰ aA	۹۹/۸±۰ aA	۹۹/۸±۰/۱ aA	۹۹/۸±۰/۱ aA

* میانگین± انحراف معیار (n=3)

** حروف کوچک متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح α= ۰/۰۵ توسط آزمون توکی (Turkey) و حروف بزرگ متفاوت در هر ردیف بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح α= ۰/۰۵ توسط آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار یا LSD (Least Significant Difference) می‌باشد.

در هر دو دما، نمونه‌های شکلات پروبیوتیک نسبت به نمونه‌های کنترل محتوای مواد جامد کل کمتری داشتند که پس از آنالیز آماری مشخص گردید تفاوت معنی‌داری بین محتوای مواد جامد کل در نمونه های شکلات کنترل و پروبیوتیک در هر دو دمای نگهداری و همچنین در طول دوره نگهداری شش ماهه وجود ندارد (P>۰/۰۵ در همه موارد).

کمتر بودن محتوای مواد جامد کل در شکلات غنی شده با *لاکتوباسیلوس کازیی*، ممکن است مربوط به بالاتر بودن محتوای آب (۵ g/۱۰۰g) پروبیوتیک لیوفیلیزه افزوده شده به شکلات، نسبت به سایر مواد اولیه باشد. همچنین در هنگام افزودن پروبیوتیک لیوفیلیزه به مغزی شکلات، برای پخش

یکنواخت پروبیوتیک در مغزی از مقداری شیر استریل استفاده شد که محتوای آب بالایی است (۸۷ g/۱۰۰g). بنابراین، این موضوع هم ممکن است باعث بالارفتن محتوای آب در نمونه‌های شکلات پروبیوتیک و در نتیجه کاهش محتوای مواد جامد کل شده باشد.

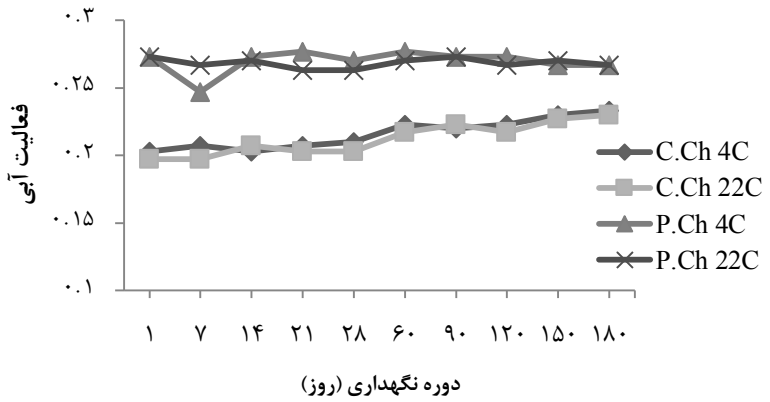
این نتایج با یافته‌های به‌دست آمده توسط زیزلویچ و همکاران در سال ۲۰۱۰، هم‌خوانی داشت؛ محتوای مواد جامد کل در شکلات شیری غنی شده با سلول‌های *لاکتوباسیلوس* لیوفیلیزه نسبت به شکلات معمولی کمتر است و علت آن به بالاتر بودن محتوای آب سلول‌های لیوفیلیزه نسبت به سایر ترکیبات تشکیل‌دهنده شکلات مربوط می‌گردد. در مطالعه دیگری که بر روی شکلات تلخ پروبیوتیک حاوی باکتری‌ها به فرم لیوفیلیزه انجام شده نیز این تفاوت اندک، در محتوای مواد جامد کل نمونه‌های پروبیوتیک و نمونه ی شاهد مشاهده شده است که علت آن به وجود مقدار جزیی آب در مرحله آماده‌سازی باکتری‌های لاکتوباسیلوس لیوفیلیزه مربوط بوده است (نبسنی و همکاران، ۲۰۰۷).

از آنجایی‌که محتوای مواد جامد کل یکی از فاکتورهای مرتبط با کیفیت شکلات است، نتایج حاصل از بررسی پارامتر محتوای مواد جامد کل در این پژوهش، نکته مثبتی از لحاظ تکنولوژی در تولید شکلات پروبیوتیک به‌حساب می‌آید.

بررسی تغییرات فعالیت آبی: پس از بررسی‌های آماری مشخص شد که در مدت زمان نگهداری، تفاوت معنی‌داری بین میزان فعالیت آبی نمونه‌های شکلات معمولی و پروبیوتیک وجود دارد و مقدار آن در نمونه‌های شکلات پروبیوتیک بیشتر از کنترل می‌باشد ($P<۰/۰۵$). در مطالعه‌ی صورت گرفته توسط بودرین و همکاران در سال ۲۰۰۷، مشاهده شد که در روکش‌های شکلاتی بیسکویت ها که با مقادیر متفاوتی از لاکتیک اسید باکتری‌ها غنی‌سازی شده‌اند، بیشترین میزان a_w در بیسکویت های دارای ۳۵٪ روکش شکلات و در محصول تازه پروبیوتیک می‌باشد. همچنین در بررسی‌ای که روی محصول آب‌نبات[۱] انجام شده بود، بیشترین مقدار a_w در محصول تازه، میزان ۲۵٪ روکش شکلات حاوی پروبیوتیک مشاهده گردید. به‌طورکلی در مورد میزان فعالیت آبی در مورد آب‌نبات و بیسکویت پوشش‌دار با ضخامت متوسطی از شکلات پروبیوتیک، باید گفت این میزان، بالاتر از سایر نمونه‌ها بوده است. که این موضوع با نتایج تحقیق ما منطبق می‌باشد. همچنین نتایج بررسی‌های آماری نشان دادند که فعالیت آبی نمونه‌های شکلات کنترل نیز در طول مدت شش ماه نگهداری، افزایش معنی‌داری داشته است ($P<۰/۰۵$). همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، فعالیت آبی نمونه‌های

۱- Candy

شکلات کنترل در هر دو دمای نگهداری طی شش‌ماه به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. این موضوع می‌تواند به‌کریستالیزاسیون مجدد ساکاروز موجود در شکلات مربوط باشد. این عمل، سبب آزادسازی آب و افزایش فعالیت آبی محصول در طی دوره نگهداری می‌شود. ولی با این حال در طول دوره نگهداری، تغییرات معنی‌داری در میزان فعالیت آبی نمونه‌های شکلات پروبیوتیک در هر دو دمای نگهداری وجود نداشته است ($P>0/05$). فعالیت آبی در بررسی حاضر در محدوده ۰/۲۰ تا ۰/۲۸ متغیر بوده است. در ضمن، تفاوت معنی‌داری در مقادیر فعالیت آبی نمونه‌های شکلات پروبیوتیک در هیچ کدام از دماها طی مدت زمان نگهداری، مشاهده نشده است. علت عدم افزایش فعالیت آبی در نمونه‌های پروبیوتیک در طول دوره ی شش ماهه نیز ممکن است ناشی از فعالیت نسبی تعدادی از پروبیوتیک‌های مغزی شکلات و مصرف آب آزاد شده در فرآیند کریستالیزاسیون مجدد ساکارز باشد.



شکل ۱- نمودار تغییرات فعالیت آبی در شکلات مغزدار.

فعالیت آبی (a_w) یکی از مهمترین خصوصیات فیزیکوشیمیایی محصول می‌باشد که اطلاع از میزان این فاکتور می‌تواند باعث جلوگیری از خسارت شود و آسیب کمتری به محصول برساند. شکلات جزو محصولاتی می‌باشد که با افزایش میزان a_w، ممکن است آسیب بیشتری به محصول وارد وسبب تسریع فساد آن شود. و به‌همین جهت ضروری است که به‌مقدار a_w موجود در محصول توجه زیادی بشود. نتایج نشان دادند که شکلات پروبیوتیک نسبت به شکلات معمولی دارای فعالیت آبی بالاتری می‌باشد، اما به‌قدری نیست که بتواند موجب فعالیت باکتری پروبیوتیک در آن گردد.

بررسی تغییرات اسیدیته: پس از آنالیز آماری مشخص شد که تفاوت معنی‌داری در میزان اسیدیته شکلات کنترل و پروبیوتیک در طی دوره نگهداری شش ماهه وجود ندارد و همچنین دماهای متفاوت نگهداری یعنی ۲۲ و ٤ درجه سانتی‌گراد تأثیر معنی‌داری بر روی اسیدیته نمونه‌های شکلات نداشته است (P>۰/۰۵) (جدول ۲).

جدول ۲- میانگین مقادیر اسیدیته در شکلات معمولی (C.Ch) و شکلات پروبیوتیک (P.Ch) در دماهای مختلف ۲۲ و ٤ درجه سانتی‌گراد طی دوره نگهداری.

گروه	دوره نگهداری (روز)									
	۱	۷	۱٤	۲۱	۲۸	٦۰	۹۰	۱۲۰	۱۵۰	۱۸۰
C.Ch 4°C	۰/۱۲±۰/۱۸ aA	۰/۱۲±۰/۱۸ aA	۰/۱۲±۰/۱۸ aA	۰/۱۲±۰/۱۸ aA	۰/۱۲±۰/۱۸ aA	۰/۱۲±۰/۱۸ aA	۰/۱۲±۰/۱۸ aA	۰/۱۲±۰/۱۸ aA	۰/۱۲±۰/۱۸ aA	۰/۱۲±۰/۱۸ aA
C.Ch 22°C	۰/۱۲±۰/۲۵ aA	۰/۱۲±۰/۱۸ aA	۰/۱۲±۰/۱۸ aA	۰/۱۲±۰/۱۸ aA	۰/۱۲±۰/۱۸ aA	۰/۱۲±۰/۱۸ aA	۰/۱۲±۰/۱۸ aA	۰/۱۲±۰/۱۸ aA	۰/۱۲±۰/۱۸ aA	۰/۱۲±۰/۱۸ aA
P.Ch 4°C	۰/۱۲±۰/۲۵ aAB	۰/۱۲±۰/۲۵ aAB	۰/۱۲±۰/۱۸ aAB	۰/۱۲±۰/۲۰ aB	۰/۱۲±۰/۲۵ aAB	۰/۱۲±۰/۲۵ aAB	۰/۱۲±۰/۲۰ aAB	۰/۱۲±۰/۲۵ aAB	۰/۱۲±۰/۲۰ aA	۰/۱۲±۰/۲۰ aAB
P.Ch 22°C	۰/۱۲±۰/۱۰ aA	۰/۱۲±۰/۱۸ aA	۰/۱۲±۰/۲۵ aA	۰/۱۲±۰/۱۰ aA	۰/۱۲±۰/۱۰ aA	۰/۱۲±۰/۱۰ aA	۰/۱۲±۰/۱۰ aA	۰/۱۲±۰/۱۰ aA	۰/۱۲±۰/۱۰ aA	۰/۱۲±۰/۱۰ aA

* میانگین± انحراف معیار (n=3)

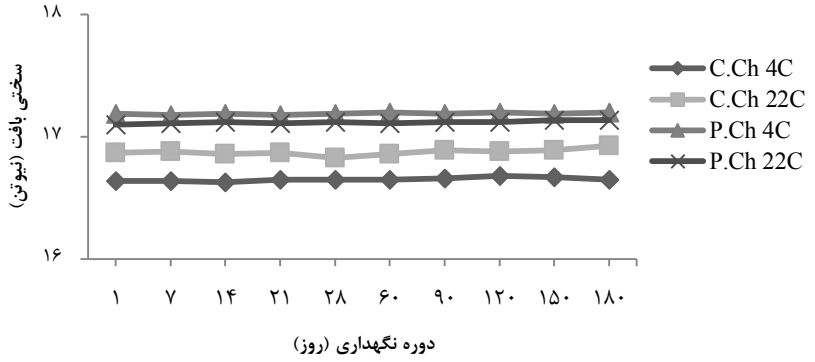
** حروف کوچک متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح α= ۰/۰۵ توسط آزمون توکی (Turkey) و حروف بزرگ متفاوت در هر ردیف بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح α= ۰/۰۵ توسط آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار یا LSD (Least Significant Difference) می‌باشد.

نتایج حاصل از این تحقیق با مطالعه آراگون آلگرو و همکارانش در سال ۲۰۰۷ که بر روی نمونه‌های موس شکلاتی پروبیوتیک انجام شده، مطابقت داشت.

اسیدیته از جمله پارامترهایی است که به‌طور مستقیم روی سایر ویژگی‌های شکلات به‌خصوص ویژگی‌های رئولوژیکی و ارگانولپتیکی اثرگذار است. بالارفتن اسیدیته در محصولات پروبیوتیک نه‌تنها بر زنده‌مانی این باکتری‌ها اثر منفی دارد بلکه بر طعم و بافت محصول نیز اثرات نامطلوبی خواهد داشت. براساس شرایط ایجاد شده در این تحقیق، پروبیوتیک‌ها در محیط پایه شکلات به‌حالت آنابیوسیس باقی ماندند، لذا هیچ‌گونه فعالیتی که موجب تولید محصولات اسید لاکتیکی شود و اسیدیته محصول را تحت تأثیر قرار دهد رخ نداده است.

بررسی تغییرات سختی بافت: پس از ارزیابی آماری نتایج حاصله از اندازه گیری سختی بافت مشاهده گردید که سختی بافت در نمونه‌های شکلات پروبیوتیک کمی بیشتر از شکلات معمولی بوده است که از نظر آماری معنی‌دار نبوده است (شکل ۲). همچنین هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری در میزان سختی بافت نمونه‌های شکلات معمولی و پروبیوتیک طی روزهای مختلف نگهداری در دو دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و ٤ درجه سانتی‌گراد مشاهده نشده است ($P>0/05$).

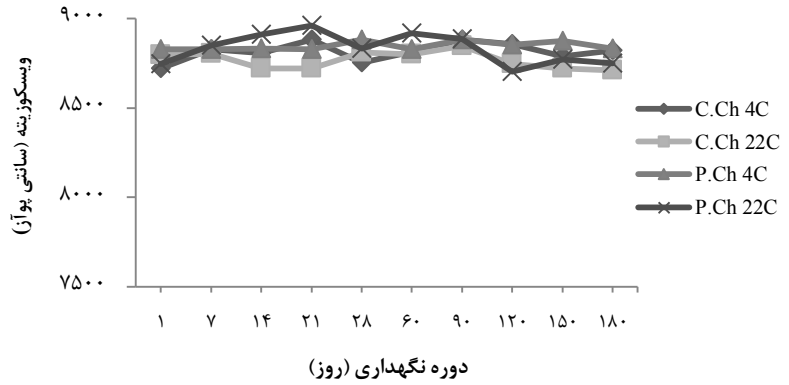
در مطالعه انجام شده توسط چتانا و همکارانش در سال ۲۰۱۳ که به بررسی ویژگی‌های رئولوژیکی شکلات شیری پروبیوتیک تولید شده با جایگزینی پودر شیر خشک با ۵۰ درصد و ۱۰۰ درصد پودر ماست پرداختند، نشان داده شد که تفاوت جزیی بین میزان سختی نمونه‌های شکلات شیری معمولی و پروبیوتیک وجود دارد. این یافته‌ها با نتایج مطالعه کنونی هم‌خوانی دارد. بنابراین بر اساس نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر و عدم تأثیر معنی‌دار باکتری *لاکتوباسیلوس* کازیی بر روی سختی شکلات، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که افزودن پروبیوتیک‌ها به شکلات نمی‌تواند به‌عنوان عامل محدودکننده تکنولوژیکی درنظر گرفته شود.



شکل ۲- نمودار تغییرات مقادیر سختی بافت در شکلات مغزدار.

سختی بافت شکلات یکی از خصوصیات رئولوژیکی مهم می‌باشد که هرگونه تغییر در میزان آن می‌تواند تأثیر منفی در بازار پسندی و مقبولیت محصول بگذارد. نتایج حاصله از این مطالعه نشان می‌دهند که نمونه‌های شکلات معمولی و پروبیوتیک طی نگهداری شش ماه در شرایط دمایی ۲۲ و ٤ درجه سانتی‌گراد، در مقادیر سختی بافت اختلاف معنی‌داری نداشتند؛ هرچند که مقادیر سختی برای نمونه‌های شکلات پروبیوتیک نسبت به شکلات کنترل، اندکی بوده است، ولی این مقدار افزایش سختی از نظر آماری معنی‌دار نبوده است.

بررسی تغییرات ویسکوزیته: در این تحقیق، نتایج حاصله از اندازه گیری ویسکوزیته نشان می‌دهند که مقادیر ویسکوزیته برای نمونه‌های شکلات پروبیوتیک کمی بالاتر از ویسکوزیته شکلات کنترل می‌باشد ولی از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین این دو نمونه شکلات مشاهده نمی‌شود ($P>۰/۰۵$). تفاوت معنی‌داری در ویسکوزیته اندازه‌گیری شده نمونه‌های شکلات پروبیوتیک و نمونه کنترل در طول مدت شش ماه نگهداری در دماهای ۲۲ و ٤ درجه سانتی‌گراد وجود نداشته است ($P>۰/۰۵$). در برخی از روزهای نگهداری شکلات پروبیوتیک به‌میزان خیلی جزئی دارای ویسکوزیته بالاتری نسبت به شکلات معمولی بوده است (شکل ۳).



شکل ۳- نمودار تغییرات مقادیر ویسکوزیته در شکلات مغزدار.

شکلات یک سیال غیرنیوتنی است و دارای ویسکوزیته و آستانه تسلیم می‌باشد. شکلات ذوب شده خواص جریان غیرنیوتونی دارد. این خواص جریان هم برای مصرف‌کننده و هم برای تولیدکننده از اهمیت زیادی برخوردار است. تحقیقات مختلف نشان داده‌اند که مقدار کره کاکائو و نوع و مقدار

لستین موجود در شکلات تأثیر زیادی بر ویژگی سیالیت شکلات دارند. کره اضافی باعث افزایش سیالیت و کاهش ویسکوزیته شکلات می‌گردد (آفوکوا و همکاران، ۲۰۰۸).

زیزلویچ و همکارانش در سال ۲۰۱۰ نیز به نتیجه مشابهی دست یافتند و بیان نمودند که مقدار ویسکوزیته و تنش حد شکلات شیری غنی شده با *لاکتوباسیلوس* لیوفیلیزه شده کمی بالاتر از شکلات شیری معمولی می‌باشد که این افزایش پارامترهای رئولوژیکی به طور عمده به‌دلیل بالا بودن رطوبت نسبی لاکتوباسیلوس‌های لیوفیلیزه (۱۰۰گرم/ ۵ گرم) می‌باشد. چتانا و همکارانش در سال ۲۰۱۳ نیز به نتیجه مشابه‌ای دست یافتند ودر مطالعه آنان، هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری در مقدار ویسکوزیته پلاستیک و تنش حد شکلات شیری پروبیوتیک تولید شده توسط جایگزینی پودر شیر خشک با ۵۰ درصد پودر ماست در مقایسه با شکلات شیری کنترل یافت نشد. در برخی منابع نیز بیان شده است که شکلات پروبیوتیک و غنی‌سازی شده با *لاکتوباسیلوس*ها به‌دلیل افزایش جذب آب توسط سلول‌های *لاکتوباسیلوس* دارای ویسکوزیته بالاتری هستند (شاه، ۲۰۰٤).

بررسی ارزیابی حسی: براساس نتایج به‌دست آمده از آزمون ارزیابی حسی که در جدول ۳ ارائه شده، مشخص گردید که تفاوت معنی‌داری بین دو گروه شکلات کنترل و پروبیوتیک از نظر پارامترهای رنگ، طعم و مزه، تردی، سختی بافت و پذیرش کلی وجود ندارد ($P>0/05$ برای همه موارد).

جدول ۳- بررسی میانگین ویژگی‌های حسی شکلات معمولی (C.Ch) و پروبیوتیک (P.Ch).

گروه	ویژگی‌های حسی				
	رنگ	طعم و مزه	تردی	بافت	پذیرش کلی
C.Ch	٤/١٧±٠/٤١ [a]	٤/٠±١/٢٧ [a]	٣/٨٣±٠/٧٥ [a]	٣/٥±٠/٨٤ [a]	٣/٦٧±٠/٨٢ [a]
P.Ch	٤/٣٣±٠/٥٢ [a]	٣/٥±١/٢٣ [a]	٣/٨٣±٠/٧٥ [a]	٣/٦٧±١/٢١ [a]	٣/٦٧±٠/٨٢ [a]

* میانگین ± انحراف معیار (n=٤٠)

** حروف کوچک متفاوت در هر ستون برای هر ویژگی حسی، بیانگر اختلاف معنی دار در سطح $\alpha=0/05$ (توسط آزمون من ویتنی یو Mann-Whitney U) بین شکلات معمولی (C.Ch) و پروبیوتیک (P.Ch) می‌باشد.

نتیجه به‌دست آمده در این تحقیق با نتایج مطالعه آراگون آلگرو و همکارانش در سال ۲۰۰۷ مطابقت دارد. آن‌ها نشان دادند که افزودن باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس* پاراکازیی و ترکیبات پری‌بیوتیکی هیچ‌گونه مداخله و تأثیر نا مطلوبی در برتری ویژگی‌های حسی موس شکلاتی نداشته است. به‌علت طعم

و بوی خاص شکلات، بایستی ویژگی‌های حسی شکلات پروبیوتیک از لحاظ خصوصیات حسی و بافتی نیز به‌میزان بسیار زیادی مشابه شکلات‌های موجود باشد (چوالی، ۱۹۹٤). براساس نتایج ارائه شده مشاهده می‌شود که به‌طورکلی بین دو گروه شکلات معمولی و پروبیوتیک از لحاظ ویژگی‌های حسی تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ($P>0/05$ برای همه موارد). بنابراین، افزودن پروبیوتیک‌ها به شکلات تأثیر منفی بر روی مطلوبیت و خواص ارگانولپتیک آن نداشته است.

تحقیق حاضر در ادامه تحقیقات سال‌های اخیر و با هدف ارزیابی نوعی محصول سلامت‌بخش غیرلبنی، طراحی و انجام شده است. از آن‌جایی که قشر وسیعی از مردم از جمله کودکان مصرف‌کنندگان اصلی انواع شکلات می‌باشند، لذا تبدیل شکلات به یک ماده غذایی فراسودمند می‌تواند نقش مهمی را در بهبود وضعیت سلامتی جامعه ایفا نماید.

در مجموع، یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهند که هیچ‌گونه تأثیر منفی بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، رئولوژیکی و حسی شکلات مغزدار پروبیوتیک نسبت به شکلات معمولی در دماهای نگهداری یخچالی و محیط طی دوره نگهداری شش ماهه وجود نداشته است و در نتیجه نیازی به تغییر در شرایط تکنولوژیکی و دستگاهی در تولید شکلات پروبیوتیک نمی‌باشد.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تبریز که هزینه‌های مالی پژوهش کنونی را تقبل نموده است، تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از شرکت شکوه شاد شانجان به‌خاطر 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.

منابع

Afoakwa, EO., Paterson, A., Fowler, M., and Vieira, J. 2008. Particle size distribution and compositional effects on textural properties and appearance of dark chocolates. Journal of food engineering. 87: 181-190.

Aragon-Alegro, LC., Alarcon-Alegro, JH., Roberta-Cardarelli, H., Chih-Chiu, M., and Isay-Saad SM. 2007. Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. LWT-food science and technology. 40: 669-675.

Budryn, G., Nebesny, E., Zyzelewicz, D., Krysiak, W., Motyl, I., and Libudzisz, Z. 2007. Confectionery product of sugar-fat cores. Polish patent application: 3841542007 in polish.

Chetana, R., Reddy, Y., Reddy, S., and Negi, PS. 2013. Preparation and Properties of Probiotic Chocolates Using Yoghurt Powder. Food and nutrition sciences. 4:276-281

Chevalley, J. 1994. Chocolate flow properties. P55-139, In: Becket ST., Industrial chocolate manufacture and use. Blackwell Press. United Kingdom.

Corbo, M., Albenzio, M., De Angelis, M., Sevi, A., and Gobbetti, M. 2001. Microbiological and biochemical properties of Canestrato Pugliese hard cheese supplemented with bifidobacteria. Journal of Dairy Science. 84: 51-61.

Donkor, O., Henriksson, A., Vasiljevic, T., and Shah, N. 2006. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. International dairy journal. 16: 81-89.

Fooks, L., Gibson, G. 2002. Probiotics as modulators of the gut flora. British Journal of Nutrition. 88: s39-s49.

Holzapfel, W., Goktepe, I., Juneja, V., and Ahmedna, M. 2006. Introduction to prebiotics and probiotics. P1-33. In: Goktepe I., Juneja VK., Ahmedna M., Probiotics in food safety and human health. CRC Press. United States.

Homayouni, A. 2008. The health benefits of functional probiotic, prebiotic and synbiotic foods. Tabriz Univ. of Medical Sciences Press. 156p.

Institute of Standards and Industrial Research of Iran, 1995. ISIRI No. 2442, Sensory analysis- determination of sensitivity of taste.

Institute of Standards and Industrial Research of Iran, 1995. ISIRI No. 3580, Sensory analysis - Methodology - flavour profile methods.

Institute of Standards and Industrial Research of Iran, 2008. ISIRI No. 3442, Sensory analysis - Methodology - General guidance.

Institute of Standards and Industrial Research of Iran, 2010. ISIRI No. 608, Chocolate - Specification and test methods.

Nebesny, E., Zyzelewicz, D., Motyl, I., and Libudzisz, Z. 2005. Properties of sucrose-free chocolates enriched with viable lactic acid bacteria. European Food Research and Technology. 220: 58-62.

Nebesny, E., Zyzelewicz, D., Motyl, I., and Libudzisz, Z. 2007. Dark chocolates supplemented with Lactobacillus strains. European Food Research and Technology. 225: 33-42.

Richelle, M., Tavazzi, I., and Offord, E. 2001. Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa, and tea) prepared per cup serving. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49: 38-42.

Shah, N. 2004. Probiotics and prebiotics. Agriculture food industry high technology. 15: 7-13.

Zyzelewicz, D., Motyl, I., Nebesny, E., Budryn, G., Krysiak, W., and Rosicka-Kaczmarek, J. 2012. Probiotic Confectionery Products–Preparation and Properties. Intech open access publisher.

Zyzelewicz, D., Nebesny, E., Motyl, I., and Libudzisz, Z. 2010. Effect of milk chocolate supplementation with lyophilised Lactobacillus cells on its attributes. Czech Journal of Food Sciences. 28: 392-406.

EJFPP, Vol. 6 (2): 63-79
http://ejfpp.gau.ac.ir

Evaluation physicochemical, rheological and sensory properties of probiotic chocolate

M. Mehrban Roudbaneh[1], *A. Homayouni Rad[2] and S.R. Aref Hosseyni[3]

[1]M.Sc. student in Food Science and Technology, Faculty of Health and Nutrition, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[2]Associate Prof., Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Health and Nutrition, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
[3]Assistant Prof., Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Health and Nutrition, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
Received: 30/09/2014 ; Accepted 19/01/2015

Abstract

The purpose of food processing is producing foodstuffs which have higher quality and more nutritional value. Recently, producing probiotic foods due to encompassing health effects has attracted much attention. Chocolate is one of the nondairy products that have exhibited appropriate protective behavior for probiotic bacteria strains. In this study, probiotic chocolate containing *Lactobacillus casei* was produced and then physicochemical parameters such as total solid content, a_w, and acidity, along with rheological parameters including texture hardness, viscosity and sensory characteristics were investigated. The experiments showed that there was not any significant differences among control and probiotic chocolate samples during 6 months of storage in ambient and refrigerated temperatures ($P>0.05$). In relation to the water activity (a_w), significant difference between probiotic and control chocolate was observed, and according to obtained results the amount for probiotic chocolate was higher than control one ($P<0.05$). In addition, the 6-month storage time did not present any significant effect on attributes of probiotic chocolate ($P>0.05$). Furthermore, different storage temperatures (4 and 22 ˚C) did not affect evaluated properties of manufactured probiotic chocolate ($P>0.05$). Addition of *Lactobacillus casei* to chocolate doesn't influence it's physicochemical, rheological and organoleptic properties after production and during storage time. Therefore, the probiotic chocolate production at industrial scale, without the need for a change in the manufacturing procedure, can not adversely affect the customer-friendly specifications of product and leads to distribution of probiotics among consumers.

*Correspo