Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 9:46 +0330 on Saturday October 12th 2019

بررسی الگوی تخمیر قند ساکارز و D– تاگاتوز توسط سوش‌های مختلف پروبیوتیک و اثر آن روی خواص فیزیکی شیرکاکائو

میلاد روحی[۱،۷](M.Sc)، اقدس تسلیمی[۲](M.Sc)، زهرا سرلک[۳](M.Sc)، رضا محمدی[۴](Ph.D)، مهدی شادنوش[۵](Ph.D)، سید امیرمحمد مرتضویان[۲*](Ph.D)، صمد صبوری [۶](Ph.D)

۱- دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۲- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳- گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، مرکز تحقیقات تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

۴- کمیته تحقیقات دانشجویان، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۵- گروه تغذیه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان و گروه تغذیه گروه تغذیه گروه تغذیه بالینی و رژیم درمانی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۶- مؤسسه تحقیقات برنج کشور، رشت، گیلان، ایران

۷- مرکز تحقیقات توسعه و کیفیت، سازمان اتکا، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: شیرکاکائو در زمره یکی از پرطرفدارترین و پرمصرف‌ترین محصولات لبنی غیر تخمیری قرار دارد ولی به‌دلیل مقادیر زیاد ساکارز، می‌تواند باعث بروز دیابت، چاقی و پوسیدگی دندان در کودکان شود. بنابراین، جایگزینی قند ساکارز با D- تاگاتوز اهمیت می‌یابد. هم‌چنین در صورت استفاده از این محصول به عنوان حامل پروبیوتیک‌ها، می‌توان بر خواص فراویژه این محصول افزود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، اثر متغیرهای نسبت قند ساکارز به تاگاتوز (۰:۱۰۰، ۵۰:۵۰ و ۱۰۰:۰) و نوع کشت پروبیوتیک (ل. اسیدوفیلوس، ل. کازئی، ل. رامنوسوس و ب. لاکتیس) بر ویژگی‌های میکروبیولوژیک (با استفاده از کشت در محیط MRS آگار)، درصد قند باقیمانده (با استفاده از HPLC) و رنگ (با استفاده از هانترلب) شیرکاکائوی سین‌بیوتیک طی ۲۱ روز نگه‌داری سرد در (۵°C) مورد بررسی قرار گرفت. تیمارهای بدون تلقیح پروبیوتیک به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها: همه تیمارها دارای قابلیت زیستی مناسبی (حداقل ۷ log cfu/ml) در پایان دوره نگه‌داری سرد بودند. با این وجود، بیش‌ترین قابلیت زیستی در پایان دوره نگه‌داری سرد مربوط به تیمارهای T-R (تیمار دارای قند D-تاگاتوز و ل. رامنوسوس) و T-C (تیمار دارای قند D-تاگاتوز و ل. کازئی) بود. هر دو باکتری ل. اسیدوفیلوس و ل. کازئی به ترتیب تمایل بیش‌تری به مصرف قندهای D-تاگاتوز، لاکتوز و ساکارز را داشتند. با این وجود، ل. رامنوسوس به ترتیب، D-تاگاتوز، ساکارز و لاکتوز را بیش‌تر تخمیر کرد و این ترتیب برای ب. لاکتیس به ترتیب ساکارز، لاکتوز و D-تاگاتوز بود و حتی باعث کاهش معناداری در مقدار قند تاگاتوز نشد. تیمارهای دارای ل. اسیدوفیلوس، ل. کازئی، ل. رامنوسوس و ب. لاکتیس به ترتیب تغییرات رنگ بیش‌تری نسبت به تیمارهای غیر پروبیوتیک طی نگه‌داری سرد داشتند.

نتیجه‌گیری: D-تاگاتوز به عنوان یک قند طبیعی با خواص عمل‌کردی برای شیرکاکائوی پروبیوتیک، سلامت‌بخشی این فرآورده را افزایش می‌دهد. اما نسبت قند ساکارز و تاگاتوز و نوع سوش پروبیوتیک مورد استفاده اهمیت زیادی در قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها و هم‌چنین کیفیت نهایی محصول دارند.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک‌ها، تاگاتوز، تخمیر، ساکارز، شیر، محدودیت کالری

مقدمه

امروزه نه‌تنها تأمین مواد مغذی و نیازهای پروتئینی، ویتامینی، کالریک و مواد معدنی اهمیت دارد، بلکه جنبه‌های

* نویسنده مسئول، تلفن: ۲۲۳۷۶۴۲۶ -۲۱ Email: mortazvn@sbmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۲۶

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 9:46 +0330 on Saturday October 12th 2019

دارویی (پیشگیری‌کننده و درمانی) مواد غذایی نیز مورد توجه است. این موضوع سبب افزایش پذیرش و مصرف غذاهای فراسودمند شده است [۱]. بازارپسندی غذاهای فراسودمند در حال افزایش است، زیرا غذاهای فراسودمند می‌توانند ضمن کاهش خطر ابتلا به بیماری‌هایی هم‌چون اسهال، انواع سرطان و بیماری‌های قلبی- عروقی باعث ارتقای سلامت مصرف‌کننده شوند [۲،۱]. هم‌چنین از آن‌جا که فرآورده‌های لبنی، به طور طبیعی از پتانسیل هدفمند بودن برخوردار هستند، استفاده از آن‌ها در رژیم غذایی اهمیت دارد. طی سه دهه گذشته بیش‌تر فرآورده‌های فراسودمند از شیر و مشتقات آن فرآوری شده است. در سراسر جهان، فرآورده‌های لبنی به طور مؤثری با پروبیوتیک‌ها پیوند یافته‌اند و فرآورده‌های لبنی پروبیوتیک بزرگ‌ترین بازار غذاهای فراسودمند را در بر می‌گیرد [۴،۳].

شیرهای غیر تخمیری طعم‌دار پروبیوتیک، به دلیل تنوع در خواص حسی، مصرف روزافزون و هم‌چنین ارزش تغذیه‌ای مطلوب، امروزه برای استفاده به عنوان حامل میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، مورد توجه قرار گرفته‌اند [۴]. اگرچه تنوعی از شیرهای طعم‌دار مثل شیرتوت‌فرنگی، شیرعسل، شیرقهوه و شیرخرما در دسترس هستند، اما شیرکاکائو هنوز مطلوب‌ترین شیر طعم‌دار است که در مقیاس جهانی در زمره پرطرفدارترین و پرمصرف‌ترین محصولات لبنی غیر تخمیری قرار دارد [۵]. بنابراین، در صورت استفاده از آن به عنوان حامل میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، می‌توان این محصول را در سطح گسترده‌تری تولید و مصرف کرد.

قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در شرایط نگه‌داری، مهم‌ترین نکته در تولید فرآورده‌های پروبیوتیک است [۶]. برخورداری از اثرات سلامت‌بخش این میکروارگانیسم‌ها به قابلیت زیستی آن‌ها در فرآورده‌های غذایی، یعنی حداقل تعداد سلول‌های زنده 10^7 cfu/ml در محصول طی دوره نگه‌داری، بستگی دارد. علاوه بر تعداد میکروارگانیسم‌های زنده در گرم یا میلی‌لیتر فرآورده‌های پروبیوتیک، مقدار مصرف روزانه آن‌ها نیز دارای اهمیت است [۸،۷]. مهم‌ترین عواملی که بر قابلیت زیستی کشت‌های آغازگر پروبیوتیک در فرآورده‌های غیر تخمیری اثرگذار است، شامل نوع گونه و سویه باکتری پروبیوتیک، ترکیب شیمیایی محیط فرآورده، مقدار ماده خشک شیر در فرآورده لبنی، مواد مغذی موجود، تقویت‌کننده‌ها و بازدارنده‌های رشد، اکسیژن مولکولی (به ویژه در خصوص بیفیدوباکتریوم‌ها)، پراکسید هیدروژن و دمای نگه‌داری می‌باشند. تخمیر در فرآورده‌های پروبیوتیک غیر تخمیری انجام نمی‌شود و بنابراین کاهش pH و کاهش شدید قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها در آن اتفاق نمی‌افتد [۱۱- ۹]. یکی از راه‌های جلوگیری از تخمیر پروبیوتیک‌های تلقیح شده در فرآورده، نگه‌داری محصول در دماهای پایین است و مناسب‌ترین دمای نگه‌داری سرد برای جلوگیری از تخمیر، در گونه‌های مختلف پروبیوتیک، متفاوت است. بنابراین نوع گونه پروبیوتیک و دمای نگه‌داری سرد از عوامل با اهمیت به شمار می‌آیند [۱۰،۹]. از طرف دیگر، در فرآورده‌های تخمیری، بعضی از محصولات متابولیسم باکتری‌های اسید لاکتیک آغازگر مثل دی‌استیل، استالدهید و اسید لاکتیک باعث کاهش قابلیت زنده‌مانی بعضی از پروبیوتیک‌های اضافه شده به محیط می‌شود [۱۲] که این امر در فرآورده‌های غیر تخمیری اتفاق نمی‌افتد. بنابراین تولید یک فرآورده پروبیوتیک غیر تخمیری، علاوه بر سرعت زیاد فرایند تولید آن (به دلیل عدم وجود مرحله تخمیر)، می‌تواند میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک را با قابلیت زیستی مطلوب به مصرف‌کننده برساند.

علاوه بر این، می‌توان با استفاده از قندهای رژیمی و پری‌بیوتیک جایگزین ساکارز (مانند تاگاتوز)، مصرف این محصول توسط افراد دیابتی و افراد تحت رژیم درمانی را نیز افزایش داد [۱۳]. لازم به ذکر است که پری‌بیوتیک‌ها ترکیباتی هستند که در برابر آنزیم‌های روده‌ای هضم‌ناپذیر یا اندک‌هضم می‌باشند تا دست‌نخورده یا با شکست پاره‌ای در محیط روده در دسترس پروبیوتیک‌ها قرار گیرند و به طور انتخابی به مصرف آن‌ها برسند [۹]. شیرینی نسبی D- تاگاتوز در محلول ۱۰٪ قند، ۹۲٪ است. مزه آن نیز مشابه ساکارز بوده ولی انرژی‌زایی بسیار پایینی دارد. D- تاگاتوز شیرین‌کننده‌ای

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 9:46 +0330 on Saturday October 12th 2019

کم‌کالری، آنتی‌پلاک، بدون پس‌طعم، بدون اثر بر نمایه گلیسمی و افزایش‌دهنده طعم است [۱۶-۱۴].

در این تحقیق، اثر افزودن ۴ گونه پروبیوتیک (ل. اسیدوفیلوس، ل. کازئی، ل. رامنوسوس و ب. لاکتیس) و نسبت قند ساکارز به تاگاتوز (۰:۱۰۰، ۱۰۰:۰ و ۵۰:۵۰) بر ویژگی‌های میکروبیولوژیک، درصد قند باقی‌مانده و رنگ شیرکاکائوی سین بیوتیک طی ۲۱ روز نگه‌داری سرد در (۵°C) مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

روش تولید نمونه‌ها (طرح آزمایش). شیر مورد استفاده برای تولید شیرکاکائوی فراسودمند، از طریق بازسازی پودر شیر بی‌چربی ساخته شده و پس از استاندارد کردن چربی و ماده خشک و هم‌چنین فرمول‌بندی (ماده خشک ناشی از شیر بدون احتساب چربی ۱۵٪، کاکائو ۱٪ و کاراگینان ۰/۰۳٪)، درصد قندهای مختلف (۶/۵٪ ساکارز، ۷/۰۶٪ تاگاتوز و ۳/۲۵٪ ساکارز + ۳/۵۳٪ تاگاتوز) به شیرکاکائو افزوده شد (از آن‌جا که ساکارز در شیرکاکائو به مقدار ۶/۵٪ استفاده می‌شود و لازم به ذکر است که شیرینی نسبی D- تاگاتوز، ۹۲٪ شیرینی نسبی ساکارز است)؛ بنابراین برای جایگزین کردن ساکارز به ۷/۰۶٪ D- تاگاتوز نیاز است تا شیرینی برابر با ۶/۵٪ ساکارز ایجاد کند). سپس فرایند حرارتی ۹۰°C (به مدت زمان ۱۵ دقیقه) و هموژنیزاسیون انجام شد. بعد از فرایند حرارتی، شیرکاکائو وارد مرحله هموژنیزاسیون شده و پس از سرد کردن سریع شیرکاکائو تا ۱۵ °C یکی از کشت میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک (ل. اسیدوفیلوس LAFTI L10 و ل. کازئی LAFTI L26 از شرکت DSM استرالیا و ل. رامنوسوس HN001 و ب. لاکتیس LAFTI B94 از شرکت دنیسکو دانمارک) تا رسیدن به جمعیت زنده حدود 10^8 cfu/ml اضافه شد. نمونه‌های فاقد میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک نیز به عنوان شاهد میکروبی منظور شدند. پس از افزودن میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، نمونه‌ها زیر هود استریل بسته‌بندی شده و در دمای ۵ °C نگه‌داری شدند. نمونه‌ها بلافاصله پس از رسیدن به دمای سرد ۵ °C (۰ روز) و هم‌چنین در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ نگه‌داری سرد بررسی شدند.

اسم هر تیمار از دو بخش تشکیل شده است که بخش اول آن مربوط به نسبت قند ساکارز به تاگاتوز (T: شیرکاکائوی دارای نسبت ساکارز به تاگاتوز ۰:۱۰۰ (فقط تاگاتوز)، S: شیرکاکائوی دارای نسبت ساکارز به تاگاتوز ۱۰۰:۰ (فقط ساکارز) و ST: شیرکاکائوی دارای نسبت ساکارز به تاگاتوز ۵۰:۵۰) و بخش دوم آن مربوط به نوع کشت پروبیوتیک (A: شیرکاکائوی دارای باکتری پروبیوتیک ل.اسیدوفیلوس، C: شیرکاکائوی دارای باکتری پروبیوتیک ل. کازئی، R: شیرکاکائوی دارای باکتری پروبیوتیک ل. رامنوسوس و B: شیرکاکائوی دارای باکتری پروبیوتیک ب. لاکتیس) است.

اندازه‌گیری قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها. شمارش زنده پروبیوتیک‌ها با استفاده از محیط کشت MRS آگار انجام شد. پلیت‌ها در شرایط هوازی و بی‌هوازی (برای باکتری‌های بیفیدوباکتریوم) در دمای ۳۷ °C به مدت زمان حداقل ۷۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند [۱۸،۱۷]. شرایط بی‌هوازی با کاربرد جار بی‌هوازی و گازپک تیپ A ایجاد شد.

تعیین مقدار قندهای لاکتوز، ساکارز و D- تاگاتوز به ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه، ۱ میلی‌لیتر محلول شفاف‌کننده و ترسیب‌دهنده پروتئین (حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر استات روی و ۰/۵ میلی‌لیتر فروسیانور پتاسیم) افزوده شده و سپس سانتریفوژ برای ترسیب پروتئین‌ها و کاکائو انجام شد. لازم به ذکر است که نمونه‌ها فاقد چربی بودند. فاز شفاف (محلول حاوی قند) با گذشتن از صافی غشایی با منافذ ۰/۴۵ میکرومتر، فیلتر شد. ۳-۲ میلی‌لیتر از محلول حاصل، پس از رقت‌سازی به نسبت ۱:۱۰ با حلال قند (۲۰٪ آب و ۸۰٪ استونیتریل)، به دستگاه HPLC تزریق شد. محلول‌های استاندارد خارجی برای هر سه قند (شرکت سیگما، آمریکا) نیز با استفاده از حلال قند (۲۰٪ آب و ۸۰٪ استونیتریل) تهیه شدند.

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 9:46 +0330 on Saturday October 12th 2019

از ستون آنالیز Develosil ساخت ژاپن از جنس فولاد ضد زنگ، با قطر ۴/۶ میلی‌متر، به طول ۲۵۰ میلی‌متر و دارای سیلیکاژل آمینی اصلاح شده با اندازه ذرات ۵ تا ۷ میکرومتر استفاده شد. فاز متحرک شامل استونیتریل در آب به نسبت ۸۰:۲۰، سرعت جریان ۱/۳ میلی‌لیتر در دقیقه، دمای ستون و آشکارساز ۳۰ °C و حجم نمونه تزریق شده ۱۰ میکرولیتر بودند [۱۹].

از زمان بازداری و سطح زیر منحنی قندهای شیرکاکائو با قندهای استانداردهای مربوطه، قندهای شیرکاکائو شناسایی و تعیین مقدار شدند.

اندازه‌گیری رنگ. برای بررسی اثر نسبت قند ساکارز به تاگاتوز و هم‌چنین نوع پروبیوتیک بر رنگ نمونه‌های شیرکاکائو از دستگاه رنگ‌سنجی‌ها نترلب در سیستم سه‌بعدی L، a و b استفاده شد.L ، شدت روشنایی (سفیدی– سیاهی) a، قرمزی–سبزی و b، زردی–آبی را مشخص می‌کند. هرچه مقدار L بیش‌تر باشد، شدت روشنایی بیش‌تر است. هرچه a بزرگ‌تر باشد، تمایل به قرمزی بیش‌تر است و هرچه b بزرگ‌تر باشد، تمایل به سمت رنگ زرد است.

روش‌های تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها. این پژوهش بر اساس طرح فاکتوریل کامل (طرح کاملاً تصادفی ۵×۳) طراحی شد. تمامی آزمون‌ها در ۳ تکرار انجام شدند. هم‌چنین تحلیل واریانس دو طرفه و آزمون دانکن (در سطح معنی‌داری ۰/۰۵) برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها برای یافتن تفاوت معنی‌دار میان میانگین داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS16 انجام شد.

نتایج

قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها طی نگه‌داری سرد. جدول ۱ قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها را در تیمارهای مختلف طی ۲۱ روز نگه‌داری سرد نشان می‌دهد. با توجه به جدول ۱، قابلیت زیستی در تیمارهای دارای ل. اسیدوفیلوس و ل. کازئی، تا روز ۱۴ نگه‌داری افزایش و سپس تا روز ۲۱ نگه‌داری سرد کاهش داشت. ولی در تیمارهای دارای ل. رامنوسوس، بیش‌ترین قابلیت زیستی به طور مشترک (بدون تفاوت معنادار) در روزهای ۱۴ و ۲۱ مشاهده شد. هم‌چنین در تیمارهای دارای بیفیدوباکتریوم، در دو تیمار T-B و ST-B، قابلیت زیستی بعد از روز ۷ نگه‌داری سرد کاهش داشت، ولی در تیمار S-B، قابلیت زیستی روز ۷ و ۱۴ نگه داری سرد تفاوت معناداری نداشت و سپس تا روز ۲۱ نگه‌داری سرد کاهش یافت (P<۰/۰۵).

لازم به ذکر است که، در همه تیمارهای دارای لاکتوباسیلوس، جمعیت نهایی پروبیوتیک‌ها در پایان ۲۱ روز نگه‌داری سرد به طور معناداری بیش‌تر از روز صفر بود. این در حالیست که این مقدار در تیمارهای دارای بیفیدوباکتریوم، کم‌تر از روز صفر بود (P<۰/۰۵).

جدول ۱. قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها در تیمارهای مختلف طی ۲۱ روز نگهداری سرد*

تیمار**	قابلیت زیستی (log cfu/mL)			
	روز صفر	روز ۷	روز ۱۴	روز ۲۱
S-A	۸/۰۲^{aD}	۹/۴۹^{bB}	۹/۹۷^{dA}	۸/۹۲^{cC}
T-A	۸/۰۲^{aD}	۹/۸۹^{aB}	۱۰/۹۳^{aA}	۹/۰۴^{bC}
ST-A	۸/۰۰^{aD}	۹/۵۱^{bB}	۱۰/۶۶^{cA}	۸/۹۴^{cC}
S-C	۸/۰۱^{aD}	۸/۸۸^{deC}	۹/۵۴^{eA}	۸/۹۹^{bB}
T-C	۷/۹۸^{aD}	۹/۸۵^{aB}	۱۰/۸۳^{bA}	۹/۲۳^{aC}
ST-C	۸/۰۲^{aD}	۹/۳۶^{cB}	۹/۹۹^{dA}	۸/۸۶^{cdC}
S-R	۷/۹۹^{aC}	۸/۴۹^{fgB}	۸/۷۵^{hiA}	۸/۷۹^{dA}
T-R	۸/۰۲^{aD}	۸/۸۵^{eC}	۹/۳۲^{fA}	۹/۲۷^{aAB}
ST-R	۸/۰۱^{aC}	۸/۵۵^{fB}	۸/۸۱^{hA}	۸/۸۲^{dA}
S-B	۷/۹۹^{aB}	۸/۹۷^{dA}	۸/۹۵^{gA}	۷/۴۷^{eC}
T-B	۷/۹۸^{aB}	۸/۴۴^{gA}	۷/۷۸^{kC}	۶/۸۹^{gD}
ST-B	۸/۰۰^{aC}	۸/۹۵^{dA}	۸/۵۱^{iB}	۷/۳۶^{fD}

* میانگین‌هایی که با حروف کوچک و بزرگ متفاوت نشان داده شده اند، به ترتیب نشاندهنده تفاوت‌های معنادار میان میانگین‌ها در ستون‌ها و سطرها هستند (P<۰/۰۵). ** S= فقط ساکارز، T= فقط تاگاتوز، ST= ساکارز و تاگاتوز به نسبت ۵۰:۵۰، A= ل. اسیدوفیلوس، C= ل. کازئی، R= ل. رامنوسوس و B= ب. لاکتیس

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 9:46 +0330 on Saturday October 12th 2019

مطابق با جدول ۱، بیش‌ترین قابلیت زیستی در روز ۷ نگه‌داری سرد به طور مشترک (بدون تفاوت معنادار) مربوط به دو تیمار T-A و T-C، در روز ۱۴ نگه‌داری سرد مربوط به تیمار T-A و در روز ۲۱ نگه‌داری سرد در دو تیمار T-C و T-R به طور مشترک (بدون تفاوت معنادار) مشاهده شد.

به طور کلی در میان همه تیمارها در ۲۱ روز دوره نگه‌داری سرد، بیش‌ترین قابلیت زیستی به طور کاملاً معناداری مربوط به تیمار T-A در روز ۱۴ نگه‌داری سرد و کم‌ترین این مقدار در تیمار T-B در پایان ۲۱ روز نگه‌داری سرد مشاهده شد. هم‌چنین بیش‌ترین و کم‌ترین تغییرات در قابلیت زیستی به ترتیب مربوط به تیمار T-A و S-R بود (P<۰/۰۵).

مقدار قندهای تیمارها طی نگه‌داری سرد. درصد لاکتوز، ساکارز و D- تاگاتوز در تیمارهای مختلف در روزهای ۰ و ۲۱ نگه‌داری سرد و هم‌چنین کاهش درصد آن‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است. مطابق با جدول ۲، کم‌ترین تغییرات درصد قند در میان همه تیمارها طی نگه‌داری سرد، مربوط به تیمارهای غیر پروبیوتیک بود. تیمارهای دارای ل. اسیدوفیلوس و ل. کازئی به ترتیب تمایل به مصرف قندهای تاگاتوز، لاکتوز و ساکارز داشتند. این در حالی است که بیش‌ترین تمایل به مصرف قندها در تیمارهای دارای ل. رامنوسوس به ترتیب مربوط به تاگاتوز، ساکارز و لاکتوز و در تیمارهای دارای ب. لاکتیس به ترتیب مربوط به ساکارز، لاکتوز و تاگاتوز بود (P<۰/۰۵).

هم‌چنین در تیمارهای پروبیوتیک، بیش‌ترین کاهش در لاکتوز، ساکارز و تاگاتوز به ترتیب مربوط به تیمارهای S-A، S-A و T-A بود و کم‌ترین کاهش این قندها به ترتیب در تیمارهای S-B و ST-B (به طور مشترک)، S-C و T-B مشاهده شد. ولی بیش‌ترین و کم‌ترین مصرف کل قند طی ۲۱ روز نگه‌داری سرد مربوط به تیمارهای T-A و T-B بود (P<۰/۰۵).

جدول ۲. درصد (g/100ml) قندهای موجود در تیمارهای مختلف طی ۲۱ روز نگهداری سرد*

تیمار**	لاکتوز (٪)			ساکارز (٪)			تاگاتوز (٪)D-			کاهش کل قند (٪)
	روز صفر	روز ۲۱	٪کاهش	روز صفر	روز ۲۱	٪کاهش	روز صفر	روز ۲۱	٪کاهش	
S	^{aA}۷/۸۱	^{aA}۷/۸۰	۰/۰۱	^{aA}۶/۵۱	^{aA}۶/۵۰	۰/۰۱	-	-	-	۰/۰۲
T	^{aA}۷/۷۹	^{aA}۷/۷۹	۰/۰۰	-	-	-	^{aA}۷/۰۶	^{aA}۷/۰۶	۰/۰۰	۰
ST	^{aA}۷/۸۲	^{aA}۷/۸۰	۰/۰۲	^{bA}۳/۲۴	^{dA}۳/۲۴	-	^{bA}۳/۵۱	^{eA}۳/۵۱	۰/۰۰	۰/۰۲
S-A	^{aA}۷/۸۰	^{dB}۷/۲۵	۰/۵۵	^{aA}۶/۵۲	^{cB}۶/۰۴	۰/۴۸	-	-	-	۱/۰۳
T-A	^{aA}۷/۸۰	^{cB}۷/۴۶	۰/۳۴	-	-	-	^{aA}۷/۰۷	^{dB}۶/۳۱	۰/۷۶	۱/۱۰
ST-A	^{aA}۷/۸۲	^{cB}۷/۵۳	۰/۲۹	^{bA}۳/۲۵	^{eB}۳/۱۱	۰/۱۴	^{bA}۳/۵۳	^{hB}۲/۸۷	۰/۶۶	۱/۰۹
S-C	^{aA}۷/۸۱	^{cB}۷/۴۵	۰/۳۶	^{aA}۶/۴۹	^{aA}۶/۴۸	۰/۰۱	-	-	-	۰/۳۷
T-C	^{aA}۷/۷۹	^{bB}۷/۶۶	۰/۱۳	-	-	-	^{aA}۷/۰۵	^{cB}۶/۷۶	۰/۲۹	۰/۴۲
ST-C	^{aA}۷/۷۹	^{abA}۷/۷۲	۰/۰۷	^{bA}۳/۲۶	^{dA}۳/۲۳	۰/۰۳	^{bA}۳/۵۴	^{gB}۳/۲۹	۰/۲۵	۰/۳۵
S-R	^{aA}۷/۸۲	^{bB}۷/۷۱	۰/۱۱	^{aA}۶/۵۰	^{bB}۶/۳۹	۰/۱۱	-	-	-	۰/۲۲
T-R	^{aA}۷/۸۰	^{bB}۷/۷۱	۰/۰۹	-	-	-	^{aA}۷/۰۸	^{bB}۶/۹۱	۰/۱۷	۰/۲۶
ST-R	^{aA}۷/۸۲	^{aA}۷/۷۶	۰/۰۶	^{bA}۳/۲۳	^{dA}۳/۲۰	۰/۰۳	^{bA}۳/۵۳	^{fB}۳/۴۲	۰/۱۱	۰/۲۰
S-B	^{aA}۷/۷۸	^{abA}۷/۷۵	۰/۰۳	^{aA}۶/۵۰	^{abB}۶/۴۳	۰/۰۷	-	-	-	۰۰/۱
T-B	^{aA}۷/۸۱	^{abA}۷/۷۵	۰/۰۶	-	-	-	^{aA}۷/۰۶	^{aA}۷/۰۵	۰/۰۱	۰/۰۷
ST-B	^{aA}۷/۸۰	^{aA}۷/۷۷	۰/۰۳	^{bA}۳/۲۵	^{deB}۳/۱۷	۰/۰۸	^{bA}۳/۵۵	^{eA}۳/۵۲	۰/۰۳	۰/۱۴

* میانگین‌هایی که با حروف کوچک و بزرگ متفاوت نشان داده شده‌اند، به ترتیب نشاندهنده تفاوت‌های معنادار میان میانگین‌ها در ستون‌ها (تیمار ها) و سطرها (زمان نگهداری سرد برای هر کدام از قندها) هستند (P<۰/۰۵)

** S= فقط ساکارز، T= فقط تاگاتوز، ST= ساکارز و تاگاتوز به نسبت ۵۰:۵۰، A= ل. اسیدوفیلوس، C= ل. کازئی، R= ل. رامنوسوس و B= ب. لاکتیس

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 9:46 +0330 on Saturday October 12th 2019

شاخص‌های رنگ تیمارها طی نگه‌داری سرد. جدول ۳ شاخص‌های مقیاس رنگ را در تیمارهای مختلف طی نگه‌داری سرد نشان می‌دهد. جدول ۳ نشان می‌دهد که تغییر شاخص‌های L و a بیش‌تر از تغییر شاخص b بود. شاخص‌های L، a و b در تیمارهای غیر پروبیوتیک و در تیمارهای ب. لاکتیس طی نگه‌داری سرد ثابت بود (P>۰/۰۵). در تیمارهای ل. اسیدوفیلوس، شاخص‌های L، a و C افزایش معناداری داشتند ولی شاخص b تغییری نداشت (P>۰/۰۵). با این وجود، در تیمارهای ل. کازئی و ل. رامنوسوس، شاخص L کاهش معناداری داشت (P<۰/۰۵) و دو شاخص a و b طی نگه‌داری سرد تغییری نداشتند (P>۰/۰۵).

شکل ۱ موقعیت فضایی تغییر رنگ تیمارها را طی دوره نگه‌داری سرد نشان می‌دهد که در آن، ارزیابی شاخص‌های L و a به وسیله نمودار روشنایی- قرمزی (Lightness-redness) انجام شد و اندازه پیکان‌ها نشان‌دهنده تغییر شاخص‌های L و a طی نگه‌داری سرد است. با توجه به این شکل، بیش‌ترین تغییرات در شاخص‌های L و a طی نگه‌داری سرد، در تیمارهای ل. اسیدوفیلوس مشاهده شد.

جدول ۳. شاخص‌های رنگ تیمارهای مختلف طی ۲۱ روز نگهداری سرد*

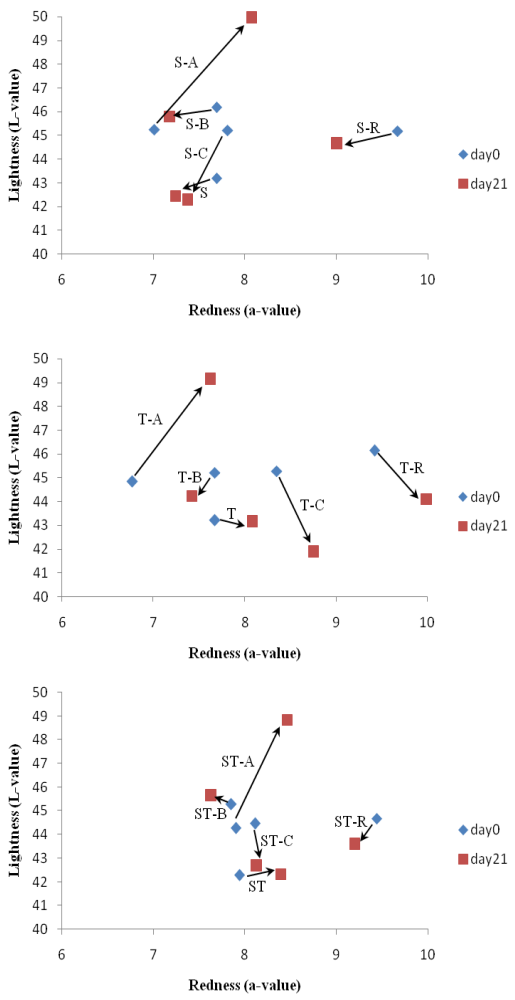
تیمار**	L			a			b			C		ΔE
	روز صفر	روز ۲۱	ΔL	روز صفر	روز ۲۱	Δa	روز صفر	روز ۲۱	Δb	روز صفر	روز ۲۱	
S	^{bA}۴۳/۲۰	^{cA}۴۲/۴۵	۰/۷۵-	^{bcA}۷/۶۹	^{cA}۷/۲۴	۰/۴۵-	^{bA}۷/۸۱	^{bA}۸/۰۹	۰/۲۸	۱۰/۹۶	۱۰/۸۵	۰/۹۱
T	^{bA}۴۳/۲۱	^{cA}۴۳/۱۴	۰/۰۷-	^{bcA}۷/۶۷	^{bcA}۸/۰۸	۰/۴۱	^{bA}۸/۳۷	^{bA}۸/۳۵	۰/۰۲-	۱۱/۳۵	۱۱/۶۲	۰/۴۱
ST	^{bA}۴۲/۲۸	^{cA}۴۲/۳۴	۰/۰۶	^{bA}۷/۹۴	^{bA}۸/۳۹	۰/۴۵	^{bA}۸/۷۰	^{bA}۸/۲۱	۰/۴۹-	۱۱/۷۷	۱۱/۷۳	۰/۶۶
S-A	^{aB}۴۵/۲۵	^{aA}۴۹/۹۵	۴/۷۰	^{cB}۷/۰۱	^{bcA}۸/۰۷	۱/۰۶	^{abA}۹/۰۲	^{bA}۹/۲۶	۰/۲۴	۱۱/۴۲	۱۲/۲۸	۴/۸۲
T-A	^{abB}۴۴/۸۵	^{aA}۴۹/۱۳	۴/۲۸	^{cB}۶/۷۷	^{cA}۷/۶۲	۰/۸۵	^{aA}۹/۵۰	^{aA}۱۰/۰۳	۰/۵۳	۱۱/۶۶	۱۲/۵۹	۴/۳۹
ST-A	^{abB}۴۴/۲۸	^{aA}۴۸/۸۵	۴/۵۷	^{bA}۷/۹۰	^{bA}۸/۴۶	۰/۵۶	^{aA}۹/۹۴	^{aA}۱۰/۳۸	۰/۴۴	۱۲/۶۹	۱۳/۳۹	۴/۶۲
S-C	^{aA}۴۵/۲۲	^{cB}۴۲/۲۸	۲/۹۴-	^{bcA}۷/۸۱	^{cA}۷/۳۷	۰/۴۴-	^{aA}۹/۸۴	^{bAB}۹/۲۱	۰/۶۳-	۱۲/۵۶	۱۱/۷۹	۳/۰۳
T-C	^{aA}۴۵/۲۸	^{cB}۴۱/۸۷	۳/۴۱-	^{bA}۸/۳۵	^{bA}۸/۷۵	۰/۴۰	^{aA}۹/۵۷	^{aA}۱۰/۵۱	۰/۹۴	۱۲/۷۰	۱۳/۶۷	۳/۵۶
ST-C	^{abA}۴۴/۴۷	^{cA}۴۲/۶۸	۱/۷۹-	^{bA}۸/۱۱	^{bcA}۸/۱۳	۰/۰۲	^{aA}۹/۴۹	^{abA}۹/۸۷	۰/۳۸	۱۲/۴۸	۱۲/۷۸	۱/۸۳
S-R	^{aA}۴۵/۱۹	^{bcA}۴۴/۶۵	۰/۵۴-	^{aA}۹/۶۷	^{abA}۹/۰۱	۰/۶۶-	^{abA}۹/۰۱	^{abA}۹/۶۳	۰/۶۲	۱۳/۲۱	۱۳/۱۸	۱/۰۵
T-R	^{aA}۴۶/۱۵	^{bcB}۴۴/۱۱	۲/۰۴-	^{aA}۹/۴۲	^{aA}۹/۹۹	۰/۵۷	^{aA}۹/۴۷	^{abA}۹/۷۹	۰/۳۲	۱۳/۳۵	۱۳/۹۸	۲/۱۴
ST-R	^{abA}۴۴/۶۸	^{cA}۴۳/۵۹	۱/۰۹-	^{aA}۹/۴۴	^{abA}۹/۲۰	۰/۲۴-	^{aA}۹/۹۰	^{bA}۹/۱۸	۰/۷۲-	۱۳/۶۸	۱۲/۹۹	۱/۳۲
S-B	^{aA}۴۶/۲۰	^{bA}۴۵/۸۰	۰/۴۰-	^{bcA}۷/۶۹	^{cA}۷/۱۸	۰/۵۱-	^{abA}۹/۳۱	^{bA}۹/۲۴	۰/۰۷-	۱۲/۰۷	۱۱/۷۰	۰/۶۵
T-B	^{aA}۴۵/۲۱	^{bcA}۴۴/۲۴	۰/۹۷-	^{bcA}۷/۶۷	^{cA}۷/۴۲	۰/۲۵-	^{aA}۹/۶۶	^{bA}۹/۲۳	۰/۴۳-	۱۲/۳۳	۱۱/۸۴	۱/۰۹
ST-B	^{aA}۴۵/۲۸	^{bA}۴۵/۶۴	۰/۳۶	^{bA}۷/۸۵	^{cA}۷/۶۳	۰/۲۲-	^{aA}۹/۷۵	^{bAB}۹/۰۵	۰/۷۰-	۱۲/۵۱	۱۱/۸۳	۰/۸۱

* میانگین‌هایی که با حروف کوچک و بزرگ متفاوت نشان داده شده‌اند، به ترتیب نشاندهنده تفاوت‌های معنادار میان میانگین‌ها در ستون‌ها (تیمار ها) و سطرها (زمان نگهداری سرد برای هر کدام از شاخص‌های رنگ) هستند (P<۰/۰۵)

$\Delta L= L_{day21}-L_{day0}$; $\Delta a= a_{day21}-a_{day0}$; $\Delta b= b_{day21}-b_{day0}$; $C= (a^2+b^2)^{1/2}$; $\Delta E= (\Delta L^2+\Delta a^2+\Delta b^2)^{1/2}$

** S= فقط ساکارز، T= فقط تاگاتوز، ST= ساکارز و تاگاتوز به نسبت ۵۰:۵۰، A= ل. اسیدوفیلوس، C= ل. کازئی، R= ل. رامنوسوس و B= ب. لاکتیس

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 9:46 +0330 on Saturday October 12th 2019



شکل ۱. موقعیت فضایی تغییر رنگ تیمار های مختلف روی نمودار روشنایی- قرمزی طی دوره نگهداری سرد

بحث و نتیجه‌گیری

قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها طی نگه‌داری سرد

با توجه به جدول ۱، نوع گونه پروبیوتیک تلقیح شده در ایجاد تغییرات قابلیت زیستی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در شیرکاکائو طی ۲۱ روز نگه‌داری سرد مهم است.

افزایش قابلیت زیستی دو گونه ل. اسیدوفیلوس و ل. کازئی تا روز ۱۴ نگه‌داری ممکن است به دلیل رشد مطلوب در دمای سرد و پروتئولیتیک بودن آن‌ها باشد. البته همین امر خود باعث افزایش بیش‌تر اسیدیته، نامناسب شدن محیط برای ماندگاری پروبیوتیک‌ها و کاهش قابلیت زیستی آن‌ها پس از روز ۱۴ شد [۲۰]. همچنین قابلیت زیستی ل. رامنوسوس همواره تا روز ۱۴ نگه‌داری سرد افزایش یافت و سپس تا پایان دوره نگه‌داری ثابت ماند. دلیل این امر ممکن است سازگاری سریع با شرایط محیطی متفاوت، رشد و تخمیر ملایم و سپس مقاوم بودن به شرایط نامساعد حاصل از تخمیر باشد. ل. رامنوسوس یکی از مقاوم‌ترین پروبیوتیک‌هاست که امروزه در سطح گسترده‌ای در محصولات تخمیری و غیر تخمیری در اروپا کاربرد دارد [۹]. البته قابلیت زیستی این گونه در تیمار T-R از روز ۱۴ تا ۲۱ به طور معناداری کاهش یافت که این کاهش احتمالاً به دلیل افت بیش‌تر pH و افزایش بیش‌تر اسیدیته قابل تیتر نسبت به سایر تیمارهای دارای ل. رامنوسوس بود.

افزایش قابلیت زیستی ب. لاکتیس تا روز ۷ نگه‌داری را می‌توان در برقرار بودن شرایط مساعد برای این گونه عنوان کرد. از جمله شرایط مساعد برای بیفیدوباکتریوم‌ها، محیط دارای پتانسیل احیای پایین است. وجود پلی‌فنل‌هایی مانند اپی‌کاتچین، کاتچین و پروسیانیدین و هم‌چنین دیگر ترکیبات احیاکننده حاصل از کاکائو ممکن است باعث کاهش پتانسیل احیای محیط در روز صفر شوند. از طرف دیگر، حل کردن موادی مانند انواع قند و کاکائو در شیر و سپس فرایند حرارتی، باعث خروج عمده اکسیژن از شیرکاکائو شده و محیط را برای تخمیر شدیدتر توسط بیفیدوباکتریوم‌ها مساعد می‌کند. کاهش قابلیت زیستی ب. لاکتیس از روز ۷ تا پایان دوره نگه‌داری ممکن است به دلیل ورود اکسیژن طی نگه‌داری سرد به داخل بسته‌بندی باشد [۲۱]. علاوه بر این، اثرات ضد میکروبی اسیدهای آلی تولید شده طی هفته اول نگه‌داری می‌تواند مسئول کاهش قابلیت زیستی بیفیدباکتریوم‌ها پس از هفته اول باشد. البته ثابت ماندن قابلیت زیستی این گونه در تیمار S-B از روز ۷ تا ۱۴، احتمالاً به دلیل وجود ساکارز در محیط است، که نسبت به تاگاتوز ماده مغذی‌تری برای ب. لاکتیس محسوب می‌شود.

اگرچه ل. اسیدوفیلوس در تیمار T-A سرعت رشد بالاتری نسبت به سایر تیمارها تا روز ۱۴ داشت؛ با این وجود، سرعت مرگ و میر آن نیز بعد از روز ۱۴ نگه‌داری سرد بالاتر بود که این پدیده احتمالاً به دلیل وارد آمدن شوک

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 9:46 +0330 on Saturday October 12th 2019

حاصل از سرعت بالای تخمیر به این میکروارگانیسم است که منجر به کاهش شدید قابلیت زیستی آن بعد از روز ۱۴ نگه‌داری شد [۲۰]. تیمار T-C در بین همه تیمارها در روز ۲۱ نگه‌داری سرد، بیش‌ترین قابلیت زیستی را داشت. Nighswonger و همکاران نیز گزارش کرده‌اند که پایداری ل. کازئی در روزهای ۲۸-۲۱ نگه‌داری سرد در دمای $5^{o}C$-۷، برابر یا بیش‌تر از ل. اسیدوفیلوس است [۲۲]. Gilliland و Lara گزارش کردند که برخی از سلول‌های ل. اسیدوفیلوس که موفق به تشکیل کلنی در محیط کشت شمارش نشده‌اند، هنوز فعالیت β- گالاکتوزیدازی دارند [۲۳]. لاکتوباسیلوس‌ها دارای آنزیم‌های β- گالاکتوزیداز و/ یا β- فسفوگالاکتوزیداز هستند که باعث توانایی این میکروارگانیسم‌ها به استفاده از لاکتوز می‌شوند [۲۴]. بنابراین آنزیم‌های متابولیک حاصل از پروبیوتیک‌های مرده ممکن است توانایی تخمیر سلول‌های زنده باقی‌مانده و سازگار شده را افزایش دهند که منجر به تغییرات بیوشیمیایی بیش‌تر شده و می‌تواند باعث کاهش مداوم و بیش‌تری در قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها شود.

مطابق با جدول ۱، قابلیت زیستی لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیک در تیمارهای شامل D- تاگاتوز بیش‌تر از تیمارهای دارای ساکارز بود ولی بیفیدوباکتریوم‌ها در حضور ساکارز بیش‌ترین قابلیت زیستی را داشتند و احتمالاً آن‌ها قادر به تخمیر D- تاگاتوز نیستند.

اگر تعداد حداقل 10^{7} cfu/ml پروبیوتیک زنده به عنوان سطح استاندارد در نظر گرفته شود، قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها در تمام تیمارها پس از ۲۱ روز نگه‌داری سرد در سطح استاندارد خواهد بود.

مقدار قندهای تیمارها طی نگه‌داری سرد. با توجه به جدول ۲، هیچ تغییر معناداری در مقدار قند تیمارهای غیر پروبیوتیک طی نگه‌داری سرد مشاهده نشد. بنابراین، افزودن میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک مختلف به شیرکاکائو منجر به کاهش معناداری در میزان تمام قندها می‌شود. هم‌چنین نوع گونه پروبیوتیک تلقیح شده در الگوی مصرف قندها طی نگه‌داری سرد مهم است. به طور کلی، ل. اسیدوفیلوس، ل. کازئی و ل. رامنوسوس تمایل بیش‌تری به مصرف قند D- تاگاتوز داشتند. هر دو باکتری ل. اسیدوفیلوس و ل. کازئی به ترتیب تمایل بیش‌تری به مصرف قندهای D- تاگاتوز، لاکتوز و ساکارز را داشتند و کم‌ترین مصرف قند ساکارز در بین همه تیمارها مربوط به تیمار S-C بود. در مقابل Garro و همکاران، شیر سویای تخمیرشده به وسیله ل. فرمنتوم، ل. کازئی، استرپتوکوکوس ترموفیلوس و ب. لانگوم را در دمای سرد $4^{o}C$ بررسی کرده و گزارش کردند که ل. کازئی نسبت به سایر سوش‌ها، سرعت بالایی در مصرف ساکارز طی ۲۸ روز نگه‌داری سرد دارد [۲۵]. البته در مطالعه Garro بر خلاف مطالعه حاضر، قندهای لاکتوز و تاگاتوز در محیط وجود نداشتند، ل. کازئی CRL 207 استفاده شده بود و هم‌چنین ماتریکس شیر سویا با شیرکاکائو متفاوت است.

مطابق با جدول ۲، ل. رامنوسوس به ترتیب، D- تاگاتوز، ساکارز و لاکتوز را بیش‌تر تخمیر کرد و این ترتیب برای ب. لاکتیس به ترتیب ساکارز، لاکتوز و D- تاگاتوز بود و حتی باعث کاهش معناداری در مقدار قند تاگاتوز نشد. این نتایج توسط مطالعات متعددی تأیید شده است. نتایج مطالعه Roy و Ward روی ۲۰ سوش بیفیدوباکتریوم نشان داد که همه سوش‌ها به‌جز ب. بیفیدوم، ساکارز را مصرف می‌کنند ولی هیچ‌کدام توانایی مصرف قند تاگاتوز را ندارند و رشد همه بیفیدوباکتریوم‌ها در حضور لاکتوز بیش‌تر می‌شود [۲۶]. هم‌چنین مطالعه Hoyles و همکاران نیز نشان داد که ب. لاکتیس CCUG 37979T از L- آرابینوز، لاکتوز، مانوز، مالتوز، ملیبیوز، رافینوز، ریبوز، ساکارز و ترهالوز، اسید تولید می‌کند. ولی قادر به تولید اسید از D- آرابیتول، سیکلودکسترین، پلولان، گلیکوژن، مانیتول، متیل β-D- گلوکوپیرانوزید، سوربیتول و تاگاتوز نیست [۲۷]. Bertelsen و همکاران، تخمیر D- تاگاتوز را در ۱۷۴ سوش از باکتری‌هایی که در دستگاه گوارش وجود دارند یا عامل بیماری‌زایی در دستگاه گوارش می‌باشند و هم‌چنین باکتری‌هایی که در محصولات لبنی عامل تولید اسید لاکتیک هستند، به مدت ۴۸ ساعت انکوباسیون بررسی کردند و به این

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 9:46 +0330 on Saturday October 12th 2019

نتیجه رسیدند که شمار کمی از سوش‌های موجود در دستگاه گوارش قادر به تخمیر قند D- تاگاتوز هستند که از آن میان می‌توان به سوش‌های مختلف انتروکوکوس فکالیس، انتروکوکوس فاسیوم و لاکتوباسیلوس اشاره کرد. هم‌چنین اعلام کردند که اکثر باکتری‌های اسید لاکتیک مانند سوش‌های لاکتوباسیلوس، لوکونوستوک و پدیوکوکوس می‌توانند به شدت D- تاگاتوز را تخمیر کنند و سوش‌های انتروکوکوس، استرپتوکوکوس و لاکتوکوکوس نیز با شدت کم‌تری این عمل را انجام می‌دهند. هم‌چنین اشاره کردند که هیچ‌کدام از بیفیدوباکتریوم‌های مورد مطالعه مانند ب لاکتیس BB-12، قادر به تخمیر تاگاتوز نیستند [۲۸]. در مقابل Alander و همکاران گزارش کردند که ب. لاکتیس BB-12 به طور ضعیفی قادر به تخمیر تاگاتوز است [۲۹].

کم‌ترین و بیش‌ترین مصرف کل قند طی ۲۱ روز نگه‌داری سرد را به ترتیب تیمارهای T-B و T-A داشتند. در تیمارهای دارای پروبیوتیک، بیش‌ترین کاهش در مقدار لاکتوز، ساکارز و D- تاگاتوز به ترتیب مربوط به تیمارهای S-A، S-A و T-A بود و کم‌ترین کاهش در مقدار این قندها به ترتیب در تیمارهای S-B و ST-B (به طور مشترک)، S-C و T-B مشاهده شد.

شاخص‌های رنگ تیمارها طی نگه‌داری سرد

همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می شود، تمام تیمارهای دارای پروبیوتیک نسبت به تیمارهای غیر پروبیوتیک مقادیر L-value، b-value و C-value بیش‌تری را در روز ۰ نشان می‌دهند (P<۰/۰۵). بنابراین، تلقیح اولیه پروبیوتیک‌ها در غلظت $۱۰^{۸}$ cfu/ml بر این شاخص‌های رنگ مؤثر است. لازم به ذکر است که سفیدی شیر در نتیجه پراکندگی نور مرئی توسط ذرات معلق (مخصوصاً میسل‌های کازئین) اتفاق می‌افتد [۳۰]. هم‌چنین سلول‌های باکتریایی در غلظت بالا (به عنوان مثال $۱۰^{۷}$ cfu/ml) می‌توانند مانند ذرات پراکنده‌کننده نور عمل کرده و مقدار L-value را افزایش دهند [۳۰]. این نتایج مشابه نتایج Owens و همکاران بود که نشان دادند هر دو شیر تیمار شده با باکتری‌های مختلف (Lactococcus lactis ssp lactis یا Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii) به طور معناداری مقادیر شاخص b بیش‌تری نسبت به شیر بدون چربی دارند که بیانگر یک تغییر رنگ از آبی به زرد است [۳۰]. در مطالعه حاضر، مقادیر شاخص a در تیمارهای تلقیح شده با هر کدام از باکتری‌های پروبیوتیک در مقایسه با تیمارهای غیر پروبیوتیک، یک الگوی خاص را در آغاز نگه‌داری نشان می‌دهند. Owens و همکاران پیشنهاد کردند که ویژگی‌های سلول باکتری (مانند مورفولوژی) ممکن است ویژگی‌های رنگ شیر، و به عبارت بهتر a-value را تحت تاثیر قرار دهند [۳۰].

مقادیر شاخص‌های L، a و b در تیمارهای غیر پروبیوتیک و هم‌چنین تیمارهای دارای ب. لاکتیس طی نگه‌داری ثابت بودند (P>۰/۰۵). مقادیر شاخص‌های L، a و C در تیمارهای تلقیح شده با ل. اسیدوفیلوس طی نگه‌داری افزایش یافتند ولی هیچ تغییری در مقدار b رخ نداد. با این وجود، مقدار شاخص L در نمونه‌های تلقیح شده با ل. کازئی یا ل. رامنوسوس کاهش یافت ولی تغییری در مقادیر شاخص‌های a و b رخ نداد. علت ممکن است pH نهایی مختلف در تیمارهای مختلف طی نگه‌داری باشد. Rankin و Brewer شیرهای بدون چربی تلقیح شده و تخمیر شده (pH=۴/۴) را با شیر بدون چربی، ۲٪ چربی شیر و شیر کامل توسط مقدار رنگ حاصل از روش‌های حسی و دستگاهی مقایسه کرده و نتیجه گرفتند که مقادیر شاخص‌های L و a برای شیرهای بدون چربی تخمیر شده بالاتر از شیرهای بدون چربی بودند اما تخمیر هیچ اثری بر شاخص b نداشت. هم‌چنین ارزیاب‌های حسی آموزش‌دیده، شیر تخمیرشده را سفیدتر از شیر بدون چربی دانستند [۳۱]. Owens و همکاران گزارش کردند که مقدار شاخص L در شیرهای دارای pH ۴/۰ و ۴/۶ بیش‌تر از شیرهای بدون چربی و نمونه‌های دارای pH ۵/۰ و ۶/۰ است. هم‌چنین شیرهای بدون چربی اسیدی شده تا pH ۵/۰ کم‌ترین مقدار شاخص L را نشان دادند [۳۰]. در مطالعه حاضر، pH نهایی نگه‌داری سرد در تمام تیمارهای

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 9:46 +0330 on Saturday October 12th 2019

تلقیح شده با ل. اسیدوفیلوس در حدود ۴/۶ بوده اما در تیمارهای تلقیح شده با ل. کازئی یا ل. رامنوسوس بالای ۵ بود (داده‌ها نشان داده نشده‌اند). میسل‌های کازئین در pH حدود ۴/۶، به نقطه ایزوالکتریک رسیده و در نتیجه به هم می‌چسبند. بنابراین میانگین اندازه ذرات برای تغییر خواص انعکاس نور به اندازه کافی افزایش یافت [۳۲].

کاهش مقدار شاخص L در pH حدود ۵/۰ ممکن است به علت کاهش اندازه ذرات موجود در میسل کازئین تغییریافته باشد. در این pH، بیش‌ترین مقدار فسفات کلسیم کلوئیدی موجود در ساختار میسل کازئین در فاز آبی حل شده که باعث تفکیک زیرواحدهای پروتئینی میسل کازئین در فاز سرم شیر و افزایش تخلخل میسل کازئین می‌شود [۳۳]. Roefs و همکاران گزارش کردند که حداقل اندازه میسل کازئین در ۲/۵pH ناشی از تفکیک چند فراکسیون پروتئینی کازئین از ساختار میسل به دلیل افزایش حلالیت آن‌ها در این pH است [۳۴]. مقادیر هر دو شاخص a و b در تیمارهای دارای ل. کازئی یا ل. رامنوسوس ثابت ماندند و تحت تاثیر انحلال فسفات کلسیم از میسل کازئین در pH ۵/۰ قرار نگرفتند. با این وجود، مقدار شاخص a در تیمار دارای ل. اسیدوفیلوس افزایش یافت که احتمالاً به دلیل چسبندگی میسل‌های کازئین در pH نزدیک به نقطه ایزوالکتریک ۴/۶ است. این نتایج با یافته‌های Owens و همکاران در تضاد بود [۳۰].

نسبت ساکارز به D- تاگاتوز هیچ اثر منفردی روی شاخص‌های رنگ طی نگه‌داری سرد نشان نداد و اثرات آن با اثر نوع پروبیوتیک‌های تلقیح شده مشترک بود. با توجه به جدول ۳، تیمار تلقیح شده با ل. اسیدوفیلوس، ل. کازئی، ل. رامنوسوس، ب. لاکتیس و تیمارهای غیر پروبیوتیک به ترتیب بیش‌ترین تا کم‌ترین مقدار شاخص ΔE را داشتند.

همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده شده است، شاخص‌های L و a نسبت به شاخص b تغییرات بیش‌تری طی نگه‌داری داشتند. ارزیابی هم‌زمان شاخص‌های L و a را می‌توان با نمودار روشنایی- قرمزی انجام داد. شکل ۱ موقعیت فضایی نسبی تیمارهای مختلف را روی نمودار روشنایی- قرمزی در آغاز و پایان دوره نگه‌داری سرد نشان می‌دهد. بررسی داده‌ها به این روش (شکل ۱) موقعیت‌های فضایی نسبی نمونه‌های شیرکاکائو را از نظر رنگ مشخص می‌کند که در آن اندازه بردار نشان‌دهنده تغییرات در مقادیر شاخص‌های L و a طی نگه‌داری است. بنابراین تیمارهای تلقیح شده با ل. اسیدوفیلوس بیش‌ترین تغییرات را در هر دو شاخص L و a طی نگه‌داری داشتند.

نتایج این مطالعه نشان داد که نوع سوش‌های پروبیوتیک و جایگزینی ساکارز با D- تاگاتوز اثر معناداری ($P<0/05$) بر قابلیت زیستی باکتری‌های پروبیوتیک و هم‌چنین ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی شیرکاکائو طی ۲۱ روز نگه‌داری سرد داشت. تیمارهای تلقیح شده با ل. اسیدوفیلوس، ل. کازئی، ل. رامنوسوس و ب. لاکتیس و هم‌چنین تیمارهای غیر پروبیوتیک به ترتیب بیش‌ترین تا کم‌ترین تغییرات را در مقادیر ΔE داشتند. بیش‌ترین قابلیت زیستی طی نگه‌داری مربوط به تیمار دارای D- تاگاتوز و ل. اسیدوفیلوس (T-A) در روز ۱۴ نگه‌داری و پس از آن، تیمارهای دارای D- تاگاتوز و ل. کازئی (T-C) و هم‌چنین D- تاگاتوز و ل. رامنوسوس (T-R) در روز ۲۱ بود. اگر چه ل. اسیدوفیلوس، ل. کازئی و ل. رامنوسوس بیش‌تر تمایل به تخمیر D- تاگاتوز داشتند، ولی ب. لاکتیس قادر به مصرف آن نبود. امید است در آینده تحقیقات تکمیلی با استفاده از گونه‌ها و سوش‌های دیگر پروبیوتیک و هم‌چنین شیرین‌کننده‌های کم‌کالری و/یا پری‌بیوتیک انجام شود.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور به دلیل حمایت‌های مالی، صمیمانه قدردانی می‌شود. این مقاله از پایان‌نامه دانشجویی مقطع کارشناسی ارشد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی استخراج شده است.

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 9:46 +0330 on Saturday October 12th 2019

منابع

[1] Menrad K. Market and marketing of functional food in Europe. J Food Eng 2003; 56: 181-188.

[2] Shah NP. Functional cultures and health benefits. Int Dairy J 2007; 17: 1262-1277.

[3] Gueimonde M, Delgado S, Mayo B, Ruas-Madiedo P, Margolles A, de los Reyes-Gavilan CG. Viability and diversity of probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium populations included in commercial fermented milks. Food Res Int 2004; 37: 839-850.

[4] Shin HS, Lee JH, Pestka J, Ustunol Z. Growth and viability of commercial Bifidobacterium spp in skim milk containing oligosaccharides and inulin. J Food Sci 2000; 65: 884-887.

[5] Yanes M, Duran L, Costell E. Rheological and optical properties of commercial chocolate milk beverages. J Food Eng 2002; 51: 229-234.

[6] Mortazavian A, Khosrokhavar R, Rastegar H, Mortazaei G. Effects of dry matter standardization order on biochemical and microbiological characteristics of freshly made probiotic Doogh (Iranian fermented milk drink). Ital J Food Sci 2010; 22: 98-104.

[7] IDF. General standard of identity for fermented milks. Int Dairy Fed 1992; 163: 1-4.

[8] Ferdousi R, Rouhi M, Mohammadi R, Mortazavian AM, Khosravi-Darani K, Homayouni Rad A. Evaluation of probiotic survivability in yogurt exposed to cold chain interruption. Iran J Pharm Res 2013; 12: 137-142.

[9] Mortazavian AM, Sohrabvandi S. Probiotics and probiotic food products; based on probiotic dairy products. Eta. Tehran. 2006 (Persian).

[10] Tamime AY, SarrelaM, Sondergaard AK, Mistry VV, Shah NP. Production and maintenance of viability of probiotic microorganisms in dairy products. In: Tamime AY, editor. Probiotic Dairy Products. Blackwell Publishing Ltd, Uk; 2005: 39-72.

[11] Talwalkar A, Kailasapathy KA review of oxygen toxicity in probiotic yogurts: Influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques. Compr Rev Food Sci Food Saf 2004; 3: 117-124.

[12] Vinderola CG, Mocchiutti PJ, Reinheimer A. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. J Dairy Sci 2002; 85: 721-772.

[13] Levin GV. Tagatose, the new GRAS sweetener and health product. J Med Food 2002; 5: 23-36.

[14] FDA. Food labeling: health claims; D-tagatose and dental caries. final rule. food and drug administration, department of health and human services (HHS), federal register 68: 39831-39833. http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2003-07-03/html/03-16949.htm. Accessed 21 Mar 2014.

[15] Kim P. Current studies on biological tagatose production using L-arabinose isomerase: a review and future perspective. Appl Microbiol Biotechnol 2004; 65: 243-249.

[16] Moore MC. Drug evaluation: tagatose in the treatment of type 2 diabetes and obesity. Curr Opin Investig Drugs 2006; 7: 924-935.

[17] Mortazavian AM, Ehsani MR, Sohrabvandi S and Reinheimery. MRS-bile agar: Its suitability for the enumeration of mixed probiotic cultures in cultured dairy products. Michwissenschaft 2007; 62: 270-272.

[18] Sohrabvandi S, Mortazavian AM, Dolatkhahnejad MR, Monfared A. Suitability of MRS-bile agar for the selective enumeration of mixed probiotic bacteria in presence of mesophilic lactic acid cultures and yoghurt bacteria. Iran J Biotechnol 2012; 10: 16-21.

[19] Bogdanov S, Baumann E. Bestimmung von Honigzucker mit HPLC. Mitt Geb Lebensm Unters Hyg 1988; 79: 198-206.

[20] Ventura M, Margolles A, Turroni F, Zomer A, Clara G, van Sinderen D. Stress Responses of Bifidobacteria. In: Tsakalidou E, Papadimitriou K, editors. Stress Responses of Lactic Acid Bacteria. Springer, New York; 2011: 323-347.

[21] Lankaputhra W, Shah N, Britz M. Survival of bifidobacteria during refrigerated storage in the presence of acid and hydrogen peroxide. Milchwissenschaft 1996; 51: 65-69.

[22] Nighswonger AD, Brashears MM, Gilliland SE. Viability of Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei in fermented milk products during refrigerated storage. J Dairy Sci 1996; 79: 212-219.

[23] Gilliland S, Lara R. Influence of storage at freezing and subsequent refrigeration temperatures on β-galactosidase activity of Lactobacillus acidophilus. Appl Environ Microbiol 1988; 54: 898-902.

[24] Premi L, Sandine W, Elliker P. Lactose-hydrolyzing enzymes of Lactobacillus species. Appl Microbiol 1972; 24: 51-57.

[25] Garro MS, de Valdez GF, Oliver G, de Giori GS. Starter culture activity in refrigerated fermented soymilk. J Food Prot 1999; 62: 808-810.

[26] Roy D, Ward P. Evaluation of rapid methods for differentiation of Bifidobacterium species. J Appl Bacteriol 1990; 69: 739-749.

[27] Hoyles L, Inganas E, Falsen E, Drancourt M, Weiss N, McCartney AL, Collins MD. Bifidobacterium scardovii sp. nov., from human sources. Int J Syst Evol Microbiol 2002; 52: 995-999.

[28] Bertelsen H, Andersen H, Tvede M. Fermentation of D-tagatose by human intestinal bacteria and dairy lactic acid bacteria. Microb Ecol Health Dis 2001; 13: 87-95.

[29] Alander M, Matto J, Kneifel W, Johansson M, Kogler B, Crittenden R, Mattila-Sandholm T, Saarela M. Effect of galacto-oligosaccharide supplementation on human faecal microflora and on survival and persistence of Bifidobacterium lactis Bb-12 in the gastrointestinal tract. Int Dairy J 2001; 11: 817-825.

[30] Owens S, Brewer J, Rankin S. Influence of bacterial cell population and pH on the color of nonfat milk. LWT-Food Sci Technol 2001; 34: 329-333.

[31] Rankin SA, Brewer JL. Color of nonfat fluid milk as affected by fermentation. J Food Sci 1998; 63: 178-180.

[32] Walstra P. On the stability of casein micelles. J Dairy Sci 1990; 73: 1965-1979.

[33] Guinee T, Pudja P, Farkye N. Fresh acid-curd cheese varieties. In: Fox P, editor. Cheese: chemistry, physics and microbiology. 2nd ed. Springer, London; 1993: 363-419.

[34] Roefs S, Walstra P, Dalgleish D, Horne D. Preliminary note on the change in casein micelles caused by acidification [skim milk]. Neth Milk Dairy J 1985; 39: 119-122.

Sucrose and D-tagatose fermentation profile by different probiotic strains and its effect on physical properties of chocolate milk

Milad Rouhi (M.Sc)[1,7], Aghdas Taslimi (M.Sc)[2], Zahra Sarlak (M.Sc)[3], Reza Mohammadi (Ph.D)[4], Mahdi Shadnoosh (Ph.D)[5], Amir Mohammad Mortazavian (Ph.D)[2], Samad Sabouri (Ph.D)[6]

1 - Dept. of Food Science, Engineering and Technology, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

2 - Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Nutrition and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3 - Dept. of Food Hygiene and Quality Control, School of Nutrition and Food Sciences, Nutrition and Food Sciences Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

4 - Students' Research Committee, Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5 – Dept. of Nutrition, School of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran, and Dept of Clinical Nutrition, Faculty of Nutrition and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

6 - Rice Research Institute of Iran, Rasht, Guilan, Iran

7 - Research, Development and quality, ETKA Organization, Tehran, Iran

(Received: 8 Feb 2015; Accepted: 17 Mar 2015)

Introduction: Chocolate milk is one of the most popular non-fermented dairy products, while, due to its higher sugar content than white milk, it has been lately criticized for its contribution to diabetes, child obesity and tooth decay. Therefore, our aim in this study was to investigate the substitution of D-tagatose with sucrose in chocolate milk product and if it can be also a probiotic carrier.

Materials and Methods: We studied the effects of different ratios of the sucrose/D-tagatose (100:0, 0:100 or 50:50) as well as the type of probiotic culture (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus* or *B. lactis*) on the microbiological characteristics (by MRS agar medium) of the chocolate milk. Also, the percentage of the sugar residue (by HPLC) and color properties (by Hunter Lab colorimeter) of the synbiotic chocolate milk were studied at (5°C) during 21 days. The control samples were not incubated with probiotics.

Results: The greatest vitality rate at the end of storage was related to the treatment of *L. rhamnosus* (T-R) and *L. casei* (T-C) with D-tagatose. Both *L. acidophilus* and *L. casei* showed high inclination for D-tagatose, lactose and sucrose fermentation, respectively. However, *L. rhamnosus* mostly fermented D-tagatose, sucrose and lactose, respectively, while, this order for *B. lacti* was sucrose, lactose and D-tagatose. *B. lactis* did not significantly consumed D-tagatose. The treatments inoculated with *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus* and *B. lactis*, orderly showed significant higher color changes in compare to non-probiotic ones.

Discussion: D-tagatose as a natural sugar may make a suitable substitute for sucrose in chocolate milk, while preserving the functional probiotic properties; enhances the health benefits of dairy chocolate milk products. Nevertheless, the right selection of sucrose/D-tagatose ratio and type of probiotic strain has high importance in probiotic biological sustainability and the quality of the final product.

Key words: Fermentation, Low-calorie, Milk, Probiotics, Sucrose, Tagatose

⁕ Corresponding author. Tel: +98 21 22376426

mortazvn@sbmu.ac.ir

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 9:46 +0330 on Saturday October 12th 2019