مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال دهم، شماره 2، تابستان 1394، صفحات 58-47

بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی، میکروبیولوژی و حسی شیرکاکائوی سین‌بیوتیک

میلاد روحی[1]، رضا محمدی[2]، زهرا سرلک[3]، اقدس تسلیمی[4]، مریم ذبیح‌زاده[2]، سید امیرمحمد مرتضویان[5]

1- دانشجوی دکترای تخصصی علوم، مهندسی و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

2- کمیته تحقیقات دانشجویان، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

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

4- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

5- نویسنده مسئول: دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، پست الکترونیک: mortazvn@sbmu.ac.ir

تاریخ دریافت: 93/11/5 تاریخ پذیرش: 94/2/15

چکیده

سابقه و هدف: شیرکاکائو یکی از پرطرفدارترین و پرمصرف‌ترین محصولات لبنی غیر تخمیری است ولی به دلیل 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 شیرکاکائو به عنوان حامل پروبیوتیک‌ها، می‌توان بر خواص فراویژه این محصول افزود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، اثر متغیرهای نسبت قند ساکارز به تاگاتوز (100:0، 50:50 و 0:100) و نوع کشت پروبیوتیک (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*) بر ویژگی‌های بیوشیمیایی، میکروبیولوژیک و حسی شیرکاکائوی سین‌بیوتیک طی 21 روز نگهداری در 5°C مورد بررسی قرار گرفت. تیمارهای بدون تلقیح پروبیوتیک به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها: تیمارهای دارای *ل. اسیدوفیلوس*، *ل. کازئی*، *ل. رامنوسوس* و *ب. لاکتیس* به طور معنی‌داری تغییرات بیشتری در خواص بیوشیمیایی در مقایسه با تیمارهای غیر پروبیوتیک داشتند (P<0/05). بیشترین قابلیت زیستی در پایان دوره نگهداری یخچالی مربوط به تیمار های T-R (تیمار دارای قند D-تاگاتوز و *ل. رامنوسوس*) و T-C (تیمار دارای قند D-تاگاتوز و *ل. کازئی*) بود. همچنین قند D-تاگاتوز نسبت به ساکارز، قابلیت زیستی لاکتوباسیلوس‌ها را بیشتر بهبود بخشید. با این وجود، قابلیت زیستی *ب. لاکتیس* به طور قابل توجهی در محیط حاوی قند ساکارز نسبت به D-تاگاتوز بهتر بود. به طور کلی بهترین تیمار ها (از نظر قابلیت زیستی، ارزیابی حسی و خواص عملکردی قند تاگاتوز) در این مطالعه، تیمار های T-R، ST-R (تیمار دارای قند D-تاگاتوز و ساکارز به همراه *ل. رامنوسوس*)، T-B (تیمار دارای قند D-تاگاتوز و *ب. لاکتیس*) و ST-B (تیمار دارای قند D-تاگاتوز و ساکارز به همراه *ب. لاکتیس*) بودند.

نتیجه‌گیری: استفاده از D-تاگاتوز به عنوان یک قند طبیعی با خواص فراویژه و جایگزین مناسب ساکارز در شیرکاکائوی پروبیوتیک، سلامت-بخشی این فرآورده را افزایش می‌دهد. اما نسبت قند ساکارز به تاگاتوز و همچنین نوع سوش پروبیوتیک مورد استفاده اهمیت زیادی در کیفیت نهایی محصول دارند.

واژگان کلیدی: شیرکاکائو، D-تاگاتوز، کم‌کالری، پروبیوتیک و سین‌بیوتیک

• مقدمه

امروزه نه تنها تأمین مواد مغذی و نیاز های پروتئینی، ویتامینی، کالریک و مواد معدنی اهمیت دارد، بلکه جنبه های دارویی (پیشگیری‌کننده و درمانی) مواد غذایی نیز مورد توجه است. این موضوع سبب افزایش پذیرش و مصرف غذاهای فراسودمند شده است (1). 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 (2). 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 (4، 3).

شیرهای غیر تخمیری طعم‌دار پروبیوتیک، به دلیل تنوع در خواص حسی، مصرف روزافزون و همچنین ارزش تغذیه‌ای مطلوب، امروزه برای استفاده به عنوان حامل میکروارگانیسم-های پروبیوتیک، مورد توجه قرار گرفته‌اند (4). شیرکاکائو مطلوب‌ترین شیر طعم‌دار است که در مقیاس جهانی در زمره پرطرفدارترین و پرمصرف‌ترین محصولات لبنی غیر تخمیری قرار دارد (5). 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 فرآورده های پروبیوتیک است (6). برخورداری از اثرات سلامت‌بخش این میکروارگانیسم‌ها به قابلیت زیستی آن‌ها در فرآورده‌های غذایی، یعنی حداقل تعداد سلول‌های زنده 10^7cfu/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 (8، 7). 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، تقویت-کننده‌ها 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 (11- 9). یکی از راه‌های جلوگیری از تخمیر پروبیوتیک‌های تلقیح‌شده در فرآورده، نگهداری محصول در دماهای پایین است و مناسب‌ترین دمای نگهداری یخچالی برای جلوگیری از تخمیر، در گونه‌های مختلف پروبیوتیک، متفاوت است. بنابراین نوع گونه پروبیوتیک و دمای نگهداری یخچالی از عوامل با اهمیت به شمار می‌آیند (10، 9). 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 (12) 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 مصرف کننده برساند.

علاوه بر این، می‌توان با استفاده از قندهای رژیمی و پری‌بیوتیک جایگزین ساکارز (مانند D-تاگاتوز)، مصرف این محصول توسط افراد دیابتی و افراد تحت رژیم درمانی را نیز افزایش داد (13). لازم به ذکر است که پری‌بیوتیک‌ها ترکیباتی هستند که در برابر آنزیم‌های روده‌ای هضم ناپذیر یا اندک- هضم می‌باشند تا دست‌نخورده یا با شکست پاره‌ای در محیط روده در دسترس پروبیوتیک‌ها قرار گیرند و به طور انتخابی به مصرف آن‌ها برسند (9). شیرینی نسبی D-تاگاتوز در محلول 10% قند، 92% است. مزه آن نیز مشابه ساکارز بوده ولی انرژی‌زایی بسیار پایینی دارد. D-تاگاتوز شیرین‌کننده‌ای کم‌کالری، آنتی‌پلاک، بدون پس‌طعم، بدون اثر بر نمایه گلیسمی و افزایش‌دهنده طعم است (16-14).

در این تحقیق، اثر افزودن 4 گونه پروبیوتیک (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*) و نسبت قند ساکارز به تاگاتوز (100:0، 0:100 و 50:50) بر ویژگی‌های بیوشیمیایی، میکروبیولوژیک و حسی شیرکاکائوی سین‌بیوتیک طی 21 روز نگهداری یخچالی در 5°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 15%، کاکائو 1% و کاراگینان 0/03%)، درصد قند های مختلف (6/5% ساکارز، 7/06% تاگاتوز و 3/25% ساکارز + 3/53% تاگاتوز) به شیرکاکائو افزوده شد (از آنجا که ساکارز در شیرکاکائو به مقدار 6/5% استفاده می‌شود و شیرینی نسبی *D-تاگاتوز*، 92% شیرینی نسبی ساکارز است؛ بنابراین برای جایگزین کردن ساکارز به 7/06% *D-تاگاتوز* نیاز است تا شیرینی برابر با 6/5% ساکارز ایجاد کند). سپس فرایند حرارتی (90°C به مدت زمان 15 دقیقه) انجام شد. بعد از

فرایند حرارتی، شیرکاکائو وارد مرحله هموژنیزاسیون شده و پس از سرد کردن سریع شیرکاکائو تا 15°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 10^8cfu/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 5°C نگهداری یخچالی شدند. نمونه‌ها بلافاصله پس از رسیدن به دمای یخچالی (0 روز) و همچنین در روز های 7، 14 و 21 نگهداری یخچالی 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 0:100 (فقط تاگاتوز)، S: شیرکاکائوی دارای نسبت ساکارز به تاگاتوز 100:0 (فقط ساکارز) و ST: شیرکاکائوی دارای نسبت ساکارز به تاگاتوز 50:50) 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 37°C به مدت زمان حداقل 72 ساعت گرمخانه‌گذاری شدند (18، 17). شرایط بی‌هوازی با کاربرد جار بی‌هوازی و گازپک تیپ A ایجاد شد.

اندازه‌گیری شاخص های بیوشیمیایی: pH و پتانسیل احیای نمونه‌ها طی نگهداری یخچالی با استفاده از pH متر مجهز به الکترود پلاتین اندازه‌گیری شد.

برای اندازه‌گیری اسیدیته قابل تیتر، 10 میلی لیتر از نمونه با 40 میلی لیتر آب مقطر در ارلن مایر مخلوط شد و با سود 0/1 نرمال در حضور معرف فنل فتالئین تیتر شد و مقدار این شاخص بر حسب درجه دُرنیک محاسبه شد (6).

همچنین پارامتر های سرعت میانگین افت pH، سرعت میانگین افزایش اسیدیته، سرعت میانگین افزایش پتانسیل احیا و محدوده زمانی بیشترین افت pH در نمونه ها طی نگهداری یخچالی محاسبه شد (19، 6):

سرعت میانگین افت pH (واحد pH/ روز) = مقدار کاهش واحد pH تا دو رقم اعشار / مدت‌زمان (روز)

سرعت میانگین افزایش پتانسیل احیا (میلی‌ولت/ روز) = مقدار افزایش پتانسیل احیا تا یک رقم اعشار / مدت زمان (روز)

سرعت میانگین افزایش اسیدیته قابل تیتر (درجه دُرنیک/ روز) = مقدار افزایش اسیدیته قابل تیتر تا یک رقم اعشار/ زمان (روز)

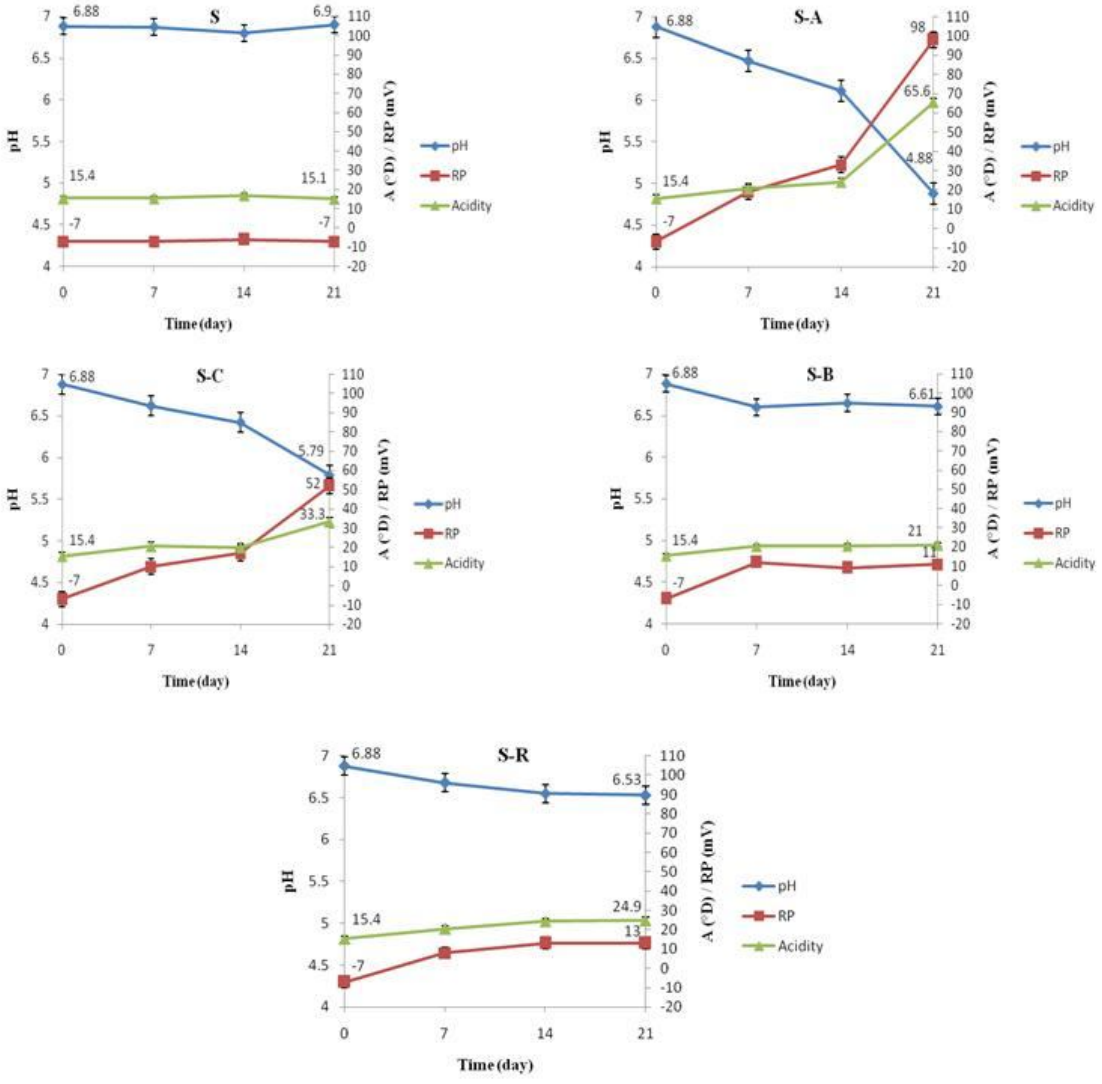
محدوده زمانی بیشترین افت pH، فواصل زمانی 7 روزه طی نگهداری یخچالی است که در آن بیشترین افت pH مشاهده شد.

ارزیابی حسی نمونه‌ها: نمونه‌های شیرکاکائو با استفاده از روش امتیازبندی مورد ارزیابی قرار گرفتند و ویژگی‌های حسی شیرکاکائو شامل طعم (مزه و بو)، احساس دهانی (لطافت، یکنواختی یا همگن بودن، گرانروی دهانی و دهان‌پوشی) و ظاهر (رنگ و دو فاز شدن) توسط 12 ارزیاب آموزش‌دیده و آشنا به شاخص‌های حسی لبنیات، بررسی شدند. امتیازدهی به شیوه مقیاس 5 نقطه‌ای شامل غیر قابل مصرف=0، غیر قابل قبول= 1، قابل قبول= 2، مطلوب= 3 و عالی= 4 انجام شد. به هر نمونه به صورت تصادفی یک کد سه رقمی داده شد و نمونه‌ها به صورت تصادفی در اختیار ارزیاب‌ها قرار گرفتند. ضرایب 6 برای میانگین طعم، 3/5 برای میانگین احساس دهانی و 2 برای میانگین ظاهر به منظور محاسبه امتیاز نهایی با استفاده از میانگین وزنی در نظر گرفته شده است (20).

روش‌های تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: این پژوهش بر اساس طرح فاکتوریل کامل (طرح کاملاً تصادفی 5×3) طراحی شد. به این صورت که 3 سطح برای متغیر مستقل نوع ترکیب قند (نسبت قند ساکارز به تاگاتوز 100:0، 0:100 یا 50:50) و 5 سطح برای متغیر مستقل نوع کشت پروبیوتیک (*ل. اسیدوفیلوس*، *ل. کازئی*، *ل. رامنوسوس*، *ب. لاکتیس* و تیمارهای بدون پروبیوتیک) مورد بررسی قرار گرفتند. بنابراین 15 تیمار (5×3) تهیه شد و تمامی تیمارها در 3 تکرار انجام شدند. بنابراین 45 نمونه (15×3) تهیه شد. همچنین تحلیل واریانس دو طرفه و آزمون دانکن (در سطح معنی‌داری 0/05) برای تجزیه و تحلیل آماری داده ها برای یافتن تفاوت معنی‌دار میان میانگین داده ها با استفاده از نرم افزار $SPSS_{16}$ انجام شد. تمامی نمودارها با استفاده از نرم افزار $Excel_{2007}$ رسم شده‌اند.

• یافته‌ها

ویژگی‌های بیوشیمیایی تیمارها طی نگهداری یخچالی: شکل‌های 1a-c و جدول 1 به ترتیب روند تغییرات و شاخص‌های بیوشیمیایی را در تیمارهای مختلف طی 21 روز نگهداری یخچالی نشان می‌دهند. مطابق با شکل‌های 1a-c و جدول 1، بررسی اثر نوع کشت پروبیوتیک بر شاخص‌های بیوشیمیایی طی نگهداری یخچالی نشان داد که بیشترین سرعت میانگین تغییرات بیوشیمیایی در میان تیمارهای با نسبت اولیه ساکارز به تاگاتوز 100:0 طی 21 روز نگهداری یخچالی، به طور معنی‌داری مربوط به تیمار S-A و در میان تیمارهای با نسبت اولیه ساکارز به تاگاتوز 0:100، به طور معنی‌داری مربوط به تیمار T-A بود. همچنین در تیمارهای با نسبت اولیه ساکارز به تاگاتوز 50:50، بیشترین و کمترین مقدار افت pH، افزایش اسیدیته قابل تیتر و افزایش پتانسیل احیا در پایان 21 روز نگهداری یخچالی به ترتیب مربوط به تیمار های ST-A و ST بود ($P<0/05$).



شکل 1a . تغییرات pH، اسیدیته قابل تیتر و پتانسیل احیا در تیمارهای حاوی ساکارز طی دوره نگهداری یخچالی (S= فقط ساکارز، A= *ل. اسیدوفیلوس*، C= *ل. کازئی*، R= *ل. رامنوسوس* و B= *ب. لاکتیس*)

جدول 1. شاخص‌های بیوشیمیایی تیمارهای مختلف طی دوره نگهداری یخچالی*

تیمار**	شاخص ها: سرعت میانگین افت pH (1/ روز)	سرعت میانگین افزایش اسیدیته قابل تیتر (درجه دورنیک/ روز)	سرعت میانگین افزایش پتانسیل احیا (میلی ولت/ روز)	زمان اوج تخمیر (روز)	اسیدیته قابل تیتر اولیه (°D) روز صفر	اسیدیته قابل تیتر نهایی (°D) روز 21
S	0/000[j]	0/00[k]	0/00[l]	-	15/4[a]	15/1[g]
T	0/000[j]	0/00[k]	0/00[l]	-	16/3[a]	14/4[g]
ST	0/000[j]	0/00[k]	0/00[l]	-	15/6[a]	15/5[g]
S-A	0/095[b]	2/39[b]	5/00[b]	14-21	15/4[a]	65/6[b]
T-A	0/099[a]	2/56[a]	5/42[a]	14-21	16/3[a]	70/2[a]
ST-A	0/094[b]	2/35[c]	4/90[c]	14-21	15/6[a]	65/0[b]
S-C	0/051[d]	0/85[e]	2/80[e]	14-21	15/4[a]	33/3[d]
T-C	0/054[c]	1/02[d]	3/23[d]	14-21	16/3[a]	37/8[c]
ST-C	0/050[d]	0/83[e]	2/76[e]	14-21	15/6[a]	33/2[d]
S-R	0/016[g]	0/45[g]	0/95[h]	0-7	15/4[a]	24/9[e]
T-R	0/025[e]	0/53[f]	1/61[f]	0-7	16/3[a]	27/6[e]
ST-R	0/019[f]	0/44[g]	1/04[g]	0-7	15/6[a]	25/0[e]
S-B	0/012[h]	0/26[h]	0/85[i]	0-7	15/4[a]	21/0[f]
T-B	0/002[i]	0/12[j]	0/23[k]	0-7	16/3[a]	18/9[f]
ST-B	0/010[h]	0/16[i]	0/52[j]	0-7	15/6[a]	19/1[f]

* میانگین‌هایی که در یک ستون با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند، به طور معنی‌دار با یکدیگر متفاوتند ($P<0/05$)

** S= فقط ساکارز، T= فقط تاگاتوز، ST= ساکارز و تاگاتوز به نسبت 50:50، A= *ل. اسیدوفیلوس*، C= *ل. کازئی*، R= *ل. رامنوسوس* و B= *ب. لاکتیس*

قابل ذکر است که اوج تغییرات بیوشیمیایی طی 21 روز نگهداری یخچالی نیز برای هر تیمار، در محدوده‌های زمانی متفاوتی بود، به این ترتیب که تیمارهای دارای *ل. اسیدوفیلوس* و *ل. کازئی*، در محدوده زمانی 21-14 روز و تیمارهای دارای *ل. رامنوسوس* و *ب. لاکتیس* در محدوده زمانی 7-0 روز از نگهداری یخچالی، بیشترین تغییرات بیوشیمیایی را در همه شاخص‌های pH، اسیدیته قابل تیتر و پتانسیل احیا نشان دادند.

با توجه به شکل های 1a-c و جدول 1، برای همه تیمار های بدون پروبیوتیک، یعنی تیمار های S، T و ST، هیچ گونه تفاوت معنی‌داری در شاخص‌های بیوشیمیایی مشاهده نشد ($P>0/05$). همچنین در بررسی اثر نسبت قند ساکارز به تاگاتوز بر شاخص‌های بیوشیمیایی طی نگهداری یخچالی، بیشترین سرعت میانگین تغییرات بیوشیمیایی در میان تیمارهای دارای *ل. اسیدوفیلوس* طی 21 روز نگهداری یخچالی به طور معنی‌داری مربوط به تیمار T-A، در تیمار های دارای *ل. کازئی* مربوط به تیمار T-C و در تیمار های دارای *ل. رامنوسوس* مربوط به تیمار T-R بود. ولی بیشترین و کمترین مقدار افت pH، افزایش اسیدیته قابل تیتر و افزایش پتانسیل احیا در پایان 21 روز نگهداری یخچالی در بین تیمار های دارای *ب. لاکتیس* به ترتیب مربوط به تیمار های S-B و T-B بود ($P<0/05$).

به طور کلی در بین همه تیمار ها، تیمار های T-A و T-B (صرف نظر از تیمار های بدون پروبیوتیک) به ترتیب بیشترین و کمترین تغییرات در خواص بیوشیمیایی را طی 21 روز نگهداری یخچالی پدید آوردند ($P<0/05$).

قابلیت زیستی پروبیوتیک ها طی نگهداری یخچالی:

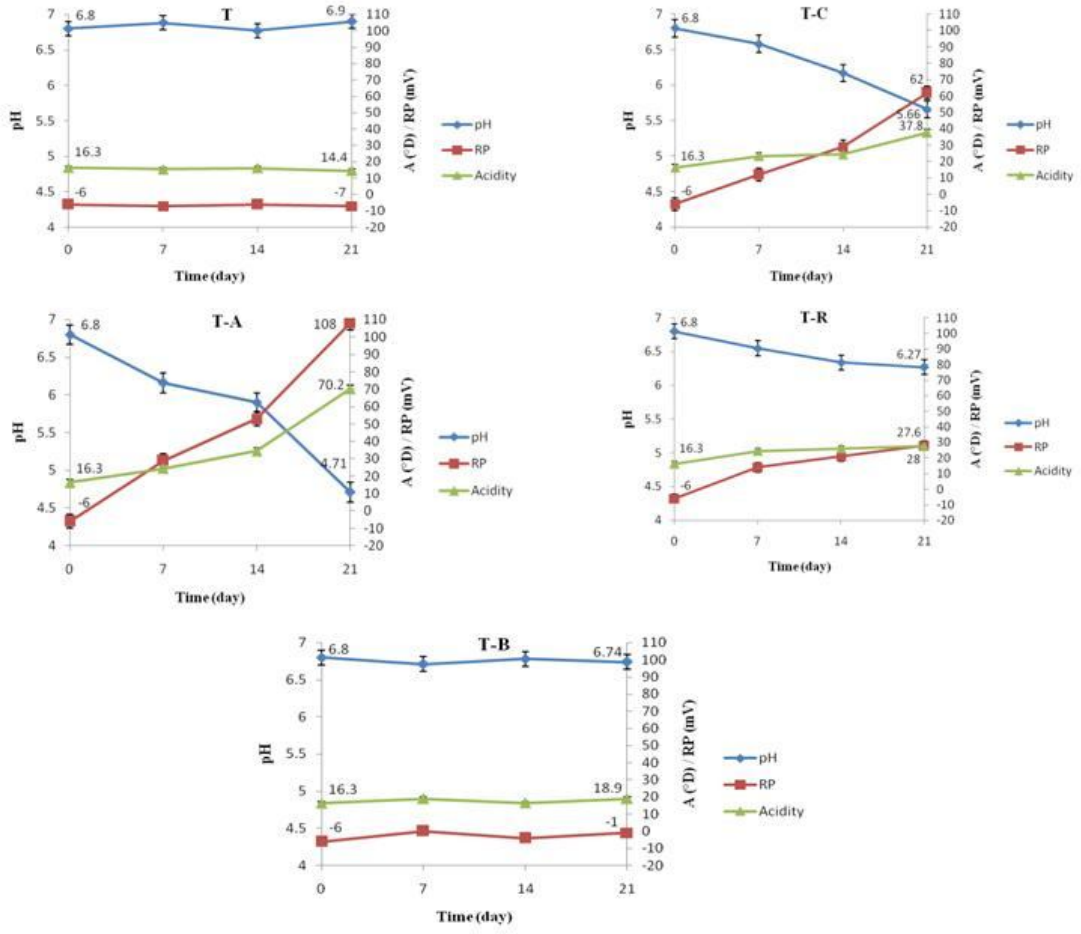
جدول 2 قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها را در تیمارهای مختلف طی 21 روز نگهداری یخچالی نشان می‌دهد. با توجه به جدول 2، قابلیت زیستی در تیمار های دارای *ل. اسیدوفیلوس* و *ل. کازئی*، تا روز 14 نگهداری افزایش و سپس تا روز 21 نگهداری یخچالی کاهش داشت. ولی در تیمار های دارای *ل. رامنوسوس*، بیشترین قابلیت زیستی به طور مشترک (بدون تفاوت معنی‌دار) در روز های 14 و 21 مشاهده شد. همچنین در تیمار های دارای بیفیدوباکتریوم، در دو تیمار T-B و ST-B، قابلیت زیستی بعد از روز 7 نگهداری یخچالی کاهش داشت، ولی در تیمار S-B، قابلیت زیستی روز 7 و 14 نگهداری یخچالی تفاوت معنی‌داری نداشت و سپس تا روز 21 نگهداری یخچالی کاهش یافت ($P<0/05$).

جدول2، قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها در تیمارهای مختلف طی دوره نگهداری یخچالی*

تیمار**	قابلیت زیستی (log cfu/mL)			
	روز صفر	روز 7	روز 14	روز 21
S-A	$8/02^{aD}$	$9/49^{bB}$	$9/97^{dA}$	$8/92^{cC}$
T-A	$8/02^{aD}$	$9/89^{aB}$	$10/93^{aA}$	$9/04^{bC}$
ST-A	$8/00^{aD}$	$9/51^{bB}$	$10/66^{cA}$	$8/94^{cC}$
S-C	$8/01^{aD}$	$8/88^{deC}$	$9/54^{eA}$	$8/99^{bB}$
T-C	$7/98^{aD}$	$9/85^{aB}$	$10/83^{bA}$	$9/23^{aC}$
ST-C	$8/02^{aD}$	$9/36^{cB}$	$9/99^{dA}$	$8/86^{cdC}$
S-R	$7/99^{aC}$	$8/49^{fgB}$	$8/75^{hiA}$	$8/79^{dA}$
T-R	$8/02^{aD}$	$8/85^{eC}$	$9/32^{fA}$	$9/27^{aAB}$
ST-R	$8/01^{aC}$	$8/55^{fB}$	$8/81^{hA}$	$8/82^{dA}$
S-B	$7/99^{aB}$	$8/97^{dA}$	$8/95^{gA}$	$7/47^{eC}$
T-B	$7/98^{aB}$	$8/44^{gA}$	$7/78^{kC}$	$6/89^{gD}$
ST-B	$8/00^{aC}$	$8/95^{dA}$	$8/51^{iB}$	$7/36^{fD}$

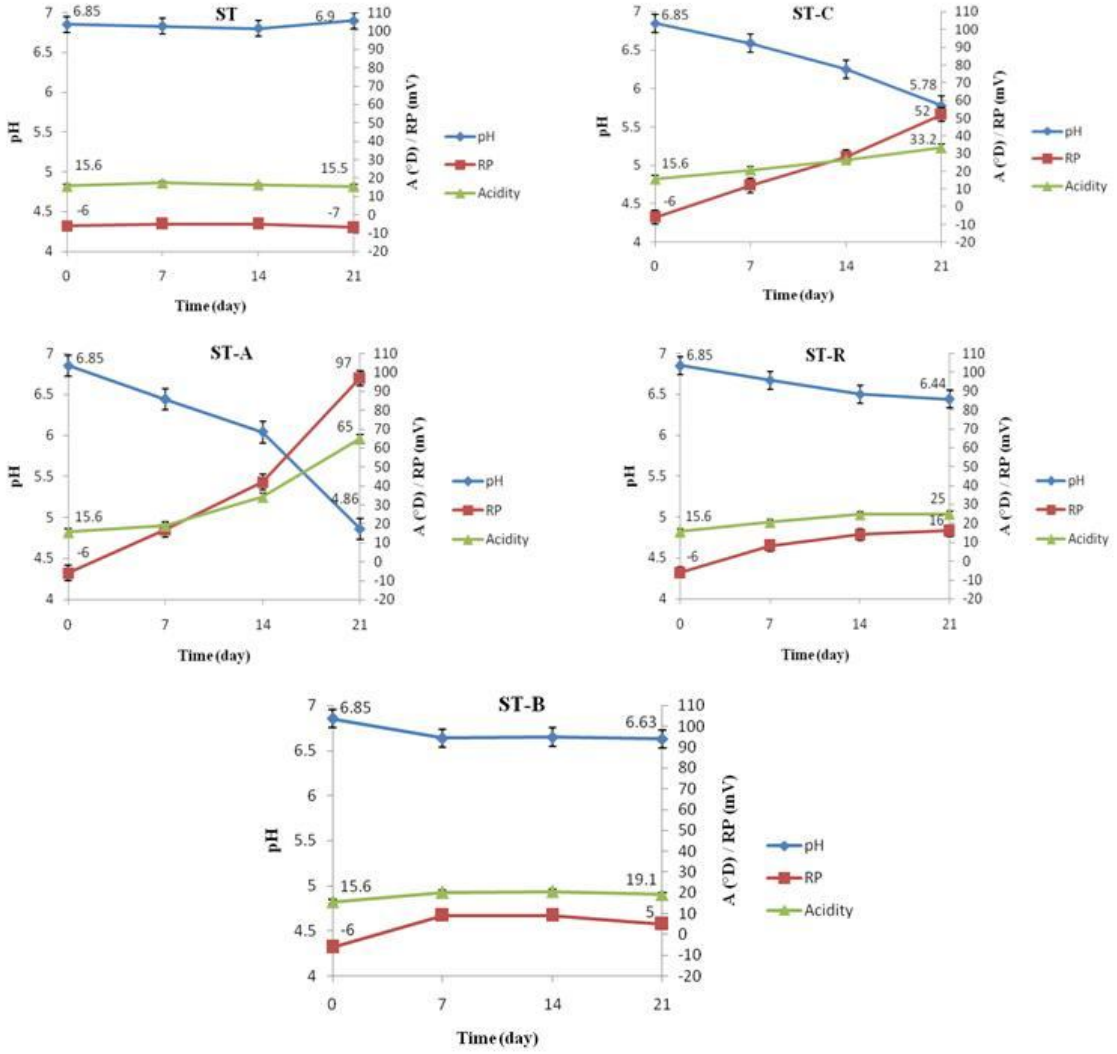
***** میانگین‌هایی که با حروف کوچک و بزرگ متفاوت نشان داده شده اند، به ترتیب نشاندهنده تفاوت‌های معنی‌دار میان میانگین‌ها در ستون‌ها و سطرها هستند ($P<0/05$)

** S= فقط ساکارز، T= فقط تاگاتوز، ST= ساکارز و تاگاتوز به نسبت 50:50، A=*ل. اسیدوفیلوس*، C=*ل. کازئی*، R=*ل. رامنوسوس* و B= ب. لاکتیس



شکل 1b، تغییرات pH، اسیدیته قابل تیتر و پتانسیل احیا در تیمارهای حاوی D- تاگاتوز طی دوره نگهداری یخچالی

(T= فقط تاگاتوز، A=*ل. اسیدوفیلوس*، C=*ل. کازئی*، R=*ل. رامنوسوس* و B= ب. لاکتیس)



شکل1c، تغییرات pH، اسیدیته قابل تیتر و پتانسیل احیا در تیمارهای حاوی ساکارز و تاگاتوز به نسبت 50:50 طی دوره نگهداری یخچالی (ST= ساکارز و تاگاتوز به نسبت 50:50، A=*ل. اسیدوفیلوس*، C=*ل. کازئی*، R=*ل. رامنوسوس* و B=*ب. لاکتیس*)

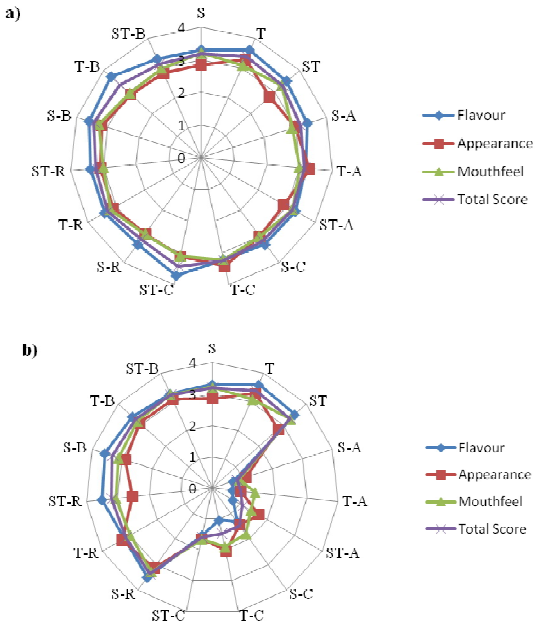
لازم بـه ذکـر اسـت کـه، در همـه تیمـار هـای دارای لاکتوباسیلوس، جمعیت نهایی پروبیوتیک ها در پایـان 21 روز نگهداری یخچالی به طور معنی‌داری بیشتر از روز صفر بود. این در حالیست که این مقدار در تیمار های دارای بیفیدوباکتریوم، کمتر از روز صفر بود (P<0/05).

مطـابق بـا جـدول 2، بیشـترین قابلیـت زیسـتی در روز 7 نگهداری یخچالی به طـور مشـترک (بـدون تفـاوت معنـی‌دار) مربوط به دو تیمار T-A و T-C، در روز 14 نگهـداری یخچـالی مربـوط بـه تیمـار T-A و در روز 21 نگهـداری یخچـالی در دو تیمار T-C و T-R به طـور مشـترک (بـدون تفـاوت معنـی‌دار) مشاهده شد.

به طـور کلـی، در میـان همـه تیمـار هـا در 21 روز دوره نگهداری یخچالی، بیشـترین قابلیـت زیسـتی بـه طـور کـاملاً معنی‌داری مربوط به تیمار T-A در روز 14 نگهداری یخچـالی و کمترین این مقدار در تیمار T-B در پایان 21 روز نگهـداری یخچالی مشاهده شد. همچنین بیشترین و کمتـرین تغییـرات در قابلیت زیستی به ترتیب مربوط به تیمـار T-A و S-R بـود (P<0/05).

خواص حسی تیمارها طی نگهـداری یخچـالی: شـکل 2 میانگین خواص حسـی تیمارهـای مختلـف را (از نظـر طعـم، احساس دهانی، ظاهر و امتیـاز نهـایی) در آغـاز و پایـان دوره نگهداری در یخچال نشان می‌دهد. مطابق با شـکل 2، ویژگـی هـای حسـی تیمـار هـا، اخـتلاف معنـی‌داری در شـروع دوره نگهداری یخچالی نداشـتند. همچنـین نـوع گونـه پروبیوتیـک

تلقیح شده بر خواص حسی طی نگهداری یخچالی تأثیر معنی‌دار داشت. به طوری که بالاترین امتیاز ارزیابی حسی در پایان دوره نگهداری یخچالی به نمونه شاهد و سپس به ترتیب به تیمار های *ل. رامنوسوس* و *ب. لاکتیس* تعلق داشت. بنابراین این تیمار ها، ماندگاری (shelf life) قابل قبولی در پایان دوره نگهداری یخچالی داشتند. ولی تیمارهای *ل. اسیدوفیلوس* و *ل. کازئی* پایین‌ترین امتیازها را داشته و برای نوشیدن در پایان دوره نگهداری مناسب نبودند.



شکل 2. میانگین ویژگی های حسی تیمار های مختلف در آغاز (a) و پایان دوره نگهداری یخچالی (b)

• بحث

شاخص‌های بیوشیمیایی تیمارها طی نگهداری یخچالی:

با توجه به شکل های 1a-c و جدول 1 می توان نتیجه گرفت که در هر نسبت از ساکارز به تاگاتوز افزودن میکروارگانیسم-های پروبیوتیک به شیرکاکائو نسبت به نمونه شاهد (بدون پروبیوتیک)، باعث ایجاد تغییرات معنی‌داری در خواص بیوشیمیایی طی 21 روز نگهداری یخچالی می شود. همچنین نوع گونه پروبیوتیک تلقیح شده در ایجاد این تغییرات مهم است و به طور کاملاً معنی‌داری به ترتیب *ل. اسیدوفیلوس*، *ل. کازئی*، *ل. رامنوسوس* و *ب. لاکتیس* بیشترین تغییرات را در خواص بیوشیمیایی طی 21 روز نگهداری یخچالی پدید آوردند که این ترتیب به دلیل تفاوت در قدرت تخمیر گونه‌های

است که *ل. اسیدوفیلوس* می‌تواند در دمای یخچالی با سرعت بسیار بیشتری از سایر پروبیوتیک‌ها باعث تخمیر قندها و تولید اسیدهای آلی در محیط شود (22، 21). ضمن اینکه *ل. اسیدوفیلوس* و *ل. کازئی* به دلیل فعالیت پروتئولیتیک بالا، سرعت اسیدی شدن محصول را بهبود می‌بخشند (23). Azcarate-peril و همکاران نیز اعلام کردند که فعالیت پروتئولیتیک ارتباط مستقیمی با شاخص اسیدی شدن دارد (24). همچنین Lankaputhra و همکاران در سال 1996 به سرعت پایین تخمیر در بیفیدوباکتریوم ها به خصوص در دمای یخچالی اشاره کرده‌اند (25).

تیمارهای دارای *ل. اسیدوفیلوس* و *ل. کازئی*، در محدوده زمانی 21-14 روز (t_{max}-pH-D) و تیمارهای دارای *ل. رامنوسوس* و *ب. لاکتیس* در محدوده زمانی 7-0 روز از نگهداری یخچالی، بیشترین تغییرات pH را داشتند که احتمالاً به دلیل این است که *ل. اسیدوفیلوس* و *ل. کازئی*، به محیط شیرکاکائو و دمای یخچالی دیر سازگار می شوند. در مورد *ل. رامنوسوس* می‌توان نتیجه گرفت که این گونه به سرعت می-تواند با شرایط محیطی شیرکاکائو سازگار شده و به آرامی تخمیر خود را انجام دهد (9). می‌توان دلیل تخمیر شدیدتر *ب. لاکتیس* در روز 7-0 را در برقرار بودن شرایط مساعد برای این گونه عنوان کرد. از جمله شرایط مساعد برای بیفیدوباکتریوم‌ها، محیط دارای پتانسیل احیای پایین می‌باشد (25، 21) که با توجه به شکل‌های 1a-c، پتانسیل احیای نمونه‌ها در روز صفر احتمالاً به دلیل وجود پلی‌فنل‌هایی مانند اپی‌کاتچین، کاتچین و پروسیانیدین و همچنین دیگر ترکیبات احیاکننده حاصل از کاکائو، منفی است. 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.

مطابق با جدول 1 در تیمارهای دارای لاکتوباسیلوس یکسان، بیشترین مقدار سرعت میانگین افت pH، افزایش اسیدیته و پتانسیل احیا مربوط به تیمار های دارای قند D-تاگاتوز بود و این نشان می‌دهد که احتمالاً D-تاگاتوز نسبت به ساکارز، در رشد و فعالیت لاکتوباسیلوس‌ها بیشتر مؤثر است. ولی تیمار T-B در بین همه تیمارهای دارای کشت پروبیوتیک، کمترین مقدار سرعت میانگین افت pH، افزایش اسیدیته قابل تیتر و افزایش پتانسیل احیا در پایان 21 روز نگهداری یخچالی را از خود نشان داد که دلیل این امر، ناتوانی

قابلیت زیستی پروبیوتیک ها طی نگهداری یخچالی: با توجه به جدول 2، نوع گونه پروبیوتیک تلقیح شده در ایجاد تغییرات قابلیت زیستی میکروارگانیسم های پروبیوتیک در شیرکاکائو طی 21 روز نگهداری یخچالی مهم است.

افزایش قابلیت زیستی دو گونه *ل. اسیدوفیلوس* و *ل. کازئی* تا روز 14 نگهداری ممکن است به دلیل رشد مطلوب در دمای یخچالی و پروتئولیتیک بودن آن ها باشد. چون همانطور که گفته شد، تیمار های دارای *ل. اسیدوفیلوس* و *ل. کازئی*، در محدوده زمانی 21-14 روز از نگهداری یخچالی، بیشترین تغییرات را در شاخص pH داشتند. البته همین امر خود باعث نامناسب شدن محیط برای ماندگاری پروبیوتیک ها و کاهش قابلیت زیستی آن ها پس از روز 14 شد (26). همچنین قابلیت زیستی *ل. رامنوسوس* همواره تا روز 14 نگهداری یخچالی 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 (9). البته قابلیت زیستی این گونه در تیمار T-R از روز 14 تا 21 به طور معنی‌داری کاهش یافت که این کاهش به دلیل افت بیشتر pH و افزایش بیشتر اسیدیته قابل تیتر نسبت به سایر تیمار های دارای *ل. رامنوسوس* بود.

افزایش قابلیت زیستی *ب. لاکتیس* تا روز 7 نگهداری را می‌توان در برقرار بودن شرایط مساعد برای این گونه عنوان کرد. از جمله شرایط مساعد برای بیفیدوباکتریوم ها، محیط دارای پتانسیل احیای پایین است و همان طور که در شکل های 1a-c مشاهده می شود، پتانسیل احیای این تیمار ها در روز صفر منفی است. کاهش قابلیت زیستی *ب. لاکتیس* از روز 7 تا پایان دوره نگهداری ممکن است به دلیل ورود اکسیژن طی نگهداری یخچالی به داخل بسته‌بندی باشد (25). 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 7 تا 14، احتمالاً به دلیل وجود ساکارز در محیط است، که نسبت به تاگاتوز ماده مغذی‌تری برای *ب. لاکتیس* محسوب می شود.

اگرچه *ل. اسیدوفیلوس* در تیمار T-A سرعت رشد بالاتری نسبت به سایر تیمارها تا روز 14 داشت؛ با این وجود سرعت مرگ و میر آن نیز بعد از روز 14 نگهداری یخچالی بالاتر بود که این پدیده احتمالاً به دلیل وارد آمدن شوک حاصل از سرعت بالای تخمیر به این میکروارگانیسم است که منجر به کاهش شدید قابلیت زیستی آن بعد از روز 14 نگهداری شد (26). در تایید این امر، با توجه به جدول 1، بیشترین تغییرات در شاخص‌های بیوشیمیایی مربوط به تیمار T-A بود. تیمار T-C در بین همه تیمارها در روز 21 نگهداری یخچالی، بیشترین قابلیت زیستی را داشت. Nighswonger و همکاران نیز گزارش کردند که پایداری *ل. کازئی* در روز های 28-21 نگهداری یخچالی در دمای 7-5°C، برابر یا بیشتر از *ل. اسیدوفیلوس* است (22). 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 (27). لاکتوباسیلوس‌ها دارای آنزیم‌های β- گالاکتوزیداز و/یا β- فسفوگالاکتوزیداز هستند که باعث توانایی این میکروارگانیسم‌ها به استفاده از لاکتوز می‌شوند (28). بنابراین آنزیم‌های متابولیک حاصل از پروبیوتیک‌های مرده ممکن است توانایی تخمیر سلول‌های زنده باقی‌مانده و سازگارشده 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 2، قابلیت زیستی لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیک در تیمار های شامل D-تاگاتوز بیشتر از تیمار های دارای ساکارز بود. همانطور که در جدول 1 نیز مشاهده شد D-تاگاتوز سبب افت pH و افزایش اسیدیته بیشتری در تیمارهای دارای لاکتوباسیلوس شد. ولی بیفیدوباکتریوم‌ها در حضور ساکارز بیشترین قابلیت زیستی را داشتند و احتمالاً آن ها قادر به تخمیر تاگاتوز نیستند.

اگر تعداد حداقل 10^7cfu/ml پروبیوتیک زنده به عنوان سطح استاندارد در نظر گرفته شود، قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها در تمام تیمارها پس از 21 روز نگهداری یخچالی در سطح استاندارد خواهد بود.

خواص حسی تیمارها طی نگهداری یخچالی: ارزیاب‌ها قادر به تشخیص تفاوت در ویژگی‌های رنگ تیمارها نبودند و همه تیمارها را از نظر رنگ پذیرفتند (داده‌ها نشان داده نشده است). مطابق با شکل 2، هیچکدام از تیمارها تفاوت معنی‌داری از نظر ویژگی‌های حسی در ابتدای نگهداری نداشتند ($P>0/05$). نسبت‌های مختلف ساکاروز به D-تاگاتوز اثر معنی‌داری بر ویژگی‌های حسی طی نگهداری نداشتند. با این وجود، نوع پروبیوتیک تلقیح‌شده موثر بود. به طوری که بیشترین امتیازهای ارزیابی حسی در پایان نگهداری در

شیرکاکائوهای غیر پروبیوتیک و سپس در تیمارهای تلقیح-شده با *ل. رامنوسوس* و ب.*لاکتیس* مشاهده شد. بنابراین این تیمارها زمان ماندگاری قابل قبولی به مدت 21 روز در 5°C داشتند. با این وجود، تیمارهای تلقیح‌شده با *ل. اسیدوفیلوس* و *ل. کازئی* کمترین امتیاز حسی را کسب کردند. اسیدیته بالا و pH پایین این تیمارهای پروبیوتیک منجر به ایجاد طعم اسیدی، ذرات منعقد شده قابل مشاهده و احساس دهانی نامطلوب شد. اثر اسیدیته قابل تیتر در درک مزه ترشی از pH مهم‌تر است (29). با توجه به شکل 2 و جدول 1 (مقادیر اسیدیته قابل تیتر نهایی)، ارزیاب‌ها قادر به درک مزه ترشی ناخوشایند و دیگر ویژگی‌های حسی نامطلوب مربوط به اسیدیته قابل تیتر به مقدار 33/2°D در پایان نگهداری بودند (تیمارهای ST-C و S-C). اما در مقدار 27/6°D (تیمار T-R) ویژگی‌های حسی را مطلوب ارزیابی کردند. بنابراین اگر محدوده 27/6°D-0 به عنوان حد تشخیص در نظر گرفته شود، تیمارهای T-A و ST-A فقط به مدت 7 روز؛ S-A و تمام شیرکاکائوهای تلقیح‌شده با *ل. کازئی* به مدت 14 روز؛ و تیمارهای S-R، ST-R و تیمارهای تلقیح‌شده با بیفیدوباکتریوم به مدت 21 روز از نگهداری یخچالی قابل قبول خواهند بود.

نتایج این مطالعه نشان داد که نوع سوش‌های پروبیوتیک و جایگزینی ساکارز با D-تاگاتوز اثر معنی‌داری ($P<0/05$) بر قابلیت زیستی باکتری‌های پروبیوتیک و همچنین ویژگی‌های بیوشیمیایی شیرکاکائو طی 21 روز نگهداری یخچالی داشت. ویژگی‌های حسی نمونه‌ها تنها توسط نوع سوش پروبیوتیک‌ها تحت تاثیر قرار گرفت. تیمارهای تلقیح‌شده با *ل. اسیدوفیلوس*، *ل. کازئی*، *ل. رامنوسوس* و ب.*لاکتیس* و همچنین تیمارهای غیر پروبیوتیک به ترتیب بیشترین تا کمترین تغییرات را در خواص بیوشیمیایی داشتند. بیشترین قابلیت زیستی طی نگهداری مربوط به تیمار دارای D-تاگاتوز و *ل. اسیدوفیلوس* (T-A) در روز 14 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 21 بود. بیشترین امتیاز حسی در پایان نگهداری مربوط به شیرکاکائوهای شاهد (غیر پروبیوتیک) و پس از آن، نمونه‌های تلقیح‌شده با *ل. رامنوسوس* و ب.*لاکتیس* بود. به طور کلی، تیمارهای T-R، ST-R، T-B و ST-B از نظر قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها، ویژگی‌های عملکردی D-تاگاتوز و خواص حسی، برای تولید صنعتی مناسب‌تر بودند. امید است در آینده تحقیقات تکمیلی با استفاده از گونه‌ها و سوش‌های دیگر پروبیوتیک و همچنین شیرین‌کننده‌های کم‌کالری و/یا پری‌بیوتیک انجام شود.

سپاسگزاری

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.

References

1. Menrad K. Market and marketing of functional food in Europe. J Food Eng. 2003; 56 (2): 181-188.
2. Shah NP. Functional cultures and health benefits. Int Dairy J. 2007; 17 (11): 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 (9): 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 (5): 884-887.
5. Yanes M, Duran L, Costell E. Rheological and optical properties of commercial chocolate milk beverages. J Food Eng. 2002; 51 (3): 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 (1): 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 (Suppl): 137-142.
9. Mortazavian AM, Sohrabvandi S. Probiotics and probiotic food products; based on probiotic dairy products. Tehran: Eta. 2006 [In 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 K. A 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 P J, Reinheimer A. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. J Dairy Sci. 2002; 85: 721-72.

13. Levin GV. Tagatose, the new GRAS sweetener and health product. J Med Food. 2002; 5 (1): 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 (128):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 (3): 243-249.

16. Moore MC . Drug evaluation: tagatose in the treatment of type 2 diabetes and obesity. Curr Opin Investig Drugs. 2006; 7 (10): 924-935.

17. Mortazavian AM, Ehsani MR, Sohrabvandi S, Reinheimer JA. MRS-bile agar: Its suitability for the enumeration of mixed probiotic cultures in cultured dairy products. Michwissenschaft. 2007; 62(3): 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(1): 16-21.

19. Mohammadi R, Rouhi M, Mortazavian A . Effects of music waves on fermentation characteristics and viability of starter cultures in probiotic yogurt. Milchwissenschaft-Milk Sci Int. 2011; 66 (2): 193-196.

20. Drake MA. Modern sensory practices. In: Clark S, Costello M, Drake M, Bodyfelt F, editors. The sensory evaluation of dairy products. Springer, New York, USA; 2009: 505-530.

21. Shah NP, Lankaputhra WEV, Britz ML, Kyle WSA. Survival of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidumin commercial yoghurt during refrigerated storage. Int Dairy J. 1995; 5: 515-21.

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: 212-19.

23. Sasaki M, Bosman BW, Tan PS. Comparison of proteolytic activities in various lactobacilli. J Dairy Res. 1995; 62 (4): 601-610.

24. Azcarate-Peril MA, McAuliffe O, Altermann E, Lick S, Russell WM, Klaenhammer TR. Microarray analysis of a two-component regulatory system involved in acid resistance and proteolytic activity in Lactobacillus acidophilus. Appl Environ Microbiol. 2005; 71 (10): 5794-5804.

25. Lankaputhra W, Shah N, Britz M. Survival of bifidobacteria during refrigerated storage in the presence of acid and hydrogen peroxide. Milchwissenschaft--Milk Sci Int. 1996; 51 (2): 65-69.

26. 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.

27. 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 (4): 898–902.

28. Premi L, Sandine W, Elliker P. Lactose-hydrolyzing enzymes of Lactobacillus species. Appl Microbiol. 1972; 24 (1): 51–57.

29. Belitz H, Grosch W, Schieberle P. Food Chemistry. 4th ed. Heidelberg, Germany: Springer. 2009.

Study on the Biochemical, Microbiological and Sensory Characteristics of Synbiotic Chocolate Milk

*Rouhi M[1], Mohammadi R[2], Sarlak Z[3], Taslimi A[4], Zabihzadeh M[2], Mortazavian AM[*5]*

1- *PhD Student, Department of Food Science, Engineering and Technology, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Iran*

2- *Students' Research Committee, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

3- *Department 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- *Assistant Prof, Dept. of Food Science and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

5- **Corresponding author: Associate Prof., Dept. of Food Science and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Email: mortazvn@sbmu.ac.ir*

Received 25 Jan, 2015 **Accepted 5 May, 2015**

Background and Objectives: Chocolate milk is one of the most popular non-fermented dairy products. However, it has been criticized lately for being a contributor to diabetes, child obesity and child tooth decay because of the higher sugar content than white milk. Therefore, it is important to substitude its sucrose with D-tagatose. Also this product has potential to be a probiotic carrier.

Materials and Methods: In this research, the effects of different ratios of 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 biochemical, microbiological and sensory characteristics of synbiotic chocolate milk were studied during 21 days in refrigerated storage (at 5°C). The control samples were without probiotic.

Results: The treatments inoculated with *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus* and *B. lactis* showed significantly higher biochemical properties compared to non-probiotic ones. The greatest viability at the end of storage was related to the treatment of D-tagatose with *L. rhamnosus* (T-R), as well as D-tagatose with *L. casei* (T-C). In general, the treatments T-R, ST-R (sucrose and D-tagatose with *L. rhamnosus*), T-B (D-tagatose with *B. lactis*) and ST-B (sucrose and D-tagatose with *B. lactis*) were realized as the best ones in terms of probiotic viability, functional property and sensory attributes of D-tagatose.

Conclusion: D-Tagatose could be successfully used as a natural sugar substitute with functional properties for probiotic chocolate milks enhancing their health benefits, but the proper selection of sucrose/D-tagatose ratio and type of probiotic strain is recommended.

Keywords: Chocolate milk; D-tagatose; Low-calorie; Probiotic; Synbiotic