www.journals.rifst.ac.ir
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال ۱۳۹۷، جلد ۷، شماره ۳، صفحات ۳۵۲-۳۳۷

JRIFST

بررسی خصوصیات کیفی و زنده‌مانی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کواگولانس* در نان پروبیوتیک

مرضیه حسینی‌نژاد [۱*]، عباس عابدفر [۲]

۱- دانشیار، گروه زیست‌فناوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
* نویسندهٔ مسئول (m.hosseininezhad@rifst.ac.ir)
۲- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه زیست‌فناوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۰۵

واژه‌های کلیدی
باسیلوس کواگولانس
ریزپوشانی
زنده‌مانی میکروبی
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس
نان پروبیوتیک

چکیده

فرایند ریزپوشانی در تولید غذاهای فراسودمند به‌عنوان یکی از شیوه‌های مؤثر و نوین به‌منظور قابلیت تحمل و بقای پروبیوتیک‌ها در طی فرایند تولید و در شرایط معده و روده ثابت شده است. هدف از انجام این پژوهش بررسی خصوصیات کیفی و پایداری جمعیت میکروبی نان پروبیوتیک تولیدی با نسبت‌های ۱، ۱/۵ و ۲ درصد سوسپانسیون میکروبی ریزپوشانی‌شده به همراه ۵ درصد نشاستهٔ خوراکی در طول ۴۸ ساعت ماندگاری بود. نتایج حاصل از این ارزیابی نشان داد که با گذشت زمان در هر دو نمونهٔ نان پروبیوتیک حاوی سوسپانسیون میکروبی متفاوت، مدت ماندگاری سبب کاهش جمعیت میکروبی شده است به‌طوری‌که کاهش جمعیت در نمونهٔ ۱ درصد سوسپانسیون به‌مراتب شدیدتر بود. همچنین، میزان حجم مخصوص و تخلخل نان به‌ترتیب روند کاهش و افزایش در دو نمونهٔ باکتری در مقایسه با نمونهٔ شاهد طی ۴۸ ساعت مدت ماندگاری داشت ($P\leq$۰/۰۵). درحالی‌که سفتی بافت نان پروبیوتیک در طول مدت ماندگاری ۲۴ ساعت برای هر سوسپانسیون میکروبی افزایش یافت که در مقایسه با نمونهٔ شاهد به‌مراتب کمتر بود ($P\leq$۰/۰۵). علاوه‌بر این آنالیز واریانس و مقایسهٔ میانگین آزمون رنگ‌سنجی پوستهٔ نان پروبیوتیک تأثیر معنی‌داری ($P\leq$۰/۰۵) بر میزان شاخص‌های رنگ (L^*، a^* و b^*) نان در طی ۴۸ ساعت نگهداری داشتند.

مقدمه

امروزه با گسترش دانش در حوزهٔ مواد غذایی، نقش تغذیه در سلامتی دستگاه گوارش به‌عنوان فاکتور کلیدی در تولید غذاهای عملگرا موردتوجه ویژه قرار گرفته است. تعداد زیادی از باکتری‌های اسید لاکتیک خصوصاً *لاکتوباسیلوس‌ها*[1] دارای ویژگی‌های پروبیوتیکی بوده و به‌عنوان کشت آغازگر در محصولات تخمیری مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند (Saarela *et al.*, 2000). اصطلاحاً پروبیوتیک به کشت زنده و فعالی اطلاق می‌شود که ضمن بقاء و تجمع در دستگاه گوارش، اثرات فیزیولوژیکی مثبتی نیز بر مصرف‌کننده داشته باشد (Doherty *et al.*, 2010). پروبیوتیک‌ها از ویژگی‌های متعددی نظیر مقاومت به اسید معده و املاح صفراوی، همچنین ممانعت از ایجاد اتصال باکتری‌های بیماری‌زا با مخاط روده برخوردارند. این میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها و نگهدارنده‌های سنتزی در پیشگیری و درمان عوارض بسیاری از عوامل عفونی و بیماری‌زا و متعادل‌نمودن میکروفلور

[1] *Lactobacillus*

دستگاه گوارش نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند (Saarela *et al*., 2000). باتوجه‌به سرانهٔ مصرف نان و میزان ضایعات آن در کشور، همواره تولید نان عاری از افزودنی‌های شیمیایی و دارای کیفیت و زمان ماندگاری مطلوب یکی از دغدغه‌های دست‌اندرکاران صنایع نانوایی بوده است. علاوه‌بر این در طی سال‌های اخیر، بهبود ویژگی‌های تغذیه‌ای، سلامتی نان و غنی‌سازی آن با ترکیبات مختلف با هدف ارتقاء ارزش غذایی و کیفیت محصول نیز موردتوجه محققین فراوانی قرار گرفته است (حسینی‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۶). سال‌های زیادی است که بشر به علت وجود مواد مغذی مؤثر بر سلامت، به استفاده از محصولات تخمیری تمایل فراوان دارد. اثرات سلامت‌بخش محصولات تخمیری فراسودمند به‌دلیل وجود برخی از میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در بدن میزبان ثابت شده است. باتوجه‌به اولویت صنعت امروز، ایجاد رویکردی نوآورانه در رفع نیازهای مصرف‌کننده و بهبود گسترش صنعت غذا به‌ویژه صنایع پخت، با مصرف پروبیوتیک‌ها به‌عنوان افزودنی مفید و مجاز روزبه‌روز در حال پیشرفت است. بااین‌حال، تولید نان فراسودمند در حضور میکروارگانیسم‌های زنده به‌دلیل درجه‌حرارت بالا در طول پخت کمتر موردتوجه محققین قرار گرفته است (Altamirano-Fortoul *et al*., 2012). ازاین‌رو ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها با خشک‌کن پاششی فرایند تجاری ساده، پیوسته و کم‌هزینه‌ای است که به‌طور گسترده‌ای درمورد مواد حساس به حرارت همچون اسانس‌ها، طعم‌ها و مواد دارویی به‌کار می‌رود و ضمن بقاء و تجمع در دستگاه گوارش، اثرات فیزیولوژیکی مثبتی بر مصرف‌کننده داشته و به‌عنوان یکی از روش‌های کاربردی و اقتصادی برای قابلیت تحمل نمونه‌های غذایی پوشش‌دهی‌شده در شرایط شبیه‌سازی معده و روده ثابت شده است (Zuidam & Nedovic, 2010). مطالعه‌های متعددی تاکنون درخصوص ریزپوشانی باکتری‌های پروبیوتیک و استفاده از آنها در فراورده‌های غلاتی مانند نان صورت گرفته است. Zhang و همکاران (۲۰۱۴) مطالعه‌ای روی زنده‌مانی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*[1] Bb12 در طول پخت نان و بررسی خصوصیات کیفی آن انجام دادند و نتایج نشان داد که زنده‌مانی این نوع باکتری در طول پخت کاهش یافت. علاوه‌بر این حجم مخصوص و محتوای رطوبتی نیز طی فرایند پخت افزایش پیدا کرد. تولید نان سین‌بیوتیک به‌وسیلهٔ میکروانکپسولاسیون *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*[2] LA-5 و *لاکتوباسیلوس کازئی*[3] ۴۳۱ توسط Seyedain-Ardabili و همکاران (۲۰۱۶) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که *لاکتوباسیلوس کازئی* ۴۳۱ در دماهای بالا مقاومت بیشتری نسبت به *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA-5 از خود نشان داد و این مقاومت در هنگام استفاده از کیتوزان نسبت به آلژینات کلسیم و نشاستهٔ مقاوم ذرت بیشتر بود و درنهایت محققین بیان کردند که میکروانکپسولاسیون مورد استفاده در تولید نان سین‌بیوتیک می‌تواند مقاومت حرارتی باکتری پروبیوتیک را افزایش دهد. Altamirano-Fortoul و همکاران (۲۰۱۲) اثر پوشش بر پایهٔ نشاسته روی درصد زنده‌ماندن *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در نان و اثر آن بر خواص مکانیکی پوسته را بررسی کردند، نتایج پژوهش نشان داد که در تمام تیمارها زنده‌مانی پس از پخت مشاهده شد. فعالیت آبی پوسته نیز افزایش و نیروی شکست آن کاهش یافت. ریزپوشانی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[4] A7 با استفاده از آلژینات سدیم و نشاستهٔ ذرت به روش امولسیون و استفاده از آن در تولید نان پروبیوتیک انجام گرفت. نتایج نشان داد که ریزپوشانی تأثیر معنی‌داری در زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها طی پخت نان داشت و تعداد باکتری‌های زنده را نسبت به نمونهٔ شاهد، بین ۲-۱ سیکل لگاریتمی افزایش داد (یوسفی و همکاران، ۱۳۹۵). در سال‌های اخیر سیاست‌گذاری‌های مسئولان نیز در جهت تولید نان‌هایی با کیفیت بالا و نیز تولید نان‌هایی باارزش تغذیه‌ای فراتر از یک نان استاندارد بوده است تا باتوجه‌به مصرف بالای این محصول در کشور ما، سطح سلامت جامعه با تولید نان‌هایی باارزش تغذیه‌ای بالاتر افزایش یابد.

[1] *Bifidobacterium Lactis*
[2] *Lactobacillus Acidophilus*
[3] *Lactobacillus Casei*
[4] *Lactobacillus Plantarum*

در اجرای این هدف، بررسی خصوصیات کیفی و مدت ماندگاری نان عملگرا تولیدی با سوسپانسیون باکتری‌های پروبیوتیک (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کوآگولانس*) ریزپوشانی‌شده به همراه نشاستهٔ خوراکی در طول ۴۸ ساعت ماندگاری و توزیع آن در سطح جامعه یکی از راهکارهای مناسب و عملی خواهد بود.

مواد و روش‌ها

مواد خام

آرد گندم مورد استفاده در این پژوهش از واحد نانوایی فنی و حرفه‌ای شمارهٔ ۲-مشهد، براساس استاندارد شمارهٔ ۵۸۰۹ (سازمان ملی استاندارد ایران، ۱۳۸۱) تهیه شد. خصوصیات آرد مصرفی که براساس روش‌های مدون (AACC, 2010) تعیین گردیده در جدول (۱) ارائه شده است. مخمر خشک فعال *ساکارومایسس سرویزیه*[6] از شرکت ایران ملاس فریمان تهیه گردید. محیط‌های کشت مصرفی شامل ام آر اس براث[7]، ام آر اس آگار[8]، نوترینت براث[9] و نوترینت آگار[10] نیز از شرکت‌های شارلو اسپانیا و سیگما آلدریچ ایتالیا تأمین شدند. مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش نیز از شرکت مرک آلمان تهیه گردیدند.

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی آرد مورد استفاده در این پژوهش

درصد استخراج	درصد رطوبت	درصد پروتئین	درصد گلوتن مرطوب	اسیدیته	درصد خاکستر
۶۹ - ۶۷/۵	۱۲/۹۰	۱۰/۹۶	۲۷-۲۴	۲/۰۷	۰/۷۵

آماده‌سازی سویه‌های میکروبی پروبیوتیک و ریزپوشانی آن

باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*[1] (PTCC 1643) و *باسیلوس کوآگولانس*[2] (T4) (IBRC-M 10791) به‌ترتیب به‌صورت منجمدشده[3] از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران[4] و مرکز ملی ذخایر ژنتیک و زیستی ایران[5] خریداری و در ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت MRS Broth در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۴-۴۸ ساعت تا ایجاد 10^8 واحد تشکیل‌دهنده پرگنه در گرم (در مقایسه با لولهٔ ۰/۵ مک فارلند) کشت داده شدند. سپس سلول‌های تازهٔ میکروبی با سانتریفیوژ، زیست‌تودهٔ تولیدی در ۵۰۰۰ g (هرمل، Z36 HK، آلمان)، ۴ درجهٔ سانتی‌گراد و به مدت ۱۵ دقیقه از محیط کشت جدا گردید و در دو مرحله با محلول استریل ۰/۱ درصد آب پپتونه شسته شد (Mokarram *et al.*, 2009). سپس جهت ریزپوشانی سویه‌های فعال در شرایط کاملاً بهداشتی با استفاده از روش Ananta و همکاران (۲۰۰۵) و همچنین Altamirano-Fortoul و همکاران (۲۰۱۲) با کمی تغییرات انجام گردید. براین‌اساس، ترکیبات اصلی تشکیل‌دهندهٔ دیوارهٔ ریزپوشانی شامل (کنسانترهٔ پروتئین آب‌پنیر، کربوکسی‌متیل سلولز، پکتین، اینولین و صمغ فارسی) به‌همراه پالیدهٔ کشت فعال در انتهای فاز لگاریتمی و ابتدای فاز سکون (آیدوفاز) برای هرکدام از سویه‌های پروبیوتیک که با استاندارد ۵ مک فارلند تنظیم گردید. در ادامه غلظت نهایی از هر سوسپانسیون میکروبی (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کواگولانس*) جهت ریزپوشانی باکتری‌های پروبیوتیک به کمک خشک‌کن پاششی حدود ۱۶/۴۵۵ (وزنی/وزنی) تهیه شد.

تهیهٔ نان پروبیوتیک

برای تهیهٔ نان پروبیوتیک، ابتدا ۲۲۰ میلی‌لیتر آب ولرم با دمای ۴۵ درجهٔ سانتی‌گراد به داخل همزن برقی کاسه‌دار (Solingen، مدل GTM8016، ساخت آلمان) به همراه ۵/۴ گرم مخمر نانوایی (۱/۲ درصد) اضافه شد. در ادامه ترکیبات خشک شامل؛ ۴۵۰ گرم

[1] *Lactobacilluse Acidophilus*
[2] *Bacillus Coagulans*
[3] Lyophilization
[4] Persian Type Culture Collection
[5] Iranian Biological Resource Center
[6] *Saccharomyces Cerevisiae*
[7] MRS Broth
[8] MRS Agar
[9] Nutrient Broth
[10] Nutrient Agar

آرد گندم به مخلوط اضافه گردید. متعاقباً پس از ۳ دقیقه اختلاط، مقادیر ۱ درصد نمک و شکر (نسبت به وزن آرد)، به خمیر نان اضافه و تا ۱۲ دقیقه اختلاط صورت گرفت. بعد از آماده‌سازی خمیر سطح آن با پارچهٔ تمیزی پوشانده شد تا از خشک‌شدن سطحی جلوگیری گردد.

بعد از استراحت اولیهٔ خمیر نان (۴۵ دقیقه) عمل چانه‌گیری انجام شد (وزن هر چانه ۳۵۰ گرم). پس از این عمل تا آغاز پخت استراحت ثانویه (۱۵ دقیقه) به خمیر نان برای ایجاد حباب‌های هوای یکنواخت، در چانهٔ خمیر داده شد. پس از طی این زمان خمیرها توسط دست پهن و به شکل نان بربری درآمده و بلافاصله روی سینی فر از قبل آماده‌شده قرار گرفت. برای طبخ آن از دستگاه پخت سنّتی نان که دمایی حدود ۳۰۰ درجهٔ سانتی‌گراد تحت زمان ۱۵ دقیقه ایجاد نموده و پس از طلایی‌شدن سطح نان از داخل فر برداشته‌شده و روی صفحه‌های مشبک جهت سردشدن قرار گرفت (Majzoobi *et al*., 2013). درنهایت نان پخته‌شده در شرایط استریل در تماس با سوسپانسیون باکتری پروبیوتیک ریزپوشانی‌شده با حامل‌های کنسانترهٔ پروتئین آب‌پنیر (WPC)[1]، کربوکسی‌متیل سلولز (CMC)[2]، پکتین[3] و صمغ فارسی[4] و به‌همراه نشاستهٔ خوراکی ۵ درصد با نسبت‌های ۱، ۱/۵ و ۲ درصد قرار داده شد.

ارزیابی جمعیت میکروبی نان پروبیوتیک در طول مدت ماندگاری برای هر سویهٔ میکروبی

پس از تهیهٔ نان‌های سنّتی و خروج از فر پخت، سوسپانسیونی از باکتری پروبیوتیک انکپسوله‌شده مطابق با استاندارد ۵ مک فارلند و تعداد پایش اولیه $۲/۹\times۱۰^{۸}$ باکتری پروبیوتیک تهیه گردید. سوسپانسیون پروبیوتیک در مخلوط با محلول نشاستهٔ خوراکی (۵ درصد) با نسبت‌های ۱، ۱/۵ و ۲ درصد به‌صورت رومال روی سطح نان به‌صورت رومال پوشش‌داده‌شده و در شرایط کاملاً بهداشتی نگهداری گردید. بقای میکروبی نان پروبیوتیک در حالت تازه‌خوری ۲ ساعت بعد از پخت و پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی و مقایسه صورت گرفت (Altamirano-Fortoul *et al*., 2012).

بررسی خصوصیات بافت نان پروبیوتیک طی مدت ماندگاری

آزمون بیاتی نان با استفاده از تست فشردگی و به کمک دستگاه بافت‌سنج (مدل TA.XT Plus Stable Micro System، ساخت انگلستان)، انجام گردید. ابعاد نمونه‌های نان مسطح تولیدی ۱۵×۳۰×۳۰ میلی‌متر و همچنین وزن چانه‌های گرفته‌شده ۳۵۰ گرم بود. سپس به‌منظور انجام آزمون فشردگی ابتدا برش‌هایی از نان با سطح مقطع ۳ سانتی‌متر تهیه گردید. بدین‌منظور در آزمون فشردگی ابتدا یک پروب استوانه‌ای از جنس آلومینیوم با قطر ۲ سانتی‌متر و ارتفاع ۱/۵ سانتی‌متر روی دستگاه نصب گردید. پس از کالیبره‌کردن دستگاه، نمونهٔ مورد آزمایش در جایگاه مخصوص قرار گرفت و حداکثر نیروی لازم برای ۵۰ درصد تغییر شکل، میزان نیروی هدف ۰/۰۵ نیوتون و فشردن با سرعت ۳۰ میلی‌متر در دقیقه در زمان‌های ۲ و ۲۴ ساعت پس از پخت به‌عنوان معیاری از بیاتی محاسبه گردید (Jackman & Stanley, 1992; Shafiee *et al*., 2008).

خصوصیات حجم مخصوص و تخلخل نان پروبیوتیک طی مدت ماندگاری

حجم مخصوص نان‌های تولیدی در فواصل زمانی ۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از پخت، به‌طور جداگانه و در شرایط معین (درون بسته‌های استریل پلی‌اتیلنی درب‌دار و دمای گرم‌خانه‌گذاری ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد (مدل Memmert، ساخت آلمان) به روش جایگزینی دانهٔ کُلزا براساس رابطه‌های (۱ تا ۳) تعیین و با نمونهٔ شاهد مقایسه گردید. نمونه‌های مورد استفاده دارای وزن یکسان بوده و از مرکز هندسی نان تهیه شدند.

رابطهٔ (۱)

$$W_{\text{کُلزا}} = W_{\text{کل}} - W_{\text{نان}} - W_{\text{ظرف}}$$

رابطهٔ (۲)

$$V_{\text{کُلزا}} = \frac{W_{\text{کُلزا}}}{\rho_{\text{کُلزا}}}$$

رابطهٔ (۳)

$$V_{\text{نان}} = W_{\text{ظرف}} - W_{\text{کُلزا}}$$

[1] Whey Protein Concentration (WPC)
[2] Carboxymethyl Cellulose (CMC)
[3] Pectin
[4] Persian Gum

برای ارزیابی میزان تخلخل مغز نان در فواصل زمانی ۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از پخت، از تکنیک پردازش تصویر استفاده شد (Haralick *et al*., 1973). به‌منظور اندازه‌گیری تخلخل نان، نمونه‌های نان با ضخامت ۲/۵ سانتی‌متر تهیه شدند. نمونهٔ بریده‌شده روی صفحهٔ اسکنر (مدل HP Scanjet G3010، ساخت آمریکا) با وضوح ۳۰۰ نقطه در اینچ از نمونه‌ها تصویربرداری گردید. پس از انتقال تصاویر به نرم‌افزار Image J نسخهٔ ۱/۴۲ و ازطریق فعال‌سازی قسمت دودویی رنگ نقاط تیره به سیاه و رنگ نقاط روشن به سفید تغییر یافت و یک تصویری سیاه‌وسفید تهیه شد. با فعال‌کردن قسمت اندازه‌گیری نرم‌افزار، مساحت مناطق تیره برحسب سانتی‌مترمربع محاسبه گردید سپس با فعال‌کردن قسمت برگردان نرم‌افزار قسمت‌های سیاه (منافذ) به رنگ سفید و قسمت‌های روشن (دیواره‌ها) به رنگ سیاه برگردانده شدند مجدداً مساحت قسمت‌های تیرهٔ جدید برحسب سانتی‌مترمربع اندازه‌گیری شد. نسبت مساحت‌ها به‌عنوان شاخصی از تخلخل نان توسط رابطهٔ (۴) محاسبه گردید.

رابطهٔ (۴)

$$\text{تخلخل} = \frac{\text{مساحت قسمت سیاه تصویر اول}}{\text{مساحت قسمت سیاه تصویر دوم}}$$

ارزیابی شاخص‌های رنگی پوستهٔ سطح نان

به‌منظور ارزیابی فاکتورهای رنگی (L^*، a^* و b^*) پوستهٔ نان توسط تیغه از مغز نان جداشده و برشی به ابعاد ۶×۸ سانتی‌متر از پوسته تهیه شد. به‌وسیلهٔ اسکنر (مدل HP Scanjet G3010، ساخت آمریکا) با وضوح ۶۰۰ dpi تصویربرداری شد. سپس تصاویر تهیه‌شده در نرم‌افزار Image J مورد بررسی قرار گرفتند. با فعال‌کردن قسمت تبدیل رنگ، تصاویر از حالت RGB به حالت Lab تغییر یافتند و هریک از پارامترهای L^*، a^* و b^* و در تصویر یک تصویر مجزا مشخص شد. در ادامه با فعال‌کردن قسمت آنالیز نرم‌افزار، میزان L^*، a^* و b^* اندازه‌گیری شد (Zheng *et al*., 2006; Salehi & Kashaninejad, 2015). در انتها فاکتور برآیند کلّی رنگ با استفاده از رابطهٔ (۵) محاسبه گردید.

رابطهٔ (۵)

$$\Delta E = \sqrt{\left(L_0^* - L^*\right)^2 + \left(a_0^* - a^*\right)^2 + \left(b_0^* - b^*\right)^2}$$

در رابطهٔ (۵)، علائم با زیروند صفر مربوط به مقادیر نمونهٔ شاهد (خمیر نان) می‌باشد.

آنالیز آماری

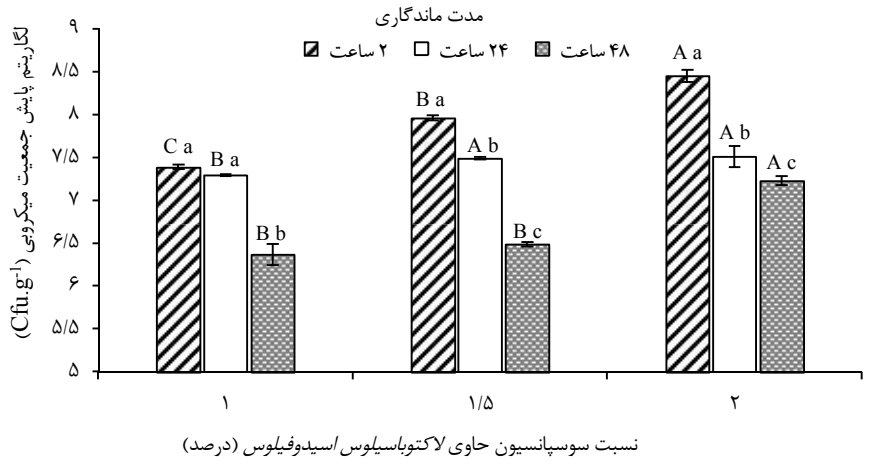
نتایج حاصل از این پژوهش براساس طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار و با استفاده از نرم‌افزارهای SAS نسخهٔ ۹.۱ و Microsoft Excel نسخهٔ ۲۰۱۳ مورد تجزیه‌وتحلیل آماری قرار گرفت. مقایسهٔ میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌داری (LSD) و آزمون دانکن در سطح ۹۵ درصد انجام شد. علاوه‌بر این پاسخ‌های مورد ارزیابی در این پژوهش شامل؛ بررسی بیاتی نان‌های تولیدی با آزمون بافت‌سنجی (شاخصی از بیاتی نان مسطح)، اندازه‌گیری حجم مخصوص نان (با روش جابجایی دانهٔ کُلزا)، تعیین میزان تخلخل مغز نان، اندازه‌گیری شاخص‌های رنگی L^* a^* b^* با نرم‌افزار Image J و پایش جمعیت میکروبی در نان پروبیوتیک طی مدت ماندگاری صورت گرفت.

نتایج و بحث

پایش بقای جمعیت میکروبی نان پروبیوتیک در طول مدت ماندگاری

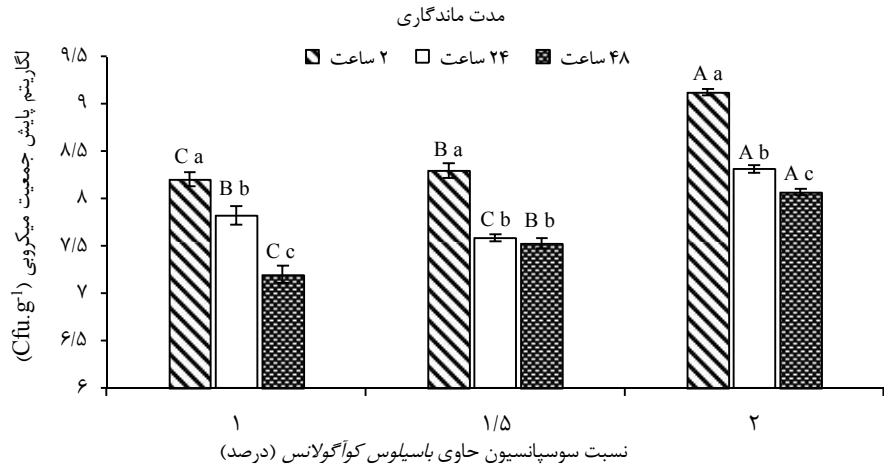
نتایج حاصل از پایش جمعیت نان پروبیوتیک مسطح تولیدی با نسبت‌های ۱، ۱/۵ و ۲ درصد پوشش از سویهٔ پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در طول مدت ماندگاری ۲، ۲۴ و ۴۸ را در شکل (۱) نشان داد. براین‌اساس با افزایش نسبت سوسپانسیون واردشده به سطح نان جمعیت میکروبی افزایش یافت درحالی‌که تأثیر زمان نگهداری سبب کاهش جمعیت میکروبی نان پروبیوتیک در سطح یک سیکل لگاریتمی شده است به‌طوری‌که این کاهش جمعیت در نمونهٔ ۱ درصد سوسپانسیون برای *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* نیز به‌مراتب شدیدتر بود. همچنین نمونه‌های حاوی ۲ درصد پوشش در حالت تازه‌خوری (۲ ساعت بعد از پخت) بالاترین جمعیت میکروبی را در هر دو سویه و نمونهٔ حاوی ۱ درصد پوشش بعد از ۴۸ ساعت نگهداری کمترین پایش جمعیت رو داشتند. در مقابل آن تأثیر طول مدت ماندگاری سبب کاهش جمعیت میکروبی نان پروبیوتیک تلقیح‌شده با *باسیلوس کوآگولانس* در سطح دو سیکل لگاریتمی با پایش

جمعیت اولیهٔ بالاتر نسبت به *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* شده بود (شکل ۲). آنالیز واریانس و مقایسهٔ میانگین تغییرات جمعیت میکروبی نمونهٔ نان‌های تولیدی در دو سویهٔ مختلف و نیز تأثیر معنی‌داری شرایط اعمال‌شده در سطح ۵ درصد در این پژوهش را مشخص نمود ($P\leq$۰/۰۵).



شکل ۱- پایش بقای جمعیت میکروبی نان پروبیوتیک حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در طول مدت ماندگاری

حروف غیریکسان بزرگ (A-B)، نشانگر تفاوت معنی‌داری نمونه‌های با نسبت سوسپانسیون مختلف از *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در سطح (α=۰/۰۵) در هر روز از زمان ماندگاری می‌باشد. همچنین نتایج آنالیز انجام‌شده با حروف کوچک (a-b-c) نمایانگر اختلاف معنی‌داری با یک نسبت سوسپانسیون ثابت در طول مدت ماندگاری را نشان می‌دهد ($P\leq$۰/۰۵).



شکل ۲- پایش بقای جمعیت میکروبی نان پروبیوتیک حاوی *باسیلوس کوآگولانس* در طول مدت ماندگاری

حروف غیریکسان بزرگ (A-B)، نشانگر تفاوت معنی‌داری نمونه‌های با نسبت سوسپانسیون مختلف از *باسیلوس کوآگولانس* در سطح (α=۰/۰۵) در هر روز از زمان ماندگاری می‌باشد. همچنین نتایج آنالیز انجام‌شده با حروف کوچک (a-b-c) نمایانگر اختلاف معنی‌داری با یک نسبت سوسپانسیون ثابت در طول مدت ماندگاری را نشان می‌دهد ($P\leq$۰/۰۵).

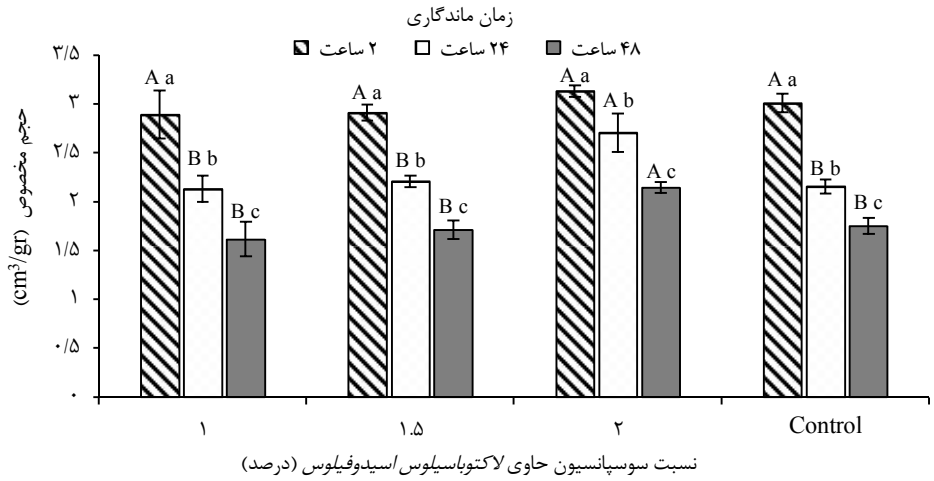
استفاده از سوسپانسیون ریزپوشانی سویه‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کوآگولانس* در انتهای فاز لگاریتمی و آغاز فاز سکون (شروع مرحلهٔ آیدوفاز) سبب افزایش مقاومت در فرایند حرارتی بعد از پخت می‌گردد. ازاین‌رو، نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج Kosin و Rakshit (۲۰۱۰)، که به بررسی باکتری‌ها در فاز سکون، در مقایسه با فاز لگاریتمی بـه تنش‌های اعمال‌شده حین فراوری مقاومت بیشتری دارند، مطابقت داشت. Zhang و همکاران (۲۰۱۴)، به بررسی بقاء جمعیت میکروبی نان پروبیوتیک تلقیح‌شده با *بیفیدوباکتریوم*[1] در طول

[1] *Bifidobacterium*

مدت ماندگاری پرداختند. نتایج نشان داد، پس از یک کاهش اولیه در زنده‌مانی جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک، با تداوم زمان حرارت‌دهی میزان مرگ باکتری‌ها کاهش می‌یابد. زیرا با افزایش ناگهانی دمای محیط (شوک حرارتی) پروتئین‌هایی در سلول ایجادشده که باعث افزایش مقاومت نسبی باکتری‌ها در برابر حرارت می‌گردد (Fu & Chen, 2011; Hosseininezhad *et al*., 2015). همچنین ترکیبات پرکننده در ریزپوشانی دیوارهٔ باکتری‌ها نظیر نشاسته، باعث افزایش پایداری ریزپوشینه در شرایط تنش‌زای حرارتی و همچنین در طول مدت ماندگاری می‌گردد (Wu *et al*., 2014). تأثیر اندازهٔ ریزپوشانی باعث نامناسب‌شدن بافت فراورده‌های غذایی و مکمل‌های خوراکی میکروبی می‌گردد درحالی‌که جهت حفظ بقاء پروبیوتیک در شرایط حرارتی اندازهٔ بزرگ ریزپوشینه با اندازهٔ کمتر از ۱۰۰ میکرومتر مناسب هستند (Homayouni *et al*., 2007; Rokka & Rantamaki, 2010). ازآنجایی‌که بعد از خروج نان از فر پخت، پروبیوتیک‌ها در معرض تنش حرارتی قرار می‌گیرند؛ اندازهٔ ریزپوشینه می‌تواند عامل مؤثری در افزایش پایداری ریزپوشینه‌ها و زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در حین و بعد از پخت نان باشد.

ارزیابی خصوصیات کیفی نان سنّتی پروبیوتیک

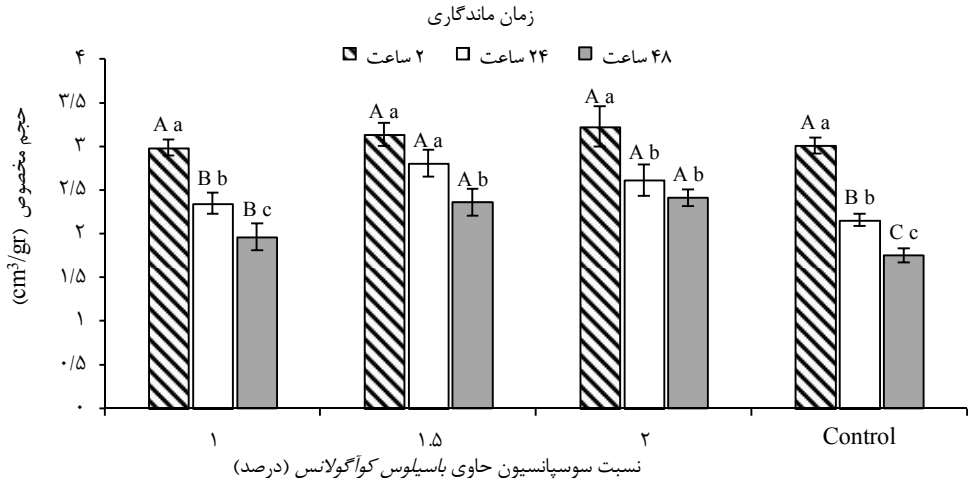
رابطهٔ ساختار مغز نان و بسیاری از ویژگی‌های کیفی آن نظیر تخلخل و حجم مخصوص مشخص ساخته که خواص مکانیکی مغز نان بیشتر تابع چگونگی توزیع اجزاء بوده و وابستگی کمتری به اندازهٔ اجزاء دارد. ازاین‌رو، بین عوامل مؤثر بر تخلخل نان، تولید گاز در حین فرایندهای تخمیری از اهمیت بیشتری در مقایسه با روش‌های فراوری یا مخلوط‌کردن اجزاء خمیر برخوردار بود. براین‌اساس حجم مخصوص و تخلخل نان مسطح تولیدی که حاوی سوسپانسیون باکتری پروبیوتیک مطابق با استاندارد ۵ مک فارلند و تعداد $۲/۹\times۱۰^{۸}$ باکتری ریزپوشانی‌شده تهیه و به همراه نشاستهٔ خوراکی ۵ درصد با ایجاد نسبت‌های متغیر ۱، ۱/۵ و ۲ درصد از سوسپانسیون پروبیوتیک ارزیابی گردید. نتایج حاصل از این پژوهش در شکل (۳) نشان داد که با گذشت زمان از میزان حجم مخصوص نان پروبیوتیک تلقیح‌شده با *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در مقایسه با نمونهٔ شاهد کاهش یافت ($P\leq۰/۰۵$)، درحالی‌که تأثیر نسبت‌های مختلفی از غلظت‌های سوسپانسیون روی سطح نان سنّتی عدم معنی‌داری حجم مخصوص را در مقایسه با نمونهٔ شاهد بین نمونه‌های نان به همراه داشت ($P\geq۰/۰۵$). براین‌اساس نمونه‌های حاوی ۲ درصد سوسپانسیون در حالت تازه‌خوری و نمونهٔ ۱ درصد بعد از ۴۸ ساعت به‌ترتیب بالاترین و کمترین حجم مخصوص را به خود اختصاص دادند.



شکل ۳- ارزیابی حجم مخصوص نان حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در طول مدت ماندگاری

حروف غیریکسان بزرگ (A-B)، نشانگر تفاوت معنی‌داری نمونه‌های با نسبت سوسپانسیون مختلف از *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در سطح (α=۰/۰۵) در هر روز از زمان ماندگاری می‌باشد. همچنین نتایج آنالیز انجام‌شده با حروف کوچک (a-b-c) نمایانگر اختلاف معنی‌داری با یک نسبت سوسپانسیون ثابت در طول مدت ماندگاری را نشان می‌دهد ($P\leq۰/۰۵$).

در میان نان‌های تولیدی، نان‌های حاوی سوسپانسیون *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به‌مراتب کاهش حجم مخصوص شدیدتری در مقایسه با *باسیلوس کواگولانس* داشت، که علت را می‌توان به ازدست‌رفتن رطوبت بخش مرکزی و فشرده‌ترشدن شدیدتر بافت نان آن نسبت به *باسیلوس کواگولانس* ارتباط داد، علاوه‌بر این در یک بازهٔ زمانی ثابت تأثیر پوشش حاوی سوسپانسیون زندهٔ باکتری ریزپوشانی‌شده به همراه نشاستهٔ خوراکی سبب افزایش جزئی در حجم مخصوص نان شد به‌طوری‌که سطح ۲ درصد پوشش تأثیر معنی‌داری را در حجم مخصوص نان نسبت به سایر تیمارها به همراه داشت. در این میان تیمار حاوی ۲ درصد سوسپانسیون (*باسیلوس کواگولانس*) در نان تازه‌خوری (۲ ساعت بعد از پخت) بیشترین حجم مخصوص و نمونهٔ حاوی ۱ درصد سوسپانسیون پوشش‌دهی‌شده بعد از ۴۸ ساعت ماندگاری نان کمترین حجم مخصوص را در مقایسه با نمونهٔ شاهد نشان داد (شکل ۴). Zhang و همکاران (۲۰۱۴) در استفاده از *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* Bb12 در فرمولاسیون نان افزایش حجم مخصوص را در طی گسترش مغز نان مشاهده کردند. در مطالعهٔ Altamirano-Fortoul و همکاران (۲۰۱۲) استفاده از مخلوط نشاسته و سوسپانسیون ریزپوشانی باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در تولید نان پروبیوتیک موجب کاهش حجم مخصوص نمونهٔ نان گردیده درحالی‌که به‌کارگیری از نشاسته به تنهایی و با تلفیق سوسپانسیون میکروانکپسولهٔ خشک‌شده به روش خشک‌کن پاششی اختلاف معنی‌داری با نمونهٔ شاهد نداشت.



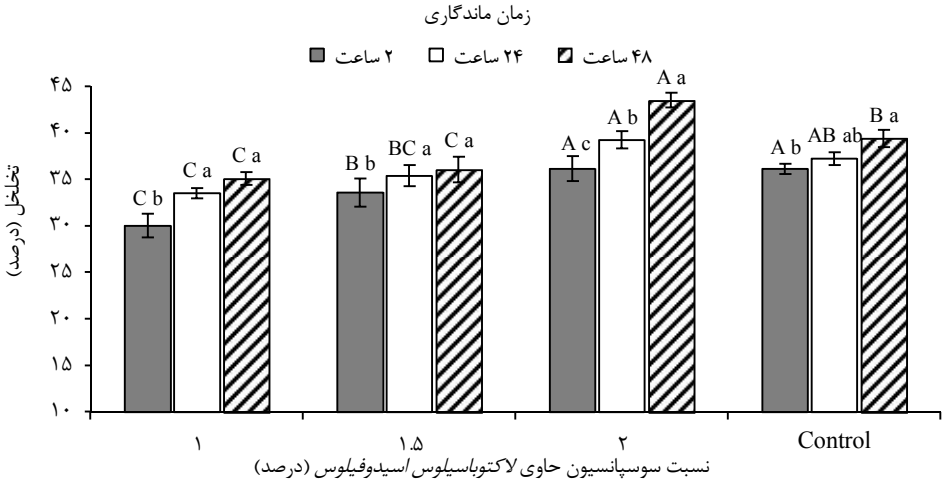
شکل ۴- ارزیابی حجم مخصوص نان حاوی *باسیلوس کواگولانس* در طول مدت ماندگاری

حروف غیریکسان بزرگ (A-B)، نشانگر تفاوت معنی‌داری نمونه‌های با نسبت سوسپانسیون مختلف از *باسیلوس کواگولانس* در سطح (α=۰/۰۵) در هر روز از زمان ماندگاری می‌باشد. همچنین نتایج آنالیز انجام‌شده با حروف کوچک (a-b-c) نمایانگر اختلاف معنی‌داری با یک نسبت سوسپانسیون ثابت در طول مدت ماندگاری را نشان می‌دهد (P≤۰/۰۵).

Zhang و همکاران (۲۰۱۴) به بررسی زنده‌مانی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* Bb12 در طول فرایند پخت و بررسی خصوصیات کیفی نان پرداختند، نتایج نشان داد، با افزایش زمان پخت حجم مخصوص نان پروبیوتیک تلقیح‌شده با سویهٔ ذکرشده در مقایسه با نمونهٔ شاهد روند افزایشی داشت.

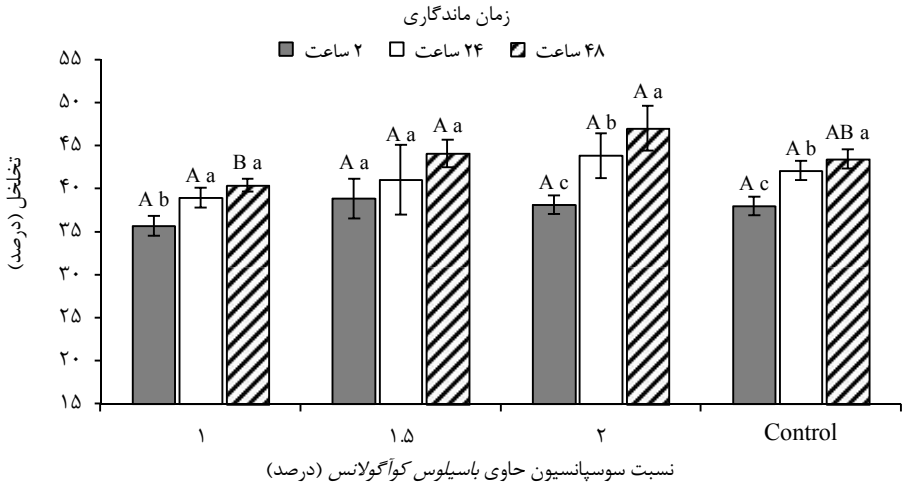
همچنین نتایج حاصل از بررسی شاخص تخلخل نان پروبیوتیک نشان داد (شکل ۵ و ۶) که افزایش سوسپانسیون زندهٔ باکتری ریزپوشانی‌شده به همراه نشاستهٔ خوراکی سبب افزایش جزئی تخلخل نان نسبت به نمونهٔ نان شاهد شد درحالی‌که آنالیز واریانس و مقایسهٔ میانگین عدم معنی‌داری در سطح اطمینان ۵ درصد را تأیید نمود (P≥۰/۰۵). درحالی‌که تأثیر زمان ماندگاری تا سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری در هر دو سویهٔ پروبیوتیک را در مقایسه با نمونهٔ شاهد ایجاد نمود (P≤۰/۰۵). براین‌اساس

نمونهٔ حاوی ۲ درصد سوسپانسیون ریزپوشانی (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کواگولانس*) بعد از ۴۸ ساعت بالاترین تخلخل و تیمار ۱ درصد در حالت تازه‌خوری به همراه نمونهٔ شاهد کمترین مقادیر تخلخل را به خود اختصاص دادند. همچنین طی گذشت زمان به‌دلیل ازدست‌دادن رطوبت، ساختار نان فشرده و شکننده شده و تخلخل موجود در بافت نان مقاومت کافی جهت نگهداری دی‌اکسید کربن در شبکهٔ گلوتنی را نداشته و گاز در نان به‌طور مناسب توزیع نمی‌گردد و این ناهماهنگی در اندازهٔ حفره‌های موجود در بافت نان سبب تغییر در مقادیر تخلخل در برخی از نمونه‌های نان مسطح می‌گردد.



شکل ۵- ارزیابی تخلخل نان حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در طول مدت ماندگاری

حروف غیریکسان بزرگ (A-B)، نشانگر تفاوت معنی‌داری نمونه‌های با نسبت سوسپانسیون مختلف از *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در سطح (α=۰/۰۵) در هر روز از زمان ماندگاری می‌باشد. همچنین نتایج آنالیز انجام‌شده با حروف کوچک (a-b-c) نمایانگر اختلاف معنی‌داری با یک نسبت سوسپانسیون ثابت در طول مدت ماندگاری را نشان می‌دهد ($P\leq$۰/۰۵).



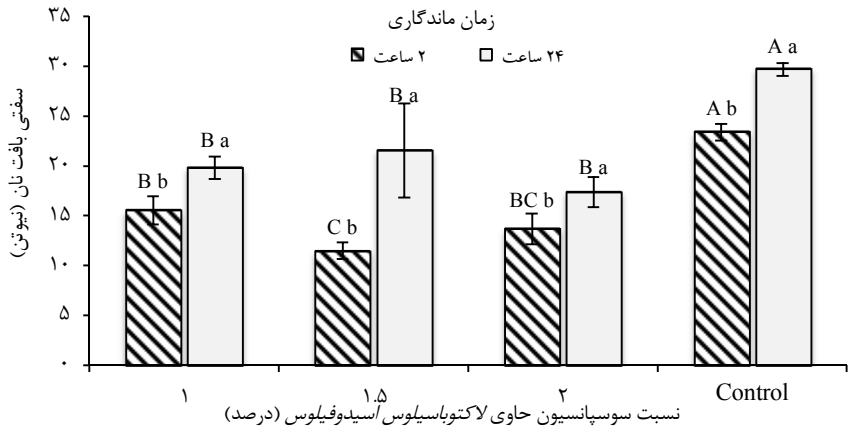
شکل ۶- ارزیابی تخلخل نان حاوی *باسیلوس کواگولانس* در طول مدت ماندگاری

حروف غیریکسان بزرگ (A-B)، نشانگر تفاوت معنی‌داری نمونه‌های با نسبت سوسپانسیون مختلف از *باسیلوس کواگولانس* در سطح (α=۰/۰۵) در هر روز از زمان ماندگاری می‌باشد. همچنین نتایج آنالیز انجام‌شده با حروف کوچک (a-b-c) نمایانگر اختلاف معنی‌داری با یک نسبت سوسپانسیون ثابت در طول مدت ماندگاری را نشان می‌دهد ($P\leq$۰/۰۵).

نتایج حاصل از پژوهش Razavizadegan jahromi و همکاران (۲۰۱۳)، نشان داد که ساختار گلوتن خمیر نان در طول مدت ماندگاری ضعیف‌تر و باعث کشش‌پذیری بیشتر آن می‌شود که این امر نگهداری گاز را کاهش‌داده و درنتیجه باعث سفت‌شدن و شکننده‌شدن بافت نان تولیدی می‌گردد. این امر سبب افزایش میزان تخلخل بافت نمونه‌های تولیدی در طی مدت ماندگاری می‌گردد (Shehzad *et al*., 2010). احتیاطی و همکاران (۱۳۸۷)، به بررسی تصاویر مغز نان بربری غنی‌شده با ترکیبات فراسودمند به کمک نرم‌افزار پردازش تصویر پرداختند، نتایج نشان داد، با افزایش زمان ماندگاری و توسعهٔ تغییرات فیزیکوشیمیایی در بافت نان، تخلخل آن کاهش پیدا می‌کند. این تغییرات محسوس در ساختار نان مسطح و نیمه‌حجیم به‌دلیل هوای کمتر مشهود بود.

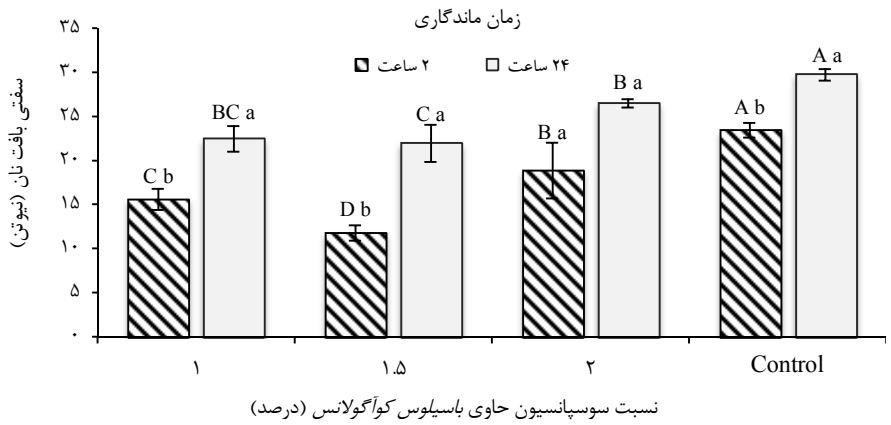
ارزیابی سفتی بافت نان

سفتی نشان‌دهندهٔ نیروی اعمال‌شده برای گاززدن و یا مقاومت بافت نان در برابر نیروی اعمال‌شده بدون تخریب اساسی آن است. نتایج مربوط به آن در طول دورهٔ نگهداری (۲۴ ساعت بعد از پخت) در شکل (۷ و ۸) آمده است. همان‌طورکه نشان‌داده افزایش سوسپانسیون‌های پروبیوتیک روند مشخصی در تغییرات بافتی نان نشان نداند ($P\geq$۰/۰۵) درحالی‌که در بین نمونه‌های نان پروبیوتیک تولیدی تلقیح‌شده با *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کوآگولانس* به‌ترتیب نمونهٔ حاوی ۲ درصد و ۱/۵ درصد سوسپانسیون، سفتی کمتری در مقایسه با سایر نسبت‌های پروبیوتیک داشتند. باتوجه‌به آنالیز واریانس و مقایسهٔ میانگین تیمارهای ذکرشده نمونهٔ حاوی ۱/۵ درصد سوسپانسیون *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در حالت تازه‌خوری کمترین و بیشترین سفتی را روی بافت نان در حالت تازه‌خوری و طی یک‌شبانه‌روز نگهداری در مقایسه با نمونهٔ شاهد نشان داد. همچنین نمونهٔ حاوی ۱/۵ درصد سوسپانسیون ریزپوشانی در باکتری *باسیلوس کوآگولانس* در حالت تازه‌خوری و ۲ درصد ریزپوشانی در طول نگهداری به‌ترتیب کمترین و بیشترین سفتی را در مقایسه با نمونهٔ شاهد نشان داد ($P\leq$۰/۰۵).



شکل ۷- ارزیابی سفتی بافت نان حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در طول مدت ماندگاری

حروف غیریکسان بزرگ (A-B)، نشانگر تفاوت معنی‌داری نمونه‌های با نسبت سوسپانسیون مختلف از *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در سطح (α=۰/۰۵) در هر روز از زمان ماندگاری می‌باشد. همچنین نتایج آنالیز انجام‌شده با حروف کوچک (a-b-c) نمایانگر اختلاف معنی‌داری با یک نسبت سوسپانسیون ثابت در طول مدت ماندگاری را نشان می‌دهد ($P\leq$۰/۰۵).



شکل ۸- ارزیابی سفتی بافت نان حاوی *باسیلوس کواگولانس* در طول مدت ماندگاری

حروف غیریکسان بزرگ (A-B)، نشانگر تفاوت معنی‌داری نمونه‌های با نسبت سوسپانسیون مختلف از *باسیلوس کوآگولانس* در سطح (α=۰/۰۵) در هر روز از زمان ماندگاری می‌باشد. همچنین نتایج آنالیز انجام‌شده با حروف کوچک (a-b-c) نمایانگر اختلاف معنی‌داری با یک نسبت سوسپانسیون ثابت در طول مدت ماندگاری را نشان می‌دهد (P≤۰/۰۵).

یوسفی و همکاران (۱۳۹۵) در بررسی سفتی بافت نان پروبیوتیک دریافتند که ریزپوشانی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A7 توسط آلژینات سدیم و نشاستهٔ ذرت سبب ایجاد بافت نرم‌تری در مقابل نمونهٔ شاهد گردید. Altamirano-Fortoul و همکاران (۲۰۱۲) به ارزیابی استفاده از مخلوط نشاسته و سوسپانسیون میکروانکپسولهٔ باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در تولید نان پرداختند، نتایج حاصل از پژوهش محققین فوق نشان داد که مخلوط نشاسته و سوسپانسیون میکروانکپسولهٔ باکتری سبب کاهش نیروی لازم برای فشردگی بافت نمونهٔ نان می‌گردد. Guarda و همکاران (۲۰۰۴) بیان کردند هیدروکلوئیدهایی که در تلفیق با باکتری پروبیوتیک ریزپوشانی‌شده، استفاده می‌گردد شامل پلی‌ساکاریدهای محلول در آبی هستند که با تأثیر بر ساختار نشاستهٔ نان، باعث توزیع و حفظ بهتر آب و متعاقباً کاهش سفتی مغز نان نسبت به نمونهٔ شاهد می‌شوند.

ارزیابی نتایج آزمون رنگ‌سنجی نان‌های تولیدی

نتایج آزمون رنگ‌سنجی پوستهٔ نان پروبیوتیک تحت‌تأثیر تیمار باکتری‌های ریزپوشانی‌شده، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* شمارهٔ (۱) و *باسیلوس کوآگولانس* شمارهٔ (۲) به همراه نشاستهٔ خوراکی ۵ درصد در طول مدت ماندگاری نیز در جدول (۲) ارائه شده است. آنالیز واریانس و مقایسهٔ میانگین آزمون رنگ‌سنجی نان‌های تولیدی در سطح ۵ درصد نشان داد که در محدودهٔ شرایط اعمال‌شده در این پژوهش، تأثیر معنی‌داری (P≤۰/۰۵) بر میزان شاخص‌های رنگ (L^*، a^* و b^*) نان در طی ۴۸ ساعت نگهداری داشتند. به‌طوری‌که با افزایش نسبت سوسپانسیون از میزان روشنایی رنگی پوستهٔ نان نسبت به نمونهٔ شاهد کاهش یافت و همچنین تأثیر مدت ماندگاری تأثیر مستقیم در افزایش روشنایی نمونهٔ تیمارهای حاوی هر دو سوسپانسیون (۱ و ۲) نان داشت. علاوه‌بر این بر میزان ΔE که نشان‌دهندهٔ برآیند تغییرات کلّی رنگ نان نسبت به نمونهٔ شاهد بوده، روند افزایشی با تأثیر تیمارهای ذکرشده در طول مدت ماندگاری در سوسپانسیون نمونهٔ اول حاوی باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* با شمارهٔ (۱) داشت. درحالی‌که در سوسپانسیون حاوی باکتری (۲) در طول مدت ماندگاری از روند مناسبی پیروی نکرد.

رنگ پوستهٔ نان در اثر واکنش مایلارد تشکیل می‌شود، در اثر ترکیب مواد ازته با مواد احیاکننده، در لایهٔ سطحی عمل قهوه‌ای‌شدن اتفاق می‌افتد. مقداری از رنگ پوستهٔ نان مربوط به کارامیلیزه‌شدن قندهاست، براین‌اساس شدت رنگ مربوط به مقدار مواد مؤثر و شرایطی که این مواد تحت آن وارد عمل

می‌شوند، نظیر دما و سرعت ازدست‌رفتن آب سطح پوستهٔ نان و شدت رنگ تأثیر زیادی دارد (Costa de Conto *et al.*, 2012). Altamirano-Fortoul و همکاران (۲۰۱۲)، در تولید نان پروبیوتیک کاهش شاخص روشنایی را مشاهده کردند و علت آن را استفاده از روش خشک‌کن پاششی و تورم نشاسته بیان نمودند، به‌طوری‌که بعد از متورم‌شدن نشاسته میزان عبور نور از میان گرانول‌ها بیشتر و درنتیجه میزان انعکاس آن کمتر می‌شود که این می‌تواند دلیلی برای کاهش روشنایی باشد. ازطرفی حضور نشاسته باعث کاهش مقادیر شاخص‌های a^* و b^* گردید.

جدول ۲ - بررسی نتایج آزمون رنگ‌سنجی نان پروبیوتیک طی مدت ماندگاری

نوع باکتری	درصد سوسپانسیون	مدت ماندگاری	شاخص رنگی پوستهٔ نان			
			L^*	a^*	b^*	ΔE
شاهد	۰	۲	۴۸/۳۲±۰/۶۸^{cd}	۱۰/۵۶±۰/۵۶^{b}	۲۰/۷۹±۱/۹۶^{b}	-
شاهد	۰	۲۴	۴۹/۵۴±۰/۵۱^{cd}	۱۱/۲±۰/۲^{ab}	۲۲/۴۳±۱/۲۴^{ab}	-
شاهد	۰	۴۸	۵۱/۸۱±۱/۳^{bc}	۱۱/۹±۱/۴^{ab}	۲۳/۱۳±۲/۱۱^{a}	-
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (کد ۱)		۲	۵۴/۳۲±۱/۲^{b}	۱۰/۵۹±۱/۰۶^{bc}	۲۰/۴۶±۰/۹۸^{b}	۵/۹۸±۱/۴۷^{bc}
۱	۱	۲۴	۵۶/۲۷±۲/۸۴^{ab}	۱۱/۴±۰/۸۱^{ab}	۲۱/۸۵±۱/۰۴^{ab}	۷/۵۷±۳/۴۴^{ab}
۱		۴۸	۵۸/۶۱±۲/۲۴^{a}	۱۲/۱۱±۱/۰۰۶^{a}	۲۱/۸۲±۱/۵۱^{ab}	۱۰/۳۰±۳/۰۶^{a}
۱		۲	۴۵/۲۷±۱/۲^{d}	۹/۴۱±۰/۹۸^{a}	۱۹/۷۶±۱/۴۹^{bc}	۴/۶۳±۲/۳۲^{c}
۱	۱/۵	۲۴	۵۴/۴۵±۱/۱۳^{b}	۱۱/۳۸±۱/۴۲^{ab}	۱۹/۹۹±۳/۰۴^{bc}	۵/۸۰±۰/۶۲^{bc}
۱		۴۸	۵۶/۰۱±۱/۳۹^{ab}	۱۱/۲۴±۰/۴۷^{ab}	۲۰/۷۳±۱/۰۱^{b}	۷/۱۷±۱/۷۶^{b}
۱		۲	۴۶/۶۴±۱/۸۵^{cd}	۹/۲۷±۱/۹۲^{c}	۲۱/۴۱±۳/۰۵^{ab}	۳/۱۸±۱/۶۳^{cd}
۱	۲	۲۴	۵۲/۶۲±۱/۸۲^{bc}	۱۱/۳۷±۱/۴۰^{ab}	۱۸/۷۱±۳/۰۶^{b}	۴/۷۷±۱/۷۶^{cd}
۱		۴۸	۵۰/۱۳±۲/۰۵^{c}	۱۱/۶۳±۱/۵^{ab}	۲۰/۷۶±۳/۷۰^{b}	۲/۹۱±۱/۸۲^{d}
باسیلوس کوآگولانس (کد ۲)		۲	۴۶/۱۸±۰/۹۹^{cd}	۱۰/۳۶±۰/۷۵^{bc}	۲۰/۷۹±۱/۴۷^{b}	۱/۰۴±۰/۳۳^{e}
۲	۱	۲۴	۵۲/۶±۱/۴۵^{bc}	۱۱/۵۴±۰/۹۲^{ab}	۲۳/۴۲±۱/۰۳^{a}	۷/۳۴±۲/۰۸^{ab}
۲		۴۸	۵۴/۳۲±۱/۳۵^{b}	۱۲/۰۸±۰/۵۷^{a}	۲۳/۱۵±۱/۶۱^{a}	۹/۰۶±۱/۶۶^{a}
۲		۲	۴۰/۲۲±۱/۱۵^{e}	۹/۴۰±۰/۳۷^{c}	۲۰/۳۵±۰/۸۳^{b}	۶/۱۶±۱/۲۱^{c}
۲	۱/۵	۲۴	۴۸/۵۸±۰/۵۱^{cd}	۱۰/۹۶±۰/۳۴^{ab}	۲۱/۵۳±۰/۶۰^{ab}	۲/۷۵±۲/۰۳^{c}
۲		۴۸	۵۱/۲۳±۱/۰۵^{bc}	۱۱/۷۷±۰/۷۶^{c}	۲۳/۲۸±۰/۶۱^{a}	۶/۰۳±۲/۵۶^{c}
۲		۲	۳۹/۵۴±۰/۸۳^{e}	۹/۶۵±۰/۴۱^{c}	۱۹/۰۹±۱/۰۱^{c}	۶/۸۶±۱/۲۷^{c}
۲	۲	۲۴	۴۴/۵۵±۰/۸۵^{de}	۱۰/۰۳±۰/۱۵^{bc}	۲۱±۰/۹۹^{ab}	۲/۴۸±۱/۰۸^{c}
۲		۴۸	۴۷/۱۱±۰/۷۳^{cd}	۱۰/۸۴±۰/۰۶^{ab}	۲۰/۳۳±۱/۸۵^{b}	۱/۸۶±۱/۰۳^{c}

نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر، بهبود ویژگی‌های تغذیه‌ای، سلامتی نان و غنی‌سازی آن با ترکیبات مختلف با هدف ارتقاء ارزش غذایی، کیفیت محصول و بهبود ویژگی‌های فراسودمند و استفاده از پروبیوتیک‌ها و ترکیبات پری‌بیوتیک در فراوردهٔ نانوایی نیز موردتوجه محققین قرار گرفته است. براین‌اساس تکنیک ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها ضمن بقاء و تجمع در دستگاه گوارش، اثرات فیزیولوژیکی مثبتی بر مصرف‌کننده داشته و به‌عنوان یک راهکار در جهت تحمل نمونه‌های غذایی پوشش‌دهی‌شده در شرایط شبیه‌سازی سیستم گوارش و تنش‌های حرارتی بعد از فرایند پخت خواهد بود. براساس نتایج حاصل از این پژوهش، مدت ماندگاری سبب کاهش جمعیت میکروبی نان پروبیوتیک‌شده است به‌طوری‌که کاهش جمعیت در نمونهٔ ۱ درصد سوسپانسیون به‌مراتب شدیدتر بود. همچنین با

گذشت زمان در هر دو نمونهٔ نان حاوی سوسپانسیون میکروبی متفاوت، میزان حجم مخصوص و تخلخل نان به‌ترتیب روند کاهش و افزایش در مقایسه با نمونهٔ شاهد داشتند. با بررسی انجام‌شده نمونهٔ نان حاوی *باسیلوس کواگولانس* به مراتب نتایج مناسب‌تری را در مقایسه با سویهٔ دیگر داشت. در سال‌های اخیر سیاست‌گذاری‌های مسئولان نیز در جهت تولید نان‌هایی با کیفیت بالا و نیز تولید نان‌هایی باارزش تغذیه‌ای فراتر از یک نان استاندارد بوده است تا باتوجه‌به مصرف بالای این محصول در کشور ما، سطح سلامت جامعه با تولید نان‌هایی باارزش تغذیه‌ای بالاتر افزایش یابد.

تقدیر و تشکر

پژوهش حاضر بخشی از نتایج تحقیقاتی طرح پژوهشی با عنوان «بررسی اثر مکمل‌های اینولین و باکتری‌های ریزپوشانی‌شده بر خواص حسّی، رئولوژیکی و ماندگاری نان سین‌بیوتیک» کد ۲۴۰۹۳۰۰۱ اجراشده در مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی می‌باشد.

منابع

۱- احتیاطی، الف.، محبی، م. و شهیدی، ف. ۱۳۸۷. کاربرد پردازش تصویر در رنگ‌سنجی سطحی نان غنی‌شده با آرد سویا. مجموعه مقالات هجدهمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی، ۲۴-۲۵ مهرماه، مشهد.

۲- حسینی‌نژاد، م.، انوری، ح.، ژیانی، م. و عابدفر، ع. ۱۳۹۶. بررسی اثر استفاده از ترکیب پری‌بیوتیک اینولین بر ارزیابی حسّی و ویژگی‌های کیفی نان تافتون. نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی، ۶(۲): ۱۸۵-۱۹۸.

۳- سازمان ملی استاندارد ایران، ۱۳۸۲. غلات و فراورده‌های آن-نان بربری-آئین کار تولید. شمارهٔ ۵۸۰۹، چاپ اول.

۴- یوسفی، ه.، سلیمانیان‌زاد، ص. و شاهدی باغ‌خندان، م. ۱۳۹۵. ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها با روش امولسیون در تولید نان پروبیوتیک. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۴(۱۱): ۹۹ -۱۰۶.

5- AACC International. 2010. AACC methods P. 46-30. Approved methods of the American Association of Cereal Chemists. 11th Ed. The St. Paul.

6- Altamirano-Fortoul, R., Moreno-Terrazas, R., Quezada-Gallo, A., & Rosell, C.M. 2012. Viability of some probiotic coatings in bread and its effect on the crust mechanical properties. Food Hydrocolloids, 29(1):166-174.

7- Ananta, E., Volkert, M., & Knorr, D. 2005. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *lactobacillus rhamnosus* GG. International Dairy Journal, 15(4):399-409.

8- Costa de Conto, L., Oliveira, RS.P.., Martin, L.G.P., Chang, Y.K., & Steel, C.J. 2012. Effects of the addition of microencapsulated omega-3 and rosemary extract on the technological and sensory quality of white pan bread. LWT-Food Science and Technology, 45(1):103-109.

9- Doherty, S.B., Gee, V.L., Ross, R.P., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., & Brodkorb, A. 2010. Efficacy of whey protein gel networks as potential viability-enhancing scaffolds for cell immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* GG. Journal of Microbiological Methods, 80(3):231-241.

10- Fu, N., & Chen, X.D. 2011. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. Food Research International, 44(5):1127-1149.

11-Guarda, A., Rosell, C.M., Benedito, C., & Galotto, M.J. 2004. Different hydrocolloids as bread improvers and antistaling agents. Food hydrocolloids, 18(2):241-247.

12-Haralick, R.M., Shanmugam, K., & Dinstein, I. 1973. Textural features for image classification. IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics, 3(6):610-621.

13-Homayouni, A., Ehsani, M.R., Azizi, A., Yarmand, M.S., & Razavi, S.H. 2007. Effect of lecithin and calcium chloride solution on the microencapsulation process yield of calcium alginate beads. Iranian Polymer journal. 16(9):597-606.

14-Hossieninezhad, M., Hussain, M.A. & Britz, M.L. 2015. Stress response in probiotic *Lactobacillus casei*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 55 (6): 740-749.

15-Jackman, R.L., & Stanley, D.W. 1992. Area-and perimeter-dependent properties and failure of mature-green and red-ripe tomato pericarp tissue. Journal of Texture Studies, 23(4):461-474.

16-Kosin, B., & Rakshit, S.K. 2010. Induction of heat tolerance in autochthonous and allochthonous thermotolerant probiotics for application to white shrimp feed. Aquaculture, 306(1-4):302-309.

17-Majzoobi, M., Farahnaky, A., Nematolahi, Z., Mohamadi Hashemi, M., & Taghipour Ardakani, M.J. 2013. Effect of different levels and particle sizes of wheat bran on the quality of flat bread. Journal of Agricultural Science and Technology, 15(1):115-123.

18-Mokarram, R.R., Mortazavi, S.A., Habibi Najafi, M.B., & Shahidi, F. 2009. The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. Food Research International, 42(8):1040-1045.

19-Razavizadegan jahromi, S.M., Karimi, M., Tabatabaee yazdi, F., & Mortazavi, S.A. 2013. Response surface optimization of barbari bread-making process variables: interrelationship of texture, image and organoleptic characteristics; using image analysis for quality and shelf life prediction. Journal of Food Processing and Preservation, 38(4):1608-1621.

20-Rokka, S., & Rantamäki, P. 2010. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. European Food Research and Technology, 231(1):1-12.

21-Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J., & Mattila-Sandholm, T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. Journal of Biotechnology, 84(3):197-215.

22-Salehi, F., & Kashaninejad, M. 2015. Effect of drying methods on rheological and textural properties, and color changes of wild sage seed gum. Journal of Food Science and Technology, 52(11):7361-7368.

23-Seyedain-Ardabili, M., Sharifan, A., & Ghiassi Tarzi, B. 2016. The Production of Synbiotic Bread by Microencapsulation. Food Technology and Biotechnology, 54(1):52-59.

24-Shafiee, S., Motlagh, M.A., Didar, A.R., & Minaee, S. 2008. Investigation the effect of skin on mechanical behavior of apple. Journal of Food Technology, 6(2):86-91.

25-Shehzad, A., Chiron, H., Della Valle, G., Kansou, K., Ndiaye, A., & Reguerre, A.L. 2010. Porosity and stability of bread dough during proofing determined by video image analysis for different compositions and mixing conditions. Food Research International, 43(8):1999-2005.

26-Wu, Z., He, Y., Chen, L., Han, Y., & Li, C. 2014. Characterization of Raoultella planticola Rs-2 microcapsule prepared with a blend of alginate and starch and its release behavior. Carbohydrate Polymer, 110:259-267.

27-Zhang, L., Huang, S., Ananingsih, V.K., Zhou, W., & Chen, X.D. 2014. A study on *bifidobacterium lactis* bb12 viability in bread during baking. Journal of Food Engineering, 122:33-37.

28-Zheng, C., Sun, D.-W., & Zheng, L. 2006. Recent developments and applications of image features for food quality evaluation and inspection-a review. Trends of Food Science & Technology, 17(12):642-655.

29-Zuidam, N.J., & Nedovic, V.A. 2010. Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. P. 269-303. In V. Manojlovic, V.A. Nedovic, K. Kailasapathy, & N.J. Zuidam (eds.), Encapsulation of Probiotics for use in Food Products. Chapter 10. Springer, New York.

A Study on the Qualitative Characteristics and Microbial Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bacillus coagulans* in Probiotic Bread

Marzieh Hosseininezhad[1*], Abbas Abedfar[2]

1- Associate Professor, Department of Food Biotechnology, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran
*Corresponding author (m.hosseininezhad@rifst.ac.ir)
2- Ph.D Candidate, Department of Food Biotechnology, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran

Abstract

Nowadays, the role of nutrition in the health of gastrointestinal system is deemed as a key factor in the production of functional foods with probiotic bacteria especially in the bakery industry. Therefore, microencapsulation of probiotics and their survival during baking and gastrointestinal aggregation have positive physiology effects on consumers. The aim of the research was to study qualitative characteristics and microbial survival of probiotic bread produced with 1, 1.5 and 2% encapsulated microbial suspension along with edible starch 5% during 48 h. The results of this assessment showed that the time of storage reduced microbial population of the probiotic bread in such way that the *p*opulation decline in the 1% suspension was more severe. Also, in both samples containing different microbial suspensions, the specific volume decreased while the porosity increased within 48 ($P\leq 0.05$), compared to the control. Whereas, hardness of probiotic bread increased after of 24 h which was less than the control sample ($P\leq 0.05$). Moreover, the analysis of variance and mean comparison of colorimetric test showed a significant effect ($P\leq 0.05$) on the color indexes of (L^*, a^* and b^*) after 48 hours.

Keywords: *Bacillus Coagulans,* Encapsulation, *Lactobacillus Acidophilus,* Microbial Survival, Probiotic Bread