مقاله علمی پژوهشی/ نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۳۳ شماره ۱/ سال ۱۴۰۲/ صفحات ۱۱۱ تا ۱۲۷
DOI: 10.22034/FR.2022.51208.1832

تولید شکلات پروبیوتیک حاوی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* ریزپوشانی شده با آلژینات- پروتئین آب‌پنیر و بررسی خواص فیزیکی‌شیمیائی، حسی و میزان ماندگاری آن

حسن محرم‌پور [۱] و اکرم پزشکی نجف آبادی [۲]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۳/۳

[۱] فارغ التحصیل کارشناسی‌ارشد علوم‌وصنایع غذائی، گروه علوم‌وصنایع غذائی، دانشگاه جامع علمی و کاربردی شیرین عسل تبریز
[۲] دانشیار گروه علوم و صنایع غذائی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
*مسئول مکاتبه: Email: moharampour@shirinasal.com

چکیده

زمینه مطالعاتی: افزودن باکتری‌های پروبیوتیک می‌تواند منجر به بهبود کارائی بیشتر باکتری‌های روده‌ای شود. **هدف**: هدف از این مطالعه تولید شکلات پروبیوتیک و شکلات پروبیوتیک ریزپوشانی شده، بررسی و مقایسه خصوصیات شیمیایی، میکروبی و حسی آنها می‌باشد. **روش کار**: در این تحقیق باکتری پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* با استفاده از آلژینات سدیم و کنسانتره پروتئین آب پنیر ریزپوشانی شده و سپس شکلات پروبیوتیک با افزودن گونه پروبیوتیک مذکور در مرحله قبل از تمپرینگ تولید گردید . تـأثیر ناشـی از ریزپوشانی روی زنده مانی، pH، اسیدیته، مقدار رطوبت، سختی، فعالیت آبی، ویسکوزیته، تنش تسلیم و ویژگیهای حسی شکلات، در طول ۶۰ روز نگهداری در دمای C ° ۲۲در مقایسه با نمونه شکلات حاوی باکتری پروبیوتیک ریزپوشانی نشده و شکلات معمولی (نمونه شاهد) ارزیابی شد. **نتایج**: مقایسه دو نوع شکلات پروبیوتیک ریزپوشانی شده و نشده بیانگر وجود تفاوت معنی دار در فعالیت آبی، مقدار رطوبت، تنش تسلیم، ویسکوزیته و سختی بود. هـمچنـین افـزودن باکتری در حالت آزاد و ریزپوشانی شـده، تـأثیر معنـی داری روی بافـت، رنـگ، طعـم، تردی و احساس دهانی نداشت. تفاوت زنده‌مانی باکتریایی محصول حاوی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* ریزپوشانی شده در مقایسه با نوع آزاد بسیار ناچیز بود. نتایج ارزیابی زنده‌مانی در طی ۲۰ روز نگهداری و در دمای ۲۲ درجه سانتیگراد بیانگر آن بود که کاهش در تعداد باکتری‌های *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* رخ داده است ولی شمارش آنها همچنان در محدوده تعریف شده برای فراورده‌های پروبیوتیک (10^6 تا 10^7 سلول زنده در هر گرم) است. **نتیجه‌گیری نهائی**: تاثیر منفی قابل توجهی بر ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی، رئولوژیکی و حسی شکلات پروبیوتیک، شکلات پروبیوتیک ریزپوشانی شده و نمونه شاهد در طی دوره نگهداری دیده نشد و بنابراین نیازی به تغییر در شرایط تکنولوژیکی و دستگاهی و همچنین خرید تجهیزات اضافی برای تولید شکلات پروبیوتیک وجود ندارد.

واژگان کلیدی: *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*، ریزپوشانی، شکلات پروبیوتیک، آلژینات سدیم، کنسانتره پروتئین آب پنیر

مقدمه

امروزه نشان داده شده است که برخی از بیماری‌های انسان به فعالیت باکتری‌های روده مربوط است. رشد بیش‌ازحد باکتری‌های بیماری‌زا و چسبیدن آنها به دیواره روده بزرگ منجر به اسهال حاد، اختلالات روده-ای، سرطان روده و کولیت روده می‌شود (همایونی و همکاران ۲۰۱٤). باتوجه به اینکه رشد میکروب‌های روده به رژیم غذایی انسان وابسته است، می‌توان با انتخاب رژیم‌غذایی سالم مثل غذاهای فراسودمند پروبیوتیک، میکروفلورروده را به نفع باکتری‌های سلامت‌بخش تغییر داد وازاین طریق برخی از بیماری‌های انسان را درمان کرد (گیبسون و همکاران ۲۰۰٤، همایونی و همکاران ۲۰۱٤).

پروبیوتیک ها میکروارگانیسم های زنده‌ای هستند که درصورت مصرف به مقدار کافی، فواید سلامتی را برای مصرف کنندگان به ارمغان می آورند (تسودا و میاموتو ۲۰۱۰، نوشاد و همکاران ۱٤۰۱). مزایای سلامتی پروبیوتیک ها شامل جلوگیری از اسهال عفونی، کاهش سطح کلسترول در خون، کاهش علائم عدم تحمل لاکتوز، افزایش ایمنی در برابر بیماری های خاص و عمل به عنوان یک عامل ضد تومور و ضد سرطان است (فراکولاکی و همکاران ۲۰۲۱). کارایی باکتری‌های پروبیوتیک با ادغام آن‌ها در غذا، افزایش می‌یابد زیرا فعل و انفعالات انجام شده با اجزای غذا می‌تواند از آن‌ها در حین عبور از دستگاه گوارش محافظت کند (ویندرولا و همکاران ۲۰۱۱).

شکلات از لیکور کاکائو و شکر پخش شده در داخل کره کاکائو ساخته شده است (اسلام ذکیرول و همکاران ۲۰۲۲). که به چندین شکل مایع، نیمه جامد و جامد وجود دارد. یکی از مهمترین اجزای تشکیل دهنده آن پودر کاکائو است که ترکیب پیچیده ای از پروتئین ها، پلی ساکاریدها و لیپیدها است (جونا اوراکس و همکاران ۲۰۲۲). مردم در تمامی سنین و جوامع در سراسر جهان، شکلات مصرف می‌کنند. علاوه بر این بخش‌های لیپیدی شکلات که از کره کاکائو تشکیل شده که قادر به حفظ باکتری‌های پروبیوتیک است و باعث افزایش مزایای سلامتی می‌شود (پوسمیرس و همکاران ۲۰۱۰). در نتیجه، پتانسیل استفاده از ماتریس شکلات به عنوان حامل یا ریزپوشانی باکتری‌های پروبیوتیک غیرمنتظره نیست (حسین و همکاران ۲۰۲۰). در سال های اخیر، بازار جهانی غذاهای فراسودمند، به ویژه مکمل های حاوی پروبیوتیک، به سرعت در حال رشد و گسترش است.

در این شرایط، شرکت های مواد غذایی به طور مداوم به دنبال محصولات جدید و کاربردی هستند تا بتوانند در بازار جهانی رقابت کنند (دپلس مارکر و همکاران ۲۰۱۵). صنعت شیرینی پزی و شکلات، در حال حاضر تحت تأثیر افزایش تقاضا برای غذاهای کاربردی بویژه شکلات است که به مشتریان کمک می‌کند تا سلامت خود را بهبود بخشند (کونار و همکاران ۲۰۱٦). به نظر می رسد محبوبیت شکلات در سراسر جهان عمدتاً به دلیل توانایی آن در تحریک چیزهای شاد در مغز انسان و تحریک احساسات مثبت می‌باشد (گوناراتون و همکاران ۲۰۱۹). شایان ذکر است، شکلات شیری، به ویژه، به عنوان منبعی از انواع ترکیبات فعال فیزیولوژیکی با فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجه، مانند فلاونوئیدها و پلی فنول ها شناخته شده است (تودورویک و همکاران ۲۰۱۵).

بنابراین با توجه به اهمیت پروبیوتیک‌ها و غذاهای فراسودمند در بدن انسان و نبود مطالعات گسترده در زمینهٔ شکلات پروبیوتیک و خصوصیات آن، مطالعهٔ حاضر با هدف بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی، رئولوژیکی و حسی شکلات پروبیوتیک تولید شده با باکتری *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* ریزپوشانی شده که جز یکی از مهمترین باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشد، طراحی شده‌است.

مواد و روش‌ها

آماده سازی باکتری پروبیوتیک

باکتری *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* به صورت لیوفیلیزه از کلکسیون کشت میکربی شرکت تک ژن ایران خریداری شد. باکتری *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در ۱۸ میلی‌لیتر محیط کشت مایع MRS، با ۰/۰۵ ٪ ال سیستئین هیدروکلراید،(MRS اصلاح شده) برای ایجاد یک محیط بی‌هوازی، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت با استفاده از سیستم Gas Pak گرمخانه گذاری شد. سپس کشت‌ها به ۱۸۰ میلی‌لیتر MMRS (MRS اصلاح شده) منتقل و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت تحت شرایط بی‌هوازی گرمخانه گذاری شدند. پس از آن کشت ها با٤ بار انتقال به محیط کشت مایع MRS فعال شدند، و باکتری‌ها بوسیله سانتریفوژ در rpm ۱۵۰۰ و بمدت ۱۵ دقیقه جداسازی و دوبار با محلول استریل پپتون واتر ۰/۱ ٪ شسته شدند. غلظت نهایی باکتری‌ها 1×10^{9} Cfu/ml تنظیم گردید (زمردی و همکاران ۲۰۱۰).

آماده سازی محلول ریزپوشانی

محلول سازنده ریزپوشانی ایزوله پروتئین آب پنیر طبق روش چابوک و تللی اوغلی (۲۰۱۵) با اندکی تغییرات تهیه شد. بدین ترتیب ابتدا محلول ۸ درصد ایزوله پروتئین آب پنیر تهیه و جهت ایجاد شدن انعقاد پروتئینی، برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد، گرم و پس از آن تا دمای محیط سرد شد. جهت تهیه محلول سازنده دیواره آلژینات، ابتدا محلول ۲ درصد آلژینات در آب مقطر استریل تهیه و پس از استریلیزاسیون (در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه) سرد گردید.

ریزپوشانی

از روش اکستروژن برای میکروانکپسوله کردن باکتری ها استفاده شد. پس از شستشو، کشت ها در ۵ میلی لیتر محلول پپتون ۰/۱ درصد استریل تعلیق شدند و با ۲۰ میلی لیتر محلول آلژینات سدیم ۲ درصد وزنی/حجمی (که در ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل شده بود) و ۲۰ میلی لیتر محلول استریل ۸ درصد پروتئین آب پنیر مخلوط شدند. سوسپانسیون سلولی از طریق یک سوزن ۰/۱۱ میلی متری به ۰/۰۵ مولار کلسیم-کلراید استریل تزریق شد. دانه های تشکیل یافته به مدت ۳۰ دقیقه در آن حالت به منظور ژلی شدن، نگه داشته شدند. و سپس با محلول پپتون واتر ۰/۱ درصد استریل در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد شستشو داده شدند. پس از صاف کردن از کاغذ صافی استریل، دانه ها به پلیت های استریل منتقل شده و در فریزدرایر بمدت ۲روز و در دمای C ° ٦٥- جهت خشک شدن قرار گرفتند و پس از خشک شدن در شرایط استریل به صورت پودر درآمدند (زمردی و همکاران ۲۰۱۰).

تهیه نمونه‌های شکلات

برای تولید شکلات ابتدا مواد اولیه شکلات یعنی خمیر کاکائو، کره‌کاکائو، شکر، شیرخشک، مواد معطر و امولسیفایر با استفاده از یک سیستم دو غلتکی، باهم مخلوط شدند. سپس با استفاده ازدستگاه پنج غلتکی عمل کاهش اندازه ذرات تا حد ۳۰-۲۵ میکرون صورت می گیرد. هدف از انجام این کار، عدم احساس شنی مواد حین خوردن و نیز پخش و پراکندگی کامل تمامی اجزاء سازنده شکلات با یکدیگر جهت ایجاد طعم یکدست و مطلوب بود. عمل ورز دادن شکلات (کانچینگ) در مرحله بعد انجام گرفت تا توده به هم چسبیده شکلات را به یک مایع روان و سیال و یکدست تبدیل کند. مدت زمان این مرحله بین ۲۲-۱۰ ساعت می‌تواند متغیر باشد. نمونه‌ها توسط دستگاه تمپرینگ واجد شرایط دمایی شدند و در قالب‌های از جنس پلی‌کربنات ریخته و در یخچال در دمای ۵ درجه سلسیوس سرد شد. در نمونه‌های حاوی باکتری پروبیوتیک، باکتری‌های ریزپوشانی شده، به میزان ۱ درصد به شکل پودر در مرحله قبل از تمپرینگ که حاوی 10^{9} Cfu/g باکتری پروبیوتیک ریزپوشانی شده می باشد به مخلوط شکلات اضافه شد. سرانجام، نمونه‌های شکلات پس از قالب‌گیری ابتدا در سلفون‌های

OPP بسته‌بندی شد و سپس در ظروف در بسته تا زمان انجام آزمون‌ها در یخچال ۱۰-۱۵°C نگهداری شد.

تعیین زنده مانی باکتری پروبیوتیک در شکلات

در ابتدا ۱۰ گرم از شکلات پروبیوتیک در شرایط استریل برداشته شد با ۹۰ ml محلول سالین استریل کاملا هم زده شد. سپس ۲۰ دقیقه در بن ماری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده و پس از ذوب شکلات مجددا هم-زده شد تا محلول یکنواخت حاصل شود. سپس با استفاده از محیط کشت جامد MRS آگار، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت تحت شرایط بی‌هوازی با استفاده از سیستم Gas Pak رشد داده شد، شمارش باکتری ها در ۳ تکرار با دستگاه کلنی کانتر صورت گرفت (زمردی و همکاران ۲۰۱۰).

درجه زنده‌مانی

برای محاسبه درصد زنده‌مانی از رابطه زیر استفاده شد:

$$\text{درصد زنده مانی} = \frac{N}{N0} \times ۱۰۰$$

در رابطه فوق N لگاریتم تعداد باکتریهای زنده *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در ۱ گرم شکلات بعد از طی مدت زمان مشخص نگهداری و N_0 لگاریتم تعداد باکتریهای زنده بیفیدوباکتریوم در ۱ گرم شکلات تازه تولید شده می باشد (نبسنی و همکاران ۲۰۰۷).

تغییرات فعالیت آبی (a_w) در طی نگهداری

سنجش فعالیت آبی مطابق با روش استاندارد شکلات به شماره ۶۰۸ موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران ارزیابی شد. در این مطالعه با استفاده ازدستگاه a_w سنج فعالیت آبی شکلات سنجیده شد.

تغییرات اسیدیته شکلات در طی نگهداری

سنجش اسیدیته، در طی نگهداری شکلات تولید شده مطابق باروش استاندارد به شماره ۶۰۸ موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران انجام شد.

اندازه‌گیری pH

pH نمونه‌های تولید شده و شکلات شاهد در روزهای ۱، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ روز از مدت زمان نگهداری با استفاده از دستگاه pH متر، Metrohm اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری درصد رطوبت

برای اندازه‌گیری رطوبت نمونه‌های تولید شده و شاهد از روش مهربان و همکاران (۱۳۹۳) استفاده شد. در این روش ابتدا وزن اولیه نمونه را یادداشت شده سپس آن را درآون با دمای ۱۰۵ ° C قرار داده شد و در فواصل زمانی ۱۵ الی ۲۰ دقیقه تا رسیدن به یک وزن ثابت نگه داشته شد در نهایت وزن نهایی بعد از عمل خشک کردن را یادداشت شد و درصد رطوبت با توجه به رابطه زیر محاسبه می شود.

$$\text{درصد رطوبت} = \frac{\text{وزن نهائی} - \text{وزن اولیه}}{\text{وزن نهائی}} \times 100$$

اندازه‌گیری سختی بافت

در این روش قطعات شکلات درابعاد ۱۰۰×۲۰×۱۰ میلیمتری آماده شد و پس از ٦ ساعت نگهداری در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد داخل انکوباتور قرار گرفت سپس نمونه های آماده شده برای اندازه گیری سختی توسط دستگاه بافت سنج (مدل H50KS، ساخت شرکت هانسفیلد انگلستان) مجهز به سمباده ته صاف ۱/٦ میلیمتری و سرعت نفوذ۱/۵ میلی‌متر بر ثانیه تحت آزمون نفوذ قرار گرفت و نیروی حداکثر در عمق ٦ میلیمتری به عنوان شاخص سختی گزارش شد (مهربان و همکاران ۱۳۹۳).

آزمون ویسکوزیته و تنش تسلیم

شکلات ها قبل از اندازه گیری ویسکوزیته در دمای ٤۳ درجه سانتیگراد به مدت ۱ ساعت انکوبه شدند. ویسکوزیته نمونه شکلات در دمای ٤۳ درجه سانتی گراد و با سرعت (rpm) ۱۰۰ تعیین شد. ضمن اینکه از اسپیندل شماره ٤ برای این منظور استفاده شد (فونگ و همکاران ۲۰۱۳).

آزمون حسی

نمونه‌های شکلات پروبیوتیک به طور تصادفی با کدهای سه رقمی شماره‌گذاری شدند و همراه با پرسشنامه در اختیار ۱۰ نفرارزیاب شرکت شیرین عسل تبریز در گروه سنی ٤۷-۲۰ سال که آموزشهای لازم را دراین زمینه

دیده بودند، قرارگرفت. این پرسشنامه طعم، بو، رنگ، بافت و احساس دهانی مطلوب را بر اساس آزمون هدونیک ۵ سطحی از کیفیت عالی تا خیلی‌بد مورد ارزیابی قرار می‌دهد. ارزیابان در حد فاصل بین ارزیابی هر نمونه، آب ولرم نوشیدند. بطوری که نقطهٔ ۵ بسیار مطلوب(عالی)، ٤ خوب، ۳ نه خوب نه بد، ۲بد و ۱ خیلی نامطلوب است (لاتی پترونوویچ و همکاران ۲۰۱۵).

روش‌های آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها

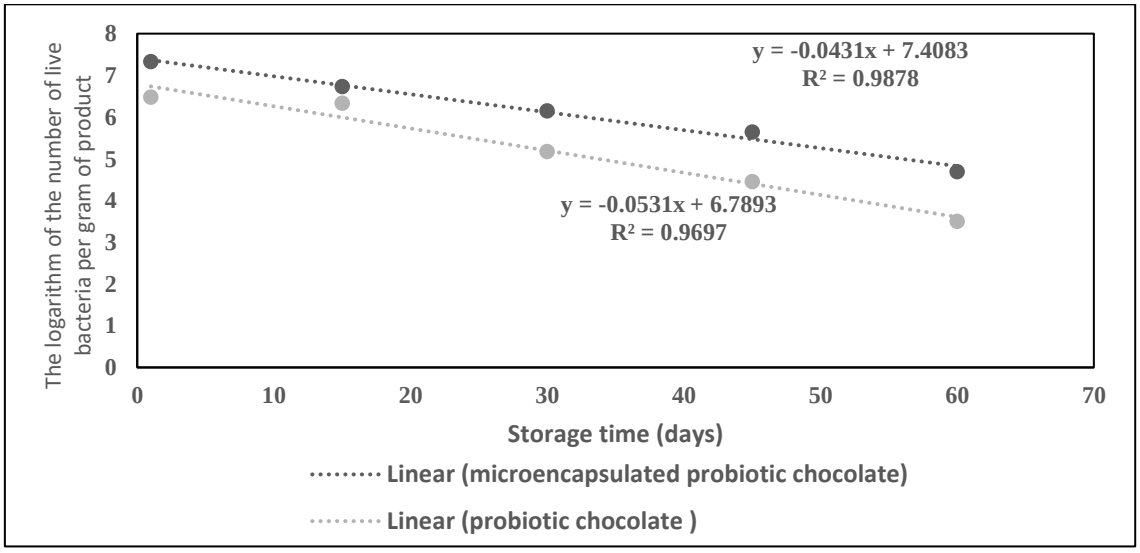
طراحی آزمایش‌ها با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار توسط نرم افزار SPSS 21 انجام پذیرفت. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده شد، ضمنا با توجه به اینکه در آزمایش یک شاهد یا کنترل بکار رفته است برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون های آماری LSD و دانکن ($P< 0.05$) نیز استفاده گردید. برای ارزیابی حسی آزمون‌های من ویتنی و کروسکال والیس به کار رفت. برای رسم نمودارها نیز از نرم افزار Excel مورد استفاده قرار گرفت.

در این پژوهش نمونه‌های شاهد، شکلات پروبیوتیک و شکلات پروبیوتیک ریزپوشانی شده تحت آزمون‌های شیمیایی و حسی قرار گرفتند. متغیرهای پژوهش شامل متغیرهای مستقل (زمان و نوع شکلات) و متغیرهای وابسته (فعالیت‌آبی، رطوبت، اسیدیته، سختی، ویسکوزیته، تنش تسلیم و pH) بودند که در حدود ٦۰ روز و در دمای $22\ ^{\circ}C$ نگهداری شده و در فواصل زمانی ۱۵ روزه و در ۳ تکرار مورد ارزیابی قرار گرفتند. ضمن اینکه آزمون حسی نیز در فواصل ۱۵ روزه انجام گرفت.

نتایج و بحث

ارزیابی زنده‌مانی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*

علاوه بر اهمیت زنده بودن پروبیوتیک‌ها، وجود تعداد زیادی از آنها در غذا نیز حائز اهمیت زیادی است. بدین دلیل که احتمال دارد تعداد پروبیوتیک‌ها در طول نگهداری غذا و عبور آن از مجرای گوارشی کاهش یابد. به منظور بهره مندی از ویژگی های سلامت زایی، پروبیوتیک‌ها باید به تعداد 10^{6} تا 10^{7} سلول زنده در هر گرم از فراورده‌های غذایی وجود داشته باشند (آدامز۱۹۹۹ وآراگان-آلجرو،۲۰۰۷).

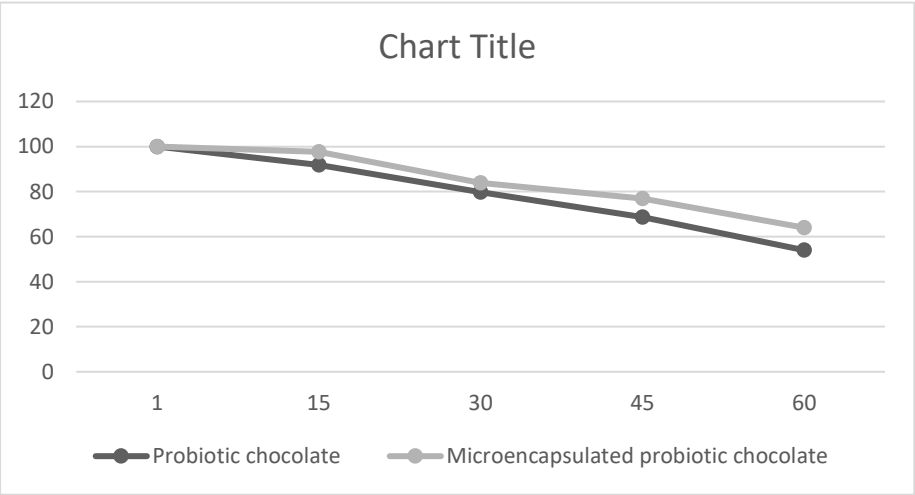


شکل ۱- روند کاهش *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* آزاد و ریزپوشانی شده در دو نوع شکلات در طی ۶۰ روز نگهداری در دمای ۲۲ °C

Figure 1- Reduction process of free and microencapsulated *Bifidobacterium bifidum* in two types of chocolate during 60 days of storage at 22 °C

نتایج شمارش باکتریایی با توجه به شکل ۱ برای شکلات پروبیوتیک از Cfu/gr ۷/۳۳ در روز اول به مقدار ٦/١٥Cfu/gr در روز سی‌ام و به مقدار Cfu/gr ٤/٦٩ در روزشصتم رسید که نشان می‌دهد که شکلات پروبیوتیک ریزپوشانی شده تا روز سی‌ام خاصیت پروبیوتیکی خود را حفظ کرده است. نتایج شمارش باکتریایی برای شکلات پروبیوتیک از مقدار Cfu/gr ٦/٤٨ به مقدار Cfu/gr ٦/٣٣ در روز پانزدهم و به مقدار Cfu/gr ٣/٥ در روز شصتم رسید که نشان می‌دهد که شکلات پروبیوتیک ریزپوشانی شده تا روز پانزدهم خاصیت پروبیوتیکی خود را حفظ کرده است. روند میزان زنده-مانی دو نوع شکلات در شکل ۱ نشان داده شده است.

شرایط نامناسب نگهداری ، فعالیت آبی کم و غلظت بالای مواد قندی تا حدی می‌تواند بر زنده مانی باکتری‌های پروبیوتیک تاثیرگذار باشد و در نتیجه میزان زنده مانی روند نزولی را طی می‌کند که شکل ۱ بیانگر این مورد می‌باشد. فرایند ریزپوشانی کردن نوعی نقش پوششی و ساختاری دارد. بدین معنی که با ایجاد ساختار یکپارچه و یکنواخت و پرکردن منافذ موجود در ساختار زنده مانی را افزایش می‌دهند. سولتانا و همکاران در سال(۲۰۰۰)، با استفاده از روش امولسیون، زنده مانی باکتری های پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ریزپوشانی شده با آلژینات کلسیم و نشاسته مقاوم ذرت را مورد مطالعه قرار دادند. هم چنین کپسول ها در نهایت با محلول گلیسرول، که یک ماده مقاوم در برابر سرماست، غوطه ور شده، که این امر منجر به بهبود قابلیت زنده مانی باکتری ها می شود . لازم به ذکر است که در تحقیق مذکور نیز از آلژینات کلسیم و نشاسته مقاوم ذرت ، به روش امولسیون برای ریز پوشانی *بیفیدوباکتریوم بروی* در شکلات استفاده شد و نتایج زنده مانی بیفیدوباکتریوم در دو حالت آزاد و ریزپوشانی شده حاکی از آن بود که ریزپوشانی تاثیر معنی داری بر زنده مانی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در طول مدت ۳۰ روز نگهداری در دمای ٤°C داشته است ($P<0.05$).



جدول ۲- درجه زنده‌مانی باکتری *بیفیدو باکتریوم بیفیدوم* در شکلات حاوی باکتری پروبیوتیک و شکلات حاوی باکتری پروبیوتیک ریزپوشانی شده

Table 2- Survival rate of probiotic bacteria in microencapsulated probiotic chocolate and encapsulated probiotic chocolate

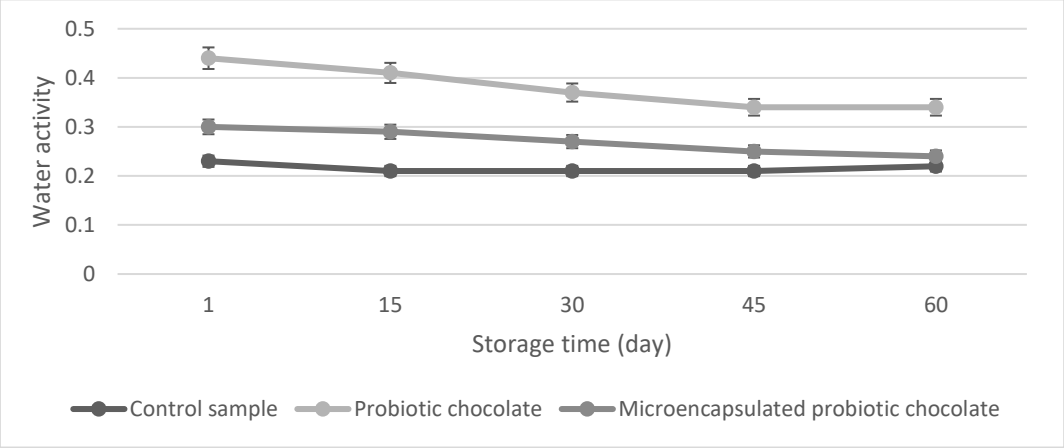
درجه زنده‌مانی

نتایج محاسبات زنده‌مانی برای دو نوع شکلات در جدول ۲ نشان داده شده است.

نتایج جدول فوق نشان داد که تا روز پانزدهم درجه زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در شکلات پروبیوتیک برابر با ۹۱/۸۷ ٪ است که در مقابل شکلات پروبیوتیک ریز پوشانی شده تولید شده برابر با ۹۷/۶۸ ٪ بود و تا روز شصتم درجه زنده‌مانی شکلات حاوی باکتری پروبیوتیک ریزپوشانی شده نسبت به شکلات حاوی باکتری پروبیوتیک بالاتر بود که نشان از نقش حفاظتی فرآیند ریزپوشانی باکتری پروبیوتیک است.

بررسی تغییرات فعالیت آبی (aw)

شکلات از جمله محصولاتی است که با افزایش میزان فعالیت آبی، میزان آسیب به محصول بیشتر و فساد محصول تسریع می‌شود و به همین جهت ضروری است که به مقدار aw توجه زیادی گردد. نتایج نشان دادند که شکلات پروبیوتیک نسبت به شکلات معمولی دارای فعالیت آبی بالاتری می‌باشد، اما به قدری نیست که بتواند موجب فعالیت باکتری پروبیوتیک در آن گردد ($P<0.05$). نتایج تغییرات فعالیت آبی (aw) شکلات در نمونه‌های شاهد، ریزپوشانی شده و ریز پوشانی نشده طی ۶۰ روز نگهداری در دمای $22\ ^{o}C$ درجه سانتی‌گراد درشکل ۳ نشان داده شده است. میزان فعالیت‌آبی(aw) برای نمونه حاوی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* ریزپوشانی شده بعداز ۶۰ روز نگهداری در دمای $22\ ^{o}C$، به۰/۲۴ رسید درحالی‌که برای نمونه شکلات حاوی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* به حالت آزاد بعد از۶۰ روزنگهداری دردمای $22^{o}C$ به۰/۳۴رسید.



شکل۳- تغییرات فعالیت آبی برای نمونه‌های مختلف شکلات در طی ۶۰ روز نگه‌داری

Figure 3- Water activity changes of chocolate samples in 60 days of storage

دلیل نتایج حاصل شده فوق به خاطر وجود مقادیر کمی آب در باکتریهای لیوفیلیزه می‌تواند باشد. داده های فوق بیانگر عدم تغییر گسترده در مقادیر فعالیت آبی در گونه پروبیوتیک و پروبیوتیک ریزپوشانی شده طی دوره نگه داری ۲ ماهه است که ممکن است به خاطر فعالیت نسبی تعدادی از پروبیوتیک ها و همچنین وجود میزان جزئی آب در مرحله آماده سازی باکتری‌های پروبیوتیک لیوفیلیزه باشد (نبسنی و همکاران، ۲۰۰۷). مهربان و همکاران در سال (۲۰۱۳) خصوصیات فیزیکی‌شیمیایی شکلات پروبیوتیک حاوی *لاکتوباسیلوس کازیی* را مورد ارزیابی قرار دادند که نتایج نشان دادند که شکلات پروبیوتیک نسبت به شکلات معمولی دارای فعالیت آبی بالاتری می باشد.

بررسی تغییرات اسیدیته

تغییرات اسیدیته برای نمونه‌های مختلف شکلات در شکل ٤ نشان داده شده است. نتایج فوق بیانگر این است که

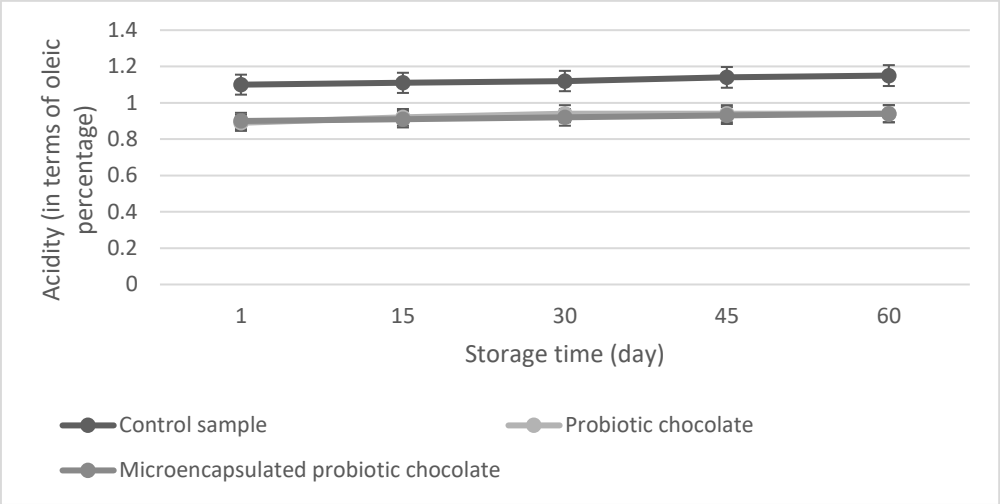
تغییرات اسیدیته برای نمونه شاهد بعد از طی ٦٠ روز نگهداری ١/١٤(بر حسب درصد اسید اولئیک) می‌باشد. این مقدار برای شکلات پروبیوتیک ریزپوشانی نشده از ۰/۸۹ در روز اول شروع شده و بعد از ٦٠ روز نگه داری به مقدار ۰/۹۵ (بر حسب درصد اسید اولئیک) می‌رسد که مشابه تغییرات اسیدیته برای نمونه ریزپوشانی شده است که به این معنی می‌باشد که روند تغییرات اسیدیته برای هر یک از نمونه ها معنی دار نمی باشد باکتری ها در محیط پایه شکلات در فاز کمون باقی می‌مانند لذا هیچگونه فعالیتی که موجب تولید محصولات اسید لاکتیکی شود و اسیدیته محصول را تحت تاثیر قرار دهد رخ نمی‌دهد (آراگون آلگرو و همکاران ۲۰۰۷).

زایزلیویچ و همکارانش در سال (۲۰۱۰) به بررسی اثر غنی‌سازی شکلات شیری با لاکتوباسیلوس های لیوفلیزه شده (*لاکتوباسیلوس کازئی* و *پارا کازئی*) بر روی ویژگیهای حسی، فیزیکی‌شیمیایی و رئولوژیکی آن پرداختند و نتایج تحقیق نشان داد که تفاوت معنی داری بین میزان اسیدیته شکلات معمولی و پروبیوتیک وجود ندارد.

نتایج این تحقیق با نتایج مطالعه انجام شده توسط آراگون- آلگرو و همکارانش در سال (۲۰۰۷) مطابقت داشت.

بررسی تغییرات pH

بررسی تغییرات pH نمونه های شکلات حائز اهمیت است زیرا تغییرات pH یکی از فاکتورهای تاثیرگذار بر کیفیت محصول و فساد و ماندگاری آن می باشد.مقادیر pH در طی دوره نگهداری برای نمونه‌های شکلات پروبیوتیک تقریبا روند ثابتی را نشان می‌دهد که در شکل ٥ نشان داده شده است.

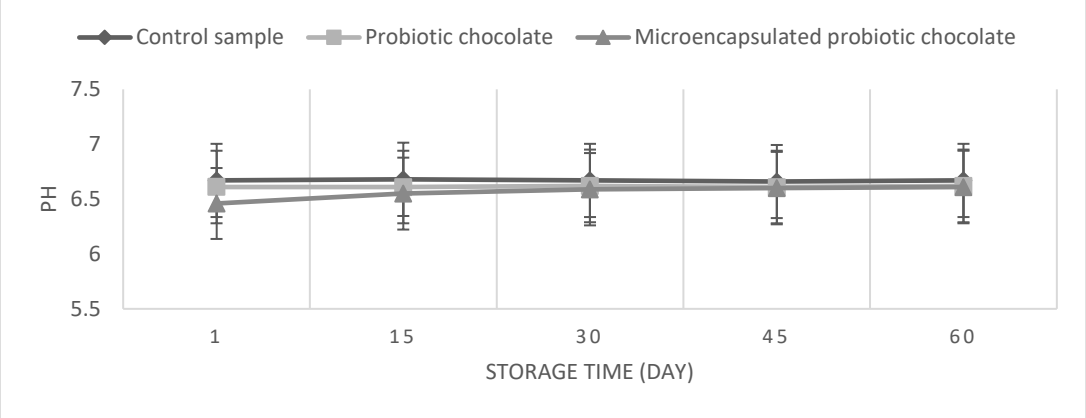


شکل ۴- تغییرات اسیدیته برای نمونه‌های مختلف شکلات در طی ۶۰ روز نگه‌داری
Figure 4- Acidity changes of chocolate samples in 60 days of storage

نتایج آزمون pH نشان می‌دهد که طول دوره ٦٠ روزه نگهداری درخصوص شکلات کنترل، پروبیوتیک و یا پروبیوتیک ریزپوشانی شده تغییرات pH معنی دار نیست.

بررسی نتایج فوق نشان داد که pH نمونه شاهد که در روز اول برابر با ٦/٦٨ بود با شیب تقریبا ثابتی به مقدار ٦/٦٧ در روز آخر رسید. تغییرات pH برای شکلات پروبیوتیک حاوی *بیفیدوباکتریم بیفیدوم* ریز پوشانی

نشده در روز اول برابر ٦/٦١ بود که در نمونه‌گیری آخر نیز همین مقدار را دارد، تغییرات pH برای شکلات پروبیوتیک حاوی *بیفیدوباکتریم بیفیدوم* ریز پوشانی شده در روز اول برابر ٦/٤٦ و در روز آخر به مقدار ٦/٦١ رسیده بود بررسی تغییرات pH از این لحاظ حائز اهمیت است که تغییرات pH از عوامل موثر بر کیفیت محصول، فساد و ماندگاری آن است و افزودن پروبیوتیک مذکور تاثیر منفی بر این پارامتر نداشت.



شکل ۵- نمودار تغییرات pH برای نمونه‌های مختلف شکلات در طی ۶۰ روز نگه‌داری

Figure 5- pH changes of chocolate samples in 60 days of storage

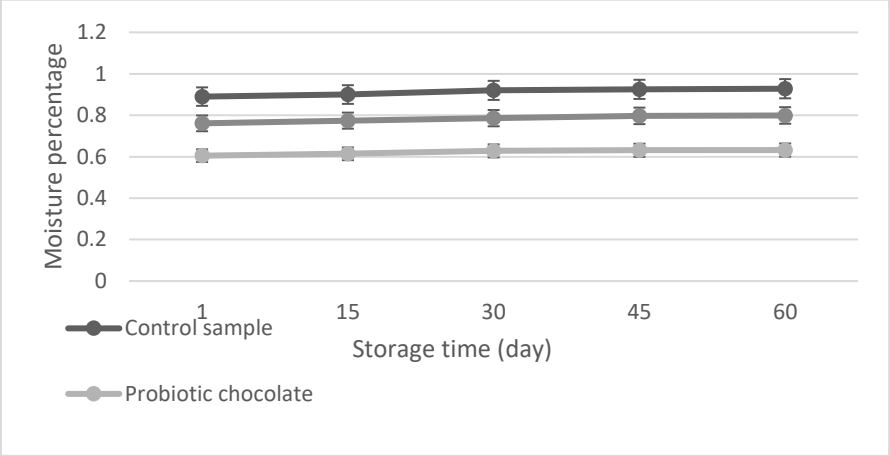
مطالعات مهربان و همکاران در سال (۱۳۹۳) در مورد افزودن *لاکتوباسیلوس کازئی* به شکلات نیز نشان داد که تغییرات معنی داری در pH مابین شکلات های پروبیوتیک و کنترل وجود نداشته که با نتایج مطالعات همایونی راد و همکاران در سال (٢٠١٤) مطابقت داشت که بیان کرده بودند که افزودن *لاکتوباسیلوس پارا کازئی* تاثیر معناداری بر روی pH ندارد.

بررسی تغییرات رطوبت

نتایج میانگین مقادیر مقدار رطوبت برای نمونه‌های شکلات شاهد، پروبیوتیک و پروبیوتیک ریزپوشانی شده در جدول ٦ نشان داده شده است. داده‌های فوق بیانگر این است که مقدار رطوبت نمونه شاهد از شکلات پروبیوتیک و شکلات پروبیوتیک ریزپوشانی شده کمتر است.

بالا بودن رطوبت شکلات پروبیوتیک ریزپوشانی شده در مقایسه با نوع بدون ریزپوشانی نشده احتمالا به خاطر وجود مواد جاذب الرطوبه، مانند (پروتئین آب پنیر) در دیواره می‌باشد که قابلیت جذب رطوبت بالایی داشته و باعث افزایش مقدار رطوبت می‌شوند. این نتایج با یافته های بدست آمده توسط زیزلویچ و همکاران در سال (٢٠١٠) که بر روی شکلات شیری غنی شده با سلولهای پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* و *پارا کازئی* انجام شد همخوانی داشت. آنها بیان نمودند که شکلات غنی شده با سلولهای لاکتوباسیلوس لیوفلیزه حاوی مواد جامد کمتری نسبت به شکلات معمولی بود.

در مطالعات انجام شده بر روی شکلات شیری پروبیوتیک و شکلات تلخ پروبیوتیک که باکتری ها به فرم لیوفلیزه به آن افزوده شده بودند نیز تفاوت کمی در مقدار رطوبت مشاهده شد که بعلت وجود مقدار جزئی آب در مرحله آماده سازی باکتریهای لاکتوباسیلوس لیوفلیزه بوده است (نبسنی و همکاران، ٢٠٠٧ و نبسنی و همکاران، ٢٠٠٥).



شکل ۶- تغییرات رطوبت نمونه‌های شکلات در طی ۶۰ روز نگه‌داری

Figure 6- Moisture changes of chocolate samples in 60 days of storage

بررسی تغییرات سختی بافت

سختی بافت در شکلات یکی از مهمترین خصوصیات فیزیکی‌شیمیایی محصول می‌باشد که هرچه میزان آن کمتر باشد در میزان بازار پسندی و مقبولیت آن تاثیر مثبتی دارد. سختی تحت عنوان نیروی مورد نیاز برای تحت فشار قرار دادن بین زبان و سقف دهان تعریف شده است و از نظر دیدگاه فیزیکی به عنوان حداکثر نیروی موردنیاز برای فشردن تعریف می‌شود. مقادیر سختی بافت در طی دوره نگهداری برای نمونه‌های شکلات پروبیوتیک، شکلات پروبیوتیک ریزپوشانی شده و شاهد در شکل ۷ نشان داده شده است.

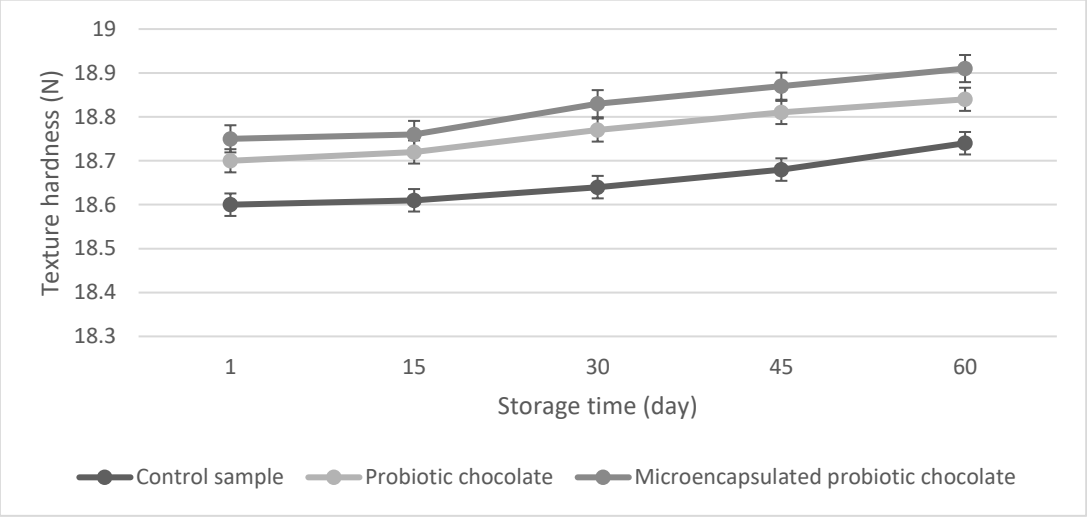
براساس نتایج حاصل از اندازه گیری سختی بافت بیشترین میزان سختی در شکلات پروبیوتیک ریزپوشانی شده (بعد از ٦٠ روز) و کمترین سختی در شکلات معمولی(بعد از۱ روز) مشاهده شد. که می‌تواند ناشی از اثرات حاصل از مواد مورد استفاده برای ریزپوشانی باشد ($P<0.05$).

نبسنی و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که افزایش در خصوصیات رئولوژیکی شکلات‌های حاوی باکتری پروبیوتیک تنها به دلیل وجود مقادیر کم رطوبت در آنها نمی باشد بلکه به وجود پروتئین موجود در این باکتریهای لیوفلیزه نیز ارتباط دارد.

بررسی تغییرات ویسکوزیته و تنش تسلیم شکلات

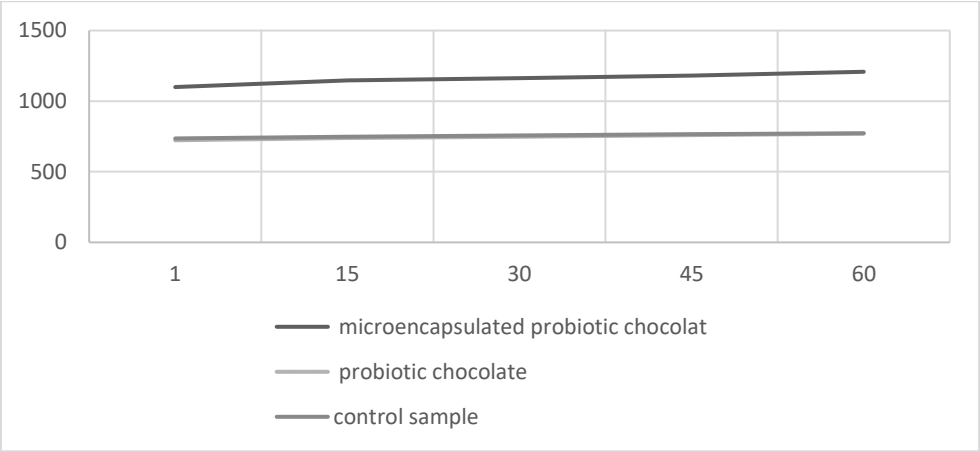
شکلات یک سیال غیرنیوتنی است که برای بررسی ویژگیهای رئولوژیکی شکلات دو پارامتر ویسکوزیته و آستانه تسلیم باید مورد توجه قرار گیرد. تحقیقات مختلف نشان داده‌اند که مقدار کره کاکائو و لستین موجود در شکلات تأثیر زیادی بر ویژگی سیالیت شکلات دارند. چربی اضافی باعث افزایش سیالیت و کاهش ویسکوزیته شکلات می‌گردد. شکلات ذوب شده سوسپانسیونی از ذرات شکر، کاکائو و یا پودر شیر خشک در یک فاز مداوم چربی کره کاکائو است و به علت حضور ذرات جامد در حالت ذوب شده ، مانند یک مایع واقعی رفتار نمی‌کند و خواص جریان غیر نیوتنی را نمایش می‌دهد و

ویسکوزیته آن بستگی به سرعت برشی، زمان و درجه حرارت دارد، تحقیقات مختلف نشان داده‌اند که مقدار کره کاکائو و لستین موجود در شکلات تأثیر زیادی بر ویژگی سیالیت شکلات دارند. چربی اضافی باعث افزایش سیالیت و کاهش ویسکوزیته شکلات می‌گردد (بکت ۱۹۹۹ و بکت ۲۰۰۰).



شکل ۷- نمودار تغییرات سختی بافت برای نمونه‌های مختلف شکلات در طی ۶۰ روز نگه‌داری

Figure 7- Texture hardness changes of chocolate samples in 60 days of storage

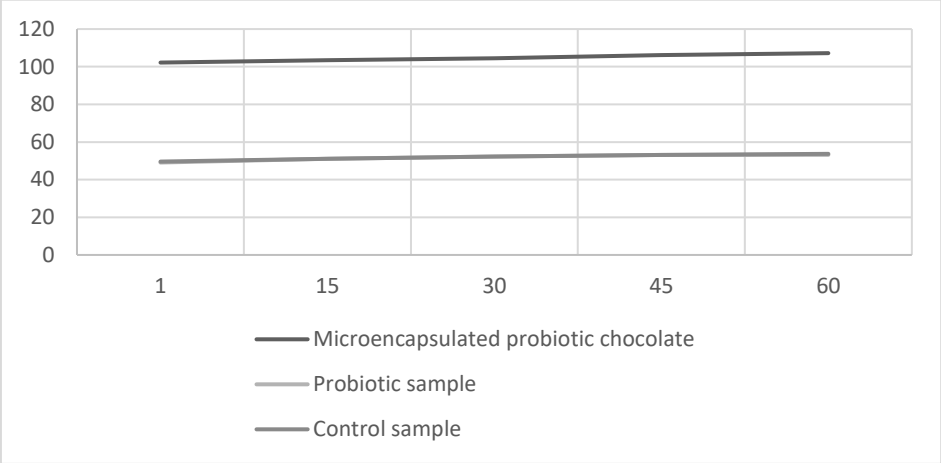


شکل ۸- تغییرات ویسکوزیته شکلات در طی ۶۰ روز نگه‌داری

Figure 8- Viscosity changes of chocolate samples in 60 days of storage

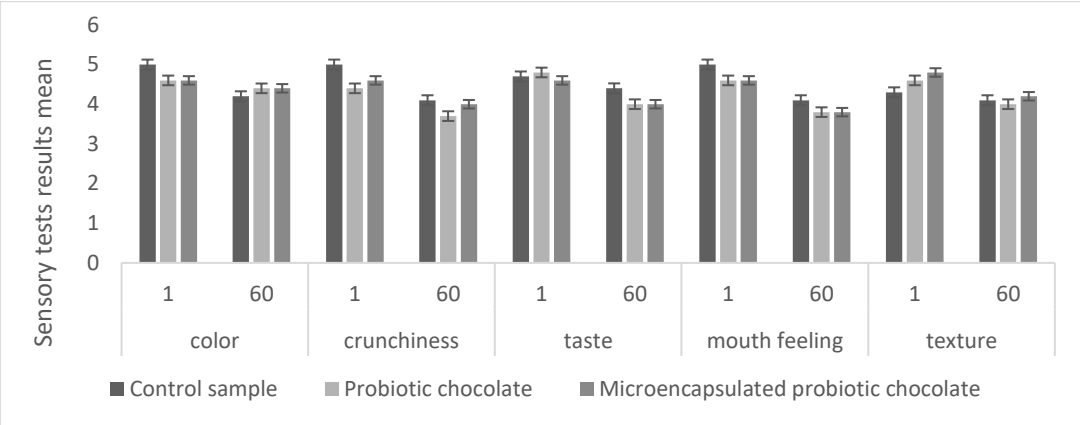
تغییرات ویسکوزیته در طی زمان در شکل ۸ و برای تنش تسلیم در طی زمان در شکل ۹ نشان داده شده اند. بررسی تغییرات ویسکوزیته در این تحقیق و نتایج حاصل از اندازه گیری ویسکوزیته نشان می‌دهند که احتمالا به خاطر وجود مواد جاذب الرطوبه، مانند (پروتئین آب پنیر) در دیواره می‌باشد که قابلیت جذب رطوبت بالایی داشته و باعث افزایش مقدار ویسکوزیته در نمونه پروبیوتیک و پروبیوتیک ریزپوشانی شده می- شود. احتمالا با توجه در نتیجه قابلیت جذب رطوبت بالا توسط آن، ویسکوزیته و تنش تسلیم نمونه پروبیوتیک بالاتر از شکلات شاهد می‌باشد ($P< 0.05$).

زیزلویچ و همکاران (۲۰۱۰) نیز به نتیجه مشابهی دست یافتند و بیان نمودند که مقدار ویسکوزیته و تنش حد شکلات شیری غنی شده با لاکتوباسیلوس لیوفیلیزه شده کمی بالاتر از شکلات شیری معمولی می باشد که این افزایش پارامترهای رئولوژیکی به طور عمده به دلیل بالا بودن رطوبت نسبی لاکتوباسیلوس های لیوفیلیزه (۱۰۰ گرم/۵ گرم) می باشد.



شکل ۹- تغییرات تنش تسلیم نمونه‌های شکلات در طی ۶۰ روز نگه‌داری

Figure 9- Yield value changes of chocolate samples in 60 days of storage



شکل ۱۰- نتایج ارزیابی حسی نمونه های شکلات در طی ۶۰ روز نگهداری

Figure 10- Sensory evaluation results of chocolate samples in 60 days of storage

چتانا و همکاران (۲۰۱۳) نیز به نتیجه مشابه‌ای دست یافتند ودر مطالعه آنها ، هیچ گونه تفاوت معناداری در مقدار ویسکوزیته پلاستیک و تنش حد شکلات شیری پروبیوتیک تولید شده توسط جایگزینی پودر شیر خشک به ۵۰ درصد پودر ماست در مقایسه با شکلات شیری کنترل یافت نشد در برخی منابع نیز بیا ن شده است که شکلات پروبیوتیک و غنی سازی شده با لاکتوباسیلوس-ها به دلیل افزایش جذب آب توسط سلولهای لاکتوباسیلوس دارای ویسکوزیته بالاتری هستند (شاه، ۲۰۰۷).

ارزیابی حسی

در این تحقیق، ارزیابی حسی به روش تست هدونیک پنج نقطه‌ای انجام شد که روشی جهت ارزیابی حسی محصول می‌باشد. نتایج حاصل از نتایج آزمون حسی برای پارامترهای رنگ، تردی، طعم، احساس دهانی و بافت در بازه‌ی زمانی ۱ و ٦٠ روزه در شکل ۱۰ نشان داده شده است. بررسی شکل ۱۰ نشان می‌دهد که شکلات پروبیوتیک حاوی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در مقایسه با نوع ریزپوشانی‌شده با روش تشکیل ژل آلژینات سدیم- پروتئین آب پنیر اختلاف معنی داری با یکدیگر و همچنین نمونه شاهد ندارند که بیانگر این می-باشد که افزودن پروبیوتیک‌ها به شکلات و یا ریزپوشانی

کردن باکتری تاثیر خاصی بر روی مطلوبیت و خواص ارگانولپتیک شکلات نداشته است.

نتیجه گیری نهائی: تاثیر منفی قابل توجهی بر ویژگیهای فیزیکی‌شیمیایی و رئولوژیکی و حسی شکلات پروبیوتیک، شکلات پروبیوتیک ریزپوشانی‌شده و نمونه شاهد در طی دوره نگهداری دیده نشد و بنابراین نیازی به تغییر در شرایط تکنولوژیکی و دستگاهی و همچنین خرید تجهیزات اضافی برای تولید شکلات پروبیوتیک وجود ندارد.

منابع مورد استفاده

مهربان رودبنه م، همایونی راد ع، عارف حسینی س.ر، ۱۳۹۳. بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی، رئولوژیکی و حسی شکلات پروبیوتیک. نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذایی، ٦ (۲)، ۷۹-٦۳.

نوشاد م، علیزاده بهبهانی ب، حجتی م، بررسی اثر سویه‌های پروبیوتیک بومی لاکتوباسیلوس دلبروکی و پدیوکوکوس پنتوزاسئوس بر ویژگی‌های شیمیایی، میکروبی و حسی دوغ طی زمان نگهداری، نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی، ۳۲ (۳)، ۹۱-۷۷.

Adams MR, 1999. Safety of industrial lactic acid bacteria. Journal of biotechnology 68:171-178.

Aragon-Alegro L C, Alegro J.H.A, Cardarelli, H.R, Chiu, M.C, Saad, S M.I, 2007. Potentially probiotic and symbiotic chocolate mousse. LWT-Food Sci. Technol 40: 669-675.

Beckett S T, 1999. Industrial chocolate manufacture and use (3rd Ed.). Oxford: Blackwell Science 153e181, 201-230, 405-428, 460-465.

Beckett S T, 2000. The science of chocolate. Royal Society of Chemistry Paperbacks.

Cabuk B & Tellioglu-Harsa S, 2015. Protection of Lactobacillus acidophilus NRRL-B 4495 under in vitro gastrointestinal conditions with whey protein/pullulan microcapsules, Journal of bioscience and Bioengineering 120: 650-656.

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

De Pelsmaeker S, Gellynck X, Delbaere C, Declercq N, Dewettinck K, 2015. Consumer-driven product development and improvement combined with sensory analysis: a case-study for European filled chocolates FQAP 41 20–29.

Foong Y J, Lee S.T, Ramli N, Tan Y.N, Ayob M.K, 2013. Incorporation of potential probiotic Lactobacillus plantarum isolated from fermented cocoa beans into dark chocolate: bacterial viability and physicochemical properties analysis, J. Food Qual 36: 164–171.

Frakolaki G, Giannou V, Kekos D, Tzia C, 2021. A review of the microencapsulation techniques for the incorporation of probiotic bacteria in functional foods, Crit. Rev. Food Sci. Nutr 61: 1515–1536.

Gunaratne T M, Fuentes S, Gunaratne N M, Torrico D D, Gonzalez Viejo C, Dunshea F.R, 2019. Physiological responses to basic tastes for sensory evaluation of chocolate using biometric techniques, Foods 8: 243.

Hossain M N, Ranadheera C S, Fang Z, Ajlouni S, 2020, Healthy chocolate enriched with probiotics: a review, Food Sci. Technol 41: 531–543.

Homayouni Rad, A & Mehrban Roudbaneh, M, 2014. Filled chocolate supplemented with Lactobacillus paracasei. International Research Journal of Applied and Basic Sciences 11: 2026-2031.

Homayouni, A, Ehsani, M R, Azizi, A, Yarmand, M S, Razavi, S H, 2006. A review on the method of increasing probiotic survival in functional dairy foods. In Proceedings of the 9th Iranian nutrition congress 288-297.

Konar N, Toker O.S, Oba S, Sagdic O, 2016. Improving functionality of chocolate: a review on probiotic, prebiotic, and/or synbiotic characteristics, Trends Food Sci. Technol 49: 35–44.

Lali˘ci´c-Petronijevi´c J, Popov-Ralji´c J, Obradovi´c D, Radulovi´c Z, Paunovi´c D, Petru˘si´c M, Pezo L, 2015. Viability of probiotic strains Lactobacillus acidophilus NCFM® and Bifidobacterium lactis HN019 and their impact on sensory and rheological properties of milk and dark chocolates during storage for 180 days, J. Funct.Foods 15: 541–550.

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

Oracz J, Nebesny E, Zyzelewicz D, Budryn G, Luzak B, 2022. Bioavailability and metabolism of selected cocoa bioactive compounds: a comprehensive review, Crit. Rev. Food Sci. Nutr 60: 1947–1985.

Possemiers S, Marzorati M, Verstraete W, Van de Wiele T, 2010. Bacteria and chocolate: a successful combination for probiotic delivery, Int. J. Food Microbiol 141: 97–103.

Shah N P, 2007. Functional cultures and health benefits. International Dairy Journal 17: 1262-1277.

Sultana K, Godward G, Reynolds N, Arumugaswamy R, Peiris P, Kailasapathy K, 2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. Int J Food Microbiol 62: 47-55.

Todorovic V, Redovnikovic I R, Todorovic Z, Jankovic G, Dodevska M, Sobajic S, Polyphenols, methylxanthines, and antioxidant capacity of chocolates produced in Serbia ,2015. J. Food Compos. Anal 41: 137–143.

Tsuda H & Miyamoto T, 2010. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, Food Sci. Technol. Res 16: 87–92, 2002.

Vinderola G, Binetti A, Burns P, Reinheimer J, 2011. Cell viability and functionality of probiotic bacteria in dairy products, Front. Microbiol. Food Microbiol 2: 1–6.

Zakirul-Islam Md, Masum A K M, Harun-ur-Rashid Md, 2022. Milk chocolate matrix as a carrier of novel Lactobacillus acidophilus LDMB-01: Physicochemical analysis, probiotic storage stability and in vitro gastrointestinal digestion. Journal of Agriculture and Food Research 7: 100263.

Zomorodi SH, Khosrowshahi-Asl A, Razavi-Rohani S M, Miraghayi S, 2010. Survival of Lactobacillus casei, Lactobacillus plantarum and Bifidobacterium bifidum in free and microencapsulated forms on Iranian white cheese produced by ultrafiltration. International Journal of Dairy Technology 64.

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

Journal of Food Research, 2023,33(1):111-127
https://foodresearch.tabrizu.ac.ir
OPEN ACCESS

© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)

DOI: 10.22034/FR.2022.51208.1832

Production of encapsulated probiotic chocolate containing *Bifidobacterium-bifidum* by alginate-whey protein and evaluation of physicochemical, sensory and shelf life

H Moharrampour[1] and A Pezeshki Najaf Abadi[2]

Received: 2022.04.20 Accepted: 2022.05.24

[1]MSc of Graduated. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Scientific Training Center of Shirin Asal Tabriz, Iran
[2]Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran
[*]Corresponding author: E mail: moharampour@shirinasal.com

Introduction: Chocolate is made of cocoa mass and sugar suspended in a cocoa butter matrix (Konar et al., 2016). Cocoa butter of chocolate, the lipid portions of chocolate, preserve the probiotic bacteria that promote health benefits (Possemiers et al., 2010) Consequently, the potentiality of using chocolate matrix as a carrier/encapsulant of probiotic is not unexpected. Probiotics are the live microorganisms that, when administered in adequate amounts, provide health benefits to consumers (Tsuda et al., 2010). Probiotic efficacy can be enhanced when these microorganisms are integrated into the diet, as interactions with food components can protect microbial cells as they pass through the gastrointestinal tract (Vindeola et al., 2011). The confectionery sector, particularly the chocolate industry, is currently undergoing dynamic changes, influenced by the growing demand for functional chocolates that may help customers improve their health (Orkaz et al., 2020). Chocolate is admired all over the world and its popularity seems to be mainly due to its ability to trigger happy things in the human brain and stimulate positive emotions. Notably, milk chocolate, in particular, is known to be a source of a variety of physiologically active compounds with significant antioxidant activity, such as flavonoids and polyphenols (Todorovic et al., 2015).

Material and methods: *Bifidobacterium bifidum* were grown in 18 mL MRS broth, supplemented with 0.05% L-cysteine hydrochloride (Sigma, Sydney, Australia) MMRS (Modified MRS) to provide an anaerobic environment, at 37 °C for 48 h under anaerobic conditions using the Gas Pak system (Anaerocult A, Darmstadt, Merck, Germany). The cultures were transferred into 180 mL MMRS for *B. bifidum* and incubated under the same conditions. The cultures were then reactivated by transferring 3−4 times in MRS broth and the cells were separated by centrifuging at 1500 g for 15 min at 25 °C (Eppendorf Centrifuge, 5810R, Hamburg, Germany) and washed twice with sterile 0.1% peptone solution. The final cell concentration was adjusted to 1.0 * 10^9 Cfu /mL (Zomorodi et al., 2010). Preparation of the microencapsulated solution: The whey protein isolated micro-coating solution was prepared according to Tellioghlu harsa & cabuk (2015) method with some modifications. Thus, first a solution of 8% whey protein isolate was prepared and for protein denaturation, it was heated at 80 ° C for 30 minutes and then cooled to ambient temperature. To

prepare the alginate coating solution, first a 2% alginate solution was prepared in sterile distilled water and after sterilization (at 121 ° C for 15 minutes) it was cooled.
Microencapsulation of microorganisms: The extrusion technique was used to microencapsulate bacteria. After washing, the cultures were suspended in 5 mL of sterile 0.1% peptone solution and mixed with 20 mL of 2% (w⁄ v) sodium alginate solution and 20 mL of 8 % (w⁄ v) whey protein concentrate solution sterilized at 121 °C for 15 min. The cell suspension was injected through a 0.11-mm needle into sterile 0.05 M CaCl2 (Merck, Germany). The beads were allowed to stand for 30 min for jellification, and then rinsed with, and subsequently kept in, sterile 0.1% peptone solution at 4 °C. After filtering from sterile filter paper, the seeds were transferred to sterile plates and placed in the freeze dryer for 2 days at -65 ° C for drying, and after drying under sterile conditions, they were powdered.
Preparation of probiotic-chocolates the probiotic milk chocolate was made according to Md Zakirul Islam et al (2022) approach, with some formulation adjustments. To inoculate probiotics, the pellet (10^9 CFU/gr) was added to the chocolate mass at 36–37 ◦C, followed by 10 min of tempering at 34 ◦C. Plain milk chocolate (without probiotics) was considered as a control. All the above procedures were performed in sterile conditions. Physicochemical analysis Changes in the physicochemical properties of the probiotic milk chocolate during 60 days of storage at 4 ◦C were monitored and compared to the control milk chocolate. The viscosity of both probiotic and control chocolates was measured according to Foong et al. (2013) at 0, 15, 30 and 60 days of storage using a Brookfield LVDV-II + viscometer (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleborough, MA, USA) attached with a LV-4 spindle. The chocolates were incubated at 38 ◦C for 1 h prior to measuring their viscosity. Sufficient time was allowed to ensure five rotations before viscosity was recorded. The pH of probiotic and control chocolates was measured at 0, 7, 30 and 60 days of storage by a digital pH meter (Metrohm, Germany). Water activity was determined for each chocolate sample at 0, 7, 30, and 60 days of storage using a Water Activity Meter (AQUALAB CX- 2, Decagon Devices, Washington, USA) at 25 ± 0.1 ◦C. Prior to every measurement. Sensory evaluation: In terms of appearance, color, flavor, texture, and overall acceptability, sensory qualities of control and probiotic-supplemented chocolates were assessed (Lalicic-Petronijevic et al., 2015).
Results and discussion: Evaluation of survival of *Bifidobacterium bifidum*: Bacterial count results for microencapsulated probiotic chocolate decreased from 7.33 Cfu/gr on the first day to 6.15 Cfu/gr on the 30th day and to 4.69 Cfu/gr on the 60th day, indicating that the microencapsulated probiotic chocolate retained its probiotic properties until the 30th day ($P<0.05$). Bacterial count results for probiotic chocolate decreased from 6.48 logcfu/gr to 6.33 logcfu/gr on the 15th day and to 3.5 logcfu/gr on the 60th day, indicating that the microencapsulated probiotic chocolate retained its probiotic properties until the 15th day. The results showed that microencapsulated probiotic chocolate has a higher water activity than plain chocolate, but not enough to cause probiotic bacteria activity in it ($P<0.05$). Investigation of acidity changes: The results indicate that the acidity changes for the control sample after 60 days of storage are 1.14 (in terms of oleic acid percentage). This value starts from 0.89 on the first day for microencapsulated probiotic chocolate and reaches 0.95 (in terms of oleic acid percentage) after 60 days of storage, which is not similar to the acidity changes for the unencapsulated sample, which means the trend of acidity changes is not too different for each of the samples. Probiotics remain in the incubator phase in the chocolate-based environment, so no activity occurs that produces lactic acid products that affect acidity. Investigation of pH changes: The pH values during the storage period for the probiotic chocolate samples show an almost constant trend. Investigation of moisture changes: The results showed that the moisture content of the microencapsulated probiotic chocolate is higher than probiotic chocolate and control chocolate, which is due to the high moisture content of microencapsulated chocolate compared to the control type is probably due to the presence of hygroscopic substances such as whey protein in the bacterial coatings, which have a high ability to absorb moisture and increase the amount of moisture.

Investigation of texture hardness changes: Based on the results of texture hardness measurements, the highest hardness was observed in microencapsulated probiotic chocolate (after 60 days) and the lowest hardness was observed in plain chocolate (after 1 day), which could be due to the effects of the materials used to microencapsulation. Investigation of viscosity and yield value changes of chocolate: In this study the results of viscosity measurements show that its ability to absorb high moisture, the viscosity and yield value of the microencapsulated probiotic chocolate sample is higher than probiotic and control chocolate. Sensory evaluation: results show that the probiotic chocolate containing *Bifidobacterium bifidum* is not significantly different from the microencapsulated type, by the method of sodium alginate - whey protein gel formation, and also the control sample which indicates that the addition of probiotics to chocolate or microencapsulation of probiotic bacteria did not have a significant effect on the desirability and organoleptic properties of chocolate.
Conclusion: There were not seen significant negative effects on physicochemical, rheological and sensory properties of probiotic chocolate, probiotic chocolate and microencapsulated probiotic during the storage time and therefore there is no need to change the technological and device conditions and also purchase additional equipment for probiotic chocolate production.

Keywords: *Bifidobacterium bifidum*, Microencapsulation, Probiotic chocolate, Sodium alginate, Whey protein concentrate