



## تولید شکلات پروبیوتیک حاوی بیفیدوباکتریوم بیفیدوم ریزپوشانی شده با آلزینات- پروتئین آب‌پنیر و بررسی خواص فیزیکی شیمیایی، حسی و میزان ماندگاری آن

حسن محرم‌پور<sup>۱</sup> و اکرم پزشکی نجف آبادی<sup>۲</sup>

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

<sup>۱</sup> فارغ التحصیل کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه جامع علمی و کاربردی شیرین عسل تبریز

<sup>۲</sup> دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

\*مسئول مکاتبه: Email: moharampour@shirinasal.com

### چکیده

**زمینه مطالعاتی:** افزودن باکتری‌های پروبیوتیک می‌تواند منجر به بهبود کارایی 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 آلزینات سدیم و کنسانتره پروتئین آب پنیر ریزپوشانی شده و سپس شکلات پروبیوتیک با افزودن گونه پروبیوتیک مذکور در مرحله قبل از تمپرینگ تولید گردید. تأثیر ناشی 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 ۲۲ °C در 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. همچنین افزودن باکتری در حالت آزاد و ریزپوشانی شده، تأثیر معنی داری روی بافت، رنگ، طعم، تردی و احساس دهانی نداشت. تفاوت زنده مانی باکتریایی محصول حاوی بیفیدوباکتریوم بیفیدوم ریزپوشانی شده در مقایسه با نوع آزاد بسیار ناچیز بود. نتایج ارزیابی زنده مانی 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 (۱۰<sup>۶</sup> تا ۱۰<sup>۷</sup> سلول زنده در هر گرم) است. **نتیجه‌گیری نهایی:** تأثیر منفی قابل توجهی بر ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی، 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، آلزینات 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 ۲۰۱۴). باتوجه به اینکه رشد میکروب‌های روده به رژیم غذایی انسان وابسته است، می‌توان با انتخاب رژیم غذایی سالم مثل غذاهای فراسودمند پروبیوتیک، میکروفلور روده را به نفع باکتری‌های سلامت بخش تغییر داد و از این طریق برخی از بیماری‌های انسان را درمان کرد (گیبسون و همکاران ۲۰۰۴، همایونی و همکاران ۲۰۱۴).

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در صورت مصرف به مقدار کافی، فواید سلامتی را برای مصرف‌کنندگان به ارمغان می‌آورند (تسودا و میاموتو ۲۰۱۰، نوشاد و همکاران ۱۴۰۱). مزایای سلامتی پروبیوتیک‌ها شامل جلوگیری از اسهال عفونی، کاهش سطح کلسترول در خون، کاهش علائم عدم تحمل لاکتوز، افزایش ایمنی در برابر بیماری‌های خاص و عمل به عنوان یک عامل ضد تومور و ضد سرطان است (فراکولاکسی 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 ذکیروول 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 پیچیده‌ای از پروتئین‌ها، پلی ساکاریدها و لیپیدها است (جونورا 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 سال‌های اخیر، بازار جهانی غذاهای فراسودمند، به ویژه مکمل‌های حاوی پروبیوتیک، به سرعت در حال رشد و گسترش است.

در این شرایط، شرکت‌های 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 شیرینی‌پزی 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 ۲۰۱۶). به نظر می‌رسد 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 آنتی‌اکسیدانی قابل توجه، مانند فلاونوئیدها و پلی فنول‌ها شناخته شده است (تودورویک و همکاران ۲۰۱۵).

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

## 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 میلی لیتر محیط کشت مایع MRS، با ۰/۰۵٪ آل سیستئین هیدروکلراید، (MRS اصلاح شده) برای ایجاد یک محیط بی‌هوازی، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت با استفاده از سیستم Gas Pak گرمخانه گذاری شد. سپس کشت‌ها به ۱۸۰ میلی لیتر (MRS) MMRS (اصلاح شده) منتقل و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت تحت شرایط بی‌هوازی گرمخانه گذاری شدند. پس از آن کشت‌ها با ۴ بار انتقال به محیط کشت مایع MRS فعال شدند، و باکتری‌ها بوسیله سانتریفیوژ در ۱۵۰۰ rpm و بمدت ۱۵ دقیقه جداسازی و دوبار با محلول استریل پپتون واتر ۰/۱٪ شسته شدند. غلظت نهایی باکتری‌ها  $1 \times 10^9$  Cfu/ml تنظیم گردید (زمردی و همکاران ۲۰۱۰).

### آماده سازی محلول ریزپوشانی

محلول سازنده ریزپوشانی ایزوله پروتئین آب پنیر طبق روش چابوک و تلی 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 سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه) سرد گردید.

### ریزپوشانی

از روش اکستروژن برای میکروانکپسوله کردن باکتری‌ها استفاده شد. پس از شستشو، کشت‌ها 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 سانتی‌گراد 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. دانه‌های 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 ۴ درجه سانتی‌گراد شستشو داده شدند. پس از صاف کردن از کاغذ صافی استریل، دانه‌ها به پلیت‌های استریل منتقل شده و در فریزدرایر بمدت ۲ روز و در دمای  $65^{\circ}C$  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، کره کاکائو، شکر، شیرخشک، مواد معطر و امولسیفایر با استفاده از یک سیستم دو غلتکی، باهم مخلوط شدند. سپس با استفاده از دستگاه پنج غلتکی عمل کاهش اندازه ذرات تا حد ۳۰-۲۵ میکرون صورت می‌گیرد. 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 می‌باشد به مخلوط شکلات اضافه شد. سرانجام، نمونه‌های شکلات پس از قالب‌گیری ابتدا در سلفون‌های

### 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 در آون با دمای  $105^{\circ}\text{C}$  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 می‌شود.

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

### اندازه‌گیری سختی بافت

در این روش قطعات شکلات در ابعاد  $10 \times 20 \times 100$  میلیمتری آماده شد و پس از ۶ ساعت نگهداری در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد داخل انکوباتور قرار گرفت سپس نمونه‌های آماده شده برای اندازه‌گیری سختی توسط دستگاه بافت سنج (مدل H50KS، ساخت شرکت هانسفیلد انگلستان) مجهز به سمباده ته صاف  $1/6$  میلیمتری و سرعت نفوذ  $1/5$  میلی‌متر بر ثانیه تحت آزمون نفوذ قرار گرفت و نیروی حداکثر در عمق ۶ میلیمتری به عنوان شاخص سختی گزارش شد (مهربان و همکاران ۱۳۹۳).

### آزمون ویسکوزیته و تنش تسلیم

شکلات‌ها قبل از اندازه‌گیری ویسکوزیته در دمای  $43^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت انکوبه شدند. ویسکوزیته نمونه شکلات در دمای  $43^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد و با سرعت (rpm) ۱۰۰ تعیین شد. ضمن اینکه از اسپیندل شماره ۴ 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 نفر ارزیاب شرکت شیرین عسل تبریز در گروه سنی ۲۰-۴۷ سال که آموزشهای لازم را در این زمینه

OPP بسته‌بندی شد و سپس در ظروف در بسته تا زمان انجام آزمون‌ها در یخچال  $10^{\circ}\text{C}$  -  $15^{\circ}\text{C}$  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 کاملاً هم زده شد. سپس ۲۰ دقیقه در بن ماری در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد قرار داده و پس از ذوب شکلات مجدداً هم زده شد تا محلول یکنواخت حاصل شود. سپس با استفاده از محیط کشت جامد MRS آگار، در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت تحت شرایط بی‌هوازی با استفاده از سیستم Gas Pak رشد داده شد، شمارش باکتری‌ها در ۳ تکرار با دستگاه کلنی کانتر صورت گرفت (زمردی و همکاران ۲۰۱۰).

### درجه زنده‌مانی

برای محاسبه درصد زنده‌مانی از رابطه زیر استفاده شد:

$$\text{درصد زنده مانی} = \frac{N}{N_0} \times 100$$

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 می‌باشد (نسبی 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 از دستگاه  $a_w$  سنج فعالیت آبی شکلات سنجیده شد.

### تغییرات اسیدیته شکلات در طی نگهداری

سنجش اسیدیته، در طی نگهداری شکلات تولید شده مطابق با روش 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.

شیمیایی و حسی قرار گرفتند. متغیرهای پژوهش شامل متغیرهای مستقل (زمان و نوع شکلات) و متغیرهای وابسته (فعالیت آبی، رطوبت، اسیدیته، سختی، ویسکوزیته، تنش تسلیم و pH) بودند که در حدود ۶۰ روز و در دمای  $22^{\circ}\text{C}$  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

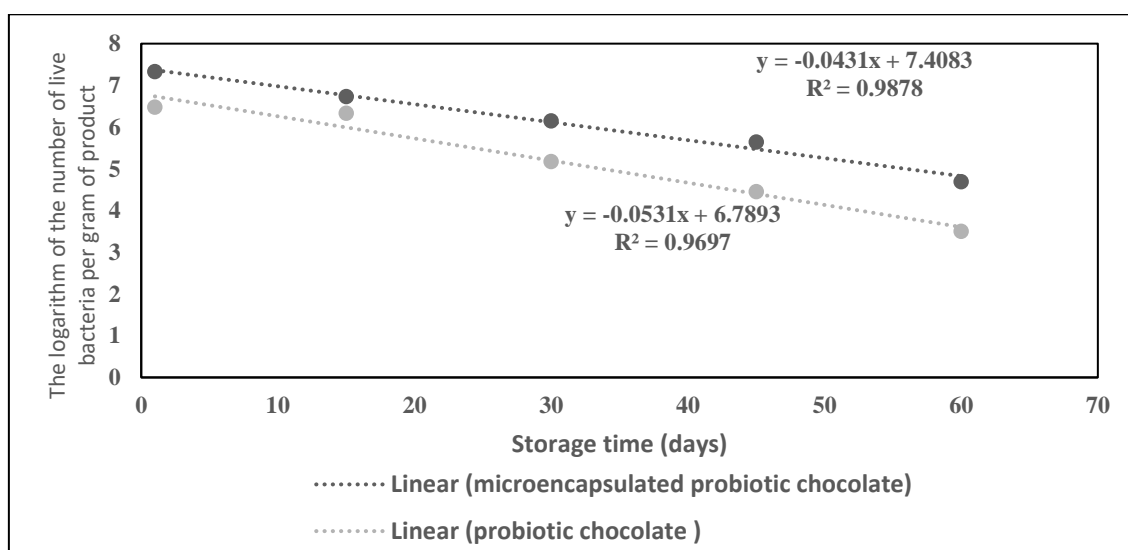
علاوه بر اهمیت زنده بودن پروبیوتیک‌ها، وجود تعداد زیادی از آنها در غذا نیز حائز اهمیت زیادی است. بدین دلیل که احتمال دارد تعداد پروبیوتیک‌ها در طول نگهداری غذا و عبور آن از مجرای گوارشی کاهش یابد. به منظور بهره‌مندی از ویژگی‌های سلامت‌زایی، پروبیوتیک‌ها باید به تعداد  $10^6$  تا  $10^7$  سلول زنده در هر گرم از فراورده‌های غذایی وجود داشته باشند (آدامز ۱۹۹۹ و آراگان-آلجرو، ۲۰۰۷).

دیده بودند، قرارگرفت. این پرسشنامه طعم، بو، رنگ، بافت و احساس دهانی مطلوب را بر اساس آزمون هدونیک ۵ سطحی از کیفیت عالی تا خیلی بد مورد ارزیابی قرار می‌دهد. ارزیابان در حد فاصل بین ارزیابی هر نمونه، آب ولرم نوشیدند. بطوری که نقطه ۵ بسیار مطلوب (عالی)، ۴ خوب، ۳ نه خوب نه بد، ۲ بد و ۱ خیلی نامطلوب است (لاتی پترونویچ و همکاران ۲۰۱۵).

#### روش‌های آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها

طراحی آزمایش‌ها با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار توسط نرم افزار SPSS 21 انجام پذیرفت. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده شد، ضمناً با توجه به اینکه در آزمایش یک شاهد یا کنترل بکار رفته است برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون‌های 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.

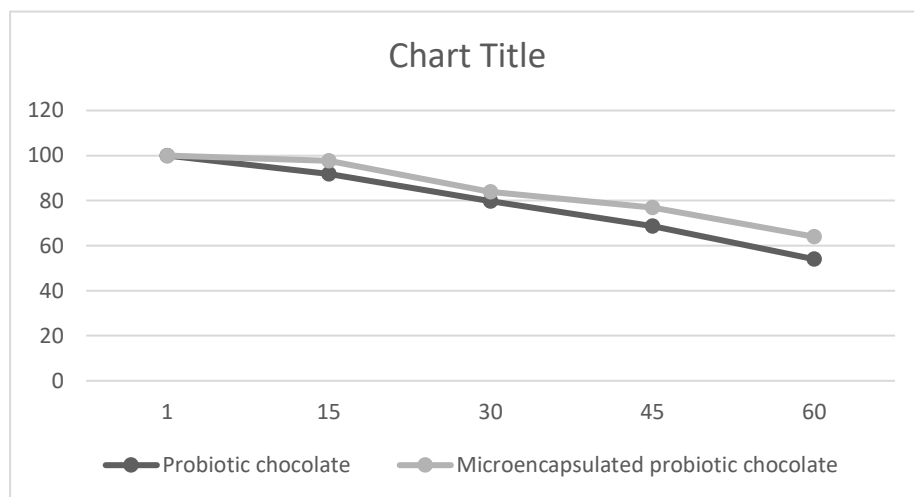
در این پژوهش نمونه‌های شاهد، شکلات پروبیوتیک و شکلات پروبیوتیک ریزپوشانی شده تحت آزمون‌های



شکل ۱- روند کاهش بیفیدوباکتریوم بیفیدوم آزاد و ریزپوشانی شده در دو نوع شکلات در طی ۶۰ روز نگهداری در دمای  $22^{\circ}\text{C}$   
**Figure 1- Reduction process of free and microencapsulated *Bifidobacterium bifidum* in two types of chocolate during 60 days of storage at  $22^{\circ}\text{C}$**

و یکنواخت و پرکردن منافذ موجود در ساختار زنده مانی را افزایش می‌دهند. سولتان و همکاران در سال (۲۰۰۰)، با استفاده از روش امولسیون، زنده مانی باکتری‌های پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ریزپوشانی شده با آلژینات کلسیم و نشاسته مقاوم ذرت را مورد مطالعه قرار دادند. هم چنین کپسول‌ها در نهایت با محلول گلیسرول، که یک ماده مقاوم در برابر سرماست، غوطه ور شده، که این امر منجر به بهبود قابلیت زنده مانی باکتری‌ها می‌شود. لازم به ذکر است که در تحقیق مذکور نیز از آلژینات کلسیم و نشاسته مقاوم ذرت، به روش امولسیون برای ریزپوشانی 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 در طول مدت ۳۰ روز نگهداری در دمای ۴°C داشته است ( $P < 0.05$ ).

نتایج شمارش باکتریایی با توجه به شکل ۱ برای شکلات پروبیوتیک از ۷/۳۳ Cfu/gr در روز اول به مقدار ۴/۶۹ Cfu/gr در روز سی‌ام و به مقدار ۶/۱۵ Cfu/gr در روز شصتم 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 ۶/۴۸ Cfu/gr به مقدار ۳/۵ Cfu/gr در روز پانزدهم و به مقدار ۶/۳۳ Cfu/gr 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



جدول ۲- درجه زنده مانی باکتری بیفیدوباکتریوم 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

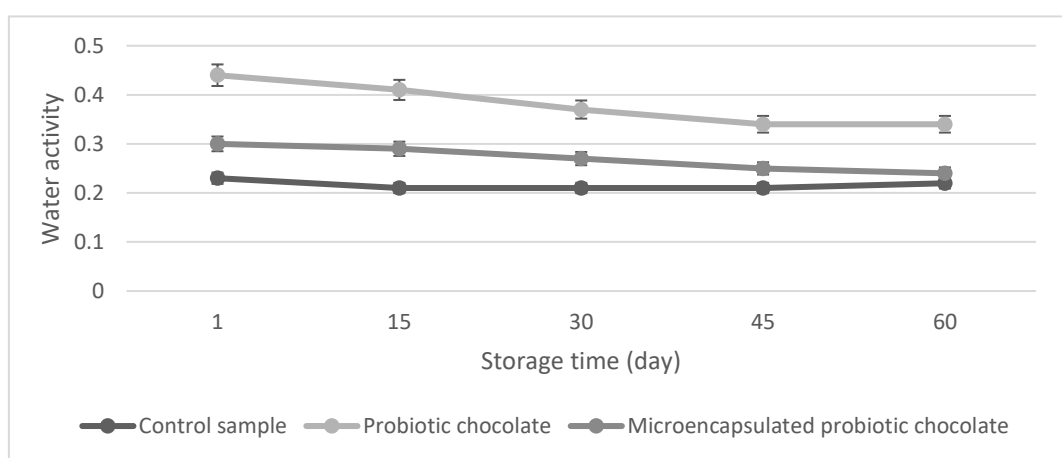
نتایج محاسبات زنده‌مانی برای دو نوع شکلات در جدول ۲ نشان داده شده است.

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 ریزپوشانی 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 ریزپوشانی نشده طی ۶۰ روز نگهداری در دمای  $22^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد در شکل ۳ نشان داده شده است. میزان فعالیت آبی (aw) برای نمونه حاوی بیفیدوباکتریوم بیفیدوم ریزپوشانی شده بعد از ۶۰ روز نگهداری در دمای  $22^{\circ}\text{C}$ ، به ۰/۲۴ رسید درحالی‌که برای نمونه شکلات حاوی بیفیدوباکتریوم بیفیدوم به حالت آزاد بعد از ۶۰ روز نگهداری در دمای  $22^{\circ}\text{C}$  به ۰/۳۴ رسید.



شکل ۳- 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

همکاران در سال (۲۰۱۳) خصوصیات فیزیکی شیمیایی 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 می‌باشد.

### بررسی تغییرات اسیدیته

تغییرات اسیدیته برای نمونه‌های مختلف شکلات در شکل ۴ نشان داده شده است. نتایج فوق بیانگر این است که

دلیل نتایج حاصل شده فوق به خاطر وجود مقادیر کمی آب در باکتری‌های لیوفیلیزه می‌تواند باشد. داده‌های فوق بیانگر عدم تغییر گسترده در مقادیر فعالیت آبی در گونه پروبیوتیک و پروبیوتیک ریزپوشانی شده طی دوره نگهداری ۲ ماهه است که ممکن است به خاطر فعالیت نسبی تعدادی از پروبیوتیک‌ها و همچنین وجود میزان جزئی آب در مرحله آماده‌سازی باکتری‌های پروبیوتیک لیوفیلیزه باشد (نبسنی و همکاران، ۲۰۰۷). مهربان و

ویژگیهای حسی، فیزیکی شیمیایی و رئولوژیکی آن پرداختند و نتایج تحقیق نشان داد که تفاوت معنی داری بین میزان اسیدیته شکلات معمولی و پروبیوتیک وجود ندارد.

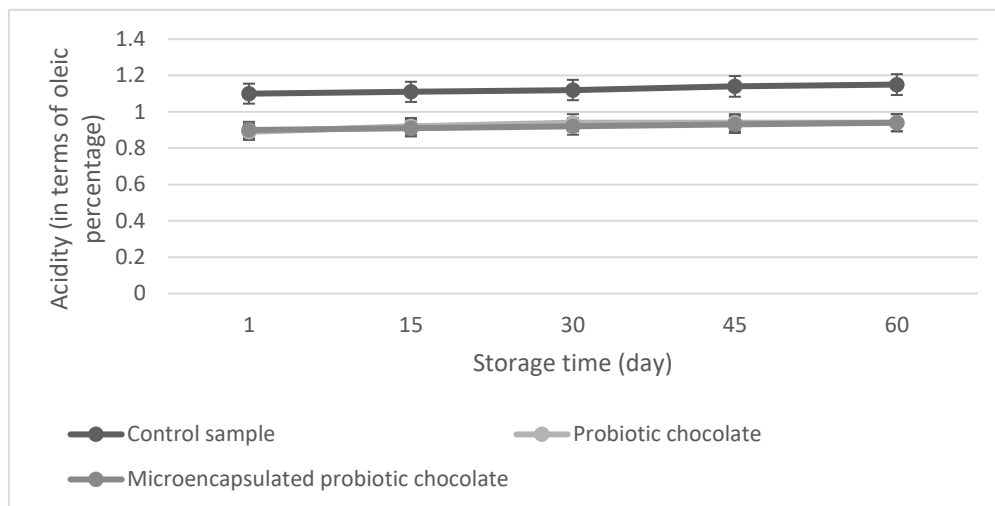
نتایج این تحقیق با نتایج مطالعه انجام شده توسط آراگون-آلگرو و همکارانش در سال (۲۰۰۷) مطابقت داشت.

### 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 نمونه های شکلات پروبیوتیک تقریباً روند ثابتی را نشان می دهد که در شکل ۵ نشان داده شده است.

تغییرات اسیدیته برای نمونه شاهد بعد از طی ۶۰ روز نگهداری ۱/۱۴ (بر حسب درصد اسید اولئیک) می باشد. این مقدار برای شکلات پروبیوتیک ریزپوشانی نشده از ۰/۸۹ در روز اول شروع شده و بعد از ۶۰ روز نگه داری به مقدار ۰/۹۵ (بر حسب درصد اسید اولئیک) می رسد که مشابه تغییرات اسیدیته برای نمونه ریزپوشانی شده است که به این معنی می باشد که روند تغییرات اسیدیته برای هر یک از نمونه ها معنی دار نمی باشد باکتری ها در محیط پایه شکلات در فاز کمون باقی می مانند لذا هیچگونه فعالیتی که موجب تولید محصولات اسید لاکتیکی شود و اسیدیته محصول را تحت تاثیر قرار دهد رخ نمی دهد (آراگون آلگرو و همکاران ۲۰۰۷).

زایلویچ و همکارانش در سال (۲۰۱۰) به بررسی اثر غنی سازی شکلات شیری با لاکتوباسیلوس های لیوفلیزه شده (لاکتوباسیلوس کازئی و پارا کازئی) بر روی



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

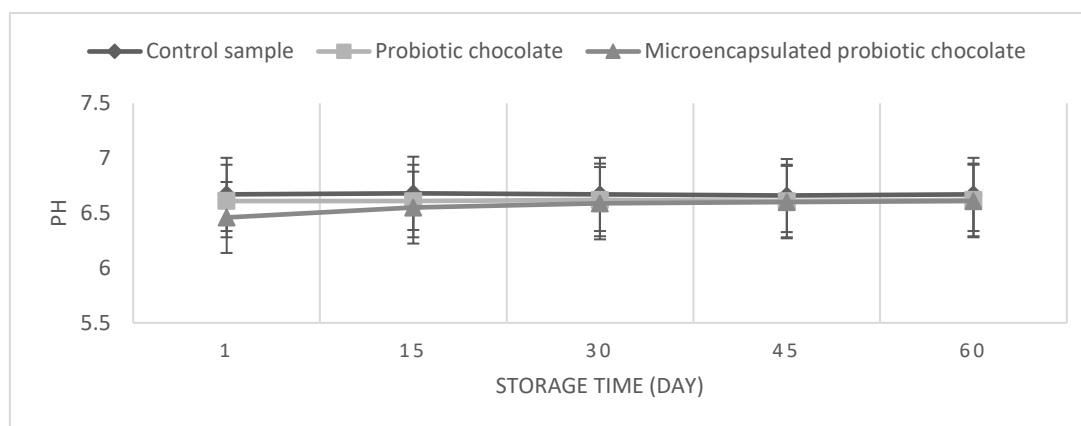
بررسی نتایج فوق نشان داد که pH نمونه شاهد که در روز اول برابر با ۶/۶۸ بود با شیب تقریباً ثابتی به مقدار ۶/۶۷ در روز آخر رسید. تغییرات pH برای شکلات پروبیوتیک حاوی بیفیدوباکتریم بیفیدوم ریز پوشانی

نتایج آزمون pH نشان می دهد که طول دوره ۶۰ روزه نگهداری درخصوص شکلات کنترل، پروبیوتیک و یا پروبیوتیک ریزپوشانی شده تغییرات pH معنی دار نیست.



نشده در روز اول برابر ۶/۶۱ بود که در نمونه‌گیری آخر نیز همین مقدار را دارد، تغییرات pH برای شکلات پروبیوتیک حاوی بیفیدوباکتریوم ریزپوشانی شده در روز اول برابر ۶/۴۶ و در روز آخر به مقدار ۶/۶۱ 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.

نشده در روز اول برابر ۶/۶۱ بود که در نمونه‌گیری آخر نیز همین مقدار را دارد، تغییرات pH برای شکلات پروبیوتیک حاوی بیفیدوباکتریوم ریزپوشانی شده در روز اول برابر ۶/۴۶ و در روز آخر به مقدار ۶/۶۱ 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

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 (۲۰۱۰) 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.

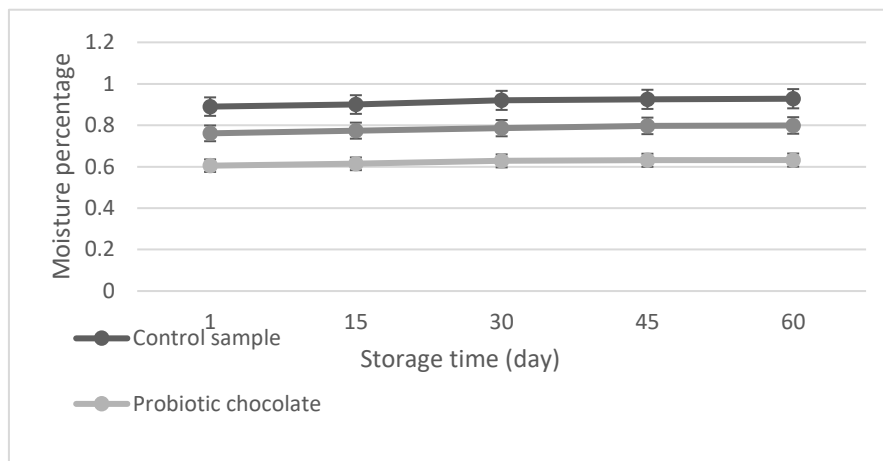
در مطالعات انجام شده بر روی شکلات شیری پروبیوتیک و شکلات تلخ پروبیوتیک که باکتری ها به فرم لیوفلیزه به آن افزوده شده بودند نیز تفاوت کمی در مقدار رطوبت مشاهده شد که بعلت وجود مقدار جزئی آب در مرحله آماده سازی باکتریهای لاکتوباسیلوس لیوفلیزه بوده است (نسبسی و همکاران، ۲۰۰۷ و نسبسی و همکاران، ۲۰۰۵).

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 (۲۰۱۴) 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 ۶ 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 احتمالاً به خاطر



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 فیزیکی شیمیایی 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 مورد نیاز 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.

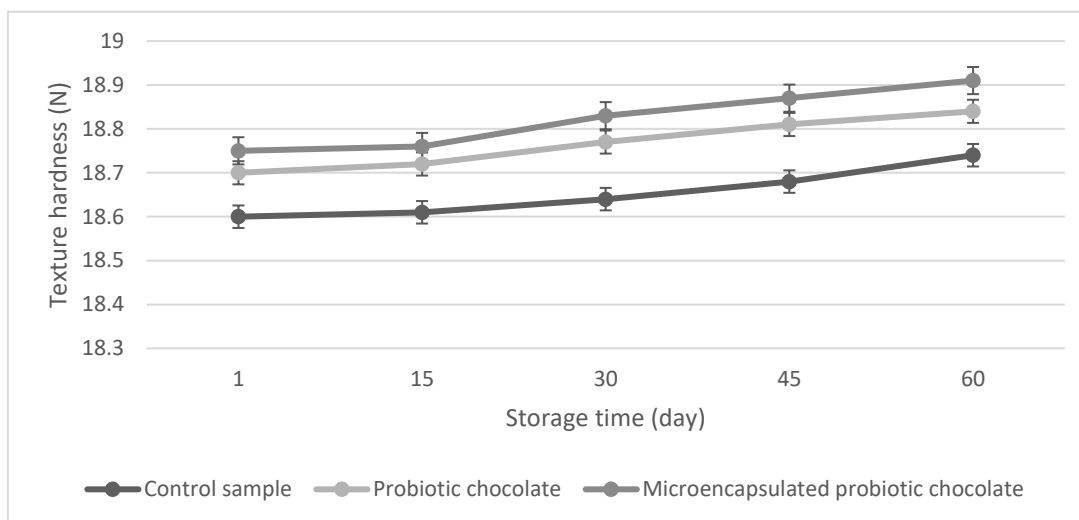
بر اساس نتایج حاصل از اندازه گیری سختی بافت بیشترین میزان سختی در شکلات پروبیوتیک ریزپوشانی شده (بعد از ۶۰ روز) و کمترین سختی در شکلات معمولی (بعد از ۱ روز) مشاهده شد. که می‌تواند ناشی از اثرات حاصل از مواد مورد استفاده برای ریزپوشانی باشد ( $P < 0.05$ ).

نبنسی و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که افزایش در خصوصیات رئولوژیکی شکلات‌های حاوی باکتری پروبیوتیک تنها به دلیل وجود مقادیر کم رطوبت در آنها

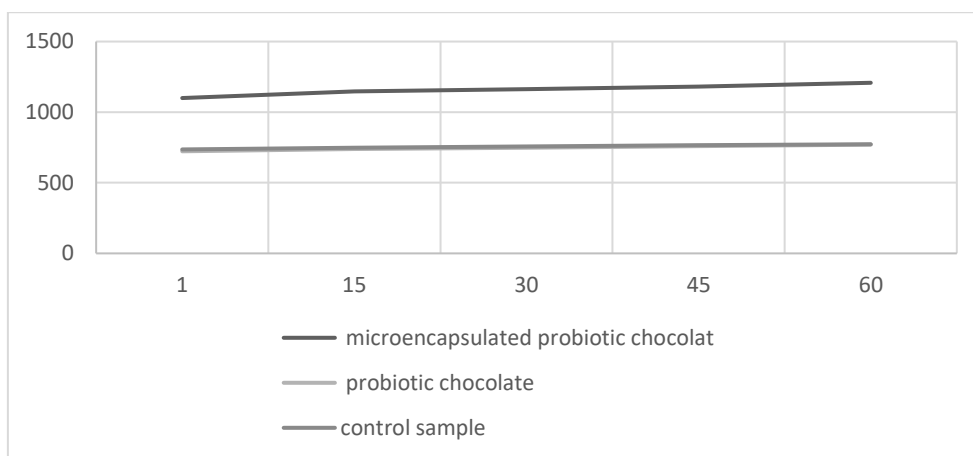
نمی باشد بلکه به وجود پروتئین موجود در این باکتریهای لیوفلیزه نیز ارتباط دارد.

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 نوب 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 نوب 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).



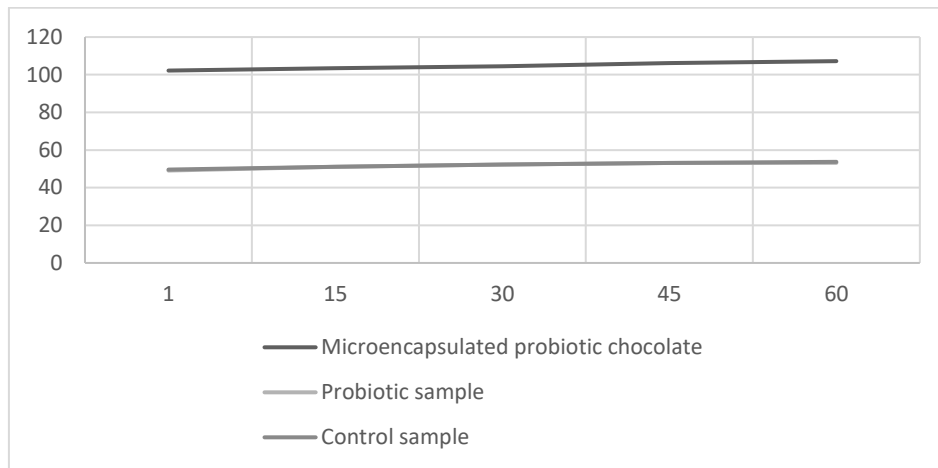
شکل ۷- نمودار تغییرات سختی بافت برای نمونه‌های مختلف شکلات در طی ۶۰ روز نگهداری  
**Figure 7- Texture hardness changes of chocolate samples in 60 days of storage**



شکل ۸- تغییرات ویسکوزیته شکلات در طی ۶۰ روز نگهداری  
**Figure 8- Viscosity changes of chocolate samples in 60 days of storage**

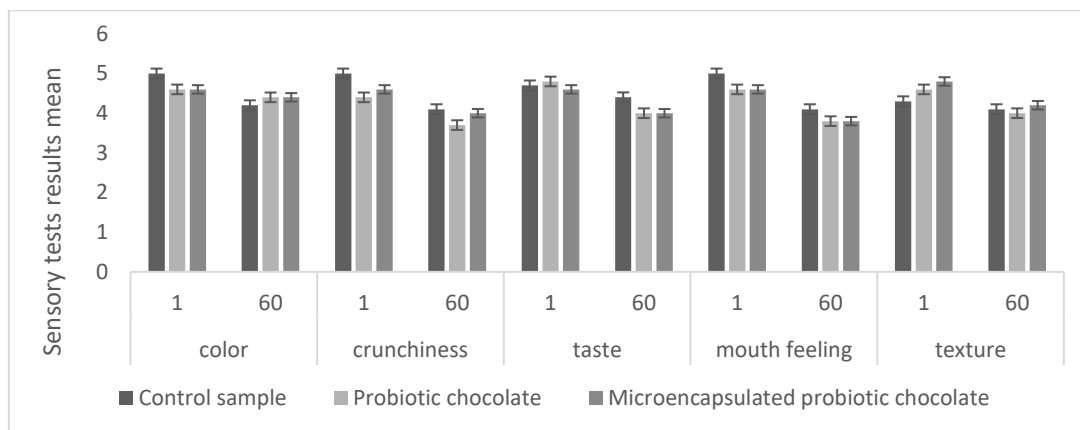
توسط آن، ویسکوزیته و تنش تسلیم نمونه پروبیوتیک بالاتر از شکلات شاهد می‌باشد ( $P < 0.05$ ). زیزلویچ و همکاران (۲۰۱۰) نیز به نتیجه مشابهی دست یافتند و بیان نمودند که مقدار ویسکوزیته و تنش حد شکلات شیری غنی شده با لاکتوباسیلوس لیوفیلیزه شده کمی بالاتر از شکلات شیری معمولی می‌باشد که این افزایش پارامترهای رئولوژیکی به طور عمده به دلیل بالا بودن رطوبت نسبی لاکتوباسیلوس های لیوفیلیزه (۱۰۰ گرم/۵ گرم) می‌باشد.

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 احتمالاً 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 می‌شود. احتمالاً با توجه در نتیجه قابلیت جذب رطوبت بالا



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 نمونه‌های شکلات در طی ۶۰ روز نگهداری

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

### 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 ۶۰ 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 می‌باشد که افزودن پروبیوتیک‌ها به شکلات و یا ریزپوشانی

چنانا و همکاران (۲۰۱۳) نیز به نتیجه مشابه‌ای دست یافتند و در 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 بیان 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).

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.

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

**نتیجه گیری نهائی:** تاثیر منفی قابل توجهی بر ویژگیهای فیزیکی شیمیایی و رئولوژیکی و حسی شکلات

### منابع مورد استفاده

- مهربان رودبانه م، همایونی راد ع، عارف حسینی س.ر، ۱۳۹۳. بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی، رئولوژیکی و حسی شکلات پروبیوتیک. نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذایی، ۶ (۲)، ۷۹-۶۳.
- نوشاد م، علیزاده بهبهانی ب، حجتی م، بررسی اثر سویه های پروبیوتیک بومی لاکتوباسیلوس دلبروکی و پدیوکوکوس پنتوزاسئوس بر ویژگی های شیمیایی، میکروبی و حسی دوغ طی زمان نگهداری، نشریه پژوهش های 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 Roudbانه, 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<sup>1</sup> and A Pezeshki Najaf Abadi<sup>2</sup>

Received: 20-April-2022

Accepted: 24-May-2022

<sup>1</sup>MSc of Graduated. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Scientific Training Center of Shirin Asal Tabriz, Iran

<sup>2</sup>Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran

\*Corresponding author: E mail: moharrampour@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  $1.0 \times 10^9$  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 CaCl<sub>2</sub> (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<sup>9</sup> 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. **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