JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره سیزدهم، شماره دوم، ۱۳۹۶، پیاپی ۳۵: ۷۳-۵۷

امکان‌سنجی تولید شکلات پروبیوتیک حاوی باکتری *Bifidobacterium breve* ریزپوشانی شده با آلژینات کلسیم و نشاسته مقاوم ذرت به روش امولسیون و بررسی میزان زنده‌مانی آن

نازنین السادات خیرخواهان[۱]، حامد اهری[۲،*]، غلامحسن اسدی[۳]

۱- کارشناس ارشد مهندسی علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- استادیار دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- استادیار دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت:۹۵/۱۲/۵ تاریخ پذیرش:۹۶/۴/۸

چکیده

برای حفاظت از پروبیوتیکها در شکلات سازی، ریزپوشانی (microencapsulation) باکتری پروبیوتیک می‌تواند روشی کارآمد برای حفظ قابلیت زنده‌مانی این باکتری‌های سودمند در شرایط نامساعد فرآیند تولید و دستگاه گوارش و همچنین بهره مندی از ارزش تغذیه‌ای شکلات تلقی گردد. در این مطالعه، از آلژینات سدیم و نشاسته مقاوم ذرت برای ایجادکپسول ها به روش امولسیون استفاده شد و بیفیدوباکتریوم بروی به حالت آزاد و ریز پوشانیشده به شکلات افزوده شد و زنده‌مانی، اسیدیته، فعالیت آبی (aw)، محتوی مواد جامدو ویژگی‌های حسی شکلات طی ۳۰ روز نگهداری در دمای $4^{\circ}C$ مورد ارزیابی قرار گرفت و اندازه و شکل کپسول‌های تشکیل شده با میکرروسکوپ الکترونی SEM مورد بررسی قرار گرفت. همچنین برای تعیین اندازه ذرات و چگونگی پراکنش کپسول‌ها، از دستگاه پارتیکل سایز آنالایزر استفاده شد. پروبیوتیک ریز پوشانی شده نسبت به حالت آزاد، زنده‌مانی بیشتری در شکلات داشت. اسیدیته و فعالیت آبی شکلات حاوی باکتری به حالت آزاد بالاتر از نمونه حاوی باکتری ریزپوشانی شده گزارش گردید ($p<۰/۰۵$). همچنین شکلات حاوی پروبیوتیک ریزپوشانی شده، محتوی مواد جامد بالاتری نسبت به نمونه آزاد داشت ($p<۰/۰۵$) علاوه بر آن ریز پوشانی اثر نامطلوبی بر ویژگی‌های حسی شکلات نداشت ($p<۰/۰۵$). ریزپوشانی، زنده‌مانی بیفیدوباکتریوم بروی را در شکلات افزایش داد و تولید شکلات پروبیوتیک امکان پذیر شد.

کلمات کلیدی: *پروبیوتیک، بیفیدوباکتریوم بروی، ریزپوشانی، شکلات*

* نویسنده مسئول: حامد اهری

آدرس: دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. تلفن: ۰۹۱۲۱۸۷۲۳۳۴

پست الکترونیک: dr.h.ahari@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

فعالیت وزنده ماندن پروبیوتیک‌ها به هنگام رسیدن به روده شرط لازم برای بروز اثرات مطلوب آنها است. به همین دلیل وجودحداقل ۱۰۷ باکتری پروبیوتیک زنده درهرگرم از محصولات پروبیوتیک ضروری می‌باشد (۹). گرایش به مواد غذایی پروبیوتیک غیر لبنی(Non-dairy probiotic products)، در بسیاری از نقاط جهان سبب شده است که امروزه پروبیوتیک ها در مواد غذایی همانند سس و شکلات نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۲). از آن جایی که قشر وسیعی از مردم از جمله کودکان و جوانان از مصرف‌کنندگان اصلی انواع مختلف شکلات‌ها به شمار می‌روند، بنابراین تبدیل این محصولات به مواد غذایی عملگرا (Functional Foods) می‌تواند نقش بسزایی در بهبود سطح سلامت جامعه داشته باشد (۲۶). ریزپوشانی (microencapsulation) به عنوان یکی از نوین‌ترین شیوه‌ها، عبارت است از پوشش دادن سلول‌های میکروارگانیسم توسط لایه‌ای از هیدروکلوئید در مقیاس میکروسکوپی، به منظور تفکیک کردن آن‌ها از محیط، که در نتیجه آن، زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در شرایط مختلف محیطی افزایش می‌یابد (۶)، (۱۸). آلژینات، پلی ساکاریدی خطی و ناهمگن می‌باشد که از جلبک‌های گوناگون استخراج می‌گردد (۱۶). نشاسته مقاوم ذرت نشاسته‌ای است که با آنزیم آمیلاز لوزالمعده شکسته نشده و به عنوان یک ترکیب مهم پری بیوتیکی مستقیماً به روده بزرگ می‌رسد (۲۴). سولتانا و همکاران در سال ۲۰۰۰، با استفاده از روش امولسیون، زنده‌مانی 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 زنده‌مانی باکتری‌ها می‌شود. در این پژوهش محققان به این نتیجه رسیدند که مدت زمانی که طول کشید تا پروبیوتیک های ریزپوشانی شده pH محصول را تا یک میزان مشخص کاهش دهند، بسیار بیشتر از باکتری‌های آزاد است ($p<0/05$) .محققان استرالیایی این امر را به دلیل کاهش فعالیت‌های متابولیکی باکتری با محیط، در اثر حضور کپسول‌ها گزارش کردند، هم چنین در شرایط شبیه سازی شده دستگاه گوارش، ریزپوشانی پروبیوتیک ها، تأثیر معنی داری بر روی زنده‌مانی آن‌ها داشت ($p<0/05$) .در این پژوهش تأثیر ریزپوشانی بر روی زنده‌مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوسو بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در ماست طی مدت ۸ هفته نگهداری نیز مورد مطالعه قرار گرفت. که نتایج این محققان نشان داد، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم ریزپوشانی شده، تنها ۰/۵ سیکل لگاریتمی کاهش در طی ۸ هفته نگهداری داشتند، در حالی که سلول‌های آزاد با کاهش ۱ سیکل لگاریتمی مواجه شدند. اندازه کپسول‌ها در این روش بوسیله آنالیز تصویری با میکروسکوپ الکترونی صورت گرفت که ابعاد کپسول‌ها در محدوده ۵۰۰ میکرون تا 1ml گزارش شد (۲۴).

کایلاساپاتی و همکاران (۲۰۰۶)، زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس در ماست در طی ۷ هفته نگهداری مورد ارزیابی قرار دادند. در این روش پروبیوتیک ها به روش امولسیون و با استفاده از آلژینات کلسیم و نشاسته ذرت ریزپوشانی شدند. نتایج پژوهش این محققان نشان داد، افزودن پروبیوتیک های ریزپوشانی شده، تولید اسید را در طی نگهداری ماست

Archive of SID

www.SID.ir

کاهش می‌دهد و هم چنین تولید اسید در نمونه‌های حاوی باکتری‌های ریزپوشانی شده در مقایسه با ماست حاوی باکتری‌های آزاد آهسته‌تر است($p<۰/۰۵$) . محققان بر این عقیده بودند که ریزپوشانی زنده‌مانی باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس را به میزان ۱ و ۲ سیکل لگاریتمی به ترتیب در مقایسه با حالت آزاد، افزایش می‌دهد ($p<۰/۰۵$) . هم چنین نتایج پژوهش محققان استرالیایی نشان داد، افزودن پروبیوتیک ها به صورت آزاد و ریزپوشانی شده تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر روی ظاهر و رنگ، اسیدیته و بدطعمی ماست در طی نگهداری ندارد. این مطالعه نشان داد که باکتری‌های پروبیوتیکی در حالت آزاد و ریزپوشانی شده تاثیری بر روی خصوصیات حسی ماست ندارد ($p>۰/۰۵$) و ریزپوشانی قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیکی را در طی نگهداری ارتقا می‌بخشد (۱۴).

پوسیمیر و همکاران در سال ۲۰۱۰، شکلات را به عنوان حاملی برای پروبیوتیک ها مورد بررسی قرار داد، در این تحقیق زنده‌مانی پروبیوتیک های آزاد و میکروانکپسولاسیون شده لاکتوباسیلوس هلوتیکوس و بیفیدوباکتریوم لانگوم در شرایط شبیه سازی شده معده و روده انسان نیز، مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود که میکروانکپسولاسیون پروبیوتیک‌ها تأثیر معنی‌داری در زنده‌مانی آن‌ها داشته است($p<۰/۰۵$) و پروبیوتیک های آزاد و میکروانکپسولاسیون شده تغییری در خصوصیات حسی محصول بوجود نمی‌آورند ($p<۰/۰۵$) . دراین تحقیق زنده‌مانی پروبیوتیک‌های میکروانکپسولاسیون شده در ۳ ماده غذایی شیر، شکلات شیری و شکلات سیاه با هم مقایسه شدند که پروبیوتیک‌های تلقیح شده در شکلات شیری و سیاه بقای بیشتری نسبت به نمونه شیر در شرایط شبیه سازی شده معده و روده انسان داشتند. به طوری که در شکلات کاهش مشخصی در تعداد پروبیوتیک ها بوجود نیامد، در حالیکه در نمونه شیر، ۱/۸ سیکل لگاریتمی کاهش مشاهده شد، در نتیجه این پژوهش نشان داد شکلات حامل مناسب‌تری برای پروبیوتیک های ریزپوشانی شده و آزاد به شمار می‌رود. محققان بلژیکی بر این عقیده بودند که شکلات علاوه بر داشتن مواد مغذی و pH مناسب که به رشد و زنده‌مانی پروبیوتیک ها کمک می‌کند، به دلیل داشتن بافت مستحکم، می‌تواند به عنوان یک محافظ از کاهش پروبیوتیک ها در دستگاه گوارش جلوگیری کند. محققان بلژیکی اظهار داشتند که متراکم‌تر بودن ماتریکس و شبکه تشکیل دهنده شکلاتنسبت به سایر فرآورده‌های پروبیوتیکی نظیر ماست و شیر، پروبیوتیک ها را از آسیب آنزیم‌ها و شرایط نامناسب دستگاه گوارش در امان نگه می‌دارد (۲۲).

مهربان رودبنه و همکاران در سال ۱۳۹۳، به بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی، رئولوژیکی و حسی شکلات پروبیوتیک حاوی لاکتوباسیلوس کازئی پرداختند. نتایج حاکی از آن بود که در طول شش ماه نگهداری تفاوت معنی داری بین شکلات پروبیوتیک و کنترل وجود نداشت($p<۰/۰۵$) تنها تفاوت معنی دار در پارامتر فعالیت آبی بود که بر اساس نتایج بدست آمده در شکلات پروبیوتیک بیشتر از شکلات کنترل بود ($p<۰/۰۵$) .آن‌ها گزارش کردند نمونه‌های شکلات پروبیوتیک نسبت به نمونه‌های کنترل، محتوی مواد جامد کل کمتری داشته که پس از آنالیز آماری مشخص گردید، تفاوت معنی‌داری($p<۰/۰۵$) بین محتوی مواد جامد کل در نمونه‌های شکلات کنترل و پروبیوتیک در هر دو دمای نگهداری و همچنین در طول دوره نگهداری شش ماهه وجود نداشت (۲).

Archive of SID

www.SID.ir

درتحقیق مذکور، به بررسی مقاوم‌سازی باکتری‌های پروبیوتیک ازطریق ریزپوشانی با آلژینات سدیم و نشاسته مقاوم ذرت و در نهایت به کاربرد این روش در تولید شکلات و ارزیابی حسی محصول پرداخته شده است. هدف فناوری مواد غذایی، تولید محصولاتی باکیفیت بالاتر و ارزش تغذیه‌ای بیشتراست. درسال‌های اخیر، تولید غذاهای پروبیوتیک به دلیل داشتن اثرات سلامت بخش، توجه بسیاری را به خود جلب نموده است.

مواد و روش‌ها

در مطالعه مذکور، تعداد ۳ نمونه با ۳ تکرار به روش رندوم (Random sampling) نمونه برداری شد و ریز پوشانی بیفیدوباکتریوم بروی به روش امولسیون انجام و بررسی با روش مطالعه آزمایشگاهی (interventional) صورت پذیرفت. برای این منظور از شکلات تلخ تبلت ۸۳٪ استفاده شد. برای آماده سازی شکلات، ابتدا ۱۰۰ گرم از شکلات را در بشر استریل ریخته و درب آن را با فویل پوشاندیم. سپس ظرف را در حمام آب $50^{\circ}C$ غوطه ور شد. نمونه داخل ظرف را به تکرار به هم زده تا شکلات کاملاً ذوب شده و دمای آن به $45^{\circ}C$ برسد. ظرف را از حمام آب گرم بیرون آورده و محتوای آن بطور کامل مخلوط شد و در حالی که هنوز به حالت مایع بود، از آن برای انجام آزمایش استفاده شد (۱).

- آماده سازی بیفیدوباکتریوم بروی (*Bifidobacterium breve*)

مقداری از پودر سوش مذکور در میکروتیوب استریل حاوی نرمال سالین اضافه شد. بعد از حل شدن ml1 از آن بوسیله ی سرنگ به MRS(de man, rogosa, sharpe)جامد (Merck Germany) تلقیح شد، سپس پلیت ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ درشرایط بی هوازی گرمخانه گذاری شدند (۲۷).

- ریز پوشانی بیفیدوباکتریوم بروی

پروبیوتیک با استفاده از روش امولسیون، ریزپوشانی شد (۲۴). بدین صورت که ابتدا ۲ گرم آلژینات سدیم (شرکت Sigma- Aldrich، آمریکا) و ۱ گرم نشاسته مقاوم ذرت (شرکت national starch، انگلستان) به آرامی به ml100 آب‌مقطر اضافه گشت تا کاملاً حل شود و سپس در اتوکلاو استریل شد، پس ازآنکه محلول با محیط هم دما شد، محلول آلژینات با ml1 سوسپانسیون میکروبی به مدت ۵ دقیقه مخلوط شد. برای تشکیل امولسیون، مخلوط حاصله به ml۵۰۰ روغن ذرت حاوی٪ ۰/۲ امولسیفایر توئین ۸۰(شرکت Merck، آلمان) ریخته شد و با استفاده از همزن مغناطیسی با سرعت (۳۵۰ rpm) به مدت ۴۰ دقیقه پراکنده گشت و امولسیون یکنواختی تشکیل شد. به منظور تشکیل کپسول‌ها، به محلول مورد نظر،ml ۵۰۰ کلرید کلسیم M1/۰ اضافه گشت و به مدت ۱ دقیقه دیگر همزده شد. سپس همزدن متوقف شد تا مخلوط حاصل دو فاز شود. پس از ۳۰ دقیقه که کپسول‌ها ته‌نشین شدند، به منظور جداسازی کپسول‌ها، از قیف بوخنر تحت خلأ استفاده شد، سپس کپسول‌های جدا شده با محلول آب مقطر به منظور جداسازی روغن تا حد امکان شسته شدند و درآب دوبار تقطیر دمای $4^{\circ}C$ نگهداری شدند (۲۷).

- شمارش باکتری‌های به دام افتاده در کپسول‌ها

ابتدا ۱ گرم از کپسول‌های تهیه شده را با ml۹ محلول استریل بافر فسفات (M۰/۱ و pH:۷) پراکنده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق هم زده شد تا کپسول‌ها به طور کامل حل و باکتری‌ها در محلول استریل بافر، آزاد

Archive of SID

www.SID.ir

شوند. سپس با استفاده از محیط جامد MRS آگار و روش کشت سطحی، باکتری‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷°C در شرایط بی هوازی، گرم خانه گذاری شدند. شمارش باکتری‌ها در ۳ نوبت انجام پذیرفت (۲۴).

-شمارش باکتری‌های به دام افتاده در کپسول موجود در شکلات

برای شمارش تعداد باکتری‌ها در شکلات، ۱۰ گرم از شکلات با ml ۹۰ محلول استریل بافر فسفات (۰/۱M و pH:۷) به مدت ۱۵ دقیقه هم زده شد و پراکنده گشت تا کپسول‌ها شکسته و باکتری‌ها به طور کامل در محلول بافر آزاد شوند، سپس با استفاده از محیط جامد MRS آگار و روش کشت سطحی، باکتری‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷°C در شرایط بی هوازی، گرم خانه گذاری شدند. شمارش باکتری‌ها در ۴ تکرارهر بار ۳ مرتبه صورت گرفت (۲۴).

- شمارش باکتری‌های آزاد تلقیح شده به شکلات

در ابتدا ۱۰ گرم شکلات با ml ۹۰ نرمال سالین استریل کاملاً هم زده شد تا یکنواخت گردد. سپس با استفاده از محیط جامد MRS آگار و روش کشت سطحی، باکتری‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷°C در شرایط بی هوازی، گرم خانه گذاری شدند. سپس شمارش باکتری‌ها در ۴ تکرار صورت پذیرفت (۲۴).

- بررسی شکل ظاهری کپسول‌ها

شکل کپسول‌ها، بوسیله میکروسکوپ نوری (MoticBA300)، با بزرگ نمایی x40 مورد بررسی قرار گرفت. همچنین به منظور تعیین خصوصیت نانوذرات پلیمری تولیدی و تعیین مورفولوژی و اندازه این ذرات از تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی مدل (XL30,Royal Philips Electronics N) استفاده گردید. جهت آماده سازی نمونه‌های میکروسکوپ الکترونی، ابتدا آماده سازی نمونه‌های مختلف از طریق تهیه سوسپانسیون در حلال استونیتریل درون فالکون های آزمایشگاهی انجام گردیده و مقدار ml ۳ از محلول حاصله روی پایه دارای چسب گذارشته شد تا حلال تبخیر گردد و سپس در دستگاه اسپاترکوتر (Spotter Coater) که حاوی گاز آرگون می‌باشد، به منظور تثبیت روکش آب طلا (به روی نمونه‌های موجود برپایه) انتقال داده شد تا بعد از ۱۰ دقیقه نمونه‌ها به محفظه دستگاه میکروسکوپ انتقال یابند و در نهایت بعد از تنظیم میکروسکوپ SEM بر روی بزرگنمائی X10 تصاویر نمونه بر روی مانتیور ظاهر گردید (۲۰).

- تعیین اندازه ذرات و چگونگی پراکنش کپسول‌ها

اندازه و چگونگی پراکنش کپسولهای تشکیل شده، بوسیله دستگاه پارتیکل سایز آنالایزر (Particle size analyzer)صورت گرفت. بدین منظور کپسول‌ها در آب یون زدایی شده پراکنده شدند و بعد از کالیبره کردن دستگاه با آب یون زدایی شده، ابتدا ml ۲ از محلول حاوی میکروکپسول ها به دستگاه اضافه گشت و نتایج بر اساس (d۰/۱ یا قطر ۱۰ درصد از کپسول‌ها)، (d۰/۵ یا قطر ۵۰ درصد از کپسول‌ها)، (d۰/۹ یا قطر ۱۰ درصد از کپسول‌ها) و قطر حجم میانگین کپسول‌ها (Volume Mean Diameter) گزارش شد (۲۰).

-تغییرات اسیدیته شکلات در طی نگهداری

سنجش اسیدیته، مطابق با روش استاندارد شکلات به شماره‌ی ۶۰۸ موسسه‌ی استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران ارزیابی شد. بدین صورت که ابتدا ۵ گرم از نمونه شکلات در ارلن مایر ml500 ریخته و ۲۵۰ml آب مقطر به آن افزوده شد. سپس مخلوط فوق از صافی رد

Archive of SID

www.SID.ir

شد و چند قطره معرف فنل فتالئین به آن افزوده شد، آنگاه با سود ۰/۱ نرمال تا ایجاد رنگ صورتی پایدار تیترشد. چون شکلات به صورت جامد است و در آب حل نمی‌شود، بشر محتوی مخلوط روی اجاق به مدت چند دقیقه حرارت داده شد تا محلول یکنواختی حاصل شود (۱). میزان اسیدیته محصول بر اساس فرمول زیر قابل ارزیابی است: وزن نمونه + (۱۰۰ × ۰/۰۰۶۴ ml سود ۰/۱ نرمال)

تغییرات اسیدیته شکلات هر ۱۰ روز، در ۳ تکرار، به مدت ۳۰ روز مورد ارزیابی قرار گرفت.

-تغییرات فعالیت آبی (aw) در طی نگهداری

سنجش فعالیت آبی مطابق با روش استاندارد شکلات به شماره‌ی ۶۰۸ موسسه‌ی استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران ارزیابی شد. در این مطالعه با استفاده از aw سنج فعالیت آبی شکلات سنجیده شد. بدین صورت که در ابتدا نمونه برش داده شدو به صورت یکنواخت در آمد. سپس ۱۲ گرمشکلات، داخل محل مخصوص aw سنج قرارداده شد و بعد از حدود ۲ دقیقه عدد مربوط به فعالیت آبی از روی مانیتور دستگاه خوانده شد (۱). تغییرات فعالیت آبی شکلات هر ۱۰ روز، در ۳ تکرار، به مدت ۳۰ روز مورد ارزیابی قرار گرفت.

- تغییرات محتوی مواد جامد در طی نگهداری

سنجش محتوی مواد جامد کل، مطابق با روش استاندارد شکلات به شماره‌ی ۶۰۸ موسسه‌ی استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران ارزیابی شد. بدین صورت که ابتدا ۵ گرم از شکلات وزن شد، سپس به مدت ۳ الی ۵ ساعت در آون با دمای $105^{\circ}C$ قرار داده شد و پس از رسیدن به وزن ثابت، مقدار رطوبت آن محاسبه شد. با قرار دادن این مقدار رطوبت در رابطه زیر، محتوای مواد جامد کل در شکلات به دست آمد (۱). تغییرات اسیدیته شکلات هر ۱۰ روز، در ۳ تکرار، به مدت ۳۰ روز مورد ارزیابی قرارگرفت.

مقدار رطوبت -۱۰۰= محتوای مواد جامدکل

- ارزیابی حسی

ارزیابی حسی نمونه‌های شکلات، توسط ۱۰ نفر از دانشجویان صنایع غذایی انجام شد. نمونه‌های شکلات شامل ۲ گروه حاوی *بیفیدوباکتریوم بروی* آزاد و بیفیدوباکتریوم *بروی* ریزپوشانی شده بود، ارزیابی حسی با استفاده از یک سری خصوصیات مهم شکلات از قبیل طعم و مزه، رنگ، عطر و بو، بافت و قوام و در نهایت پذیرش کلی سنجیده شدو امتیازها از ۰ تا ۵ براساس نمره دهی هدونیک صورت پذیرفت، (Kailasapathy & Masondole, 2005). ارزیابان در حد فاصل بین ارزیابی هر نمونه، آب ولرم نوشیدند (۱).

-تجزیه و تحلیل آماری

تحقیق حاضر بر اساس آزمایش فاکتوریل ۲×۱×۴ با ۳ تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. فاکتورهای مورد بررسی نوع پوشش در ۲ سطح (آزاد، ریزپوشانی شده با آلژینات کلسیم و نشاسته مقاوم ذرت)، باکتری پروبیوتیک در ۱ سطح (*بیفیدوباکتریوم بروی*) و زمان در ۴ سطح (روزاول، روز ۱۰، روز ۲۰ و روز ۳۰)، در نظر گرفته شد. مقایسه میانگین هر کدام از فاکتورها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس ترکیبی (Mixed ANOVA) با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ انجام گردیده شد.

- نتایج

- بررسی اندازه کپسول‌ها و چگونگی پراکنش آن‌ها

در این روش قطرحجم میانگین ۱۰۶ نمونه‌ی تصادفی از کپسول‌ها توسط دستگاه پارتیکل سایز آنالایزر (مدل MASTER SIZER MALVERN) اندازه گیری شد.

Archive of SID

www.SID.ir

قطر حجم میانگین کپسول‌ها µm ۴۰۷/۱۹۵ گزارش شد (نمودار ۱). میانگین قطر ۱۰٪ از کپسول‌ها µm ۷۳/۰۳۰، میانگین قطر ۵۰٪ از کپسول‌ها µm ۳۸۶/۷۱۸، میانگین قطر ۹۰٪ از کپسول‌ها µm ۷۵۳/۰۷۱ گزارش گردید. (نمودار ۱)

- مورفولوژی کپسول‌ها

با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (SEM) نیز، سطح و مورفولوژی کپسول‌های مختلف به کار رفته در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در تصاویر دیده می‌شود، در سطح کپسول‌ها، حضور گرانول‌های نشاسته مشخص است. (عکس ۲-۱)

-تغییرات اسیدیته شکلات طی مدت نگهداری

تغییرات اسیدیته شکلات طی مدت ۳۰ روز نگهداری در دمای $4^{\circ}C$ در جدول ۱ نشان داده شده است. اسیدیته نهایی شکلات، پس از ۳۰ روز نگهداری، در گروه (۱) با اختلاف معنی داری کمتر از گروه (۲) بود ($p<0/05$). میزان اسیدیته برای نمونه حاوی بیفیدوباکتریوم بروی ریز پوشانی شده بعد از ۳۰ روز نگهداری در دمای $4^{\circ}C$، به ۷/۹۰±۰/۲۲ رسید، در حالی که برای نمونه شکلات حاوی بیفیدوباکتریوم بروی به حالت آزادبعد از ۳۰ روز نگهداری در دمای $4^{\circ}C$ به ۹/۰۳±۰/۰۹ رسید. نتایج منحنی میانگین برآورد اسیدیته در دو حالت آزادو ریزپوشانی شده حکایت از آن دارد که میزان اسیدیته برای گروه ریزپوشانی به مراتب کمتر بوده و علیرغم کمی افزایش اسیدیته در روزهای بعدی که در هر دو گروه مشاهده شد، اختلاف اسیدیته این ۲ گروه همچنان پایدار ماند. (نمودار ۲)

-تغییرات فعالیت آبی (aw) شکلات طی مدت نگهداری

نتایج تغییرات فعالیت آبی (aw) شکلات، در ۲ حالت آزاد و ریزپوشانی شده طی ۳۰ روز نگهداری در دمای $4^{\circ}C$ در جدول ۲ نشان داده شده است. فعالیت آبی در گروه (۱)، به طور معنی داری نسبت به گروه (۲) کاهش یافته است ($p<0/05$) میزان فعالیت آبی (aw) برای نمونه حاوی بیفیدوباکتریوم بروی ریز پوشانی شده بعد از ۳۰ روز نگهداری در دمای $4^{\circ}C$، به ۰/۲۴±۰/۰۰۵ رسید، در حالی که برای نمونه شکلات حاوی بیفیدوباکتریوم بروی به حالت آزاد بعد از ۳۰ روز نگهداری در دمای $4^{\circ}C$ به ۰/۳۲±۰/۰۰۲ رسید. نتایج منحنی میانگین برآورد فعالیت آبی در دو حالت آزاد و ریزپوشانی شده حکایت از آن دارد که از همان روز اول نمونه برداری تا پایان دوره ۳۰ روزه، میزان فعالیت آبی گروه ریزپوشانی شده بر اساس یک الگو کاهشی نسبت به گروه آزاد تنزل معنی داری داشته است. (نمودار ۳)

-تغییرات محتوی مواد جامد شکلات طی مدت نگهداری

نتایج تغییرات محتوی مواد جامد شکلات، در ۲ حالت آزاد و ریزپوشانی شده طی ۳۰ روز نگهداری در دمای $4^{\circ}C$ در جدول ۳ نشان داده شده است. محتوی مواد جامد در گروه (۱) به طور معنی داری نسبت به گروه (۲) افزایش یافت($p<0/05$) .میزان محتوی مواد جامد برای نمونه حاوی*بیفیدوباکتریوم بروی* ریز پوشانی شده بعد از ۳۰ روز نگهداری در دمای $4^{\circ}C$، به ۹۹/۴۱±۰/۳۲ رسید، در حالی که برای نمونه شکلات حاوی *بیفیدوباکتریوم بروی* به حالت آزاد بعد از ۳۰ روز نگهداری در دمای $4^{\circ}C$ به ۹۸/۸۰±۰/۱۳ رسید.

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج محتوی مواد جامد در گروه (۱) و بر خلاف گروه (۲) با یک کاهش نسبی از روز دهم تا روز بیستم همراه بوده ولی هر دو گروه با افزایش نتایج محتوی مواد جامد از روز بیستم تا روز سی‌ام روبرو بودند، که این افزایش در گروه ریزپوشانی شده بسیار چشمگیر بوده است. (نمودار ۴)

- زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بروی آزاد و ریزپوشانی شده در شکلات

زنده‌مانی بیفید و باکتریوم بروی آزاد و ریز پوشانی شده در شکلات، طی مدت زمان نگهداری، در جدول ۴ نشان داده شده است. با توجه به یافته‌های حاصل، زنده‌مانی بیفیدوباکتریوم ریزپوشانی شده به طور معنی داری بیشتر از حالت آزاد آن بود($p<۰/۰۵$) تعداد باکتری‌های شمارش شده برای نمونه حاوی *بیفیدوباکتریوم بروی* ریز پوشانی شده بعد از ۳۰ روز نگهداری در دمای $4^{\circ}C$، به ۸/۴۴±۰/۱۲ رسید، در حالی که برای نمونه شکلات حاوی *بیفیدوباکتریوم بروی*به حالت آزاد بعد از ۳۰ روز نگهداری در دمای $4^{\circ}C$ به ۵/۴۳±۰/۰۷ رسید.

نتایج زنده‌مانی *بیفیدوباکتریوم بروی* در دو حالت آزاد و ریزپوشانی شده حکایت از آن دارد که تا روز دهم تحقیق هیچگونه تفاوت معنی داری در اندازه کاهش تعداد باکتری‌ها در دو شکل فوق ندارد، اما از روز دهم به بعد تا روز سیام نتایج روند کاهشی با آهنگ آهسته‌تر در روش ریزپوشانی شده در مقایسه با تعداد باکتری‌ها در روش آزاد از خود نشان می‌دهد.

- ارزیابی حسی

ارزیابی حسی شکلات در طول نگهداری در جدول ۵ نمایش داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که نمونه‌های حاوی باکتری‌های ریز پوشانی شده از نظر پذیرش کلی نسبت به گروه آزاد با تفاوت اندکی از مقبولیت بیشتری برخوردار بودند و تفاوت معنی داری در طعم، بو، رنگ و بافت شکلات حاصل نشد ($P<۰/۰۵$).

بحث

به منظور بهره مندی از ویژگی‌های سلامت زایی، پروبیوتیک ها باید به تعداد 10^{6} تا 10^{7} سلول زنده در هر گرم از فراورده‌های غذایی وجود داشته باشند (۴ و ۵). از این رو فرایند ریز پوشانی، تأثیر قابل ملاحظه‌ای در زنده‌مانی پروبیوتیک ها در فراورده‌های غذایی دارد و شکلات می‌تواند بعنوان یک بستر مناسب برای باکتری *بیفیدوباکتریوم بروی* ریز پوشانی شده عمل کند و مصرف آن در جهت بروز اثرات مفید سلامت بخش، مناسب باشد.

سولتانا و همکاران (۲۰۰۰) (۲۴)، با استفاده از روش امولسیون، زنده‌مانی 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 زنده‌مانی باکتری‌ها می‌شود. طبق نتایج گزارش شده، در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش، ریزپوشانی پروبیوتیک ها، تأثیر معنی‌داری($p<۰/۰۵$) بر روی زنده‌مانی آن‌ها داشت. در این پژوهش تأثیر ریزپوشانی بر روی زنده‌مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در ماست طی مدت ۸ هفته نگهداری نیز مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این محققان نشان داد، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم ریزپوشانی شده، ۰/۵ سیکل لگاریتمی کاهش در طی ۸ هفته نگهداری داشتند، سلول‌های آزاد با کاهش ۱ سیکل لگاریتمی مواجه

Archive of SID

www.SID.ir

شدند. اندازه کپسول‌ها در این روش بوسیله آنالیز تصویری با میکروسکوپ الکترونی صورت گرفت که ابعاد کپسول‌ها در محدوده ۵۰۰ میکرون تا 1ml گزارش شد. لازم به ذکر است که در تحقیق مذکور نیزاز آلژینات کلسیم و نشاسته مقاوم ذرت، به روش امولسیون برای ریز پوشانی بیفید و باکتریوم بروی در شکلات استفاده شدونتایج زنده‌مانی بیفیدوباکتریوم بروی در دو حالت آزاد و ریزپوشانی شده حاکی از آن بود که ریزپوشانی تأثیر معنی داری بر زنده‌مانی بیفیدوباکتریوم بروی در طول مدت ۳۰ روز نگهداری در دمای $4^{\circ}C$ داشته است($p<0/05$) علت کاهش بیشتر تعداد سلول‌های آزاد *بیفیدوباکتریوم بروی* در مقایسه با حالت ریزپوشانی شده رامی توان مرگ این میکروارگانیسم بی‌هوازی مطلق در برابر اکسیژن دانست (۵). همچنان که این پوشش باعث مقاومت باکتری پروبیوتیک نسبت به تغییرات دما و در نهایت زنده‌مانی بیشتر باکتری‌ها نسبت به حالت آزاد شده است (۱۲). علاوه بر آن قطر حجم میانگین کپسول‌ها ۴۰۷/۱۹۵ µm گزارش شده است که درمقایسه با انواع گزارش شده توسط برخی محققان که در حد ml بوده است (۲۴)، بافت نرم‌تری را در شکلات ایجاد می‌کند. هم چنین، کوچک‌تر بودن و کروی بودن کپسول‌ها باعث تغییرات کمتری در بافت محصول می‌شود و از بروز پدیده شنی شدن در ماده غذایی جلوگیری می‌کند (۲۴)، (۱۷)، (۱۹). اگر کپسول‌ها بسیار کوچک باشند، نمی‌توانند محافظ خوبی برای پروبیوتیک ها در مواد غذایی باشند و ایـن موضوع باعث نابودی پروبیوتیک ها می‌شود (۱۸). گزارش شده است که کپسول‌های بزرگتر از ml1 موجب خشن شدن بافت مواد غذایی می‌شود. هر چه اندازه کپسول‌ها بزرگتر باشد، پروبیوتیک ها به دلیل استفاده از فعالیت آبی کافی در داخل کپسول‌ها، از زنده‌مانی بیشتری در شرایط مختلف محیطی برخوردار هستند (۲۲). نشاسته مقاوم ذرت با شرکت در بافت و شبکه آلژینات کلسیم به استحکام ساختار کپسول‌ها کمک می‌کند و تاثیری بر افزایش قطر کپسول‌ها ندارد. نشاسته علاوه بر خاصیت پری بیوتیکی منجر به افزایش پایداری ساختار کپسول‌ها می‌شود. نشاسته مقاوم در ساختار کپسول‌های آلژینات کلسیم شرکت کرده و کپسول را در برابر عوامل نامساعد محیطی محافظت می‌کند و باعث افزایش قطر کپسول‌ها نیز نمی‌شود (۱۴).

کایلاساپاتی و همکاران (۲۰۰۰) (۱۳)، زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس در ماست در طی ۷ هفته نگهداری مورد ارزیابی قرار دادند. در این روش پروبیوتیک ها به روش امولسیون و با استفاده از آلژینات کلسیم و نشاسته ذرت ریزپوشانی شدند. نتایج پژوهش این محققان نشان داد، افزودن پروبیوتیک های ریزپوشانی شده، تولید اسید را در طی نگهداری ماست کاهش می‌دهد و هم چنین تولید اسید در نمونه‌های حاوی باکتری‌های ریزپوشانی شده در مقایسه با ماست حاوی باکتری‌های آزاد آهسته‌تر است($p<0/05$) محققان بر این عقیده بودند که میکروکپسولاسیون، زنده‌مانی باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس را به میزان ۱ و ۲ سیکل لگاریتمی به ترتیب در مقایسه با حالت آزاد، افزایش می‌دهد($p<0/05$) ، هم چنین نتایج پژوهش محققان استرالیایی نشان داد، افزودن پروبیوتیک ها به صورت آزاد و میکروکپسولاسیون شده تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر روی ظاهر و رنگ، اسیدیته و بدطعمی ماست در طی نگهداری ندارد. این مطالعه نشان داد که باکتری‌های پروبیوتیکی در حالت آزاد و میکروانکپسولاسیون شده

Archive of SID

www.SID.ir

تاثیری بر روی خصوصیات حسی ماست ندارد(۰/۰۵ <p)و میکروکپسولاسیون قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیکی را در طی نگهداری ارتقا می‌بخشد (۱۳). لازم به ذکر است که در تحقیق مذکور، زنده‌مانی بیفیدوباکتریوم بروی ریزپوشانی شده با آلژینات کلسیم و نشاسته مقاوم ذرت در شکلات در طی ۳۰ روز مورد ارزیابی قرار گرفته است. نتایج نشان داد ریزپوشانی، زنده‌مانی باکتری بیفیدوباکتریوم بروی را به طور معنی‌داری در مقایسه باحالت آزاد افزایش داده است (p<۰/۰۵) همچنین نتایج تحقیق مذکور در رابطه با اسیدیته در راستای پژوهش محققان استرالیایی بوده و نمونه حاوی باکتری آزاد افزایش اسیدیته معنی داری نسبت به نمونه حاوی کپسول داشته است(p<۰/۰۵) چرا که *بیفیدوباکتریوم بروی* آزاد موجود در نمونه، مواد قندی شکلات را مصرف کرده و تولید اسید لاکتیک می‌نماید. علت پایین‌تر بودن اسیدیته در نمونه حاوی باکتری ریزپوشانی شده نیز ماندن باکتری‌ها در فاز تاخیری رشد می‌باشد، لذا متابولیت اسیدی کمتری آزاد می‌کنند. حضور نشاسته در ساختار کپسول‌ها باعث شده است که تغییرات pH در طول مدت نگهداری به حداقل برسد و به دلیل کندی در جذب مواد مغذی و هم چنین آزاد سازی متابولیت ها از طریق پوشش ایجاد شده، تأثیر موثری بر کاهش سرعت انتقال و فعالیت‌های متابولیکی پروبیوتیک ها داشته باشد (۱۶). اسیدیته از جمله پارامترهایی است که به طور مستقیم روی سایر ویژگی‌های شکلات به خصوص ویژگی‌های رئولوژیکی و ارگانولپتیکی اثرگذار است. بالارفتن اسیدیته در محصولات پروبیوتیک نه تنها بر زنده‌مانی این باکتری‌ها اثر منفی دارد، بلکه بر طعم و بافت محصول نیز اثرات نامطلوبی خواهد داشت. شمارش میکروبی پروبیوتیک‌ها نشان داد که پروبیوتیک ها در داخل کپسول‌ها زنده هستند و فرایند ریزپوشانی باعث کاهش تعداد پروبیوتیک ها نشده است. تولید اسید لاکتیک توسط پروبیوتیک ها در طول مدت نگهداری باعث افزایش اسیدیته شکلات در طی نگهداری می‌گردد (۵)، (۱۹)، (۲۷) علاوه بر آن در تحقیق مذکور نیز، ریز پوشانی پروبیوتیک تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر روی خصوصیات حسی شکلات نیز نداشته است(p<۰/۰۵) علت این امر را می‌توان به کوچک بودن اندازه کپسول‌های تشکیل شده به روش امولسیون دانست. در حالی که در روش‌های متعارف ریزپوشانی نظیر اکستروژن و خشک کردن پاششی ابعاد کپسول‌ها بزرگتر هستند، که این امر منجر به بوجود آمدن احساس دهانی و شنی شدن در مصرف کننده می‌شود (۱۷).

پوسیمیر و همکاران (۲۰۱۰) (۲۲)، شکلات را به عنوان حاملی برای پروبیوتیک ها مورد بررسی قرار داد، در این تحقیق زنده‌مانی پروبیوتیک های آزاد و ریزپوشانی شده لاکتوباسیلوس هلوتیکوس و بیفیدوباکتریوم لانگوم در شرایط شبیه سازی شده معده و روده انسان نیز، مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود که ریزپوشانی پروبیوتیک ها تأثیر معنی داری در زنده‌مانی آن‌ها داشته است. در این تحقیق زنده‌مانی پروبیوتیک‌های ریزپوشانی شده در ۳ ماده غذایی شیر، شکلات شیری و شکلات سیاه با هم مقایسه شدند که پروبیوتیک های تلقیح شده در شکلات شیری و سیاه بقای بیشتری نسبت به نمونه شیر در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده انسان داشتند. به طوری که در شکلات کاهش مشخصی در تعداد پروبیوتیک ها بوجود نیامد، در حالی که در نمونه شیر، ۱/۸ سیکل لگاریتمی کاهش مشاهده شد. محققان بلژیکی اظهار داشتند که متراکم‌تر بودن ماتریکس و شبکه تشکیل

Archive of SID

www.SID.ir

دهنده شکلات نسبت به سایر فرآورده‌های پروبیوتیکی نظیر ماست و شیر، پروبیوتیک ها را از آسیب آنزیم‌ها و شرایط نامناسب دستگاه گوارش در امان نگه می‌دارد. محققان بلژیکی بر این عقیده بودند که شکلات علاوه بر داشتن مواد مغذی و pH مناسب که به رشد و زنده‌مانی پروبیوتیک ها کمک می‌کند، به دلیل داشتن بافت مستحکم، می‌تواند به عنوان یک محافظ از کاهش پروبیوتیک ها در دستگاه گوارش جلوگیری کند. محققان بلژیکی اظهار داشتند که متراکم‌تر بودن ماتریکس و شبکه تشکیل دهنده شکلات نسبت به سایر فرآورده‌های پروبیوتیکی نظیر ماست و شیر، پروبیوتیک‌ها را از آسیب آنزیم هاو شرایط نامناسب دستگاه گوارش در امان نگه می‌دارد (۲۲). در همین راستا در تحقیق مذکور نیز، زنده‌مانی بیفیدوباکتریوم بروی در شکلات تلخ طی ۳۰ روز نگهداری بررسی گردیده است. طبق نتایج حاصله، ریز پوشانی تأثیر معنی داریدر زنده‌مانی سوش مذکور داشته است($p<۰/۰۵$) .با توجه به اینکه به میزان $۱۰^{۸}$ باکتری فعال و زنده در شکلات در روز سی‌ام شمارش مشاهده شده، این پژوهش به این نتیجه رسیده است که شکلات حاوی بیفیدوباکتریوم بروی ریزپوشانی شده، یک محصول پروبیوتیک می‌باشد.

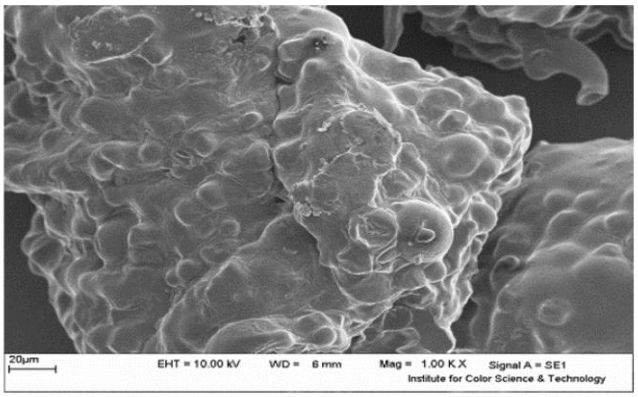
مهربان رودبنه و همکاران (۱۳۹۳) (۲)، به بررسی خصوصیات فیزیک و شیمیایی، رئولوژیکی و حسی شکلات پروبیوتیک حاوی لاکتوباسیلوس کازئی پرداختند. نتایج حاکی از آن بود که در طول شش ماه نگهداری تفاوت معنی داری بین شکلات پروبیوتیک و کنترل وجود نداشت($p<۰/۰۵$) تنها تفاوت معنی دار در پارامتر فعالیت آبی بود که بر اساس نتایج بدست آمده در شکلات پروبیوتیک بیشتر از شکلات کنترل بود ($p<۰/۰۵$) آن‌ها گزارش کردند نمونه‌های شکلات پروبیوتیک نسبت به نمونه‌های کنترل، محتوی مواد جامد کل کمتری داشته که پس از آنالیز آماری مشخص گردید، تفاوت معنی داری($p<۰/۰۵$) بین محتوی مواد جامد کل در نمونه‌های شکلات کنترل و پروبیوتیک در هر دو دمای نگهداری و همچنین در طول دوره نگهداری شش ماهه وجود ندارد (۲).

در حالی که در تحقیق مذکور بر خلاف پژوهش آنان، بیفیدوباکتریوم بروی به صورت ریزپوشانی شده و آزاد به شکلات تلقیح شد و به مدت ۳۰ روز نگهداری شد. فعالیت آبی نمونه حاوی باکتری آزاد تفاوت معنی داری با نمونه کپسول شده داشته است($p< ۰/۰۵$) فعالیت آبی در نمونه‌ای که باکتری‌ها داخل کپسول‌ها محصور هستند به دلیل افزایش مواد محلول که شامل مواد تشکیل دهنده کپسول می‌باشد به میزان بیشتری کاهش یافته است، لذا این باکتری‌ها در فاز آنابیوسیس رشد باقی می‌مانند، که در محصولات پروبیوتیک به عنوان شرایط ایده آل محسوب می‌شود. با توجه به این نکته که پایین بودن میزان فعالیت آبی باعث افزایش زمان ماندگاری و به تأخیر انداختن فساد شکلات می‌شود می‌توان دریافت که ریزپوشانی کردن باکتری تأثیر مثبتی بر تولید این محصول خواهد داشت. از طرف دیگر با گذشت زمان تعداد باکتری‌هایی که به صورت آزاد تلقیح شده بودند کاهش یافته، در نتیجه به مرور زمان کاهش فعالیت آبی کندتر رخ داده و در انتهای مدت زمان نگهداری فعالیت آبی بالاتری نسبت به نمونه حاوی باکتری ریز پوشانی شده گزارش شده است. همچنین محتوی مواد جامد نیز بر خلاف پژوهش مهربان رودبنه و همکاران، در نمونه حاوی کپسول، تفاوت معنی‌داری با نمونه حاوی باکتری آزاد داشته است ($p<۰/۰۵$) چرا که در نمونه حاوی باکتری ریزپوشانی شده، به دلیل وجود موادی که برای ساخت

Archive of SID

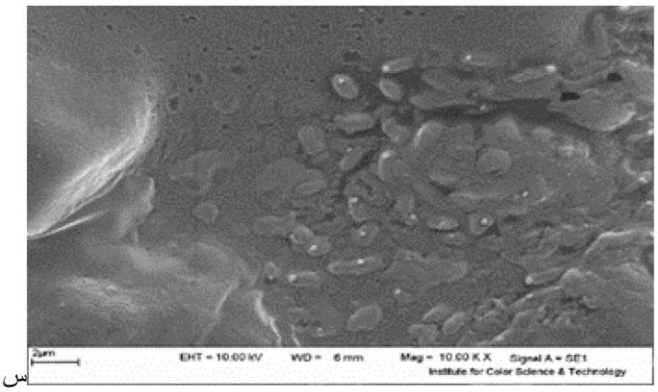
www.SID.ir

کپسول استفاده شده است، محتوی مواد جامد بالاتری گزارش شده است. بنابراین تصور می‌شود که فسادپذیری نمونه حاوی باکتری ریزپوشانی شده به دلیل کاهش رطوبت کمتر از نمونه حاوی باکتری به حالت آزاد باشد.



شکل ۱-نماي ميكروسكوپ الكتروني كپسول آلژينات كلسيم

با ميزان kv ۱۰/۰۰ ،EHT=۶ mm ،WD=۱۰/۰۰KX ،Mag=۲µm ،scale



شکل ۲- نماي ميكروسكوپ الكتروني كپسول آلژينات كلسيم

با ميزان kv ۱۰/۰۰ ،EHT=۶ mm ،WD=۱/۰۰KX ،Mag=µm ،scale=۲۰

جدول ۱-تغییرات pH در ۲ گروه ریز پوشانی (۱) و آزاد (۲) در ۴ زمان نمونه برداری در مدت زمان ۳۰ روز نگهداری در دمای $4^{\circ}C$

	زمان (روز)			
	۰	۱۰	۲۰	۳۰
شاهد	۷/۸۱±۰/۰۲	۷/۸۱±۰/۰۲	۷/۸۱±۰/۰۲	۷/۸۱±۰/۰۲
ریزپوشانی شده	۷/۸۱±۰/۰	۷/۸۶±۰/۰۳	۷/۹۴±۰/۰۴	۷/۹۰±۰/۲۲
آزاد	۸/۸۴±۰/۰۴	۹/۰۳±۰/۰۴	۹/۰۵±۰/۰۸	۹/۰۳±۰/۰۹

جدول ۲-تغییرات فعالیت آبی در ۲ گروه ریز پوشانی (۱) و آزاد (۲) در ۴ زمان نمونه برداری در مدت زمان ۳۰ روز نگهداری

	زمان (روز)			
	۰	۱۰	۲۰	۳۰
شاهد	۰/۲۴±۰/۰۰۱	۰/۲۴±۰/۰۰۲	۰/۲۴±۰/۰۰۴	۰/۲۴±۰/۰۰۲
ریزپوشانی شده	۰/۳۵±۰/۰۰۷	۰/۳۱±۰/۰۰۸	۰/۲۸±۰/۰۰۸	۰/۲۴±۰/۰۰۵
آزاد	۰/۴۴±۰/۰۰۴	۰/۳۸±۰/۰۰۱	۰/۳۴±۰/۰۰۵	۰/۳۲±۰/۰۰۲

www.SID.ir

جدول ۳-جدول تغییرات محتوی جامد در ۲ گروه ریز پوشانی (۱) و آزاد (۲) در ۴ زمان نمونه برداری در مدت زمان ۳۰ روز نگهداری در دمای ۴°C

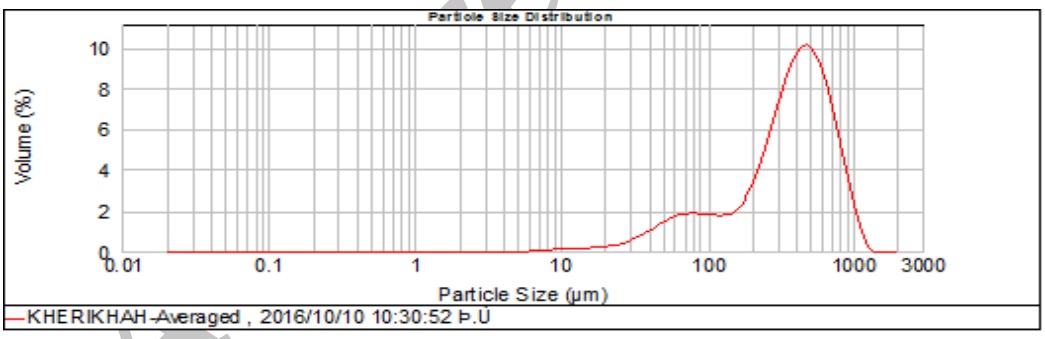
ویژگیهای حسی	خصوصیات ظاهری و رنگ	عطر و بو	طعم و مزه	بافت و قوام	پذیرش کلی
گروه مورد مطالعه					
بیفیدوباکتریوم بروی آزاد	۴±۰/۸۱	۳/۲۵±۰/۵	۳/۵±۱	۴/۲۵±۰/۵	۳/۵±۱
بیفیدوباکتریوم بروی ریزپوشانی شده	۴±۰	۴±۰	۳/۷۵±۰/۵	۴±۰/۸۱	۳/۷۵±۰/۵

جدول ۴- مقایسه زنده‌مانی *بیفیدوباکتریوم بروی* CFU/ml در ۲ گروه ریز پوشانی (۱) و آزاد (۲) در ۴ زمان نمونه برداری در مدت زمان ۳۰ روز نگهداری در دمای ۴°C

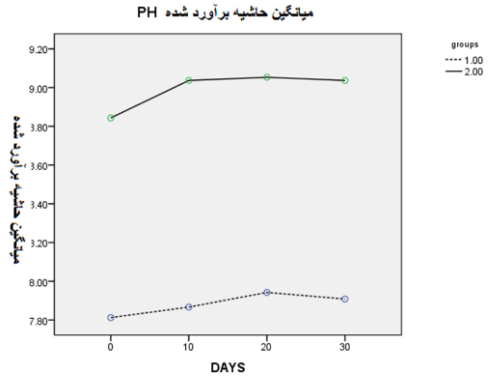
	زمان (روز)			
	۰	۱۰	۲۰	۳۰
شاهد	۹۹/۲۴±۰/۰۱	۹۹/۲۴±۰/۰۲	۹۹/۲۴±۰/۰۲	۹۹/۲۴±۰/۰۲
ریزپوشانی شده	۹۸/۶۶±۰/۰۲	۹۹/۳۲±۰/۵۵	۹۹/۲۴±۰/۲۱	۹۹/۴۱±۰/۳۲
آزاد	۹۷/۱۴±۰/۱۳	۹۸/۰۰±۰/۰۲	۹۸/۰۸±۰/۲۲	۹۸/۸۰±۰/۱۳

جدول ۵-میانگین رتبه‌های پارامترهای حسی در شکلات حاوی *بیفیدوباکتریوم بروی* آزاد و ریزپوشانی شده

	زمان (روز)			
	۰	۱۰	۲۰	۳۰
ریزپوشانی شده	۱۱/۵۱±۰/۱۴	۹/۴۹±۰/۲۶	۹/۴۳±۰/۱۲	۸/۴۴±۰/۱۲
آزاد	۱۱/۴۳±۰/۲۵	۹/۴۳±۰/۱۲	۷/۳۵±۰/۱۸	۵/۴۳±۰/۰۷

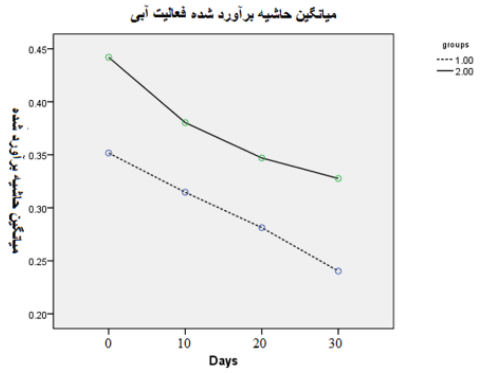


نمودار ۱-نمودارررسم شده توسط دستگاه پارتیکل سایز آنالایزر

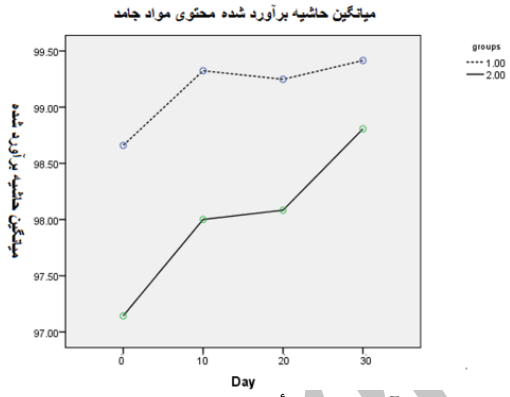


نمودار ۲-میانگین برآوردی اسیدیته با تأثیر از دو فاکتور زمان و نوع قرارگیری باکتری در شکلات

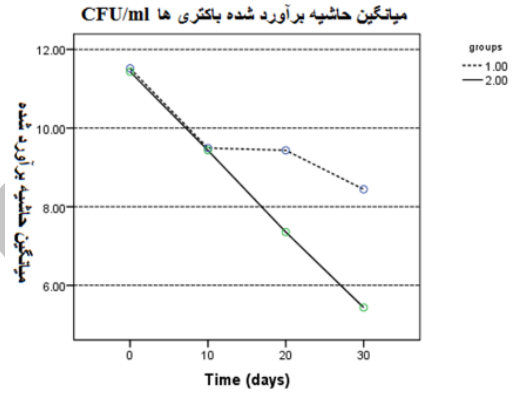
www.SID.ir



نمودار ۳-میانگین فعالیت آبی با تأثیر از دو فاکتور زمان و نوع قرار گیری باکتری در شکلات



نمودار ۴-میانگین محتوی مواد جامد برآورد شده با تأثیر از دو فاکتور زمان و نوع قرار گیری باکتری در شکلات



نمودار ۵-میانگین برآوردی باکتریها با تأثیر از دو فاکتور زمان و نوع قرار گیری باکتری در شکلات

نتیجه گیری

در مجموع، این مطالعه نشان داد که ریز پوشانی بیفیدوباکتریوم بروی با آلژینات کلسیم و نشاسته مقاوم ذرت باعث افزایش زنده‌مانی پروبیوتیک مذکور در طی نگهداری شکلات می‌گردد و با توجه به بی هوازی بودن بیفیدوباکتریوم بروی یک محافظ خوب برای سلول‌های باکتری در مقابل اکسیژن می‌باشد، چرا که در قسمت‌های مختلف تولید در اثر همزدن شکلات حباب‌های هوا وارد بافت شکلات می‌شوند، به علاوه به علت کاهش میزان فعالیت آبی مقاومت دمایی باکتری را افزایش می‌دهند. همچنین شکل و مورفولوژی کپسول‌های تشکیل شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مورد تأیید قرار گرفت و ذرات نشاسته روی سطوح کپسول‌ها مشاهده شدند و پذیرش حسی محصول با وجود این پوشش مثبت گزارش شد.

www.SID.ir

همچنین پیشنهاد می‌شود تا از سایر روش‌های انکپسولاسیون و یا سوش های دیگر باکتری پروبیوتیک، همچنین پوششها و راه‌های رهایش دیگر جهت پروبیوتیک کردن شکلات استفاده شود.

سپاسگزاری

از مسئولین محترم مجتمع آزمایشگاهی رازی برای همکاری در انجام این پروژه قدردانی می‌شود.

منابع

۱. بی نام. (۱۳۸۵). موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. شکلات، ویژگی‌ها و روش‌های آزمون. ویرایش ششم. شماره ۶۰۸. ویژگیها و روش آزمون.

۲. مهربان رودبنه، م.، همایونی راد، ع.، عارف حسینی، س.(۱۳۹۳). بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی، رئولوژیکی و حسی شکلات پروبیوتیک. *نشریه فراوری و نگهداری مواد غذایی*، جلد ششم، شماره دوم، صفحات ۷۹-۶۳.

۳. همایونی‌راد، ع.، یارمند، م.، احسانی، م.، عزیزی، ا.(۱۳۸۷). افزایش زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها به وسیله ریزپوشانی در بستنی فراویژه. هجدهمین کنگره علوم وصنایع غذایی، مشهد مقدس.

4.Adams, MR.,(1999)Safety of industrial *lactic acid bacteria. Journal of Biotechnology1999*; **68**: 171-8

5.Aragon-Alegro, LC., Alarcon Alegro, JH., Roberta Cardarelli, H., Chih Chiu, M., Isay Saad, SM. (2007). Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. *LWT - Food Science and Technology* **40**:669-675

6.Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, **104:**467-483

7.Charbonneau, D., Gibb, RD., Quigley EM. (2013). Fecal excretion of *Bifidobacterium Infantis* 35624 and changes in fecal microbiota after eight weeks of oral supplementation with encapsulated probiotic. *Gut Microbes* **4**:1- 201

8.Chetana, R., Reddy, S., Negi, P. (2013). Preparation and properties of probiotic chocolates using yoghurt powder. *Food and Nutrition Sciences* **4**: 276- 281

9.de Vos, P., Faas, M., Spasojevic, M., Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal* **20:** 292-302.

10.Espinoza, Y., Gallardo-Navarro, Y. (2010). Non-dairy probiotic products. *Food Microbiol* **27**:1-11.

11.Homayouni, A., Ehsani, M.R., Azizi, A., Yarmand, M.S., Razavi, S.H. (2008). Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food Chem* **111**: 50-5.

12.Jung, J.K., Kil, J.H., Kim, S.K., Jeon, J.T., Park, K.Y. (2007). Survival of double-microencapsulated *Bifidobacterium breve* in milk in simulated gastric and small intestinal conditions. *Journal of Food Science and Nutrition* **12:** 58-63.

13.Kailasapathy, K., Chin, J. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and Bifidobacterium spp. *Immunology and Cell Biology* **78:** 80-88.

14.Kailasapathy, K., Masondole, L. (2005). Survival of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* and their effect on texture of feta cheese. *Australian Journal of Dairy Technology* **60:** 252- 312.

15.Krasaekoopt, W., Bhandari, B.D. (2006). coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. *LWT - Food Science and Technology* **39**:177-381.

16.Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal* **13:** 3-13.

17.Lalicic-Petronijevic, J. (2012). Sensory, antioxidant and rheological properties of different types of chocolates with probiotics. PhD thesis, university of Belgrade, Faculty of Agriculture.

18.Lopez-Rubio, A., Sanchez, E., Wilkanowicz, S., Sanz, Y., Lagaron, J M. (2012). Electrospinning as a useful technique for the encapsulation of living *bifidobacteria* in food hydrocolloids. *Food Hydrocolloids* **28:** 159-167.

Archive of SID

www.SID.ir

19. Mohammadi, N., Ahari, H., Fahimdanesh, M., Zanjani, M.A.K., Anvar, A., Shokri E. (2012) .Survival of alginate prebiotic microencapsulated Lactobacillus acidophilus in mayonnaise sauce. *Iranian Journal of Veterinari Medicine 2012***; 6**: 259-264.
20. Mokarram, R.R., Mortazavi, S.A., Najafi, MBH., Shahidi, F. (2009). The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. *Food Research Nebesny* **15**: 115-130.
21. Muthukumarasamy, P., Holley, R.A. (2006). Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated *Lactobacillus reuteri. International Journal of Food Microbiology*, **111:**164-9.
22. Possemiers, S., Marazorati, M., Verstraete, W., Van de Wiele, T. (2009). Bacteria and chocolate: a successful combination for probiotic delivery. *International Journal of Food Microbiology 2009*; **141**: 97-103.
23. Sabikhi, L., Babu, R., Thompkinson, D., Kapila, S. (2010). Resistance of Microencapsulated *Lactobacillus acidophilus LA1* to Processing Treatments and Simulated Gut Conditions. *Food and Bioprocess Technology* **3:**586-593.
24. 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. *International Journal of food Microbiology* **62:** 47-55.
25. Truelstrup-Hansen, L., Allan-Wojtas, P., Jin, Y.L., Paulson, A.T. (2002). Survival of ca-alginate microencapsulated Bifidobacterium spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiol* **19**: 35-45.
26. Weinbreck, F., Bodnar, I., Marco, M.L. (2010). Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products? *International Journal of Food Microbiology* **136**:364-763.
27. Zanjani, M.A.K., Tarzi, B.G., Sharifan, A., Mohammadi, N., Bakhoda, H., Madanipour,M.M. (2012). Microencapsulation of *Lactobacillus casei* with calcium alginate-resistant starch and evaluation of survival and sensory properties in cream-filled cake. *African Journal of Microbiology Reseaech*, **6:** 5511-5517.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 13, Issue 2, 2017

Feasibility Study of Production a Chocolate Containing *Bifidobacterium Breve* Encapsulated by Calcium Alginate and Resistant Maiz Starch by using Emulsion Technique and Evaluation of its Survival

Kheirkhahan, N.S.[1], Ahari, H[2*], Asadi, GH.[3]

1. M.Sc. of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Assistance prof, Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Assistance prof, Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received Date: 23 February 2017 *Accepted Date: 29 June 2017*

Abstract: *The global popularity of probiotic products on one hand and their low viability in foods and digestive system on the other hand, has led researchers to innovate new techniques in order to enhance their viability. Chocolate is considered as a healthy food in societies due to its nutritional and delightful properties, ease of use and variety of forms. It is necessary to eliminate the limitations in order to use probiotics in chocolate. Therefore, to use probiotics in chocolate making, microencapsulation of probiotics can be an efficient method to protect their survival in unfavorable conditions of manufacturing process and digestive system and thus exploit the nutritional properties of chocolate. In this study, calcium alginate and resistant starch were used for making capsules by emulsion method and Bifidobacterium breve was added to chocolate in two forms: free and microencapsulated; and survival, acidity, water activity, solid content and sensory attributes of chocolate were monitored during 30 days storage at 4 ºC. the morphology and size of microcapsules were measured, SEM technique and particle size analyzer. Obtained results showed that probiotics in microencapsulated form had higher survival compared to those in free form. Acidity and water activity of chocolate with free form of probiotics were reported higher than those of samples with microencapsulated probiotics. Also chocolate contained microencapsulated probiotic had higher solid content than that of samples with free form. In addition, microencapsulation had no undesirable effect on sensory attributes of chocolate. microencapsulation helps to enhance the survival of probiotic bacteria in chocolateand manufacturing probiotic chocolate is now made possible.*

Keywords: *probiotic, Bifidobacterium breve, microencapsulation, chocolate.*

**Corresponding author: Ahari, H.*
Address: Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Tel: 09121872334
Email: dr.h.ahari@gmail.com

www.SID.ir