



تاثیر حضور باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، بیفیدوباکتریوم و استرپتوکوکوس ترموفیلوس بر خواص فیزیکوشیمیایی، رنگ سنجی و رئولوژیک شکلات تلخ پروبیوتیک

نیما مباهی*

۱- گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۳

کلمات کلیدی:

پروبیوتیک،

شکلات تلخ،

خواص فیزیکوشیمیایی،

رنگ سنجی،

ویژگی‌های رئولوژیکی.

DOI: 10.52547/fsct.18.119.115

* مسئول مکاتبات:

n.mobahi@iau-ntb.ac.ir

شکلات تلخ به عنوان محصولی پر فروش در سراسر جهان با ترکیبات اصلی سلامت محور مانند پودر و کره کائو در کنار سطح بالایی از آگاهی مصرف کنندگان در ارتباط با حفظ و افزایش سلامتی، ایده غنی سازی انواع شکلات با سویه‌های باکتری پروبیوتیک را تقویت می‌کند. هدف از این تحقیق اثرات حضور باکتری‌های ریزپوشانی شده لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، استرپتوکوکوس ترموفیلوس و بیفیدوباکتریوم با آلزینات سدیم و نشاسته مقاوم ذرت بر خواص فیزیکوشیمیایی شامل سنجش رطوبت، اسیدیته، فعالیت آبی، توزیع اندازه ذرات و سختی بافت، رنگ سنجی و ویژگی‌های رئولوژی شامل سنجش گرانشی ظاهری و پلاستیک شکلات تلخ پروبیوتیک در طول بازه نگهداری ۱۸۰ روز در دو دمای ۴ °C و ۲۵ °C با هدف تعیین دمای ذخیره سازی بررسی شدند. به منظور تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از تحقیق، از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن، در سطح احتمال ($\alpha=1\%$) انجام پذیرفت. طبق نتایج در دوره‌های روز ۰، ۷، ۳۰، ۹۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، رنگ شکلات و رئولوژیکی در دو دمای نگهداری و نیز در میان تیمارهای مختلف شکلات تلخ پروبیوتیک حاصل از سویه‌ها تفاوت معنی‌دار ($P<0/05$) مشاهده نشد. بدین ترتیب هر سه محصول به عنوان شکلات تلخ پروبیوتیک دارای ویژگی‌های مناسبی از نظر خصوصیات ذکر شده جهت حضور در بازار مصرف را دارد.

۱- مقدمه

شکلات سوسپانسیونی از ذرات ریز پراکنده و جامد شکر و پودر کاکائو (حدود ۷۰٪) در فاز پیوسته چربی است که طبق استاندارد ملی ایران و نیز سازمان غذا و دارو آمریکا از کره کاکائو^۱ تشکیل شده است [۱-۴]. امروزه این مخلوط طی یک فرآیند پیچیده و چند مرحله ای که شامل مخلوط کردن و بارگیری^۲، بهبود بافت^۳، کنج کردن^۴، مشروط کردن دمایی^۵، قالب گیری^۶، خنک کردن^۷، جدا کردن از قالب^۸ و بسته بندی^۹ می شود تهیه می گردد. طی این فرآیند به جهت کنترل ویژگی های فیزیکوشیمیایی، ساختار، بافت و خصوصیات رئولوژیکی شکلات تلاش هایی انجام شده و شرایط ویژه از نظر دما و فشار را برای هر بخش از پروسه تولید فراهم می شود. همچنین چند افزودنی نیز به جهت بهبود بافت، خواص رئولوژیک و عطر و طعم شکلات در طول فراوری افزوده می شود. به جهت بهبود طعم، رنگ و عطر شکلات از پتاسیم یا بی کربنات سدیم استفاده می شود که با افزایش pH از ۵/۵ به حدود ۸ در فرآیند بهبودی صورت می پذیرد. لستیتین به منظور دستیابی به گرانروی مناسب در هنگام انتقال شکلات مذاب در لوله ها و نیز به منظور مشروط کردن دمایی و قالب گیری ایده آل افزوده می شود [۶-۴] در میان ویژگی های شیمیایی، رطوبت از مهمترین آن ها است. حضور رطوبت در شکلات موجب افزایش احتمال رشد میکرواورگانیزم های مضر و بیماری زا، تخریب بافت و ایجاد لکه های روشن بر روی سطح و درون شکلات را افزایش داده و ساختار محصول را به دلیل کاهش گرانروی در هنگام قالب گیری تضعیف و نگهداری شکلات را با مشکل مواجه می کند. از سوی دیگر میزان اسیدیته و فعالیت آبی نیز از اهمیت ویژه برخوردار است. اسیدیته که به نوع

کره کاکائو و فساد در چربی شکلات بستگی دارد می تواند علاوه تاثیر منفی بر عطر و طعم شکلات موجب تخریب ساختار و ریز ساختار شکلات شده و شکنندگی آن را افزایش دهد. با توجه به حضور مقدار بالای چربی (بیش از ۳۰٪) و شکر (بالای ۳۵٪) در فرمولاسیون شکلات موجب شده تا فعالیت آبی این محصول کاهش چشمگیری داشته باشد اما با افزودن هر ماده دیگری در شکلات این تعادل احتمال دارد که بر هم زده شود. از دیگر موارد بسیار مهم که نه تنها در هنگام فرایند که در زمان مصرف بر شکلات تاثیر می گذارد توزیع اندازه ذرات است. حداکثر اندازه ذرات مورد قبول در شکلات تلخ بین ۱۵ الی ۲۰ میکرومتر است و ذرات بزرگتر از آن ضمن ایجاد احساس شنی بودن محصول در دهان، بخش های از فرآیند (مانند حذف پروفایل نامطبوع عطر و طعم در مرحله ورز دادن، مشروط کردن دمایی، قالب گیری و غیره) را نیز تحت تاثیر قرار می دهد. بافت از دیگر خصوصیات فیزیکی مهم میتوان شکلات است که از همه خصوصیات فیزیکی آن پیچیده تر بوده و همراه با عطر و طعم و رنگ، مهمترین ارکان کیفی شکلات را تشکیل و خریداران را تشویق به انتخاب و ترجیح یک محصول نسبت به محصولات مشابه است. بافت یک پارامتر کیفی مرتبط با تجربه ذهنی خریدار است که به احساس غذا در دهان و برداشتی که از ویژگی های فیزیکی آن در نتیجه گاز زدن و جویدن دارد اشاره می کند. بسته به اینکه تأکید بر ساختار، قوام یا احساس دهانی محصول باشد، طیف گسترده ای از ویژگی ها را برای توصیف بافت شکلات می توان استفاده کرد. از سوی دیگر و با توجه به حضور چربی و شکر در شکلات تلخ، خصوصیات فیزیکوشیمیایی و بررسی بافت برای آن بسیار مهم است زیرا پارامترهای مهمی مانند ویسکوزیته و لکه چربی^{۱۰} و دیگر موارد بر احساس دهانی محصول تأثیر مستقیم می گذارد. خصوصیات فیزیکوشیمیایی شکلات به عوامل زیادی از قبیل اجزای تشکیل دهنده شکلات، فرآیند و ترکیب کردن آن ها و همچنین شرایط نگهداری بستگی دارد [۷-۱۰]. کره کاکائو، تنها

1. Cocoa Butter (CB)
2. Mixing
3. Refining
4. Conching
5. Tempering
6. Molding
7. Cooling
8. Demolding
9. Packaging

10. Fat Bloom

تناسلی و مجاری ادرار زنان^۸، دستگاه گوارش^۹ به ویژه بیماری التهابی روده^{۱۰} و سایر بیماری‌ها بهره مند شوند. از ویژگی‌های محصولات پروبیوتیک این است که می‌توانند در گستره وسیعی از محصولات و به اشکال گوناگون، به عنوان یک مکمل غذایی، قرص‌های دارویی و یا استفاده از آن در فرمولاسیون محصولات غذایی مورد مصرف قرار گیرند [۲۳]. یکی از پرکاربردترین گونه‌های پروبیوتیک‌ها باکتری‌های گروه لاکتیکی^{۱۱} به نام باکتری‌های لاکتوباسیلوس^{۱۲} هستند که خود به جنس‌های مختلف تقسیم می‌شوند. این باکتری‌ها طی قرون متمادی در تخمیر محصولات غذایی نقش داشته و در تهیه ماست و دوغ و دیگر محصولات لبنی در منطقه خاورمیانه سابقه مصرف بیش از ۱۰۰۰ ساله دارند. نتایج مطالعات پیشین اما علاوه بر تاثیر این باکتری‌ها بر کیفیت محصولات غذایی نشان از نقش مثبت و بهبود دهنده لاکتوباسیل‌ها در سیستم ایمنی، کاهش فشار و کلسترول خون و بهبود کارکرد دستگاه گوارش داشته و خاصیت ضد سرطان رحم و مجاری ادرار در بانوان را نیز دارا می‌باشند [۲۴-۲۵]. اما لاکتوباسیل‌ها نیز مانند هر میکرواورگانیزم دیگری دارای حساسیت زنده مانی و عمر مفید بوده که شرایط حضور آن‌ها را در فرآیندهای حرارتی و ذخیره سازی دشوار می‌کند. طبق استانداردهای ایران و سازمان غذا و دارو ایالات متحده آمریکا تا زمانی که جمعیت باکتری‌ها به کمتر از 10^6 cfu/gr نرسد دارای خاصیت پروبیوتیکی و اثر گذاری کافی می‌باشند [۲۶]. اعتقاد بر این است که لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس^{۱۳} میکرو فلور روده انسان را تقویت کرده و پس از مصرف آنتی‌بیوتیک موجب تثبیت آن می‌شود [۲۷-۲۸]. استرپتوکوکوس ترموفیلوس^{۱۴} یکی دیگر از مهمترین بخش‌های فلورهای میکروبی در دستگاه گوارش و به ویژه در روده انسان و گروهی از پروبیوتیک‌ها است که برای ارتقا سلامت انسان در نظر گرفته می‌شوند [۲۹-۳۰]. آنها همچنین

فاز چربی موجود در شکلات‌های تلخ بوده و اسیدهای چرب آن با نسبت اسید اولئیک^۱ (C18:1، ۳۵٪)، اسید استئاریک^۲ (C18:0، ۳۴٪) و اسید پالمیتیک^۳ (C16:0، ۲۶٪) است [۹]. این اسیدهای چرب بسته به موقعیت استریفیکاسیون در مولکول گلیسرول شامل پالمیتوئیل-اولوئیل-پالمیتوئیل^۴، پالمیتوئیل-اولوئیل-استئاریل^۵ و استئاریل-اولوئیل-استئاریل^۶ است. کره کاکائو می‌تواند در شش شکل چند وجهی وجود داشته باشد که فرم های β و VI پایدارترین آنها هستند. شکل V در شکلات با بافت عالی غالب بوده اما در نگهداری طولانی مدت شکلات بیش از حد به آرامی به فرم VI تبدیل و موجب ظهور شکوفه چربی می‌شود [۱۳-۱۰].

ویژگی‌های رئولوژیکی برای شکلات که دارای فاز پیوسته چربی به دلیل تاثیر بر خصوصیات مهمی مانند ویسکوزیته، قوام و احساس دهانی بسیار مهم است. از نظر رئولوژیکی شکلات تلخ یک رفتار رئولوژیکی پیچیده از خود نشان می‌دهد یعنی مایع غیر نیوتنی و برش دهنده است که تنش تسلیم آشکار (حداقل مقدار انرژی برای شروع جریان مایع) و ویسکوزیته پلاستیکی (انرژی برای مایع را حرکت نگهدارد)، کاملاً به روند تولید بستگی دارد خواص رئولوژیکی شکلات پیچیده و به عوامل زیادی از جمله ترکیب و شرایط فرآوری بستگی دارد. تضعیف رفتار شکلات موجب برهم خوردن پروفایل عطر و طعم در آن شده و با کاهش قالب‌پذیری محصول در هنگام قالب گیری روبرو می‌شود [۱۴-۲۳]

تاثیر باکتری‌های پروبیوتیک امروزه بر کسی پوشیده نیست لذا محققین در تلاش هستند که این سویه‌های ارزشمند را در فرمولاسیون محصولات غذایی مهندسی کرده تا بتوانند از مزایای ارزشمند آن‌ها مانند تاثیر بر بیماری‌های قلبی و عروقی^۷، دستگاه

8. Women's Uterine Diseases

9. Digestion

10. Inflammatory Bowel Disease (IBD)

11. Lactic acid Bacteria (LAB)

12. Lactobacillus bacteria

13. Lactobacillus acidophilus

14. Streptococcus sativarius subsp. thermophilus

1. Oleic acid

2. Stearic acid

3. Palmitic acid

4. Palmitoyl-Oleoyl-Palmitoyl (POP)

5. Palmitoyl-Oleoyl-Stearoyl (POS)

6. Stearoyl-Oleoyl-Stearoyl (SOS)

7. Cardiovascular Disease

۲-۱-۲- تهیه و کشت باکتری بیفیدوباکتریوم لاکتیس

باکتری پروبیوتیک *Bifidobacterium*, *UABla-12*TM (دنيسكو-دانمارك) در دمای °C ۳۷ به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت TOS-propionate agar medium و MUP (مرک-آلمان) کشت شد. بایومس پروبیوتیک در اواخر فاز لگاریتمی با سانتریفیوژ (سیگما-آلمان) در ۶۰۰ گرم به مدت ۱۰ دقیقه در دمای °C ۴ برداشت می شود. سپس دو بار در محلول استریل ۰/۹٪ سالین (۹٪ کلرید سدیم یا ۹ گرم NaCl در یک لیتر آب) (مرک-آلمان) تحت شرایط مشابه سانتریفیوژ شسته خواهد شد و در آب دیونیزه (مرک-آلمان) رقیق گشته تا در فرایند بعدی مورد استفاده قرار گیرند. در مرحله بعد برای لیوفیلیزه کردن باکتری‌ها از روش Fonseca و همکاران (۲۰۱۵) استفاده شد. تعداد باکتری‌ها پیش از لیوفیلیزه شدن شمارش و سپس مرحله ریز پوشانی انجام انجام گرفت [۲۴ و ۳۳].

۲-۱-۳- تهیه و کشت باکتری استرپتوکوکوس ترموفیلوس

باکتری پروبیوتیک *Streptococcus thermophilus*, *TH*-⁴ (دنيسكو-دانمارك) در دمای °C ۳۷ به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت M17 broth (مرک-آلمان) کشت شد. بایومس پروبیوتیک در اواخر فاز لگاریتمی با سانتریفیوژ (سیگما-آلمان) در ۶۰۰ گرم به مدت ۱۰ دقیقه در دمای °C ۴ برداشت شد. سپس دو بار در محلول استریل ۰/۹٪ سالین (۹٪ کلرید سدیم یا ۹ گرم NaCl در یک لیتر آب) (مرک-آلمان) تحت شرایط مشابه سانتریفیوژ شسته و در آب دیونیزه شده رقیق گشته تا در فرایند بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. تعداد باکتری‌ها پیش از جداسازی و شست و شوی، تعیین و سپس بر اساس تعداد کلونی آن، مرحله بعدی انجام گرفت [۲۴].

۲-۲- انجام روش ریزپوشانی باکتری‌ها^۲

ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها به صورت جداگانه برای هر باکتری و با استفاده از روش امولسیون و در شرایط استریل انجام شد. ابتدا ۳

می‌توانند نقش مهمی در تعادل میکروارگانیسم‌های روده‌ای داشته باشند [۳۱-۳۲]. بیفیدوباکتر^۱ از دیگر گونه‌های مورد استفاده به جهت بهبود سیستم ایمنی بدن است و در محصولات پروبیوتیک نقش پررنگ و حضور فراوان دارد [۲۷-۲۸]. در این تحقیق سعی شده تا تاثیر سه سویه پروبیوتیک مذکور را که با کمک نشاسته مقاوم ذرت و آلژینات سدیم ریزپوشانی و به شکلات تلخ افزوده شده را طی ۱۸۰ روز نگهداری در دو دمای اتاق و یخچال بر خواص فیزیکیوشیمیایی، رنگ و رئولوژیکی شکلات بررسی کنیم.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱-۲- تهیه باکتری‌ها و محیط کشت آن‌ها

۲-۱-۱- تهیه و کشت باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

باکتری پروبیوتیک *Lactobacillus acidophilus*, *DDS-I*[®] (دنيسكو-دانمارك) به شکل خشک انجمادی تهیه شد را به جهت فعال کردن به ۲۰ میلی لیتر محیط کشت MRS-Broth (مرک-آلمان) در دمای °C ۳۷ افزوده و به مدت ۲۴ ساعت کشت شد و در ادامه به ۹۰ میلی لیتر از همان محیط کشت منتقل گشت تا در شرایط تکثیر قرار گیرد. سپس بایومس پروبیوتیک در اواخر فاز لگاریتمی با سانتریفیوژ (سیگما-آلمان) در ۶۰۰ گرم به مدت ۱۰ دقیقه در دمای °C ۴ جداسازی و برداشت شد. در مرحله بعد دو بار در محلول استریل ۰/۹٪ سالین (۹٪ کلرید سدیم یا ۹ گرم NaCl در یک لیتر آب) (مرک-آلمان) تحت شرایط مشابه سانتریفیوژ و شسته شد. بعد برای لیوفیلیزه کردن باکتری‌ها از روش Fonseca و همکاران (۲۰۱۵) استفاده شد. تعداد باکتری‌ها پیش از لیوفیلیزه شدن شمارش و سپس مرحله ریز پوشانی انجام انجام گرفت [۲۴].

2. Encapsulation procedure

1. *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*

دستگاه مشروط کننده شکلات^۵ (سولیش-آلمان) محصول را تمپر کرده و پس از رسیدن به دمای $26/5^{\circ}\text{C}$ ، با باکتری‌های تهیه و ریز پوشانی شده (بخش‌های ۱-۲ و ۲-۲) مخلوط و توسط دستگاه قالب گیری (سولیش-آلمان) در قالب‌های جنس پلی کربنات^۶ (به وزن هر قالب ۶ گرم از شکلات) ریخته و به مدت ۴۰ دقیقه در تونل خنک کننده (وینر-آلمان) به دمای 4°C رسید. سپس نمونه‌ها از قالب جدا و با استفاده از پلی اتیلن با چگالی کم^۷ بسته بندی و در دو دمای اتاق (25°C) و یخچال (4°C) به مدت ۱۸۰ روز نگهداری کردیم [۱ و ۳ و ۱۱] (جدول ۱).

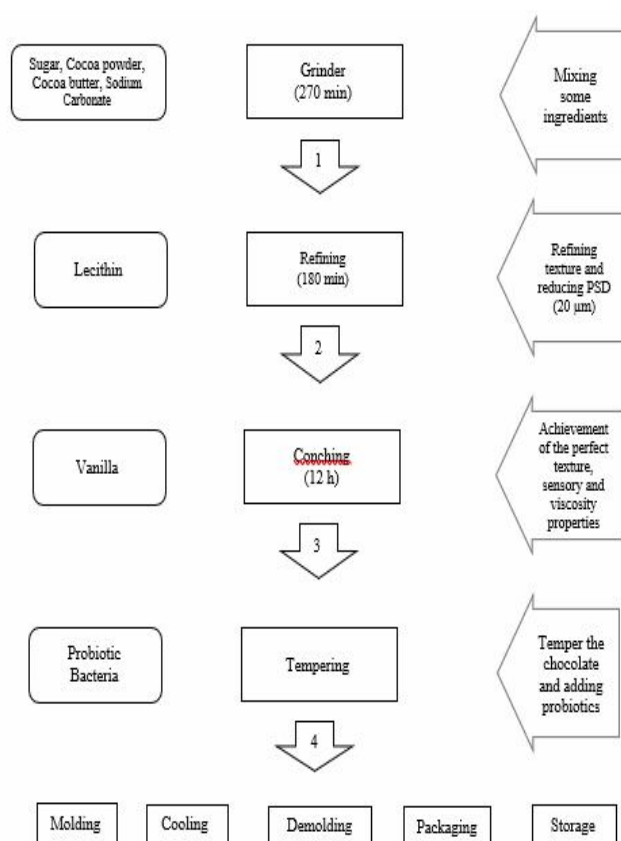


Fig1 Scheme of Scheme of Probiotic Dark Chocolate (PDC) manufacturing process (adapted from Afoakwa, 2010).

5. Tempering Machin
6. Polycarbonate chocolate mold
7. Low-density polyethylene (LDPE)

گرم آلزینات سدیم (سیگما آلدریج-ایالات متحده آمریکا) و ۲ گرم نشاسته مقاوم ذرت (نشال استارچ-انگلستان) به آرامی به ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه و پس از حل شدن در اتوکلاو استریل شد. پس از هم دمایی محلول با محیط، محلول آلزینات با سوسپانسیون میکروبی $0/1\%$ به مدت ۵ دقیقه مخلوط گردیده تا همگن شوند. برای تشکیل امولسیون، مخلوط حاصل به ۵۰۰ میلی لیتر روغن ذرت (اویلا-ایران) حاوی ۲ درصد امولسیفایر توئین ۸۰ (سیگما آلدریج-ایالات متحده آمریکا) افزوده و با همزن مغناطیسی (شیمی فن-ایران) به مدت ۳۰ دقیقه و سرعت 500rpm یکنواخت گشت. جهت تشکیل کپسول‌ها به محلول مورد نظر کلرید کلسیم $0/1\%$ مولار اضافه و پس از ۳۰ دقیقه کپسول‌ها ته نشین شدند به منظور جداسازی کپسول‌ها از سانتیفوژ سیگما-آلمان) با سرعت ۳۵۰ گرم به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. کپسول‌های جدا شده با محلول آب پیتونه $0/1\%$ شسته و در دمای 4°C نگهداری شدند [۳۳].

۳-۲- تهیه شکلات تلخ

شکل ۱ روند تهیه شکلات تلخ پروبیوتیک را شرح می‌دهد. پودر کاکائو (آلتین مارکا-ترکیه)، کره کاکائو (آلتین مارکا-ترکیه)، شکر (نیشکر هفت تپه-ایران)، وانیل (پلار بییر-چین)، لسیتین سویا (فیسمر لسیتین-کشور بلژیک) کربونات سدیم (گروه صنعتی کاوه-ایران) و نمک ید دار (گلها-ایران) را درون میکسر^۱ (وینر-آلمان) ریخته و به مدت ۲۷۰ دقیقه در دمای 55°C مخلوط نمودیم. در مرحله بهبود بافت به جهت کاهش اندازه ذرات شکلات به ریفاینر^۲ از نوع بال میل^۳ (وینر-آلمان) منتقل و به مدت ۱۸۰ دقیقه چرخش داده شدند. سپس برای بهبود پروفایل عطر طعم شکلات در دستگاه ورز دهنده با کنج^۴ (کاتچ-هلند) در دمای 70°C به مدت ۱۲ ساعت ورز داده شده و بعد به مخزن همزن و المنت دار (وینر-آلمان) منتقل و تا مرحله بعد نگهداری کرده تا دمای آن به 45°C کاهش یابد. سپس با

1. Grinder
2. Refiner
3. Ball-Mill
4. Conch

Table 1 The abbreviations, the percentage and the ingredients of samples*.

Abbreviation	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , DDS-1® (Wt. %)	<i>Bifidobacterium</i> , UABla-12™ (Wt. %)	<i>Streptococcus thermophilus</i> , TH-4® (Wt. %)	Cocoa Powder (Wt. %)	Cocoa Butter (Wt. %)	Sugar (Wt. %)	Lecithin (Wt. %)	Salt, vanilla, Sodium Carbonate (Wt. %)
PDC-L.a	1	0	0	21	34	40	0.3	3.7
PDC-B.U	0	1	0	21	34	40	0.3	3.7
PDC-S.t	0	0	1	21	34	40	0.3	3.7
DC	0	0	0	21	35	40	0.3	3.7

* Probiotic Dark Chocolate- *Lactobacillus acidophilus* (PDC-L.a), Probiotic Dark Chocolate- *Bifidobacterium* (PDC-B.U),

Probiotic Dark Chocolate- *Streptococcus thermophilus* (PDC-S.t), Dark Chocolate (DC)

۲-۴- شبیه سازی و بررسی بخش گوارش

برای شبیه سازی بزاق دهان ابتدا هر عدد شکلات تلخ پروبیوتیک به ۳۰ میلی لیتر الکترولیت استریل منتقل و سپس با محلول شبه بزاق (۶۲ gr/l از NaCl، ۲/۲ gr/l از KCl، ۰/۲۲ gr/l از CaCl₂، ۱/۲ gr/l از NaHCO₃) به همراه ۰/۰۱ درصد لیزوزیم در کیسه Stomacher برای ۲ دقیقه قرار گرفت. در مرحله شبیه ساز محیط معده، محلول شکلاتی حاصل از مرحله قبل پس از خروج از مرحله بزاقی در ۳۰ میلی لیتر الکترولیت محلول حاوی پپسین ۰/۳٪ و ۱ mol/L از HCl در انکوباتور و در دمای ۳۷ °C برای ۱ ساعت قرار گرفت تا pH به ۲ کاهش یافت. اطمینان از این کاهش با سنجش pH حاصل شد. برای شبیه سازی استرس روده pH با کمک محلول اشباع بیکربنات سدیم به ۷/۵ برگشته و در ادامه محلول شکلاتی حاصل از مرحله پیشین در ۳۰ میلی لیتر محلول الکترولیتی استریل حاوی ۰/۴۵٪ نمک صفراوی و ۰/۱٪ پانکراتین در شرایط بی هوازی در دمای ۳۷ °C به مدت ۴ ساعت قرار گرفت. در نهایت تعداد میکروبها با آزمون میکروبی اندازه گیری شد [۳۴].

۲-۵- مواد آزمایشگاهی

تمام آزمونهای میکروبی در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه تهران انجام و مواد مورد نیاز در این آزمونها از شرکت مرک ساخته شده در کشور آلمان و سیگما آلدریج ساخته شده در کشور ایالات متحده آمریکا تهیه شدند. آزمون حسی نیز به کمک کارکنان بخش دپارتمان تحقیقات و توسعه کارخانه کیان شکلات کیمیا (شکلات پامیدا) انجام شد.

۲-۶- اندازه گیری درصد رطوبت

ابتدا پلیت و شکلات به صورت جداگانه با ترازوی ۰/۰۰۱ گرم (اوهاس-سویس) توزین و شکلات را درون پلیت قرار داده و آنها را در آون (۱۲ بهمن-ایران) در درجه ۱۰۵ °C به مدت ۳ ساعت حرارت داده شد. سپس پلیت و شکلات را به درون دسیکاتور منتقل و تا رسیدن به دمای محیط خنک و بلافاصله آنها را وزن کرده و درصد رطوبت موجود در شکلات از معادله ۱ بدست آمد:

$$M_3 = \left[\frac{(M_2 - M_0)}{(M_1 - M_0)} \right] \times 100 \quad (1)$$

که M_0 برابر با وزن پلیت، M_1 برابر با وزن نمونه شکلات پیش از حرارت، M_2 وزن نمونه و پلیت پس از حرارت و M_3 درصد رطوبت شکلات است [۳۵].

۲-۷- اندازه گیری اسیدیته روغن استخراج شده

بر اساس روش استاندارد ۶۰۸ و توسط حلال ان-هگزان مقدار ۳/۵ از چربی شکلات را استخراج کرده و سپس در ارلن ۲۵۰ ml میلی لیتری توزین کرده و ۵۰ ml الکل اتیلیک خنثی جوشان و ۳ قطره معرف فتالین را به آن افزوده و در حالی که در حالت جوش است با محلول هیدروکسید سدیم تیترو کردیم. مقدار اسیدیته چربی در ۱۰۰ g گرم بر حسب اسید اولئیک (A) از طریق معادله ۲ به دست آمد.

$$A = \frac{28.2 \times V \times N}{W} \quad (2)$$

که V برابر با حجم محلول هیدروکسید سدیم، N برابر با نرمالیه محلول هیدروکسید سدیم و W برابر با وزن چربی استخراج شده بود [۳۶].

۸-۲- اندازه گیری فعالیت آبی

برای اندازه گیری فعالیت آبی نمونه‌های شکلات تلخ پروبیوتیک از دستگاه مخصوص سنجش این ویژگی (نواسینا-سوییس) استفاده شد. به این منظور ۱۵ g از شکلات در داخل محل قرارگیری نمونه قرار گرفت و پس از ۲ دقیقه عدد نمایشگر نشان دهنده فعالیت آبی نمونه‌ها بود.

۹-۲- اندازه گیری اندازه ذرات

این آزمون به صورت دستگاهی و با استفاده از دستگاه زتاسایزر (میتوتویا-ژاپن) انجام شد. مقدار ۵ گرم شکلات مذاب و دمای اتاق را پیچ آماده کردیم. تنظیم دستگاه آن را کاملاً بسته و دکمه صفر کننده را فشار دادیم تا اندازه نشان دهنده کالیبره و صفر شد. سپس پیچ تنظیم را به مقدار حدود ۲ cm باز کرده و شکلات را روی میله پیچ تنظیم ریخته و شروع به بستن پیچ تنظیم کردیم. هر کجا که پیچ تنظیم روان و سریع نچرخید بستن را متوقف کرده و اندازه مشخص شده بر روی نشانگر دیجیتال را یادداشت نمودیم. واحد اندازه‌گیری به میکرومتر می‌باشد [۳۶].

۱۰-۲- آزمون سنجش سختی بافت

این آزمون با استفاده از دستگاه بافت سنج (هانسفیلد-انگلستان) انجام شد. ابتدا نمونه را در دمای ۲۰°C به مدت ۶ ساعت نگه داشتیم. سپس نمونه در جایگاه مخصوص خود در دستگاه بافت سنج و زیر میله عمودی قرار داده شد. در نهایت بخش پردازش‌گر دستگاه را روشن کرده و با پایین آمدن، فشار میله بر شکلات و مقدار نفوذ آن به شکلات تا پیش از شکست شکلات اندازه‌گیری و در نهایت اندازه هر دو بخش ثبت شد [۲۴ و ۳۷].

۱۱-۲- آزمون‌های رئولوژیک

خصوصیات رئولوژیکی نمونه‌های آنالیز شده با استفاده از روشی که توسط انجمن بین‌المللی شیرینی‌سازی^۱ در اندازه‌گیری ویسکوزیته شکلات توصیه شده است تعیین شد. از دستگاه ویسکومتر (مایر-اسپانیا) استفاده شد. قبل از اندازه‌گیری نمونه‌ها در آن با دمای ۴۰-۴۲ درجه سلسیوس در مدت ۶۰ دقیقه ذوب شدند. برای محاسبات داده‌ها و سایر پارامترهای رئولوژیکی (مقدار عملکرد جریا و گرانیروی ظاهری و پلاستیکی) از مدل

ریاضی کاسون و شاخص آماری از برازش معادله داده شده در قالب ضریب همبستگی^۲ (r) تعیین و حسابات با استفاده از نرم افزار Rheoplus/32 V3.21 و روش مربعات انجام شد. اندازه‌گیری خصوصیات جریان در دمای ۴۰°C با استفاده از نرخ برشی در محدوده ۲S⁻¹ تا ۵۰S⁻¹ انجام شد. براساس مقادیر اندازه‌گیری شده نرخ تنش برشی بسته به نرخ برشی از طریق معادله ۳ مورد آزمایش قرار گرفت،

$$\sqrt{\tau} = \sqrt{\tau_{CA}} + \sqrt{\eta_{CA} \cdot \dot{\gamma}} \quad (3)$$

که τ برابر با نرخ تنش برشی، τ_{CA} برابر با عملکرد کاسون، η_{CA} برابر با نرخ پلاستیک کاسون ویسکوزیته و D برابر با نرخ برشی است [۳۸].

۱۲-۲- آزمون رنگ سنجی

برای آزمون رنگ سنجی از دستگاه رنگ سنج (شرکت هانتربل-کشور ایالات متحده آمریکا) استفاده شد. برای این منظور نمونه شکلات را مجدداً به صورت دایره‌ای به قطر ۹۰ و ضخامت ۱۰ میلی‌متر قالبگیری و در محل مخصوص نمونه در دستگاه قرار داده شد. نور از منبع نوری دستگاه به نمونه تابیده و در سیستم CIELAB فاکتورهای a، b و L سنجیده و فاکتور ΔE محاسبه گردید. اندازه‌گیری در دمای محیط (۲۵-۲۰ درجه سلسیوس) انجام گرفت (معادله ۴).

$$\Delta E = \sqrt{(L_{PDC} - L_{Standard})^2 + (a_{PDC} - a_{Standard})^2 + (b_{PDC} - b_{Standard})^2}$$

که L_{PDC} درجه روشنایی (سیاهی، ۰) تا روشنی (سفیدی، ۱۰۰)، a_{PDC} درجه سبز تا قرمز و b_{PDC} از آبی تا زرد را نشان می‌دهد [۳۹].

۱۳-۲- تجزیه و تحلیل آماری

طراحی آزمایش‌ها با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با انجام ۳ بار تکرار ($n=3$) صورت گرفت. برای بررسی تفاوت معنی‌داری بین میانگین داده‌های پارامترهای فیزیکی-شیمیایی، خواص رئولوژیکی و نیز رنگ سنجی شکلات و تغییرات آن‌ها طی ۶ ماه از دستورالعمل مرتبط به آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) در سطح $p < 0.05$ با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۶ محاسبه شد.

2. Correlation coefficient

1. International Confectionery Association (ICA)

۳- نتایج و تحلیل داده‌ها

۳-۱- ارزیابی تغییرات رطوبت

نظر به جدول مقایسه میانگین ۲، بیشترین مقدار رطوبت معادل

Table 2 Values of the moisture parameter of the dark chocolates with and without probiotics during storage of 180 days at 4 °C and 25 °C in percent^{±*}.

specimens	Time						
	0	7	30	90	120	150	180
PDC-L.a (4 °C)	0.31±0.04 ^a	0.39±0.06 ^a	0.36±0.03 ^a	0.34±0.05 ^a	0.32±0.06 ^a	0.40±0.03 ^a	0.42±0.08 ^a
PDC-L.a (25 °C)	0.30±0.05 ^a	0.38±0.03 ^a	0.35±0.04 ^a	0.33±0.01 ^a	0.33±0.02 ^a	0.31±0.08 ^a	0.33±0.07 ^a
PDC-B.U (4 °C)	0.30±0.06 ^a	0.36±0.03 ^a	0.37±0.4 ^a	0.37±0.04 ^a	0.32±0.04 ^a	0.39±0.06 ^a	0.43±0.08 ^a
PDC-B.U (25 °C)	0.31±0.06 ^a	0.33±0.06 ^a	0.35±0.01 ^a	0.36±0.07 ^a	0.33±0.04 ^a	0.39±0.04 ^a	0.39±0.05 ^a
PDC-S.t (4 °C)	0.29±0.04 ^a	0.34±0.01 ^a	0.40±0.02 ^a	0.38±0.03 ^a	0.36±0.06 ^a	0.41±0.04 ^a	0.40±0.06 ^a
PDC-S.t (25 °C)	0.33±0.07 ^a	0.33±0.04 ^a	0.35±0.01 ^a	0.34±0.01 ^a	0.39±0.05 ^a	0.40±0.06 ^a	0.39±0.05 ^a
DC (4 °C)	0.34±0.04 ^a	0.35±0.04 ^a	0.34±0.07 ^a	0.38±0.06 ^a	0.39±0.02 ^a	0.39±0.04 ^a	0.44±0.01 ^a
DC (25 °C)	0.31±0.05 ^a	0.33±0.05 ^a	0.32±0.08 ^a	0.35±0.01 ^a	0.35±0.04 ^a	0.39±0.01 ^a	0.39±0.05 ^a

[±]Means within each column with the same letter are not significantly different (P<0.05)

^{*}Data are means ± SD.

اتیلنی را پیشنهاد نمودند [۷ و ۳۶].

۳-۲- ارزیابی تغییرات اسیدیته

مطابق جدول مقایسه میانگین ۳، بیشترین مقدار اسیدیته نمونه‌ها معادل ۱/۳۶٪ در تیمارهای PDC-B.U در روز ۱۸۰ و دمای ۲۵°C و همچنین PDC-S.t در روز ۱۲۰ و دمای ۴°C مشاهده شد. اما کمترین مقدار آن معادل ۱/۲۹ درصد در تیمار کنترل و در روز انتهایی روز ۰ و دمای ۴°C مشاهده گردید.

اسیدیته کره کاکائو پیش از افزودن به نمونه‌های شکلات تلخ معادل ۰/۹٪ اندازه‌گیری شد که با تغییرات اندک در این مقدار طی نگهداری ۱۸۰ روزه نمونه‌ها تفاوت معنی‌داری طی دوره نگهداری در دو دمای ۴°C و ۲۵°C بین مقدار اسیدیته تیمارها و نمونه کنترل مشاهده نشد (P<0.05). بیشینه مجاز این پارامتر ۱/۵٪ وزنی بر حسب اسید اولئیک موجود در چربی کره کاکائو است. عوامل مختلفی می‌توانند بر این مقدار اثر منفی گذاشته و موجب تخریب پروفایل طعمی، تضعیف بافت و ساختار شکلات و همچنین ایجاد فساد شیمیایی در شکلات کنند اما نمازی و

میزان رطوبت مجاز از دیدگاه استاندارد ۶۰۸ معادل ۲٪ وزنی است، هرچند به طور کلی حضور رطوبت در شکلات سبب ایجاد لکه‌هایی کمرنگ‌تر بر روی آن شده و از فاکتورهایی است که بر رشد میکروارگانیسم‌ها از جمله پروبیوتیک‌ها تاثیر دارد اما پایداری اکسیداتیو از مهم‌ترین پارامترهایی است که با افزایش رطوبت از مقدار آن کاسته شده و احتمال اکسیداسیون افزایش می‌یابد که تاثیر بسیار زیادی بر کاهش جمعیت میکروبی دارد. مطابق جدول ۲، مقدار رطوبت نمونه‌های حاوی سویه‌های مخالف باکتری در دو دمای ۴°C و ۲۵°C افزایش نداشته و در مقایسه با نمونه کنترل دارای تفاوت معنی‌دار نبود (P<0.05). علت اصلی نتیجه حاصل را می‌توان به شرایط صحیح نگهداری نمونه‌ها نسبت داد. بسته‌بندی و نگهداری صحیح در محیط خشک و خنک (دور از منابع حرارتی و نور مستقیم آفتاب در دمای اتاق) از مناسب‌ترین روش‌ها جهت جلوگیری از ورود رطوبت احتمالی به درون شکلات است. Afoakwa و همکاران (۲۰۱۰) در تحقیقات خود جهت حفظ کیفیت شکلات و جلوگیری از نفوذ رطوبت به درون آن‌ها، بسته‌بندی با مواد پلی

همکاران (۱۳۹۰) در تحقیقات خود به نتایج مشابهی دست یافته و بیان داشتند که شکلات به شرط نگهداری در دمای ۴°C و نیز در محل خشک با بسته بندی کامل موجب حفظ اسیدیته در

محدوده استاندارد ۶۰۸ (معادل ۱/۵٪) تاثیری بر افزایش اسیدیته نمونه‌ها نخواهد داشت [۳۶ و ۴۰].

Table 3 Values of the Acidity parameter of the dark chocolates with and without probiotics during storage of 180 days at 4 °C and 25 °C in percent^{±*}.

specimens	Time						
	0	7	30	90	120	150	180
PDC-L.a (4 °C)	1.30±0.01 ^a	1.31±0.02 ^a	1.31±0.03 ^a	1.30±0.01 ^a	1.30±0.05 ^a	1.31±0.07 ^a	1.32±0.01 ^a
PDC-L.a (25 °C)	1.30±0.05 ^a	1.31±0.08 ^a	1.33±0.04 ^a	1.33±0.05 ^a	1.35±0.07 ^a	1.33±0.03 ^a	1.33±0.04 ^a
PDC-B.U (4 °C)	1.30±0.06 ^a	1.30±0.02 ^a	1.31±0.8 ^a	1.33±0.04 ^a	1.32±0.05 ^a	1.30±0.05 ^a	1.33±0.08 ^a
PDC-B.U (25 °C)	1.30±0.04 ^a	1.31±0.07 ^a	1.32±0.05 ^a	1.36±0.05 ^a	1.33±0.02 ^a	1.30±0.06 ^a	1.36±0.07 ^a
PDC-S.t (4 °C)	1.31±0.07 ^a	1.32±0.01 ^a	1.30±0.08 ^a	1.30±0.05 ^a	1.36±0.04 ^a	1.31±0.04 ^a	1.35±0.05 ^a
PDC-S.t (25 °C)	1.32±0.01 ^a	1.30±0.04 ^a	1.33±0.03 ^a	1.32±0.01 ^a	1.35±0.01 ^a	1.30±0.01 ^a	1.34±0.03 ^a
DC (4 °C)	1.29±0.05 ^a	1.32±0.06 ^a	1.32±0.07 ^a	1.31±0.04 ^a	1.33±0.04 ^a	1.32±0.06 ^a	1.34±0.04 ^a
DC (25 °C)	1.30±0.05 ^a	1.32±0.04 ^a	1.33±0.08 ^a	1.32±0.06 ^a	1.32±0.03 ^a	1.32±0.05 ^a	1.33±0.07 ^a

[±]Means within each column with the same letter are not significantly different (P<0.05)

*Data are means ± SD.

۱۸۰ و در هر دو دمای ۲۵°C و ۴°C مشاهده شد. اما کمترین مقدار آن معادل ۲۰/۰٪ در اکثر تیمارها و تا روز انتهای روز ۷ در هر دو دما مشاهده گردید.

۳-۳-ارزیابی تغییرات فعالیت آبی (a_w)

مطابق جدول مقایسه میانگین ۴، بیشترین مقدار فعالیت آبی در نمونه‌ها معادل ۲۵/۰٪ در تیمارهای PDC-S.t در روزهای ۱۵۰ و

Table 4 – Values of the Water activity parameter of the dark chocolates with and without probiotics during storage of 180 days at 4 °C and 25 °C in percent^{±*}.

specimens	Time						
	0	7	30	90	120	150	180
PDC-L.a (4 °C)	0.21±0.04 ^a	0.22±0.02 ^a	0.22±0.03 ^a	0.23±0.01 ^a	0.23±0.05 ^a	0.24±0.06 ^a	0.24±0.02 ^a
PDC-L.a (25 °C)	0.20±0.05 ^a	0.21±0.02 ^a	0.21±0.02 ^a	0.21±0.03 ^a	0.22±0.01 ^a	0.23±0.01 ^a	0.23±0.02 ^a
PDC-B.U (4 °C)	0.20±0.01 ^a	0.20±0.01 ^a	0.22±0.3 ^a	0.22±0.04 ^a	0.23±0.05 ^a	0.24±0.05 ^a	0.24±0.02 ^a
PDC-B.U (25 °C)	0.20±0.01 ^a	0.21±0.01 ^a	0.22±0.01 ^a	0.22±0.01 ^a	0.21±0.01 ^a	0.23±0.04 ^a	0.24±0.01 ^a
PDC-S.t (4 °C)	0.21±0.01 ^a	0.21±0.01 ^a	0.23±0.02 ^a	0.23±0.05 ^a	0.23±0.04 ^a	0.25±0.01 ^a	0.25±0.02 ^a
PDC-S.t (25 °C)	0.20±0.01 ^a	0.20±0.01 ^a	0.21±0.01 ^a	0.22±0.01 ^a	0.23±0.01 ^a	0.24±0.01 ^a	0.25±0.01 ^a
DC (4 °C)	0.20±0.01 ^a	0.20±0.01 ^a	0.20±0.02 ^a	0.21±0.04 ^a	0.20±0.02 ^a	0.22±0.06 ^a	0.22±0.04 ^a
DC (4 °C)	0.20±0.01 ^a	0.21±0.02 ^a	0.21±0.01 ^a	0.22±0.01 ^a	0.22±0.01 ^a	0.22±0.02 ^a	0.22±0.01 ^a

[±]Means within each column with the same letter are not significantly different (P<0.05)

*Data are means ± SD.

عوامل مختلفی مانند نوع مواد اولیه مورد استفاده، دما و رطوبت آنها و نیز نوع ترکیب کردن می‌توانند بر فعالیت آب در شکلات تأثیر بگذارند [۴۱ و ۴۲]. شکلات تلخ به دلیل ترکیبات موجود در آن ذاتا محصولی با فعالیت آب کم است [۴۳]. روسینی و همکاران (۱۹۸۸) [۴۱] مقدار فعالیت آبی را برابر ۰/۳۴٪ برای شکلات تلخ بیان کرد. در این مطالعه فعالیت آبی کلیه نمونه‌ها کمتر یا برابر ۰/۲۵ تعیین شد. این تفاوت ممکن است در نتیجه تفاوت‌های حضور باکتری‌ها در نمونه‌ها باشد. فرزانه‌مهر و عباسی (۲۰۰۹) [۴۴] نیز اما فعالیت آبی شکلات تلخ با اینولین به عنوان جایگزین شکر را ۰/۳۴٪ تعیین کردند. میزان فعالیت آبی در شکلات به علت حضور درصد بالای شکر و چربی بسیار کم است حذف شکر منجر به افزایش جزئی آن در نمونه‌های تحقیق آنان شده بود. از طرفی نبود فعالیت آبی کافی ممکن است رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها را نیز محدود کند. نتایج نمایانگر افزایش در فعالیت آبی نمونه کنترل و پروبیوتیک‌ها بود که این تفاوت اگرچه معنی دار نبود ($p < 0/05$) و مقدار فعالیت آبی شکلات تلخ پروبیوتیک بیشتر از نمونه کنترل گزارش شد اما میزان این فعالیت به مقداری نیست که بتواند بر رشد و ادامه بقای باکتری‌ها تأثیر بگذارد. Budryn و همکاران (۲۰۰۷) [۴۵] مشاهده کردند که فعالیت آبی در روشک‌های شکلاتی بیسکویت‌هایی که با مقدار متفاوتی از LAB غنی‌سازی شده بودند بیشتر از روشک‌های نمونه کنترل بود. رودبنه و همکاران (۱۳۹۶) [۴۶] نیز نتایج مشابهی درباره بالا بودن میزان فعالیت آبی شکلات پروبیوتیک حاوی LAB نسبت به نمونه معمولی و کنترل خود داشته و محدود ۰/۲۰٪ الی ۰/۲۷٪ را برای شکلات‌های تلخ حاوی لاکتوباسیلوس کازئی به دست آوردند.

۳-۴- ارزیابی اندازه ذرات، گرانروی و بافت

شناسی

طبق جدول‌های مقایسه میانگین ۵ الی ۷، اندازه ذرات شکلات در تیمارهای کنترل و شکلات تلخ پروبیوتیک ۱۵۰ μm بود که تفاوت معنی داری با یکدیگر و در طی نگهداری ۱۸۰ روز

نداشته‌اند. ابعاد باکتری‌های مورد استفاده در حدود ۱۰ μm است در حالی که با توجه به انجام مرحله بهبود بافت (ریفاینر) و کاهش اندازه ذرات در تهیه شکلات اجزای آن در محدوده ۱۵ الی ۲۰ میکرومتر قرار گرفتند که این مقدار بزرگتر از اندازه باکتری‌ها است [۲۴]. اندازه ذرات می‌تواند بر گرانروی و جریان شکلات هنگام انتقال در مسیر فرآیند و از همه مهمتر بر روی مشروط کردن دمایی تأثیر بسزایی گذاشته و در صورتی که از محدوده ۱۵ الی ۱۸ میکرومتر افزایش یابد مراحل مورد ذکر را مختل و به محصول آسیب برساند. از سویی ممکن است با عدم مشروط شدن دمایی کامل ایجاد حس شنی در دهان و هنگام مصرف ایجاد کند و از سوی دیگر با توجه به فرم کریستال‌های نامتقارن چربی‌ها شاهد ظهور لکه‌های چربی (شکوفه چربی) بر روی محصول می‌شود [۲۰].

بر اساس جداول ۵ الی ۷ مقادیر اندازه‌گیری شده گرانروی در طول مدت زمان نگهداری تفاوت معنی داری مشاهده شد ($p < 0/05$). در جدول ۵ و طی ۳۰ روز نگهداری مقادیر ویسکوزیته ظاهری در حدود ۹/۲ Pa.s بود در حالی که دوره ۶۰ روزه نگهداری ۶/۸ Pa.s ثبت و در ۹۰ روز انتهایی به ۳/۶ Pa.s کاهش یافت. این تفاوت معنی دار در طول دوره نگهداری مربوط به تمام نمونه‌های شکلات تلخ پروبیوتیک و کنترل در هر دو دمای نگهداری مشاهده شد و ارتباط حضور و عدم حضور باکتری در شکلات و تغییرات ویسکوزیته ظاهری را ثابت نکرد. مقادیر ویسکوزیته پلاستیک نیز همانند ویسکوزیته ظاهری بود و طی ۱۸۰ روز از ۵/۵ Pa.s در دوره اول نگهداری به ۱/۷ Pa.s در انتهای دوره سوم رسید اما در بین نمونه‌های پروبیوتیک و کنترل تفاوت معنی داری وجود نداشت. حضور درصد بالای چربی که ذرات جامد را پوشانده و شروع جریان را آسان می‌کند تأثیر فراوانی بر ویسکوزیته ظاهری داشته و در مواردی مانند قالب‌گیری اهمیت فراوانی دارد. در حالی که گرانروی پلاستیک بیشتر به محیط‌های برشی بالاتر مانند جریان از طریق پمپ و ادامه جریان در لوله‌ها و جابجایی در مسیر مربوط می‌شود. مواردی مانند مشروط کردن دمایی متأثر از هر دو ویسکوزیته بوده و

تغییر در آن دو می‌تواند بر این مرحله تأثیر منفی بگذارد [۱، ۲۴ و ۴۷]. اگر چه پیش بینی می‌شد که کاهش ۱ درصدی در میزان چربی و افزودن همین مقدار از باکتری‌ها به فرمولاسیون به عنوان بازتابی از عملکرد نیروی بین ذرات جامد یعنی فاصله بین آن‌ها عملکرد ویسکوزیته ظاهری و پلاستیک شکلات تلخ را تا حد بیشتری تحت تأثیر قرار دهد اما با توجه به نتایج تحقیقات *Lalic'ic'-Petonijsvic* و همکاران (۲۰۱۵) [۲۴] تفاوت معنی داری در اثر افزودن باکتری‌ها به وجود نیامد [۴۸ و ۴۷]. ضریب تعیین برای محاسبه ویسکوزیته پلاستیک ۰/۹۹۹ و در ویسکوزیته ظاهری ۰/۹۸۵ بود.

در رفتار بافت شناسی نیز تفاوت معنی‌داری ما بین نمونه‌های کنترل و شکلات تلخ پروبیوتیک مشاهده نشد. بر اساس یافته‌های جداول ۵ الی ۷، بیشترین مقدار نفوذ در تیمار کنترل در دو دمای ۴۰°C و ۲۵°C و به مقدار ۳/۵ میلی‌متر در دور اول نگهداری و کمترین مقدار آن در هر ۳ تیمار شکلات تلخ پروبیوتیک و به مقدار ۲/۸ میلی‌متر اندازه‌گیری در هر دو دمای نگهداری بود. همچنین نیروی مورد نیاز جهت سنجش سختی نمونه‌ها از N ۸/۶ در نمونه کنترل در دور اول نگهداری به N ۷/۳ در انتهای

دوره ۱۸۰ روزه کاهش یافت که تفاوت معنی دار در هر دو مورد مشاهد شد ($p < 0.05$). به طور کلی روند کاهش مقدار نفوذ با کاهش مقدار نیرو جهت نفوذ در شکلات رابطه مستقیم دارد که حکایت از کاهش انسجام بافت شکلات در طول دوره نگهداری دارد. از طرفی در هنگام تولید هرچه این مقادیر کمتر باشد اندازه ذرات شکلات درشت‌تر، میزان پذیرش دهانی کمتر، مشروط کردن دمایی سخت‌تر و تا حدودی غیر ممکن و همچنین ذوب شدن شکلات در دمای محیط سریع‌تر اتفاق می‌افتد. *Afoakwa* (۲۰۱۰) در تحقیق خود نشان دادند که سختی بافت رابطه عکس با اندازه ذرات، مقدار چربی و مقدار لستین دارد [۱]. با توجه به اندازه ذره باکتری‌ها (در حدود $10\mu m$) که کمتر از اندازه ذرات شکلات است می‌توان نتیجه گرفت که افزودن آن به شکلات تلخ فراسودمند تأثیری ندارد اما در گذر زمان و با توجه به تغییر فرم کریستال‌های کره کاکائو از β به VI تبدیل شده و موجب ایجاد بافت سست‌تر و کاهش انسجام و پیوندهای عرضی در شکلات‌های تلخ پروبیوتیک و نمونه کنترل در دو دمای نگهداری شد [۱۰، ۱۳].

Table 5 Values of the Physical and flow parameters of the dark chocolates with and without probiotics during storage of 30 days at 4 °C and 25 °C in percent^{±*}.

specimens	Time (180)						Correlation coefficient (r)
	PSD (μm)	Hardness (N)	Breaking Point (mm)	Yield value (Pa)	Viscosity (Pa.s)		
					Plastic	Apparent	
PDC-L.a (4 °C)	15.27±0.02 ^a	8.59±0.01 ^a	3.45±0.01 ^a	19.65±0.01 ^a	5.57±0.01 ^a	9.21±0.02 ^a	0.99895
PDC-L.a (25 °C)	15.41±0.01 ^a	8.57±0.01 ^a	3.46±0.02 ^a	19.63±0.02 ^a	5.58±0.01 ^a	9.23±0.02 ^a	0.99831
PDC-B.U (4 °C)	15.47±0.01 ^a	8.61±0.02 ^a	3.45±0.02 ^a	19.64±0.02 ^a	5.57±0.02 ^a	9.25±0.01 ^a	0.99279
PDC-B.U (25 °C)	15.39±0.01 ^a	8.61±0.01 ^a	3.53±0.02 ^a	19.67±0.01 ^a	5.55±0.01 ^a	9.22±0.02 ^a	0.99768
PDC-S.t (4 °C)	15.47±0.02 ^a	8.63±0.02 ^a	3.49±0.01 ^a	19.68±0.02 ^a	5.56±0.02 ^a	9.22±0.01 ^a	0.99801
PDC-S.t (25 °C)	15.51±0.02 ^a	8.59±0.02 ^a	3.48±0.02 ^a	19.69±0.01 ^a	5.57±0.01 ^a	9.21±0.01 ^a	0.99809
DC (4 °C)	15.50±0.01 ^a	8.60±0.01 ^a	3.51±0.01 ^a	19.65±0.01 ^a	5.58±0.02 ^a	9.24±0.01 ^a	0.99904
DC (25 °C)	15.16±0.02 ^a	8.59±0.01 ^a	3.52±0.01 ^a	19.66±0.01 ^a	5.56±0.02 ^a	9.21±0.01 ^a	0.99982

[±]Means within each column with the same letter are not significantly different ($P < 0.05$)

*Data are means \pm SD.

Table 6 Values of the Physical and flow parameters of the dark chocolates with and without probiotics during storage of 30-90 days at 4 °C and 25 °C in percent^{±*}.

specimens	Time (30-90)						Correlation coefficient (r)
	PSD (μm)	Hardness (N)	Breaking Point (mm)	Yield value (Pa)	Viscosity (Pa.s)		
					Plastic	Apparent	
PDC-L.a (4 °C)	15.65±0.01 ^a	8.27±0.02 ^a	2.95±0.01 ^a	7.98±0.01 ^a	2.37±0.01 ^a	6.81±0.02 ^a	0.99141
PDC-L.a (25 °C)	15.67±0.01 ^a	8.29±0.02 ^a	2.96±0.01 ^a	7.95±0.02 ^a	2.38±0.02 ^a	6.82±0.02 ^a	0.99844
PDC-B.U (4 °C)	15.66±0.01 ^a	8.26±0.01 ^a	2.94±0.01 ^a	7.94±0.01 ^a	2.39±0.02 ^a	6.81±0.02 ^a	0.99849
PDC-B.U (25 °C)	15.65±0.02 ^a	8.29±0.01 ^a	2.95±0.02 ^a	7.97±0.02 ^a	2.35±0.01 ^a	6.82±0.01 ^a	0.99729
PDC-S.t (4 °C)	15.64±0.01 ^a	8.26±0.02 ^a	2.97±0.01 ^a	7.98±0.01 ^a	2.39±0.01 ^a	6.82±0.01 ^a	0.99879
PDC-S.t (25 °C)	15.69±0.02 ^a	8.28±0.02 ^a	2.95±0.02 ^a	7.99±0.02 ^a	2.38±0.01 ^a	6.81±0.02 ^a	0.998
DC (4 °C)	15.68±0.02 ^a	8.29±0.01 ^a	2.95±0.01 ^a	7.96±0.02 ^a	2.38±0.02 ^a	6.80±0.01 ^a	0.9994
DC (25 °C)	15.68±0.02 ^a	8.28±0.01 ^a	2.96±0.01 ^a	7.97±0.01 ^a	2.38±0.01 ^a	6.81±0.02 ^a	0.99735

[±]Means within each column with the same letter are not significantly different (P<0.05)

*Data are means ± SD.

Table 7 Values of the Physical and flow parameters of the dark chocolates with and without probiotics during storage of 90-180 days at 4 °C and 25 °C in percent^{±*}.

specimens	Time (90-180)						Correlation coefficient (r)
	PSD (μm)	Hardness (N)	Breaking Point (mm)	Yield value (Pa)	Viscosity (Pa.s)		
					Plastic	Apparent	
PDC-L.a (4 °C)	15.58±0.01 ^a	7.39±0.02 ^a	2.82±0.02 ^a	7.88±0.01 ^a	1.71±0.01 ^a	3.59±0.02 ^a	0.99172
PDC-L.a (25 °C)	15.59±0.02 ^a	7.37±0.02 ^a	2.85±0.01 ^a	7.85±0.02 ^a	1.73±0.01 ^a	3.62±0.01 ^a	0.99862
PDC-B.U (4 °C)	15.59±0.01 ^a	7.36±0.01 ^a	2.84±0.01 ^a	7.88±0.01 ^a	1.73±0.02 ^a	3.61±0.02 ^a	0.99927
PDC-B.U (25 °C)	15.55±0.01 ^a	7.39±0.02 ^a	2.83±0.02 ^a	7.86±0.02 ^a	1.71±0.02 ^a	3.58±0.02 ^a	0.99937
PDC-S.t (4 °C)	15.57±0.02 ^a	7.36±0.02 ^a	2.82±0.01 ^a	7.87±0.02 ^a	1.72±0.02 ^a	3.62±0.01 ^a	0.99879
PDC-S.t (25 °C)	15.59±0.01 ^a	7.36±0.01 ^a	2.83±0.02 ^a	7.86±0.01 ^a	1.71±0.02 ^a	3.61±0.01 ^a	0.99978
DC (4 °C)	15.58±0.01 ^a	7.39±0.02 ^a	2.84±0.02 ^a	7.89±0.02 ^a	1.73±0.01 ^a	3.60±0.01 ^a	0.99798
DC (25 °C)	15.58±0.01 ^a	7.38±0.01 ^a	2.83±0.02 ^a	7.86±0.02 ^a	1.71±0.02 ^a	3.61±0.01 ^a	0.99739

[±]Means within each column with the same letter are not significantly different (P<0.05)

*Data are means ±SD

پروبیوتیک داشت که عدم تاثیر حضور باکتری‌های پروبیوتیک بر روی شکلات را نشان داد. این مورد نیز در تحقیقات *Petronijevic* و همکارانش در سال ۲۰۱۵ ثابت شد. آنها نیز با افزودن میکروب به شکلات و نیز شیر کاکائو آزمون رنگ سنجی را انجام دادند که در نهایت مشخص شد افزودن

۳-۵- ارزیابی تغییرات رنگ شکلات تلخ

فراسودمند

مقدار متوسط L_{PDC} ، a_{PDC} و b_{PDC} در جدول نشان از عدم تفاوت معنی دار بین نمونه‌های کنترل و شکلات تلخ

باکتری‌های پروبیوتیک تاثیر معنی داری ($p < 0.05$) بر رنگ شکلات ندارد [۲۸].

Table 5 Values of the Physical and flow parameters of the dark chocolates with and without probiotics during storage of 30 days at 4 °C and 25 °C in percent^{±*}.

specimens	Time (180)			
	L _{PDC}	a _{PDC}	b _{PDC}	ΔE
PDC-L.a (4 °C)	24.56±0.01 ^a	1.36±0.01 ^a	3.45±0.01 ^a	1.65±0.01 ^a
PDC-L.a (25 °C)	24.55±0.02 ^a	1.33±0.02 ^a	3.46±0.02 ^a	1.68±0.02 ^a
PDC-B.U (4 °C)	24.61±0.02 ^a	1.33±0.01 ^a	3.45±0.02 ^a	1.64±0.02 ^a
PDC-B.U (25 °C)	24.59±0.02 ^a	1.32±0.02 ^a	3.53±0.02 ^a	1.70±0.01 ^a
PDC-S.t (4 °C)	24.57±0.01 ^a	1.35±0.01 ^a	3.49±0.01 ^a	1.68±0.02 ^a
PDC-S.t (25 °C)	22.59±0.01 ^a	1.31±0.01 ^a	3.48±0.02 ^a	1.69±0.01 ^a
DC (4 °C)	15.50±0.01 ^a	8.60±0.01 ^a	3.51±0.01 ^a	19.65±0.01 ^a
DC (25 °C)	15.16±0.02 ^a	8.59±0.01 ^a	3.52±0.01 ^a	19.66±0.01 ^a

[±]Means within each column with the same letter are not significantly different ($P < 0.05$)

^{*}Data are means ± SD.

استاندارد ایران به منظور تولید این محصول در مقیاس صنعتی خارج نشدند. در بررسی بافت و استحکام ساختار، اگر چه محصولات نگهداری شده در هر دو دما نتایج قابل قبولی را کسب کردند اما نوع نگهداری شده در دمای یخچال بافتی با یکنواختی و استحکام بیشتری را نشان داد. رفتار رئولوژی نمونه‌ها مشخص کرد که نگهداری در هر دو دما نتایج مشابهی را ارائه داده و اثبات کردند که افزودن باکتری‌های پروبیوتیکی بر رفتار رئولوژیک شکلات تلخ اثر معنی داری ندارد. لذا افزودن باکتری‌های مذکور تاثیر منفی بر روی پارامترهای فیزیکوشیمیایی، ساختار و رئولوژیک شکلات تلخ نگذاشته و ترکیبی از باکتریهای پروبیوتیک و شکلات تلخ نشان دهنده مسیر امیدوار کننده به سمت تشکیل محصولات جدید فراسودمند است که دارای طعم لذت بخش و اثرات بهبود دهندگی سلامت می‌باشند.

۵- منابع

- [1] Afoakwa, E. O., Paterson, A. Afoakwa, E. O., Paterson, A. & Fowler, M. 2007a. Factors influencing rheological and textural qualities in chocolate – a review. Trends in Food Science and Technology. 18. 290–298.

اثر پراکندگی اجزا و بافت شکلات بر روی رنگ محصول و پخش آن مشهود است. حفظ اندازه ذرات در محدوده ۱۵ الی ۲۰ میکرومتر و ۳۵ درصد چربی موجب ایجاد روشنایی و شفافیت رنگ بیشتری می‌شود. این در حالی است که حضور سویه‌های پروبیوتیک با توجه به ابعاد آن‌ها تفاوت معنی داری بر رنگ شکلات‌های تلخ پروبیوتیک ایجاد نکرد. از طرف دیگر کاهش ۱ درصدی مقدار چربی نیز میزان پراکندگی ذرات و بافت و به دنبال آن رنگ شکلات را تغییر نداد که با نتایج تحقیقات Saputro و همکاران (۲۰۱۹) مطابقت دارد [۴، ۴۸].

۴- نتیجه گیری

در مطالعه حاضر شکلات تلخ ۶۰٪ با موفقیت با سویه‌های پروبیوتیک باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، استرپتوکوکوس ترموفیلوس و بیفیدوباکتریوم ترکیب شده و شکلات تلخ پروبیوتیک تولید شد. بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نشان داد که شکلات تلخ پروبیوتیک نگهداری شده در دو دمای ۴ °C و ۲۵ °C طی ۱۸۰ روز دارای درصد رطوبت، اسیدیته و فعالیت آبی قابل قبولی بوده و از حد مجاز

- ed.). Oxford: Blackwell Science. 218–230.
- [14] Rodriguez Furlán, L. T., Baracco, Y., Lecot, J., Zaritzky, N., Campderrós, ME. 2017. Effect of sweetener combination and storage temperature on physicochemical properties of sucrose free white chocolate. *Food Chemistry*. 229. 610-620
- [15] Aguilera, J. M., Michel, M. & Mayor, G. 2004. Fat migration in chocolate: diffusion or capillary flow in a particulate solid? Hypothesis paper. *Journal of Food Science*. 69(7). 167–174.
- [16] Glicerina, V. Balestra, F Dalla-Rosa, M. Romani, S. 2013. Rheological, textural and calorimetric modifications of dark chocolate during process. *Journal of Food Engineering*. 119. 173–179.
- [17] Baixauli, R., Sanz, T., Salvadora, A., Fiszmana, S.M., 2007. Influence of the dosing process on the rheological and microstructural properties of a bakery product. *Food Hydrocolloids*. 21. 230–236.
- [18] Ahmed, J., Ramaswamy, H.S. 2006. Viscoelastic properties of sweet potato puree infant food. *Journal of Food Engineering*. 74. 376–382.
- [19] Servais, C., Ranch, H., Roberts, I. 2004. Determination of chocolate viscosity. *Journal of Texture Studies*. 34. 467–497.
- [20] Afoakwa, E., Paterson, A., Fowler, M. 2008a. Effects of particle size distribution and composition on rheological properties of dark chocolate. *European Food Research and Technology*. 226. 1259–1268.
- [21] Afoakwa, E., Paterson, A., Fowler, M., Veira, J. 2008b. Characterization of melting properties in dark chocolate from varying particle size distribution and composition using differential scanning calorimetry. *Food Research International*. 41. 751–757.
- [22] Afoakwa, E., Paterson, A., Fowler, M., Vieira, J. 2009. Microstructure and mechanical properties related to particle size distribution and composition in dark chocolate. *International Journal of Food Science and Technology*. 44. 111–119.
- [23] Lenfestey, M. W. Josef Neu, J. 2017. Probiotics in newborns and children. *Pediatric clinics of north America*. 64(6). 1271-1289.
- [24] Lalic'ic'-Petronijevic', J. Popov-Raljić', J. Obradovic', D. Radulovic', Z. Paunovic', D. Petrušić', M. Pezo, L. 2015. Viability of
- [2] Afoakwa, E. O., Budu, A. S. & Merson, B. A. 2007b. Response surface methodology for studying the effect of processing conditions on some nutritional and textural properties of bambara groundnuts (*Voandzei subterranea*) during canning. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 5. 270–281.
- [3] Gültekin-Ozğüven, M. Berktaş, I. Beraat, O. 2016. Influence of processing conditions on procyanidin profiles and antioxidant capacity of chocolates: Optimization of dark chocolate manufacturing by response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*. 66. 252-259.
- [4] da Silva, T. L. T. Grimaldi, R. Gonçalves, L. A. G. 2017. Temperature, time and fat composition effect on fat bloom formation in dark chocolate. *Food Structure*. 14. 68-75.
- [5] Afoakwa, E. O., Fowler, A. M., Vieir, J. 2008. Effects of tempering and fat crystallisation behaviour on microstructure, mechanical properties and appearance in dark chocolate systems. *Journal of Food Engineering*. 89. 2-9.
- [6] Tanabe, N. A., Hofberger, R. 2006. Chocolate. In Y. H. Hui (Ed.), *Handbook of food science, technology, and engineering*. Boca Raton: CRC Press.
- [7] Afoakwa, E. O. 2010. *Chocolate Science and Technology*, Blackwell, Oxford, United Kingdom.
- [8] Beckett, S. T. 2009. *Industrial chocolate manufacture and use* (4th ed.). Oxford, UK: Blackwell Publishing.
- [9] Briones. B., Aguilera, J. M., Brown, C. 2006. Effect of surface topography on color and gloss of chocolate samples. *Journal of Food Engineering*. 77(4). 776-783.
- [10] Glicerina, V. Balestra, F. Rosa, M. D. Romani, S. 2013. Rheological, textural and calorimetric modifications of dark chocolate during process. *Journal of Food Engineering*. 119. 173-179.
- [11] Beckett, S. T. 1999. *Industrial chocolate manufacture and use* (3rd ed.). Blackwell. Oxford, United Kingdom.
- [12] Lipp, M., Anklam E. 1998. Review of cocoa butter and alternative fats for use in chocolate—Part A. Compositional data." *Food Chemistry*. 62(1). 73-97.
- [13] Talbot, G. 1999. Chocolate temper. In *Industrial Chocolate Manufacture and Use* (3rd

- double encapsulation in alginate and maltodextrin. *Food and Bioprocess Technology*. 6(10). 2763-2769.
- [33] Homayouni, A. Azizi, A. Ehsani, M.R. 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 Chemistry*. 111. 50–55.
- [34] Saarela, M., Rantala, M., Hallamaa, K., Nohynek, L., Virkajarvi, I., & Matto, J. 2004. Stationary-phase acid and heat treatments for improvement of the viability of probiotic lactobacilli and bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 96. 1205–1214.
- [35] Kemsawasd, V. Chaikham, P. Rattanasena, P. 2016. Survival of immobilized probiotics in chocolate during storage and with an in vitro gastrointestinal model. *Food Bioscience*. 16. 37–43.
- [36] ISIRI number 608. 2006. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Chocolate. Specification and test methods (7th revision). Tehran, Iran.
- [37] Saputro, A. D. de Walle, D. V. Antan Caiquo, B. Hinneh, M. Kluczykoff, M. Dewettinck, K. 2019. Rheological behaviour and microstructural properties of dark chocolate produced by combination of a ball mill and a liquefier device as small-scale chocolate production system. *LWT - Food Science and Technology*. 100. 10–19.
- [38] International Confectionery Association (ICA). 2000. Viscosity of cocoa and chocolate products. *Analytical Method*. 46.
- [39] Farzanmehr, H., & Abbasi, S. 2009. Effects of inulin and bulking agents on some physicochemical, textural and sensory properties of milk chocolate. *Journal of Texture Studies*. 40. 536–553.
- [40] Namazi, L., Sahari, M. A., Zaringhalami, S. and Ghanati, K. 2011. Possibility of the Functional Oil Production from Flax (ω -3) and Safflower (ω -6) Seeds and Evaluation of Its Physico-chemical Properties During 4 Months Storage. *Journal of Medicinal Plants*. 4(40). 144–159.
- [41] Biquet, B. & Labuza, T. P. 1988. Evaluation of the moisture permeability characteristics of the chocolate films as an edible moisture barrier. 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. *Journal of Functional Foods*. 15. 541–550.
- [25] Karamese, M. Aydin, H. Sengul, E. Gelen, V. Sevim, C. Ustek, D. 2016. The immunostimulatory effect of lactic acid bacteria in a rat model, *Iran. J. Immunol*. 13 (3). 220–228.
- [26] Morais, G. C., Morais, A. R., André Bolini, H. M. 2015. Prebiotic and diet/light chocolate dairy dessert: Chemical composition, sensory profiling and relationship with consumer expectation. *LWT - Food Science and Technology*. 62 (1). 424-430.
- [27] Díaz-Muñiz, I., Banavara, D. S., Budinich, M. F., Rankin, S.A., Dudley, E. G., Steele, J. L. 2006. *Lactobacillus casei* metabolic potential to utilize citrate as an energy source in ripening cheese: a bioinformatics approach. *J. Appl. Microbiol*. 872–882.
- [28] Engelbrekston, A. L., Korzenik, J. R., Sanders, M. E., Clement, B. G., Leyer, G., Klaenhammer, T. R., & Kitts, C. L. (2006). Analysis of treatment effects on the microbial ecology of the human intestine. *FEMS Microbiology Ecology*. 57. 239–250.
- [29] Ouwehand, A. C., ten Bruggencate, S. J., Schonewille, A. J., Alhoniemi, E., Forssten, S. D., & Bovee-Oudenhoven, I. M. (2014). *Lactobacillus acidophilus* supplementation in human subjects and their resistance to enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *British Journal of Nutrition*. 111(3). 465-73.
- [30] Hymes, J. P., Johnson, B. R., Barrangou, R., & Klaenhammer, T. R. 2016. Functional analysis of an s-layer-associated fibronectin-binding protein in *Lactobacillus acidophilus* ncfm. *Applied & Environmental Microbiology*. 82(9). 2676-2685.
- [31] Arora, T., Anastasovska, J., Gibson, G., Tuohy, K., Sharma, R. K., & Bell, J., et al. 2012. Effect of *Lactobacillus acidophilus* ncdc supplementation on the progression of obesity in diet-induced obese mice. *British Journal of Nutrition*. 108(8). 1382-9.
- [32] Sohail, A., Turner, M. S., & Coombes, A. 2013. The viability of *Lactobacillus rhamnosus* gg and *Lactobacillus acidophilus* ncfm following

- refrigerated temperatures. *Journal of Food Science and Technology*. 62. Vol. 14.
- [46] Lalic'ic'-Petonijevic', J. 2015. Sensory, Antioxidant and Rheological Properties of Different Types of Chocolates with Probiotics, PhD thesis, Faculty of Agriculture, University of Belgrade, Serbia (in Serbian).
- [47] Saputro, A. D. Van de Walle, D. Caiquo, B. A. Hinneh, M. Kluczykoff, M. Dewettinck, K. 2019. Rheological behaviour and microstructural properties of dark chocolate produced by combination of a ball mill and a liquefier device as small-scale chocolate production system. *LWT - Food Science and Technology*. 100. 10–19.
- [48] Guinard, J. X., & Mazzuchelli, R. 1999. Effect of sugar and fat on the sensory properties of milk chocolate: Descriptive analysis and instrumental measurement. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79(11). 1331–1399.
- Journal of Food Science*. 53(4). 989–998.
- [42] Rossini, K., Norena, C. P. Z., & Brandelli, A. 2011. Changes in the colour of white chocolate during storage: potential roles of lipid oxidation and non-enzymatic browning reactions. *Journal of Food Science and Technology*. 48(3). 305–311.
- [43] Konar, N. Özhan, B. Artık, N. Dalabasmaz, S. Poyrazoglu, E. S. 2013. Rheological and physical properties of Inulin-containing milk chocolate prepared at different process conditions. *CyTA - Journal of Food*. 12:1. 55–64.
- [44] Budryn G, Nebesny E, Żyzelewicz D, Krysiak W, Motyl I, Libudzisz Z. 2007. Confectionery product of sugar-fat cores. Polish patent application: 3841542007in polish.
- [45] Mehrban-Roudbaneh, M. Homayouni Rad, A. Aref Hosseyni, S. R. 2017. Assessing the survival of *Lactobacillus casei* in probiotic chocolate during 6 months in ambient and



The effect of the presence of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* and *Streptococcus thermophilus* on physicochemical, colorimetric and rheological properties of probiotic dark chocolate

Mobahi, N.^{1*}

1. Department of Food Science and Technology, Faculty of Maritime Sciences and Technologies, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Article History:</p> <p>Received 2021/07/26 Accepted 2021/09/14</p> <hr/> <p>Keywords:</p> <p>Probiotics, Dark Chocolate, Physicochemical characterize, Colorimetry, Rheological properties.</p> <hr/> <p>DOI: 10.52547/fst.18.119.115</p> <hr/> <p>*Corresponding Author E-Mail: n.mobahi@iau-ntb.ac.ir</p>	<p>Dark chocolate as a best-selling product worldwide with the main health-oriented ingredients such as cocoa powder and butter, along with a high level of consumer awareness of maintaining and enhancing health, reinforces the idea of enriching all types of chocolate with probiotic strains. The aim of this study was to investigate the effects of the presence of microencapsulated bacteria <i>Lactobacillus acidophilus</i>, <i>Streptococcus thermophilus</i> and <i>Bifidobacterium</i> using sodium alginate and resistant corn starch on physicochemical properties including moisture, acidity, water activity, particle size distribution and texture, the plastic and apparent viscosity of probiotic dark chocolate were investigated during storage for 180 days at 4 °C and 25 °C to determine the storage temperature. In order to analyze the data obtained from the research, factorial experiment in the form of a completely randomized design was used and the comparison of means was performed by Duncan's multiple range test at the probability level ($\alpha = 1\%$). According to the results, in days 0, 7, 30, 90, 150 and 180 physicochemical, chocolate and rheological properties at two storage temperatures and also between different treatments of probiotic dark chocolate obtained from the strains, no significant difference ($P < 0.05$) was observed. Thus, all three products as probiotic dark chocolate have suitable characteristics in terms of the mentioned characteristics to be present in the consumer market.</p>