



## بهینه سازی فرمولاسیون شکلات صبحانه پروبیوتیک

حسین مصطفی لو<sup>۱</sup>، رضا کاراژیان<sup>۲\*</sup>، احمد احتیاطی<sup>۳</sup>

- ۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی موسسه آموزش عالی جهاددانشگاهی کاشمر، کاشمر، ایران.  
 ۲- استادیار پژوهشی، گروه بیوتکنولوژی صنعتی میکروارگانیسم‌ها، پژوهشکده بیوتکنولوژی صنعتی، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران.  
 ۳- عضو گروه پژوهشی کیفیت و ایمنی مواد غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران.

### اطلاعات مقاله

### چکیده

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۰۳

کلمات کلیدی:

لاکتوباسیلوس پلانتاروم،

سفتی بافت،

شکلات، صمغ های عربی و گوار،

بافت سنجی.

DOI: 10.52547/fsct.18.120.6

DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.120.6.8

مسئول مکاتبات:

reza\_karazhyan2002@yahoo.com

شکلات به عنوان یکی از خوراکی های خوشمزه، از پرطرفدارترین غذاهاست که با ایجاد تنوع در وعده غذایی صبحانه، می تواند تمایل افراد را به صرف صبحانه افزایش داده و به این ترتیب سبب کاهش بروز خستگی و بی حالی آنها در طول روز شود. پروبیوتیک ها میکروارگانیسم هایی هستند که اگر به تعداد کافی و به صورت زنده مورد استفاده قرار بگیرند، اثرات سلامتی بخش در میزبان از خود بروز می دهند. با توجه به نیاز مصرف کنندگان به تولید فرآورده های غذایی سلامتی بخش هدف از این پژوهش بررسی صمغ های عربی، گوار و لسیتین بر ویژگی های کیفی و زنده مانگی باکتری پروبیوتیک در شکلات صبحانه پروبیوتیک است. برای این منظور بر اساس طرح آماری به صورت **Box-Behnken**، ۱۸ نمونه تهیه گردید که بعد از اختلاط کامل ترکیبات (شامل عسل، ارده، شیره انگور، هل، صمغ های عربی، گوار و لسیتین) و دستیابی به بافت یکنواخت، باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم مورد نظر در مرحله آخر به میزان  $10^8$  در هر گرم اضافه شد و در نهایت شکلات صبحانه تهیه و در محل خشک و خنک نگهداری شدند. آزمون های مورد بررسی شامل ویسکوزیته، سفتی بافت و شمارش باکتری پروبیوتیک بود که بعد از طرح ریزی آزمایش ها، مدل سازی رگرسیونی با الگوریتم حذف پس خور، بهینه سازی عددی و رسم نمودارهای سطح پاسخ با نرم افزار **Design-Expert** انجام گردید. نتایج پژوهش حاکی از آن بود که افزودن صمغ گوار و لسیتین بر ویژگی های بافتی (سفتی بافت و ویسکوزیته) و زنده مانگی باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم معنادار است، درحالی که افزودن صمغ عربی و لسیتین تاثیر معناداری بر سفتی بافت، ویسکوزیته و افزایش معناداری در زنده مانگی باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم نداشت. شرایط بهینه در این پژوهش با مطلوبیت کل، بر اساس طرح آماری مربوطه در غلظت  $0.0564$  لسیتین،  $0.08$  گوار و  $0.064$  صمغ عربی بیشترین زنده مانگی باکتری پروبیوتیک  $10^{8.589}$  cfu/gr و سفتی بافت  $8.22$  نیوتن فراهم شد.

## ۱- مقدمه

شکلات به عنوان یک خوراکی منحصر به فرد و خوشمزه، یکی از منابع مهم مواد فعال بیولوژیکی است که اثر آنتی‌اکسیدانی ویژه‌ای را در بدن انسان نشان داده و بر سلامت اعضای مختلف بدن به ویژه قلب و عروق تأثیر بسزایی دارد [۱] و آنتی‌اکسیدان‌های موجود در غذا، بدن را در برابر رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کنند. کاکائو یکی از منابع شناخته شده آنتی‌اکسیدان است و کاتچین<sup>۱</sup> موجود در شکلات که از خانواده فلاونوئیدها می‌باشد، جزء قویترین آنتی‌اکسیدان‌هاست. محققان دریافته‌اند که در ۱۰۰ گرم از شکلات تلخ، ۳/۵ میلی گرم کاتچین وجود دارد که این مقدار چهار برابر مقدار آن در چای است. دانه کاکائو حاوی تیرآمین و فنیل اتیل آمین می‌باشد که هر دو این مواد باعث افزایش درجه هوشیاری می‌گردند. کره کاکائو چربی عمده موجود در شکلات است [۲]. برخی چربی‌های غذایی، کلسترول خون را افزایش می‌دهند ولی کره کاکائو به دلیل ساختمان تری گلیسیریدی فاقد چنین خصوصیتی است [۳].

شکلات بر مبنای استاندارد ایران حاصل فرایند کامل و صحیحی از مخلوط یک یا چند فراورده از مغز دانه کاکائو شامل خمیر کاکائو، پودر کاکائو و کره کاکائو می‌باشد که ممکن است همراه شکر و یا شیرین کننده‌های مجاز خوراکی، فراورده‌های شیری و افزودنی‌های مجاز باشد [۴] و در واقع نوعی سیستم کلوئیدی است که در آن فاز مایع را کره کاکائو و فاز پراکنده را ذرات پودر کاکائو و شکر تشکیل می‌دهند. شکلات به دلیل داشتن سه ماده کافئین، تئوبرومین و فنیل اتیل آمین محرک ملایم بوده و موجب احساس شغف و آرامش بخشی می‌گردد [۵].

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که مصرف آنها در مقادیر کافی، سبب ایجاد خواص سلامت بخش برای میزبان می‌شود [۶]. ایجاد خواص سلامت بخش پروبیوتیک‌ها

اساساً مدیون اثرهای سرکوب کننده آنها بر فلور زیان‌آور روده و حفظ و بهبود توازن این فلور، تقویت سیستم ایمنی، کاهش سطح کلسترول سرم، کاهش فشار خون، و ... است [۷]. غذاهای حاوی پروبیوتیک باید ایمن و در زمان مصرف حاوی مقادیر کافی از این میکروارگانیسم‌ها باشند. حداقل مقدار پروبیوتیک در غذاهای حاوی پروبیوتیک باید  $\text{cfu/gr}$   $10^7$  باشد. اکثر پروبیوتیک‌ها متعلق به گروه بزرگی از باکتری‌های اصلی فلور میکروبی روده انسان بوده و در آنجا زندگی مسالمت آمیز و بی ضرری دارند که مهم ترین و مرسوم ترین پروبیوتیک‌ها به جنس لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم تعلق دارند. سویه های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس کازیبی، لاکتوباسیلوس رامنوسوس و بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم بیشترین کاربرد تجاری را دارند [۸]. این باکتری‌ها مانع از التهاب پوشش روده می‌شوند، همچنین پوشش روده را از حمله و تهاجم پاتوژن‌ها حفاظت می‌کنند و باعث تنظیم پاسخ سیستم ایمنی روده می‌شوند [۸].

صمغ عربی ماده تراوش شده از درختی از انواع آکاسیا می‌باشد که در اثر صدمه وارد شدن به پوست آن به دست می‌آید و به صورت قطراتی به قطر چند سانتی متر که در جریان هوا خشک شده اند جمع آوری می‌شود. این ماده سفیدرنگ، در آب بسیار محلول است و از واحدهای ساختمانی L-آرابینوز، L-رامنوز، D- گالاکتوز و D- گلوکوزونیک اسید تشکیل شده است. این صمغ در سیستم‌های غذایی به منزله امولسیون کننده و پایدار کننده استفاده می‌شود [۹].

صمغ گوار از دانه گیاه *Cyamopsis tetragonolobus* بدست می‌آید. این صمغ از پلی ساکاریدی به وزن مولکولی ۵۰۰۰۰ تا ۸۰۰۰۰۰۰۰ دالتون تشکیل شده است. ساختمان آن از گالاکتومانان است که پلی ساکاریدی متشکل از واحدهای دی‌گالاکتوز و دی‌مانو با پیوند بتا ۶-۱ تشکیل شده است [۱۰]. تاکنون مطالعات محدودی در خصوص جایگزینی ساکاروز با ترکیبات پری‌بیوتیک و حجم دهنده به منظور کاهش کالری شکلات صورت گرفته است خیرخواهان و

میکروارگانسیم های صنعتی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران لستین از شرکت کارجیل<sup>۱</sup> هلند، صمغ عربی و صمغ گوار از شرکت کوندی آلمان<sup>۲</sup> تهیه گردید.

## ۲-۲- روش تهیه شکلات صبحانه

متناسب با فرمول ارائه شده عسل، ارده و شیره انگور با پودر کاکائو مخلوط شد و پس از اختلاط کامل، هل و پودر نارگیل اضافه شده و سپس لستین و صمغ مورد نظر (صمغ عربی یا صمغ گوار) اضافه شد. همزدن برای چند دقیقه تا اختلاط کامل ترکیبات ادامه یافته و پس از دستیابی به بافت یکنواخت باکتری پروبیوتیک مورد نظر در مرحله آخر اضافه شد و پس از هم زدن نهایی و اطمینان از مخلوط شده کلیه ترکیبات شکلات صبحانه تهیه شد. جهت انجام آزمون های مورد نظر در ظروف درب دار تقسیم شده و تا زمان انجام آزمون ها در محل خشک و خنک نگهداری شدند (جدول ۱).

## ۲-۳- فعال سازی و ریزپوشانی (کپسولاسیون)

### باکتری پروبیوتیک

پروبیوتیک با استفاده از روش امولسیون ریزپوشانی شد. بدین صورت که ابتدا ۲ گرم آلژینات سدیم (شرکت Sigma-Aldrich، آمریکا) و ۱ گرم نشاسته مقاوم ذرت شرکت (starch national، انگلستان) به آرامی در ۱۰۰ ml آب مقطر کاملاً حل شد و سپس در اتوکلاو استریل شد، پس از آنکه محلول با محیط هم دما شد، محلول آلژینات با ۱ ml سوسپانسیون میکروبی به مدت ۵ دقیقه مخلوط شد. برای تشکیل امولسیون مخلوط حاصله به ۵۰۰ ml روغن ذرت حاوی ۰/۲ درصد امولسیفایر توئین ۸۰ (شرکت Merck، آلمان) اضافه و با استفاده از همزن مغناطیسی با سرعت ۳۵۰ rpm به مدت ۴۰ دقیقه به طور کامل پراکنده شد و امولسیون یکنواختی تشکیل شد. به منظور تشکیل کپسول ها، به محلول مورد نظر، ۵۰۰ ml کلرید کلسیم ۰/۱ M اضافه شد و به مدت

همکاران (۱۳۹۶) امکان سنجی تولید شکلات پروبیوتیک حاوی باکتری *Bifidobacterium breve* ریزپوشانی شده با آلژینات کلسیم و نشاسته مقاوم ذرت به روش امولسیون و بررسی میزان زنده مانی آن را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه، از آلژینات کلسیم و نشاسته مقاوم ذرت برای ایجاد کپسول ها به روش امولسیون استفاده شد و این باکتری به حالت آزاد و ریز پوشانی شده به شکلات افزوده شد و زنده مانی، اسیدیته، فعالیت آبی ( $a_w$ )، محتوی مواد جامد و ویژگی های حسی شکلات طی ۳۰ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتیگراد مورد ارزیابی قرار گرفت. پروبیوتیک ریز پوشانی شده نسبت به حالت آزاد، زنده مانی بیشتری در شکلات داشت. شکلات حاوی باکتری به حالت آزاد اسیدیته و فعالیت آبی بالاتر، محتوی مواد جامد کمتر نسبت به نمونه پروبیوتیک ریز پوشانی شده داشت، علاوه بر آن ریز پوشانی اثر نامطلوبی بر ویژگی های حسی شکلات نداشت [۱].

مندال و همکاران (۲۰۱۲)، شکلات شیری سین بیوتیک را توسط باکتری لاکتوباسیلوس کازئی NCDC 298 کپسوله شده و کپسوله نشده تولید کرده و از اینولین به عنوان ماده پری بیوتیک بهره بردند. نتایج این تحقیق نشان داد که تعداد باکتری های لاکتوباسیلوس کازئی تا ۶۰ روز نگهداری تحت شرایط نگهداری در یخچال بیشتر از  $10^8 \log \text{cfu/g}$  بود. همچنین تفاوت چشمگیری در زنده مانی لاکتوباسیلوس های آزاد و کپسوله شده در شکلات شیری طی نگهداری در یخچال مشاهده نگردید و لاکتوباسیلوس کپسوله شده باعث افزایش لاکتوباسیلوس ها و کاهش کلیفرم های مدفوعی و فعالیت بتا-گلوکورونیداز شد [۱۲].

## ۲- مواد و روش ها

### ۲-۱- مواد لازم

گونه های لاکتوباسیلوس پلانتاروم (PTCC ۱۸۹۶) به صورت تک سویه، خالص و خشک شده انجمادی از مرکز کلکسیون

1. Cargill  
2. Condio

انجام آزمون به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد. جهت تعیین ویژگی های بافتی از پروب استوانه ای به قطر ۴۵ میلی متر برای نفوذ به عمق ۲۰ میلی متر نمونه ها با سرعت ۱ میلی متر بر ثانیه استفاده شد. پارامتر سفتی بافت در خصوص نمونه ها مورد ارزیابی قرار گرفت [۱۵].

#### ۲-۴-۵- زنده مانی باکتری پروبیوتیک

برای شمارش تعداد باکتری پروبیوتیک در شکلات، ۱۰ گرم از شکلات با ۹۰ ml محلول استریل بافر فسفات (M ۰/۱ و pH=۷) به مدت ۱۵ دقیقه هم زده شد و پراکنده گشت تا کپسول ها شکسته و باکتری به طور کامل در محلول بافر آزاد شوند، سپس رقت های  $10^{-1}$  تا  $10^{-11}$  آماده شده و در محیط کشت MRS-agar در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  انکوبه گردید. تعداد باکتری زنده پس از گذشت ۴۸ ساعت زیر دستگاه کلنی کانتر شمارش گردید.

#### ۲-۵- تجزیه و تحلیل آماری

به منظور حصول مدل های تجربی برای پیش بینی هر کدام از پاسخ های فیزیکی شیمیایی، رئولوژی و میکروبی رابطه های خطی و چند جمله ای درجه دوم بر داده های به دست آمده از آزمایش ها برآزش شدند. سپس این مدل ها مورد آنالیز آماری قرار گرفتند تا مدل مناسب گزینش گردد. متغیرهای مورد بررسی شامل غلظت صمغ عربی، گوار و لسیترین در محدوده مناسب بر اساس پیش تیمارهای انجام شده، در قالب طرح آزمایشی سطح-پاسخ به صورت Box-Behnken تعیین گردید. طرح ریزی آزمایش ها، مدل سازی رگرسیونی با الگوریتم حذف پس خور، بهینه سازی عددی و رسم نمودارهای سطح پاسخ با نرم افزار Design-Expert انجام گردید (جدول ۱). رسم نمودارها و محاسبات با نرم افزار Excel صورت گرفت. کلیه آزمون ها در ۳ تکرار به مدت ۳ ماه و بازه زمانی ۲ هفته ای انجام گردید.

۱ دقیقه دیگر همزده شد. سپس همزدن متوقف شد تا مخلوط حاصل دو فاز شود پس از ۳۰ دقیقه کپسول ها ته نشین شدند. به منظور جدا سازی کپسول ها، از قیف بوخنر تحت خلأ استفاده شد، سپس کپسول های جدا شده با محلول آب مقطر استریل به منظور جداسازی روغن تا حد امکان شسته شدند و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند [۱۹].

#### ۲-۴-۲- آزمون های مورد بررسی

##### ۲-۴-۱- اندازه گیری فعالیت آبی

فعالیت آبی نمونه های شکلات توسط دستگاه Novasina Sprint (مدل ۵۰۰ ساخت سوئیس) تعیین گردید. مقداری از نمونه های تهیه شده داخل محل مخصوص نمونه در گوشه سمت راست دستگاه قرار دادیم. بعد از اینکه مانیتور دستگاه تا ۴ خط پر کرد و عدد ثابت شد عدد بدست آمده قرائت گردید (مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ۶۰۸) [۵].

##### ۲-۴-۲- تعیین میزان دوفاز شدن

به منظور تعیین دوفازی شدن مقدار ۱۰ گرم از نمونه شکلات در لوله آزمایشگاهی مدرج قرار داده شد و در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط تحت سانتریفیوژ قرار گرفت. سپس حجم فاز آبی جدا شده از شکلات، بر حسب میلی لیتر ثبت گردید [۱۳].

##### ۲-۴-۳- اندازه گیری ویسکوزیته

جهت تعیین ویسکوزیته نمونه های شکلات صبحانه از دستگاه ویسکومتر Fungilab ساخت کشور اسپانیا استفاده شد. ابتدا ۲۰۰ میلی لیتر از شکلات را در بشر ریخته و بعد از توزین در بن ماری سیال می کنیم. سپس با اسپندل شماره ۳ دستگاه مقدار ویسکوزیته نمونه ها تعیین شد [۱۴].

##### ۲-۴-۴- خواص بافتی

برای تعیین ویژگی های بافتی نمونه ها از دستگاه بافت سنج<sup>۳</sup> مدل TAPLuse استفاده گردید. نمونه شکلات صبحانه قبل از

**Table 1** Levels (percent) and amount (in grams per 100 grams of chocolate)

Run	Lecithin	guar	arabic gum	Hanny	Tahini	Grape juice	Grape juice	Rose water	Cardamon	vanilla	Coconut powder
1	4.5	3	1.5	147.8	236.4	147.8	11.8	31.9	0.3	0.6	11.8
2	3	4.8	1.5	147.7	236.3	147.7	11.8	31.9	0.3	0.6	11.8
3	3	1.2	1.5	148.6	237.7	148.6	11.9	32.1	0.3	0.6	11.9
4	4.5	3	1.5	147.8	236.4	147.8	11.8	31.9	0.3	0.6	11.8
5	4.5	3	1.5	147.8	236.4	147.8	11.8	31.9	0.3	0.6	11.8
6	6	4.8	1.5	147.9	235.1	147.9	11.8	31.7	0.3	0.6	11.8
7	4.5	4.8	1.5	147.8	236.4	147.8	11.8	31.9	0.3	0.6	11.8
8	4.5	3	0	147.7	236.3	147.8	11.8	31.9	0.3	0.6	11.8
9	3	3	0	147.5	237.6	147.8	11.9	32.1	0.3	0.6	11.8
10	6	3	3	147.0	235.2	147.0	11.8	31.8	2.9	0.6	11.8
11	4.5	3	1.5	147.8	236.4	147.8	11.8	31.9	0.3	0.6	11.8
12	4.5	3	3	146.9	236.1	146.9	11.8	31.7	0.3	0.6	11.8
13	6	3	0	147.8	236.4	147.8	11.8	31.9	0.3	0.6	11.8
14	4.5	1.2	3	147.8	236.5	147.8	11.8	31.9	0.3	0.6	11.8
15	6	1.2	1.5	147.8	236.5	147.8	11.8	31.9	0.3	0.6	11.8
16	0	0	0	147.8	236.4	147.8	11.8	31.9	0.3	0.6	11.8
17	3	3	3	147.8	236.4	147.8	11.8	31.9	0.3	0.6	11.8
18	4.5	1.2	0	147.6	236.7	148.6	11.9	32.1	0.3	0.6	11.9

### ۳- نتایج بحث

#### ۳-۱- تاثیر برهم کنش متغیر های مورد بررسی بر روی فعالیت آبی و آب اندازی نمونه های کرم شکلات

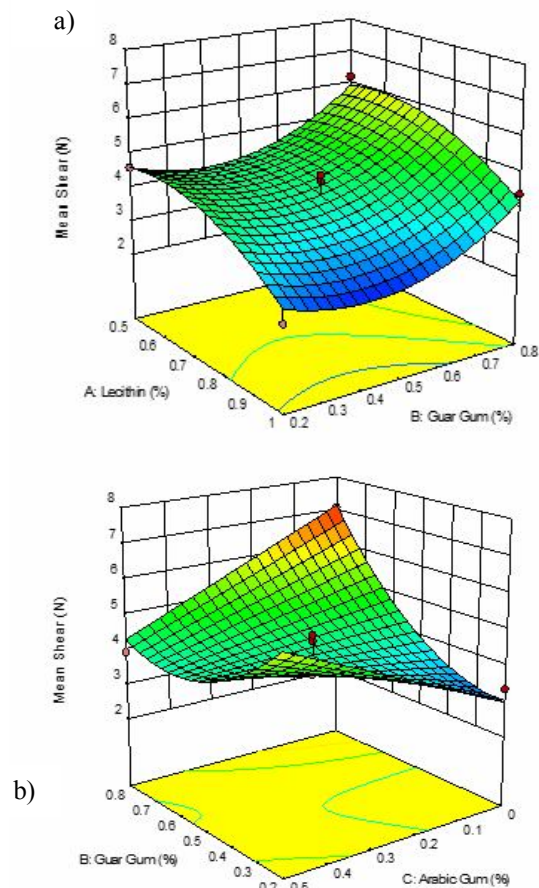
نتایج تجزیه آماری داده‌های اثر درصد لستین، صمغ های گوار و عربی بر فعالیت آبی شکلات صبحانه حاکی از آن است که در خصوص فعالیت آبی هیچ یک از مدل ها معنی دار نیست و به عبارت دیگر، متغیرها تاثیر معنی داری بر فعالیت آبی ندارد ( $P > 0.05$ ). متوسط فعالیت آبی برای نمونه های شکلات ۰/۶۲ گزارش شده است. در این مطالعه متوسط آب اندازی برای نمونه های شکلات صفر محاسبه شد که به نظر می‌رسد با توجه به ویژگی جذب آب صمغ ها، افزودن این ترکیبات سبب تاثیر بر آب اندازی گردیده است و در نتیجه در هیچ یک از نمونه ها آب اندازی مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ).

#### ۳-۲- تاثیر برهم کنش متغیر های مورد بررسی بر سفتی بافت

نتایج تجزیه آماری داده‌های اثر درصد لستین، صمغ های گوار و عربی بر تغییرات سفتی بافت شکلات صبحانه در شکل 1 (a و b)، آورده شده است. به طور کلی در تمام سطوح جایگزینی سختی با افزایش درصد صمغ گوار و لستین افزایش یافت ( $p < 0.05$ ) که علت این پدیده می تواند احتمالا جذب روغن توسط صمغ مورد استفاده و تشکیل شبکه ژلی توسط هیدروکلوئید ها و افزایش استحکام نمونه ها بر اثر تشکیل این شبکه باشد، درحالی که افزودن صمغ عربی بر پارامتر سفتی معنی دار نبوده است. به طوری که بیشترین میزان سفتی در نمونه حاوی ۰/۸ درصد گوار و کمتر از ۰/۱ درصد صمغ عربی به دست آمده است.

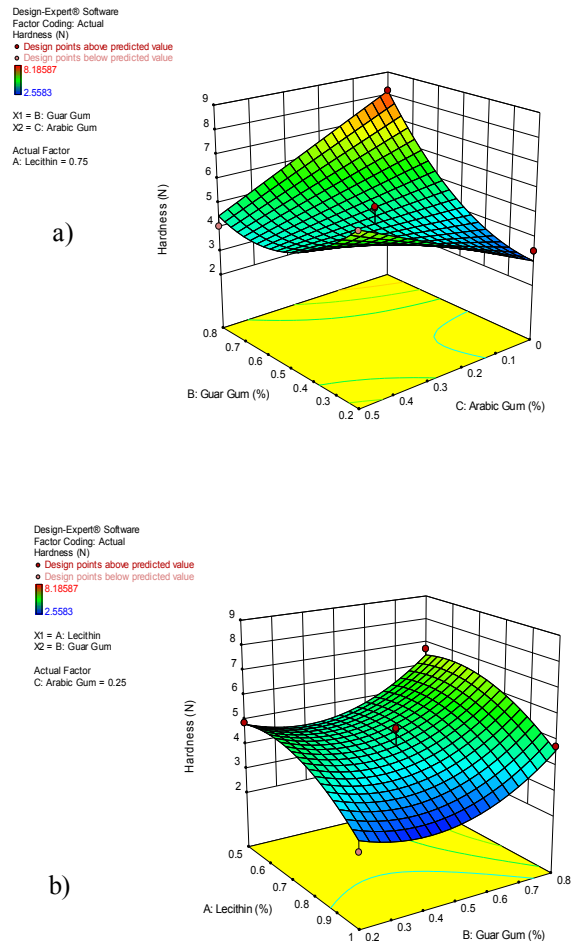
بکت (۲۰۰۹) گزارش داد که عوامل متعددی نظیر فرمولاسیون، نحوه تولید، نحوه تمپرینگ، پلی مورفیسم و دمای سرد کردن، تعیین کننده سختی نهایی نمونه های شکلات است [۳].

مقادیر صمغ گوار تا محدوده ۰/۸ و کاهش امولسیفایر تا ۰/۵ روند معنی داری مشاهده گردید. در این میان، تأثیر صمغ گوار به تنهایی عملکرد بهتری را در افزایش ویسکوزیته محصول نهایی ایفا نمود. مکانیزم عمل هیدروکلوئیدها در جلوگیری از جدا شدن سرم به ساختار مولکولی هیدروکلوئید مورد استفاده بستگی دارد در صورتی که صمغ مورد استفاده باردار باشد از طریق ممانعت فضایی و دفع پایداری در کمپلکس های غذایی توسط صمغ گوار می شود افزایش ویسکوزیته و به دام انداختن ذرات پروتئینی در یک شبکه مولکولی که توسط صمغ ایجاد شده می باشد [۱۶]. نتایج حاصل از پژوهش احمد (۲۰۰۶) بر روی خصوصیات صمغ گوار در محصولات تخمیری نشان داد که بکارگیری صمغ گوار به تنهایی سبب تغییر رفتار رئولوژیک و کاهش گرانیوی و افزایش جداسازی فازی در محصولات غذایی بالانحص پایه لبنی می گردد [۱۷].



**Fig 2** effect of adetive Arabic, guar gum and lecithin of viscosity breakfast chocol

بنابراین می توان نتیجه گرفت که با توجه به عدم نیاز به تمپرینگ، ثابت بودن دمای سرد کردن نمونه ها و دمای آزمون سختی برای کلیه نمونه های این پژوهش افزایش درصد سختی با افزودن صمغ گوار بر ویژگی های صمغ و تأثیر آن بر میکروساختار شکلات تهیه شده مرتبط باشد [۳].



**Fig 1** Interaction of a) arabic and guar gum b) lecithin and guar gum on the of hardness of breakfast chocolate

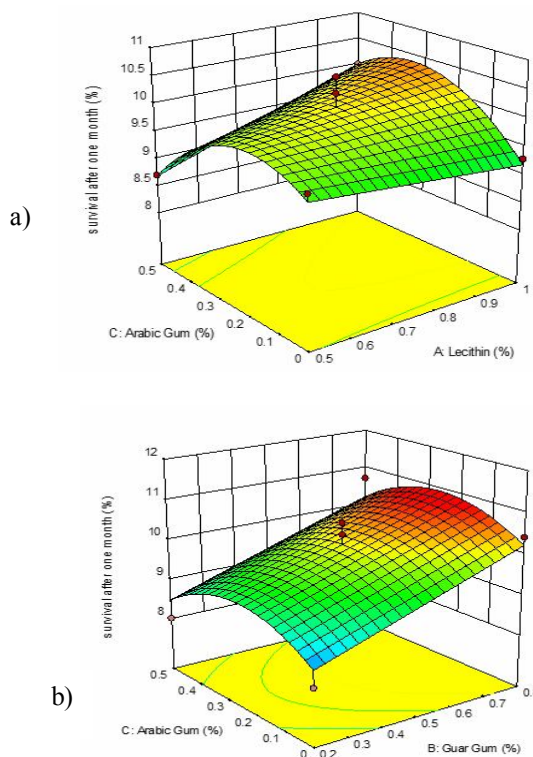
### ۳-۳- تأثیر برهم کنش متغیر های مورد بررسی

#### بر ویسکوزیته شکلات صبحانه

همان طور که در شکل (3 a و b) و جدول ۲، نشان داده شده است، افزودن کمپلکس صمغ عربی و گوار تأثیر معنی داری بر ویسکوزیته کرم شکلاتی نداشت ( $p \geq 0.05$ )، درحالی که افزودن کمپلکس صمغ گوار و امولسیفایر لسیتین بر ویسکوزیته معنی دار بوده است ( $p \leq 0.05$ ). بطوریکه با افزایش

**Table 2** Analysis of variability of viscosity of breakfast chocolate samples

	P Value	F Value	sum of squares	average of squares	Df	Source
Significant	<0.00001	23.37	23.34	5.45	6	Width of origin
	0.00001	36.84	6.13	6.91	1	A-Lecithin
	0.0009	21.62	۳.۶	5.17	1	C-Arabic Gum
	0.9558	3.227 E-003	5.372 E-004	0.045	1	AC
	<0.00001	47.97	7.99	12.50	1	Residual
not significant	0.0075	11.16	1.86	2.78	1	Lack of Fit
			4.05	5.71	1	Pure Error
					10	Cor Total
					6	R <sup>2</sup>
					4	corrected (R <sup>2</sup> )
					16	Coefficient of variation



**Fig 3** effect of adetive Arabic, guar gum and Lisetin on the survival of the probiotic bacteria (*L. Pelantarum*) breakfast chocol during one month of shelf life

حداقل تعداد باکتری یک میلیون در هر میلی لیتر برای محصولات پروبیوتیک در حد استاندارد تعریف شده است (۸). نتایج نشان می دهد که افزودن صمغ گوار می تواند با حفاظت از باکتری ها زنده مانی آن ها را تقویت کند. احتمالاً نقش صمغ افزوده شده به عنوان یک ترکیب پروبیوتیک قادر به حفظ باکتری های پروبیوتیک از آسیب های محیطی من جمله اکسیژن، فشار اسمزی و ... می باشد و اثرات مفید خود را در

### ۳-۴- بررسی اثر صمغ های عربی، گوار و

#### لستین بر زنده مانی باکتری پروبیوتیک

نمونه های کرم شکلات حاوی مقادیر یکسان باکتری پروبیوتیک، طی سه ماه نگهداری شد و طی هر ماه میزان زنده مانی، یعنی درصد باکتری های زنده و فعال نسبت به تعداد آن ها در روز اول، مورد بررسی قرار گرفت. برای نتایج حاصل، تنها داده های ماه اول قابلیت آنالیز آماری و برازش مدل را داشت و داده های ماه های دوم و سوم، به دلیل کاهش قابل توجه تعداد باکتری های زنده در هر دو سویه و در همه نمونه ها، مورد بررسی قرار نگرفت. بر این اساس، آنالیزهای انجام شده برای زنده مانی طی یک ماه نگهداری ارائه گردید.

نتایج تجزیه آماری داده های اثر درصد لستین، صمغ های گوار و عربی بر زنده مانی باکتری پروبیوتیک کرم شکلات صبحانه طی یک ماه ماندگاری در شکل (۴)، آورده شده است. همان طور که در شکل (۴)، ملاحظه می شود، با افزایش سطح لیستین و صمغ گوار میزان زنده مانی باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم افزایش یافت درحالی که افزودن میزان صمغ عربی به بیش از ۰/۳ درصد سبب کاهش زنده مانی باکتری پروبیوتیک گردید ( $p > 0.05$ ). با توجه به ساختار منشعب و پیچیده صمغ عربی احتمالاً افزایش درصد این ترکیب سبب افزایش جذب آب نمونه گردیده و کاهش میزان  $a_w$  سبب کاهش رشد و بقا باکتری پروبیوتیک گردیده است.

گوار و لسیتین بر ویژگی های بافتی (سفتی بافت و ویسکوزیته) معنی دار بود ( $p < 0/05$ ). درحالی که افزودن صمغ عربی تاثیر معناداری بر سفتی بافت و ویسکوزیته نداشت ( $p > 0/05$ ).

افزودن صمغ گوار تاثیر معناداری بر زنده مانی باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتروم داشت ( $p < 0/05$ ) و افزودن صمغ عربی تا ۰/۳ درصد سبب افزایش زنده مانی زنده مانی باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتروم گردیده است در عین حال این افزایش معنی دار نبود ( $p > 0/05$ ). همچنین اثر افزودن همزمان صمغ عربی و لسیتین در فرمولاسیون کرم شکلات صبحانه نیز افزایش معنی داری در زنده مانی باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتروم نداشت ( $p > 0/05$ ).

## ۵- منابع

- [1] Nebesny E, Zyzelewicz, D. Effect of lecithin concentration on properties of sucrose-free chocolate masses sweetened with isomalt: *Eur Food Res Technol* 2005; 220: 131-135.
- [2] Haylock SJ, Dodds TM. Ingredients from milk. In S. T. Beckett (Ed.), *Industrial chocolate manufacture and use* (3rd ed.): Oxford: Blackwell Science 1999; pp. 137-152.
- [3] Beckett, ST. The science of chocolate. Edition 2, Royal Society of Chemistry Paperbacks 200۹; 978-1-78262-595-7. P 223-233.
- [4] Maghsoudi, SH. *Candy and Chocolate Making Technology: Agricultural Science Publishing* 2002; pp. 50-36.
- [5] Iranian National Standard, No. 608, *Chocolate - Characteristics and Test Methods* (2004).
- [6] Soukoulis C, Behboudi-Jobbehdar S, Yonekura L, Parmenter C. and Fisk I. Stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG in prebiotic edible films: *Food Chemistry* 2014a; 159,302-308.
- [7] Soukoulis C, Yonekura L, Gan HH, Behboudi-Jobbehdar S, Parmenter C, and Fisk I. Probiotic edible films as a new strategy for developing functional bakery products: The case of pan bread, *Food Hydrocolloids* 2014b; 39,231-242.
- [8] Ebrahimi B, Mohammadi R, Mortazavian SAM, and Shojaei Aliabadi S. Addition of

حفظ و تقویت رشد باکتری ها نشان می دهد. گزارش شده است که ریز ساختار شبکه ای فراورده های نیمه جامد در مقایسه با ریز ساختار ذره ای این فراورده ها با مواد غذایی مایع اثر حفاظتی بهتری در مقابل عوامل نامناسب از جمله اسیدیته و سایر ترکیبات ضد میکروبی دارد. علت این موضوع ممانعت فیزیکی شبکه نیمه جامد ماده غذایی از ورود ترکیبات ضد میکروبی به درون شبکه و مجاور شدن با باکتری های مفید موجود در آن است [۶ و ۱۱].

نبستی و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند عوامل کلیدی تاثیر گذار بر زنده مانی باکتری های پروبیوتیک در فراورده های قنادی، فعالیت آبی، فشار اسمزی و دما است [۱۸]. نبستی و همکاران (۲۰۰۵) زنده مانی باکتری های لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پاراکازئی را در نمونه های شکلات حاوی ساکارز و برخی قند های کم کالری در دماهای ۴، ۱۸ و ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۲ ماه مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که باکتری های پروبیوتیک زنده مانی خود را در کلیه نمونه ها تا درصد های بالایی حفظ کردند هر چند زنده مانی باکتری ها در دمای ۴ درجه سانتیگراد بیشتر بود [۱].

## ۳-۵- بهینه سازی

با توجه به تحلیل نمودارها و این نکته که شرایط بهینه یک پاسخ، ممکن است برای پاسخ دیگر نامناسب باشد، بنابراین بایستی الگوی را معرفی کرد که تا حد امکان تمامی پاسخ ها را به نحو رضایت بخشی بهینه نماید. برای این منظور کانتور پلات های مختلف بر روی هم قرار گرفته و منطقه ای که مشخصات تمامی پاسخ ها را برآورده کرد، به عنوان منطقه بهینه معرفی می گردد. بنابراین شرایط بهینه برای تولید شکلات صبحانه در غلظت ۰/۵۶۴ لیستین، ۰/۸ گوار و ۰/۰۶۴ صمغ عربی بیشترین زنده مانی باکتری پروبیوتیک ۱۰/۵۸۹ cfu/gr و سفتی بافت ۸/۲۲ نیوتن فراهم شد.

## ۴- نتیجه گیری

با توجه به نیاز مصرف کنندگان به تولید فراورده های غذایی سلامتی بخش در این پژوهش تاثیر افزودن صمغ های عربی، گوار و لسیتین بر ویژگی های کیفی و زنده مانی باکتری های پروبیوتیک در کرم شکلات صبحانه پروبیوتیک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج پژوهش حاکی از آن بود که افزودن صمغ



- [14] Khorasani S, Azizi MH, Ishaqi, M R. Investigation and determination of rheological properties of breakfast chocolate prepared from pistachios and dates: 23 National Congress of Food Science and Industry of Iran 2014. NCFOODI 23-431.
- [15] Farzanmehr H, Abbasi S, Sahari MA. Effect of sugar replacer on some physicochemical, rheological and sensory properties of milk chocolate: Iranian J Nutr Sci Food Technol 2008; 3(3):65-82[in Persian].
- [16] Koksoy A, & Kilic M. Use of hydrocolloids in textural stabilization of a yoghurt drink, ayran: Food hydrocolloids 2004; 18(4): 593-600.
- [17] Ahmed FE. Genetically Modified Probiotics. In: Probiotics in Food Safety and Human Health. Goktepe: 2006.
- [18] Nebesny E, Zyzelewicz D, Motyl I, Libudzis Z. Chocolate and preparation thereof, Polish patent: P-366273 (Patent Application, 2004) (in polish) - in press: 2012.
- [19] KHosrvi Zanjani M.A, ghiyasi tarzi B, SHarifan A, Mohamadi N, Bakhoda H. Survival of *Bifidobacterium bifidum* Encapsulation in water-based cake brain cream: Food Technology & Nutrition 2013; 10 (3) p29-39 [in Persian].
- Probiotic Bacteria to Oral Film Based on Carboxymethyl Cellulose and Measurement of Survival Rate at Refrigeration and Ambient Temperatures: Journal of Food Industry Engineering Research 2017; Volume 17, Number 65, pp. 90-79.
- [9] Creel, RE. Effect of acacia gum on postharvest quality of cut flowers: Master of Science Thesis, Auburn, Alabama University 2006; 70. P.
- [10] Fatemi H. Food Chemistry, Joint Stock Company, Tehran Publications. Pages 260-259. 2004.
- [11] Khairkahan N, Ahri H, Asadi, Gh. Feasibility study of producing probiotic chocolates containing *Bifidobacterium breve* bacterium microcoated with calcium alginate and resistant corn starch by emulsion method and evaluation of its viability: Veterinary microbiology 2017;57-73.
- [12] Mandal SS, Hati AK, Puniya R, Singh and Singh. Development of Synbiotic Milk Chocolate using Encapsulated Lactobacillus Casei NCDC 298: Journal of Food Processing and Preservation ISSN 2012; 1745-4549.
- [13] Prakash S, Huppertz T, Karvchuk O and Deeth H. Ultra-high-temperature processing of chocolate flavoured milk: Journal of Food Engineering 2010; 96: 179-184.



## Optimization of probiotic breakfast chocolate formulation

Mostafa Lou, H. <sup>1</sup>, Karazhyan, R. <sup>2\*</sup>, Ehtiati, A. <sup>3</sup>

1. MSc. Graduated Student, Department of Food Science and Technology, ACECR Kashmar Higher Education Institute.
2. Assistant Professor, Department of industrial microbial biotechnology, Iranian Academic Center for Education Culture and Research (ACECR), Mashhad, Iran.
3. Member of faculty, Department of Food quality and safety, Iranian Academic Center for Education Culture and Research (ACECR), Mashhad, Iran.

### ARTICLE INFO

### ABSTRACT

#### Article History:

Received 2021/ 01/ 31  
Accepted 2021/ 10/ 25

#### Keywords:

Lactobacillus plantarum,  
Tissue stiffness,  
Chocolate,  
Guar gum,  
Texture analysis.

DOI: 10.52547/fsct.18.120.6

DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.120.6.8

\*Corresponding Author E-Mail:  
reza\_karazhyan2002@yahoo.com

Chocolate is one of the most delicious foods, one of the most popular foods that by increasing the variety of breakfast meals, can increase the desire of people to eat breakfast and thus reduce their fatigue and lethargy during the day. Probiotics are microorganisms that, if used in large numbers and live, have health-promoting effects on the host. According to the need of consumers to produce health food products, the purpose of this study is to investigate gum Arabic, guar and lecithin on the quality characteristics and survival of probiotic bacteria in probiotic breakfast chocolate. For this purpose, based on Box-Behnken statistical design, 18 samples were prepared. After complete mixing of compounds (including honey, Tahini, grape juice, cardamom, gum arabic, guar and lecithin) and achieving a uniform texture, the *Lactobacillus plantarum* probiotic bacteria. In the last step,  $10^8$  per gram of added and finally, breakfast chocolate was prepared and stored in a cool and dry place. The tests included viscosity, tissue stiffness and probiotic bacteria count. After designing the experiments, regression modeling with feedback removal algorithm, numerical optimization and drawing response surface diagrams were performed with Design-Expert software. The results showed that the addition of guar gum and lecithin had a significant effect on tissue properties (tissue firmness and viscosity) and survival of the probiotic bacterium *Lactobacillus plantarum*, while the addition of gum arabic and listin had a significant effect on tissue firmness, viscosity and significant increase in The probiotic bacterium did not have *Lactobacillus plantarum*. Optimal conditions in this study with total desirability, according to the relevant statistical design at a concentration of 0.546 listin, 0.8 guar gum and 0.064 arabic gum, the highest survival of probiotic bacteria was 10.599 cfu / gr and tissue stiffness was 8.22 N.