



تولید و فرمولاسیون شکلات تلخ سین بیوتیک بر پایه میکروکپسول های لاکتوباسیلوس کازئی و فیبر

شاه بلوط و ارزیابی بقای پروبیوتیک در طی دوره نگهداری

الناز تقی زاده^۱، فرزانه عبدالملکی^{۲*}، انوشه شریفان^۱

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲-استادیار گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی صنایع و مکانیک، واحد قزوین، دانشگاه آزاد اسلامی، قزوین،

ایران.

۳-دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله :	استفاده از فیبرها در صنایع مختلف غذایی از جمله شکلات در سال های اخیر رواج داشته است. با توجه به ارزش تغذیه ای شناخته شده شاه بلوط در این تحقیق پس از تهیه و آماده سازی فیبر، آزمون های ارزیابی ترکیبات فنولی و محتوی تانن تجمع یافته بررسی شد. اثر مثبت ریزپوشانی بر قابلیت تحمل شرایط شبیه سازی شده معده و روده توسط پروبیوتیک ها ثابت شده است. نتایج نشان داد که میزان ترکیبات فنولی کل برابر با ۱۸۴/۳۲ و میزان تانن تجمع یافته برابر با ۵/۱ میلی گرم بر گرم نمونه بود. همچنین میکروکپسول ها کروی، هموزن و با اندازه هایی بین ۱۰۰ تا ۳۰۰ میکرومتر می باشند. بین ذرات حالت آگلومراسیون وجود نداشت و به صورت یکنواخت بود. جمعیت باکتری های به دام افتاده در میکروکپسول ها ۷×۱۰ ^۷ کلنی بر گرم بود. همچنین با افزایش میزان درصد استفاده از میکروکپسول ها و فیبر شاه بلوط میزان درصد رطوبت، سختی و اسیدیته تیمارهای شکلات افزایش یافت. بقای لاکتوباسیلوس کازئی در تیمار T3 در بالاترین حالت ممکن بین تیمارهای تحقیق قرار داشت. میزان شاخص جمعیت میکروبی در طی زمان نگهداری کاهش یافت و از نظر خصوصیات حسی تیمار T6 دارای مطلوبیت کمتری نسبت به سایر تیمارها بود.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۳۰	
کلمات کلیدی: فیبر شاه بلوط، لاکتوباسیلوس کازئی، بقای پروبیوتیک، ریز پوشانی.	
DOI: 10.22034/FSCT.19.130.23 DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.130.3.2	
* مسئول مکاتبات: fa.abdolmaleki@gmail.com	

۱- مقدمه

غذاهای حاوی پروبیوتیک در بین غذاهای فراسودمند از اهمیت ویژه ای برخوردار است. از آنجا که پروبیوتیک ها روی تعادل میکروبی روده و سلامتی کلی بدن اثر مثبتی دارند، بازار تولید و مصرف آنها در حال افزایش است. مطالعات مختلف نشان داده اند که گونه های پروبیوتیکی مختلف باهم متفاوت هستند و اثر بخشی آنها نیز تحت تاثیر ماتریکسی است که برای رساندن آنها به روده استفاده شده است. یک پروبیوتیک ایده آل پروبیوتیکی است که بتواند در حین عبور از دستگاه گوارش زنده مانده بصورت دائمی در روده جایگزین شده و اثرات مفیدی را بر سلامت میزبان از طریق تقویت پاسخهای ایمنی، ترشح، تولید و سنتز ترکیباتی مانند اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه، اسید لاکتیک و باکتریوسینها یا با مکانیسمهای اثر مناسب دیگر اعمال نماید [۱].

امروزه مطالعات بسیاری در حال انجام است که تأثیرات ویژه پروبیوتیکها را شامل کاهش بیماریهای تورم مزمن روده، پیشگیری و درمان بیماریزای های مولد اسهال، عفونتهای دستگاه ادراری و تناسلی و گروهی از آلرژیها و سندرم روده تحریک پذیر و التهاب مزمن روده ایرا شامل می شود [۲].

میکروانکپسولاسیون به عنوان یکی از نوین ترین شیوه ها، عبارت است از پوشش دادن سلولهای میکروکپسوله میکروارگانسیم توسط لایه ای از هیدروکلوئید در مقیاس میکروسکوپی، به منظور محصور کردن و تفکیک کردن آنها از محیط، که در نتیجه آن، زنده ماندن باکتریهای پروبیوتیک در محیط مواد غذایی و شرایط دستگاه گوارش افزایش میابد. در سالهای اخیر، استفاده از تکنولوژی ریزپوشانی سبب حل مشکل اخیر شده است. ریزپوشانی باکتری پروبیوتیک جهت افزایش تقویت کارایی آنها در حین فرآیند و همچنین رهاش کنترل شده در دستگاه گوارش، مورد استفاده قرار میگیرد [۳].

میکروکپسوله کردن یک روش فیزیکوشیمیایی و یا مکانیکی است که در آن ذرات دارای مواد فعال، جهت حفاظت توسط یک لایه از مواد دیگر پوشش داده میشوند تا ذرات میکروکپسول به وجود آید. این کپسولها میتوانند محتویات خود را با سرعتی کنترل شده و یا در شرایط خاص تعریف

شده آزاد نمایند. در این تکنیک انواع طعم ها، اسانس ها، روغن ها، آنزیم ها، میکرو ارگانسیم ها و غیره می توانند توسط ترکیبات بیوپلیمر مانند کربوهیدرات ها، پروتئین ها، چربی ها پوشش داده شوند. متداول ترین مواد پوششی شامل پلیمرهایی با درجه ی غذایی نظیر آلژینات، کیتوزان، کربوکسی متیل سلولز، کاپاکاراگینان، ژلاتین، پکتین، ژلان، آگارز، زانتان و لوبیای لوکاست هستند. از جمله روش های ریز پوشانی می توان به: خشک کردن پاششی، خشک کردن انجمادی، پوشش دهی به طریق بستر سیال، اکستروژن، کریستالیزاسیون مرکب، ژلاسیون داخلی، دخول ملکولی و کوآسرواسیون اشاره کرد، روش ژلاتیناسیون خارجی که در این تحقیق مورد استفاده قرار خواهد گرفت [۴].

شکلات با طعم، مزه و بافت منحصر بفرد آن، حاوی مواد زیست فعال بسیاری است که اثر آنتی اکسیدانی ویژه ای را نشان می دهد و بر سلامت قلب انسان بویژه سیستم قلب و عروق تاثیر مثبت دارد. شکلات تلخ (همچنین شناخته شده با عنوان شکلات سیاه یا شکلات تخته ای)، فراورده ای می باشد که در ترکیب آن، کل مواد جامد بدون چربی کاکائو حداقل ۱۸ درصد می باشد. دارای درصد بالاتری از دانه های کاکائو و کره کاکائو نسبت به شکلات شیری است و جزء محصولات چاق کننده محسوب نمی شود [۵].

امروزه از فیبرهای رژیمی، به دلیل تاثیر مفید آنها بر الگوی غذایی مورد مصرف نظیر کاهش و تنظیم سطح کلسترول خون و اثرات ضدسرطان زایی به طور وسیعی در غذاهای فرآیند شده استفاده می گردد [۶]. نقش اصلی فیبرها در بدن، تضمین سلامت دستگاه گوارش است اما آن ها در پیشگیری از سرطان روده و بیماری هایی از جمله دیابت و بیماری های قلبی نیز بی تاثیر نیستند. سازمان بهداشت جهانی مصرف روزانه ۳۰ گرم فیبر را برای بزرگسالان توصیه می کند و کارشناسان تغذیه استرالیایی معتقدند کودکان باید ۱۰ گرم بیشتر از معادل سن خود فیبر مصرف کنند، به طور مثال یک کودک ۱۰ ساله روزانه باید ۲۰-۱۵ گرم فیبر مصرف کند [۶].

شاه بلوط سرشار از مواد معدنی و ویتامین های گروه B می باشد. به علت دارا بودن فیبر بسیار، با مصرف مقدار کم باعث

1. Carboxy methyl cellulose (CMC)
2. Bioactive

۲-۳-۱- ریزدرون پوشانی لاکتوباسیلوس کازئی

ریز درون پوشانی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی با استفاده از روش ژلاتیناسیون خارجی^۵ اجرا شد. مراحل روش را می توان بطور خلاصه چنین بیان کرد، ابتدا آلژینات (سیگما، آلمان A High mannuro; 2033) ایجاد کننده ویسکوزیته متوسط در آب مقطر، با همزن مغناطیسی حل شد. سپس مقداری از محلول فوق با یک گرم سوسپانسیون باکتریایی مخلوط با استفاده از همزن مغناطیسی در ۹۰۰rpm به مدت ۲۰ دقیقه پراکنده گردید. در مرحله بعد با افزودن کیتوزان حاوی یون کلسیم (تهیه شده از انحلال روغن نباتی مایع، توئین و کلرور کلسیم) عمل انکپسولاسیون آغاز شد. هم زدن ادامه یافت تا دانک ها تشکیل شدند. در نهایت کپسول ها با محلول ۰/۱ درصد پپتون بر روی کاغذ صافی شسته و با استفاده از همین محلول در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد [۱۱].

۲-۳-۲- آزمون های میکروکپسول ها

شمارش تعداد باکتری ها به دام افتاده در میکروکپسول بدین صورت بود که ۱ گرم از نمونه میکروکپسول تهیه شده در ۹۹ میلی لیتر محلول ۱ درصد وزنی /حجمی سدیم سیترات استریل در pH حدود ۶ پراکنده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق همزده شد تا کپسول ها بطور کامل حل و باکتری ها آزاد شوند، آنگاه با استفاده از محیط جامد MRS^۶ در شرایط هوازی، دمای ۳۷ درجه و به مدت زمان ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد و تعداد باکتری ها شمارش گردید، این شمارش در سه تکرار صورت پذیرفت [۱۱].

تعیین اندازه میکروکپسول ها و نحوه پراکنش آن ها با استفاده از دستگاه اندازه گیری قطر ذرات انجام پذیرفت. بررسی مورفولوژی میکروکپسول ها با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی و تکنیک SEM^۷ انجام شد [۱۲].

۲-۳-۳- بررسی قابلیت زنده مانی لاکتوباسیلوس

کازئی در شرایط شبیه سازی شده

آماده سازی شرایط شبیه سازی شده معده با استفاده از پپسین، اسیدکلریدریک و سدیم کلرید انجام شد.

سیری می شود و همچنین فاقد گلوتن است که برای افراد حساس به گلوتن مناسب است [۷].

در تحقیق حاضر نیز سعی شد تا از این ترکیبات زیست فعال موجود در فیبر شاه بلوط در تهیه شکلات پروبیوتیک و افزایش بقای باکتری های پروبیوتیک استفاده شود.

۲- مواد و روش

۲-۱- تهیه و استخراج فیبر شاه بلوط

در این تحقیق شاه بلوط هندی از پژوهشکده گیاهان دارویی تهیه شده و استخراج فیبر شاه بلوط مطابق با روش Singh G.D و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام شد [۸].

۲-۲- آزمون های تعیین ویژگی های فیبر شاه

بلوط

برای ارزیابی ویژگی های فیبر شاه بلوط، اندازه گیری ترکیبات فنولی و تانن تجمع یافته با روش اسپکتروفتومتری انجام شد [۹].

۲-۳- باکتری مورد استفاده در تحقیق و شرایط

رشد آن

باکتری لاکتوباسیلوس کازئی PTCC 1608 از کلکسیون باکتری های و قارچ های ایران^۳ خریداری شد. باکتری مورد نظر پس از جداسازی، در محیط کشت MRS^۴ مایع استریل و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد رشد کرد. کشت باکتری در محیط کشت مشابه و در حضور ۱۶ درصد (حجمی /حجمی) گلیسرول استریل، توسط نیتروژن مایع منجمد شده و در دمای ۸۰- مورد نگهداری قرار گرفت. این کشت منجمد در محیط کشت MRS استریل طی ۱۶ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد فعال شد، شمارش جمعیت میکروبی با استفاده از اسپکتروفتومتری مدل Aquaris ساخت انگلیس انجام شد و پس از رسیدن جمعیت میکروبی لاکتوباسیلوس کازئی به مقدار ۱۰^۷ cfu.ml به یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد انتقال یافت [۱۰].

5. External gelation
6. De man, Rogosa and Sharpe
7. Scanning electron microscope

3. PTCC (Persian Collection Center)
4. De Man, Rogosa and Sharpe agar

۷۲ ساعت انجام شد. این عمل در روزهای تولید، پانزدهم، سی ام و چهل و پنجم انجام پذیرفت [۱۷].

۲-۵-۲- ارزیابی حسی

نمونه های شکلات با کدهای سه رقمی به طور تصادفی شماره گذاری شد و همراه با پرسشنامه در اختیار ۱۰ ارزیاب تعلیم دیده موسسه تحقیقات فنی و مهندسی کرج قرار گرفت. ارزیاب ها در گروه سنی ۴۷-۲۰ سال که آموزش های لازم را در این زمینه دیده بودند، قرار گرفت. از آن ها خواسته شد که ویژگی های کیفی رنگ ظاهری، طعم و مزه، شکل ظاهری، عطر و بو و پذیرش کلی را از عدد ۱ تا ۵ رتبه بندی نمایند (روش هدونیک ۵ سطحی). برای بهترین کیفیت عدد ۵ و نازل ترین کیفیت عدد ۱ در نظر گرفته شد [۱۸].

Table 1 Encoding research treatment

Chesnut's fiber	Microcapsule value	Treatments	Row
0	0	T	1
1	1	T1	2
1	2	T2	3
1	3	T3	4
2	1	T4	5
2	2	T5	6
2	3	T6	7

۲-۶- روش ها و ابزار تجزیه و تحلیل داده ها

آنالیز آماری با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین داده با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۰/۰۵ درصد انجام گرفت. جهت آنالیز آماری از نرم افزار Statistica نسخه ۸ استفاده گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج آزمون های فیبر شاه بلوط

۳-۱-۱- میزان ترکیبات فنولی کل و تانن تجمع یافته
میزان ترکیبات فنولی کل و تانن تجمع یافته به صورت زیر است.

آماده سازی شرایط شبیه سازی روده با استفاده از پانکراتین، نمک صفراوی، سدیم کلرید و سود انجام شد.

بافر سالیین فسفات با اسیدیته ۷ برای آزادسازی باکتری ها از میکروکپسول انجام شد. میکروکپسول حاوی باکتری در هر یک از سه محیط نامبرده حل شد و سپس کشت و شمارش باکتری انجام گرفت [۱۳].

۲-۴- تهیه و فرمولاسیون شکلات پروبیوتیک

روش کلی تهیه شکلات به این صورت بود که ابتدا تمامی مواد اولیه شکلات شامل پودر کاکائو، خمیر کاکائو، شکر، لستین، کره کاکائو و وانیلین پس از توزین، در دستگاه بال میل^۸ آزمایشگاهی ساخت شرکت سپهر ماشین (تهران، ایران) ریخته شده و عمل آسیاب، کاهش ذرات^۹ و ورز دادن^{۱۰} مخلوط به طور همزمان در این دستگاه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد و با سرعت ۱۰۰ دور بر دقیقه همراه با عمل سیرکوله شدن صورت پذیرفت. نمونه های شکلات پس از طی مدت زمان لازم تخلیه و در قالب هایی از جنس پلی کربنات ریخته شد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه جهت خنک شدن در فریزر در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از طی دوره سرد شدن نمونه ها از قالب خارج و در ظروف پلاستیکی در دمای محیط تا زمان انجام آزمایشات نگهداری شد [۱۴].

۲-۵- آزمون های شکلات

۲-۵-۱- اندازه گیری برخی ویژگی های فیزیکی و شیمیایی شکلات

ارزیابی درصد رطوبت شکلات با استفاده از روش توزین و مطابق استاندارد ملی شماره ۶۰۸ انجام شد. ارزیابی اسیدیته شکلات مطابق با استاندارد ملی شماره ۶۰۸ انجام شد. ارزیابی خصوصیات بافت با استفاده از دستگاه بافت سنج انجام شد [۱۵]. ارزیابی فعالیت آبی شکلات با استفاده از دستگاه اندازه گیری فعالیت آبی انجام شد [۱۶]. ارزیابی بقای لاکتوباسیلوس کازئی در تیمارهای شکلات با روش رقت های متوالی روی محیط کشت ام آر اس آگار وانکوباسیون به مدت

8. Ball mill
9. Refining
10. Conchin

Table 2 Chestnut Fiber Evaluation Results

Accumulated tanning (mg/g)	Total phenolic compounds(mg/g)
5.1±0.01	184.32±0.02

Data are the mean± standard deviation of three replications.

۲-۳- نتایج آزمون های میکروکپسول های حاوی پروبیوتیک

۱-۲-۳- شمارش تعداد باکتری ها به دام افتاده در میکروکپسول

خصوصیات به دام اندازی و رهایش میکروکپسول ها در جدول زیر آمده است.

Table 3 Characteristics of trapping and release of microcapsules

The percentage of release	Population of trapped bacteria/cfu/g
74±0.01	7×10 ⁷

•Data are the mean± standard deviation of three replications.

نتایج بررسی شمارش میکروارگانیسم ها در درون میکروکپسول ها حاکی از به دام اندازی هشتاد درصد میکروارگانیسم های پروبیوتیک در غلظت به کاررفته در فرمولاسیون می باشد. همانگونه که نتایج نشان می دهد تیمارهای حامل آلژینات / کیتوزان دارای قابلیت به دام اندازی یا انباشت ۸۰ درصد می باشد. یکی از دلایل چنین وضعیتی را می توان به توانایی آلژینات در ایجاد شبکه تخم مرغی و محبوس کردن ترکیبات در ساختار خود مرتبط دانست [۱۲].

۲-۳-۲- تعیین اندازه میکروکپسول ها و نحوه پراکنش آن ها

اندازه میکروکپسول ها و نحوه پراکنش آن ها در جدول زیر آمده است.

به طور کلی رهایش میکروکپسول ها در مراحل مختلف دارای پروفایل های متفاوتی بوده و همچنین عوامل بسیاری بر میزان رهایش نانوذرات نیز موثر می باشد. بیشتر پلیمرهای زیست تخریب پذیر مورد استفاده در سیستم های میکرومولسیون ها بوسیله ی هیدرولیز، تخریب میشوند. یکی از عوامل موثر بر میزان رهایش میکروکپسول ها سایز میکروکپسول ها می باشد که با افزایش اندازه میکروکپسول ها سطح تماس میکرومولسیون به طور موثری کاهش می یابد که می تواند باعث کاهش میزان آزاد سازی ترکیبات به دام افتاده در درون میکروکپسول شود. بنابراین با توجه به نتایج سایز میزان شاخص به دام اندازی به طور موثری تحت تاثیر قرار میگیرد.

Table 4 Microcapsules size and polydispersity index

Zeta Potential Index(Mv)	polydispersity index	Microcapsules size (μm)
+37	0.2	210

بیفیدیوم نیز با استفاده از کپسول های کیتوزان و آلژینات کلسیم نیز به نتایج مشابهی دست یافتند. [۱۹]

۲-۳-۴- بررسی قابلیت زنده مانگی لاکتوباسیلوس کازئی در شرایط شبیه سازی شده

با توجه به نمودار ۱ مشاهده شد که اختلافات معنی داری بین میزان زنده مانگی لاکتوباسیلوس کازئی در شرایط مختلف وجود داشت ($p \leq 0.05$). بالاترین میزان زنده مانگی لاکتوباسیلوس کازئی در شرایط محیط بافر بود و کمترین میزان زنده مانگی لاکتوباسیلوس کازئی در شرایط فرم آزاد مشاهده

۲-۳-۳- بررسی ریخت شناسی میکروکپسول ها

میکروکپسول ها از ظاهر کروی و هموژن با اندازه هایی بین ۱۰۰ تا ۳۰۰ میکرومتر می باشند. بین ذرات حالت آگلومراسیون وجود نداشت و به صورت یکنواخت می باشد. نتایج مورفولوژی نانوذرات نیز تشکیل نانوذرات بیوپلیمری کروی شکل و با اندازه های نسبتاً یکنواخت را تایید نمود. نانوذرات به صورت مجزا از هم و کروی و یکنواخت بودند و میزان استفاده از سلول های پروبیوتیک در ویژگی های ظاهری و مورفولوژیکی میکروکپسول ها موثر نبوده است. خسروی زنجانی و همکاران نیز با کپسوله کردن بیفیدوباکتریوم

روشنی و نقی پور در بررسی ویژگی های کیک فنجانی تهیه شده با آرد شاه بلوط نیز به نتایج مشابهی دست یافتند. آن ها نیز افزایش درصد رطوبت در تیمارهای کیک را با افزایش آرد شاه بلوط مشاهده نمودند که با یافته های تحقیق حاضر در توافق بود [۲۰].

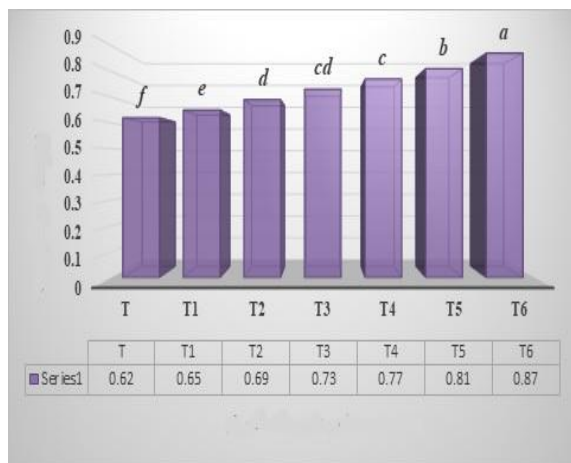


Chart 2 Comparison of the average moisture content of chocolate treatments at a significant level of 0.05

T=Lactobacillus Casei in free form, T1=Chocolate has 1% microcapsule, 1% chestnut fiber, T2=Chocolate has 2% microcapsules, 1% chestnut fiber, T3=Chocolate has 3% microcapsules and 1% chestnut fiber, T4=Chocolate has 1% microcapsule, 2% chestnut fiber, T5=Chocolate has 2% microcapsules and 2% chestnut fiber, T6=Chocolate contains 3% microcapsules and 2% chestnut fiber

۳-۳-۲- میزان اسیدیته

با توجه به نمودار ۳ تاثیر تیمار بر میزان اسیدیته تیمارهای شکلات در سطح ۰/۰۵ درصد معنی دار می باشد ($p \leq 0/05$). بر اساس این نمودار مشاهده شد که استفاده از میکروکپسول ها تاثیرات معنی داری بر میزان اسیدیته تیمارهای شکلات نشان نداد ($p > 0/05$). با توجه به نمودار ۴-۲ مشاهده شد که با افزایش میزان درصد فیبر شاه بلوط و میکروکپسول ها میزان اسیدیته تیمارهای شکلات به طور معنی داری افزایش می یابد که با افزایش درصد فیبر شکلات به میزان ۲ درصد، بالاترین میزان اسیدیته در تیمارهای شکلات مشاهده شد. اما تیمار شاهد دارای کمترین میزان اسیدیته در بین تیمارهای شکلات بود. با توجه به میزان اسیدیته فیبر شاه بلوط که در محدوده ۶-۴/۵ می باشد.

شد ($p \leq 0/05$). میزان زنده باکتری لاکتوباسیلوس کازئی در شرایط معده و روده کمتر از شرایط بافر و بیشتر از شرایط آزاد بود ($p \leq 0/05$). همچنین میزان زنده مانی در شرایط روده کمتر از شرایط معده نیز بود ($p \leq 0/05$).

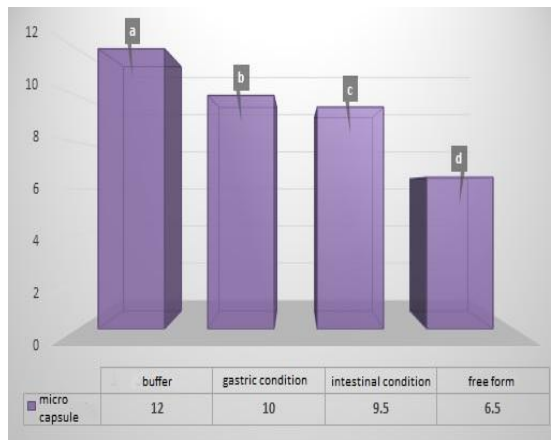


Chart 1 Survival of Lactobacillus casei in the environment of buffering phosphate, gastric, intestinal and free form conditions

۳-۳-۳- نتایج آزمون های شکلات

۳-۳-۱- درصد رطوبت

با توجه به نمودار ۲ تجزیه واریانس تاثیر تیمار بر درصد رطوبت تیمارهای شکلات در سطح ۰/۰۵ درصد معنی دار می باشد ($p \leq 0/05$). با توجه به نمودار ۴-۲ مشاهده شد که با افزایش میزان درصد فیبر شاه بلوط و میکروکپسول ها درصد رطوبت تیمارهای شکلات به طور معنی داری افزایش می یابد که با افزایش درصد فیبر شکلات به میزان ۲ درصد و افزایش میزان میکروکپسول ها به میزان ۳ درصد بالاترین میزان درصد رطوبت در تیمارهای شکلات مشاهده شد. اما تیمار شاهد دارای کمترین میزان درصد رطوبت در بین تیمارهای شکلات بود. تیمارهای T4 تا T6 میزان درصد رطوبت خارج از استاندارد ملی شکلات به شماره ۶۰۸ می باشد. فیبرها از ترکیباتی هستند که به حفظ و نگهداری میزان رطوبت محصول کمک می کنند اما از آن جایی که شکلات ترکیب حساس به رطوبت می باشد و مانند محصولاتمانند کیک و نان که به دلیل مساله بیاتی، حفظ رطوبت حائز اهمیت می باشد، این ویژگی مثبت ارزیابی نمی شود. بنابراین این انتظار می رفت که حضور فیبر شاه بلوط به افزایش درصد رطوبت محصول منجر شود که در تحقیقات اخیر نیز چنین مشاهداتی نیز وجود داشت.

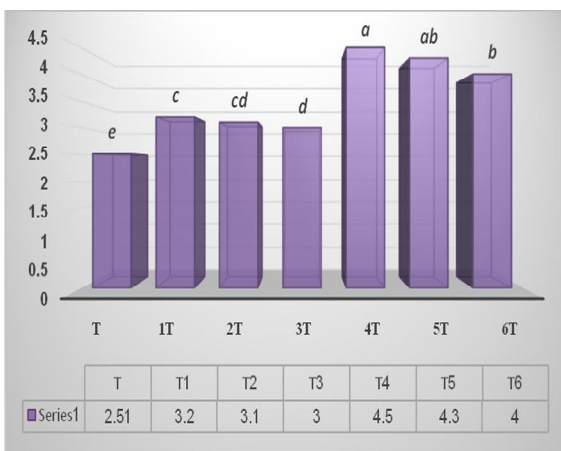


Chart 4 Comparison of the mean hardness index of chocolate treatments at a significant level of 0.05
T=Lactobacillus Casei in free form, T1=Chocolate

has 1% microcapsule, 1% chestnut fiber
T2=Chocolate has 2% microcapsules, 1% chestnut fiber, T3=Chocolate has 3% microcapsules and 1% chestnut fiber

T4=Chocolate has 1% microcapsule, 2% chestnut fiber, T5=Chocolate has 2% microcapsules and 2% chestnut

T6=Chocolate contains 3% microcapsules and 2% chestnut fiber

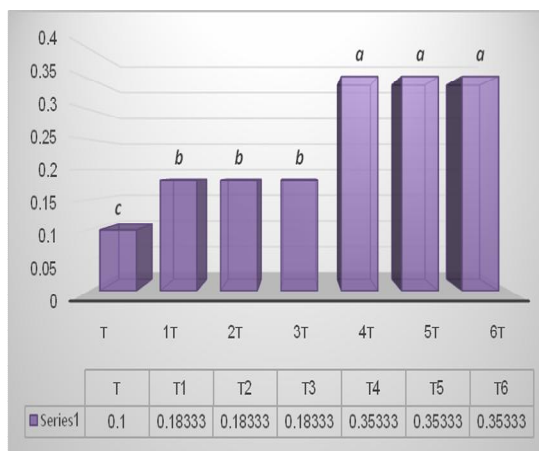


Chart 3 Comparison of average acidity percentage of chocolate treatments at a significant level of 0.05
T=Lactobacillus Casei in free form, T1=

Chocolate has 1% microcapsule, 1% chestnut fiber
T2=Chocolate has 2% microcapsules, 1% chestnut fiber, T3=Chocolate has 3% microcapsules and 1% chestnut fiber

T4=Chocolate has 1% microcapsule, 2% chestnut fiber, T5=Chocolate has 2% microcapsules and 2% chestnut

T6=Chocolate contains 3% microcapsules and 2% chestnut fiber

۳-۳-۳- سختی شکلات

با توجه به نمودار ۴-۴ تاثیر تیمار بر شاخص سختی تیمارهای شکلات در سطح ۰/۰۵ درصد معنی دار می باشد ($p \leq 0/05$). بر اساس این نمودار مشاهده شد که استفاده از میکروکپسول ها تاثیرات معنی داری بر میزان سختی تیمارهای شکلات نشان نداد ($p > 0/05$). با توجه به نمودار ۴ مشاهده شد که با افزایش میزان درصد فیبر شاه بلوط میزان سختی تیمارهای شکلات به طور معنی داری افزایش می یابد که با افزایش درصد فیبر شکلات به میزان ۲ درصد بالاترین میزان سختی در تیمارهای شکلات مشاهده شد.

اما تیمار شاهد دارای کمترین میزان سختی در بین تیمارهای شکلات بود. همچنین بر اساس نتایج با افزایش میزان استفاده از میکروکپسول ها، میزان شاخص سختی تیمارهای شکلات به طور معنی داری کاهش می یابد ($p \leq 0/05$).

۳-۳-۴- فعالیت آبی

با توجه به نمودار ۵-۴ تاثیر تیمار بر شاخص فعالیت آبی تیمارهای شکلات در سطح ۰/۰۵ درصد معنی دار می باشد ($p \leq 0/05$). با توجه به نمودار ۵-۴ مشاهده شد که با افزایش میزان درصد فیبر شاه بلوط و میکروکپسول ها میزان فعالیت آبی تیمارهای شکلات به طور معنی داری افزایش می یابد که با افزایش درصد فیبر شکلات به میزان ۲ درصد و افزایش میزان میکروکپسول ها به میزان ۳ درصد بالاترین میزان فعالیت آبی در تیمارهای شکلات مشاهده شد. اما تیمار شاهد دارای کمترین میزان فعالیت آبی در بین تیمارهای شکلات بود. تیمارهای T4 تا T6 میزان فعالیت آبی خارج از استاندارد ملی شکلات به شماره ۶۰۸ می باشد. فعالیت آبی فاکتور مناسبی برای ارزیابی عمر ماندگاری و پایداری میکروبیولوژیکی مواد غذایی محسوب می گردد. میزان فعالیت آبی یکی از فاکتورهایی است که بر رشد میکروارگانیسمها تأثیر گذاشته و از اهمیت ویژه ای در نگهداری مواد غذایی برخوردار است

میزان فعالیت باکتری لاکتوباسیلوس کازئی کم می شود. از طرفی دیگر با افزایش میزان اسیدیته در فرمولاسیون شکلات در میزان دو درصد استفاده از فیبر شاه بلوط، به دلیل حساسیت بالای باکتری های پروبیوتیک به شرایط اسیدی می تواند باعث کاهش بقای این ترکیبات شود.

در مورد نمونه های شکلات حاوی لاکتوباسیلوس کازئی کپسوله شده، همان گونه که در نمودار نیز مشهود است، می توان پی برد، میزان کاهش تعداد باکتری به دام افتاده در کپسول ها در طی دوره انبارمانی چهل و پنج روزه در ۴ درجه سانتی گراد، کاهش کمتری را نسبت به شکلات تیمار نشان داد که در انتهای دوره ۴۵ روزه انبارمانی در ۴ درجه سانتی گراد، حدود ۱-۱/۵ سیکل لگاریتمی کاهش در تعداد سلول های پروبیوتیکی، تحت شرایط و عوامل نامساعد برای رشد آن ها که در محصول و یا در طی فرآیند و تولید محصول وجود داشت. همچنین نتایج نشان داد که نمونه تیمار دارای فیبر شاه بلوط ۱ درصد نسبت به نمونه تیمار دارای فیبر شاه بلوط ۲ درصد دارای تعداد سلول های پروبیوتیک بالاتری بود که ارتباط مستقیمی با تعداد سلول های اولیه به کار رفته در کپسولاسیون و همچنین تعداد سلول های به دام افتاده در درون کپسول ها نشان داد.

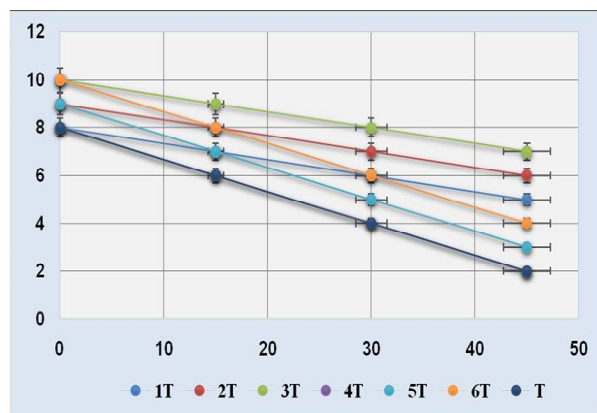


Chart 6 Comparison of the mean survival index of *Lactobacillus casei* in chocolate treatments at a significant level of 0.05

T=Lactobacillus Casei in free form, T1= Chocolate has 1% microcapsule, 1% chestnut fiber
 T2=Chocolate has 2% microcapsules, 1% chestnut fiber, T3=Chocolate has 3% microcapsules and 1% chestnut fiber
 T4=Chocolate has 1% microcapsule, 2% chestnut fiber, T5=Chocolate has 2% microcapsules and 2% chestnut
 T6=Chocolate contains 3% microcapsules and 2% chestnut fiber

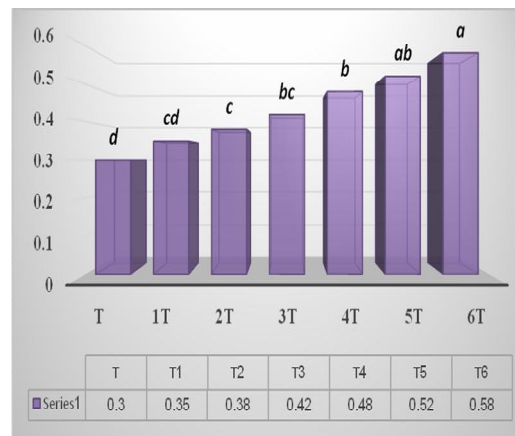


Chart 5 Comparison of the mean water activity index of chocolate treatments at a significant level of 0.05

T=Lactobacillus Casei in free form, T1= Chocolate has 1% microcapsule, 1% chestnut fiber
 T2=Chocolate has 2% microcapsules, 1% chestnut fiber, T3=Chocolate has 3% microcapsules and 1% chestnut fiber
 T4=Chocolate has 1% microcapsule, 2% chestnut fiber, T5=Chocolate has 2% microcapsules and 2% chestnut
 T6=Chocolate contains 3% microcapsules and 2% chestnut fiber

۳-۳-۵- بقای لاکتوباسیلوس کازئی در تیمارهای شکلات

با توجه به نمودار ۶ تاثیر تیمار بر بقای لاکتوباسیلوس کازئی در تیمارهای شکلات در سطح ۰/۰۵ درصد معنی دار می باشد ($p \leq 0/05$). مطابق با نمودار ۶ مشاهده شد که اختلافات معنی داری بین میزان بقای لاکتوباسیلوس کازئی در تیمارهای شکلات در طی چهل و پنج روز نگهداری وجود داشته و به تدریج در طی زمان نگهداری از میزان زنده مانده لاکتوباسیلوس کازئی کاسته شد ($p \leq 0/05$). اختلافات معنی داری بین روند کاهش جمعیت لاکتوباسیلوس کازئی در طی زمان نگهداری وجود داشت ($p \leq 0/05$). بر اساس نتایج استفاده از فیبر شاه بلوط در میزان ۱ درصد میزان بقای لاکتوباسیلوس کازئی را نسبت به استفاده از فیبر شاه بلوط نسبت به ۳ درصد بقای بیشتری می دهد. فیبر شاه بلوط به دلیل دارا بودن ترکیبات آنتی اکسیدانی به دلیل این که از حضور باکتری های مضر ممانعت می کند می تواند باعث افزایش بقای باکتری های پروبیوتیک مانند لاکتوباسیلوس کازئی شود. اما در درصدهای بالای فیبر شاه بلوط به دلیل تلخی و ترکیبات گلیکوزیدی

امتیازات طعم را کاهش دهد. به این ترتیب که طعم غالب شکلات تا حدودی کاهش می یابد که این بر امتیازات داورها اثر گذار می باشد.

Yildiz و همکاران در سال ۲۰۱۴ در بهینه سازی تهیه و فرمولاسیون کیک فاقد گلوتن با استفاده از آرد شاه بلوط در مقادیر بالای استفاده تلخی و کاهش طعم را گزارش نمودند که با یافته های تحقیق حاضر نیز در توافق بود [۲۱].

۳-۴-۲- شکل ظاهری

با توجه به نمودار ۸ تاثیر تیمار بر شاخص شکل ظاهری تیمارهای شکلات در سطح ۰/۰۵ درصد معنی دار می باشد ($p \leq 0/05$). با توجه به نمودار ۴-۸ مشاهده شد که اختلافات معنی داری بین میزان مطلوبیت شاخص شکل ظاهر تیمارهای شکلات با سایر تیمارها مشاهده شد ($p \leq 0/05$). استفاده از میکروکپسول های پروبیوتیک در سطح ۱ و ۲ درصد اختلافات معنی داری بر روی شاخص شکل ظاهری تیمارهای شکلات نداشت ($p > 0/05$). اما در مقدار ۳ درصد استفاده از میکروکپسول ها میزان مطلوبیت شکل ظاهری را به طور معنی داری کاهش داد ($p \leq 0/05$). استفاده از فیبر شاه بلوط نیز در میزان ۱ درصد اثرات نامطلوبی بر روی شکل ظاهری تیمارهای شکلات نشان نداد اما در میزان ۲ درصد میزان مطلوبیت شکل ظاهری تیمارهای شکلات به طور معنی داری کاهش یافت ($p \leq 0/05$).

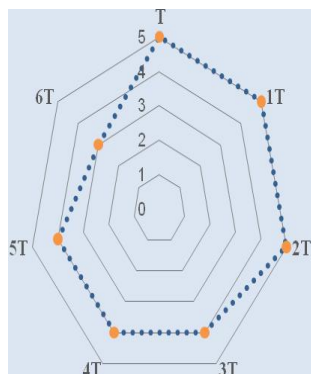


Chart 8 Comparison of the mean appearance index of chocolate treatments at a significant level of 0.05

در مقادیر بالای استفاده از فیبر شاه بلوط به دلیل این که سختی تیمارهای شکلات تحت تاثیر قرار می گیرد و این سختی بر

سلول های کپسوله شده به زمان بیشتری نیاز دارند تا یک چرخه (سیکل) لگاریتمی در تعداد سلول های با قابلیت زیست پذیری آن ها کاهش صورت گیرد. کپسولاسیون به دلیل حفاظت از شرایط اسیدی و تنش های محیطی نیز بر میزان زنده ماندن باکتری های پروبیوتیک موثر است که در نمودار ۱ نیز تایید می شود بقای لاکتوباسیلوسکازئی در شرایط معده و روده کمتر از شرایط بافری می باشد.

۳-۴-۳- خصوصیات حسی

۳-۴-۳-۱- طعم و مزه

با توجه به نمودار ۴-۷ تاثیر تیمار بر شاخص طعم شکلات در سطح ۰/۰۵ درصد معنی دار می باشد ($p \leq 0/05$). با توجه به نمودار ۷ مشاهده شد که اختلافات معنی داری بین میزان مطلوبیت شاخص طعم تیمارهای شکلات با تیمار کنترل مشاهده شد ($p \leq 0/05$). استفاده از میکروکپسول های پروبیوتیک در سطح ۱ و ۲ درصد اختلافات معنی داری بر روی شاخص طعم تیمارهای شکلات نداشت ($p > 0/05$). اما در مقدار ۳ درصد استفاده از میکروکپسول ها میزان مطلوبیت طعم و مزه را به طور معنی داری کاهش داد ($p \leq 0/05$). استفاده از فیبر شاه بلوط نیز در میزان ۱ درصد اثرات نامطلوبی بر روی طعم تیمارهای شکلات نشان نداد اما در میزان ۲ درصد میزان مطلوبیت طعم تیمارهای شکلات به طور معنی داری کاهش یافت ($p \leq 0/05$).

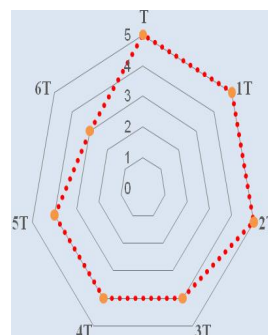


Chart 7 Comparison of the mean taste index of chocolate treatments at a significant level of 0.05

استفاده از فیبر شاه بلوط در مقادیر زیاد به دلیل دارا بودن تانن می تواند تا حدودی باعث تلخی طعم شده و امتیازات را کاهش دهد. استفاده از میکروکپسول های پروبیوتیک نیز به دلیل تلخی پروبیوتیک ها در غلظت های بالا می تواند میزان

دریافتند که نشاسته مقاوم به حرارت به دلیل ایجاد کدورت در تیمارهای شکلات از میزان مطلوبیت رنگ ظاهری تیمارهای شکلات کاسته که با یافته های تحقیق حاضر در توافق بود [۲۲].

۳-۴-۴- عطر و بو

با توجه به نمودار ۱۰ تاثیر تیمار بر شاخص عطر و بو تیمارهای شکلات در سطح ۰/۰۵ درصد معنی دار می باشد ($p \leq 0/05$). استفاده از میکروکپسول ها و فیبر شاه بلوط تاثیرات معنی داری بر میزان عطر و بوی هیچ کدام از تیمارهای شکلات نشان نداد ($p > 0/05$).

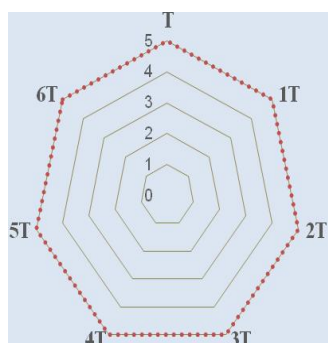


Chart 10 Comparison of the mean aroma and odor index of chocolate treatments at a significant level of 0.05

هیچ یک از دو ترکیبات میکروکپسول های پروبیوتیک و فیبر دارای اثرات خاصی روی عطر و بو نیستند که شکلات راتحت تاثیر قرار نمی دهد.

۳-۴-۵- پذیرش کلی

تاثیر تیمار بر شاخص پذیرش کلی تیمارهای شکلات در سطح ۰/۰۵ درصد معنی دار می باشد ($p \leq 0/05$). اختلافات معنی داری بین میزان شاخص پذیرش کلی تیمار شاهد با تیمار شکلات دارای ۱ درصد میکروکپسول و ۱ درصد فیبر شاه بلوط وجود نداشت ($p > 0/05$). با افزایش میزان درصد استفاده از میکروکپسول ها تا ۳ درصد میزان پذیرش کلی کاهش معنی داری نشان داد و همچنین افزایش میزان درصد استفاده از فیبر شاه بلوط تا ۲ درصد میزان شاخص پذیرش کلی تیمارهای شکلات را کاهش داد ($p \leq 0/05$). به طوری که بدترین تیمار ۳ درصد میکروکپسول و ۲ درصد فیبر شاه بلوط ارزیابی شد.

افزایش درصد رطوبت غالب می باشد، شکل ظاهری تیمارهای شکلات تحت تاثیر قرار گرفته و مطلوبیت آن کاهش می یابد.

۳-۴-۳- رنگ ظاهری

با توجه به نمودار ۹ تاثیر تیمار بر شاخص رنگ ظاهری تیمارهای شکلات در سطح ۰/۰۵ درصد معنی دار می باشد ($p \leq 0/05$). با توجه به نمودار ۹ مشاهده شد که اختلافات معنی داری بین میزان مطلوبیت شاخص رنگ ظاهری تیمارهای شکلات با سایر تیمارها مشاهده شد ($p \leq 0/05$). استفاده از میکروکپسول های پروبیوتیک در سطح ۱ و ۲ درصد اختلافات معنی داری بر روی شاخص رنگ ظاهری تیمارهای شکلات نداشت ($p > 0/05$). اما در مقدار ۳ درصد استفاده از میکروکپسول ها میزان مطلوبیت رنگ ظاهری را به طور معنی داری کاهش داد ($p \leq 0/05$). استفاده از فیبر شاه بلوط نیز در میزان ۱ درصد اثرات نامطلوبی بر روی رنگ ظاهری تیمارهای شکلات نشان نداد اما در میزان ۲ درصد فیبر شاه بلوط میزان مطلوبیت رنگ ظاهری تیمارهای شکلات به طور معنی داری کاهش یافت ($p \leq 0/05$).

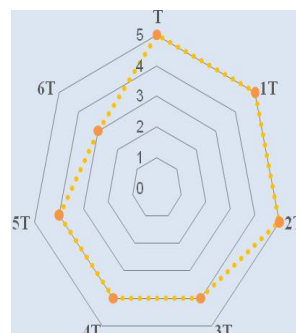


Chart 9 Comparison of the mean apparent color index of chocolate treatments at a significant level of 0.05

استفاده از میکروکپسول ها در ۳ درصد به دلیل ایجاد حالت ژله ای و همچنین استفاده از فیبر شاه بلوط به دلیل رنگ ظاهری آن می تواند باعث ایجاد کدورت در تیمارهای شکلات شده و مطلوبیت رنگ ظاهری را کاهش دهد. با افزایش میزان استفاده از فیبر شاه بلوط و افزایش غلظت رنگدانه های قرمز آن میزان مطلوبیت رنگ ظاهری کاهش می یابد. در این راستا نیز تحقیقات مشابهی نیز وجود داشت.

Lončarević و همکاران (۲۰۲۱) اثرات نشاسته مقاوم به حرارت را در فرمولاسیون تیمارهای شکلات بررسی نمودند و

- [6] Ajila, C. and U.P. Rao. (2013), Mango peel dietary fibre: Composition and associated bound phenolics. *Journal of functional foods*, **5**(1): p. 444-450.
- [7] Yang, J., A. Xiao, and C. (2014). Wang, Novel development and characterisation of dietary fibre from yellow soybean hulls. *Food Chemistry*.161: p. 367-375.
- [8] Singh, G.D., Bawa, A. S., Singh, S., Saxena, D.C. (2009). Physicochemical, pasting, thermal and morphological characteristics of Indian water chestnut (*Trapa natans*) starch. *Starch - Stärke*.61(1): p. 35-42.
- [9] Hwang, J.-Y., I.-K. Hwang, and J.-B. Park. (2001). Analysis of physicochemical factors related to the automatic pellicle removal in Korean chestnut (*Castanea crenata*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(12): p. 6045-6049.
- [10] Abghari, A., Sheykh Zeynolabedin, M., Soleymanzad, S., Dakhani, Sh., (2008). Evaluation of *Lactobacillus acidophilus* survival in a non-thermal ice cream. 18th Congress of Food Science and Technology, Mashhad.
- [11] Mandal, S., A. Puniya, and K. Singh, (2006). Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *International Dairy Journal*, **16**(10): p. 1190-1195.
- [12] Ghaseminezhad Tabrizian, V., Homayouni rad, A., Bolandi, M. (2013), Investigation of physicochemical and emotional properties of probiotic chocolate 2nd National Conference on Food Science and Technology, Islamic Azad University of Quchan Branch.
- [13] Ghaffarian, R., Pérez Herrero, E., Oh, H., Raghavan, S. R., Muro, S. (2016). Chitosan-Alginate Microcapsules Provide Gastric Protection and Intestinal Release of ICAM-1-Targeting Nanocarriers, Enabling GI Targeting In Vivo. *Advanced functional materials*, **26**(20): p. 3382-3393.
- [14] Mazaheri tehrani, M., Yeganehzad, S., Raoufi, N. (2011), Effect of different ratios of whole soy flour as fat substitutes and grinding time on histological, rheological and sensory properties of milk chocolate. *Researches in Food Science and Technology of Iran*.
- [15] Iran, N.S.O.o., *Chocolate and test methods*. (2011)

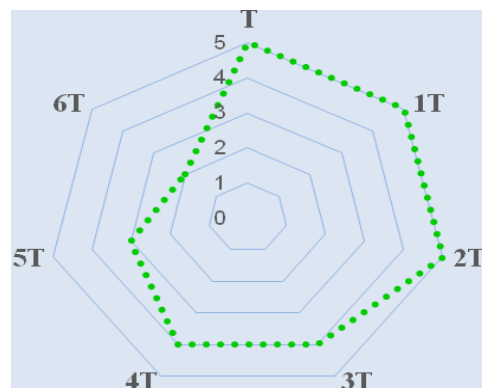


Chart 11 Comparison of the mean of total acceptance index of chocolate treatments at a significant level of 0.05

۴- نتیجه گیری کلی

در این بررسی مشخص شد که شکلات بستر مناسبی برای این باکتری لاکتوباسیلوس کازئی پروبیوتیکی باشد. همچنین نتایج این تحقیق مطابق با تحقیقات انجام شده در گذشته مشخص نمود که انکپسولاسیون تاثیر مثبتی بر زنده ماندن باکتری های پروبیوتیک در شکلات دارد. در این تحقیق، افزودن فیبر شاه بلوط به نمونه های شکلات باعث افزایش فنل کل، رطوبت، سختی، اسیدیته و افزایش ویژگیهای ارگانولپتیک گردید.

۵- منابع

- [1] Sendra, E., Fayos, P., Yolanda Lario, Y., Fernández-López, J., Estrella Sayas-Barberá, E., José Angel Pérez-Alvarez, J. (2008). Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bacteria. *Food Microbiology*, **25**(1): p. 13-21.
- [2] Reid G. The Scientific Basis for Probiotic Strains of *Lactobacillus*. (1999) *Journal Applied Environmental Microbiology* 1; 65(9): 3763-6.
- [3] Krasaekoopt, W. and K. Kitsawad, (2010). Sensory characteristics and consumer acceptance of fruit juice containing probiotics beads in Thailand. *AU Journal of Technology*, 14(1): p. 33-38.
- [4] Akbar baglou, Z., S, H, peyghambar doost, R, Nikjoo. (2015). 23rd National Congress on Food Science and Technology, Islamic Azad University of Quchan Branch,
- [5] Nebesny, E., Żyzelewicz, D., Motyl, I., Libudzisz, Z. (2005). Properties of sucrose-free chocolates enriched with viable lactic acid bacteria. *European Food Research and Technology*, 220(3): p. 358-362.

- simulated human gastro-intestinal condition. Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR,
- [20] Naghipour, F., Roshani, Sh.(2018), Investigation of histological, visual and sensory properties of cup cake containing chestnut flour and sodium stearuyl 2-lactilate. Food Science & Technology of Iran, p. 120-111.
- [21] Yildiz, Ö. and I.S. Dogan.(2014).Optimization of gluten-free cake prepared from chestnut flour and transglutaminase: Response surface methodology approach. International Journal of Food Engineering, 10(4): p. 737-746.
- [22] Lončarević, I., Pajin,B., Petrović,J., Nikolić,I., Maravić,N. Ačkar,D.,Šubarić,D., Zarić,D., MiličevićB.<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34641451/> - affiliation-2(2021).White Chocolate with Resistant Starch: Impact on Physical Properties, Dietary Fiber Content and Sensory Characteristics. Molecules, 26(19): p. 5908.
- [16] Shorideh, M., Taslimi, A. , Azizi, M H. ,Mohammadifar, M A.(2011) , The effect of D-tagatosis on the physical, chemical and rheological properties of milk chocolate. . Quarterly Journal of Food Science and Technology, 8: p. 29-113.
- [17] Erdem, Ö., et al.(2014), Development of a novel synbiotic dark chocolate enriched with Bacillus indicus HU36, maltodextrin and lemon fiber: Optimization by response surface methodology. LWT-Food Science and Technology, 56(1): p. 187-193.
- [18] Hasan nezhad, Z., Azadmardi Damirchi, S. , Soti Khiabani, M. , Peyghambaroust, H. , Rasouli Pirouzian, H.(2017) , Production and evaluation of some quality features of chocolate containing linseed powder,. processing and food storage publication, 9(1): p. 23-36.
- [19] Zanjani, M.A.K., Ghiassi Tarzi,B., Sharifan.A., and Mohammadi,N. (2014)., Microencapsulation of probiotics by calcium alginate-gelatinized starch with chitosan coating and evaluation of survival in



Production and formulation of symbiotic dark chocolate based on *Lactobacillus casei* microcapsules and chestnut fiber and evaluation of probiotic survival during storage

Taghizadeh, E.¹, Abdolmaleki, F.^{2*}, Sharifan, A.¹

1. M. Sc. Student of the Department of Food Science & Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Assistant Professor of the Department of Food Science & Technology, Faculty of Industrial and Mechanical Engineering, Qazvin Branch, Islamic Azad University, Qazvin, Iran.
3. Associate Professor of the Department of Food Science & Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

ABSTRACT

In various food industries, including chocolate, the use of fibers has been prevalent in recent years. Considering the known nutritional value of chestnut in this study, after fiber preparation, evaluation tests of phenolic compounds and accumulated tannins content were investigated. The positive effect of Microencapsulation on the tolerance of simulated gastric and intestinal conditions by probiotics has been proved. The results showed that the total phenolic compounds were 184.32, and the amount of accumulated tannins was 5.1 mg/g. Also, microcapsules are spherical and homogeneous with between 100 and 300 μm . There was no agglomeration state between the particles, and it was uniform. The population of bacteria trapped in microcapsules was 7×10^7 colonies per gram. Also, increasing the percentage of microcapsules and chestnut fiber increased the percentage of moisture, hardness, and acidity of chocolate treatments. The *Lactobacillus casei* survival rate was at treatment T3 in the highest possible condition among the research treatments. During storage, the microbial population index decreased. In terms of sensory properties, treatment T6 had less desirability than other treatments.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2022/ 01/ 27

Accepted 2022/ 09/ 21

Keywords:

Chestnut fiber,
Lactobacillus casei,
Probiotic survival,
Microencapsulation.

DOI: 10.22034/FSCT.19.130.23

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.130.3.2

*Corresponding Author E-Mail:
fa.abdolmaleki@gmail.com