

PROBİYOTİK BİTTER ÇİKOLATA ÜRETİMİNDE MİKROENKAPSÜLE *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* KULLANIMI

Zerrin Erginkaya¹, Ezgi Sarıkodak¹, Serya Tülin Özkütük¹,
Gözde Konuray¹, Emel Ünal Turhan^{2*}

¹ Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Adana, Türkiye

² Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Kadirli Uygulamalı Bilimler Yüksekokulu, Gıda Teknolojisi Bölümü,
Kadirli-Osmaniye, Türkiye

Geliş / Received: 12.01.2019; Kabul / Accepted: 03.03.2019; Online baskı / Published online: 10.03.2019

Erginkaya, Z., Sarıkodak, E., Özkütük, S.T., Konuray, G., Ünal-Turhan, E. (2019). Probiyotik bitter çikolata üretiminde mikroenkapsüle *Lactobacillus rhamnosus* kullanımı. *GIDA* (2019) 44 (2): 238-247 doi: 10.15237/gida.GD18050

Erginkaya, Z., Sarıkodak, E., Özkütük, S.T., Konuray, G., Ünal-Turhan, E. (2019). The use of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* in probiotic bitter chocolate production. *GIDA* (2019) 44 (2): 238-247 doi: 10.15237/gida.GD18050

ÖZ

Bu çalışmanın amacı, probiyotik bitter çikolata üretiminde mikroenkapsüle *Lactobacillus rhamnosus* kullanımının farklı sıcaklıklardaki depolama süresince canlı probiyotik hücre sayısı ve duyu özellikleri üzerindeki etkisini araştırmaktır. Çalışmada probiyotik çikolata üretiminde kullanılan *L. rhamnosus* ekstrüzyon tekniği ile mikroenkapsüle edilmiş ve probiyotik çikolatalar 2 farklı sıcaklıkta (4°C ve 25°C) 60 gün boyunca depolanmıştır. Mikroenkapsülasyon işlemi çikolatanın erime sıcaklıklarında probiyotik kültürler dayanım kazandırmıştır. 4°C'de depolamanın canlı hücre sayısını koruma yönünden daha elverişli olduğu tespit edilirken, 25°C'de depolama sonucunda çikolatalardaki probiyotik hücre sayısında ciddi düzeyde düşüş gözlenmiştir. Sonuç olarak bitter çikolata üretiminde mikroenkapsülasyon işlemi ve 4°C'de buzdolabı koşullarında depolama probiyotik hücre dayanımını arttırdığı için önerilmiştir.

Anahtar kelimeler: Çikolata, probiyotik, mikroenkapsülasyon, *L. rhamnosus*

THE USE OF MICROENCAPSULATED *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* IN PROBIOTIC BITTER CHOCOLATE PRODUCTION

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of the use of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* in the production of probiotic bitter chocolate on probiotic viable cell count and sensory properties during storage at different temperatures. *L. rhamnosus* used in the production of probiotic chocolate was microencapsulated by extrusion technique and probiotic chocolate was stored at two different temperature (4°C and 25°C) throughout 60 days. The microencapsulation provided resistance to probiotic cultures at chocolate melting temperatures. While storage at 4°C was found more convenient to protect the survival of probiotic cells, storage at 25°C caused a serious decline in probiotic viability of tested microorganism in chocolates. As a result, microencapsulation technique and storage under refrigerator conditions (at 4°C) has been suggested to ensure the stability of probiotic cells in bitter chocolate production.

Keywords: Chocolate, probiotic, microencapsulation, *L. rhamnosus*

*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ emelunalurhan@gmail.com,

☎ (+90) 328 888 0090

☎ (+90) 328 888 0091

GİRİŞ

Dünya çapında çoğunluğunu probiyotik gıdaların oluşturduğu fonksiyonel ürünlerin tüketimine yönelik bir eğilim söz konusudur ve bu durum gün geçtikçe artmaktadır. Probiyotikler, yeterli miktarlarda alındıklarında insan sağlığı üzerinde yararlı etkileri olan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (FAO/WHO, 2003). Gıdalarda yaygın olarak kullanılan probiyotik bakteriler *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerine ait türlerdir. Bunlardan *L. rhamnosus* ise en sık başvurulan probiyotik bakteri türüdür ve “GRAS” yani tüketimi genellikle güvenli olarak tanımlanmıştır. Bu probiyotik bakterinin sağlık üzerinde bağışıklık sistemini güçlendirme, gastrointestinal enfeksiyonları, diareyi ve gıda kaynaklı bazı alerjileri önleme gibi faydaları vardır (Randazzo vd., 2013; Segers and Lebeer, 2014). Probiyotiklerin sağlığa yararlı etkilerinin görülebilmesi için gıdalarda 10^6 - 10^7 KOB/g veya mL düzeyinde bulunması ve tüketimden sonra gastrointestinal sistemde canlılıklarını devam ettirmesi gerekir (Akan ve Kınık, 2015; Toldam vd., 2016). Bağırsak mikrobiyotasındaki yararlı mikroorganizmaların sayısını arttırmada probiyotik gıda tüketiminin yanı sıra uygulanan diğer bir yaklaşımda prebiyotik maddelerin kullanımıdır. Prebiyotikler, konakçının gastrointestinal kanalında probiyotiklerin gelişimini destekleyen sindirilemeyen gıda maddeleridir (Alegro vd., 2007). Probiyotikler çoğunlukla süt ve süt ürünlerinde kullanılmış ancak son yıllarda fermente sosis, sucuk, meyve suyu, tahıl gevrekleri, çikolata, puding, bebek maması ve mayonez gibi ürünlerde de kullanım potansiyellerinin olduğu bildirilmiş ve dünya çapında yeni probiyotik gıdaların geliştirilmesine önem verilmiştir (Capela vd., 2006; Ceyhan vd., 2012; Fahimdanesh vd., 2012; Anekella vd., 2013; Champagne vd., 2015; Kalkan vd., 2018). Probiyotik gıda ürünleri geliştirilirken probiyotik mikroorganizmanın gıdanın bileşim, üretim ve depolama koşulları gibi stres faktörlerine dayanıklı olması hedeflenmektedir. Probiyotik gıda ürünlerinin geliştirilmesini sınırlayan bu stres faktörlerinin üstesinden gelmek için mikroenkapsülasyon gibi yeni teknolojilere başvurulmuştur (Possemiers vd., 2010). Mikroenkapsülasyon işleminin olumsuz çevre

koşullarına karşı probiyotik bakterilerin canlılığını korumada etkili olduğunu bildiren birçok çalışma mevcuttur (Champagne vd., 2015; Heidebach vd., 2012; Raymond vd., 2015). Mikroenkapsülasyon; katı, sıvı veya gaz halindeki maddelerin kapsül olarak adlandırılan inert bir kabuğun içinde hapsedilerek kontrollü salınımının gerçekleştirildiği bir teknolojidir (Ünal ve Erginkaya, 2010). Probiyotik gıdalarda kullanılan kültürlerin mikroenkapsülasyonunda daha çok ekstrüzyon yönteminden yararlanılmakta ve kaplama materyali olarak aljinat, gellan gum ve jelatin kullanılmaktadır (Malmo vd., 2013). Ancak son yıllarda, probiyotik ve prebiyotikler arasındaki sinerjik etkiler nedeniyle kaplama materyallerine çeşitli prebiyotik katkıların (fruktooligosakkarit, inülin, dirençli nişasta, peptit vb) ilavesi de tercih edilmeye başlanmıştır (Capela vd., 2006; Hernandez vd., 2012; Zanjani vd., 2012).

Gıda endüstrisi; rekabet ortamı içinde sürekli yeni fonksiyonel probiyotik gıdalar geliştirmekte ve pazarda ön plana çıkmaya çalışmaktadır (Kemsawasd vd., 2016). Son yıllarda şekerleme endüstrisinde özellikle de çikolata ve türevi ürünlerde probiyotik kültürlerin potansiyeli üzerinde durulmuş ve uluslararası pazarda Kanada, Belçika, Amerika ve Malezya gibi ülkelerde probiyotik bitter çikolatalar satışa sunulmuştur (Foong vd., 2015; Konar vd., 2016; Güneş vd., 2018). Çikolata, şekerleme ürünleri arasında biyoyararlılığının da bir sonucu olarak çok fazla talep edilen ve yüksek oranda tüketilen bir üründür. Araştırmalar göstermiştir ki çikolata sadece yağ ve şekerin basit bir karışımı değil aynı zamanda epikateşin, kateşin ve prosiyanidin gibi polifenoller ve flavanoidleri içeren bileşimlerinden dolayı biyoaktif özellikleri olan fonksiyonel bir gıda maddesidir ve bu gıda maddesine probiyotik kültür ilavesinin ürünün cezbediciliğini daha da arttıracığı düşünülmektedir (Kemsawasd vd., 2016; Succi vd., 2017). Çikolata; potasyum, magnezyum, bakır ve demir gibi mineral maddelerce de zengindir. Kakaodaki biyoaktif fenolik bileşiklerin yaşlanma karşıtı, oksidatif stresleri düzeltme, kan basıncını düzenleme, antikanserojen, kalp hastalığı ve krizi riskini azaltma gibi sağlık üzerindeki olumlu etkileri, çikolata ve türevi ürünler üzerindeki ilgiyi

arttırmıştır (Possemiers vd., 2010; Mandal vd., 2013; Erdem vd., 2014; Gadhiye vd., 2015). Probiyotiklerin çikolatalara endüstriyel ölçekte ilave edilmesinde ürünün kendi bileşiminden (yüksek şeker içeriği, düşük su aktivitesi, fenolik maddeler vb) ve üretimden (sıcaklık, basınç, depolama vb.) kaynaklanan zorluklarla karşılaşılabilir (Gadhiya vd., 2015). Bitter çikolatalarda mikroenkapsüle probiyotik kültür kullanımının bu zorlukların üstesinden geleceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, mikroenkapsüle *L. rhamnosus* kullanılarak probiyotik bitter çikolata üretimi gerçekleştirilmiş ve depolama koşullarının probiyotik hücre canlılığı ve duyuşal özellikler üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Bu çalışmada kullanılan bitter çikolata Tören Gıda San. ve Tic. A.Ş.'den temin edilmiştir. Çikolatalarda probiyotik kültür olarak *Lactobacillus rhamnosus* (RIUM/ Hollanda) kullanılmıştır. Stok kültürden alınan *L. rhamnosus* MRS (de Man, Rogosa, and Sharpe) broth (Merck, Germany) besiyeri içerisinde 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılarak geliştirilmiş ve diğer işlemler için kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Yöntem

Bu çalışmada mikroenkapsüle ve serbest probiyotik kültür içeren bitter çikolata üretimi (2 paralel ve 3 tekrür) 3 farklı deneme planı ile gerçekleştirilmiştir. Deneme planında mikroenkapsülasyonda kullanılacak kaplama materyalleri kombinasyonunun kurulmasında daha önceki çalışma sonuçlarından elde edilen verilerden yararlanılmıştır. Önceki çalışmalarda, probiyotiklerin sıcaklık dayanımları açısından %3 aljinat ve %1 jelatin'den oluşan kaplama materyalleri ve gastrik koşullara dayanımları açısından ise %3 fruktooligosakkarit (FOS) ve %1 peptit gibi probiyotik katkı ilaveli kaplama materyalleri kullanımı önerilmiştir (Chen vd., 2006; Turhan vd., 2014). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda probiyotik katkılı (%3 aljinat + %1 jelatin + %3 fruktooligosakkarit + %1 peptit) ve probiyotik katkısız (%3 aljinat + %1 jelatin) olmak

üzere iki farklı kaplama materyali ile mikroenkapsülasyon işlemi hedeflenmiştir.

Üretilen çikolatalar 2 farklı sıcaklıkta (4°C ve 25°C) depolanmıştır. Çikolatalarda üretimin hemen ardından 0. gün, 30. gün ve 60. gün olmak üzere 3 farklı aşamada örnekler alınıp *L. rhamnosus* sayımı ve duyuşal analizler gerçekleştirilmiştir.

Probiyotik Kültürlerin Ekstrüzyon Tekniğı ile Mikroenkapsülasyonu

L. rhamnosus'un mikroenkapsülasyonunda ekstrüzyon tekniğinden yararlanılmıştır (Chen vd., 2007). Kullanılan tüm cam malzemeler ve çözeltiler 121°C'de 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir. Kaplama materyali çözeltisi destile su kullanılarak hazırlanmıştır. Çikolatalarda kullanılmak üzere probiyotik kültürü içeren süspansiyon (10⁹ KOB/mL) steril kaplama materyali çözeltisine 1/5 oranında ilave edilmiştir. Probiyotik kültür içeren bu karışım (10⁸ KOB/mL) 0.11 mm'lik iğnesi olan şırınga ile 0.05 M'lık steril CaCl₂ (Merck-Germany) çözeltisi içerisine enjekte edilmiştir. Oluşan kapsüller, yeterli sertliğı kazanmaları amacıyla 30 dakika süre ile çözelti içerisinde bırakılmış ve sonra "whatman# 4 filtre kâğıdı" (Merck) ile süzülerek kullanıma hazır hale gelmiştir.

Probiyotik Bitter Çikolata Üretim Aşamaları

Probiyotik bitter çikolatalar 3 tekerrürlü olarak üretilmiştir. Üretim ile ilgili deneme planı Çizelge 1'de gösterilmiştir.

Probiyotik çikolata üretimi için ambalaj olarak alüminyum folyodan elde edilen kaplar otoklavda steril edilmiştir. Aseptik koşullar altında steril alüminyum folyo kapların içerisine probiyotik kültür ilave edildikten sonra (10⁸ KOB/g veya mL) üzerine su banyosunda (50°C sıcaklıkta) erimekte olan çikolatadan yaklaşık 10 gram ilave edilerek karıştırılmış ve soğumaları için bir müddet oda sıcaklığında bekletilerek yeterli sertliğe ulaşmaları sağlanmıştır. Ardından çikolata ambalajları kapatılarak 4°C'de buzdolabında ve 25°C'de inkübatörde depolamaya bırakılmıştır (Gadhiya vd., 2015).

Çizelge 1. Probiyotik çikolata üretimi deneme planı
Table 1. Trial Plan on Probiotic Chocolate Production

Çikolata <i>Chocolate</i>	Üretim Yöntemi <i>Production Method</i>
A	Serbest probiyotik kültür içeren çikolata <i>Chocolate with free probiotic culture</i>
B	Mikroenkapsüle (%3 aljinat + %1 jelatin) probiyotik kültür içeren çikolata <i>Chocolate with microencapsulated (3% alginate + 1% gelatine) probiotic culture</i>
C	Prebiyotik katkı ilaveli mikroenkapsüle (%1 peptit + %3 FOS + %3 aljinat + %1 jelatin) probiyotik kültür içeren çikolata <i>Chocolate with prebiotic ingredient-adding microencapsulated (1% peptide + 3% FOS + 3% alginate + 1% gelatine) probiotic culture</i>

Probiyotik Çikolatalardaki *L. rhamnosus* Sayısının Belirlenmesi

L. rhamnosus sayımı için, 10 g çikolata 90 mL steril dilüsyon sıvısı ile (%0.85 tuz ve %0.1 pepton içeren) 2 dakika boyunca homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnekten 1 mL alınmış ve dilüsyon sıvısı kullanılarak seyreltilmiştir. Daha sonra 0.1 mL seyreltilmiş örnekler de Man, Rogosa Sharpe (MRS) agar'a (Merck-Germany) yayma ekim yöntemiyle ekilmiş ve 37°C'de anaerobik koşullarda 48 saat inkübasyona bırakılmıştır (Halkman, 2005).

Probiyotik Çikolatalarda Duyusal Analiz

Probiyotik çikolatalarda duyusal analizler 5 kişiden oluşan panelist tarafından gerçekleştirilmiştir. 3 ayrı çikolata örneği daha önceki araştırmacılar tarafından önerilen duyusal özelliklere göre 1-9 puan üzerinden değerlendirilmiştir (Erdem vd., 2014; Toldam vd., 2016; Zaric vd., 2016; Succi vd., 2017). Analizlerde kullanılan form Çizelge 2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2. Probiyotik çikolatalarda duyusal analiz değerlendirme formu
Table 2. The evaluation form for sensorial properties of probiotic chocolate

Duyusal Özellikler <i>Sensory Properties</i>	Tanım <i>Definition</i>	Puan* <i>Point</i>
Görünüş <i>Appearance</i>	-Pürüzsüzlük: Ürün yüzeyinde kum parçacıkları olmaksızın pürüzsüz yüzey <i>Smoothness: Smooth appearance of products surface without lumps of grits</i>	
	-Parlaklık: Ürün yüzeyindeki ışık yansımalarının yoğunluğu (opak görüntünün zıttı) <i>Brightness: Intensity of light reflection in the product, opposite of opaque</i>	
	-Çiçeklenme: Yüzeydeki görünür lipid/şeker kristallerinin beyaz-gri tabakası <i>Bloom: White-gray layer of visible lipid/sugar crystals on the surface</i>	
Aroma <i>Flavour</i>	-Kakao aroması: Kakao tozu aroması (azdan çoğa) <i>Cocoa aroma: The aroma of cocoa powder (from none > very)</i>	
	Off-flavour: İstenmeyen hoş gitmeyen aroma <i>Off-flavor: Unpleasant and unwanted aroma in the product</i>	
Tat <i>Taste</i>	-Kakao tadı: Üründeki kakao tadının yoğunluğu <i>Cocoa taste: The intensity of the taste of cocoa in the product</i>	
	-Tatlılık: Çoğunlukla sükrözle ilişkilendirilen tat kalitesi (azdan çoğa) <i>Sweetness: Taste quality most often associated with sucrose (none > very)</i>	

Çizelge 2. devam

Tekstür (İlk ısırıktaki) <i>Texture (first bite)</i>	-Sertlik: Merkezi kesici dişleri kullanarak kesmek için gereken kuvvet <i>Hardness: The force required to cut using central incisor teeth</i> -Kırılabilirlik: İlk ısırıktaki çikolata parçasının kırılma düzeyi <i>Breakage: The breakage level of the piece of chocolate in first bite</i> -Dayanıklılık: Dil ve damak arasındaki örneği sıkıştırmak için gerekli kuvvet <i>Firmness: Force required to compress sample between tongue and palate</i>
Tekstür (Çiğneme) <i>Texture (Chewing)</i>	-Pürüzsüzlük: Ürünün ağızda eşit ve tutarlı düzeyde sürekli dağılımı <i>Smoothness: Level of even and consistent continuity of the product in mouth</i> -Erime düzeyi: Çiğneme esnasında örneğin yarısının erimesi için istenen süre (yavaştan hızlıya) <i>Melting rate: Time required to melt half of the sample while chewing (slow > fast)</i> -Yapışkanlık: Azı dişine yapışma düzeyi <i>Adherence: Level of stickiness to molar teeth</i> -Yayıma: Ağız yüzeyini kaplama düzeyi <i>Spreadiness: Level of covering the surface of the mouth</i> -Ağız kaplama: Ağız yüzeyini kaplayan film hissi <i>Mouth coating: The after-feel film which covers mouth surface</i>
Renk <i>Colour</i>	-Kahverengi renk: Açık kahveden koyu kahveye renk <i>Brown colour: Light brown to dark brown</i>
Genel kabul edilebilirlik <i>Overall Acceptability</i>	-Genel anlamda ürünün kabul edilebilirliği <i>Acceptability of the product in general with all its sensory properties</i>

Puan* (1-9): 9=oldukça iyi, 5=ne iyi ne kötü, 1=oldukça kötü

Point* (1-9): 9=extremely like, 5= neither like nor dislike, 1= extremely dislike

İstatistiksel Analizler

Elde edilen bulgular SPSS 20 paket programı (IBM SPSS Advanced Statistics 20.0-SPSS Inc, ABD) kullanılarak tek yönlü varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuş ve önemli bulunan farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre ($P<0.05$) değerlendirilmiştir (Düzgüneş vd., 1987; Özdamar, 1999).

BULGULAR VE TARTIŞMA

Gıda matrisi, proses koşulları, depolama koşulları ve gastrointestinal sistem gibi faktörler probiyotik mikroorganizmaların canlılıklarını sınırlandıran faktörler olarak bilinir. Mikroenkapsülasyon bu bahsedilen faktörlere karşı probiyotik hücreyi korumada en etkili olan yöntemlerden biri olarak

görülmemektedir (Gadhiya vd., 2015). Bitter çikolatalar sade çikolatalar ile kıyaslandığında yaklaşık 5 kat daha fazla polifenol içeriğine sahiptir ve fenolik maddelerin sağlık üzerindeki olumlu etkilerinden dolayı yararlı ürünlere eğilim gösteren tüketiciler tarafından tercih edilirler. Ancak bu gibi ürünlerde yüksek fenolik madde içeriği probiyotik kültürler üzerinde antimikrobiyel etkiye neden olabilir ve bitter çikolatalarda probiyotik kültürlerin uygulanması zorlaşabilir (Foong vd., 2015). Bu bakımdan bitter çikolata gibi bileşim yönünden probiyotik kültürlerin canlılığını olumsuz etkileyecek ürünlerde mikroenkapsülasyon yöntemine başvurmak faydalı olabilir (Possemiers vd., 2010). Bu çalışmada bitter çikolatalarda mikroenkapsüle

probiyotik kültür kullanımının hücre canlılığı ve duyuşal özellikler üzerindeki etkisi belirlenmiştir.

Depolama süresince probiyotik bitter çikolata örneklerindeki canlı *L. rhamnosus* sayısındaki değişim Çizelge 3'de gösterilmiştir. Sonuçlardan da görüldüğü üzere depolama süresinin ve sıcaklığının canlı hücre konsantrasyonu üzerindeki etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0.05$). 4°C'de buzdolabı koşullarında depolama sırasında 30. günde çikolata örneklerindeki probiyotik hücre sayısında artış gözlenirken, 60. günde ise azalış gözlenmiştir. 25°C'de depolamanın ise hücre konsantrasyonu üzerinde ciddi bir düşüőe neden olduğu görülmüştür. Nitekim, 4°C'deki depolama koşullarının probiyotiklerin canlılıklarını koruması açısından daha elverişli olduğu saptanmıştır. 4°C'de depolama koşullarında probiyotik kültürlerin mikroenkapsülasyonunda kullanılan kaplama materyallerinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi 0. ve 30. günlerde istatistiksel olarak önemli bulunurken 60. günde örnekler arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılığın bulunmadığı belirlenmiştir ($P<0.05$). 25°C'deki koşullarda kaplama materyallerinin etkisi ise hücre canlılığında ciddi bir düşüş gözleendiği için göz ardı edilmiş ve değerlendirmeye alınmaması uygun bulunmuştur. Probiyotik gıdalarda bulunan probiyotik kültürlerin sağlık üzerinde beklenen olumlu etkilerini gösterebilmeleri için canlılıklarını (en az 10^7 KOB/g veya mL düzeyinde) korumaları gerekmektedir. Bu çalışmada 25°C'de depolama koşulları hücre canlılığını olumsuz etkilemiştir. Laktik asit bakterileri 27-30°C gibi mezofilik sıcaklık değerlerinde metabolik aktivitelerine devam edip çeşitli metabolitler üretebilirler. Metabolik aktivitesini devam ettiren mikroorganizma bir süre sonra mikrobiyel gelişme fazlarından ölüm fazına geçip canlılığını önemli düzeyde kaybedebilir. Bu bilgiler ışığında probiyotik gıdaların metabolik aktivitenin görülmeyeceği ya da en az düzeyde görüleceği sıcaklıklarda depolanmasının daha uygun olduğu bildirilmiştir (Dharmasena 2012; Khanafari vd., 2012). Bu bakımdan çalışmamızda 4°C'de depolama koşullarında ise 60. günün sonunda A ve B örneklerindeki probiyotik hücre konsantrasyonunda yaklaşık 1 log KOB/g

düzeyinde, C örneğinde ise yaklaşık 2 log KOB/g düzeyinde düşüş gözlenmiştir. Sonuçlarımızla uyumlu olarak, probiyotik çikolata üretimi ile ilgili yapılan önceki çalışmalarda özellikle 4°C ve 25°C'de depolama karşılaştırıldığında oda sıcaklığında depolamanın hücre sayısında ciddi bir azalışa neden olduğu bildirilmiştir. Nitekim 60 günlük bir depolama periyodu sonunda 4°C'de depolamanın probiyotik canlı hücre sayısında 1-2 log KOB/g düşüőe; 25°C'de depolamanın ise 4-7 log KOB/g düşüőe neden olduğu bildirilmiştir (Mandal vd., 2013; Foong vd., 2015; Kemsawasd vd., 2016). Çikolatalarda kullanılan probiyotik kültürlerin türüne, üretim koşullarına, depolama koşullarına ve çikolata çeşidine göre probiyotik canlı hücre sayısı değişebilmektedir (Khanafari vd., 2012). Çalışmamızda farklı probiyotik kültür ve mikroenkapsülasyon işlemleri uygulaması ile depolama dayanımları geliştirilmeye çalışılmış ancak literatüre benzer sonuçlar bulunmuştur. Bu durum probiyotik çikolatalarda depolama koşulu olarak 4°C'nin oda sıcaklığından daha elverişli olduğunu bir kez daha ortaya koymuştur. Ancak yine de çikolatalarda probiyotik kültürlerin canlılıklarını koruyabilecek 25°C'de depolamaya dirençli farklı probiyotik türler ve proses yöntemlerinin denenmesi önerilmektedir.

Sonuçlarımızdan da görüldüğü üzere mikroenkapsüle probiyotiklerin kullanıldığı çikolatada gerek farklı depolama sıcaklıklarında gerekse depolama sürelerinde canlı hücre sayısı serbest kültür kullanılandan yüksek bulunmuştur. Bu bulgu mikroenkapsülasyon işleminin sıcaklık ve gıda bileşiminden kaynaklanan stres faktörlerine karşı hücre dayanımını arttırdığı bilgisini desteklemiştir (Zanjani vd., 2012, Konar vd., 2016). Bu çalışmada dikkat çeken bir diğer nokta ise depolamanın başlangıcında (sıfırncı günde) serbest kültürlerin kullandığı çikolatada hücre sayısının daha düşük bulunmasıdır. Probiyotik çikolata üretimi sırasında çikolatalara ilave edilen kültür konsantrasyonunun her üç grup çikolatada da aynı olmasına rağmen, serbest kültürlerin ilave edildiği çikolatada daha düşük canlı hücre sayısının bulunması diğer grup çikolatalarda mikroenkapsülasyon işleminin hücreye çikolata eritme sıcaklıklarında direnç kazandırdığı hipotezini desteklemiştir (Ding ve

Shah, 2007). B ve C örneklerinde probiyotik kültürlerin mikroenkapsülasyon ile sıcaklık dayanımları artırılmış böylece yaklaşık 50°C'deki çikolata eritme sıcaklığına direnç gösterilmiştir. A örneğinde ise serbest kültürlerin doğrudan eritme sıcaklığındaki çikolata ile ve çikolatanın kendi bileşiminden kaynaklı stres faktörleri ile karışması sonucu bazı hücreler inaktive olmuş ve hücre sayısında azalma gözlenmiştir. Sonuçlarımızdan da görüldüğü üzere probiyotik katkı kullanımının probiyotik hücre canlılığı üzerindeki etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Benzer

olarak; Patel vd., (2008) probiyotik katkı (inülin) mikroenkapsüle *L. paracasei* ile çikolatalı sufle üretiminde kullanılan probiyotik katkının hücre canlılığı üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Bu sonuçlarla uyumlu olarak başka bir çalışmada çikolatalı mus (krema-köpük) üretiminde probiyotik kültür olarak *L. paracasei* ve probiyotik katkı olarak ise inülin kullanılmıştır. Kullanılan inülinin probiyotik canlılığı ve duyuşal özellikler üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı saptanmıştır (Alegro vd., 2007).

Çizelge 3. Probiyotik bitter çikolata örneklerindeki canlı *L. rhamnosus* sayısı (log KOB/g)

Table 3. The viable cell count of *L. rhamnosus* in probiotic bitter chocolate samples

Örnek Sample	Depolama süresi Storage time			Depolama sıcaklığı Storage Temperature
	0. gün Zero day	30. gün 30 th day	60. gün 60 th day	
A	5.46±0.25 ^{aA}	6.28±0.06 ^{aB}	5.25±0.19 ^{aA}	4°C
	5.46±0.25 ^{aC}	3.66±0.09 ^{dA}	2.83±0.05 ^{eA}	25°C
B	6.13±0.24 ^{bB}	6.48±0.09 ^{aB}	5.64±0.01 ^{aA}	4°C
	6.13±0.24 ^{bB}	2.79±0.45 ^{dA}	1.01±1.42 ^{deA}	25°C
C	7.21±0.04 ^{cB}	7.35±0.25 ^{bB}	5.35±0.16 ^{aA}	4°C
	7.21±0.04 ^{cC}	3.29±0.13 ^{dB}	0.00 ±0.00 ^{dA}	25°C

a,b,c,d,e,f: Aynı sütunda farklı üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır- *Different lowercase letters denote significant differences on the same column (P<0.05)*

A,B,C: Aynı satırda farklı üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır- *Different capital letters denote significant differences on the same line (P<0.05)*

Depolama süresince probiyotik bitter çikolata örneklerinin duyuşal özelliklerindeki değişim ise Çizelge 4'de gösterilmiştir. Sonuçlardan da görüldüğü üzere özelliklerde genel kabul edilebilirlik özellikleri dikkate alındığında örnekler arasında önemli bir farklılığın olmadığı görülmüştür ($P<0.05$). Bu durum mikroenkapsülasyon işleminin duyuşal özellikleri olumsuz etkilemediğini ortaya çıkarmıştır. Depolama sıcaklığının ve depolama süresinin farklı duyuşal özellikler üzerindeki etkisi ise değişkenlik göstermiştir. Bazı duyuşal özellikler üzerindeki etkisi istatistiksel olarak önemli bulunurken bazıları üzerindeki etkisi ise önemsiz bulunmuştur. Bu nedenle duyuşal özellikler ve depolama koşullarının etkisi arasında tam bir

korelasyon kurulamamıştır. 4°C'deki depolama koşullarında çoğunlukla görünüş, aroma, tat, tekstür ve renk özellikleri açısından depolama süresinin etkisi A örneği için önemsiz diğerleri için (B ve C örnekleri) önemli bulunmuştur. Bu durum B ve C örneklerinde çikolatalara ilave edilen probiyotik kapsüllerin depolama süreci ile birlikte duyuşal özellikleri etkilediğini göstermiştir.

Önceki çalışmalarda elde edilen verilere göre mikroenkapsüle kültürlerin kullanıldığı çikolatalar duyuşal değerlendirmeler sonucunda serbest kültür kullanılarak üretilen çikolatalara benzer puanlar almıştır (Kemsawasd vd., 2016). Çikolata türevi ürünlerde mikroenkapsüle probiyotik kültür kullanımının yanı sıra probiyotik katkı

kullanımının da duyuşal özellikleri pek fazla etkilemediğı yapılan araştırmaların birçoğunda vurgulanmıştır (Patel vd., 2008; Mandal vd., 2013). Çalışmamızda örnekler duyuşal olarak

genellikle yakın puanlar almış ve sonuçlarımız literatür bilgilerini desteklemiştir.

Çizelge 4. Probiyotik bitter çikolata örneklerinin duyuşal analiz sonuçları
Table 4. The results of sensorial analysis of probiotic chocolate samples

Örnek Sample	Görünüş Appearance	Aroma Flavour	Tat Taste	Tekstür- ilk ısırıktaki Texture- first bite	Tekstür- çıgneme Texture- chewing	Renk Colour	Genel kabul edilebilirlik Overall acceptability
A0-4°C	8.00 ^{bc}	8.00 ^{bc}	7.60 ^{abc}	7.40 ^{abc}	7.40 ^{ab}	8.60 ^b	7.80 ^{ab}
A0-25°C	8.60 ^c	8.40 ^c	8.20 ^c	8.80 ^c	8.20 ^b	9.00 ^b	8.40 ^b
A30-4°C	8.20 ^{bc}	8.20 ^{bc}	8.00 ^{bc}	8.20 ^{abc}	8.00 ^b	7.00 ^{ab}	8.00 ^{ab}
A30-25°C	6.20 ^{ab}	7.20 ^{abc}	6.80 ^{abc}	7.60 ^{abc}	6.60 ^{ab}	7.60 ^{ab}	6.80 ^{ab}
A60-4°C	6.80 ^{bc}	7.00 ^{abc}	7.20 ^{abc}	7.40 ^{abc}	7.00 ^{ab}	7.20 ^{ab}	8.00 ^{ab}
A60-25°C	7.20 ^{bc}	7.20 ^{abc}	7.20 ^{abc}	7.20 ^{abc}	7.40 ^{ab}	8.10 ^{ab}	7.20 ^{ab}
B0-4°C	6.60 ^{abc}	8.40 ^c	8.20 ^c	7.80 ^{abc}	7.40 ^{ab}	8.20 ^b	8.20 ^{ab}
B0-25°C	8.00 ^{bc}	7.60 ^{abc}	7.40 ^{abc}	8.60 ^{bc}	7.00 ^{ab}	8.80 ^b	8.00 ^{ab}
B30-4°C	7.20 ^{bc}	8.00 ^{bc}	7.60 ^{abc}	7.20 ^{abc}	7.60 ^b	7.60 ^{ab}	7.60 ^{ab}
B30-25°C	6.60 ^{abc}	7.20 ^{abc}	6.60 ^{abc}	6.80 ^{abc}	6.40 ^{ab}	7.40 ^{ab}	7.20 ^{ab}
B60-4°C	4.40 ^a	5.30 ^a	5.50 ^a	5.80 ^a	5.00 ^a	5.60 ^a	6.00 ^a
B60-25°C	6.20 ^{ab}	5.80 ^{ab}	6.20 ^{abc}	6.00 ^{ab}	5.00 ^a	6.80 ^{ab}	6.60 ^{ab}
C0-4°C	6.80 ^{bc}	6.80 ^{abc}	6.20 ^{abc}	7.00 ^{abc}	6.00 ^{ab}	8.00 ^{ab}	6.80 ^{ab}
C0-25°C	6.60 ^{abc}	6.60 ^{abc}	6.80 ^{abc}	8.60 ^{bc}	7.00 ^{ab}	8.80 ^b	7.40 ^{ab}
C30-4°C	6.60 ^{abc}	6.20 ^{abc}	7.40 ^{abc}	7.00 ^{abc}	7.60 ^b	6.60 ^{ab}	7.80 ^{ab}
C30-25°C	6.20 ^{ab}	6.40 ^{abc}	5.80 ^{ab}	6.60 ^{abc}	7.00 ^{ab}	7.60 ^{ab}	6.00 ^a
C60-4°C	6.20 ^{ab}	7.10 ^{abc}	6.90 ^{abc}	7.40 ^{abc}	5.80 ^{ab}	6.60 ^{ab}	7.60 ^{ab}
C60-25°C	7.60 ^{bc}	6.90 ^{abc}	6.70 ^{abc}	7.20 ^{abc}	6.40 ^{ab}	7.00 ^{ab}	6.30 ^{ab}

a,b,c: Aynı sütunda farklı üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır- Different lowercase letters denote significant differences on the same column ($P < 0.05$); 0, 30, 60: depolama süreleri (gün)- storage time (day)

SONUÇ

Biyoyaralılığı yüksek olan ve sıklıkla tüketilen gıda maddelerinden biri olan bitter çikolatada probiyotik kültür kullanımının ürünün fonksiyonel özelliklerini daha da arttıracığı düşünölmüştür. Ancak bitter çikolatada probiyotik kültürlerin canlılığını sınırlandıran bileşim, üretim ve depolama koşulları gibi faktörlerin üstesinden gelmek için mikroenkapsölasyon yöntemi önerilmiştir. Bu çalışmada gerek kaplama materyallerinin, gerekse depolama koşullarının probiyotik hücre canlılığı ve çikolatanın duyuşal özellikleri üzerinde etkili olduğı bulunmuştur. 60 günlük depolama periyodu sonunda canlı hücre sayısında ciddi bir düşüş meydana gelmiştir. Bu durum bitter çikolatalarda uzun depolama periyotlarında

probiyotik kültürlerin canlıklarının korunmasını sağılayacak yeni kaplama materyali kombinasyonlarının veya farklı probiyotik kültürlerin denenmesinin gerekli olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca; probiyotik çikolata üretiminde kullanılan probiyotik kapsöllerin ürünün biyokimyasal ve fiziksel özellikleri üzerindeki etkilerinin de araştırılması gerekmektedir.

TEŐEKKÜR

Bu çalışmada çikolata teminindeki deşeğinden ötürü Arge ve Kalite Müdürü Selçuk Arslan'a ve Tören Gıda San. ve Tic. A.Ő'ye teőekkür ederiz.

KAYNAKLAR

Alegro, L., Alegro, J., Cardarelli, H., Chiu ,M., Saad, S. (2007). Potentially probiotic and synbiotic

- chocolate mousse. *LWT-Food Sci Technol*, 40: 669-675.
- Akan, E., Kınık, Ö. (2015). Gıda üretimi ve depolanması sırasında probiyotiklerin canlılıklarını etkileyen faktörler. *CBÜ Fen Bil Dergi*, 11(2): 155-166.
- Anakella, K., Orsat, V. (2013). Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. *LWT- Food Sci Technol*, 50, 17-24.
- Ceyhan, N., Alıç H. (2012). Bağırsak mikroflorası ve probiyotikler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 5 (1): 107-113.
- Champagne, C., Raymond, Y., Guertin, N., Belanger, G. (2015). Effects of storage conditions, microencapsulation and inclusion in chocolate particles on the stability of probiotic bacteria in ice cream. *Int Dairy J*, 47: 109-117.
- Chen, M., Chen, K., Kuo, Y. (2007). Optimal thermotolerance of *Bifidobacterium bifidum* in gellan-alginate microparticles. *Biotechnol Bioeng*, 98 (2): 411-419.
- Capela, P., Hay, T.K.C., Shah, N.P. (2006). Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Res Int*, 39, 203-211.
- Chen, K.N., Chen, M.J., Lin, C.W. (2006). Optimum combination of the encapsulating materials for probiotic microcapsules and its experimental verification (R1). *J Food Eng*, 76, 313-320.
- Dharmasena, M.P. (2012). Assessment of viability of probiotic bacteria in non dairy food matrices under refrigeration storage. Master Thesis, Food, Nutrition, and Culinary Sciences, Clemson University, 91p.
- Ding, W.K., Shah, N.P., 2008. Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. *IFRJ*, 15 (2): 219-232.
- Düzgüneş, O., Kesici, T., Kavuncu, O. ve Gürbüz, F. (1987). *Araştırma ve Deneme Metotları (İstatistik Metotları 2)*. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları. Ankara, Türkiye, 381s.
- Erdem, Ö., Özgüven, M.G., Berktaş, I., Erşan, S., Tuna, H.E., Karadağ, A., Özçelik, B., Güneş, G., Cutting, S.M. (2014). Development of a novel synbiotic dark chocolate enriched with *Bacillus indicus* HU36, maltodextrin and lemon fiber: Optimization by response surface methodology. *LWT - Food Sci Technol*, 56: 187-193.
- Fahimdanesh M., Mohammadi N., Ahari H., Zanjani M.A.K., Hargalani F.Z., Behrouznasab K. (2012). Effect of microencapsulation plus resistant starch on survival of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium bifidum* in mayonnaise sauce. *Afr J Microbiol Res*, 6(40): 6853-6858.
- FAO/WHO (2003). Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation, Vol. 85., Rome-Italy.
- Foong Y.J., Lee S.T., Ramlı N., Tan Y.N., Ayob M.K. (2015). Incorporation of potential prebiotic lactobacillus plantarum isolated from fermented cacao beans into dark chocolate: bacterial viability and physicochemical properties analysis. *J Food Quality*, 36: 164-171.
- Gadhiya, D., Patel, A., Prajapati, J. (2015). Current trend and future prospective of functional probiotic milk chocolates and related products. *Czech J Food Sci*, 33(4): 295-301.
- Güneş, R., Palabıyık, İ, Kurultay, Ş. (2018). Şekerleme teknolojisinde fonksiyonel ürün üretimi. *Gıda*, 43(6): 984-1001.
- Halkman, K. (2005) *Merkel Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları*. Başak Matbaacılık Limited Şti., Ankara, Türkiye, 358s.
- Heidebach, T., Först, P., Kulozik, U. (2012). Microencapsulation of probiotic cells for food applications. *Crit Rev Food Sci*, 52: 291-311.
- Hernandez, O.H., Muthaiyan, A., Moreno, F.J., Montilla, A., Sanz, M., Ricke, S.C. (2012). Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of *Lactobacillus*. *Food Microbiol*, 30, 355-361.
- Kalkan, S., Öztürk, D., Selimoğlu, B.S. (2018) Determining some of the quality characteristics of probiotic yogurts manufactured by using microencapsulated *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. *Turk J Vet Anim Sci*, 42:617-623.

- 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.
- Khanafari, A., Porgham, S.H., Ebrahimi, M.T. (2012). Investigation of probiotic chocolate effect on *Streptococcus mutans* growth inhibition. *Jundishapur J Microbiol* 5(4): 590-597.
- Konar, N., Toker, O.S., Oba, S., Sagdic, O. (2016). Improving functionality of chocolate: a review on probiotic, prebiotic, and/or synbiotic characteristics. *Trends Food Sci Tech*, 49: 35-44
- Malmo, C., Storia, A.L., Mauriello, G. (2013). Microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* DSM17938 cells coated in alginate beads with chitosan by spray drying to use as a probiotic cell in a chocolate soufflé. *Food Bioprocess Technol*, 6: 795-805.
- Mandal S., Hati S., Puniya A.K., Singh R., Singh K., (2013). Development of synbiotic milk chocolate using encapsulated *Lactobacillus casei* NCDC 298. *J Food Process Pres*, 37: 1031-1037.
- Özdamar, K. (1999). *Paket Programlar ile İstatistiksel Veri Analizi*. Kaan Kitabevi, Eskişehir, Türkiye, 535s.
- Possemiers, S., Marzorati M., Verstraete W., Van De Wiele T., 2010. Bacteria and chocolate: a successful combination for probiotic delivery. *Int J Food Microbiol*, 141(1-2): 97-103.
- Patel, P., Parekh, T., Subhash, R. (2008). Development of probiotic and synbiotic chocolate mousse: a functional food. *Biotechnology*, 7(4): 769-774.
- Randazzo, C.L., Pitino, I., Licciardello, F., Muratore, G., Caggia, C. (2013). Survival of *Lactobacillus rhamnosus* probiotic strains in peach jam during storage at different temperatures. *Food Sci Technol Campinas*, 33(4): 652-659.
- Raymond, Y., Champagne, C.P. (2015). The Use of flow cytometry to accurately ascertain total and viable counts of *Lactobacillus rhamnosus* in chocolate. *Food Microbiol*, 46: 176-183.
- Segers, M.E., Lebeer, S. (2014). Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG - host interactions. *Microb Cell Fact*, 13(1):1-7.
- Succi, M., Tremonte, P., Pannella, G., Tipaldi, L., Cozzolino, A., Coppola, R., Sorrentino, E. (2017). Survival of commercial probiotic strains in dark chocolate with high cocoa and phenols content during the storage and in a static in vitro digestion model. *J Funct Food*, 35: 60-67.
- Toldam, K.S., Larsen, S.K., Saaby, L., Olsen, L.R., Sivenstrub, G., Mullertz, A., Knochel, S., Heimdal, H., Nielsen, D.S., Zielinska, D. (2016). Survival of *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Bifidobacterium lactis* HN019 encapsulated in chocolate during in vitro simulated passage of the upper gastrointestinal tract. *LWT-Food Sci Technol*, 74: 404-410.
- Ünal Turhan, E., Erginkaya, Z., Polat, S., Özer, E.A. (2014). Design of probiotic dry fermented sausage (sucuk) production with microencapsulated and free cells of *Lactobacillus rhamnosus*. *Turk J Vet Anim Sci*, 41: 598-603.
- Ünal, E., Erginkaya Z. (2010). Probiyotik mikroorganizmaların mikrokapsülasyonu. *Food (Gıda)*, 35(4): 297-304.
- Zanjani, M.A.K., Tarzi, B.G., Sharifan, A., Mohammadi, N., Bakhoda, H., Madanipour, M.M. (2012). Microencapsulation of *Lactobacillus casei* with calcium alginate-resistant starch and evaluation of survival and sensory properties in cream-filled cake. *Afr J Microbiol Res*, 6 (26): 5511-5517.
- Zaric D.B., Bulatovic M.L., Rakin M.B., Kronic T.Z., Loncarevic I.S., Pajin B.S. (2016). Functional, rheological and sensory properties of probiotic milk chocolate produced in a ball mill. *RSC*, 6: 13934-13941.