

УДК 663.918:641.1:663.1

Разработка технологии обогащенного напитка с синбиотическими свойствами на базе отходов производства какао тертого

- ¹ Московский государственный университет пищевых производств, г. Москва, Российская Федерация
- ² ООО «Микробные нутриенты иммунокорректоры», г. Москва, Российская Федерация

М. С. Каночкина^{1,2}, И. Р. Соколов¹**КОРРЕСПОНДЕНЦИЯ:****Каночкина Мария Сергеевна**

Адрес: 125080, г. Москва,

Волоколамское ш., д.11

E-mail: kanoch@yandex.ru

ЗАЯВЛЕНИЕ О ДОСТУПНОСТИ ДАННЫХ:

данные текущего исследования

доступны по запросу

у корреспондирующего автора.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ:

Каночкина, М. С., & Соколов, И. Р. (2022).

Разработка технологии обогащенного напитка с синбиотическими свойствами на базе отходов производства какао тертого. *Хранение и переработка сельхозсырья*, (4), 152–163.<https://doi.org/10.36107/spfp.2022.332>**ПОСТУПИЛА:** 19.09.2022**ПРИНЯТА:** 03.10.2022**ОПУБЛИКОВАНА:** 14.10.2022**КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ:**

авторы сообщают об отсутствии

конфликта интересов.

**АННОТАЦИЯ**

Введение. В статье рассматриваются возможности функционального питания в условиях распространения коронавирусной инфекции и соответствующих последствий в виде нарушения нормального состава микрофлоры кишечника. При этом в Российской Федерации почти не используется такой отход производства какао тертого, как какао велла, богатая микроэлементами и обладающая противовоспалительной, антиканцерогенной и биофункциональной активностью.

Цель. Целью исследования поставлена разработка технологии изготовления обогащенного напитка с синбиотическими свойствами на базе отходов производства какао-тертого.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования использованы штаммы молочнокислых бактерий и комплексные культуры, а также дрожжевые культуры. С целью разработки экспериментальной модели технологии проведен скрининг пробиотических штаммов микроорганизмов различных родов, способных расти на какаовелле, включая комплексы микроорганизмов, образующие сложные биологические системы – биопленки. Далее изучено влияние предварительной обработки используемого сырья и наличия добавок в среде на рост пробиотических микроорганизмов и в соответствии с полученными данными разработана экспериментальная модель технологии получения обогащенного напитка с синбиотическими свойствами.

Результаты. Впервые продемонстрирована возможность активного роста на какаовелле молочнокислых бактерий родов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* и *Streptococcus* при глубинном культивировании и дрожжей рода *Pichia*, *Saccharomyces* при твердофазном культивировании. Наилучшие результаты роста достигнуты при использовании в технологии двухфазной последовательной ферментации дрожжами *Pichia guilliermondii* 2507 и комплексом пробиотических микроорганизмов ОМ-Х, Dr. Ohhira – 3×10^{10} КОЕ/мл напитка. Показано использование минимальных фракций порошка какаовеллы, размерами 5–10 мкм и отдельной стерилизации твердофазного сырья и жидкого компонента (молочная сыворотка) сырья ввиду сильной степени набухания какаовеллы.

Выводы. С учетом технологических особенностей процесса разработана экспериментальная модель технологии обогащенного напитка, позволяющая получить продукты с высоким содержанием пробиотических микроорганизмов на уровне 1×10^{10} КОЕ/мл на базе ранее не используемого для этих целей отхода производства какао тертого. Практическое применение разработанной технологии позволит выпустить на рынок функциональный продукт с добавленными свойствами и высоким содержанием кальция и магния, нацеленный на профилактику и восстановление после перенесенной коронавирусной инфекции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

пищевая биотехнология, пробиотик, синбиотик, дрожжи, *Saccharomyces boulardii*, *Pichia*, твердофазная ферментация, молочнокислые бактерии, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, вторичное сырье, какао, шоколад, обогащенный напиток, функциональный напиток, молочная сыворотка

Development of Technology for an Enriched Drink with Synbiotic Properties Based on Waste from the Production of Grated Cocoa

¹ Moscow State University of Food Production, Moscow, Russian Federation

² LLC "Microbial Nutrients, Moscow, Russian Federation Immunocorrectors"

Maria S. Kanochkina^{1,2}, Ilya R. Sokolov¹

CORRESPONDENCE:

Maria S. Kanochkina
11, Volokolamskoe sh., Moscow,
125080, Russian Federation
E-mail:kanoch@yandex.ru

FOR CITATIONS:

Kanochkina, M. S., & Sokolov, I. R. (2022). Development of technology for an enriched drink with synbiotic properties based on waste from the production of grated cocoa. *Storage and Processing of Farm Products*, (4), 152–163. <https://doi.org/10.36107/spfp.2022.332>

RECEIVED: 17.06.2022

ACCEPTED: 03.10.2022

PUBLISHED: 14.10.2022

DECLARATION OF COMPETING

INTEREST: none declared.



ABSTRACT

Background. The article discusses the possibilities of functional nutrition in the conditions of the spread of coronavirus infection and the corresponding consequences in the form of a violation of the normal composition of the intestinal microflora. At the same time, in the Russian Federation, such waste from the production of grated cocoa as cocoa vella, rich in trace elements and possessing anti-inflammatory, anti-carcinogenic and biofunctional activity, is almost not used.

Purpose. The aim of the study is to develop a technology for the production of an enriched drink with synbiotic properties based on the waste of cocoa production.

Materials and Methods. Strains of lactic acid bacteria and complex cultures, as well as yeast cultures, were used as objects of research. In order to develop an experimental model of the technology, screening of probiotic strains of microorganisms of various genera capable of growing on cacaovella, including complexes of microorganisms forming complex biological systems – biofilms, was carried out. Further, the effect of pretreatment of the raw materials used and the presence of additives in the medium on the growth of probiotic microorganisms was studied and, in accordance with the data obtained, an experimental model of the technology for producing an enriched drink with synbiotic properties was developed.

Results. The possibility of active growth of lactic acid bacteria of the genera *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* and *Streptococcus* in deep cultivation and yeast of the genus *Pichia*, *Saccharomyces* in solid-phase cultivation was demonstrated for the first time. The best growth results were achieved when using two-phase sequential fermentation technology with *Pichia guilliermondii* 2507 yeast and a complex of probiotic microorganisms OM-X, Dr. Ohhira – 3×10^{10} CFU/ml of the drink. The use of minimal fractions of cocoa shell powder, 5–10 microns in size, and separate sterilization of solid-phase raw materials and the liquid component (whey) of raw materials due to the strong degree of swelling of cocoa shell is shown.

Conclusion. Taking into account the technological features of the process, an experimental model of the enriched beverage technology has been developed, which makes it possible to obtain products with a high content of probiotic microorganisms at the level of 1×10^{10} CFU/ml on the basis of previously unused cocoa production waste for these purposes. The practical application of the developed technology will make it possible to launch a functional product with added properties and a high content of calcium and magnesium, aimed at prevention and recovery after a coronavirus infection.

KEYWORDS

food biotechnology, probiotic, synbiotic, yeast, *Saccharomyces boulardii*, *Pichia*, solid-phase fermentation, lactic acid bacteria, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, secondary raw materials, cocoa, chocolate, enriched drink, functional drink, whey

ВВЕДЕНИЕ

Коронавирусное заболевание (COVID-19), характеризующееся симптомами респираторного тракта с разной степенью поражения важных органов и тканей, обычно проявляется лихорадкой, однако почти у 50 % пациентов также наблюдаются сопутствующие пищеварительные симптомы, которые варьируются от болей в животе до диареи и расстройства желудка (Qureshi H., 2020; Wang et al, 2021; Postigo-Martin P. et al, 2021; Fan & Pedersen, 2021). Кроме того, отмечается существенное вымывание микроэлементов, таких как магний и калий, из организма (Micke et al., 2020; Li et al., 2012). Последние исследования (Citu et al, 2022; Tian et al, 2022) сделали акцент на рекомендациях по нутритивной поддержке пациентов с COVID-19. Растущее количество данных (Tang et al, 2020; DiNicolantonio & O’Keefe, 2021; Sheu et al, 2002) подтверждает, что добавки магния предотвращают или лечат различные типы расстройств или заболеваний, связанных с дыхательной системой, репродуктивной системой, нервной системой, пищеварительной системой и сердечно-сосудистой системой, а также повреждением почек, диабетом. В этой связи разработка технологий пищевых продуктов, содержащих пре- и пробиотические компоненты, способствующие росту полезной индигенной микрофлоры кишечника, магний, калий, актуальна и востребована, как в фазе заболевания, так и при длительном реабилитационном периоде.

Перспективным сырьем для получения органических продуктов, обогащенных указанными микроэлементами и белком, а также пребиотической составляющей, является какаовелла — отход производства какао тертого, состоящий из оболочки проферментированных какао бобов. Побочный продукт производства какао обладает ароматическими характеристиками, пищевой ценностью, а также биофункциональным потенциалом, также сообщается антибактериальной, противовирусной, антиканцерогенной, антидиабетической активности и пользе для сердечно-сосудистой системы (González et al., 2018; Battegazzore et al., 2014; Rojo-Poveda et al., 2019; Martín-Cabrejas et al., 1994; Kowalska et al., 2017; Pérez et al., 2015; Martínez et al., 2012; Nsor-Atindana et al., 2012; Santana et al., 2018). Химический состав и пищевая ценность сырья представлены в Таблице 1. Важно отметить, что в 100 г какаовеллы содержится более чем суточная норма потребления калия и магния для взрослого населения. Введение биопродуктов на базе какаовеллы в рацион питания современного человека способно удовлетворить потребности в калии, магнии, пищевых волокнах, витаминах и белке.

Кроме того, биопродукты на базе какаовеллы содержат различные биологически активные соединения, оказывающие положительный эффект на организм. Проведены исследования (Quijano-Avilés et al., 2021; Paladines-Santacruz et al., 2021) по определению влияния добавления какаовеллы на профиль метаболитов и оценке безвредности, острой пероральной токсичности полученного

Таблица 1
Химический состав и пищевая ценность какаовеллы

Вид сырья	Содержание веществ в % на 100 г						
	Белки	Жиры	Углеводы	Вода	Зола	Пищевые волокна	Органические кислоты
Какаовелла	15	4,5	11	6,5	5,4	56,8	0,8
	Содержание витаминов, микро- и макроэлементов в мг на 100 г						
	Калий (K)	Витамин E	Железо	Витамин B ₂	Фосфор (P)	Магний (Mg)	Витамин PP
	2875	1,8	5,8	0,16	770	701	4,9
% от суточной нормы потребления	115	12	32	9	96,3	175,3	24,5

Примечание. Из «Химический состав российских пищевых продуктов: Справочник», И. М. Скурихин и В. А. Тутельян (Ред.), 2002, М., ДелиПринт. Copyright 2002 by ДелиПринт.

функционального напитка на экспериментальных мышах. Установлено, что после однократного перорального приема дозы 2000 мг/кг массы тела признаков неблагоприятной токсичности, смертности и гистопатологических изменений в основных оцениваемых органах не наблюдалось. При этом добавление шелухи какао повышает содержание в напитках фенольных кислот (кофеиновой, 4-оксибензойной, пирокатехина) и придает антисептические, бактерицидные свойства, характерные для этой группы соединений и представляющие фармакологический интерес. Таким образом подобные функциональные напитки безопасны и могут быть отнесены к категории потенциальных напитков с высокой пищевой и фармакологической ценностью.

Объем какаофеллы, как отходов производства какао тертого, составляет 10–20% от общей массы какао-бобов. Утилизация такого объема затруднена и влечет серьезные финансовые затраты. В исследованиях (Rojo-Poveda et al, 2020) показано несколько целевых вариантов использования шелухи какао бобов для повышения ценности этого побочного продукта в пищевой отрасли, сельском хозяйстве и медицине. Поскольку какаофелла может быть источником питательных веществ и усиливать органолептические свойства получаемых на её базе продуктов, разработка технологии рациональной переработки какаофеллы в рамках экономики замкнутого цикла предприятий становится критически важным по экономическим и экологическим причинам.

Цель научного исследования — разработать технологию изготовления обогащенного напитка с синбиотическими свойствами на базе отходов производства какао-тертого.

Задачи экспериментальной работы:

1. Провести скрининг пробиотических штаммов микроорганизмов, способных расти на отходах производства какао тертого.
2. Изучить влияние предварительной обработки используемого сырья и наличия добавок в среде на рост пробиотических микроорганизмов различных родов.
3. Разработать экспериментальную модель технологии получения обогащенного напитка с синбиотическими свойствами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Научно-исследовательская работа проводилась на базе кафедры «Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза» ФГБОУ ВО «МГУПП» и научно-исследовательской организации ООО «Микробные нутриенты иммунокорректоры».

Материалы

Субстраты. В качестве твердофазного сырья использовали отход производства какао тертого — оболочку бобов какао — какаофеллу, в качестве сырья для глубинного культивирования — подсырную молочную сыворотку, производство ООО «Чистая Линия». Химический состав сырья представлен в Таблице 2.

Таблица 2

Химический состав используемого сырья
(ТУ 10.82.22–001-02806279–2019;
ТУ 10.51.55–017-18153454–2019, 2019)

Вид сырья	Содержание веществ в 100 г				
	Белки, г	Жиры, г	Углеводы, г	Клетчатка, г	Экстрактивные вещества, г
Какаофелла	14,6	3,4	11	17,5	28,2
Молочная сыворотка	2	0,1	4	—	—

Штаммы. В данной работе для твердофазного и глубинного культивирования применяли следующие штаммы микроорганизмов:

- штамм дрожжей *Pichia guilliermondii* 2510 из коллекции кафедры «Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза» ФГБОУ ВО «МГУПП»;
- штамм дрожжей *Pichia guilliermondii* ВКПМ Y-4316 из коллекции ООО «Микробные нутриенты иммунокорректоры»;
- штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (препарат «Энтерол»);
- комплекс пробиотических культур, выделенный из препарата Dr. Ohhira. Комплекс OM-X содержит микроорганизмы *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* и *Streptococcus thermophilus*.
- штаммы *Enterococcus faecium* и *Bifidobacterium longum*, полученные из препарата «Бифиформ»;
- штамм лактобактерий *Lactobacillus acidophilus* № 317/402 (молочнокислая закваска «Нарине»).

Методы

Подготовка субстрата

Для твердофазного культивирования использовали необработанную какао-веллу, а также измельченную до порошка какао-веллу с размерами частиц 5–10 мкм, 25 мкм. Одновременно в качестве добавок использовали глюкозу, солодовые ростки и лузгу подсолнечника.

Приготовление и засев сред для культивирования

Для твердофазного культивирования взвешивали по 10 г какао-веллы в чашки Петри, автоклавировали 40 минут при избыточном давлении 1 атм, охлаждали до комнатной температуры на мраморном столе, после чего проводили засев сред в стерильном боксе. Для засева использовали косяки со скошенным агаром, содержащие культуры дрожжей *Pichia guilliermondii* и *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, смывали культуру с косяка стерильной водой. Влажность сред делали на уровне 60 %, посев производили по всей поверхности среды, посевная доза $1 \cdot 10^7$ КОЕ/г.

Для глубинного культивирования использовали молочную сыворотку, производство ООО «Чистая Линия», ТУ 10.51.55–017–18153454–2019, и порошок какао-веллы, производство ООО «Vento d' Oro», ТУ 10.82.22–001–02806279–2019, в соответствующем процентном содержании к общему объему гетерофазной среды. После взвешивания порошок рассыпался в отдельные стеклянные емкости или добавлялся сразу в колбу с молочной сывороткой. Емкости с какао-веллой и колбы с молочной сывороткой помещались в автоклав для стерилизации на 40 минут при избыточном давлении в 1 атм. После стерилизации, все компоненты сред охлаждали до комнатной температуры. Далее при необходимости в стерильных условиях какао-веллу и молочную сыворотку смешивали и засевали штаммами молочнокислых бактерий *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus* штамм 317/402 и комплексом ОМ-Х Dr. Ohhira $1 \cdot 10^7$ КОЕ/мл.

Выделение чистых культур молочнокислых бактерий и дрожжей из биопрепаратов

Выделение чистых культур микроорганизмов проводили методом высева на плотные питательные

среды и в молоко. Брали навеску биопрепарата и смешивали со стерильным физиологическим раствором, из полученной суспензии проводили высев на чашку Петри с агаризованной средой или в стерильное молоко. Для выделения чистой культуры использовались твердые селективные среды MRS, Saburaud, Энтерококкагар и Бифидум-среда, а также стерильное обезжиренное молоко. Затем чашки и пробирки термостатировали в течение 3-х суток при температуре 37 °С для молочнокислых бактерий и 30 °С для дрожжей до появления гладких белых колоний на поверхности среды. Для подтверждения чистоты колоний полученные культуры микроскопировали.

Культивирование микроорганизмов

Ферментация цельной какао-веллы происходила в растительной камере при температуре 30 в течение 48 ч твердофазным способом с доступом воздуха в течение всего процесса культивирования. Ферментация смеси молочной сыворотки и какао-веллы происходила в течение 72 ч при температуре 37 в растительной камере глубинным способом.

Подсчет клеток. Продуктивность твердофазного и глубинного культивирования исследовали методом предельных разведений. Подсчет осуществляли через 0, 48 и 72 ч после начала ферментации.

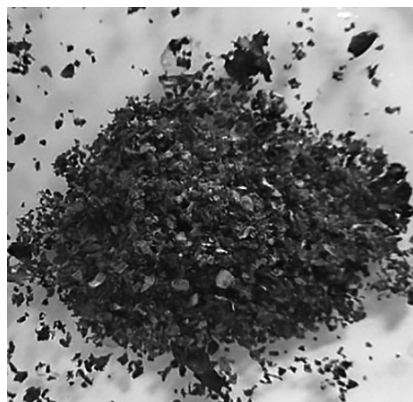
С целью получения достоверных результатов эксперимент проводился в 3-х повторностях с использованием статистических методов анализа экспериментальных данных, включая описательный анализ, построение таблиц, графиков по стандартной методике. Математический анализ экспериментальных данных проводили с помощью программного пакета Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Какао-велла представляет собой достаточно сложное сырье по химическому составу и физическим свойствам. В этой связи было изучено влияние предварительной обработки используемого сырья на технологические показатели получаемых напитков. Наиболее важным фактором в напитках признана величина фракций. В исследованиях

Рисунок 1

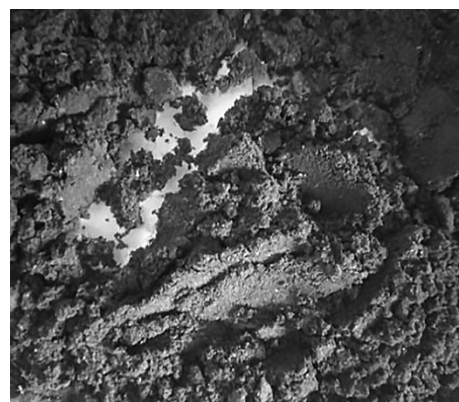
Технологические свойства напитков при использовании разных фракций какао-веллы



А — необработанная какао-велла



Б — молотая какао-велла с фракциями 25 мкм



В — молотая и просеянная какао-велла с фракциями 5–10 мкм

оценивали технологические свойства необработанной какао-веллы, молотой какао-веллы с фракциями 25 мкм, молотой и просеянной какао-веллы с фракциями 5–10 мкм. Результаты представлены на Рисунке 1. Показано использование минимальных фракций порошка какао-веллы, размерами 5–10 мкм при получении напитков.

Также какао-велла обладает высокой степенью набухания. В этой связи опытным путем изучали возможность совместной стерилизации твердофазного сырья и жидкого компонента для напитков при различных концентрациях какао-веллы (2%, 4%, 6%, 8%). Даже в самой низкой концентрации — 2% — какао-велла сильно набухает и снижает технологические показатели напитка. На Рисунке 2 показаны экспериментальные варианты напитка при раздельной и совместной стерилизации твердофазного сырья и жидкого компонента.

Ввиду сильной степени набухания какао-веллы при разработке технологии получения синбиотических напитков показана раздельная стерилизации твердофазного сырья и жидкого компонента.

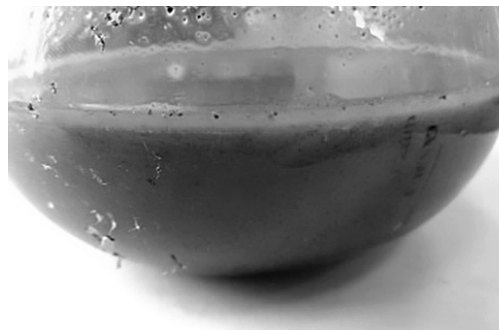
С целью разработки технологии синбиотического напитка был проведен скрининг микроорганизмов, способных активно развиваться и накапливать биомассу на какао-велле. По результатам исследований (Elhalis et al, 2020; Papalexandratou et al, 2013; Schwan & Wheals, 2004; Visintin et al, 2016) основными видами микроорганизмов, обнаруженными при ферментации какао бобов были дрожжи *Hanseniaspora guilliermondii*, *Pichia kudriavzevii* и *Kluyveromyces marxianus*, молочнокислые бактерии *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus fermentum*. В качестве базового вида культур в настоящей работе выступили дрожжи, которые необходимы для естественного процесса ферментации какао бобов. Тестирова-

Рисунок 2

Технологические свойства напитков при разных вариантах стерилизационной обработки сырья



А — напиток при совместной стерилизации (концентрация какао-веллы 2%)



Б — напиток при раздельной стерилизации (концентрация какао-веллы 2%)

ли культуру *Pichia guilliermondii* 2510 из коллекции кафедры «Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза» ФГБОУ ВО «МГУПП», *Pichia guilliermondii* ВКПМ Y-4316 из коллекции ООО «Микробные нутриенты иммунокорректоры» и пробиотический штамм *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. Уровни накопления биомассы дрожжей при твердофазном культивировании на какао-овелле представлены в таблице 3. Необходимо отметить, что штаммы дрожжей *Pichia guilliermondii* показали результаты на порядок больше, чем производственный штамм *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. Эти данные коррелируют с предыдущими исследованиями и подтверждают перспективность использования для ферментации какао-овеллы дрожжей рода *Pichia*.

Для подбора оптимального состава среды для роста дрожжей были проведены исследования влияния целлюлозосодержащих добавок и глюкозы на накопление дрожжевых культур при твердофазном культивировании. По результатам исследований (Голованова & Солдатова, 2017; Солдатова и соавт., 2016) целлюлозосодержащие добавки могут быть дополнительными источниками биологически активных веществ. Данные представлены в Таблице 3. Однако, полученные нами результаты свидетельствуют

о том, что целлюлозосодержащие добавки не стимулируют рост дрожжей на какао-овелле, в то время как добавление 2% глюкозы в среду для культивирования увеличивает выход биомассы в 1,5 раза и достигает значений $3 \cdot 10^{10}$ КОЕ/г при использовании штамма *Pichia guilliermondii* 2510.

Пробиотики и пробиотические закваски, используемые в промышленном производстве, в основном представлены молочнокислыми бактериями. В этой связи исследовали возможность роста таких микроорганизмов, как *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, а также комплекса молочнокислых бактерий, выделенного из препарата Dr. Ohhira и образующего сложные биологические системы — биопленки, в условиях глубинного культивирования при различных концентрациях какао-овеллы в питательной среде. В качестве основы использовали молочную сыворотку. Данные по накоплению биомассы молочнокислых бактерий и влиянию концентрации какао-овеллы на продуктивность микроорганизмов представлены в Таблице 4.

Проведенные исследования показали, что наибольший результат по количеству колониеобра-

Таблица 3

Накопление дрожжей при твердофазном культивировании на какао-овелле и влияние целлюлозосодержащих добавок и глюкозы на рост дрожжевых культур

Штамм дрожжей	Накопление дрожжей на твердой среде, 10^9 КОЕ/г			
	Велла 100 %	Велла 50 % + лузга подсолнечника (молотая) 50 %	Велла 50 % + солодовые ростки 50 %	Велла 98 % + глюкоза 2 %
<i>Pichia sp.</i> 2510	20	10	14	30
<i>Pichia guilliermondii</i> ВКПМ Y-4316	22	10	18	29
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	2	1	1	4

Таблица 4

Накопление молочнокислых бактерий при глубинном культивировании на молочной сыворотке (МС) с добавлением какао-овеллы и влияние концентрации какао-овеллы на продуктивность микроорганизмов

Штамм молочнокислых бактерий	Накопление бактерий, 10^9 КОЕ/мл			
	МС + 2 % какао-овеллы	МС + 4 % какао-овеллы	МС + 6 % какао-овеллы	МС + 8 % какао-овеллы
Комплекс ОМ-Х Dr. Ohhira	15	25	30	26
<i>Enterococcus faecium</i>	6	9	9	8
<i>Bifidobacterium longum</i>	1	4	4	4
<i>Lactobacillus acidophilus</i> № 317/402	2	2	3	2

зующих единиц достигнут при использовании комплекса пробиотических культур OM-X Dr. Ohhira и составил $2,5 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл. Необходимо отметить, что *Bifidobacterium longum*, которые довольно требовательны к условиям культивирования, также характеризовались активным ростом — $4 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл. Концентрация какао-веллы на уровне 6 % оптимальна, однако в связи со специфическими органолептическими свойствами сырья, такое высокое процентное содержание придает горьковатый вкус получаемому синбиотическому напитку. Для дальнейших исследований использовалась концентрация какао-веллы 4 %.

В ряде работ была показана стимулирующая роль дрожжевого компонента на рост молочнокислых бактерий (Каночкина, 2011; Маслова и соавт., 2018; Каночкина, 2012). В этой связи были проведены исследования роста комплекса пробиотических культур OM-X Dr. Ohhira в условиях глубинного культивирования на молочной сыворотке с добавлением 4 % предварительно проферментированной дрожжами *Pichia guilliermondii* 2510 и *Pichia guilliermondii* ВКПМ У-4316 какао-веллы, которые подтвердили результаты предыдущих исследований. Данные по накоплению биомассы молочнокислых бактерий представлены в Таблице 5.

Наилучшие результаты роста достигнуты при использовании в технологии двухфазной последовательной ферментации дрожжами *Pichia guilliermondii* 2507 и комплексом пробиотических микроорганизмов OM-X, Dr. Ohhira — $3 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл напитка. Это объясняется скорее всего метаболической активностью дрожжей в процессе твердофазного культивирования, которая способствует более полной ассимиляции сырья молочнокислыми бактериями на второй (глубинной) стадии ферментации.

Ученые (Van Thi et al, 2014) уже определяли роль дрожжей в ферментации какао и их вклада в качество шоколада. В ферментационную среду добавляли натамицин, рост дрожжей подавлялся, а молочнокислые бактерии *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus fermentum* развивались. При этом отмечали, что бобы, сброженные без дрожжей, были пурпурно-фиолетового цвета, а не полностью коричневыми, а шоколад, приготовленный из этих бобов, не имел характерного шоколадного вкуса и был слишком кислый. Физический и химический

Таблица 5

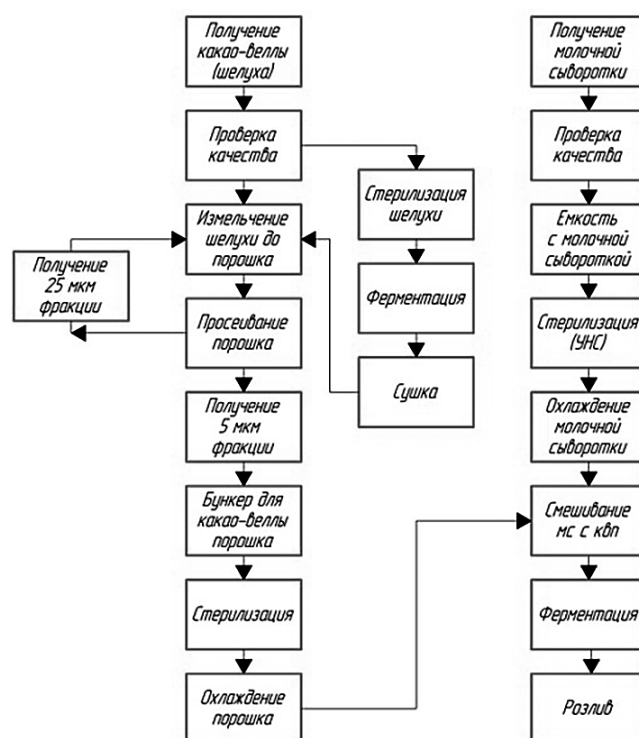
Накопление молочнокислых бактерий при глубинном культивировании на молочной сыворотке (МС) с добавлением какао-веллы

Штамм молочно- кислых бактерий	Накопление бактерий, 10^9 КОЕ/мл		
	МС + 4 % како- веллы	МС + 4 % профер- ментированной дрожжами <i>Pichia</i> <i>guilliermondii</i> 2510 какао-веллы	МС + 4 % профермен- тированной дрожжами <i>Pichia</i> <i>guilliermondii</i> ВКПМ У-4316 какао-веллы
Комплекс OM-X Dr. Ohhira	25	30	28

анализы показали, что бобы, сброженные без дрожжей, имеют повышенное содержание скорлупы, более низкое производство этанола, более высокое содержание спиртов и эфиров в процессе ферментации и меньшее присутствие пирозинов в обжаренном продукте. Это коррелирует с нашими результатами и требует дальнейших исследований

Рисунок 3

Блок-схема технологии получения обогащенного напитка на базе какао-веллы и молочной сыворотки



органолептических и потребительских показателей разрабатываемых синбиотических напитков.

Проанализировав результаты исследований, была разработана экспериментальная модель технологии получения обогащенного напитка на базе какао-овеллы и молочной сыворотки, которая представлена на Рисунке 3.

ВЫВОДЫ

В результате исследований можно сделать вывод о подтверждении идеи использования какао-овеллы как пребиотической добавки при изготовлении биопродуктов и кормов для сельскохозяйственных животных. Проведен скрининг пробиотических штаммов микроорганизмов, показывающий возможность роста на данном сырье наиболее широко применяемых видов пробиотических микроорганизмов: *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. При этом наиболее перспективны для твердофазной ферментации дрожжи рода *Pichia*.

Показано влияние предварительной обработки используемого сырья и наличия глюкозы в среде

на рост пробиотических микроорганизмов. Разработана модель (блок-схема) технологии получения обогащенного напитка на базе какао-овеллы с синбиотическими свойствами.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность Обществу с ограниченной ответственностью «Микробные нутриенты иммунокорректоры» за организационную, информационную поддержку и помощь в проведении исследований.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Каночкина М. С.: концептуализация, методология, формальный анализ, проведение исследования, администрирование данных, создание рукописи и её редактирование, руководство исследованием, администрирование проекта.

Соколов И. Р.: верификация данных, проведение исследования, создание черновика рукописи, визуализация.

ЛИТЕРАТУРА

- Голованова, К. Ю., & Солдатова С. Ю. (2017). Использование биологически активных веществ растений для создания нутрицевтика, нормализующего работу ЖКТ. В День науки: Сборник материалов конференции (ч. 1, с. 63–67). М.: Московский государственный университет пищевых производств.
- Каночкина, М. С. (2011). Выживаемость дрожжей в твердофазных культурах. *Пищевая промышленность*, (6), 44–55.
- Каночкина, М. С. (2012). *Разработка технологии активных полимикробных посевных материалов для производства дрожже-бактериальных функциональных продуктов* [Кандидатская диссертация, Московский государственный университет пищевых производств]. М., Россия.
- Маслова, Т. А., Солдатова, С. Ю., Подольская, Ю. М., Борисенко, Е. Г., & Лаптева, Е. А. (2018). Дрожжевые изоляты для прямой биоконверсии целлюлозосодержащего сырья. В *Биотехнология и продукты биоорганического синтеза: Сборник материалов национальной научно-практической конференции* (с. 227–231). М.: Московский государственный университет пищевых производств.
- Солдатова, С. Ю., Бутова, С. Н., & Голованова, К. Ю. (2016). Разработка рецептуры биологически активной добавки для нормализации работы желудочно-кишечного тракта. *Бюллетень науки и практики*, (5), 27–33. <https://doi.org/10.5281/zenodo.54823>
- Battegazzore, D., Bocchini, S., Alongi, J., & Frache, A. (2014). Plasticizers, antioxidants and reinforcement fillers from hazelnut skin and cocoa by-products: Extraction and use in PLA and PP. *Polymer Degradation and Stability*, 108, 297–306. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2014.03.003>
- Citu, I. M., Citu, C., Margan, M. M., Craina, M., Neamtu, R., Gorun, O. M., Burlea, B., Bratosin, F., Rosca, O., Grigoras, M. L., Motoc, A., Malita, D., Neagoe, O., & Gorun, F. (2022). Calcium, magnesium, and zinc supplementation during pregnancy: The additive value of micronutrients on maternal immune response after SARS-CoV-2 infection. *Nutrients*, 14(7), Article 1445. <https://doi.org/10.3390/nu14071445>

- DiNicolantonio, J., & O'Keefe, J. H. (2021). Magnesium and vitamin D deficiency as a potential cause of immune dysfunction, cytokine storm and disseminated intravascular coagulation in covid-19 patients. *Missouri Medicine*, 118(1), 68–73.
- Elhalis, H., Cox, J., Frank, D., & Zhao, J. (2020). The crucial role of yeasts in the wet fermentation of coffee beans and quality. *International Journal of Food Microbiology*, 333, Article 108796. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108796>
- Fan, Y., & Pedersen, O. (2021). Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 19, 55–71. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0433-9>
- González, J., Pérez, D., Gutiérrez, Y. I., Scull, R., de la C. Salgado, E. G. D., & Monan, M. (2018). Pharmacognostic and physicochemical studies of theobroma cacao bean husk in Cuba. *International Journal of Scientific Journal*, 2(7), 262–267.
- Kowalska, H., Czajkowska, K., Cichowska, J., & Lenart, A. (2017). What's new in biopotential of fruit and vegetable by-products applied in the food processing industry. *Trends in Food Science & Technology*, 67, 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.016>
- Li, F.-Y., Chaigne-Delalande, B., Kanellopoulou, C., Davis, J. C., Matthews, H. F., Douek, D. C., Cohen, J. I., Uzel, G., Su, H. S., & Lenardo, M. J. (2011). Second role for Mg²⁺ revealed by immunodeficiency due to loss of MagT1. *Nature*, 475(7357), 471–476. <https://doi.org/10.1038/nature10246>
- Martín-Cabrejas, M. A., Valiente, C., Esteban, R. M., Mollá, E., & Waldron, K. (1994). Cocoa hull: A potential source of dietary fibre. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 66(3), 307–311. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740660307>
- Martínez, R., Torres, P., Meneses, M., Figueroa, J., Pérez-Álvarez, J., & Viuda-Martos, M. (2012). Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (Theobroma cacao L.) co-products. *Food Research International*, 49(1), 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.005>
- Micke, O., Vormann, J., & Kisters, K. (2020). Magnesium deficiency and COVID-19 — What are the links. *Trace Elements and Electrolytes*, 37, 103–107. <https://doi.org/10.5414/tex01651>
- Nsor-Atindana, J., Zhong, F., Mothibe, K. J., Bangoura, M. L., & Lagnika, C. (2012). Quantification of total polyphenolic content and antimicrobial activity of cocoa (Theobroma cacao L.) Bean Shells. *Pakistan Journal of Nutrition*, 11(7), 672–677. <https://doi.org/10.3923/pjn.2012.672.677>
- Paladines-Santacruz, G., Orellana-Manzano, A., Sarmiento, G., Piloza, G., Iñiga, E., Zaruma-Torres, F., Ortiz-Ulloa, J., Quijano-Aviles, M., di Grumo, D., Orellana-Manzano, S., del Carmen Villacres, M., Manzano, P., & Berghe, W. V. (2021). Acute oral toxicity of a novel functional drink based on Ilex guayusa, vernonanthur patens, and cocoa husk. *Toxicology Reports*, 8, 747–752. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.03.026>
- Papalexandratou, Z., Lefeber, T., Bahrim, B., Seng Lee, O., Daniel, H., de Vuyst, L. (2013). Hanseniaspora opuntiae, saccharomyces cerevisiae, lactobacillus fermentum, and acetobacter pasteurianus predominate during well-formed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa bean fermentation process. *Food Microbiology*, 35(2), 73–85. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.02.015>
- Pérez, E., Méndez, A., León, M., Hernández, G., & Sívoli, L. (2015). Proximal composition and the nutritional and functional properties of cocoa by-products (pods and husks) for their use in the food industry. In *Chocolate cocoa byproducts technology, rheology, styling, and nutrition* (pp. 219–234). New York: Nova Science Publishers.
- Postigo-Martin, P., Cantarero-Villanueva, I., Lista-Paz, A., Castro-Martín, E., Arroyo-Morales, M., & Seco-Calvo, J. (2021). A COVID-19 rehabilitation prospective surveillance model for use by physiotherapists. *Journal of Clinical Medicine*, 10(8), Article 1691. <https://doi.org/10.3390/jcm10081691>
- Quijano-Avilés, M., Chóez-Guaranda, I., Viteri, R., Baragán-Lucas, A., Sosa, D., Manzano, P. (2021). Effect of cocoa bean shell addition on metabolite profile and antioxidant activity of herbal infusions. *International Journal of Food Science*, 2021, Article 9915797. <https://doi.org/10.1155/2021/9915797>
- Qureshi, H. (2020). The digestive system and the COVID-19. *Journal of Pakistan Medical Association*, 70(5), S98-S100. <https://doi.org/10.5455/JPM.19>
- Rojo-Poveda, O., Barbosa-Pereira, L., Zeppa, G., & Stévigny, C. (2020). Cocoa bean shell-a by-product with nutritional properties and biofunctional potential. *Nutrients*, 12(4), Article 1123. <https://doi.org/10.3390/nu12041123>
- Rojo-Poveda, O., Barbosa-Pereira, L., Mateus-Reguengo, L., Bertolino, M., Stévigny, C., & Zeppa, G. (2019) Effects of particle size and extraction methods on cocoa bean shell functional beverage. *Nutrients*, 11(4), Article 867. <https://doi.org/10.3390/nu11040867>
- Santana, D. P., Sanchez, J. L. R., Calle, J., de Villavicencio, M. N., Ortega, L. D., & Llanes, L. H. (2018). Utilización de la cascarilla de cacao como fuente de fibra dietética y antioxidantes en la elaboración de galletas dulces. *Food Science and Technology*, 28, 62–67.
- Schwan, R. F., & Wheals, A. E. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 205–221. <https://doi.org/10.1080/10408690490464104>
- Sheu, J.-R., Hsiao, G., Shen, M.-Y., Fong, T.-H., Lin, C.-H., & Chou, D.-S. (2002). Mechanisms involved in the antiplatelet activity of magnesium in human platelets. *British Journal of Haematology*, 119(4), 1033–1041. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2002.03967.x>
- Tang, C., Ding, H., Jiao, R., Wu, X., & Kong, L. (2020). Possibility of magnesium supplementation for supportive treatment in patients with COVID-19. *European Journal of Pharmacology*, 886, Article 173546. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173546>
- Tian, J., Tang, L., Liu, X., Li, Y., Chen, J., Huang, W., & Liu, M. (2022). Populations in low-magnesium areas were associated with higher risk of infection in COVID-19's early transmission: A nationwide retrospective cohort study

- in the United States. *Nutrients*, 14(4), Article 909. <https://doi.org/10.3390/nu14040909>
- Van Thi, T. H., Zhao, J., & Fleet, G. (2014). Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 174, 72–87. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.014>
- Visintin, S., Alessandria, V., Valente, A., Dolci, P., & Cocolin, L. (2015). Molecular identification and physiological characterization of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria isolated from heap and box cocoa bean fermentations in West Africa. *International Journal of Food Microbiology*, 216, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.004>
- Wang, M. K., Yue, H. Y., Cai, J., Zhai, Y. J., Peng, J. H., Hui, J. F., Hou, D. Y., Li, W. P., & Yang, J. S. (2021). COVID-19 and the digestive system: A comprehensive review. *World Journal of Clinical Cases*, 9(16), 3796–3813. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v9.i16.3796>
- ## REFERENCES
- Golovanova, K. Yu., & Soldatova S. Yu. (2017). Ispol'zovanie biologicheskii aktivnykh veshchestv rastenii dlya sozdaniya nutritsevtika, normalizuyushchego rabotu ZhKT [The use of biologically active substances of plants to create a nutraceutical that normalizes the work of the gastrointestinal tract]. In *Den' nauki: Sbornik materialov konferentsii [Science Day: Collection of conference materials]* (vol. 1, pp. 63–67). Moscow: Moskovskii gosudarstvennyi universitet pishchevykh proizvodstv.
- Kanochkina, M. S. (2011). Vyzhivaemost' drozhzhei v tverdo-faznykh kul'turakh [Yeast survival in solid-phase cultures]. *Pishhevaya promyshlennost' [Food Industry]*, (6), 44–55.
- Kanochkina, M. S. (2012). *Razrabotka tekhnologii aktivnykh polimikrobnnykh posevnykh materialov dlya proizvodstva drozhzhe-bakterial'nykh funktsional'nykh produktov [Development of technology of active polymicrobial seed materials for the production of yeast-bacterial functional products]* [Candidate Dissertation, Moskovskii gosudarstvennyi universitet pishchevykh proizvodstv]. Moscow, Rossiya.
- Maslova, T. A., Soldatova, S. Yu., Podol'skaya, Yu. M., Borisenko, E. G., & Lapteva, E. A. (2018). Drozhzhevye izolyaty dlya pryamoi biokonversii tsellyulozosoderzhashchego syr'ya [Yeast isolates for direct bioconversion of cellulose-containing raw materials]. In *Biotehnologiya i produkty bioorganicheskogo sinteza: Sbornik materialov natsional'noi nauchno-prakticheskoi konferentsii [Biotechnology and bioorganic synthesis products: Collection of materials of the National Scientific and Practical Conference]* (pp. 227–231). Moscow: Moskovskii gosudarstvennyi universitet pishchevykh proizvodstv.
- Soldatova, S. Yu., Butova, S. N., & Golovanova, K. Yu. (2016). Razrabotka retseptury biologicheskii aktivnoi dobavki dlya normalizatsii raboty zheludochno-kishechnogo trakta [Development of a formulation of a biologically active additive for normalization of the gastrointestinal tract]. *Byulleten' nauki i praktiki [Bulletin of Science and Practice]*, (5), 27–33. <https://doi.org/10.5281/zenodo.54823>
- Battegazzore, D., Bocchini, S., Alongi, J., & Frache, A. (2014). Plasticizers, antioxidants and reinforcement fillers from hazelnut skin and cocoa by-products: Extraction and use in PLA and PP. *Polymer Degradation and Stability*, 108, 297–306. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2014.03.003>
- Citu, I. M., Citu, C., Margan, M. M., Craina, M., Neamtu, R., Gorun, O. M., Burlea, B., Bratosin, F., Rosca, O., Grigoras, M. L., Motoc, A., Malita, D., Neagoe, O., & Gorun, F. (2022). Calcium, magnesium, and zinc supplementation during pregnancy: The additive value of micronutrients on maternal immune response after SARS-CoV-2 infection. *Nutrients*, 14(7), Article 1445. <https://doi.org/10.3390/nu14071445>
- DiNicolantonio, J., & O'Keefe, J. H. (2021). Magnesium and vitamin D deficiency as a potential cause of immune dysfunction, cytokine storm and disseminated intravascular coagulation in covid-19 patients. *Missouri Medicine*, 118(1), 68–73.
- Elhalis, H., Cox, J., Frank, D., & Zhao, J. (2020). The crucial role of yeasts in the wet fermentation of coffee beans and quality. *International Journal of Food Microbiology*, 333, Article 108796. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108796>
- Fan, Y., & Pedersen, O. (2021). Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 19, 55–71. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0433-9>
- González, J., Pérez, D., Gutiérrez, Y. I., Scull, R., de la C. Salgado, E. G. D., & Monan, M. (2018). Pharmacognostic and physicochemical studies of theobroma cacao bean husk in Cuba. *International Journal of Scientific Journal*, 2(7), 262–267.
- Kowalska, H., Czajkowska, K., Cichowska, J., & Lenart, A. (2017). What's new in biopotential of fruit and vegetable by-products applied in the food processing industry. *Trends in Food Science & Technology*, 67, 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.016>
- Li, F.-Y., Chaigne-Delalande, B., Kanellopoulou, C., Davis, J. C., Matthews, H. F., Douek, D. C., Cohen, J. I., Uzel, G., Su, H. S., & Lenardo, M. J. (2011). Second role for Mg²⁺ revealed by immunodeficiency due to loss of MagT1. *Nature*, 475(7357), 471–476. <https://doi.org/10.1038/nature10246>
- Martín-Cabrejas, M. A., Valiente, C., Esteban, R. M., Mollá, E., & Waldron, K. (1994). Cocoa hull: A potential source of dietary fibre. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 66(3), 307–311. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740660307>
- Martínez, R., Torres, P., Meneses, M., Figueroa, J., Pérez-Álvarez, J., & Viuda-Martos, M. (2012). Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (Theobroma

- cacao L.) co-products. *Food Research International*, 49(1), 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.005>
- Micke, O., Vormann, J., & Kisters, K. (2020). Magnesium deficiency and COVID-19 — What are the links. *Trace Elements and Electrolytes*, 37, 103–107. <https://doi.org/10.5414/tex01651>
- Nsor-Atindana, J., Zhong, F., Mothibe, K. J., Bangoura, M. L., & Lagnika, C. (2012). Quantification of total polyphenolic content and antimicrobial activity of cocoa (Theobroma cacao L.) Bean Shells. *Pakistan Journal of Nutrition*, 11(7), 672–677. <https://doi.org/10.3923/pjn.2012.672.677>
- Paladines-Santacruz, G., Orellana-Manzano, A., Sarmiento, G., Piloza, G., Iñiga, E., Zaruma-Torres, F., Ortiz-Ulloa, J., Quijano-Aviles, M., di Grumo, D., Orellana-Manzano, S., del Carmen Villacres, M., Manzano, P., & Berghe, W. V. (2021). Acute oral toxicity of a novel functional drink based on Ilex guayusa, vernonanthuria patens, and cocoa husk. *Toxicology Reports*, 8, 747–752. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.03.026>
- Papalexandratou, Z., Lefeber, T., Bahrim, B., Seng Lee, O., Daniel, H., de Vuyst, L. (2013). Hanseniaspora opuntiae, saccharomyces cerevisiae, lactobacillus fermentum, and acetobacter pasteurianus predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa bean fermentation process. *Food Microbiology*, 35(2), 73–85. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.02.015>
- Pérez, E., Méndez, A., León, M., Hernández, G., & Sívoli, L. (2015). Proximal composition and the nutritional and functional properties of cocoa by-products (pods and husks) for their use in the food industry. In *Chocolate cocoa byproducts technology, rheology, styling, and nutrition* (pp. 219–234). New York: Nova Science Publishers.
- Postigo-Martin, P., Cantarero-Villanueva, I., Lista-Paz, A., Castro-Martin, E., Arroyo-Morales, M., & Seco-Calvo, J. (2021). A COVID-19 rehabilitation prospective surveillance model for use by physiotherapists. *Journal of Clinical Medicine*, 10(8), Article 1691. <https://doi.org/10.3390/jcm10081691>
- Quijano-Avilés, M., Chóez-Guaranda, I., Viteri, R., Baragán-Lucas, A., Sosa, D., Manzano, P. (2021). Effect of cocoa bean shell addition on metabolite profile and antioxidant activity of herbal infusions. *International Journal of Food Science*, 2021, Article 9915797. <https://doi.org/10.1155/2021/9915797>
- Qureshi, H. (2020). The digestive system and the COVID-19. *Journal of Pakistan Medical Association*, 70(5), S98–S100. <https://doi.org/10.5455/JPMA.19>
- Rajo-Poveda, O., Barbosa-Pereira, L., Zeppa, G., & Stévigny, C. (2020). Cocoa bean shell-a by-product with nutritional properties and biofunctional potential. *Nutrients*, 12(4), Article 1123. <https://doi.org/10.3390/nu12041123>
- Rajo-Poveda, O., Barbosa-Pereira, L., Mateus-Reguengo, L., Bertolino, M., Stévigny, C., & Zeppa, G. (2019) Effects of particle size and extraction methods on cocoa bean shell functional beverage. *Nutrients*, 11(4), Article 867. <https://doi.org/10.3390/nu11040867>
- Santana, D. P., Sanchez, J. L. R., Calle, J., de Villavicencio, M. N., Ortega, L. D., & Llanes, L. H. (2018). Utilización de la cascarilla de cacao como fuente de fibra dietética y antioxidantes en la elaboración de galletas dulces. *Food Science and Technology*, 28, 62–67.
- Schwan, R. F., & Wheals, A. E. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 205–221. <https://doi.org/10.1080/10408690490464104>
- Sheu, J.-R., Hsiao, G., Shen, M.-Y., Fong, T.-H., Lin, C.-H., & Chou, D.-S. (2002). Mechanisms involved in the antiplatelet activity of magnesium in human platelets. *British Journal of Haematology*, 119(4), 1033–1041. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2002.03967.x>
- Tang, C., Ding, H., Jiao, R., Wu, X., & Kong, L. (2020). Possibility of magnesium supplementation for supportive treatment in patients with COVID-19. *European Journal of Pharmacology*, 886, Article 173546. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173546>
- Tian, J., Tang, L., Liu, X., Li, Y., Chen, J., Huang, W., & Liu, M. (2022). Populations in low-magnesium areas were associated with higher risk of infection in COVID-19's early transmission: A nationwide retrospective cohort study in the United States. *Nutrients*, 14(4), Article 909. <https://doi.org/10.3390/nu14040909>
- Van Thi, T. H., Zhao, J., & Fleet, G. (2014). Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 174, 72–87. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.014>
- Visintin, S., Alessandria, V., Valente, A., Dolci, P., & Cocolin, L. (2015). Molecular identification and physiological characterization of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria isolated from heap and box cocoa bean fermentations in West Africa. *International Journal of Food Microbiology*, 216, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.004>
- Wang, M. K., Yue, H. Y., Cai, J., Zhai, Y. J., Peng, J. H., Hui, J. F., Hou, D. Y., Li, W. P., & Yang, J. S. (2021). COVID-19 and the digestive system: A comprehensive review. *World Journal of Clinical Cases*, 9(16), 3796–3813. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v9.i16.3796>