



مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی-پژوهشی

فرمولاسیون نوشیدنی ایزوتونیک برپایه ی پرمیت آب پنیر حاوی پروبیوتیک و پپتیدهای آب پنیر انکپسوله شده در آلژینات

مریم سلطانی^۱، محمد ربانی^{۱*}، وحید مفید^۲، سید امیر محمد مرتضویان^۲

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

۲- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله :	این تحقیق با هدف فرموله کردن یک نوشیدنی ورزشی ایزوتونیک فراسودمند برپایه ی
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۳/۳	پرمیت آب پنیر حاوی پروبیوتیک ها و پپتیدهای آب پنیر انکپسوله شده توسط آلژینات
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۴	انجام شد. اثر پروتئین آب پنیر هیدرولیز شده به عنوان آنتی اکسیدان طبیعی و پروتئین های
کلمات کلیدی:	آب پنیر به عنوان پوشش میکروکپسول ها در نوشیدنی فرموله شده مورد بررسی قرار
پرمیت آب پنیر،	گرفت. انکپسول پروبیوتیک ها و پپتیدهای آب پنیر به بهبود خواص مکانیکی کپسول،
پروتئین هیدرولیز شده،	فعالیت تخمیری و بقای پروبیوتیک ها در طول ۲۸ روز نگهداری کمک کردند. کپسول
آنتی اکسیدان،	های آلژینات پوشش داده شده با پروتئین آب پنیر کارایی کپسولاسیون، فاکتور کروی بودن
انکپسولاسیون	و ظرفیت آنتی اکسیدانی بهتری را قبل و بعد از تخمیر نسبت به کپسول های بدون پوشش
	نشان دادند. هیدرولیز پروتئین تأثیر مثبتی بر خواص آنتی اکسیدانی و زنده ماندنی باکتری
	های پروبیوتیک نوشیدنی در طول ۲۸ روز نگهداری داشت. نوشیدنی ورزشی فرموله شده
	بر پایه آب پنیر می تواند بعنوان یک جایگزین طبیعی و فراسودمند برای نوشیدنی های
	تجاری موجود باشد.
DOI:10.22034/FSCT.22.162.16.	
* مسئول مکاتبات:	
mhd-rabani@yahoo.com	

۱-مقدمه

نوشیدنی‌های ورزشی برای بهبود هیدراتاسیون با تحریک مصرف مایعات، بازجذب و احتباس مایعات طراحی شده‌اند. نوشیدنی ایزوتونیک مبتنی بر آب پنیر به دلیل غلظت الکترولیت بالاتر و محتوای کربوهیدرات مشابه، به عنوان یک منبع هیدراتاسیون جایگزین برای نوشیدنی‌های ورزشی پیشنهاد شده است. آب پنیر، محصول جانبی حاصل از فرآیند اولترافیلتراسیون آب پنیر شیرین، حاوی لاکتوز (به عنوان ماده اصلی تشکیل دهنده) به علاوه چندین ویتامین محلول در آب است که آن را از نظر تغذیه‌ای مهم می‌کند [۱].

تخمیر یک روش مؤثر برای تولید هیدرو الکترولیت‌های کاربردی بر پایه ی پرمیت آب پنیر^۱ است که می‌تواند همزمان به عنوان یک حامل مهم برای پروبیوتیک‌ها باشد. علاوه بر این، باکتری‌های اسید لاکتیک مواد بازدارنده مختلفی تولید می‌کنند که می‌توانند ماندگاری محصولات تخمیر شده را افزایش دهند [۲].

پیشرفت‌های اخیر در تولید محصولات تخمیری با ارزش افزوده و افزایش آگاهی مصرف‌کنندگان درباره استفاده از مواد طبیعی به جای مواد شیمیایی، نشان‌دهنده پتانسیل بالای مواد طبیعی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی برای تولید نوشیدنی‌های فراسودمند است. این نوع از نوشیدنی‌ها نه تنها می‌توانند از نظر ایمنی مواد غذایی بسیار مفید باشند، بلکه همچنین می‌توانند ارزش غذایی محصولات غذایی را با استفاده از مزایای آنتی‌اکسیدانی این مواد بالا ببرند [۳].

مطالعات فراوانی در رابطه با خواص مرتبط با سلامتی پپتیدهای پروتئین آب پنیر وجود دارد که از جمله آنها می‌توان به خواص آنتی‌اکسیدانی، تنظیم سیستم ایمنی، ضدسرطانی و افزایش دسترسی بیولوژیکی مواد معدنی اشاره کرد.

پروتئین‌های آب پنیر می‌توانند در طی فرآیندهای تولیدی نظیر تخمیر و هیدرولیز تغییراتی را تجربه کنند که به واسطه این تغییرات، فعالیت بیولوژیکی و خواص آنتی‌اکسیدانی آن‌ها تقویت می‌شود. در این فرآیند پیچیده، عوامل متعددی بر تولید پپتیدهای زیست فعال تأثیر می‌گذارند. عموماً شرایط بهینه برای تخمیر و رشد باکتری‌ها، شرایط ایده‌آلی برای دستیابی به درجه هیدرولیز مورد نیاز برای تولید این پپتیدها نیست. به همین دلیل، برخی تولیدکنندگان ترجیح می‌دهند به جای تولید پپتیدها در فرایند ساخت، از پپتیدهای زیست فعال آماده استفاده کنند. به همین علت، در برخی محصولات، پروتئین‌ها و پپتیدها در طول یا پس از تولید به منظور افزایش خواص آنتی‌اکسیدانی اضافه می‌شوند [۴].

مشکل مهم دیگری که محصولات پروبیوتیک را تحت تأثیر قرار می‌دهد، زنده‌مانی کم پروبیوتیک‌ها در طول ذخیره‌سازی و هضم است. به نظر می‌رسد کپسوله کردن^۲ یک راه عالی برای محافظت از میکروارگانیسم‌ها در برابر شرایط محیطی باشد. هیدروژل‌های آلژینات به دلیل سهولت در کاربرد، غیرسمی بودن و هزینه کم به طور گسترده برای درون پوشانی سلولی استفاده می‌شوند. از طرف دیگر، دانه‌های آلژینات به محیط اسیدی مانند معده یا برخی از محصولات لبنی حساس هستند و حتی در حضور برخی یون‌ها یا ترکیباتی که کمپلکس‌های شلاته کننده را تشکیل می‌دهند، مانند لاکتات و فسفات، ناپایدار هستند.

برای حل این مشکل، پوشش‌های پروتئینی آب پنیر می‌توانند با افزایش یکپارچگی ساختاری میکروکپسول‌های آلژینات و محافظت از آن‌ها در برابر عوامل خارجی به عنوان یک راه حل مؤثر در این زمینه عمل می‌کند. تعامل الکتروستاتیکی بین پروتئین آب پنیر و آلژینات به چسبندگی و پایداری

۱۰^۹CFU/ml * ۱ و محیط کشت MRS^۷ آگار توسط از شرکت Ibersco (تهران، ایران) تهیه شد.

۲-۱- هیدرولیز ایزوله پروتئین آب پنیر^۸ (WPH)

HWPI با حل کردن WPI در بافر فسفات ۱۰ میلی مولار (pH = 7)، با غلظت ۵ درصد (وزنی/حجمی) تهیه شد. سپس سوسپانسیون هم زده شده و به مدت ۳۰ دقیقه تا هیدراته شدن و رسیدن به دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در محیط آزمایشگاه نگهداری شد. سپس سوسپانسیون ها برای pH آنزیم پپسین (pH = 2.6) با HCl و NaOH ۲ مولار تنظیم شدند. سپس آنزیم با نسبت ۱:۴۰ به سوبسترا اضافه شد. پس از هیدرولیز، pH سوسپانسیون با سود ۲ مولار به حالت خنثی تنظیم شد. در نهایت دمای ۹۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه برای غیرفعال کردن آنزیم ها استفاده شد. درجه هیدرولیز (DH) با روش OPA که توسط Petersen, Nielsen و Dammann در سال (۲۰۰۱) ارائه شده است، تعیین شد [۷].

۲-۲- ظرفیت آنتی اکسیدانی WPH

پروتئین آب پنیر هیدرولیز شده برای ظرفیت آنتی اکسیدانی با روشی که توسط Lowry و همکاران در سال (۱۹۵۱) ارائه شد، اندازه گیری شد [۸].

۲-۳- تلقیح

کشت پروبیوتیک مخلوط لاکتوباسیلوس پلانتراریوم و لاکتوباسیلوس کازئی در آبگوشت MRS تلقیح شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و در محلول ۰.۸۵٪

پوشش کمک می کند و در نتیجه عملکرد سیستم انکپسولاسیون را بهبود می بخشد. افزون بر این، پوشش پروتئینی آب پنیر نه تنها پایداری و قابلیت زنده ماندن مواد کپسوله شده را افزایش می دهد، بلکه به عنوان یک منبع پروتئین اضافی نیز عمل کرده و می تواند ارزش تغذیه ای محصول نهایی را ارتقا دهد.

هدف این مطالعه فرمولاسیون یک نوشیدنی هیدروالکترولیتی بر پایه ی پرمیت آب پنیر با ظرفیت آنتی اکسیدانی بهبود یافته، قابلیت زنده ماندن طولانی تر پروبیوتیک ها و ویژگی های حسی بهینه بود. برای دستیابی به این هدف، پپتیدهای پروتئین آب پنیر و پروبیوتیک ها به طور مشترک در حامل های مبتنی بر آلژینات انکپسوله شدند و کنسانتره پروتئین آب پنیر برای پوشش دادن میکرو کپسول ها با هدف حفاظت بیشتر بکار گرفته شد.

۲- مواد و روش ها

پودر پروتئین آب پنیر خالص شده (WPI)^۳ حاوی (< ۹۰ درصد پروتئین) از شرکت غذایی Ocean Protein خریداری شد. آب پنیر و پرمیت آب پنیر (فرآورده اولترافیلتر شده و تغلیظ شده از شیر بدون چربی گاو با روش اسمز معکوس) از شرکت لبنیات رامک کرج تهیه شد. آلژینات سدیم با ویسکوزیته متوسط، پپسین (EC 3.4.23) و تمام محلول ها از شرکت سیگما آلدريج^۴ خریداری شد. استارتر لاکتوباسیلوس پلانتراریوم^۵ (PTCC 1058) و لاکتوباسیلوس کازئی^۶ (PTCC 1608) از شرکت تک ژن زیست (تهران، ایران) با تعداد سلول های زنده اولیه

6- L. casei

7- De Man-Rogosa-Sharpe

8- Hydrolyzed Whey Protein

3 -Whey Protein Isolate

4 -Sigma- Aldrich

5 -L. Plantarum

NaCl شسته شد. پس از سانتریفیوژ کردن و شستشو با بافر فسفات (۱۰ میلی مولار، pH = 7) برای به دست آوردن محلولی حاوی حدود (1.5×10^9 CFU/ml) مجدداً در محلول نمکی سوسپانسیون شدند [۹].

۲-۴-۱- انکپسولاسیون کشت استارتر پروبیوتیک

میکروکپسول های آلژینات (ALG) با روش اکستروژن الکترواستاتیکی به دست آمدند. محلول های آلژینات سدیم در آب مقطر (۱/۵ درصد وزنی) حل شده و در حمام آب در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه پاستوریزه شدند. پروتئین آب پنیر ایزوله در آب دیونیزه (۱۰ درصد وزنی) با هم زدن مغناطیسی ملایم به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق و پس از تنظیم pH در ۷.۰، در دمای ۷۸ درجه سانتی - گراد به مدت ۴۵ دقیقه پاستوریزه شد تا پروتئین ها به طور کامل دناتوره شوند. محلول ها به مدت یک شب در دمای اتاق سرد شدند. کشت پروبیوتیک در محلولی از مخلوط آب پنیر، آلژینات سدیم و پروتئین آب پنیر هیدرولیز شده رقیق شد. سلول های باکتریایی کپسوله شده با استفاده از یک کپسولاتور (Dottikon Inotech AG، سوئیس)، مجهز به یک نازل ۸۰ میکرومتری تهیه شدند. دستگاه با سرعت تغذیه ۵ میلی لیتر در دقیقه تنظیم شد. در نهایت ریز کپسول های تولید شده در ۲۰۰ میلی لیتر از محلول ۰.۵ مولار CaCl_2 جمع آوری و بعد از ۳۰ دقیقه جامد شدند. در نهایت، سوسپانسیون های حاوی کپسول ها در فلاسک های استریل جمع آوری و شسته شده و با آب دیونیزه فیلتر شدند. در انتها در ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات (۱۰ میلی مولار pH = 7) مجدداً حل شده و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند [۱۰].

۲-۵- پوشش میکروکپسول ها

میکروکپسول ها با غوطه ور شدن در ایزوله پروتئین آب پنیر پوشش دهی شدند. به این منظور میکروکپسول های آلژینات بدست آمده از محلول CaCl_2 به مدت ۱۰ دقیقه در محلول WPI دناتوره شده (۱۰٪ وزنی / وزنی) هم زده شده و به محلول ۰.۱ مولار CaCl_2 منتقل شدند. در انتها میکروکپسول ها جمع آوری و با آب دیونیزه شسته شدند.

۲-۶- بازدهی انکپسولاسیون (EE)

میزان پروبیوتیک های انکپسوله شده در طول فرآیند بر اساس معادله (۱) محاسبه شد.

$$EE\% = (N / N_0) \times 100$$

N تعداد سلول های زنده ($\log \text{CFU/g}$) آزاد شده از کپسول ها و N_0 تعداد سلول های زنده آزاد ($\log \text{CFU/g}$) در محلول سوسپانسیون قبل از فرآیند کپسوله کردن است [۱۱].

۲-۷- ویژگی های میکروذرات

مورفولوژی ریزذرات با استفاده از یک میکروسکوپ نوری (Oberkochen، آلمان) ارزیابی شد [۱۲].

اندازه قطر ذرات و توزیع اندازه ذرات با استفاده از دستگاه اندازه گیری ذرات (Malvern) Mastersizer 3000 (آلمان) بدست آمد [۱۳].

۲-۸- تولید نوشیدنی های تخمیری

پرمیت آب پنیر اولترافیلتر شده غلیظ در فلاسک های ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری قرار داده شدند. تیمارها شامل نمونه های تلقیح شده با پروبیوتیک ها و WPH انکپسوله شده در Alginate ۱٪ وزنی / وزنی، پروبیوتیک ها و WPH انکپسوله شده در Alginate و پوشش دهی شده با WPI بودند. همه نمونه ها در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد انکوبه

شدند. زمان انکوباسیون ۴-۵ ساعت برای کاهش pH تا ۵ در نظر گرفته شد. سپس محصولات در دمای کمتر از ۵ درجه سانتیگراد در یخچال و به مدت ۲۸ روز نگهداری شدند [۱۴].

۲-۹- ظرفیت آنتی اکسیدانی نوشیدنی بر پایه ی پریمیت آب پنیر

ظرفیت آنتی اکسیدانی نمونه‌ها قبل و بعد از تخمیر و همچنین در طی ۲۸ روز نگهداری (هر ۷ روز) تعیین شد. برای این منظور، نوشیدنی مبتنی بر آب پنیر از طریق غشایی با منافذی به اندازه ۰.۷ میلی‌متر فیلتر شده و محلول تراوش (سوبسترا) نمونه‌برداری و برای ظرفیت آنتی اکسیدانی آنالیز شد. محلول به‌دست آمده توسط DPPH آنالیز شد. ظرفیت مهار رادیکال با استفاده از روش مهار رادیکال آزاد DPPH تعیین شد. نمونه‌ها با متانول در نسبت ۱:۴ مخلوط شده و با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، ۱ میلی‌لیتر مایع رویی با ۱ میلی‌لیتر متانول و ۱ میلی‌لیتر محلول رادیکال آزاد DPPH مخلوط شد. مخلوط‌ها به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شدند تا همگن شوند و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی باقی ماندند تا واکنش دهند. میزان جذب نمونه با استفاده از اسپکتروفتومتر (Unico, S 2100 SUV, NJ) در طول موج ۵۱۵ نانومتر تعیین شد. تمام آنالیزها در سه تکرار انجام شد. درصد فعالیت مهار رادیکال DPPH به صورت زیر محاسبه شد:

$$\text{DPPH} \% = \text{فعالیت مهار رادیکال (Abs)} - \text{نمونه Abs کنترل} \\ \text{Abs} / \text{کنترل} \times 100$$

که در آن Abs شاهد و Abs نمونه مقادیر جذب نمونه خالی و محلول سنجش DPPH به ترتیب در طول موج ۵۱۵ نانومتر هستند. اندازه‌گیری‌ها در سه تکرار انجام شد [۱۵].

۲-۱۰- پایداری نوشیدنی تخمیری

نوشیدنی‌های تخمیرشده در فواصل ۷ روزه برای یک دوره ۲۸ روزه نمونه‌برداری شدند و از نظر تعداد سلول زنده، مقدار pH و اسیدیته آنالیز شدند. مقدار pH با استفاده از pH متر (Wellheim, WTW82362، آلمان) در دمای اتاق اندازه‌گیری شد. اسیدیته قابل تیتراسیون با روش سوکسله-هنکل تعیین شد. تعداد سلول‌های باکتری‌های پروبیوتیک با روش شمارش کلی بر روی MRS آگار تعیین شد. تعداد سلول‌ها در $\log_{10}$ CFU/mL برای سلول‌های آزاد و $\log_{10}$ CFU/g برای دانه‌ها بیان شد. سلول‌های کپسوله‌شده با افزودن ۱ گرم از کپسول‌ها در ۹ میلی‌لیتر سیرات سدیم ۰.۲٪ (وزنی / حجمی) از کپسول‌ها آزاد شدند [۱۶].

۳- تجزیه و تحلیل آماری

طراحی آزمایش‌ها با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح تصادفی در سه تکرار انجام شد. جهت پیدا کردن تفاوت معنادار میان میانگین داده‌های حاصل‌شده، از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA)، تست چند دامنه‌ای دانکن با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. در تمام آنالیزهای آماری، سطح معنی‌داری ($p < 0.05$) در نظر گرفته شد.

۴- نتایج و بحث

۴-۱- بازدهی انکپسولاسیون (EE)، اندازه و مورفولوژی میکروکپسول‌ها

مورفولوژی میکروکپسول‌های ALG بدون پوشش و پوشش‌داده‌شده با WPI در (شکل ۱) نشان داده شد. اندازه تعیین‌شده توسط تصاویر میکروسکوپ نوری برای میکروکپسول‌های بدون پوشش تقریباً دو برابر قطر نازل تغذیه مورد استفاده در این آزمایش‌ها بود. آنها به صورت

نتایج مربوط به راندمان انکپسولاسیون پروبیوتیک ها در میکروکپسول های بدون پوشش و پوشش داده شده در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که پوشش با ایزوله پروتئین آب پنیر باعث افزایش بازدهی کپسولاسیون شد. این نتایج با مطالعه Doherty و همکاران در سال ۲۰۱۱ همخوانی دارد که پوشش پروتئین آب پنیر، با خواص عملکردی مربوط به خود، تأثیر مستقیم بر راندمان کپسولاسیون می گذارد و آن را افزایش می دهد. [۱۸].

میکروکپسول های کروی نزدیک با سطح فشرده مشاهده شدند. پوشش میکروکپسول های ALG با ایزوله پروتئین آب پنیر حدود ۵۰ میکرومتر به قطر اضافه کرد (جدول ۱) و سطح با پوشش یکنواختی فراهم کرد. برای محافظت مناسب از پروبیوتیک ها بدون تأثیر بر ویژگی های حسی مواد غذایی، میکروکپسول باید قطری مابین ۴۰ تا ۱۰۰ میکرومتر داشته باشند. با این حال، برای محافظت از پروبیوتیک ها در حین انتقال از طریق دستگاه گوارش در pH شیره معده، تنها کپسول های با قطر بیش از ۱۰۰ میلی متر موثر هستند [۱۷].

Table 1. Encapsulation Efficiency and Mean Diameter of the alginate (ALG) and WPI coated alginate (WPI/ALG) beads

Treatments	Diameter (μm)	EE (%)
ALG bead	170 ^a	88.05 $\pm$ 1.05
WPI coated ALG bead	250 ^b	91.85 $\pm$ 0.08

Means followed by different lowercase letters differ statistically in column ($p < 0.05$). The values obtained are the means $\pm$ standard deviation of triplicates.

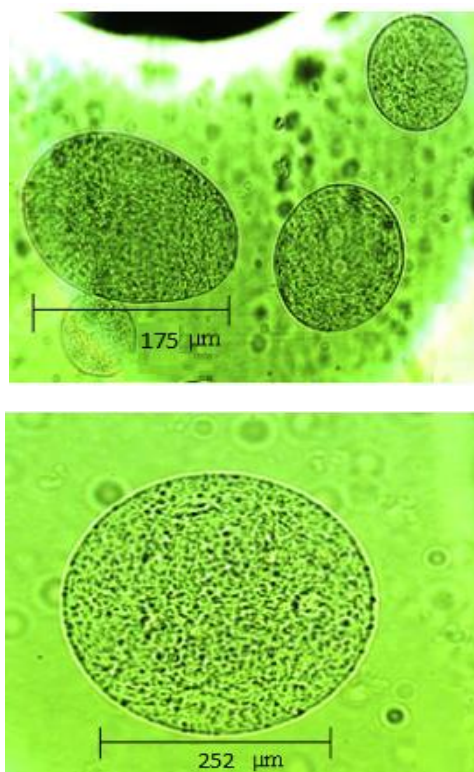


Figure1. Encapsulated and coated probiotics under microscope

۴-۲- ظرفیت آنتی اکسیدانی، pH و اسیدیته نوشیدنی تخمیر شده

ظرفیت آنتی اکسیدانی میکروکپسول ها و بستر برپایه ی پرمیت آب پنیر در (شکل ۲) برای نمونه های حاوی میکروکپسول های ALG بدون پوشش و پوشش داده شده با WPI نشان داده شده است. ظرفیت آنتی اکسیدانی در هر دو میکروکپسول پوشش داده شده و بدون پوشش در طول تخمیر کاهش یافت، اما میکروکپسول ها ALG پوشش داده شده در مقایسه با بدون پوشش، کاهش کمتری در فعالیت آنتی اکسیدانی نشان دادند. این می تواند به این دلیل باشد که پپتیدهای فعال زیست فعال و اسیدهای آمینه کپسوله شده تا حدی از طریق سطح متخلخل میکروکپسول ها به بستر مهاجرت کرده اند و تا حدی برای رشد باکتری در داخل میکروکپسول ها در طول تخمیر استفاده شده اند. پوشش دهی با WPI منجر به آزادسازی کنترل شده تر مولکول های فعال زیستی در مقایسه با بدون پوشش شد. علاوه بر این، کشت پروبیوتیک، مولکول های زیست فعال مختلفی را با فعالیت آنتی اکسیدانی در طی تخمیر تولید می کند، اما کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی حامل ها نشان می دهد که تولید این مولکول ها کمتر از مصرف پپتید با ظرفیت آنتی اکسیدانی توسط کشت و مهاجرت آن پپتیدها به بستر بوده است. در طول ذخیره سازی، ظرفیت مهار DPPH کپسول های پوشش داده شده و بدون پوشش برای ۱۴ روز اول ذخیره سازی افزایش یافت، سپس تا ۲۸ روز ذخیره سازی کاهش یافت. میکروکپسول های بدون پوشش کاهش بیشتری در ظرفیت آنتی اکسیدانی

نشان دادند. دلیل آن می تواند تغییر در ساختار حامل ناشی از فعالیت متابولیک باکتری و انتشار ماده بین کپسول ها و بستر در طول ذخیره سازی باشد [۱۱]. پوشش میکروکپسول ها با WPI باعث بهبود آزادسازی کنترل شده مولکول های فعال زیستی با افزایش تخلخل ماتریکس کپسول و کاهش سرعت انتشار شد.

ظرفیت آنتی اکسیدانی سوپسترای حاوی میکروکپسول های ALG در طی تخمیر و ۷ روز اول نگهداری به طور معنی داری بیشتر از نمونه حاوی میکروکپسول های پوشش داده شده بود، اما پس از ۲۸ روز نگهداری به طور معنی داری کاهش یافت. دلیل این امر می تواند نرخ آزادسازی بیشتر پپتیدهای زیست فعال از میکروکپسول های بدون پوشش به بستر در مقایسه با میکروکپسول های پوشش داده شده در طی تخمیر و ۷ روز اول ذخیره سازی باشد. سوپسترای حاوی میکروکپسول های پوشش دار، ظرفیت آنتی اکسیدانی بالاتری در مقایسه با میکروکپسول های بدون پوشش پس از ۲۸ روز نگهداری نشان داد. این تفاوت به دلیل انتشار تأخیری و کنترل شده پپتیدهای فعال زیستی و اسیدهای آمینه می باشد.

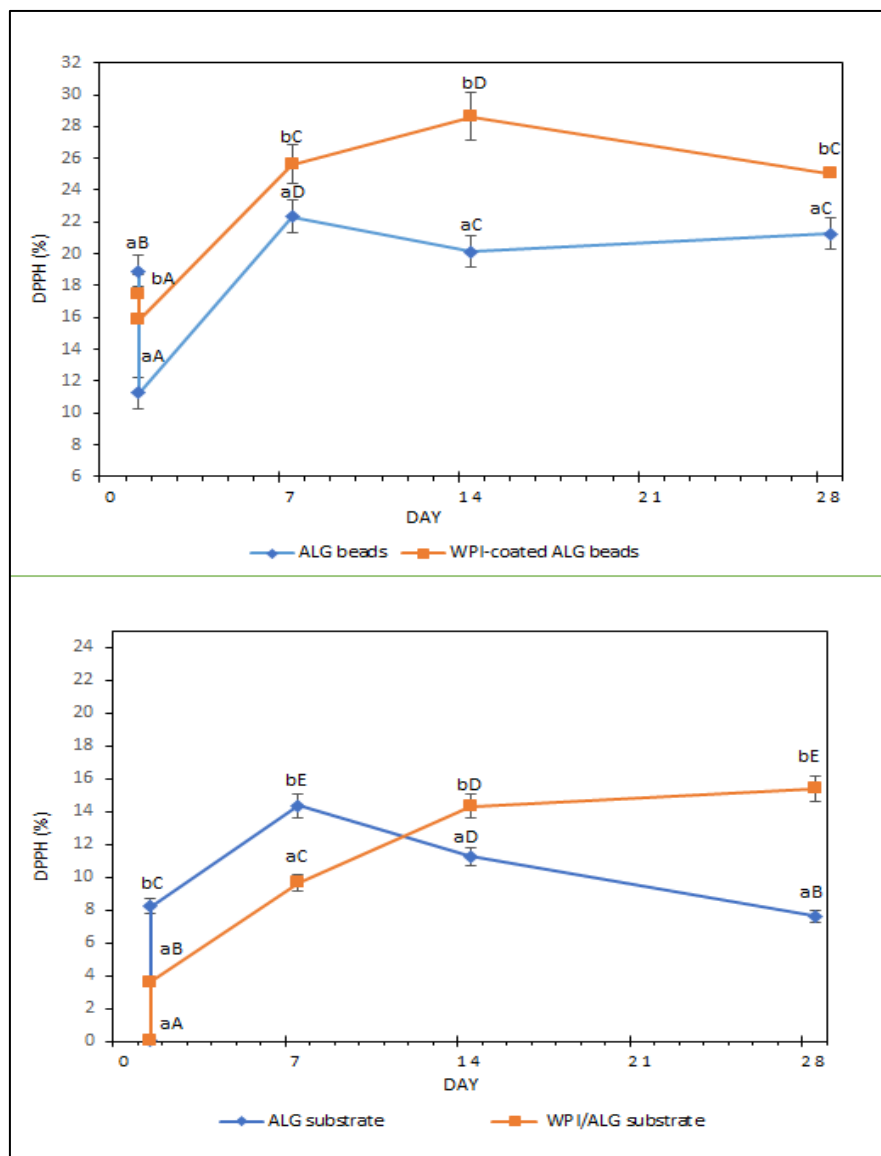


Figure 2. Antioxidant capacity (DPPH) of beads and substrate for sport drink samples with alginate (ALG) and WPI-coated alginate (WPI/ALG) beads, during fermentation and 28 days of storage at 4 °C. Means in a column shown with different lowercase letters are significantly different ($p < 0.05$). Means in a row shown with different uppercase letters are significantly different a row ($p < 0.05$).

تولید اسید لاکتیک توسط کشت استارتر، pH در طول دوره نگهداری کاهش یافت. در پایان دوره نگهداری، نوشیدنی‌های تخمیرشده حاوی میکروکپسول‌های پوشش دهی شده، مقدار pH بالاتری نسبت به نمونه حاوی میکروکپسول آلژینات نشان دادند. تفاوت معنی‌داری در اسیدیته بین نمونه‌ها وجود نداشت ($p < 0.05$). علی‌رغم اسیدیته بالای نمونه‌های حاوی میکروکپسول‌های پوشش‌داده‌شده WPI،

در مطالعه حاضر، تفاوت معنی‌داری در pH نوشیدنی حاوی میکروکپسول‌های ALG بدون پوشش و پوشش‌داده‌شده مشاهده نشد (جدول ۲). نتایج مشابهی توسط مطالعات دیگر گزارش شده است. Peiris و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۹ هیچ تفاوتی بین نمونه ماست کنترل و ماست حاوی بیفیدوباکتریوم کپسوله شده در ماتریکس آلژینات / شیربز / اینولین پیدا نکردند [۱۹]. در تمام نمونه‌ها به دلیل

pH در محدوده ۴-۴.۵ در نتیجه خاصیت بافری پیتیدهای

آب پنیر و اسیدهای آمینه باقی ماند.

Table 2. pH and titratable acidity values of sport drink samples containing Alginate (ALG) and WPI coated alginate (WPI/ALG) beads during refrigerated storage.

Treatment	Storage	ALG	WPI Coated ALG
pH	1 st day	4.81 ± 0.02 ^d	4.84 ± 0.19 ^d
	7 st day	4.69 ± 0.15 ^c	4.72 ± 0.12 ^c
	14 st day	4.61 ± 0.06 ^{bc}	4.69 ± 0.23 ^b
	21 st day	4.42 ± 0.06 ^b	4.51 ± 0.06 ^b
	28 st day	4.10 ± 0.12 ^a	4.21 ± 0.15 ^a
Acidity (%Acid lactic)	1 st day	1.21 ± 1.09 ^a	1.24 ± 1.09 ^a
	7 st day	1.31 ± 0.09 ^{ab}	1.29 ± 0.08 ^{ab}
	14 st day	1.35 ± 0.03 ^{ab}	1.32 ± 0.15 ^{ab}
	21 st day	1.66 ± 0.03 ^b	1.70 ± 0.15 ^b
	28 st day	2.54 ± 0.10 ^c	2.51 ± 0.10 ^c

Numbers are expressed as mean ± standard deviation. Means in a column shown with different lowercase letters are significantly different ($p < 0.05$).

باعث شده تعداد سلول‌های زنده در میکروکپسول‌ها ی پوشش‌داده‌شده با WPI افزایش یافت. افزودن پوشش WPI منجر به ماتریکس پایدارتر با میزان کاهش کمتر سلول‌ها می‌شود و این به دلیل تحمل محیط اسیدی و خواص بافری بالای WPI می‌باشد. در پایان ذخیره‌سازی، همه نمونه‌ها، حاوی پروبیوتیک بالاتر از میزات توصیه‌شده $6(\log \text{CFU/g})$ بودند. بالاترین تعداد پروبیوتیک پس از ۲۸ روز در نمونه حاوی پروبیوتیک‌های کپسوله‌شده و پوشش‌داده‌شده با پروتئین آب پنیر مشاهده شد. نتایج ما مطابق با مطالعات مشابه بود. Krasaekoopt و همکاران در سال ۲۰۱۴ گزارش کردند که کاهش لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس کپسوله شده با آلژینات، کیتوزان و گالاتالیکوساکارید پس از ۲۸ روز نگهداری در دمای ۴

۴-۳- زنده‌مانی پروبیوتیک‌های کپسوله‌شده در طول ذخیره‌سازی

رشد کشت پروبیوتیک کپسوله‌شده در آلژینات طی ۷ روز اول نگهداری افزایش یافت (شکل ۳). رشد کشت بالاتر در میکروکپسول‌های حاوی WPH مشاهده شد که نشان دهنده تأثیر مصرف پیتیدهای فعال زیستی بر رشد باکتری هاست. تفاوت در زنده‌مانی پروبیوتیک‌های کپسوله شده و پوشش دهی شده با WPI و بدون پوشش می‌تواند مربوط به انتشار مولکول زیست‌فعال در میکروکپسول‌های بدون پوشش باشد که می‌تواند منجر به اثر حفاظتی کمتر برای سلول‌های پروبیوتیک شود [۱۶]. نرخ آزادسازی کم پیتیدهای زیست-فعال از میکروکپسول‌های پوشش‌داده‌شده با WPI در مقایسه با کپسول‌های بدون پوشش در طول ذخیره‌سازی

درجه سانتیگراد $\log \text{CFU/mL}$ ۱.۸ بود [۲۰]. کیتوزان در ماست را پس از ۳۵ روز نگهداری $\log$ Brinques و همکاران در سال ۲۰۱۱ کاهش تعداد لاکتوباسیلوس پلانترایوم پوشش داده شده با آلژینات و

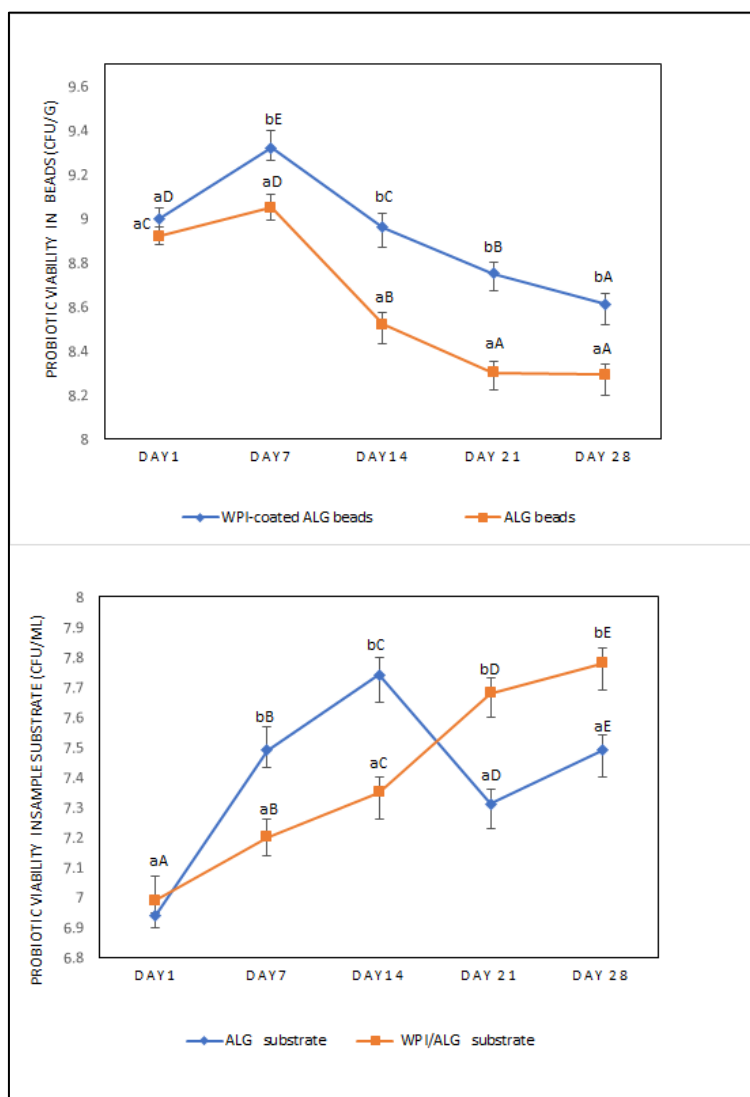


Figure ۳. Viability of probiotic bacteria for encapsulated cells (Log cfu/g) and released cells (Log cfu/ml) in sport drink samples with alginate (ALG) and WPI-coated alginate (WPI/ALG) beads, during 28 days of storage at 4 °C. Means in a column shown with different lowercase letters are significantly different ($p < 0.05$). Means in a row shown with different uppercase letters are significantly different a row ($p < 0.05$).

ورزشی بر پایه ی پرمیت آب پنیر بکار رفتند. انکپسولاسیون و پوشش دهی پپتیدهای زیست فعال و باکتری های پروبیوتیک جهت بهبود بقای پروبیوتیک ها و کاهش سرعت رهاسازی پروبیوتیک ها و پپتیدهای زیست فعال در محصول موفق بود و محصول نهایی بعد از ۲۸ روز نگهداری در سطح قابل قبولی از میزان پپتیدهای زیست فعال و پروبیوتیک

۵- نتیجه گیری

در مطالعه حاضر، WPH به عنوان آنتی اکسیدان طبیعی به همراه باکتری های پروبیوتیک شامل لاکتوباسیلوس پلانترایوم و لاکتوباسیلوس کازئی در ماتریکس آلژینات انکپسوله شدند و بعد از پوشش دهی با WPI در نوشیدنی

باکتری ها قرار داشت. با توجه به علاقه گسترده جهانی به مصرف غذاهای کاربردی با ارزش افزوده، این محصول می تواند به عنوان بعنوان یک نوشیدنی ورزشی پروبیوتیک و فراسودمند مطرح شود.

ه-منابع

- [1] Nyanzi, Richard, Piet J. Jooste, and Elna M. Buys., 2021. Invited review: Probiotic yogurt quality criteria, regulatory framework, clinical evidence, and analytical aspects. *Journal of Dairy Science* 104.1: 1-19.
- [2] Shi, Qilong, Zhongxiang Fang, and Bhesh Bhandari., 2013. Effect of addition of whey protein isolate on spray-drying behavior of honey with maltodextrin as a carrier material. *Drying Technology* 31.13-14: 1681-1692.
- [3] Ribeiro, Daiany Alves, et al., 2014. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 16: 912-930.
- [4] Krunic, Tanja Ž., Nataša S. Obradović, and Marica B. Rakin., 2019. Application of whey protein and whey protein hydrolysate as protein based carrier for probiotic starter culture." *Food Chemistry* 293: 74-82.
- [5] Ryder, Kate, Alaa El-Din Bekhit, Michelle McConnell, and Alan Carne., 2016. Towards generation of bioactive peptides from meat industry waste proteins: Generation of peptides using commercial microbial proteases. *Food Chemistry* 208: 42-50.
- [6] Gbassi, Gildas K., and Thierry Vandamme., 2012. Probiotic encapsulation technology: from microencapsulation to release into the gut. *Pharmaceutics* 4, no. 1: 149-163.
- [7] Nielsen, P. M., D. Petersen, and C. J. J. O. F. S. Dambmann., 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of food science* 66, no. 5: 642-646
- [8] Xia, Ting, Bo Zhang, Wenhui Duan, Jin Zhang, and Min Wang., 2020. Nutrients and bioactive components from vinegar: A fermented and functional food. *Journal of Functional Foods* 64: 103681.
- [9] Gamage, S. M., M. K. S. Mihirani, O. D. A. N. Perera, and HL Darshani Weerahewa., (2016). Development of synbiotic beverage from beetroot juice using beneficial probiotic *Lactobacillus Casei* 431. *Ruhuna Journal of Science* 7, no. 2 December.
- [10] Varga, László., 2006. Effect of acacia (*Robinia pseudo-acacia* L.) honey on the characteristic microflora of yogurt during refrigerated storage. *International journal of food microbiology* 108, no. 2: 272-275
- [11] De Prisco, Annachiara, Diamante Maresca, Duncan Ongeng, and Gianluigi Mauriello., 2015. Microencapsulation by vibrating technology of the probiotic strain *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 to enhance its survival in foods and in gastrointestinal environment. *LWT-Food Science and Technology* 61, no. 2: 452-462.
- [12] Lowry, Oliver H., Nira J. Rosebrough, A. Lewis Farr, and Rose J. Randall., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry* 193: 265-275.
- [13] Krunic, Tanja Ž., Nataša S. Obradović, and Marica B. Rakin., 2019. Application of whey protein and whey protein hydrolysate as protein based carrier for probiotic starter culture. *Food Chemistry* 293: 74-82.
- [14] Ramos, Jose, Jacqueline Forcada, and Roque Hidalgo-Alvarez., 2014. Cationic polymer nanoparticles and nanogels: from synthesis to biotechnological

applications. *Chemical reviews* 114, no. 1: 367-428.

[15] Lee, Dong-Hoon, Bong-Hwa Jin, Yong-Il Hwang, and Seung-Cheol Lee., 2000. Encapsulation of bromelain in liposome. *Preventive Nutrition and Food Science* 5, no. 2: 81-85.

[16] Krunic, Tanja, Marica Rakin, Maja Bulatovic, and Danica Zaric., 2018. The contribution of bioactive peptides of whey to quality of food products. In *Food processing for increased quality and consumption*, pp. 251-285. Academic Press.

[17] Vargas, Sara A., et al., 2021. High-intensity ultrasound pretreatment influence on whey protein isolate and its use on complex coacervation with kappa carrageenan: Evaluation of selected functional properties. *Ultrasonics sonochemistry* 70: 105340.

[18] Doherty, S. B., V. L. Gee, R. P. Ross, C. Stanton, G. F. Fitzgerald, and A. Brodkorb., 2011. Development and characterisation of whey

protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. *Food Hydrocolloids* 25, no. 6: 1604-1617.

[19] Peiris, K. R. M., Prasanna, P. H. P., Chandramali, D. V. P., Gunasekara, D. C. S., & Madhusanka, P. M. V., 2019. Effect of Incorporation of Kithul Flour on Physical, Microbiological and Sensory Attributes of Probiotic Set Yogurt.

[20] Krasaekoopt, Wunwisa, and S. Watcharapoka., 2014. Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. *LWT-Food Science and Technology* 57.2: 761-766.

[21] Brinques, Graziela Brusch, and Marco Antônio Záchia Ayub., 2011. Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. *Journal of food engineering* 103.2: 123-128.



Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage: www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Whey permeate-based isotonic beverage formulation containing whey protein probiotic and peptides Co-encapsulated in alginate Matrix

Maryam Soltani ¹, Mohammad Rabbani ^{1*}, Vahid Mofid², Seyed Amir Mohammad Mortazavian ²

1- Department of Food Science and Industry, Islamic Azad University, Science and Research Unit, Tehran, Iran.

2- Department of Food Science and Industry, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Article History: Received:2023/5/24 Accepted:2024/12/24	This study aimed to formulate a functional isotonic sports drink based on whey permeate containing probiotics and whey peptides encapsulated by alginate. The effect of hydrolyzed whey production as a natural antioxidant and whey as a coating of microcapsules in the formulated drink was investigated. Encapsulation of probiotics and whey peptides helped to improve the mechanical properties of the capsule, fermentation activity and survival of probiotics during 28 days of storage. Alginate capsules coated with whey culture showed better encapsulation efficiency, sphericity factor and antioxidant composition before and after fermentation compared to uncoated capsules. Hydrolysis had a positive effect on the antioxidant properties and viability of probiotic bacteria during 28 days of storage. Formulated whey-based sport drink can be a natural and functional alternative to existing commercial drinks.
Keywords: Whey permittivity, Hydrolyzed protein, Antioxidant, Encapsulation	
DOI: 10.22034/FSCT.22.162.16. *Corresponding Author E- mhd-rabani@yahoo.com	