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 انکپسوله‌شده 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 شمال، تهران، ایران.

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

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۳/۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۴

کلمات کلیدی:

پرمیت آب پنیر،

پروتئین هیدرولیزشده،

آنتی‌اکسیدان،

انکپسولاسیون

DOI:10.22034/FSCT.22.162.16.

* مسئول مکاتبات:

mhd-rabani@yahoo.com

چکیده

این تحقیق با هدف فرموله‌کردن یک نوشیدنی ورزشی ایزوتونیک فراسودمند برپایه ی پرمیت آب پنیر حاوی پروبیوتیک ها و پپتیدهای آب پنیرانکپسوله شده توسط آلژینات انجام شد. اثر پروتئین آب پنیر هیدرولیزشده به‌عنوان آنتی اکسیدان طبیعی و پروتئین‌های آب پنیر به‌عنوان پوشش میکروکپسول ها در نوشیدنی فرموله شده مورد بررسی قرار گرفت. انکپسول پروبیوتیک ها و پپتیدهای آب پنیر به بهبود خواص مکانیکی کپسول، فعالیت تخمیری و بقای پروبیوتیک‌ها در طول ۲۸ روز نگهداری کمک کردند. کپسول های آلژینات پوشش‌داده‌شده با پروتئین آب پنیر کارایی کپسولاسیون، فاکتور کروی‌بودن و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بهتری را قبل و بعد از تخمیر نسبت به کپسول های بدون پوشش نشان دادند. هیدرولیز پروتئین تأثیر مثبتی بر خواص آنتی‌اکسیدانی و زنده‌مانی 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.

۱-مقدمه

نوشیدنی‌های ورزشی برای بهبود هیدراتاسیون با تحریک مصرف مایعات، بازجذب و احتباس مایعات طراحی شده‌اند. نوشیدنی ایزوتونیک مبتنی بر آب پنیر به‌دلیل غلظت الکترولیت بالاتر و محتوای کربوهیدرات مشابه، به‌عنوان یک منبع هیدراتاسیون جایگزین برای نوشیدنی‌های ورزشی پیشنهاد شده است. آب پنیر، محصول جانبی حاصل از فرآیند اولترافیلتراسیون آب پنیر شیرین، حاوی لاکتوز (به‌عنوان مادهٔ اصلی تشکیل‌دهنده) 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[1] است که می‌تواند همزمان به‌عنوان یک حامل مهم برای پروبیوتیک‌ها باشد. علاوه‌بر 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 ارزش‌افزوده 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 نه‌تنها 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 به‌واسطه 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 به‌جای 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 به‌منظور افزایش خواص آنتی‌اکسیدانی اضافه می‌شوند [٤].

مشکل مهم دیگری که محصولات پروبیوتیک را تحت تأثیر قرار می‌دهد، زنده‌مانی کم پروبیوتیک‌ها در طول ذخیره‌سازی و هضم است. به نظر می‌رسد کپسوله‌کردن[2] یک راه عالی برای محافظت از میکروارگانیسم‌ها در برابر شرایط محیطی باشد. هیدروژل‌های آلژینات به‌دلیل سهولت در کاربرد، غیرسمی‌بودن و هزینهٔ کم به‌طور گسترده برای درون پوشانی سلولی استفاده می‌شوند. از طرف دیگر، دانه‌های آلژینات به

1-Whey Permeate

2- Encapsulation

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 می توانند با افزایش یکپارچگی ساختاری میکروکپسول های آلژینات و محافظت از آن‌ها در برابر عوامل خارجی به‌عنوان یک راه‌حل مؤثر در این زمینه عمل می‌کند. تعامل الکتروستاتیکی بین پروتئین آب پنیر و آلژینات به چسبندگی و پایداری پوشش کمک می‌کند و در نتیجه عملکرد سیستم انکپسولاسیون را بهبود می‌بخشد. افزون بر این، پوشش پروتئینی آب پنیر نه‌تنها پایداری و قابلیت زنده‌مانی مواد کپسوله‌شده را افزایش می‌دهد، بلکه به‌عنوان یک منبع پروتئین اضافی نیز عمل کرده و می‌تواند ارزش تغذیه‌ای محصول نهایی را ارتقا دهد.

هدف این مطالعه فرمولاسیون یک نوشیدنی هیدروالکترولیتی بر پایه ی پرمیت آب پنیر با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بهبود یافته، قابلیت زنده‌مانی طولانی تر پروبیوتیک ها و ویژگی‌های حسی بهینه بود. برای دستیابی به این هدف، پپتیدهای پروتئین آب پنیر و پروبیوتیک‌ها به‌طور مشترک در حامل‌های 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 روش‌ها

پودر پروتئین آب پنیرخالص شده (WPI)[3] حاوی (< ۹۰ درصد پروتئین) از شرکت غذایی Ocean Protein خریداری شد. آب پنیر و پرمیت آب پنیر (فرآورده اولترافیلترشده و تغلیظ‌شده 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 آلدریچ [4] خریداری شد. استارتر لاکتوباسیلوس پلانتاریوم[5] (PTCC 1058) و لاکتوباسیلوس کازئی[6] (PTCC 1608) از شرکت تک ژن زیست (تهران، ایران) با تعداد سلول‌های زندهٔ اولیه ۱* ۱۰[۹]CFU/ml و محیط کشت MRS[7] آگار توسط از شرکت Ibersco (تهران، ایران) تهیه شد.

۲-۱- هیدرولیز ایزوله پروتئین آب پنیر (WPH)[8]

HWPI با حل‌کردن WPI در بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار (pH = 7) ، با غلظت ۵ درصد (وزنی/حجمی) تهیه شد. سپس سوسپانسیون هم‌زده شده و به مدت ۳۰ دقیقه تا هیدراته شدن ورسیدن به دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد در محیط آزمایشگاه نگهداری شد. سپس سوسپانسیون‌ها برای pH آنزیم پپسین (pH = 2.6) با HCl و NaOH ۲ مولار تنظیم شدند. سپس آنزیم با نسبت ۱:٤۰ به سوبسترا اضافه شد. پس از هیدرولیز، pH سوسپانسیون با سود ۲ مولار به حالت خنثی تنظیم شد. در نهایت دمای ۹۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه برای غیرفعال‌کردن آنزیم‌ها استفاده شد. درجهٔ هیدرولیز (DH) با روش OPA که توسط Nielsen، Petersen و Dambmann در سال (۲۰۰۱) ارائه شده است، تعیین شد [۷].

3 -Whey Protein Isolate

4 -Sigma- Aldrich

5 -L. Plantarum

6- L. casei

7- De Man–Rogosa–Sharpe

8- Hydrolyzed Whey Protein

۲-۲- ظرفیت آنتی‌اکسیدانی WPH

پروتئین آب پنیر هیدرولیزشده برای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با روشی که توسط Lowry و همکاران در سال (۱۹۵۱) ارائه شد، اندازه‌گیری شد [۸].

۲-۳- تلقیح

کشت پروبیوتیک مخلوط لاکتولاسیلوس پلانتاریوم و لاکتوباسیلوس کازئی در آبگوشت MRS تلقیح شد و به مدت ٤۸ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و در محلول ۰.۸۵٪ NaCl شسته شد. پس از سانتریفیوژکردن و شستشو با بافر فسفات (۱۰ میلی‌مولار، pH (= 7 برای به‌دست‌آوردن محلولی حاوی حدود (۱.۵*۱۰^{۹} CFU/ml) مجدداً در محلول نمکی سوسپانسیون شدند [۹].

۲-٤- انکپسولاسیون کشت استارتر پروبیوتیک

میکروکپسول های آلژینات (ALG)[9] با روش اکستروژن الکترواستاتیکی به دست آمدند. محلول‌های آلژینات سدیم در آب مقطر (۱/۵ درصد وزنی) حل شده و در حمام آب در دمای ٦۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ٦۰ دقیقه پاستوریزه شدند. پروتئین آب پنیر ایزوله در آب دیونیزه (۱۰ درصد وزنی) با هم‌زدن مغناطیسی ملایم به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق و پس از تنظیم pH در ۷.۰، در دمای ۷۸ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ٤۵ دقیقه پاستوریزه شد تا پروتئین‌ها به‌طور کامل دناتوره شوند. محلول‌ها به مدت یک شب در دمای اتاق سرد شدند. کشت پروبیوتیک در محلولی از مخلوط آب پنیر، آلژینات سدیم و پروتئین آب پنیر هیدرولیزشده رقیق شد. سلول‌های باکتریایی کپسوله‌شده با استفاده از یک کپسولاتور (Inotech AG، Dottikon، سوئیس)، مجهز به یک نازل ۸۰ میکرومتری تهیه شدند. دستگاه با سرعت تغذیه ۵ میلی‌لیتر در دقیقه تنظیم شد. در نهایت ریز کپسول های تولید شده در ۲۰۰ میلی‌لیتر از محلول ۰.۵ مولار $CaCl_2$ جمع آوری و بعد از ۳۰ دقیقه جامد شدند. در نهایت، سوسپانسیون‌های حاوی کپسول ها در فلاسک‌های استریل جمع‌آوری و شسته شده و با آب دیونیزه فیلتر شدند. در انتها در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار (pH = 7) مجدداً حل شده و در دمای ٤ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند [۱۰].

۲-۵- پوشش میکروکپسول ها

میکروکپسول ها با غوطه‌ور شدن در ایزولهٔ پروتئین آب پنیر پوشش‌دهی 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 جمع‌آوری و با آب دیونیزه شسته شدند.

۲-٦- بازدهی انکپسولاسیون (EE)

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

$$EE\% = (N / N0) \times 100$$

N تعداد سلول‌های زنده (log CFU/g) آزاد شده از کپسول ها و N0 تعداد سلول‌های زنده آزاد (log CFU/g) در محلول سوسپانسیون قبل از فرآیند کپسوله کردن است [۱۱].

۲-۷- ویژگی‌های میکروذرات

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

9 -Alginate

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

۲-۸- تولید نوشیدنی‌های تخمیری

پرمیت آب پنیر اولترافیلترشدهٔ غلیظ در فلاسک‌های ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری قرار داده شدند. تیمارها شامل نمونه‌های تلقیح‌شده با پروبیوتیک‌ها و WPH انکپسوله‌شده در Alginate ۱٪ وزنی/ وزنی، پروبیوتیک‌ها و و WPH انکپسوله‌شده در Alginate و پوشش‌دهی شده با WPI بودند. همهٔ نمونه‌ها در دمای ٤۲ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شدند. زمان انکوباسیون ٤/۵-٤ ساعت برای کاهش pH تا ۵ در نظر گرفته شد. سپس محصولات در دمای کمتر از ۵ درجهٔ سانتی‌گراد در یخچال و به مدت ۲۸ روز نگهداری شدند [١٤].

۲-۹- ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نوشیدنی بر پایه ی پرمیت آب پنیر

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی 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 اندازهٔ ۰.۷ میلی‌متر فیلتر شده و محلول تراوش (سوبسترا) نمونه‌برداری و برای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی 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: ٤ مخلوط شده و با سرعت ٦۰۰۰ 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:

٪DPPH = فعالیت مهار رادیکال (Abs نمونه – Abs کنترل / Abs کنترل) × 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 (WTW82362، Wellheim، آلمان) در دمای اتاق اندازه‌گیری شد. اسیدیته قابل تیتراسیون با روش سوکسله-هنکل تعیین شد. تعداد سلول‌های باکتری های پروبیوتیک با روش شمارش کلی بر روی MRS آگار تعیین شد. تعداد سلول‌ها در log10 CFU/mL برای سلول‌های آزاد و log10 CFU/g برای دانه‌ها بیان شد. سلول‌های کپسوله‌شده با افزودن ۱ گرم از کپسول ها در ۹ میلی‌لیتر سیترات سدیم ۰.۲ ٪ (وزنی / حجمی) از کپسول‌ها آزاد شدند [١٦].

۳- تجزیه و تحلیل آماری

طراحی آزمایش‌ها با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح تصادفی در سه تکرار انجام شد. جهت پیداکردن 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 ($p < ۰.۰۵$) در نظر گرفته شد.

۴- نتایج و بحث

٤-١- بازدهی انکپسولاسیون (EE٪)، اندازه و مورفولوژی میکروکپسول‌ها

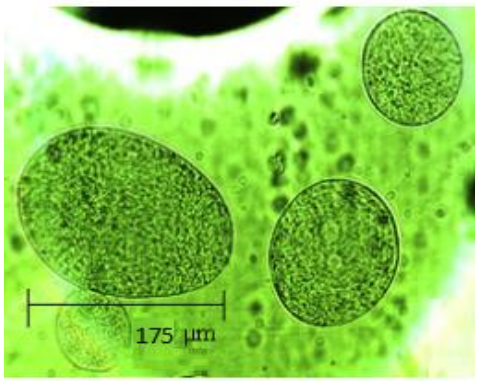
مورفولوژی میکروکپسول‌های ALG بدون پوشش و پوشش‌داده‌شده با WPI در (شکل ۱) نشان داده شد. اندازهٔ تعیین‌شده توسط تصاویر میکروسکوپ نوری برای میکروکپسول های بدون پوشش تقریباً دو برابر قطر نازل تغذیهٔ مورد استفاده در این آزمایش‌ها بود. آنها به صورت میکروکپسول‌های کروی نزدیک با سطح فشرده مشاهده شدند. پوشش میکروکپسول‌های 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 ویژگی‌های حسی مواد غذایی، میکروکپسول باید قطری مابین ٤٠ تا ١٠٠ میکرومتر داشته باشند. با این حال، برای محافظت از پروبیوتیک‌ها در حین انتقال از طریق دستگاه گوارش در pH شیره معده، تنها کپسول های با قطر بیش از ١٠٠ میلی‌متر موثر هستند [١٧].

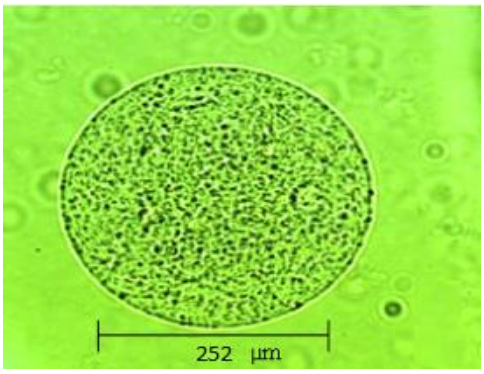
نتایج مربوط به راندمان انکپسولاسیون پروبیوتیک ها در میکروکپسول‌های بدون پوشش و پوشش‌داده‌شده در جدول ١ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که پوشش با ایزولهٔ پروتئین آب پنیر باعث افزایش بازدهی کپسولاسیون شد. این نتایج با مطالعهٔ Doherty و همکاران در سال ٢٠١١ همخوانی دارد که پوشش پروتئین آب پنیر، با خواص عملکردی مربوط به خود، تأثیر مستقیم بر راندمان کپسولاسیون می گذارد و آن را افزایش می دهد. [١٨].

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 ± 1.05
WPI coated ALG bead	250^{b}	91.85 ± 0.08

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





Figue1. Encapsulated and coated probiotics under microscope

٤-٢- ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، pH و اسیدیتهٔ نوشیدنی تخمیرشده

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی میکروکپسول‌ها و بستربرپایه ی پرمیت آب پنیر در (شکل ۲) برای نمونه‌های حاوی میکروکپسول‌های ALG بدون پوشش و پوشش داده شده با WPI نشان داده شده است. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در هر دو میکروکپسول پوشش‌داده‌شده و بدون پوشش در طول تخمیر کاهش یافت، اما میکروکپسول‌ها ALG پوشش‌داده-شده در مقایسه با بدون پوشش، کاهش کمتری در فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان دادند. این می‌تواند به این دلیل باشد که پپتیدهای فعال زیست‌فعال و اسیدهای آمینه کپسوله شده تا حدی از طریق سطح متخلخل میکروکپسول‌ها به بستر مهاجرت کرده‌اند و تا حدی برای رشد باکتری در داخل میکروکپسول‌ها در طول تخمیر استفاده شده‌اند. پوشش دهی با WPI منجر به آزادسازی کنترل‌شده‌تر مولکول‌های فعال زیستی در مقایسه با بدون‌پوشش شد. علاوه‌بر این، کشت پروبیوتیک، مولکول‌های زیست‌فعال مختلفی را با فعالیت آنتی‌اکسیدانی در طی تخمیر تولید می‌کند، اما کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی حامل‌ها نشان می‌دهد که تولید این مولکول‌ها کمتر از مصرف پپتید با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی توسط کشت و مهاجرت آن پپتیدها به بستر بوده است. در طول ذخیره-سازی، ظرفیت مهار DPPH کپسولهای پوشش‌داده‌شده و بدون پوشش برای ١٤ روز اول ذخیره‌سازی افزایش یافت، سپس تا ۲۸ روز ذخیره‌سازی کاهش یافت. میکروکپسول-های بدون پوشش کاهش بیشتری در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نشان دادند. دلیل آن می‌تواند تغییردر ساختار حامل ناشی از فعالیت متابولیک باکتری و انتشار ماده بین کپسول ها و بستر در طول ذخیره‌سازی باشد [۱۱]. پوشش میکروکپسول‌ها با WPI باعث بهبود آزادسازی کنترل‌شده مولکول‌های فعال زیستی با افزایش تخلخل ماتریکس کپسول و کاهش سرعت انتشار شد.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سوبسترای حاوی میکروکپسول‌های ALG در طی تخمیر و ۷ روز اول نگهداری به‌طور معنی-داری بیشتراز نمونه حاوی میکروکپسول‌های پوشش‌داده‌شده بود، اما پس ۲۸ روز نگهداری به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. دلیل این امر می‌تواند نرخ آزادسازی بیشتر پپتیدهای زیست‌فعال از میکروکپسول‌های بدون پوشش به بستر در مقایسه با میکروکپسول‌های پوشش‌داده‌شده در طی تخمیر و ۷ روز اول ذخیره‌سازی باشد. سوبسترای حاوی میکروکپسول‌های پوشش‌دار، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری در مقایسه با میکروکپسول‌های بدون پوشش پس از ۲۸ روز نگهداری نشان داد. این تفاوت به‌دلیل انتشار تأخیری و کنترل‌شدهٔ پپتیدهای فعال زیستی و اسیدهای آمینه می باشد.

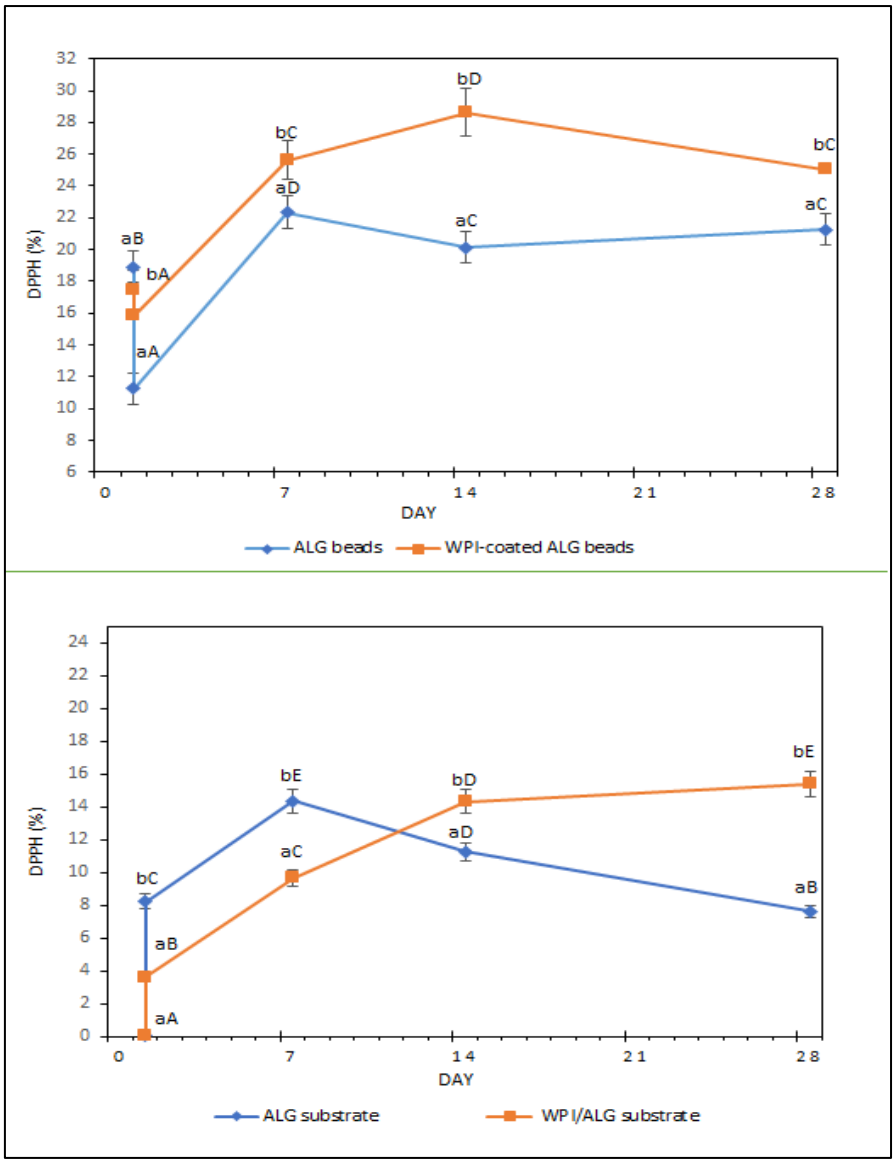


Figure 2. Antioxidant capacity (DPPH) of beads and substrate for sport drink samples with alginate (ALG) and WPI-coated alginate (WPI/ALG) beads, during fermentation and 28 days of storage at 4 ◦C. Means in a column shown with different lowercase letters are significantly different ($p < 0.05$). Means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

در مطالعهٔ حاضر، تفاوت معنی‌داری در pH نوشیدنی حاوی میکروکپسول های 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 PH نمونه ماست کنترل و ماست حاوی بیفیدوباکتریوم کپسوله شده در ماتریکس آلژینات / شیربز/ اینولین پیدا نکردند [۱۹]. در تمام نمونه‌ها به‌دلیل تولید اسید لاکتیک توسط کشت استارتر، pH در طول دورهٔ نگهداری کاهش یافت. در پایان دورهٔ نگهداری، نوشیدنی‌های تخمیرشدهٔ حاوی میکروکپسول های پوشش دهی شده، مقدار pH بالاتری نسبت به نمونهٔ حاوی میکروکپسول آلژینات نشان دادند. تفاوت معنی‌داری در اسیدیته بین نمونه-

ها وجود نداشت ($p< ۰.۰۵$). علی‌رغم اسیدیتهٔ بالای نمونه‌های حاوی میکروکپسول‌های پوشش‌داده‌شده WPI ، pH در محدودهٔ ٤-٤.٥ در نتیجهٔ خاصیت بافری پپتیدهای 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	1st day	4.81 ± 0.02[d]	**4.84 ± 0.19[d]**
	7st day	4.69 ± 0.15[c]	**4.72 ± 0.12[c]**
	14st day	4.61 ± 0.06[bc]	**4.69 ± 0.23[b]**
	21st day	4.42 ± 0.06[b]	**4.51 ± 0.06[b]**
	28st day	4.10 ± 0.12[a]	**4.21 ± 0.15[a]**
Acidity (%Acid lactic)	1st day	1.21 ± 1.09[a]	**1.24 ± 1.09[a]**
	7st day	1.31 ± 0.09[ab]	**1.29 ± 0.08[ab]**
	14st day	1.35 ± 0.03[ab]	**1.32 ± 0.15[ab]**
	21st day	1.66 ± 0.03[b]	**1.70 ± 0.15[b]**
	28st 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 ($p <0.05$).

٤-٣- زنده‌مانی پروبیوتیک‌های کپسوله‌شده در طول ذخیره‌سازی

رشد کشت پروبیوتیک کپسوله‌شده درآلژینات طی ۷ روز اول نگهداری افزایش یافت (شکل ۳). رشد کشت بالاتر در میکروکپسول‌های حاوی WPH مشاهده شد که نشان دهندهٔ تأثیر مصرف پپتیدهای 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 [١٦]. نرخ آزادسازی کم پپتیدهای زیست-فعال از میکروکپسول‌های پوشش‌داده‌شده با WPI در مقایسه با کپسول‌های بدون پوشش در طول ذخیره‌سازی باعث شده تعداد سلول‌های زنده در میکروکپسول ها ی پوشش‌داده‌شده با WPI افزایش یافت. افزودن پوشش WPI منجر به ماتریکس پایدارتر با میزان کاهش کمترسلول ها می شود و این به‌دلیل تحمل محیط اسیدی و خواص بافری بالای WPI می باشد. در پایان ذخیره‌سازی، همهٔ نمونه‌ها، حاوی پروبیوتیک بالاتر از میزات توصیه‌شده (log CFU/g)٦ بودند. بالاترین تعداد پروبیوتیک پس از ۲۸ روز در نمونهٔ حاوی پروبیوتیک های کپسوله‌شده و پوشش‌داده‌شده با پروتئین آب پنیر مشاهده شد. نتایج ما مطابق با مطالعات مشابه بود. Krasaekoopt و همکاران در سال ٢٠١٤ گزارش کردند که کاهش لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس کپسوله شده با آلژینات، کیتوزان و گالاکتوالیگوساکارید پس از ۲۸ روز نگهداری در دمای ٤

درجهٔ سانتیگراد log CFU/mL ۱.۸ بود [۲۰]. Brinques و همکاران در سال ۲۰۱۱ کاهش تعداد لاکتوباسیلوس پلانتاریوم پوشش‌داده‌شده با آلژینات و کیتوزان در ماست را پس از ۳۵ روز نگهداری log CFU/mL ۰.۵۵ ارزیابی کردند [۲۱].

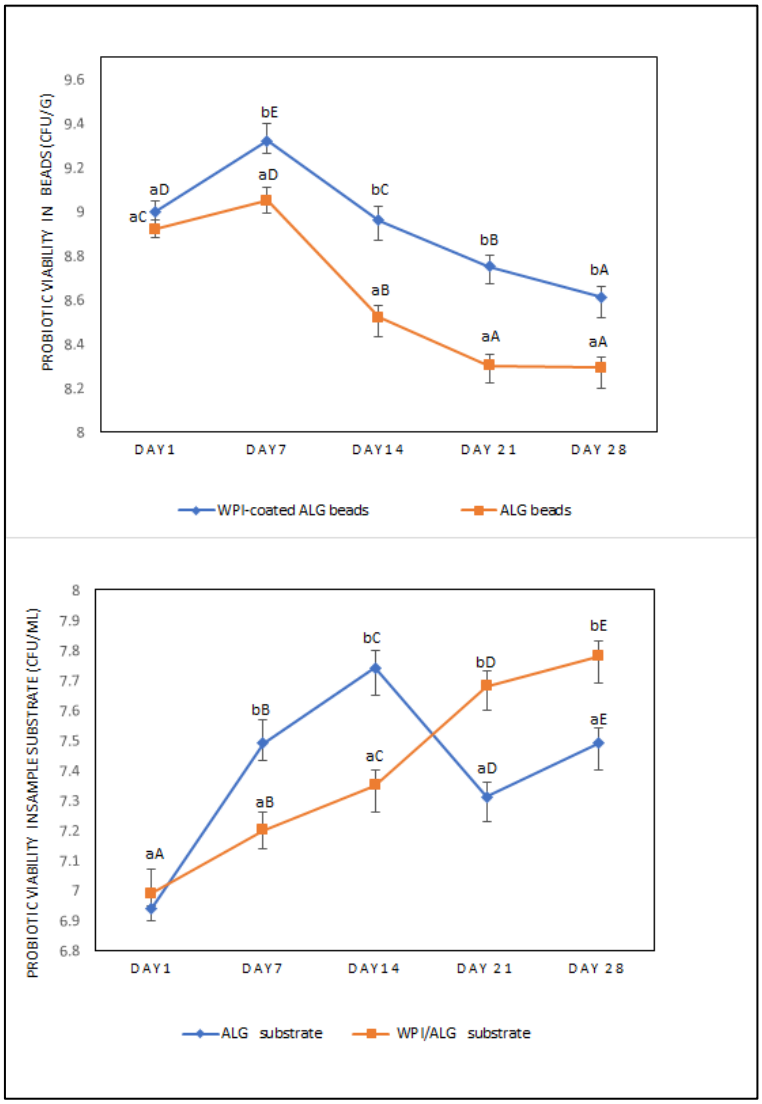


Figure ۳. Viability of probiotic bacteria for encapsulated cells (Log cfu/g) and released cells (Log cfu/ml) in sport drink samples with alginate (ALG) and WPI-coated alginate (WPI/ALG) beads, during 28 days of storage at 4 ˚C. Means in a column shown with different lowercase letters are significantly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

۵- نتیجه گیری

در مطالعهٔ حاضر، WPH به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی به همراه باکتری های پروبیوتیک شامل لاکتوباسیلوس پلانتاریوم و لاکتوباسیلوس کازئی در ماتریکس آلژینات انکپسوله شدند و بعد از پوشش دهی با WPI در نوشیدنی 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

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

۵-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] Krunić, 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] Krunić, 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 Mofid[2], Seyed Amir Mohammad Mortazavian [2]

1- Department of Food Science and Industry, Islamic Azad University, North Branch, Tehran, Iran.
2- Department of Food Science and Industry, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

ARTICLE INFO

Article History:

Received:2023/5/24

Accepted:2024/12/24

Keywords:

Whey permittivity,

Hydrolyzed protein,

Antioxidant,

Encapsulation

DOI: 10.22034/FSCT.22.162.16.

*Corresponding Author E-mhd-rabani@yahoo.com

ABSTRACT

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.