مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

فرمولاسیون نوشیدنی ورزشی سین بیوتیک فراسودمند بر پایهٔ پرمیت آب پنیر هیدرولیزشده

مریم سلطانی[۱]، وحید مفید[۲]*، محمد ربانی[۱]، سید امیر محمد مرتضویان[۲]

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

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

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱٤۰۱/۱۲/۲

تاریخ پذیرش: ۱٤۰۳/۱۲/۱۸

کلمات کلیدی:

پرمیت آب پنیر،

پری‌بیوتیک،

پروبیوتیک،

لاکتوز،

ترکیبات فنولیک

DOI: 10.22034/FSCT.22.163.65.

* مسئول مکاتبات:

vmofid@sbmvaeir

چکیده

نوشیدنی ایزوتونیک مبتنی بر پرمیت آب پنیر با محتوای بالاتر الکترولیت‌ها و کربوهیدرات‌ها، به عنوان یک منبع هیدراتاسیون جایگزین برای نوشیدنی‌های ورزشی معمولی مطرح است. در این مطالعه، نوشیدنی فراسودمند بر پایه پرمیت آب پنیر هیدرولیزشده و تلقیح‌شده با لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس کازئی به غلظت ۱/۳×۱۰۸ CFU.ml-1 تهیه شد. لاکتوز موجود در پرمیت آب پنیر با استفاده از آنزیم β-گالاکتوزیداز هیدرولیز گردید. در این راستا، تأثیر پری‌بیوتیک‌های افزوده شده (اینولین و الیگوفروکتوز) و هیدرولیز لاکتوز بر روی فاکتورهای فیزیکوشیمیایی و میکروبی در طول نگهداری در دمای یخچال بررسی شد. محصول به‌دست‌آمده زنده‌ماندنی خوبی را برای کشت استارتر با مقدار ۱۰۸ CFU.ml-1 پس از ٤ هفته نگهداری در شرایط یخچال نشان داد. افزوده شدن پری‌بیوتیک‌ها به نوشیدنی موجب افزایش قابل توجهی در محتوای فنلی و خاصیت آنتی اکسیدانی محصول شد ($p < 0/05$) . الیگوفروکتوز و اینولین امتیازات حسی را بهبود بخشیدند. تیمار حاوی هر دو پروبیوتیک و پری‌بیوتیک‌ها بالاترین امتیازات حسی را در طول مدت نگهداری نشان دادند ($p < 0/05$). هیدرولیز لاکتوز به همراه بهبود پذیرش نوشیدنی ورزشی، می‌تواند برای افرادی که دچار عدم تحمل لاکتوز هستند، گزینه مناسبی باشد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، این نوشیدنی می‌تواند جایگزین خوبی برای نوشیدنی‌های ورزشی و مواد آلرژی‌زای حاوی لاکتوز باشد.

۱-مقدمه

نوشیدنی‌های ورزشی، مایعاتی هستند که به منظور تأمین آب و الکترولیت‌ها، انرژی و مواد مغذی مورد نیاز بدن ورزشکاران طراحی شده‌اند. این نوشیدنی‌ها معمولاً حاوی آب، الکترولیت‌ها (مانند سدیم و پتاسیم)، کربوهیدرات‌ها و ویتامین‌ها هستند.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].

باکتری‌های پروبیوتیک به علت حساسیت به شرایط محیطی در فرآوری محصولات غذایی و همچنین محیط دستگاه گوارش توان زنده‌مانی کمی دارند که از مهم‌ترین چالش‌های موجود در حوزهٔ تولید و فرآوری محصولات پروبیوتیکی به شمار می‌آید. در این راستا استفاده از مواد پری‌بیوتیک که تحریک‌کنندهٔ رشد پروبیوتیک‌ها در روده هستند و می‌توانند به زنده مانی بهتر آن‌ها در زمان نگهداری محصول کمک کند، در تولید غذاهای پروبیوتیکی ضروری به نظر می‌رسد و برای تولید انبوه و اقتصادی محصولات پروبیوتیکی بسیار مناسب است. از این ترکیبات می‌توان به اینولین و الیگوفروکتوز اشاره کرد[۲].

پری بیوتیک ها کربوئیدراتهای غیر قابل هضمی هستند که به طور انتخابی سبب تحریک رشد و فعالیت تعدادی از باکتری های روده شده و اثرات سودمندی بر میزبان اعمال می کنند. از پری بیوتیک های می توان به اینولین ، صمغ های فیبری ، رافتیلین ، پیرودکسترین ، زایلان ، استاکیوز ، مالتو دکسترین ، لاکتیلول ، گزیلو اولیگوساکارید ، لاکتوسوکروز ، رافیتلوز ، لاکتولوز و فروکتو الیگوساکارید اشاره کرد. در میان الیگو ساکاریدهای غیر قابل هضم، اینولین و الیگو فروکتوز پری بیوتیک های شناخته شده ای هستند که اثرات مفید، آنها به اثبات رسیده بطوریکه به صورت گزینشی توسط باکتریهای مفید روده ای از جمله، بیفیدوباکتریها و لاکتوباسیلوس تخمیر شده، سبب تحریک رشد این باکتریهای مفید در روده می شوند [۳].

اگرچه مطالعات زیادی در زمینه تهیه نوشیدنی از آب پنیر غنی شده با پروبیوتیک ها و پریبیوتیک ها وجود دارد [۵ و ٤]، اما در مورد فرمولاسیون نوشیدنی هیدروالکتریک بر پایه ی پرمیت آب پنیر هیدرولیزشده که همزمان با باکتری های پریبیوتیک و پروبیوتیک ها غنی سازی شده باشد مطالعه ای یافت نشد. هدف این مطالعه تولید نوشیدنی ورزشی فراسودمند بر پایه ی پرمیت آب پنیر به عنوان محصول جانبی به دست آمده از تولید پنیر به همراه پری‌بیوتیک ها (اینولین و الیگوفروکتوز) و باکتری‌های پروبیوتیک شامل لاکتوباسیلوس پلانتاروم[1] و کازئی[2] بود که می تواند بعنوان یک محصول جایگزین کاملا طبیعی و ارزان‌قیمت برای نوشیدنی های ورزشی موجود در بازار معرفی شود.

۲- مواد و روش‌ها

1- Whey Permeate

پرمیت آب پنیر (فرآورده اولترافیلترشده و تغلیظ‌شده از شیر بدون چربی گاو با روش اسمز معکوس) از شرکت لبنیات رامک کرج تهیه شد. اینولین (6 گرم در 100 گرم با درجه پلیمریزاسیون ≤ 23) و الیگوفروکتوز(96 گرم در 100 گرم با درجه پلیمریزاسیون 8) از شرکت (BENEO– Orafti®، برزیل) تهیه شدند. استارتر لاکتوباسیلوس پلانتاریوم [2] (PTCC 1058) و لاکتوباسیلوس کازئی[3]1608) (PTCC از شرکت تک ژن زیست (تهران، ایران) با تعداد سلول‌های زندهٔ اولیه CFU/ml ۱۰[۹] *۱ و محیط کشت MRS[4] آگار توسط از شرکت Ibersco (تهران، ایران) تهیه شد.

۲-۱- هیدرولیز لاکتوز

هیدرولیز پرمیت آب پنیر با pH اولیه 6/45 توسط آنزیم β-گالاکتوزیداز (با منشأ میکروبی از باکتری کلایوروومایسیس لاکتیس) و با غلظت آنزیمی معادل 1/11 گرم در لیتر در شیکر چرخشی (با 150 دور در دقیقه) در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انجام شد. فعالیت این آنزیم برابر با 2000 واحد لاکتاز خنثی به ازای هر گرم آنزیم بود. یک واحد لاکتاز خنثی مقدار آنزیمی است که 3/1 میکرومول o-nitrophenol را در مدت یک دقیقه از o-nitrophenol-B-D-galactoside آزاد می‌کند. سپس از محلول KOH (۱ نرمال) برای تنظیم pH اسیدی محلول آنزیمی و بهینه‌سازی فعالیت آن استفاده شد و pH بر روی 6/5 تنظیم گردید. نمونه‌های به دست آمده در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 4 ساعت انکوبه شدند و در نهایت آنزیم در دمای 60 درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه غیرفعال شد. این دما تقریباً مشابه دمای گزارش شده توسط Beucler و همکاران (2005) است، جایی که آنها از آنزیم لاکتاز در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 3 ساعت برای هیدرولیز پرمیت آب پنیر استفاده کردند و سپس آنزیم را در دمای 63 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه غیرفعال کردند. سپس نمونه‌های آماده‌شده به سرعت تا دمای اتاق خنک شده و در ادامه فیلتر شدند تا کدورت آنها از بین برود[۶].

برای ارزیابی سطح لاکتوز اولیه و قند های حاصل از هیدرولیز لاکتوز از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده شد. یک سیستم HPLC مارک واترز به همراه آشکارساز UV-vis برای تعیین سطح هیدرولیز لاکتوز استفاده شد. در این دستگاه از ستون Eurokat H و فاز متحرک اسید سولفوریک (0/01 نرمال) با سرعت 0/05 میلی لیتر در دقیقه استفاده شد. میزان کمی قند ها بر اساس سطح زیر منحنی محاسبه شد[۷].

۲-۲- آماده‌سازی کشت پروبیوتیکی

سویه‌های باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم (PTCC 1058) و لاکتوباسیلوس کازئی (PTCC 1608) با شماره دستهٔ مشخص از مرکز تک ژن و محیط‌های MRS broth و MRS agar نیز از ایبرسکو تهیه شدند. برای تهیهٔ میزان تلقیح باکتریایی از کشت استوک، سویه‌های باکتری‌های پروبیوتیک در محیط کشت MRS broth در دمای 37 درجهٔ سانتی‌گراد برای زمان 24 ساعت فعال گردیدند و پس از آن کشت دوم از محیط کشت MRS broth بر روی براث دیگر به مدت 24 ساعت و در دمای 37 درجهٔ سانتی‌گراد صورت پذیرفت. سپس لوله‌های استریل تهیه شد و به آنها ۵ میلی‌لیتر از محیط مایع استریل اضافه گشت و از کشت دوم مقادیر مختلفی به داخل کووت منتقل شد و با بهره گیری از اسپکتروفتومتری جذب نوری در طول موج 600 نانومتر که طول موج مخصوص باکتری‌ها و منحنی رشد است، خوانده شد. پس از آن، از این لوله‌های کووت به منظور شمارش تعداد باکتری‌ها استفاده شد و در انتها، لولهٔ کووت که حاوی

2- L. Plantarum

3- L. casei

4- De Man–Rogosa–Sharpe

نیم مک فارلند، معادل $1/3 \times 10^8$ باکتری در هر میلی‌لیتر بود، به منظور تهیه دوز تلقیح انتخاب شد. همچنین، یک قطره از محتوای محیط کشت MRS broth در سطح محیط جامد MRS agar جهت گرفتن تک کلنی خالص کشت شد.

2-3- تهیه ی نوشیدنی ورزشی

100 میلی‌لیتر پرمیت آب پنیر اولترافیلتراسیون و تغلیظ‌شده در فلاسک‌های ارلن مایر 250 میلی‌لیتری قرار گرفت. دو گروه تیماره مختلف به شرح زیر تهیه شدند: (I) پرمیت هیدرولیزشده (v/v) با ٪1 باکتری‌های لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس کازئی، و (II) پرمیت هیدرولیزشده (v/v) با ٪1 باکتری‌های لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس کازئی به همراه ٪1 پری‌بیوتیک (اینولین + الیگوفروکتوز). نمونه‌ها پس از افزودن کشت پروبیوتیکی و پری‌بیوتیک، در دمای 42 درجه سانتی‌گراد جهت تخمیر انکوبه شدند. زمان انکوباسیون 4 تا 4/5 ساعت تا رسیدن به pH برابر با 5 در نظر گرفته شد. سپس محصولات در دمای 4 درجه سانتی‌گراد در یخچال قرار گرفتند و به مدت 28 روز در این شرایط نگهداری شدند.

۲-٤- شمارش باکتری‌های پروبیوتیک

ارزیابی جمعیت پروبیوتیکیِ یک محصول فراسودمند از ضرورت‌های مهم محسوب می‌شود تا معلوم شود جمعیت پروبیوتیکی کل به واسطه وجود دو نوع باکتری پروبیوتیک در طول نگهداری متحمل چه تغییراتی می‌شود.

۲-٤-۱- شمارش باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم

جهت شمارش سلول‌های زنده، روش رقت‌سازی دهگانی و روش کشت پورپلیت[5] به‌کار گرفته شد. به‌منظور تهیه رقت، مقدار ۱۰ سی‌سی از نمونهٔ تولیدی همگن‌شده در کیسه‌های زیپ‌دار استریل حاوی ۹۰ میلی‌لیتر تری سدیم سیترات (2 گرم در 100 گرم) استریل توزین شدند و برای دو دقیقه با دستگاه استومکرSCIENTZ-09 (، چین) همگن گردیدند. توسط سمپلر 1000 -100 میکرولیتری مقدار 1 میلی‌لیتر برای تهیهٔ رقت‌های 10 تایی متوالی در لوله‌های شیشه‌ای محتوای 9 میلی‌لیتر محلول استریل آب پپتونه 0/1% ریخته شد و سری رقت‌ها با افزایش 1 میلی‌لیتر از هر رقت به 9 میلی‌لیتر آب پپتون استریل تهیه گشت. سپس از محتویات هر یک از لوله‌های تهیهٔ رقت 0/1 میلی‌لیتر با سمپلر استریل برداشته شد و در سطح پلیت MRS agar جامد کشت داده شد. پلیت‌ها برای 72 ساعت در دمای 37 درجهٔ سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و تعداد کلنی‌های لاکتوباسیلوس پلانتاروم در نمونه‌های نوشیدنی 1،14 و 28 روز پس از نگهداری در یخچال شمارش شدند. پلیت‌های دارای تعداد قابل‌شمارش از کلنی‌ها و به‌طور معمول پلیت‌های دارای 30 الی 300 کلنی انتخاب گردیدند و کلنی‌های کروی‌شکل، مقعر با قطر 1-1/5 سانتی‌متر با لبه‌های صاف و واضح و یا بدون هاله در اطراف کلنی، شمارش شدند و تعداد کلنی‌های هر پلیت بعد از تعیین تعداد در هر میلی‌لیتر ثبت گردید. محاسبهٔ تعداد کلنی‌های رشدکرده روی آگار به شرح ذیل انجام پذیرفت. رابطهٔ (1):

$$\text{میلی لیتر/کلنی} = \text{تعداد کلنی} \times \frac{1}{\text{فاکتوررقت}}$$

۲-٤-۲- شمارش باکتری لاکتوباسیلوس کازئی

شمارش باکتری لاکتوباسیلوس کازئی با روش پورپلیت و استاندارد صفحه‌ای بر روی محیط MRS agar انجام شد. ابتدا رقت‌های مناسب تهیه گردید و پس از کشت بر روی محیط MRS agar، محیط کشت به مدت 72 ساعت در دمای 37 درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شد و شمارش کلنی صورت پذیرفت [۸].

5- Standard Plate Count

۲-۵- خواص فیزیکوشیمیایی

۲-۵-۱- اندازه‌گیری اسیدیته و pH

جهت ثبات طعم محصول در طول نگهداری، به‌طوری که محصول در روز اول که توسط مصرف‌کننده خریداری می‌شود و روزبیست و هشتم طعمی مشابه داشته باشد، باید تغییرات pH و اسیدیته ارزیابی شود و نمونه‌ای انتخاب گردد که کمترین میزان تغییرات را داشته باشد پس از تولید نوشیدنی، تغییرات pH توسط دستگاه pH متر (Metrohm model 827, Swiss) در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد اندازه گیری شد.

درصد اسیدیته قابل تیتراسیون از مقدار NaOH (0/1 نرمال) مصرف شده برای تیتراسیون 18 گرم از نمونه تا رسیدن به pH نهایی 8/3، محاسبه شد [۹].

۲-۵-۲- ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آزاد

قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH تیمارها با بهره-گیری از روش سانچز و همکاران توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در 517 نانومتر تعیین گردید. DPPH رادیکال چربی دوستی است که در طول موج 517 نانومتر جذب بیشینه دارد. در آزمون DPPH، گروه‌های هیدروکسیل ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با دادن H به رادیکال‌های آزاد DPPHباعث کاهش مولکول‌های DPPH می‌شوند که با تغییر رنگ محلول واکنش از رنگ بنفش تیره به زرد روشن توأم است. در نتیجه جذب کاهش می‌یابد. جذب در طول موج 517 نانومتر مبیّن مقدار DPPH باقیمانده است. بدین منظور،39/43 میلی‌گرم DPPH در100 میلی‌لیتر متانول حل شد، سپس با متانول به نسبت 1 به 10 رقیق گردید. 0/1 میلی‌لیتر از نمونه های نوشیدنی با غلظت‌های مختلف با 3/9 میلی‌لیتر از محلول متانولی 0/1 میلی‌مولار DPPH جهت رسیدن به حجم 4 میلی‌لیتر مخلوط شد و به مدت 30 ثانیه با ورتکس (Stuart مدل SA7) هم زده شد. مخلوط حاصل برای 30 دقیقه جهت انجام واکنش در دمای اتاق و در مکان تاریک قرار گرفت، سپس جذب نوری نمونه‌ها در طول موج 517 نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر در برابر بلانک حاوی متانول خوانده شد. درصد مهار رادیکال‌های آزاد با کمک فرمول زیر محاسبه گردید.

رابطهٔ (3):

$$\%IP = (A_{control} - A_{sample} / A_{control}) \times 100$$

IP درصد مهار رادیکال‌های آزاد. $A_{control}$ جذب کنترل (حاوی همهٔ اجزاء واکنشگر بدون نمونه) و

A_{sample} جذب نمونه (حاوی حجم‌های مختلف عصارهٔ گیاهی، متانول و محلول DPPH) است [۱۰].

2-5-3- اندازه‌گیری ترکیبات فنلی

تعیین کمّی فنول کل با بهره‌گیری از روش طیف‌سنجی براساس واکنش با معرّف فولین- سیوکالتیو[٦] انجام شد. روش فولین- سیوکالتیو از رایج‌ترین روش‌های اندازه‌گیری ترکیبات فنولی محسوب می‌شود. مبنای کار این روش، احیاء معرّف فولین توسط ترکیبات فنولی در محیط قلیایی و ایجاد کمپلکس آبی رنگ است که حداکثر جذب را در طول موج 760 نانومتر نشان می‌دهد. در این روش، 0/5 میلی‌لیتر نمونه نوشیدنی با 2/5 میلی‌لیتر معرف فولین-سیوکالتیو 0/2 نرمال درون لولهٔ آزمایش مخلوط شدند. بعد از گذشت 5 دقیقه، 2 میلی‌لیتر محلول 75 گرم بر لیتر سدیم کربنات به محتوای لوله آزمایش اضافه شد. پس از آن، میزان جذب رنگ نمونه‌ها بعد از گذشت 2 ساعت، با اسپکتروفتومتر در طول موج 760 نانومتر اندازه‌گیری شد و میزان کل ترکیبات فنولی با کمک منحنی استاندارد اسید گالیک (R^2 = 0.9912) بدست آمد. جهت ترسیم نمودار اسید گالیک، از غلظت‌های ٤۰۰ ,۳۵۰ ,۳۰۰ ,۲۵۰ ,۲۰۰ ,۱۰۰,۱۵۰ ,۵۰ ,۲۵ میلی‌گرم بر لیتر از این ماده استفاده شد و در انتها، نتایج به

[٦] Folin- Ciocalteu

صورت میلی گرم اسید گالیک به ازای 100 میلی گرم نمونه گزارش گردید[۱۱].

۳- ارزیابی حسی نمونه‌ها

آثار حسی ناشی از افزودن باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس کازئی و پری‌بیوتیک‌ها به نمونه نوشیدنی با بهره‌گیری از آزمایش قابلیت پذیرش حسی ارزیابی شد. نمونه‌های نوشیدنی در ظروف شیشه‌ای 10 میلی‌لیتری قرار داده شده و به منظور ممانعت از مخدوش شدن نتایج، ظروف به صورت تصادفی کدگذاری شدند. ارزیابی حسی نمونه‌ها پس از یک شب ذخیره‌سازی در دمای 4 درجه سانتی‌گراد توسط 12 داور چشایی و با آزمون هدیونیک پنج امتیازی انجام گرفت. از هر یک از ارزیاب‌ها خواسته شد که ارزیابی رنگ، طعم، بو، احساس دهانی و پذیرش کلی نوشیدنی سین‌بیوتیک را برای هر نمونه 10 میلی‌لیتری با استفاده از عبارات (1) خیلی بد، (2) بد، (3) متوسط، (4) خوب و (5)خیلی خوب ارائه دهند [۱۲].

٤- 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 نتایج آنالیز واریانس (ANOVA)، تست چند دامنه‌ای دانکن[۷] با استفاده از نرم افزار SPSS22 استفاده شد. در تمام آنالیزهای آماری، سطح معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) در نظر گرفته شد.

٥- نتایج و بحث

۵-۱- هیدرولیز لاکتوز

شکل (1) کروماتوگرام هیدرولیز لاکتوز را پس از مخلوط شدن با آنزیم β-گالاکتوزیداز نشان می‌دهد. پیک گلوکز و گالاکتوز (دو جزء اصلی لاکتوز) و همچنین پنتوز (به احتمال زیاد آرابینوز) به ترتیب در 11/7، 14/7 و 20 دقیقه مشاهده شد .بر اساس کروماتوگرام بدست آمده تمام لاکتوز موجود در پرمیت آب پنیر به قند های سازنده اش تبدیل شد. مارتینز و همکاران (۲۰۱۱) هنگامی که از β-گالاکتوزیداز (تولید شده توسط K. lactis) برای هیدرولیز لاکتوز ماست معمولی استفاده کردند، به نتایج مشابهی دست یافتند [۱۳].

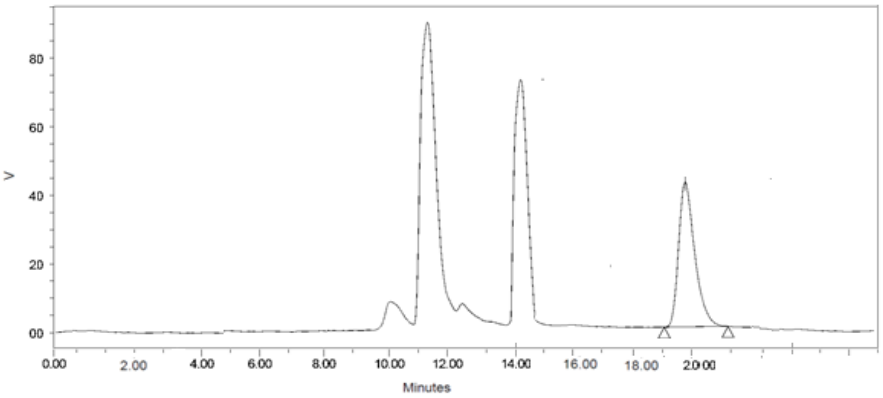

Figure 1. chromatogram of sugar analysis by the HPLC method

7- Duncan

پرمیت آب پنیر هیدرولیزشده و در حضور و عدم حضور اینولین و الیگوفروکتوز را نشان می‌دهد.

5-2- اسیدیته و pH

جدول (1) میزان اسیدیته و pH در نوشیدنی‌های مختلف در طول ۲۸ روز نگهداری در دمای ٤ درجه سانتی گراد بر پایهٔ

Table 1. pH and titratable acidity of samples during storage

Treatment	Storage time	Hydrolyzed permeate/probiotic	Hydrolyzed permeate/probiotic/prebiotic
pH	1st day	4.82 ± 0.189^{dA}	4.84 ± 0.19^{dB}
	7st day	4.72 ± 0.10^{cA}	4.72 ± 0.12^{cB}
	14st day	4.56 ± 0.03^{bA}	4.69 ± 0.23^{bB}
	28st day	4.25 ± 0.32^{aA}	4.50 ± 0.15^{aB}
acidity (%)	1st day	0.68 ± 1.19^{dA}	0.78 ± 1.09^{dB}
	7st day	0.85 ± 0.28^{cA}	0.88 ± 0.08^{cB}
	14st day	1.05 ± 0.15^{bA}	0.97 ± 0.15^{bB}
	28st day	2.68 ± 0.10^{aA}	1.88 ± 0.10^{aB}

standard deviation. Different lowercase letters indicate significance in the column (p ± Numbers are expressed as means <0.05). Different capital letters indicate significance in the row ($p<0.05$)

مطابق جدول ۱، با مقایسه میانگین، بین تیمارهای مختلف تفاوت معناداری مشاهده گردید ($p \leq 0/05$). با افزایش میزان اینولین و الیگوفروکتوز در نوشیدنی، میزان اسیدیته به شکل معناداری کاهش یافت و pH به نحوی معنادار، افزایش پیدا کرد ($p \leq 0/05$). به‌علاوه، با گذشت زمان، اسیدیته به نحوی معنادار افزایش و pH به‌همان نحو، کاهش یافت ($p \leq 0/05$). در مجموع می‌توان چنین نتیجه گرفت که با افزودن اینولین و الیگوفروکتوز به نوشیدنی‌ها، میزان اسیدیته و pH دچار تغییر می‌شود.

طبق نتایج بدست آمده در طی مرحله تخمیر، اسیدیته به واسطهٔ فعالیت سلولهای میکروبی افزایش پیدا کرده است. باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم کازئی، اسید لاکتیک و مجموعه‌ای از اسیدهای آلی مانند استیک اسید تولید می‌کند. کاهش pH و افزایش اسیدیته، با تولید اسیدهای آلی مرتبط است. بر اساس مطالعات، میزان pH در حدود 4/5 -3/5 در فرمولاسیون غذا به کاهش pH دستگاه گوارش می‌انجامد و در نتیجه باعث بالارفتن ثبات پروبیوتیک‌ها می‌شود. همچنین این امر مانع رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌شود [١٤].

عامل اصلی کاهش‌یافتن pH و افزایش اسیدیته در طول دورهٔ ماندگاری، ، ممکن است در نتیجهٔ تجزیهٔ اسیدهای آلی و تولید اسیدهای چرب کوتاه‌زنجیر باشد [١٥]. در مطالعهٔ Shahو همکاران (۲۰۰۱)، اثر پری‌بیوتیک‌های لاکتولوز، اینولین و اولیگوفروکتوز در ماست پروبیوتیک به نتایج مشابهی دربارهٔ اسیدیته و pH اشاره کردند [١٦].

5-3- ترکیبات فنولیک و خاصیت آنتی‌اکسیدانی

تغییر در محتوای فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نوشیدنی‌های تخمیرشده که در دمای 4 درجه به مدت 28 روز ذخیره شده‌اند در جدول (2) نشان داده شده است.

Table 2. Total phenolic content and percentage of DPPH measured for 28 days at 4 ° C

Treatment	Storage time	Hydrolyzed permeate/probiotic	Hydrolyzed permeate/probiotic/prebiotic
TOTAL PHENOL (mg GAE/ 100 mL)	1st day (before fermentation)	17.5 ± 0.05^{aA}	19.5 ± 0.05^{aA}
	1st day (after fermentation)	16.5 ± 0.05^{bB}	25.04 ± 0.16^{aB}

	7st day	20.19 ± 0.75bC	25.96 ± 0.38 aC
	14st day	23.63 ± 1.30bD	26.56 ± 1.8 aD
	28st day	25.20 ± 0.14 bE	28.43 ± 1.25aE
DPPH (%)	1st day (before fermentation)	0.02 ± 0.24bA	0.09 ± 0.24aA
	1st day (after fermentation)	2.14 ± 1.24bB	4.64 ± 1.22aB
	7st day	6.15 ± 1.15bC	9.65 ± 1.05aC
	14st day	8.02 ± 1.45bD	15.32 ± 1.15aD
	28st day	15.37 ± 0.25bE	18.72 ± 1.25aE

Numbers are expressed as means ± standard deviation. Different lowercase letters indicate significance in the column ($p < 0.05$). Different capital letters indicate significance in the row ($p < 0.05$).

ترکیبات فنولیک در هر دو نمونه نوشیدنی، پس از تخمیر به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت ($p < 0/05$)، اما نوشیدنی‌های تخمیرشده حاوی اینولین و الیگو فروکتوز بیشترین میزان ترکیبات فنولیک را داشتند. این امر می‌تواند به‌دلیل هیدرولیز ترکیبات فنلی گلیکوزیلیک و تولید ترکیبات فنلی آزاد از طریق تخمیر باشد [۱۷].

نتایج نشان می‌دهد که تخمیر نوشیدنی‌ها توسط LAB، جزء فعال زیستی نوشیدنی سین‌بیوتیک را حفظ می‌کند [۱۸]. اگرچه یک رژیم غذایی غنی از فیبر غذایی و پلی‌فنول‌ها اثرات مثبتی بر سلامت انسان دارد، اما فعالیت‌های زیستی آنها می‌تواند تحت‌تأثیر فعل‌وانفعالات مولکولی بین یکدیگر قرار گیرد [۱۹].

فعالیت آنتی‌اکسیدانی روند مشابهی را نشان داد. محتوای فنلی کل نوشیدنی عملکردی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی مطابق با جدول (2) همبستگی مثبت داشت. افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی در هر دو مورد در نوشیدنی تخمیرشده دیده شد ولی این میزان بصورت معناداری در نوشیدنی حاوی پریبیوتیک ها بالاتر بود. نتایج ارائه‌شده مطابق با مطالعهٔ Pereira و همکاران (۲۰۱۲) است که تأثیر تخمیر اسید لاکتیکی را بر روی آب سیب بادام هندی ارزیابی کردند [۲۰]. افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نوشیدنی تخمیرشده می‌تواند به‌دلیل افزایش غلظت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند پلی‌فنل، فلاونوئید و بتا کاروتن در طی تخمیر توسط باکتری‌های اسید لاکتیک باشد [۲۱].

افزایش فنول کل طی فرآیند تخمیر و درنتیجه بهبود خاصیت آنتی‌اکسیدانی توسط بسیاری از محققین به اثبات رسیده است و علت آن به هیدرولیز ترکیبات فنولی گلیکوزیل و ایجاد فنول آزاد نسبت داده شده است. میکروارگانیسم‌های یادشده توانایی افزایش فنول را در طی فرآیند تخمیر دارند. با این حال، در نمونهٔ بدون پری‌بیوتیک‌ها، میزان ترکیبات فنولی در طی زمان تغییر کمتری را به نسبت نمونهٔ حاوی پری‌بیوتیک از خود نشان داده‌اند. در پژوهشی مشابه، پژوهشگران بیان داشتند که محتوای فنول کل آب زغال‌اخته، انگور و توت‌فرنگی بعد از تخمیر با سراتیا واکسینی ، افزایش معناداری داشته است، به‌طوری که پس از تخمیر توت‌فرنگی به مدت ۵ روز، مقدار فنل کل از 385 به 771 میلی‌گرم اسید گالیک به‌ازای هر لیتر رسیده است [۲۲].

3-5- شمارش باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پلانتاروم

شکل (2) زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها را در طول نگهداری سرد به مدت 28 روز نشان می‌دهد.

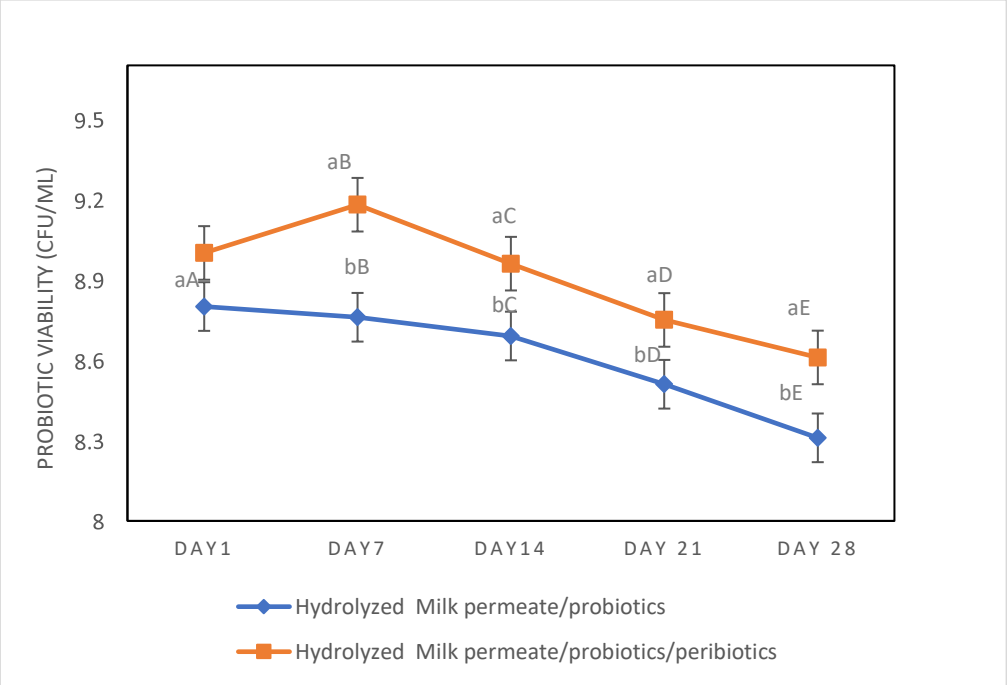

Figure 2. Survival of probiotic bacteria in beverages during storage

نتایج نشان می دهد که باکتری‌های پروبیوتیک در طول ذخیره‌سازی زنده مانی خوبی با شمارش $۱۰^{۸}$ CFU. ml^{-1} داشتند. کاهش میزان باکتری‌های پروبیوتیک در طول ذخیره-سازی ممکن است به کاهش pH محیط و تجمع اسید آلی در نتیجهٔ رشد و تخمیر باکتری‌ها مرتبط باشد. در این راستا، Jayamanne و Adams (۲۰۰۹) کاهش قابل‌توجهی در تعداد زنده‌مانی Bifidobacterium lactis در محصولات در طول زمان نگهداری سرد گزارش کردند [۲۳]. بر اساس نتایج، میزان پروبیوتیک‌ها در تمام تیمارها در پایان هفتهٔ چهارم به حدود $۱۰^{۸}$ CFU.mL^{-1} رسیده است. این میزان، با حد استانداردهای بین‌المللی ($۱۰^{۸}$) برای باکتری‌های پروبیوتیک زنده در هر میلی‌لیتر از محصول در زمان مصرف مطابقت دارد [۲٤]. این نتایج با پژوهش‌های پیشین مطابقت داشت [۲۵].

افزودن پری‌بیوتیک‌ها (اینولین و اولیگو فروکتوز) زنده‌مانی *L. casei* و *L. plantarum* را به نحو چشمگیری ($P < 0/05$) در نوشیدنی‌های سین‌بیوتیک افزایش داد. اثر تحریک‌کنندهٔ پری بیوتیک‌ها بر رشد و زنده مانی باکتری های پروبیوتیک در محصول، با پژوهش‌های مشابه تطابق داشت [۲٦].در این زمینه نوری و همکاران در سال (۲۰۱۷) گزارش دادند که عصارهٔ جوانه چاودار با فعالیت پری‌بیوتیکی رشد و زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک را افزایش داد [۲۷].

٤-۵- ویژگی‌های حسی

جدول (3) امتیازات ارزیابی حسی نمونه‌های نوشیدنی را طی مدت نگهداری نشان می‌دهد. ارزیاب‌ها تغییر حسی چشمگیری را در نمونه‌های مختلف طی 28 روز گزارش کردند ($P < 0/05$).

Table 3. Predominant sensory scores (1–5) * for taste, odour, and overall acceptability of sport drink samples: HWP/Pro (Hydrolyzed Whey Permeate and Probiotic) and HWP/Pro/Pre (Hydrolyzed Whey Permeate, Probiotic, and Prebiotic) for 28 days storage at 4 °C.

parameter	Group	Day(s)				
		1	7	14	21	28
Taste	HWP/Pro	5 ± 0.00^{D}	4.10 ± 0.23^{aC}	4 ± 0.00^{aC}	3.5 ± 0.00^{aB}	**3 ± 0.00^{aA}**
	HWP/Pro/Pre	5 ± 0.00^{D}	5 ± 0.00^{bD}	4.70 ± 0.55^{bC}	4.52 ± 0.85^{bB}	**4.01 ± 0.08^{bA}**
Odour	HWP/Pro	5 ± 0.00^{D}	4.82 ± 0.23^{D}	4 ± 0.00^{aC}	3.6 ± 0.83^{aB}	**3 ± 0.00^{aA}**
	HWP/Pro/Pre	5 ± 0.00^{C}	4.80 ± 0.00^{C}	4.56 ± 0.21^{bB}	4.22 ± 0.24^{bA}	**3.99 ± 0.82^{bA}**
Overall Acceptability	HWP/Pro	5 ± 0.00^{D}	4.5 ± 0.00^{aD}	4 ± 0.00^{aC}	3.54 ± 0.16^{aB}	**3.25 ± 0.23^{aA}**
	HWP/Pro/Pre	5 ± 0.00^{C}	5 ± 0.00^{bC}	4.77 ± 0.16^{bB}	4.50 ± 0.33^{bAB}	**4.20 ± 0.16^{bA}**

Data are means ± SD. 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 ($p < 0.05$).

امتیاز طعم در هر دو گروه بعد از تخمیر قابل قبول ارزیابی شد. دلیل آن را می توان هیدرولیز لاکتوز موجود در پرمیت به قندهای سازنده‌اش قبل از تخمیر دانست. نمونه‌های نوشیدنی حاوی اینولین و اولیگوفروکتوز بالاترین امتیازهای حسی را در طول نگهداری نشان دادند ($p \leq 0/05$). به‌علاوه، با گذشت زمان امتیاز طعم به‌نحو معناداری کاهش پیدا کرد ($p \leq 0/05$). این کاهش می تواند در ارتباط با افزایش درصد اسدیته و کاهش pH در نمونه ها در طول نگهداری باشد. امتیازات حسی مربوط به بو در مقایسه با طعم کمتر بود که ممکن است به علت بوی اسیدی نمونه‌ها باشد.

٦- نتیجه‌گیری

یک نوشیدنی ورزشی بر پایهٔ پرمیت آب پنیر هیدرولیزشده حاوی پروبیوتیک‌های *L. casei* و *L. plantarum* و ترکیبات پری‌بیوتیک شامل اینولین و الیگوفروکتوز طراحی شد تا در کنار بهبود خواص حسی و طعم محصول از طریق هیدرولیز لاکتوز، خواص عملکردی نوشیدنی نیز افزایش یابد. میزان زنده‌مانی قابل‌قبولی از پروبیوتیک‌ها در طول ذخیره‌سازی تا روز ۲۸ مشاهده شد. هیدرولیز لاکتوز به مونوساکارید سازندهٔ آن، خواص حسی نوشیدنی را به طور چشمگیری بهبود بخشید و به‌کارگیری پری‌بیوتیک (اینولین و اولیگوفروکتوز) تاثیر مثبتی بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در طول ذخیره‌سازی داشتند. بنابراین، نوشیدنی ایزوتونیک فراسودمند فرموله‌شده می‌تواند جایگزین مناسبی برای نوشیدنی‌های ورزشی موجود باشد. همچنین این نوشیدنی می‌تواند یک نوشیدنی مناسب برای افراد مبتلا به بیماری عدم‌تحمل لاکتوز در نظر گرفته شود.

۷-منابع

[1] Berry, C. W., Murray, B., & Kenney, W. L. (2022). Scientific basis for a milk permeate-based sports drink–A critical review. *International Dairy Journal*, **127**, 105296.

[2] Gamage, S. M., Mihirani, M. K. S., Perera, O. D. A. N., & Weerahewa, H. L. (2016). Development of synbiotic beverage from beetroot juice using beneficial probiotic

Lactobacillus Casei 431. *Ruhuna Journal of Science*, **7**(2 December).
[3] Ejaz, A., Afzaal, M., Saeed, F., Waliat, S., Shah, Y. A., Imran, A., Akram, N., Asghar, A., Ateeq, H., Alomar, S.Y., & Nawaz, A. (2023). Development and characterization of symbiotic microcapsules to enhance the viability of probiotic under stressed conditions. *International Journal of Food Properties*, **26**(2), 2838-2853.
[4] Rivas, J. C., Cabral, L. M. C., & Rocha-Leão, M. H. M. D. (2021). Microencapsulation of guava pulp using prebiotic wall material. *Brazilian Journal of Food Technology*, *24*, e2020213.
[5] Guimarães, J. T., Silva, E. K., Alvarenga, V. O., Costa, A. L. R., Cunha, R. L., Sant'Ana, A. S., ... & Cruz, A. G. (2018). Physicochemical changes and microbial inactivation after high-intensity ultrasound processing of prebiotic whey beverage applying different ultrasonic power levels. *Ultrasonics sonochemistry*, *44*, 251-260.
[6] Beucler, J., Drake, M., & Foegeding, E. A. (2005). Design of a beverage from whey permeate. *Journal of food science*, *70*(4), S277-S285.

[7] Jeon, I. J., Galitzer, S. J., & Hennessy, K. J. (1984). Rapid determination of lactose and its hydrolyzates in whey and whey permeate by high performance liquid chromatography. *Journal of Dairy Science*, *67*(4), 884-887.

[8] Institute of Standards and Industrial Research of Iran (1393). standard 5272–2.

[9] Becker, A. F., Rebelatto, E., Sabadin, K., Becker, J., Steffens, J., Bagatini, L., ... & Rigo, E. (2021). Evaluation of whey permeate obtained through nanofiltration for the formulation sports drinks. Brazilian Journal of Development, 7(2), 18753-18769.

[10] Gad, A. S., Emam, W. H., Mohamed, G. F., & Sayd, A. F. (2013). Utilization whey in production of functional healthy beverage whey-mango beverages. *American Journal of Food Technology*, **8**(3), 133-148.

[11] AbdulAlim, T. S., Zayan, A. F., Campelo, P. H., & Bakry, A. M. (2018). Development of new functional fermented product: Mulberry-whey beverage. *J Nutr Food Technol*, *1*(3), 64-69.

[12] Stokes, C. N., O'Sullivan, M. G., Kerry, J. P. (2017). Hedonic and descriptive sensory evaluation of instant and fresh coffee products. *European Food Research and Technology*, 243, 331-340.
[13] Martins, A. R., Monteiro, R. L., Burkert, J. F. D. M., & Burkert, C. A. V. (2012). Simultaneous enzymatic hydrolysis and lactic fermentation to obtain a yogurt with low lactose content. *Ciência e Agrotecnologia*, *36*, 551-559.
[14] Garro, M.S., de Valdez, G.F., Oliver, G. and de Giori, G.S., 1998. Growth characteristics and fermentation products of Streptococcus salivarius subsp. thermophilus, Lactobacillus casei and L. fermentum in soymilk. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A, 206(1), pp.72-75.
[15] Pan, X.D., Chen, F.Q., Wu, T.X., Tang, H.G. and Zhao, Z.Y., 2009. Prebiotic oligosaccharides change the concentrations of short-chain fatty acids and the microbial population of mouse bowels. Journal of Zhejiang University SCIENCE B, 10(4), pp.258-263.

[16] Shah, N., 2001. Functional foods from probiotics and prebiotics. Food Technology.55.46-53.
[17] Jayamanne, V.S. and Adams, M.R., 2009. Modelling the effects of pH, storage temperature and redox potential (Eh) on the survival of bifidobacteria in fermented milk. International journal of food science & technology, 44(6), pp.1131-1138.

[18] Khalil, R., El-Halafawy, K., Mahrous, H., Kamaly, K., Frank, J. and El Soda, M., 2007. Evaluation of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from faeces of breast-fed infants in Egypt. African Journal of Biotechnology, 6(7).

[19] Kumar, A. and Kumar, D., 2016. Development of antioxidant rich fruit supplemented probiotic yogurts using free and microencapsulated Lactobacillus rhamnosus culture. Journal of food science and technology, 53(1), pp.667-675.
[20] Pereira ALF, Maciel TC, Rodrigues S. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with Lactobacillus casei. Food Res Int 2011; 44: 1276– 1283.
[21] Pan, X.D., Chen, F.Q., Wu, T.X., Tang, H.G. and Zhao, Z.Y., 2009. Prebiotic oligosaccharides change the concentrations of

short-chain fatty acids and the microbial population of mouse bowels. Journal of Zhejiang University SCIENCE B, 10(4), pp.258-263.

[22] Quirós-Sauceda, A.E., Ayala-Zavala, J.F., Sáyago-Ayerdi, S.G., Vélez-de La Rocha, R., Sañudo-Barajas, A. and González-Aguilar, G.A., 2014. Added dietary fiber reduces the antioxidant capacity of phenolic compounds extracted from tropical fruit. Journal of Applied Botany and Food Quality, 87.

[23] Jayamanne, V.S. and Adams, M.R., 2009. Modelling the effects of pH, storage temperature and redox potential (Eh) on the survival of bifidobacteria in fermented milk. International journal of food science & technology, 44(6), pp.1131-1138.

[24] Tewari, S., Dubey, K.K. and Singhal, R.S., 2018. Evaluation and application of prebiotic and probiotic ingredients for development of ready to drink tea beverage. Journal of food science and technology, 55(4), pp.1525-1534.

[25] Towo, E., Matuschek, E. and Svanberg, U., 2006. Fermentation and enzyme treatment of tannin sorghum gruels: effects on phenolic compounds, phytate and in vitro accessible iron. Food Chemistry, 94(3), pp.369-376.

[26] Wu, S.C., Su, Y.S. and Cheng, H.Y., 2011. Antioxidant properties of Lactobacillus-fermented and non-fermented Graptopetalum paraguayense E. Walther at different stages of maturity. Food Chemistry, 129(3), pp.804-809.

[27] Noori, N., Hamedi, H., Kargozari, M. and Shotorbani, P.M., 2017. Investigation of potential prebiotic activity of rye sprout extract. Food bioscience, 19, pp.

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Formulation of Health Beneficial Synbiotic Sports Drink based on Hydrolyzed Whey Permeate

Maryam Soltani [1], Vahid Mofid *[2], Mohammad Rabbani [1], 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:2023/2/21

Accepted:2025/3/8

Keywords:

whey permeate,

prebiotics,

probiotics,

lactose,

phenolic compounds

DOI: 10.22034/FSCT.22.163.65.

*Corresponding Author E-

vmofid@sbmvaeir

.ABSTRACT

An isotonic beverage based on whey permeate with higher levels of electrolytes and carbohydrates is presented as an alternative hydration source to conventional sports drinks. In this study, a functional beverage was prepared from hydrolyzed whey permeate inoculated with Lactobacillus plantarum and Lactobacillus casei at a concentration of 1 × 108 CFU/ml. The lactose present in whey permeate was hydrolyzed using the enzyme β-galactosidase. In this context, the effects of added prebiotics (inulin and oligofructose) and lactose hydrolysis on physicochemical and microbiological factors during storage in refrigeration were examined. The resulting product exhibited good viability for the starter culture, maintaining a concentration of 1 × 108 CFU/ml after 4 weeks of refrigeration. The addition of prebiotics significantly increased the phenolic content and antioxidant properties of the beverage ($p < 0.05$). Oligofructose and inulin improved the sensory attributes. The treatment containing both probiotics and prebiotics showed the highest sensory scores throughout the storage period ($p < 0.05$). Lactose hydrolysis, along with improved acceptability of the sports beverage, may provide a suitable option for individuals with lactose intolerance. Based on the results obtained, this beverage can be a good alternative to sports drinks and allergenic products containing lactose.