



مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی-پژوهشی

فرمولاسیون نوشیدنی ورزشی سین بیوتیک فراسودمند بر پایه 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 علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

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

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله : تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۱۸ کلمات کلیدی: پرمیت آب پنیر، پری بیوتیک، پرو بیوتیک، لاکتوز، ترکیبات فنولیک	نوشیدنی ایزوتونیک مبتنی بر پرمیت آب پنیر با محتوای بالاتر الکترولیت ها و کربوهیدرات ها، به عنوان یک منبع هیدراتاسیون جایگزین برای نوشیدنی های ورزشی معمولی مطرح است. در این مطالعه، نوشیدنی فراسودمند بر پایه پرمیت آب پنیر هیدرولیزشده و تلفیح شده با لاکتوباسیلوس پلاننتاروم و لاکتوباسیلوس کازئی به غلظت 1×10^8 CFU.ml⁻¹ تهیه شد. لاکتوز موجود در پرمیت آب پنیر با استفاده از آنزیم β-گالاکتوزیداز هیدرولیز گردید. در این راستا، تأثیر پری بیوتیک های افزوده شده (اینولین و الیگوفروکتوز) و هیدرولیز لاکتوز بر روی فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی و میکروبی در طول نگهداری در دمای یخچال بررسی شد. محصول به دست آمده زنده ماندنی خوبی را برای کشت استارتر با مقدار 1×10^8 CFU.ml⁻¹ پس از ۴ هفته نگهداری در شرایط یخچال نشان داد. افزوده شدن پری بیوتیک ها 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 پرو بیوتیک و پری بیوتیک ها بالاترین امتیازات حسی را در طول مدت نگهداری نشان دادند ($p < 0/05$). هیدرولیز لاکتوز به همراه بهبود پذیرش نوشیدنی ورزشی، می تواند برای افرادی که دچار عدم تحمل لاکتوز هستند، گزینه مناسبی باشد. بر اساس نتایج به دست آمده، این نوشیدنی می تواند جایگزین خوبی برای نوشیدنی های ورزشی و مواد آلرژی زای حاوی لاکتوز باشد.
DOI: 10.22034/FSCT.22.163.65. * مسئول مکاتبات: vmofid@sbmvaecir	

۱- مقدمه

است. از این ترکیبات می‌توان به اینولین و الیگوفروکتوز اشاره کرد [۲].

پری بیوتیک‌ها کربوئیدراتهای غیر قابل هضمی هستند که به طور انتخابی سبب تحریک رشد و فعالیت تعدادی از باکتری‌های روده شده و اثرات سودمندی بر میزبان اعمال می‌کنند. از پری بیوتیک‌های می‌توان به اینولین، صمغ‌های فیبری، رافیتیلین، پیرو دکستترین، زایلان، استاکیوز، مالتو دکستترین، لاکتیلول، گزیلو اولیگوساکارید، لاکتوسوکروز، رافیتلوز، لاکتولوز و فروکتو الیگوساکارید اشاره کرد. در میان الیگو ساکاریدهای غیر قابل هضم، اینولین و الیگو فروکتوز پری بیوتیک‌های شناخته شده‌ای هستند که اثرات مفید، آنها به اثبات رسیده بطوریکه به صورت گزینشی توسط باکتریهای مفید روده‌ای از جمله، بیفیدوباکتریها و لاکتوباسیلوس تخمیر شده، سبب تحریک رشد این باکتریهای مفید در روده می‌شوند [۳].

اگرچه مطالعات زیادی در زمینه تهیه نوشیدنی از آب پنیر غنی شده با پروبیوتیک‌ها و پریبیوتیک‌ها وجود دارد [۵] و [۴]، اما در مورد فرمولاسیون نوشیدنی هیدروالکتریک بر پایه ی پرمیت آب پنیر هیدرولیز شده که همزمان با باکتری‌های پریبیوتیک و پروبیوتیک‌ها غنی سازی شده باشد مطالعه‌ای 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 پری بیوتیک‌ها (اینولین و الیگوفروکتوز) و باکتری‌های پروبیوتیک شامل لاکتوباسیلوس پلانتروم^۱ و کازئی^۲ بود که می‌تواند بعنوان یک محصول جایگزین کاملاً طبیعی و ارزان قیمت برای نوشیدنی‌های ورزشی موجود در بازار معرفی شود.

۲- مواد و روش‌ها

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 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].

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 حوزه تولید و فرآوری محصولات پروبیوتیکی به شمار می‌آید. در این راستا استفاده از مواد پری بیوتیک که تحریک کننده رشد پروبیوتیک‌ها در روده هستند و می‌توانند به زنده‌مانی 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

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 پلانتراروم (PTCC 1058) و لاکتوباسیلوس کازئی (PTCC 1608) با شماره دسته مشخص از مرکز تک ژن و محیط‌های MRS broth و MRS agar نیز از ایبرسکو تهیه شدند. برای تهیه میزان تلقیح باکتریایی از کشت استوک، سویه‌های باکتری‌های پروبیوتیک در محیط کشت MRS broth در دمای 37 درجه 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 درجه 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 بهره‌گیری 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، لوله کووت که حاوی

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 (BENE-O-Rafti®، برزیل) تهیه شدند. استارتر لاکتوباسیلوس پلانتراریوم² (PTCC 1058) و لاکتوباسیلوس کازئی³ (PTCC 1608) از شرکت تک ژن زیست (تهران، ایران) با تعداد سلول‌های زنده اولیه 10^9 CFU/ml و محیط کشت MRS⁴ 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 کلائیورومایسس 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-B-D-galactoside در مدت یک دقیقه از o-nitrophenol 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 Beuceler 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

4- De Man-Rogosa-Sharpe

2- L. Plantarum

3- L. casei

نیم مک فارلند، معادل $10^8 \times 1/3$ 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 پلانتروم و لاکتوباسیلوس کازئی، و (II) پرمیت هیدرولیزشده (v/v) با 1٪ باکتری‌های لاکتوباسیلوس پلانتروم 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.

2-4- شمارش باکتری‌های پروبیوتیک

ارزیابی جمعیت پروبیوتیکی 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.

2-4-1- شمارش باکتری لاکتوباسیلوس پلانتروم

جهت شمارش سلول‌های زنده، روش رقت‌سازی دهگانی و روش کشت پورپلیت^۵ به‌کار گرفته شد. به‌منظور تهیه رقت، مقدار ۱۰ سی‌سی از نمونه تولیدی همگن‌شده در کیسه‌های زیپ‌دار استریل حاوی ۹۰ میلی‌لیتر تری سدیم سترات (2)

گرم در 100 گرم) استریل توزین شدند و برای دو دقیقه با دستگاه استومکر SCIENTZ-09، (چین) همگن گردیدند. توسط سمپلر 1000-100 میکرولیتری مقدار 1 میلی‌لیتر برای تهیه رقت‌های 10 تایی متوالی در لوله‌های شیشه‌ای محتوای 9 میلی‌لیتر محلول استریل آب پیتونه 0/1٪ ریخته شد و سری رقت‌ها با افزایش 1 میلی‌لیتر از هر رقت به 9 میلی‌لیتر آب پیتون استریل تهیه گشت. سپس از محتویات هر یک از لوله‌های تهیه 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 درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و تعداد کلنی‌های لاکتوباسیلوس پلانتروم در نمونه‌های نوشیدنی 14، 1 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. محاسبه تعداد کلنی‌های رشدکرده روی آگار به شرح ذیل انجام پذیرفت. رابطه (1):

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

2-4-2- 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 درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد و شمارش کلنی صورت پذیرفت [۸].

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 روزیست 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 اندازه‌گیری شد.

درصد اسیدیته قابل تیتراسیون از مقدار 0/1 NaOH (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 بهره‌گیری 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 DPPH باعث 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 مبین مقدار DPPH باقیمانده است. بدین منظور، 39/43 میلی‌گرم DPPH در 100 میلی‌لیتر متانول حل شد، سپس با متانول به نسبت 1 به 10 رقیق گردید. 0/1 میلی‌لیتر از نمونه‌های 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.

رابطه (3):

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

IP درصد مهار رادیکال‌های آزاد. A_{control} جذب کنترا (حاوی همه اجزاء واکنشگر بدون نمونه) و

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

2-5-3- اندازه‌گیری ترکیبات فنلی

تعیین کمی فنول کل با بهره‌گیری از روش طیف‌سنجی براساس واکنش با معرف فولین-سیوکالتیو^۶ انجام شد. روش فولین-سیوکالتیو از رایج‌ترین روش‌های اندازه‌گیری ترکیبات فنولی محسوب می‌شود. مبنای کار این روش، احیاء معرف 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 لوله 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 ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از این ماده استفاده شد و در انتها، نتایج به

۴- 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 حاصل شده، 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 ($p < 0.05$) در نظر گرفته شد.

۵- نتایج و بحث

۵-۱- هیدرولیز لاکتوز

شکل (۱) 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 ۱۱/۷، ۱۴/۷ و ۲۰ دقیقه مشاهده شد. بر اساس کروماتوگرام بدست آمده تمام لاکتوز موجود در پریمیت آب پنیر به قند‌های 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].

صورت میلی گرم اسید گالیک به ازای ۱۰۰ میلی گرم نمونه گزارش گردید [۱۱].

۳- ارزیابی حسی نمونه‌ها

آثار حسی ناشی از افزودن باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتروم، لاکتوباسیلوس کازئی و پریبیوتیک‌ها به نمونه نوشیدنی با بهره‌گیری از آزمایش قابلیت پذیرش حسی ارزیابی شد. نمونه‌های نوشیدنی در ظروف شیشه‌ای ۱۰ میلی‌لیتری قرار داده شده و به منظور ممانعت از مخلوش شدن نتایج، ظروف به صورت تصادفی کدگذاری شدند. ارزیابی حسی نمونه‌ها پس از یک شب ذخیره‌سازی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد توسط ۱۲ 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 سین بیوتیک را برای هر نمونه ۱۰ میلی‌لیتری با استفاده از عبارات (۱) خیلی بد، (۲) بد، (۳) متوسط، (۴) خوب و (۵) خیلی خوب ارائه دهند [۱۲].

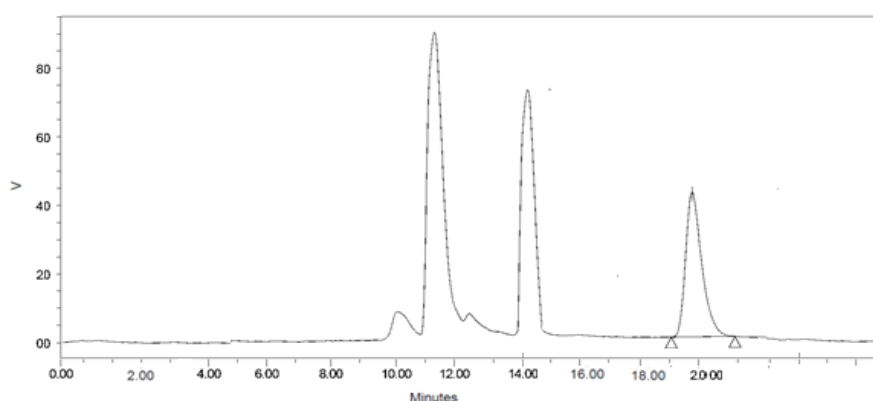


Figure 1. chromatogram of sugar analysis by the HPLC method

پرمیت آب پنیر هیدرولیز شده و در حضور و عدم حضور اینولین و الیگوفروکتوز را نشان می دهد.

5-2- اسیدیته و pH

جدول (1) میزان اسیدیته و pH در نوشیدنی های مختلف در طول ۲۸ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد بر پایه

Table 1. pH and titratable acidity of samples during storage

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

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

و در نتیجه باعث بالارفتن ثبات پروبیوتیک ها می شود. همچنین این امر مانع رشد میکروارگانیسم های بیماری زا می شود [۱۴].

عامل اصلی کاهش یافتن pH و افزایش اسیدیته در طول دوره ماندگاری، ممکن است در نتیجه تجزیه اسیدهای آلی و تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیر باشد [۱۵]. در مطالعه Shah و همکاران (۲۰۰۱)، اثر پری بیوتیک های لاکتولوز، اینولین و اولیگوفروکتوز در ماست پروبیوتیک به نتایج مشابهی درباره اسیدیته و pH اشاره کردند [۱۶].

5-3- ترکیبات فنولیک و خاصیت آنتی اکسیدانی

تغییر در محتوای فنل کل و فعالیت آنتی اکسیدانی در نوشیدنی های تخمیر شده که در دمای ۴ درجه به مدت ۲۸ روز ذخیره شده اند در جدول (۲) نشان داده شده است.

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 ($p \leq 0/05$). به علاوه، با گذشت زمان، اسیدیته به نحوی معنادار افزایش و pH به همان نحو، کاهش یافت ($p \leq 0/05$). در مجموع می توان چنین نتیجه گرفت که با افزودن اینولین و الیگوفروکتوز به نوشیدنی ها، میزان اسیدیته و pH دچار تغییر می شود.

طبق نتایج بدست آمده در طی مرحله تخمیر، اسیدیته به واسطه فعالیت سلولهای میکروبی افزایش پیدا کرده است. باکتری لاکتوباسیلوس پلانتروم کازئی، اسید لاکتیک و مجموعه ای از اسیدهای آلی مانند استیک اسید تولید می کند. کاهش pH و افزایش اسیدیته، با تولید اسیدهای آلی مرتبط است. بر اساس مطالعات، میزان pH در حدود ۳/۵- ۴/۵ در فرمولاسیون غذا به کاهش pH دستگاه گوارش می انجامد

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)	1 st day (before fermentation)	17.5 ± 0.05 ^{aA}	19.5 ± 0.05 ^{aA}
	1 st day (after fermentation)	16.5 ± 0.05 ^{bB}	25.04 ± 0.16 ^{aB}

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

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 ($p < 0.05$).

[۲۰]. افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نوشیدنی تخمیر شده می‌تواند به دلیل 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 در نتیجه 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 یاد شده توانایی افزایش فنول را در طی فرآیند تخمیر دارند. با این حال، در نمونه بدون پری‌بیوتیک‌ها، میزان ترکیبات فنولی در طی زمان تغییر کمتری را به نسبت نمونه 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 ۳۸۵ به ۷۷۱ میلی‌گرم اسید گالیک به‌ازای هر لیتر رسیده است [۲۲].

3-5- شمارش باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پلاننتاروم

ترکیبات فنولیک در هر دو نمونه نوشیدنی، پس از تخمیر به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت ($p < 0/05$)، اما نوشیدنی-های تخمیر شده حاوی اینولین و الیگو فروکتوز بیشترین میزان ترکیبات فنولیک را داشتند. این امر می‌تواند به دلیل هیدرولیز ترکیبات فنولی 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 تحت تأثیر 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 (۲) همبستگی مثبت داشت. افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در هر دو مورد در نوشیدنی تخمیر شده دیده شد ولی این میزان بصورت معناداری در نوشیدنی حاوی پری‌بیوتیک‌ها بالاتر بود. نتایج ارائه شده مطابق با مطالعه Pereira و همکاران (۲۰۱۲) است که تأثیر تخمیر اسید لاکتیکی را بر روی آب سیب بادام هندی ارزیابی کردند

شکل (۲) زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها را در طول نگهداری سرد به مدت ۲۸ روز نشان می‌دهد.

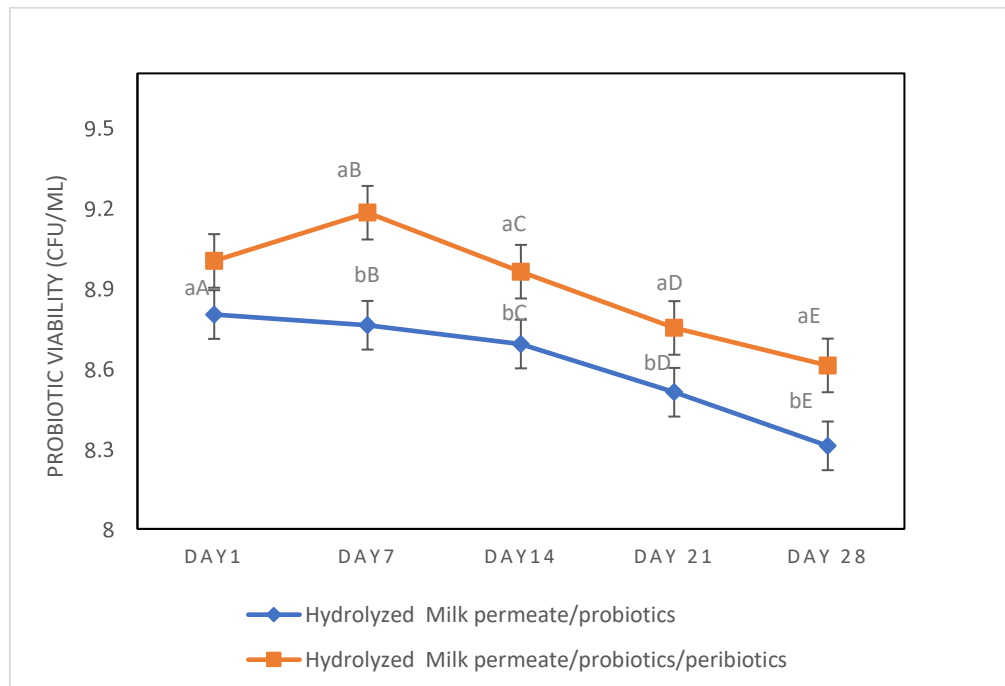


Figure 2. Survival of probiotic bacteria in beverages during storage

تحریک‌کننده پری بیوتیک‌ها بر رشد و زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در محصول، با پژوهش‌های مشابه تطابق داشت [۲۶]. در این زمینه نوری و همکاران در سال (۲۰۱۷) گزارش دادند که عصاره جوانه چاودار با فعالیت پری بیوتیکی رشد و زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک را افزایش داد [۲۷].

۵-۴- ویژگی‌های حسی

جدول (۳) امتیازات ارزیابی حسی نمونه‌های نوشیدنی را طی مدت نگهداری نشان می‌دهد. ارزیاب‌ها تغییر حسی چشمگیری را در نمونه‌های مختلف طی ۲۸ روز گزارش کردند ($P < 0/05$).

نتایج نشان می‌دهد که باکتری‌های پروبیوتیک در طول ذخیره‌سازی زنده‌مانی خوبی با شمارش 10^8 CFU. mL⁻¹ داشتند. کاهش میزان باکتری‌های پروبیوتیک در طول ذخیره‌سازی ممکن است به کاهش pH محیط و تجمع اسید آلی در نتیجه رشد و تخمیر باکتری‌ها مرتبط باشد. در این راستا، Jayamanne و Adams (۲۰۰۹) کاهش قابل توجهی 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 هفته چهارم به حدود 10^8 CFU.mL⁻¹ رسیده است. این میزان، با حد استانداردهای بین‌المللی (10^8) برای باکتری‌های پروبیوتیک زنده در هر میلی‌لیتر از محصول در زمان مصرف مطابقت دارد [۲۴]. این نتایج با پژوهش‌های پیشین مطابقت داشت [۲۵].

افزودن پری بیوتیک‌ها (اینولین و اولیگو فروکتوز) زنده‌مانی *L. plantarum* و *L. casei* را به نحو چشمگیری ($P < 0/05$) در نوشیدنی‌های سین بیوتیک افزایش داد. اثر

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 ($p < 0.05$).

ترکیبات پری بیوتیک 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 زنده ماندن قابل قبولی از پروبیوتیک ها در طول ذخیره سازی تا روز ۲۸ مشاهده شد. هیدرولیز لاکتوز به مونوساکارید سازنده آن، خواص حسی نوشیدنی را به طور چشمگیری بهبود بخشید و به کارگیری پری بیوتیک (اینولین و الیگوفروکتوز) تاثیر مثبتی بر زنده ماندن باکتری های پروبیوتیک در طول ذخیره سازی داشتند. بنابراین، نوشیدنی ایزوتونیک فراسودمند فرموله شده می تواند جایگزین مناسبی برای نوشیدنی های ورزشی موجود باشد. همچنین این نوشیدنی می تواند یک نوشیدنی مناسب برای افراد مبتلا به بیماری عدم تحمل لاکتوز در نظر گرفته شود.

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 سازنده اش قبل از تخمیر دانست. نمونه های نوشیدنی حاوی اینولین و الیگوفروکتوز بالاترین امتیازهای حسی را در طول نگهداری نشان دادند ($p \leq 0/05$). به علاوه، با گذشت زمان امتیاز طعم به نحو معناداری کاهش پیدا کرد ($p \leq 0/05$). این کاهش می تواند در ارتباط با افزایش درصد اسدیت 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 نمونه ها باشد.

۶- نتیجه گیری

یک نوشیدنی ورزشی بر پایه پرمیت آب پنیر هیدرولیز شده حاوی پروبیوتیک های *L. plantarum* و *L. casei* و

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., Hamed, 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, Science and Research Unit, Tehran, Iran.

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

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Article History: Received: 2023/2/21 Accepted: 2025/3/8 Keywords: whey permeate, prebiotics, probiotics, lactose, phenolic compounds DOI: 10.22034/FSCT.22.163.65. *Corresponding Author E- vmofid@sbmvaeir	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 <i>Lactobacillus plantarum</i> and <i>Lactobacillus casei</i> at a concentration of 1×10^8 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 1×10^8 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.