

بهینه‌سازی و بررسی خواص فیزیکوشیمیایی، میکروبی و حسی نوشیدنی پروبیوتیک پرتقالی تولید شده بر پایه تراوه

رضا امیر خمیریان^۱، حسین جوینده^{۲*}، جواد حصاری^۳، حسن برزگر^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تبریز

۴- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

(تاریخ دریافت: ۹۳/۰۶/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۷/۰۷)

چکیده

تراوه، محصول جانبی تولید شده از فرایند فرابالایش شیر یا آب پنیر می‌باشد که به دلیل طعم نامطلوب چندان مورد توجه تولیدکنندگان مواد غذایی و محققین قرار نگرفته است. یکی از بهترین راه حل‌هایی که می‌تواند جهت استفاده عموم مصرف کنندگان از این ضایعات پیشنهاد گردد، تولید نوشیدنی‌های پروبیوتیک می‌باشد. به این ترتیب، علاوه بر افزایش ارزش غذایی پساب، می‌توان محصولی نسبتاً ارزان با خواص عمل‌کنندگی و درمانی قابل توجه تولید نمود. در این تحقیق، ابتدا فرمولاسیون نوشیدنی میوه‌ای بر پایه تراوه با استفاده از روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی بهینه گردید. بر اساس نتایج آزمون‌های ابتدایی، مقادیر تراوه (۹۷/۰۴-۱۲/۹۵ ml)، آب (۷۰/۲۲-۱۹/۷۷ ml) و کنسانتره پرتقال (۵/۵۹-۱۶/۰۴ g) به عنوان متغیرهای ثابت آزمایش در نظر گرفته شد. با ارزیابی نتایج، فرمول بهینه‌ای شامل ۴۵/۶۳ میلی‌لیتر آب، ۳۸/۷۵ میلی‌لیتر تراوه و ۱۴ گرم کنسانتره تعیین شد. پس از پاستوریزاسیون نوشیدنی بهینه، این نوشیدنی با استفاده از باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس* (LA5) تلقیح شد و به مدت ۴ هفته در یخچال (دمای ۴°C) نگهداری گردید و آزمون‌های فیزیکوشیمیایی، حسی و میکروبی مورد نظر انجام پذیرفت. نتایج نشان داد نوشیدنی‌ها در تمامی مدت ۲۸ روز نگهداری، حاوی تعداد قابل توجهی باکتری‌های پروبیوتیک (10^6 cfu/ml) بودند. نوشیدنی پرتقالی تهیه شده پس از پایان دوره نگهداری حاوی مقدار $100\text{ g}/22/48\text{ mg}$ فنل کل، خواص آنتی-اکسیدانی $1/48\text{ }\mu\text{mol/g}$ برحسب تروکس و $3/73\text{ }\mu\text{mol/g}$ برحسب آهن II و مقدار $100\text{ g}/7/3\text{ mg}$ ویتامین C بود.

کلید واژگان: تراوه، باکتری‌های پروبیوتیک، نوشیدنی آب پرتقال، روش سطح پاسخ

۱- مقدمه

اطبای قدیم از آب پنیر برای معالجه برخی از بیماری‌ها استفاده می‌کردند. مشکل مصرف آب پنیر به عنوان نوشابه، بویژه عطر و طعم نامناسب آن می‌باشد. ساده‌ترین راه پوشانیدن این عیب مخلوط کردن آب پنیر با آن گروه از آب میوه‌جات است که می‌توانند عطر نامطلوب آن را به خوبی بپوشانند [۱]. در طی عمل فرایالایش یا اولترافیلتراسیون، شیر یا آب پنیر به دو جزء تبدیل می‌شود: ۱) رتنتیت^۱ یا ناتراوه که علاوه بر استفاده در پنیرسازی می‌تواند به عنوان افزودنی در برخی از نوشیدنی‌ها بکار رود و نقش آن در این نوشیدنی‌ها بهبود بافت، افزایش ارزش غذایی و بهبود طعم می‌باشد؛ ۲) پرمیت^۲ یا تراوه، که با داشتن خواص تغذیه‌ای خوب از جمله پروتئین‌ها و املاح قابلیت کاربرد در فراورده‌های دیگر را داشته و می‌توان از این طریق مانع اتلاف این ماده بالارزش و از طرفی جلوگیری از آلودگی محیط زیست گردید [۲].

براساس گزارش USDA، مقدار ترکیبات تراوه حاصل از فرایند تولید WPC^۳ یا WPI^۴ شامل (۰/۵٪) لاکتوز، (۹۳٪) آب و (۵۳٪) مواد معدنی با حداقل (۰/۱٪) چربی و (۰/۸۵٪) پروتئین می‌باشد [۳]. بنابر گزارش های وزارت صنایع و معادن، آمار تولید پنیر با روش اولترافیلتراسیون در ایران حدود ۲۵۱۰۰۰ تن و مقدار تراوه حاصل از آن در حدود ۱۰۰۰۰۰ تن در سال است [۴]. اگرچه در حال حاضر بخشی از تراوه تولیدی به صورت پودر تولید و در صنایع مختلف غذایی از جمله شیرینی‌سازی، قنادی و شکلات‌سازی استفاده می‌شود [۵] اما با معرفی روش‌های مناسب دیگر می‌توان به طور مؤثرتری از اتلاف این ماده مغذی جلوگیری کرد. افزایش ظرفیت جذب آب و بهبود رنگ بویژه در محصولات نانوائی از جمله شناخته شده‌ترین کاربردهای تراوه می‌باشد. تراوه در سال‌های اخیر برای تولید اسیدهای آلی بویژه اسید لاکتیک و استیک مورد توجه قرار گرفته است [۶]. پژوهش‌های محدودی نیز در مورد استفاده از تراوه در صنایع غذایی انجام شده است. Rustom و همکاران با استفاده از لاکتوز موجود در تراوه، الیگوساکاریدهایی برای غذاهای عملگرا تولید نمودند [۷]. در این تحقیق از بتا-گالاکتوزیداز برای هیدرولیز لاکتوز

استفاده گردید. Geilman و همکاران با استفاده از تراوه هیدرولیز شده، نوشیدنی الکترولیت تولید نمودند [۸]. نوشیدنی‌های ورزشی یا الکترولیت برای آبرسانی طراحی شده و در دسته آشامیدنی‌های عملگرا قرار می‌گیرند. در حال آنها گزارش نمودند که نوشیدنی تهیه شده با ۱۰۰ درصد تراوه مزه شوری دارد.

امروزه فراورده‌های پروبیوتیک به عنوان مکمل‌های طبیعی زنده، در صنایع غذایی و دارویی اهمیت ویژه‌ای پیدا نموده‌اند. اثرات مفیدی نظیر کاهش کلسترول خون، افزایش قدرت سیستم ایمنی بدن، اثر ضد سرطانی و ضد جهش‌زا بودن آن، مقابله با میکروارگانیسم‌های مضر دستگاه گوارش و بسیاری اثرات مفید دیگر محققین را بر آن داشته است تا با استفاده از مواد غذایی طبیعی نظیر فراورده‌های شیری و غیره، محصولات پروبیوتیکی تولید نمایند [۵ و ۹-۱۲]. فلور میکروبی روده در یک فرد غالباً ثابت است هر چند که این فلور در افراد مختلف ممکن است متفاوت باشد [۹]. با این حال تجویز پروبیوتیک‌ها هم در نوزادان تازه متولد شده و هم در بزرگسالان منجر به تغییر در پروفایل میکروبی و فعالیت‌های متابولیکی مدفوع می‌شود. هر چند این تغییرات اندک است اما در صورت تجویز در شرایط پاتولوژیک اکثراً برای بهبود بیماری کافی است [۱۰]. در برخی افراد، رشد این باکتری‌ها به دلیل استفاده از داروهای مختلف، آنتی‌بیوتیک‌ها، استرس یا برخی از عوامل ناشناخته کاهش یافته و در نتیجه باعث بروز علائم مختلفی از جمله مشکلات گوارشی می‌گردد [۱۱]. مصرف محصولات لبنی تخمیری حاوی کشت‌های بیفیدوباکتر و لاکتوباسیلوس در استقرار دوباره این ارگانیسم‌ها در روده کمک می‌کند و در نتیجه از رشد باکتری‌های مضر جلوگیری کرده و باعث افزایش ویژگی‌های درمانی محصول می‌شود [۱۰]. در این میان، باتوجه به اثرات درمانی منحصربه‌فرد و همچنین زنده‌مانی بهتر لاکتوباسیلوس /سیدوفیلوس در حین نگهداری مواد غذایی اسیدی، استفاده از این باکتری در تولید محصولات تخمیری شیر بیشتر مورد توجه قرار گرفته است [۱۲]. Shukla و Admassu در پژوهشی به بررسی توسعه نوشیدنی پروبیوتیک با نسبت‌های مختلف عصاره آناناس به آب پنیر و با استفاده از لاکتوباسیلوس /سیدوفیلوس در مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷°C پرداختند [۱۳]. نتایج آن‌ها نشان داد نمونه شامل ۶۵:۳۵ عصاره آناناس: تراوه، بهترین

1. Retentet
2. Permeat
3. Whey protein concentrate
4. Whey protein isolate

نمونه از لحاظ حسی بود و میزان لاکتوباسیلوس/سیدوفیلوس آن بعد از ۲۴ ساعت بیش از 10^8 cfu.ml⁻¹ گزارش گردید. محصولات لبنی یکی از مهم‌ترین مواد غذایی است که مورد مصرف محدوده وسیعی از مصرف‌کنندگان مواد غذایی می‌باشد. این حجم زیاد استقبال موجب گردیده است تولید کنندگان صنایع لبنی تلاش دو چندانی برای ایجاد تنوع در فرمولاسیون محصولات انجام دهند. در این پژوهش سعی بر آن بوده است تا نوشیدنی پروبیوتیک پرتقالی نسبتاً ارزان با خواص حسی مطلوب و خصوصیات تغذیه‌ای و عملکردی بالا برای عموم مصرف کنندگان تولید شود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد مورد استفاده

تراوه مورد استفاده از شرکت شیر پاستوریزه پگاه آذربایجان شرقی و کنسانتره پرتقال از شرکت تکدانه مرنند تهیه گردیدند. به منظور تثبیت سیستم کلونیدی نوشیدنی حاصل و جلوگیری از رسوب پروتئین‌ها در محیط اسیدی و در اثر فرایند حرارتی، مخلوط صمغ عربی-سدیم کازئینات براساس آزمون‌های مقدماتی به ترتیب به مقدار ۰/۲ و ۰/۵ درصد وزنی/حجمی انتخاب و جهت تولید نوشیدنی‌ها مورد استفاده قرار گرفت. جهت شیرین کردن نوشیدنی و پوشاندن طعم و مزه تراوه، مخلوط شکر سفید-استویا براساس آزمون‌های مقدماتی به ترتیب به مقدار ۲ و ۰/۲ درصد وزنی/حجمی انتخاب و مورد استفاده قرار گرفت. همچنین از فسفات خوراکی به مقدار ۰/۸ درصد جهت نزدیک نمودن pH نوشیدنی به pH مطلوب پروبیوتیک (۵/۵-۶) مصرفی و کنسانتره پروتئینی آب پنیر به میزان ۱ درصد جهت بهبود خواص تغذیه‌ای و احساس دهانی استفاده شد.

۲-۲- روش‌ها

۲-۲-۱- تهیه کشت پروبیوتیک

در این پژوهش از باکتری لاکتوباسیلوس/سیدوفیلوس (LA5) شرکت Christian Hansen دانمارک به عنوان سویه پروبیوتیک استفاده شد. میزان تلقیح به پروبیوتیک‌ها به شکلی انجام پذیرفت که تعداد اولیه آنها در نوشیدنی‌ها و در شروع

زمان نگهداری بیش از 10^9 cfu/ml در هر میلی لیتر حاصل گردد. برای این منظور، یک لیتر شیر پس چرخ در دمای 90°C به مدت ۱۵ دقیقه حرارت داده شد و پس از سرد شدن به دمای 37°C ، مقدار ۲۵ گرم از پودر محیط کشت به شیر پس-چرخ اضافه گردید. سپس نمونه‌های نوشیدنی پروبیوتیک با درصدهای مختلف ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ درصد با شیر پس‌چرخ تلقیح گردیدند. بر اساس نتایج به دست آمده، میزان یک درصد تلقیح برای رسیدن به تعداد حداقل زنده مانی مورد نظر (10^9) انتخاب گردید. هر میلی لیتر شیر پس چرخ تلقیح شده مذکور نیز حاوی $11/91 \pm 0/84 \log \text{cfu/ml}$ باکتری پروبیوتیک LA5 بود.

۲-۲-۲- تهیه نوشیدنی میوه‌ای پروبیوتیک و غیر پروبیوتیک

در این پژوهش، برای تهیه نوشیدنی‌ها از سطوح مختلف تراوه، کنسانتره و آب استفاده شد (جدول ۱). برای تولید نوشیدنی ابتدا استویا، شکر، مخلوط صمغ عربی-سدیم کازئینات، WPC و فسفات خوراکی بخوبی با هم مخلوط و در مقدار مناسبی آب محلول گردیدند. پس از یک روز نگهداری، تراوه و کنسانتره پرتقال به این مخلوط اضافه و با همزن مکانیکی مخلوط مجدداً به خوبی همگن گشت. در پایان، نوشیدنی در بن‌ماری در دمای 80°C به مدت ۵ دقیقه پاستوریزه شده و پس از رساندن به دمای محیط (20°C) آزمون‌های مورد نظر روی آن انجام شد. برای تهیه نمونه‌های پروبیوتیک علاوه بر مراحل فوق، پس از پاستوریزاسیون و سرد شدن تا دمای محیط، مقدار یک درصد از شیر پس چرخ حاوی باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس/سیدوفیلوس اضافه گردید و سپس نمونه‌ها در بطری‌های پلی‌اتیلنی ۲۰۰ میلی‌لیتری پر شدند و تا زمان انجام آزمایشات در دمای 4°C نگهداری شدند. کلیه آزمون‌های شیمیایی و حسی جهت بهینه‌سازی تولید نمونه بلافاصله پس از تولید انجام گرفت. در مرحله بعد و جهت مقایسه نوشیدنی‌های پروبیوتیک با غیر پروبیوتیک، تمامی آزمون‌های شیمیایی، میکروبی و حسی پس از تولید و پس از ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز نگهداری انجام شدند.

Table 1 Coded and uncoded levels of independent variables according to the CCD

Ingredients formulation	Level				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Permeate (ml)	12.9552	30	55	80	97.04
Water (ml)	19.7731	30	45	60	70.22
Concentrate (g)	5.9546	8	11	14	16.04

۲-۳-۲-آزمون‌های فیزیکوشیمیایی

اسیدیته تراوه برحسب اسید لاکتیک و نوشیدنی میوه ای برحسب اسید سیتریک به روش تیتراسیون با محلول سود در حضور معرف فنل فتالین، pH توسط pH متر دیجیتال (knick مدل ۷۶۶، ساخت آلمان)، مواد جامد محلول با استفاده از رفراکتومتر دستی ATAGO (ساخت ژاپن)، ماده خشک به روش تبخیر در آون، خاکستر به روش سوزاندن در کوره الکتریکی، پروتئین به روش کلدال (ضریب تبدیل: ۶/۳۸) و چربی به روش ژریر اندازه گیری شد [۱۴]. اندازه گیری پلی فنل کل [۱۵]، تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی برحسب ترولکس [۱۶] و کاهش قدرت آنتی اکسیدانی آهن II [۱۷] توسط اسپکتوفتومتر HACH (ساخت آمریکا) انجام پذیرفت. اندازه گیری ویتامین C نیز به روش یدومتری [۱۸] انجام پذیرفت.

۲-۴-۲-اندازه گیری رنگ

عکس برداری با استفاده از دوربین دیجیتالی (Finepix A202، مدل Fujifilm، ساخت چین) تعبیه شده در محفظه ی چوبی استاندارد موجود در دانشگاه تبریز انجام شد و فاکتورهای مربوط به رنگ (a, b و L)، با انتقال تصاویر به رایانه و اندازه گیری ۵ نقطه توسط نرم افزار فتوشاپ^۱ به دست آمدند [۱۹].

۲-۵-۲-آزمون‌های میکروبی

به منظور تأیی کیفیت میکروبی نوشیدنی‌های پروبیوتیک و غیرپروبیوتیک، تعداد کل میکروارگانیسم‌ها، کلی فرم و کپک و مخمر بلافاصله پس از تولید و پس از ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز بررسی گردید [۲۰]. زنده مانگی پروبیوتیک‌ها نیز در فواصل زمانی مذکور مطابق با روش مرتضویان و همکاران [۲۱] ارزیابی شد.

1. Photoshop

۲-۶-۲-ارزیابی حسی

پس از برگزاری آزمون‌های حسی مقدماتی و قرار دادن یک نمونه تکراری میان سه نمونه نوشیدنی در هر بار آزمون، در نهایت ۱۰ نفر داور که بیشترین دقت در ارزیابی و تشخیص نمونه‌های مشابه برخوردار بودند، برای ارزیابی حسی انتخاب شدند. ۷۰-۶۰ میلی لیتر از هر نمونه نوشیدنی با دمای $10 \pm 2^\circ\text{C}$ در اختیار داوران (مهندسان و کارکنان شرکت پگاه آذربایجان شرقی و دانشجویان صنایع غذایی) قرار داده شد. آزمون حسی مطابق روش هدونیک یا ترجیحی ۵ نقطه‌ای (بسیار مطلوب تا بسیار نامطلوب) انجام گرفت و صفات مزه، رنگ، بو، پس مزه و پذیرش کلی نوشیدنی توسط داوران مورد بررسی قرار گرفت [۲۲].

۲-۳-۲-طرح آماری

در این پژوهش برای برآورد تأثیر متغیرهای مستقل تراوه (X_1)، میزان کنسانتره (X_2) و آب (X_3)، بر متغیرهای وابسته (شامل pH، اسیدیته، ماده خشک، بریکس، رنگ، بو، مزه، پس مزه و پذیرش کلی) از روش سطح پاسخ طرح مرکب مرکزی (CCD) استفاده شد (جدول ۱). تعداد ۲۰ آزمایش با توجه به طرح مرکب مرکزی (CCD) انجام گردید (جدول ۲).

آنالیز آماری نمونه‌ها با استفاده از روش سطح پاسخ و با نرم افزار Design Expert (version 9) انجام گرفت. این طرح، دربرگیرنده گروهی از تکنیک‌های آماری و ریاضی است که امکان رسیدن به شرایط بهینه در سیستم‌های پیچیده را فراهم می‌کند. با کاربرد آنالیز رگرسیون شاخص‌های اندازه گیری شده در قالب یک چند جمله‌ای درجه دوم بر طبق معادله زیر مدل-سازی شدند.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

که در آن Y پاسخ های مختلف β_0 ضرایب ثابت مدلها است. ($\beta_1, \beta_2, \beta_3$)، ($\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$) و ($\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$) به ترتیب نشان دهنده اثر خطی، درجه دوم و برهمکنش مدل

خواص آنتی اکسیدان، ضد دیابتی، ضد اسهال، ضد هایپرگلیسمی، ضد فشارخون، ضد تومور و ادرار آور می باشد [۲۵].

Table 2 Randomized experimental treatments based on independent variables in the CCD

Treatments	Water (ml)	Permeate (ml)	Concentrate (g)
1	45	55	11
2	30	30	14
3	60	30	14
4	45	12.95	11
5	70.22	55	11
6	19.77	55	11
7	60	80	14
8	45	97.04	11
9	60	80	8
10	45	55	11
11	45	55	11
12	30	80	8
13	60	30	8
14	45	55	16.04
15	45	55	11
16	45	55	11
17	45	55	11
18	30	80	14
19	45	55	5.95
20	30	30	8

پیشنهادی به وسیله آنالیز چندگانه رگرسیون می باشد. X_1 ، X_2 و X_3 متغیرهای مستقل می باشند. پس از به دست آمدن نمونه بهینه، داده ها با استفاده نرم افزار SPSS ویرایش ۲۰ به روش طرح کاملاً تصادفی مورد ارزیابی قرار گرفت.

۳- نتایج و بحث

جدول ۳ ترکیبات تراوه و کنسانتره پرتقال مورد استفاده در تهیه نوشیدنی پرتقالی را نشان می دهد. با مقایسه ترکیبات نمونه های بهینه تولید شده در این پژوهش با نمونه های تجاری همانند نوشیدنی ریولا، نتایج حاکی از بالا بودن مقادیر ماده خشک، پروتئین و خاکستر در نوشیدنی های تولیدی در این تحقیق بود [۲۳]. نتایج آزمون های مقدماتی نشان داد، با توجه به رسوبات تراوه در نتیجه فرآیندهای حرارتی استفاده از یک تثبیت کننده به منظور تثبیت سیستم کلوئیدی نوشیدنی حاصل و جلوگیری از رسوبات در محیط اسیدی و در اثر فرآیند حرارتی ضروری می باشد. بدین منظور همانند بسیاری از تحقیقات انجام شده در این زمینه [۴ و ۱۱]، از مخلوط تثبیت کننده صمغ عربی-سديم کازئینات استفاده گردید. هرچند استفاده از تثبیت کننده های دیگر همانند پکتین و دیگر ترکیبات فعال سطحی جهت جلوگیری از ترسیب پروتئین ها پیشنهاد شده است [۲۴]. به علاوه، با توجه این که امروزه علاقمندی به استفاده از جایگزین های قند (ساکارز) بسیار افزایش یافته است و نظر به آن که هدف از این تحقیق تولید نوشیدنی با خواص تغذیه ای و عملگرایی بالا بود، از استویا به عنوان شیرین کننده غیرکالری استفاده گردید. استویا دارای

Table 3 Constituents of permeate and concentrate used in the production of orange drink

	Sugar (%)	Protein (%)	Fat (%)	Ash (%)	Dry matter (%)	Brix	Acidity (%)	pH
Permeate	3.82-4.39	0.32-0.46	0.05-0.1	0.4-0.52	4.9-5.1	-	0.29-0.37	6.63-6.71
Concentrate	58-60	-	-	0.4-0.5	-	70	7.7-8.6	2.6-2.9

پاسخ های مختلف و سایر خصوصیات مدل ارائه شده را نشان می دهد. با جایگزینی متغیرهای مستقل در معادله، می توان مقدار هر پاسخ یا متغیرهای وابسته را پیشگویی کرد.

۳-۱- مدل سازی

با استفاده از این روش آماری برای هر پاسخ یک معادله درجه دوم به دست آمد. جدول ۴ ضرایب رگرسیون مدل ها برای

Table 4 Coefficients of the polynomial regression models for different responses

	pH	Acidity	Brix	Dry matter	Color	Taste	Odour	After taste	Accepting
β_0	5.54	0.98	13.21	14.34	ns	4.07	3.73	4.10	3.85
β_1	0.20	-0.12	-0.95	-1.14	ns	-0.066	-0.17	ns	-0.21
β_2	0.23	-0.13	-0.88	-0.83	ns	-0.20	-0.31	-0.25	-0.34
β_3	-0.33	0.18	1.07	1.22	ns	0.46	0.31	0.43	0.40
β_{12}	ns	ns	0.33	ns	ns	0.075	ns	0.15	ns
β_{13}	ns	ns	ns	ns	ns	0.13	ns	ns	0.25
β_{23}	-0.05	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.15	0.13
β_{11}	-0.027	ns	-0.35	-0.32	ns	-0.27	ns	-0.39	-0.23
β_{22}	-0.1	0.031	0.21	0.36	ns	-0.18	ns	-0.21	-0.15
β_{33}	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0.18	ns
R^2	0.9872	0.9914	0.9826	0.9795	0.3104	0.9835	0.9817	0.9613	0.9619
Adj- R^2	0.9758	0.9837	0.9669	0.9611	0.1811	0.9687	0.9728	0.9264	0.9277
value F	86.02	128.20	62.63	53.16	2.40	66.34	285.78	27.57	28.09
p-value	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.1059	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

نتایج نشان داد که متغیرهای مورد آزمون (مقادیر آب، تراوه و کنسانتره) به جز رنگ، تأثیر معنی داری ($P < 0.05$) بر سایر پاسخ ها یا پارامترهای مورد بررسی می گذارد. با افزایش تراوه و آب مقادیر اسیدیته، بریکس، ماده خشک و امتیازات دریافت شده بو و پذیرش کلی کاهش اما pH افزایش می یافت. امتیازات مزه و پس مزه به ترتیب با افزایش مقدار آب تا حدود ۴۵ و ۵۵ درصد ابتدا افزایش و سپس کاهش می یافت. با افزایش مقدار تراوه این امتیازات کاهش می یافت. همچنین با افزایش کنسانتره تا مقدار ۱۴ میلی لیتر ویژگی های حسی محصول به طور قابل توجهی بهبود می یافت اما در مقادیر بیشتر از آن امتیازات حسی محصول تا حدودی کاهش پیدا می نمود.

۳-۲- بهینه سازی فرمولاسیون نوشیدنی

جهت بهینه سازی فرمولاسیون نوشیدنی، ۲۰ فرمول مختلف نوشیدنی (جدول ۲) تهیه شد و با استفاده از آزمون های فیزیکوشیمیایی و حسی مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور بهینه سازی پارامترهای اندازه گیری شده، pH، اسیدیته و ماده خشک در محدوده داده های به دست آمده، بریکس در نوشیدنی پرتقالی در مقدار ۱۴/۵ و همه ارزیابی های حسی در بیشترین مقدار انتخاب شدند. همچنین متغیرهای مستقل شامل آب، تراوه و کنسانتره در محدوده داده های به دست آمده تعریف شدند. برای تعیین اعتبار نتایج حاصل از مدل، آزمایش ها تحت شرایط بهینه با ۳ تکرار انجام شد. تمامی نتایج آزمایشات تجربی با نتایج حاصل از مدل اختلاف معنی داری نداشتند و بنابراین مدل ارائه شده توسط نرم افزار می تواند برای تخمین نتایج در شرایط عملی قابل کاربرد باشد (جدول ۵).

Table 5 Performance of models in predicting of optimum ingredients formulation

Sample	Water (ml)	Pemete (ml)	Concentrate (g)	pH	Acidity (%)	Brix	Dry matter (%)	Color	Taste	Odor	After taste	Accepting
Predicted value	45.63	38.75	14	5.02	1.25	14.5	16.24	4.13	4.55	4.22	4.33	4.29
Experimental value				5.07±0.3	1.18±0.07	14.6±0.7	16.36±0.9	4.23±0.2	4.46±0.3	4.26±0.3	4.3±0.4	4.13±0.3

۳-۳- خواص فیزیکوشیمیایی

همانطور که نتایج جدول ۶ نشان می دهد، در نوشیدنی بهینه غیرپروبیوتیک، پارامترهای pH، بریکس و ماده خشک معنی دار نگردیدند. کاهش چشم گیر سرعت واکنش های

شیمیایی در دمای یخچال و عدم فعالیت میکروبی از مهم ترین دلایل عدم معنی داری این پارامترها می باشند [۲۶]. در نتایج مشابه، Salvia و همکاران اثر فرآیند حرارتی (90°C) به مدت ۶۰s را بر pH شیر طعم دار (مخلوط آب پرتقال،

خشک در طی زمان نگهداری مشخص نگردید. Baccouche و همکاران در نتایجی مشابه تغییر چندانی در مقادیر ماده خشک و بریکس نوشیدنی گلابی خاردار تهیه شده بر پایه آب پنیر پس از ۴۰ روز نگهداری در دمای ۴°C مشاهده نمودند [۲۹]. در مطالعه‌ای دیگر، Jaworska و همکاران نیز ثبات در ماده خشک، بریکس و اسیدیته را در نکتار انگور فرنگی سیاه پس از ۱۲ ماه نگهداری گزارش نمودند [۲۶].

آناناس، انبه و کیوی) مورد مطالعه قرار دادند [۲۷]. pH نوشیدنی تازه و پس از ۵۶ روز نگهداری در دمای ۴°C، به ترتیب ۳/۳۲ و ۳/۲۹ اندازه گیری شد. برخلاف نوشیدنی‌های غیرپروبیوتیک، pH نوشیدنی‌های پروبیوتیک طی مدت زمان نگهداری احتمالاً به دلیل فعالیت باکتری‌های پروبیوتیک [۲۸] کاهش معنی‌داری یافت و در ابتدا و انتهای زمان نگهداری به ترتیب ۵/۰۷ و ۴/۸۳ تعیین شد. در هر حال، در نوشیدنی‌های بهینه پروبیوتیک اختلاف معنی‌داری از نظر بریکس و ماده

Table 6 The shelf life of probiotic and non-probiotic optimized orange drinks

Test		Day 0	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
pH	Simple	5.10±0.01 ^a	5.09±0.03 ^a	5.09±0.03 ^a	5.10±0.03 ^a	5.07±0.02 ^a
	Probiotic	5.07±0.02 ^a	5.01±0.01 ^b	4.95±0.02 ^c	4.89±0.01 ^d	4.83±0.02 ^e
Brix	Simple	14.46±0.05 ^a	14.46±0.05 ^a	14.43±0.05 ^a	14.50±0.1 ^a	14.50±0.00 ^a
	Probiotic	14.56±0.05 ^a	14.53±0.05 ^a	14.56±0.05 ^a	14.46±0.05 ^a	14.50±0.03 ^a
Dry matter (%)	Simple	16.42±0.04 ^a	16.46±0.03 ^a	16.45±0.06 ^a	16.43±0.11 ^a	16.47±0.03 ^a
	Probiotic	16.36±0.03 ^a	16.37±0.05 ^a	16.37±0.02 ^a	16.44±0.03 ^a	16.33±0.1 ^a

Values with different letters within a row denote statistically significant differences ($P < 0.05$).

مستقیمی میان ویژگی‌های مذکور با قدرت آنتی‌اکسیدانی وجود دارد و با کاهش این ترکیبات میزان قدرت آنتی‌اکسیدانی نوشیدنی نیز کاهش می‌یابد [۳۴]. Chaovanalikit و Wrolstad کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی FRAP گیلان را در طی سه ماه در نگهداری در ۲۳°C- گزارش کردند [۳۵]. همچنین Wojdyło در تحقیقی در مورد تولید آبمیوه مخلوط انگور سیاه و سیب گزارش نمود که در مدت یک ماه نگهداری، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ABTS به میزان ۲۲-۳۹ درصد کاهش می‌یابد [۳۶]. همچنین طی ۲۸ روز نگهداری میزان ویتامین C نمونه‌ها کاهش معنی‌داری یافت و از ۱۶/۱ به ۷/۳ mg/۱۰۰ g تقلیل پیدا کرد. نرخ کاهش قابل توجه ویتامین C طی مدت نگهداری در مقالات مختلف متفاوت گزارش گردیده است که علت آن می‌تواند به دلایل مختلفی همانند تفاوت در میزان دمای نگهداری، میزان اکسیژن، دسترسی به نور، نوع میوه و ترکیب شیمیایی نوشیدنی باشد [۳۷ و ۳۸]. در پژوهشی Piljac-Zegarac و همکاران، با بررسی نوشیدنی‌های زغال اخته، توت فرنگی و گیلان گزارش نمودند که میزان ویتامین C در این نوشیدنی‌ها بعد از ۷ روز نگهداری در یخچال، در زغال اخته حدود ۵۰ درصد و در توت فرنگی و گیلان ۳۵ تا ۵۸ درصد کاهش می‌یابد [۳۲].

۳-۴- آزمون فنل کل، ویتامین C و خاصیت

آنتی‌اکسیدانی در نوشیدنی‌های پروبیوتیک

نتایج ارائه شده در روز اول کلیه نوشیدنی‌ها در مقایسه با نتایج دیگر مقالات [۳۰ و ۳۱] حاکی از پائین بودن مقادیر این ترکیبات در تحقیق حاضر بود (جدول ۷). به علاوه در اثر نگهداری کاهش معنی‌داری در مقادیر فنل کل، ویتامین C و خاصیت آنتی‌اکسیدانی بر مبنای ترولکس و بر مبنای تقلیل قدرت آهن II ثبت گردید. در مورد فنل، این نتایج در انتهای زمان نگهداری متفاوت بود و مقدار آن در هفته پایانی به مقدار نسبتاً قابل توجهی افزایش یافت. میزان فنل کل در ابتدای زمان نگهداری ۲۵/۶۵ mg/۱۰۰ g ثبت گردید که پس از ۲۱ روز به ۱۹/۴۷ کاهش و سپس در انتهای زمان نگهداری به ۱۰۰ g ۲۲/۶۸ mg/ افزایش یافت. احتمالاً به وجود آمدن برخی ترکیبات طی مدت نگهداری که قادر به واکنش با معرف فولین هستند می‌تواند علت این موضوع باشد [۳۲ و ۳۳]. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندازه گرفته به وسیله هر دو روش نیز در طول مدت نگهداری کاهش معنی‌داری را در نمونه‌ها نشان داد. خاصیت آنتی‌اکسیدانی توسط ترولکس از میزان ۲/۱۰ به ۱/۴۸ μmol/g و خاصیت آنتی‌اکسیدانی تقلیل قدرت آهن II از ۵/۴۱ به ۳/۶۳ μmol/g کاهش یافت. به طور کلی، ارتباط

Table 7 Evaluation of total phenolic, antioxidant activity and vitamin C contents of probiotic orange drinks

Test	Day 0	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
Phenol (mg/100g)	25.65±0.57 ^a	22.66±0.04 ^b	19.88±0.06 ^c	17.47±0.05 ^d	21.68±0.03 ^c
Trolex (μmol/g)	1.95±0.02 ^a	1.90±0.01 ^a	1.75±0.03 ^b	1.42±0.04 ^c	1.28±0.02 ^d
Frap (μmol/g)	5.61±0.05 ^a	5.03±0.03 ^b	4.68±0.03 ^c	4.13±0.02 ^d	3.63±0.05 ^e
Vit C (mg/100g)	16.1±0.06 ^a	14.21±0.1 ^b	11.37±0.06 ^c	9.6±0.16 ^d	7.3±0.15 ^e

Values with different letters within a row denote statistically significant differences (P<0.05).

۳-۵- آزمون حسی

روز نگهداری از کیفیت حسی و مقبولیت بالایی برخوردار بودند. Daneshi و همکاران با انجام ارزیابی‌های حسی نوشیدنی‌های پروبیوتیک مخلوط شیر-آب هویج مشاهده نمودند که با افزایش زمان نگهداری، فاکتورهای رنگ، قوام، مزه، عطر و طعم و قوام نمونه‌ها کاهش یافته و نمونه‌ها در پایان روز ۲۰ نگهداری کمترین امتیازات را دریافت کردند [۴۰]. در این میان، نوشیدنی‌های حاوی لاکتوباسیلوس /سیدوفیلیوس دارای بیشترین امتیازات حسی بودند. Bayarri و همکاران نیز با بررسی تأثیر مدت زمان نگهداری بر نوشیدنی‌های با طعم پرتقال، کیوی و هلو کاهش معنی‌داری را در فاکتورهای حسی گزارش نمودند [۴۱]. درهرحال برخلاف این نتایج Majumdar و همکاران تغییرات معنی‌داری در ویژگی‌های حسی نوشیدنی‌های مخلوط میوه و سبزیجات (آب لیمو، کدوقلیانی^۱ و برگ ریحان^۲) طی ۶ ماه زمان نگهداری مشاهده نمودند [۴۲].

به جز ویژگی رنگ در نوشیدنی‌های غیرپروبیوتیک، سایر خواص حسی نوشیدنی‌های پرتقالی در طول چهار هفته نگهداری کاهش معنی‌داری یافت (جدول ۸). امتیاز رنگ، بو، مزه، پس مزه و پذیرش کلی نوشیدنی غیرپروبیوتیک طی مدت نگهداری به ترتیب از ۴/۱۶، ۴/۲۸، ۴/۴۶، ۴/۳۳ و ۴/۲۶ به مقادیر ۴/۰۶، ۴/۰۸، ۴/۱۶، ۴/۱۳ و ۴/۰۶ کاهش یافت. همچنین امتیاز رنگ، بو، مزه، پس مزه و پذیرش کلی نوشیدنی پروبیوتیک طی این زمان به ترتیب از ۴/۲۳، ۴/۲۶، ۴/۵۰، ۴/۳۰ و ۴/۱۳ به مقادیر ۳/۸۷، ۳/۹۴، ۳/۸۶، ۳/۸۱ و ۳/۷۶ کاهش یافت. کاهش ویژگی‌های حسی را می‌توان به برهمکنش بین ترکیبات نوشیدنی به ویژه ترکیبات پروتئینی تراوه و مواد پکتیکی کنسانتره و همچنین فعالیت پروبیوتیک‌ها و تولید ترکیبات جدید نسبت داد [۳۹]. درهرحال همانطور که در جدول ۸ می‌توان مشاهده کرد، کلیه نوشیدنی‌ها پس از ۲۸

Table 8 Organoleptic characteristics of optimized orange drinks

Test		Day 0	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
Color	Simple	4.16±0.05 ^a	4.16±0.05 ^a	4.16±0.05 ^a	4.13±0.05 ^a	4.06±0.05 ^a
	Probiotic	4.23±0.05 ^a	4.16±0.05 ^a	4.13±0.05 ^a	4.00±0.0 ^b	3.87±0.1 ^b
Odor	Simple	4.28±0.05 ^a	4.26±0.05 ^a	4.23±0.05 ^a	4.16±0.05 ^{ab}	4.08±0.05 ^b
	Probiotic	4.26±0.05 ^a	4.23±0.05 ^a	4.20±0.05 ^a	4.03±0.05 ^b	3.94±0.1 ^b
Taste	Simple	4.46±0.05 ^a	4.40±0.05 ^a	4.43±0.11 ^a	4.23±0.05 ^b	4.16±0.05 ^b
	Probiotic	4.50±0.05 ^a	4.45±0.1 ^a	4.30±0.1 ^a	4.10±0.1 ^b	3.86±0.01 ^b
After taste	Simple	4.33±0.05 ^a	4.30±0.00 ^a	4.26±0.05 ^a	4.16±0.05 ^b	4.13±0.05 ^b
	Probiotic	4.30±0.05 ^a	4.33±0.05 ^a	4.23±0.05 ^a	4.10±0.1 ^b	3.81±0.05 ^c
Accepting	Simple	4.26±0.05 ^a	4.26±0.05 ^a	4.26±0.05 ^a	4.16±0.05 ^{ab}	4.06±0.05 ^b
	Probiotic	4.13±0.05 ^a	4.06±0.11 ^{ab}	4.00±0.0 ^{ab}	3.93±0.05 ^b	3.76±0.05 ^c

Values with different letters within a row denote statistically significant differences (P<0.05).

1. Bottle gourd
2. Basil Leaves

۳-۶- آزمون میکروبی

نتایج آزمون‌های میکروبی نشان دهنده عدم وجود کلنی در کشت کلی، کلی فرم و کپک و مخمر در نمونه‌های نگهداری شده در دمای سردخانه تا پایان هفته ۴ بود که دلیل این امر را می‌توان با اعمال فرآیند حرارتی نوشیدنی‌ها مرتبط دانست. استاندارد بین المللی FIL-IDF¹ بیان می‌کند که محصول پروبیوتیک برای تأثیر بر سلامتی و عملکرد مطلوب حداقل باید دارای 10^6 باکتری پروبیوتیک زنده بر حسب گرم محصول در زمان مصرف باشند [۱۱]. شکل ۱ بیانگر روند تغییرات باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس (LA5) در نوشیدنی‌های تهیه شده در طول نگهداری در یخچال می‌باشد. نتایج این پژوهش (شکل ۱) نشان داد که می‌توان از میکروارگانیسم پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس در تولید نوشیدنی‌های میوه‌ای برپایه تراوه استفاده کرد. به این ترتیب، بقای این باکتری بعد از نگهداری ۲۸ روزه با وجود کاهش بیش از دو واحد لگاریتمی مناسب ارزیابی شد و محصول توانست با حفظ تعداد باکتری پروبیوتیکی بالاتر از حد تعریف شده ($7.22 \log \text{cfu/ml}$)، بعد از زمان نگهداری نیز پروبیوتیک باقی بماند. نتایج مشابهی توسط محققین دیگر در مورد تعداد بالای پروبیوتیک‌ها (10^6) در نوشیدنی‌های میوه‌ای پس از پایان مدت زمان نگهداری گزارش شده است [۱۲، ۴۰، ۴۳ و ۴۴] Daneshi و همکاران در تحقیقی راجع به تولید نوشیدنی‌های پروبیوتیک مخلوط شیر-آب هویج گزارش نمودند که قابلیت زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس LA5 در مقایسه با چندین نوع باکتری پروبیوتیک بکار رفته بالاتر می‌باشد. این محققین نیز تعداد باکتری‌های LA5 را پس از ۲۰ روز نگهداری در دمای 4°C بیش از حد تعریف شده (10^6) و به میزان $6.64 \log \text{cfu/ml}$ گزارش نمودند [۴۰].

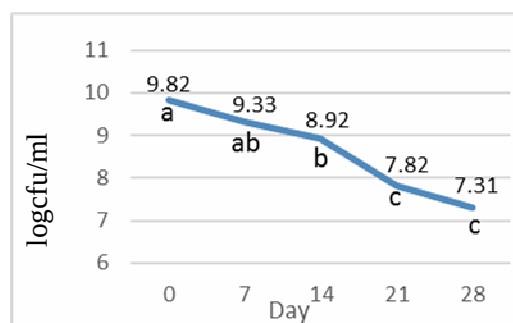


Fig 1 Viable counts of LA5 in orange juice drinks during the storage period at 4°C for 28 days.

۳-۷- آزمون رنگ

برای بررسی میزان تغییرات ایجاد شده در ویژگی‌های رنگی موادغذایی از اصلاح پارامترها یا شاخص‌های رنگی استفاده می‌شود. نتایج تجزیه واریانس در شکل ۲ نشان داده شده است. بررسی نتایج آزمون رنگ در نوشیدنی با طعم پرتقال نشان دهنده تغییرات معنی‌دار ($p < 0.05$) پارامترهای رنگ طی مدت زمان نگهداریست؛ بطوری که فاکتور a^* و b^* طی ۲۸ روز مدت نگهداری افزایش و فاکتور L^* کاهش یافت که دلیل آن احتمالاً تجزیه یا تغییر رنگدانه‌های موجود در نمونه‌های غذایی است. در نوشیدنی پرتقالی، که رنگدانه غالب آن کارتنوئید می‌باشد، عواملی نظیر دما، زمان و شرایط نگهداری، واکنش قهوه‌ای شدن، حرارت‌دهی و حضور اکسیژن می‌تواند سبب کاهش کارتنوئیدها طی مدت نگهداری گردد [۴۵].

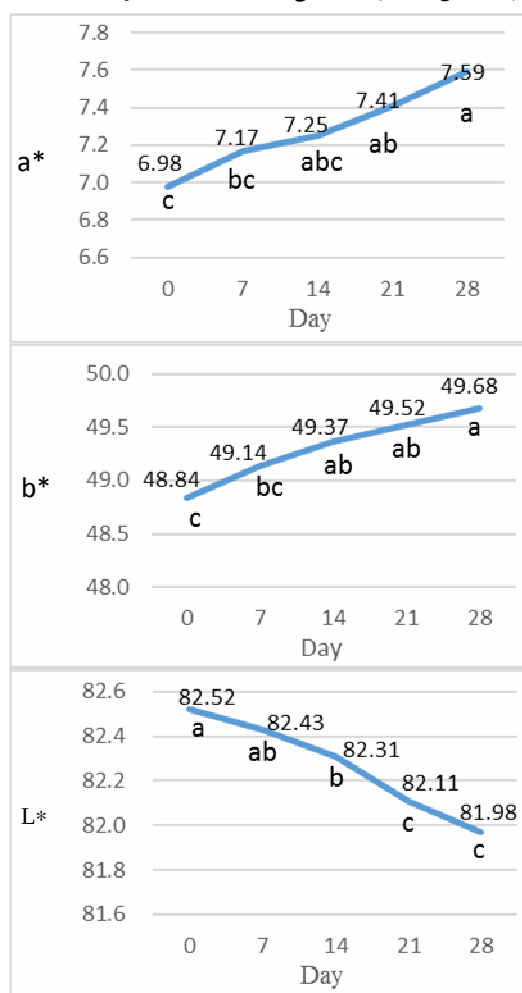


Fig 2 Color component L^* , a^* and b^* orange juice during storage for 28 days.

۴- نتیجه گیری

نتایج مرحله اول نشان داد، متغیرها (تراوه، آب و کنسانتره) تأثیر معنی داری بر ویژگی های فیزیکیوشیمیایی (pH، اسیدیته، بریکس و ماده خشک) و ویژگی های حسی (مزه، بو، پس مزه، رنگ و پذیرش کلی) مورد ارزیابی داشتند. با ارزیابی نتایج تیمارها، فرمول بهینه ای شامل ۴۵/۶۳ ml آب، ۳۸/۷۵ g تراوه و ۱۴ g کنسانتره تعیین شد. در مرحله دوم، نوشیدنی بهینه به دو شکل پروبیوتیک و غیرپروبیوتیک تولید گشت و ویژگی های فیزیکیوشیمیایی، خواص آنتی اکسیدانی، حسی و میکروبی آن طی ۲۸ روز نگهداری بررسی گردید. نتایج نشان داد امتیازات حسی در طول نگهداری کاهش می یافت، در حالی که تغییر محسوسی در ماده خشک و بریکس نوشیدنی مشاهده نگردید. همچنین مقادیر pH در تمامی نوشیدنی ها طی نگهداری کاهش یافت، هرچند این تغییرات در نوشیدنی های غیرپروبیوتیک معنی دار نگردید. در تمامی مدت زمان نگهداری ۲۸ روزه، نوشیدنی پروبیوتیک حاوی تعداد قابل توجهی باکتری های پروبیوتیک (10^7 cfu/ml) بود. نوشیدنی پرتقالی تهیه شده پس از تولید حاوی ۱۰۰ mg/۲۵/۶۵ فنل کل، $2/10 \mu\text{mol/g}$ خاصیت آنتی اکسیدانی بر حسب ترولکس و $5/41 \mu\text{mol/g}$ بر حسب آهن II (Frap) و $16/1 \text{ mg}/100 \text{ g}$ ویتامین C بود. مقادیر فنل، ترولکس، Frap و ویتامین C پس از چهار هفته نگهداری به ترتیب $12/4$ ، $29/5$ ، $32/9$ و $54/7$ درصد کاهش نشان داد. نتایج ارزیابی آزمون رنگ نیز بیانگر افزایش فاکتور a^* و کاهش فاکتور L^* و b^* طی مدت نگهداری بود.

۵- سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب سپاس خود را از مسئولین دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان بابت پشتیبانی مالی از این تحقیق اعلام می دارند.

۶- منابع

- utilization in beverage formulation. Food Chemistry, 101(4): 1484-1491.
- [3] USDA. (2004). United States Dept. of Agriculture. Washington, D.C., Available from: www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl. Accessed June 15, 2004.
- [4] Jamalifar, H., Samadi, N., Fazeli, R. and Meshak, Z. (2011). Preparation of probiotic whey beverage using *Lactobacillus casei* and *Streptococcus thermophiles*. Comparative Pathobiology, 8(2): 475-483.
- [5] Hernandez-Mendoza, A., Robles, V. J., Angulo, J.O., De La Cruz, J. and Garcia, H. S. (2007). Preparation of a whey-based probiotic product with *Lactobacillus reuteri* and *Bifidobacterium bifidum*. Food Technology and Biotechnology, 45(1): 27-31.
- [6] Talabardon, M., Schwitzguébel, J. P. and Péringer P. (2000). Anaerobic thermophilic fermentation for acetic acid production from milk permeate. Journal of Biotechnology, 76(1): 83-92.
- [7] Rustom, I. Y., Foda M. I. and Lopez-Leiva M. H. (1998). Formation of oligosaccharides from whey UF-permeate by enzymatic hydrolysis—analysis of factors. Food Chemistry, 62(2): 141-147.
- [8] Geilman, W. G., Schmidt, D., Herfurth-Kennedy, C., Path, J. and Cullor, J. (1992). Production of an electrolyte beverage from milk permeate. Journal of Dairy Science, 75(9): 2364-2369.
- [9] McCarney, A. L., Wenzhi, W. and Tannock, G. W. (1996). Molecular analysis of the composition of the bifidobacteria and lactobacillus microflora of humans. Applied and Environmental Microbiology, 62: 4608-4613.
- [10] Kop-Hoolihan, L. (2001). Prophylactic and therapeutic role of probiotics: A review. Journal of the American Dietetic Association, 101(2): 229-41.
- [11] Floch, M. H. (2014). Recommendations for Probiotic Use in Humans. Pharmaceuticals, 7(10): 999-1007.
- [12] Rybka, S. and Kailasapathy, K. (1997). Effect of freeze drying and storage on the microbiological and physical properties of AB-yoghurt. Milchwissenschaft, 52(7): 390-394.
- [13] Shukla, M., Jha, Y. K. and Admassu S. (2013). Development of Probiotic Beverage from Whey and Pineapple Juice. Journal of
- [1] Pien, J. (1974). Whey utilization and whey products. Journal of Dairy Science, 62(7): 1149-1160.
- [2] Sinha, R., Radha C., Prakash, J., and Kaul, P. (2007). Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and

- physicochemical, interfacial, and foaming properties. *Langmuir*, 23(8): 4155-4166.
- [25] Mathur, S. and Shekhawat, G. S. (2013). Establishment and characterization of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) cell suspension culture: an in vitro approach for production of stevioside. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(3): 931-939.
- [26] Jaworska, G., Pogoń, K., Klimek, M. and Gwóźdź, E. (2014). Quality changes of blackcurrant nectar under different storage conditions. *Journal of Life Sciences Research*, 1(1): 16-20.
- [27] Salvia-Trujillo, L., Morales-de la Peña, M., Rojas-Graü, M. A. and Martín-Belloso, O. (2011). Microbial and enzymatic stability of fruit juice-milk beverages treated by high intensity pulsed electric fields or heat during refrigerated storage. *Food Control*, 22(10): 1639-1646.
- [28] Mohamed, A. G., Abbas, H. M. and Zayan, A. F. (2014). Physicochemical and Microbiological Properties of Papaya Functional Beverages Based on Sweet Cheese Whey. *Life Science Journal*, 11(3): 257-263.
- [29] Baccouche, A., Ennouri, M., Felfoul, I. and Attia, H. (2013). A physical stability study of whey-based prickly pear beverages. *Food Hydrocolloids*, 33(2): 234-244.
- [30] Roussos, P. A. (2011). Phytochemicals and antioxidant capacity of orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Salustiana) juice produced under organic and integrated farming system in Greece. *Scientia Horticulturae*, 129(2): 253-258.
- [31] Fu, L., Xu, B. T., Xu, X. R., Gan, R. Y., Zhang, Y., Xia, E. Q. and Li, H. B. (2011). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry*, 129(2): 345-350.
- [32] Piljac-Zegarac, J., Valek, L., Martinez, S. and Belscak, A. (2009). Fluctuations in the phenolic content and antioxidant capacity of dark fruit juices in refrigerated storage. *Food Chemistry*, 113: 394-400.
- [33] Vinson, J. A., Su, X., Zubik, L. and Bose, P. (2001). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 5315-5321.
- [34] Potter, R. M., Dougherty, M. P., Halteman, W. A. and Camire, M. E. (2007). Characteristics Food Processing and Technology, 88(2): 589-594.
- [14] AOAC. (2000). Official Methods of Analysis. 17th ed, Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, Maryland, USA.
- [15] Singleton, V. L. and Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3): 144-158.
- [16] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9): 1231-1237.
- [17] Song, F. L., Gan, R. Y., Zhang, Y., Xiao, Q., Kuang, L. and Li, H. B. (2010). Total phenolic contents and antioxidant capacities of selected Chinese medicinal plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(6): 2362-2372.
- [18] Cesar, R. S., Jose, A. S, Carol, H. C. and Pedro, L. O. (1999). Ascorbic Acid as a Standard for Iodometric Titrations. An Analytical Experiment for General Chemistry. *Journal of Chemistry Education*, 76 (10): 121-125.
- [19] Yam, K. L. and Papadakis, S. E. (2004). A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. *Journal of Food Engineering*, 61(1): 137-142.
- [20] Krishnaiah, N., Reddy, C. R., Sastery, P. M. and Ramarao M. (1989). Studies on the keeping quality of whey beverage. *Journal of Dairy Research*, 8(1): 8-14.
- [21] Mortazavian, A. M., Ehsani, M. R., Mousavi, S. M., Rezaei, K., Sohrabvandi, S. and Reinheimer, J. A. (2007). Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic microorganisms in yogurt. *International Journal of Dairy Technology*, 60(2): 123-127.
- [22] Meilgaard, M. C., Carr, B. T. and Civille, G. V. (2006). Sensory Evaluation Techniques. CRC press.
- [23] Reddy, C. J. and Hernandez-Sanches, H. (2003). Manufacture of a beverage from cheese whey using tea fungus fermentation. *Dairy Food*, 26(5): 5-11.
- [24] Reust, H. (2003). Whey protein soluble aggregates from heating with NaCl:

- mix drink. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(5): 5-5.
- [41] Bayarri, S., Calvo, C., Costell, E. and Durán, L. (2001). Influence of storage on sensory evaluation of fruit drinks. *Food Science and Technology International*, 7(5): 399-404.
- [42] Majumdar, T. K., Wadikar, D. D., Vasudish, C. R., Premavalli, K. S. and Bawa, A. S. (2011). Effect of storage on physico-chemical, microbiological and sensory quality of bottlegourd-basil leaves juice. *American Journal of Food Technology*, 6(3): 226-234.
- [43] Roy, D. (2005). Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. *Le lait*, 85(1-2): 39-56.
- [44] Samona, A. and Robinson, R. K. (1991). Enumeration of bifidobacteria in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 44(3): 64-66.
- [45] Koca, N., Burdurlu, H. S. and Karadeniz, F. (2003). Kinetics of nonenzymatic browning reaction in citrus juice concentrates during storage. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 27: 353-360.
- [46] Wibowo, S., Vervoort, L., Tomic, J., Santiago, J. S., Lemmens, L., Panozzo, A. and Van Loey, A. (2015). Colour and carotenoid changes of pasteurised orange juice during storage. *Food Chemistry*, 171: 330-340.
- of wild blueberry-soy beverages. *LWT-Food Science and Technology*, 40(5): 807-814.
- [35] Chaovanalikit, A. and Wrolstad, R. E. (2004). Total anthocyanin and total phenolic of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. *Journal of Food Science*, 69(1): 67-72.
- [36] Wojdyło, A. (2009). Effects of blackcurrant and apple mash blending on the phenolic contents, antioxidant capacity, and colour of juices. *Czech Journal of Food Sciences*, 27(5): 338-351.
- [37] Kabasakalis, V., Siopidou, D. and Moshatou, E. (2000). Ascorbic acid content of commercial fruit juices and its rate of loss upon storage. *Food Chemistry*, 70(3): 325-328.
- [38] Özkan, M., Kırca, A. and Cemeroğlu, B. (2004). Effects of hydrogen peroxide on the stability of ascorbic acid during storage in various fruit juices. *Food Chemistry*, 88(4): 591-597.
- [39] Singh, C., Grewal, K. S. and Sharma, H. K. (2006). Effect of incorporation of carrot juice in the preparation of flavoured milk. *Journal of Food Science and Technology -Mysore*, 43(1): 80-82.
- [40] Daneshi, M., Ehsani, M. R., Razavi, S. H. and Labbafi, M. (2013). Effect of refrigerated storage on the probiotic survival and sensory properties of milk/carrot juice

Optimization and investigation on physicochemical, microbial and sensory quality of permeate-based probiotic orange beverage

Khamirian, R. A. ¹, Jooyandeh, H. ^{2*}, Hesari, J. ³, Barzegar, H. ⁴

1. M.Sc. Student, Department of Food Science and Technology, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

3. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Tabriz University, Tabriz, Iran

4. Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

(Received: 2014/09/8 Accepted: 2016/08/28)

Permeate (PM) is a by-product produced from milk or whey ultrafiltration process. Due to its flavour off-notes, little attention has been given by food manufactures and researchers. To increase nutritional value of PM and their conversion to forms that are suitable for human consumption, production of probiotic juice beverage is one of the best choice. By this way, an economical product with appropriate functional properties and beneficial health can be produced. At the beginning, formulation of PM non-probiotic fruit beverages were optimized using Response Surface Methodology founded on central composite design. Based on primary experiments, PM (12.95-97.04ml), water (19.77-70.22ml) and orange juice concentrate (5.95-16.04g) were selected as the constant factors. Formulation of orange juice was optimized based on 45.63 ml, water; 38.75 ml PM; and 14 g orange juice concentrate, respectively. At the next stage, the best sample was inoculated with *Lactobacillus acidophilus* (LA5) and were kept on refrigerator (4°C) till the end of storage. Antioxidant capacity (amounts of anthocyanin, total phenol, Trolox, Frap and vitamin C), probiotic cell counts and physicochemical and sensory attributes of probiotic beverages were monitored during a 28-day storage period. Probiotic fruit beverages had high probiotics bacteria count ($>10^7$ cfu/ml) at the beginning till the end of storage. After 28 days storage, the amount of total phenol, Trolox, Frap and vitamin C of probiotic PM juice was recorded as 22.48mg/100 g, 1.48 μ mol/g, 3.63 mol/g and 7.3mg/100g, respectively.

Keyword: Permeate, Probiotic bacteria, Orange juice beverage, Response Surface Methodology

* Corresponding Author E-Mail Address: hosjooy@yahoo.com