

## Production of functional beverage of grape juice and lemon skin distilment contained *Bacillus coagulans*

Jaddi, Z.S.<sup>1</sup>, Ahmadi-Dastgerdi, A.<sup>2\*</sup>, Sharafati-Chaloshtori, R.<sup>3</sup>

1. Graduated of Master, Department of Food Science and Technology, Ardestan Branch, Islamic Azad University, Ardestan, Iran
2. Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Ardestan Branch, Islamic Azad University, Ardestan, Iran
3. Assistant professor, Research Center for Biochemistry and Nutrition in Metabolic Diseases, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

Corresponding Author: as.ahmadi17@gmail.com

(Received: 2019/11/26 Accepted: 2020/2/12)

### Abstract

Nowadays consumers' interest in processed foods such as probiotic beverages is increasing. Therefore, the purpose of this study was to produce a beverage made from sour grape juice and sour lemon peel containing *Bacillus coagulans*. In this experimental study, grape juice and sour lemon peel were prepared. Treatments containing 12 (treatment 1) and 9 (treatment 2) percent grape juice plus 25% lemon peel sweat and  $10^7$  CFU/ml of *Bacillus coagulans* were prepared. The results showed that the acidity decreased during storage and the pH decreased. Brix and alcohol also had a steady trend. Phenolic compounds and antioxidant properties were higher in samples containing 12% grape juice than in samples containing 9% juice ( $p < 0.05$ ). During the storage period, the amount of phenolic compounds decreased. The antioxidant property also decreased with time, with the effect of treatment 1 from 153.4 to 97.72 mmol Fe<sup>2+</sup>/g and in treatment 2 from 123.35 to 80.52 mmol Fe<sup>2+</sup>/g. The results showed that after 90 days, the treated beverages were free of microbial contamination (Coliforms, *Escherichia coli*, mold and yeast). The *Bacillus coagulans* count was not less than  $10^7$  CFU/ml. Sensory results showed that the overall acceptance of treatment 1 was more than treatment 2 but there was no significant difference between the two groups. According to the results, our best treatment was 12% grape juice with 25% lemon sour skin and  $10^7$  CFU/ml *Bacillus coagulans*.

**Conflict of interest:** None declared.

**Keywords:** Functional Beverage, Grape Juice, Lemon Skin, *Bacillus coagulans*

«مقاله پژوهشی»

DOI: 10.30495/JFH.2020.671218

## تولید نوشیدنی فراسودمند حاوی باسیلوس کوآگولانس با استفاده از شیر انگور و عرق پوست لیموترش

زهرا سادات جدی<sup>۱</sup>، آسیه احمدی دستگردی<sup>۲\*</sup>، رضا شرافتی چالستری<sup>۳</sup>

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد اردستان، دانشگاه آزاد اسلامی، اردستان، ایران

۲. استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد اردستان، دانشگاه آزاد اسلامی، اردستان، ایران

۳. استادیار گروه تغذیه، مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

\* نویسنده مسئول مکاتبات: as.ahmadi17@gmail.com

(دریافت مقاله: ۹۸/۹/۵ پذیرش نهایی: ۹۸/۱۱/۲۳)

## چکیده

امروزه تمایل مصرف‌کنندگان به محصولات غذایی فراسودمند مانند انواع نوشیدنی‌های پروبیوتیک رو به افزایش است. هدف از این پژوهش، تولید نوشیدنی فراسودمند از شیر انگور و عرق پوست لیموترش حاوی باسیلوس کوآگولانس بود. در این مطالعه تجربی شیر انگور و عرق پوست لیموترش تهیه و سپس تیمارهای حاوی ۹ و ۱۲ درصد شیر انگور به همراه ۲۵ درصد عرق پوست لیموترش و  $10^7$  CFU/ml باکتری باسیلوس کوآگولانس تولید شد. نتایج نشان داد که میزان اسیدیته در طی زمان نگهداری روند افزایشی و میزان pH روند کاهشی داشت. همچنین بریکس و الکل روند ثابتی داشتند. میزان ترکیبات فنولی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی در نمونه حاوی ۱۲ درصد شیر انگور نسبت به نمونه حاوی ۹ درصد بیشتر بود ( $p < 0.05$ ). خاصیت آنتی‌اکسیدانی نیز در طول زمان روند کاهشی داشت به طوری که در تیمار ۱ از  $153/4$  به  $97/72$  (میلی مول  $Fe^{+2}$  در گرم) و در تیمار ۲ از  $123/35$  به  $80/52$  (میلی مول  $Fe^{+2}$  در گرم) رسید. طبق نتایج به‌دست‌آمده پس از ۹۰ روز، تیمارهای تهیه‌شده نوشیدنی فاقد آلودگی میکروبی (کلی‌فرم‌ها، اش‌ریشیا کولای، کپک و مخمر) بودند. همچنین شمارش باکتری باسیلوس کوآگولانس به میزان کمتر از  $10^7$  CFU/ml گزارش نشد. ارزیابی حسی نشان داد پذیرش کلی تیمار ۱ نسبت به تیمار ۲ بیشتر بود ولی بین دو گروه اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده تیمار بهینه، تیمار حاوی ۱۲ درصد شیر انگور به همراه ۲۵ درصد عرق پوست لیموترش و  $10^7$  CFU/ml باکتری باسیلوس کوآگولانس بود.

واژه‌های کلیدی: باسیلوس کوآگولانس، شیر انگور، عرق پوست لیموترش، نوشیدنی فراسودمند

## مقدمه

در دهه‌های اخیر تغییرات چشمگیری در درک نقش غذا در بهبود کیفیت زندگی، افزایش طول عمر و پیشگیری از بیماری‌هایی همچون عفونت‌های گوارشی، تصلب شرائین، کلسترول، سرطان (به‌خصوص سرطان روده) و التهاب مجرای گوارشی ایجاد شده است. در این راستا الگوی غذایی جوامع پیشرفته و در حال توسعه به سمت تولید مواد غذایی فراسودمند سوق داده شده است. مواد غذایی فراسودمند افزون بر خواص تغذیه‌ای، حداقل دارای یک ویژگی سلامتی بخش می‌باشند که توسط دانشمندان علم تغذیه توصیه می‌شوند (Ebrahimsaray et al., 2018; Karbasi et al., 2014). غذاهایی که حاوی باکتری‌های پروبیوتیک هستند در گروه غذاهای فراسودمند قرار می‌گیرند و بر طبق توصیه فدراسیون بین‌المللی فرآورده‌های لبنی (IDF) این غذاها بایستی حاوی  $10^7$  cfu/g باکتری پروبیوتیک باشند و مصرف‌کننده بایستی حداقل ۱۰۰ گرم در روز از این غذا را مصرف کند تا اثرات مفید این دسته از غذاها را دریافت کند (Anal and Singh, 2007; Donkor et al., 2007). از جمله باکتری‌هایی که می‌توان از آن به‌عنوان پروبیوتیک نام برد باکتری باسیلوس کوآگولانس است که یک باسیل گرم مثبت، بی‌هوازی اختیاری، اسپوردار، متحرک، طنابی شکل است (Adibpour et al., 2019). شکر از ترکیبات اصلی مواد غذایی است که علاوه بر نقش شیرین‌کنندگی، دارای ویژگی‌های عملکردی می‌باشد. با وجود تمام فواید ساکارز، به دلیل ارتباط با برخی مشکلات سلامتی مانند فشارخون، بیماری‌های قلبی عروقی، فساد دندان، چاقی و دیابت، پژوهش‌های روزافزونی جهت یافتن جایگزین‌های مناسب شکر در

حال انجام است (Ahmed et al., 2001). از مشکلات جایگزینی شکر با سایر شیرین‌کننده‌ها، ایجاد خصوصیات بافتی و عملکردی مشابه شکر، طعم مطلوب و حفظ کیفیت فرآورده می‌باشد. بنابراین انتخاب نوع شیرین‌کننده، چالش عمده تولید محصولات رژیمی می‌باشد (Specter and Setser, 1994; Soukoulis and Tzia C, 2010).

شیره انگور از فرآورده‌های باارزش ثانویه انگور (با نام علمی *Vitis vinifera* L و از خانواده *Vitaceas*) است که سرشار از قند طبیعی بوده و برای بیماران دیابتی کم‌ضررتر است. جایگزین کردن شیره انگور در فرمولاسیون مواد غذایی علاوه بر این که می‌تواند جایگزین مناسبی برای شکر باشد، می‌تواند سبب بهبود خواص تغذیه‌ای مواد غذایی شود. شیره انگور در مقایسه با ساکارز دارای مزایایی می‌باشد از جمله: تمایل کم به قندک زدن (شکرک زدن)، جذب رطوبت بالاتر و قدرت شیرین‌کنندگی بیشتر (Ahmed et al., 2001; Al-Farsi et al., 2007). قندهای شیره انگور عمدتاً از فروکتوز و گلوکز است و از این نظر مشابه شیره خرما و عسل می‌باشد (Al-Farsi et al., 2007; Tavakoli pour and Kalbasi-Ashtari, 2013; Bilgicli and Akbulut, 2009). لیموترش با نام علمی *Citrus limon Burm. F* درختی از خانواده نارنج *Rutaceae* است که دارای خواص بی‌شماری می‌باشد. عصاره لیموترش به سبب داشتن مقدار قابل‌ملاحظه‌ای ویتامین C، یک آنتی‌اکسیدان قوی است. پوست لیموترش نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل‌ملاحظه‌ای دارد (Mirheidar, 2006).

### مواد و روش‌ها

#### - تهیه شیره انگور و عرق پوست لیموترش

شیره انگور از شرکت انگور بن جنوب بندرعباس و عرق پوست لیموترش از شرکت محصولات گیاهی نارون علوی کاشان دارای پروانه ساخت بهداشتی تهیه و در آزمایشگاه کنترل مواد غذایی کاشان بر اساس استاندارد ملی ایران مورد ارزیابی قرار گرفت و مطابق با استاندارد ملی ایران تأیید کیفیت شد (ISIRI 3545/2007; 2018).

#### - تهیه باکتری پروبیوتیک

باسیلوس کوآگولانس از شرکت دانش‌بنیان تک ژن دارای گواهی کیفیت خریداری شد و در شرایط استریل به تیمارها اضافه گردید.

#### - تهیه و آماده‌سازی نوشیدنی

ترکیبات تشکیل‌دهنده نوشیدنی شامل شیره انگور، عرق پوست لیموترش و باکتری پروبیوتیک می‌باشند که با سایر اجزای نوشیدنی به روش گراویمتری (وزن سنجی) به نسبت‌های مشخص تهیه شدند (جدول ۱). پس از تهیه تیمارهای ۱ و ۲ و پاستوریزه کردن آن‌ها در دمای ۶۳ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه، باکتری پروبیوتیک تحت شرایط استریل به طوری افزوده شد که محصول نهایی مطابق استاندارد ملی ایران حاوی حداقل  $10^8$  CFU/ml باکتری باسیلوس کوآگولانس باشد. محصول نهایی در یخچال نگهداری شد و طی ۹۰ روز در روزهای صفر، ۳۰، ۶۰، ۹۰، آزمون‌های مختلف روی آن انجام گرفت.

در تحقیقی که بر روی خصوصیات کیک اسفنجی تولیدشده با شیره انگور انجام شد مشخص شد قوام و وزن مخصوص خمیر با افزایش شیره انگور، افزایش می‌یابد (Shahidi et al., 2017). در مطالعه‌ای تأثیر جایگزینی شکر با شیره انگور بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و حسی بستنی وانیلی بررسی شد (Jafarpour and Maleki, 2015). در مطالعه‌ای به تولید و بسته‌بندی نوشیدنی تخمیری فراسودمند از شیره خرما حاوی لاکتوباسیلوس رامنوسوس پرداخته شد (Karbasi et al., 2015). در یک بررسی تأثیر شیره خرما بر خواص فیزیکوشیمیایی، میکروبی و حسی نوشیدنی تهیه‌شده از دانه‌های کفیر را بررسی کردند (Taherian and Sadeghi Mahoonak, 2015) و در بررسی دیگری ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و بهینه‌سازی فرمولاسیون ماست طعم‌دار حاوی شیره انجیر و باکتری باسیلوس کوآگولانس را ارزیابی کردند (Jafarpour and Maleki, 2018).

با توجه به تمایل مصرف‌کنندگان به شیرین‌کننده‌های طبیعی در محصولات غذایی و کمبود مطالعات در زمینه استفاده از شیره انگور در نوشیدنی‌ها در داخل کشور، در این پژوهش، جایگزین کردن کامل ساکارز با شیره انگور در تولید نوشیدنی فراسودمند با استفاده از عصاره پوست لیموترش و تأثیر آن بر خصوصیات فیزیکی و حسی محصول مورد بررسی قرار گرفت.

جدول (۱) - ترکیبات تشکیل دهنده نوشیدنی (%).

ترکیبات	تیمار ۱	تیمار ۲
عرق پوست لیموترش	۲۵	۲۵
شیره انگور	۱۲	۹
اسیدسیتریک	۰/۱۱	۰/۰۸
آب	۶۲/۸۹	۶۵/۹۲

## - آزمون‌های شیمیایی

اندازه‌گیری مواد جامد محلول در آب (بریکس) و قند کل مطابق با استاندارد ملی ایران (ISIRI/2685/2007)، اسیدیته مطابق استاندارد ملی (ISIRI/11077/2016)، pH و الکل اتیلیک با استاندارد ملی (ISIRI/1487/2014) و اندازه‌گیری پروتئین طبق استاندارد ملی ایران (ISIRI/1029/2018; ISIRI/117, 1990) انجام شد.

## - اندازه‌گیری ترکیبات فنولیک

ترکیبات فنولیک با استفاده از روش فولین سیوکالتیو اندازه‌گیری شد. محلول‌های استاندارد با غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۶۲/۵، ۱۰۰ و ۱۲۵ ppm از گالیک‌اسید در محلول متانول ۶۰٪ تهیه گردید. ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول عصاره را به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول ۱۰ درصد فولین اضافه کرده و پس از ۳ الی ۸ دقیقه به آن ۰/۴ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد اضافه کرده، پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای آزمایشگاه جذب محلول‌ها در ۷۶۵ نانومتر نسبت به شاهد قرائت گردید. نتایج به صورت میلی‌گرم در گرم گیاه خشک معادل اسید گالیک گزارش شد (Sharafati et al., 2011).

## - اندازه‌گیری خاصیت آنتی‌اکسیدانی به روش احیا آهن

## (FRAP)

مقدار ۰/۸۳ میلی‌لیتر از اسیدکلریدریک ۳۷ درصد توسط سمپلر در بالن ژوژه ریخته و با آب مقطر به حجم

۲۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. ۳/۱ گرم از استات سدیم توزین و با آب مقطر در بالن ژوژه به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده و سپس ۱۶ میلی‌لیتر اسیداستیک به محلول افزوده شد. محلول TPTZ، محلول کلرید آهن و بافر استات به نسبت ۱۰:۱:۱ مخلوط شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره به دست‌آمده در حلال متانول با غلظت‌های مختلف با ۳ میلی‌لیتر از محلول FRAP مخلوط و ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. جذب محلول‌ها در ۵۹۳ نانومتر نسبت به نمونه شاهد قرائت گردید. از BHT به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. به منظور کالیبراسیون از محلول آبی Fe (II) با غلظت مشخص در محدوده ۱۰۰-۲۰۰ M $\mu$  (FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) استفاده شد. نتایج به صورت میلی‌مول Fe<sup>+2</sup> در گرم گیاه خشک گزارش گردید (Kamali et al., 2014).

## - آزمون‌های میکروبی

شمارش/شیریشیا کولای مطابق با استاندارد ملی ایران، (ISIRI/2946/2004)، شمارش کپک و مخمر مطابق با استاندارد ملی ایران (ISIRI/10893-3/2007) و شمارش کلی‌فرم (MPN) مطابق با استاندارد ملی ایران (ISIRI/11166/2008) انجام شد. برای شمارش باکتری پروبیوتیک، نمونه در دمای ۸۰±۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری، حرارت داده شد. سپس در

آب سرد تا دمای ۴۵ تا ۵۰ درجه سلسیوس خنک و به مدت ۵۰-۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در انکوباتور شیکردار قابل تنظیم با سرعت ۱۰۰-۱۵۰ دور در دقیقه، گرمخانه‌گذاری گردید. رقت‌های اعشاری تهیه شد. مقدار ۱ میلی‌لیتر از هر لوله به روش پورپلیت در محیط پلیت کانت آگار کشت داده شد و در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری و شمارش شد (Jafarpour and Maleki, 2015).

#### - ارزیابی حسی

از روش هدونیک ۵ نقطه و ۱۰ نفر ارزیاب زن و مرد با محدوده سنی ۲۲ تا ۵۰ سال از کارشناسان علوم و صنایع غذایی و تغذیه دانشگاه علوم پزشکی کاشان استفاده شد. پارامترهای مورد ارزیابی شامل رنگ، بو، طعم، مزه دهانی و پذیرش نهایی بود.

#### - روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

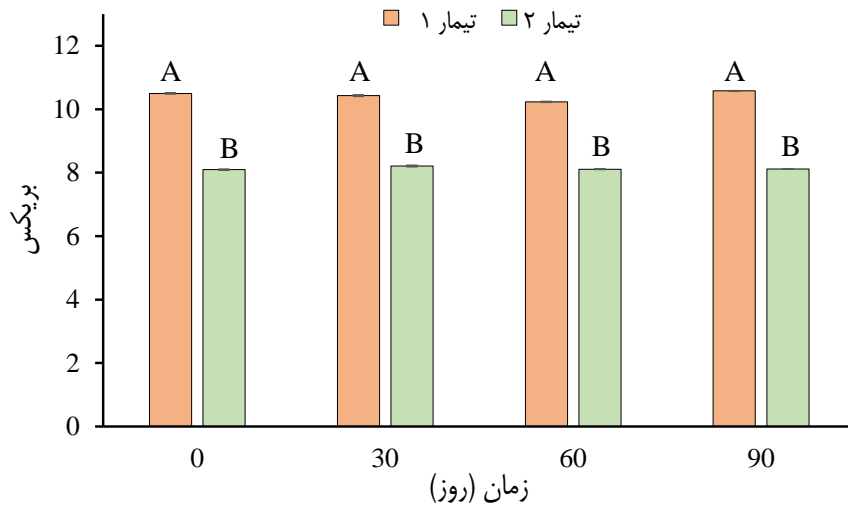
آنالیزهای شیمیایی و میکروبی با سه تکرار انجام و نتایج بر اساس میانگین و انحراف معیار در نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ به دست آمد. برای مقایسه میانگین از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن استفاده شد.

#### یافته‌ها

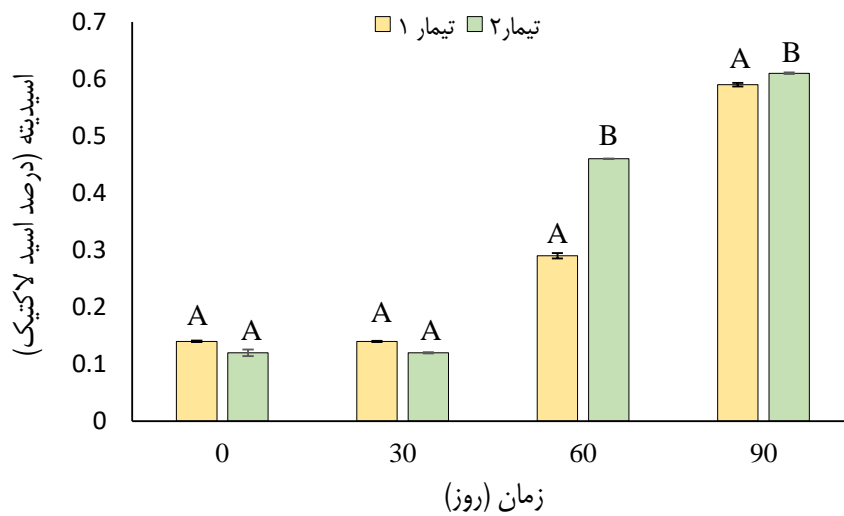
##### - آزمون‌های شیمیایی

بر اساس نتایج به دست آمده میزان پروتئین در تیمارهای ۱ و ۲ به ترتیب برابر  $27 \pm 0$  و  $216/8 \pm 0/57$

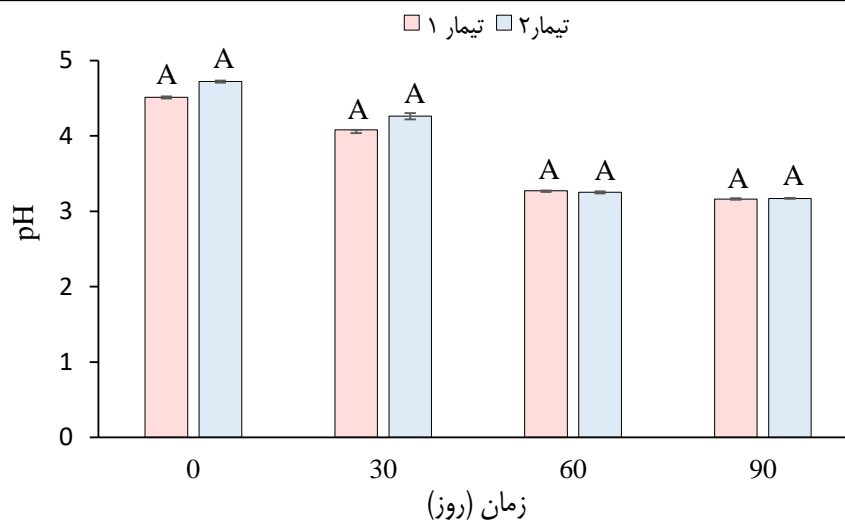
$165/6$  میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر بود. میزان قند در تیمارهای ۱ و ۲ به ترتیب برابر  $14 \pm 0/8$  و  $46 \pm 0/8$  درصد بود. نتایج نشان می‌دهد با افزایش میزان شیره انگور محتوی پروتئین و قند افزایش معنی‌داری در تیمار ۱ نسبت به تیمار ۲ نشان داده است ( $p < 0/05$ ). میزان بریکس به‌طور معنی‌داری در تیمار ۱ بیشتر از تیمار ۲ بود (نمودار ۱). در طی زمان ماندگاری تغییر معنی‌داری در میزان بریکس تیمارها مشاهده نشد. میزان اسیدیته به‌طور معنی‌داری در روزهای ۶۰ و ۹۰ زمان نگهداری در تیمارها افزایش نشان داده است ولی تغییرات اسیدیته در روز صفر و ۳۰ از زمان نگهداری در یخچال معنی‌دار نمی‌باشد. همچنین در هرروز به‌جز در روزهای صفر و ۳۰، بین تیمار ۱ و تیمار ۲ تفاوت معنی‌داری ( $p < 0/05$ ) در میزان اسیدیته مشاهده شد (نمودار ۲). میزان pH در طی زمان ۹۰ روزه در تمامی تیمارها به‌طور معنی‌داری روند کاهشی نشان داد ( $p < 0/05$ )، به‌طوری‌که میزان pH در تیمار ۱ از  $4/51$  به  $3/16$  و در تیمار ۲ از  $4/72$  به  $3/175$  نزول پیدا کرده است (نمودار ۳). این نتایج با میزان تغییرات اسیدیته نیز مطابقت دارد (نمودار ۲). ولی در هرروز تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد. میزان الکل در طی زمان ۹۰ روزه در تمامی تیمارها روند افزایشی نشان نداد (نمودار ۴).



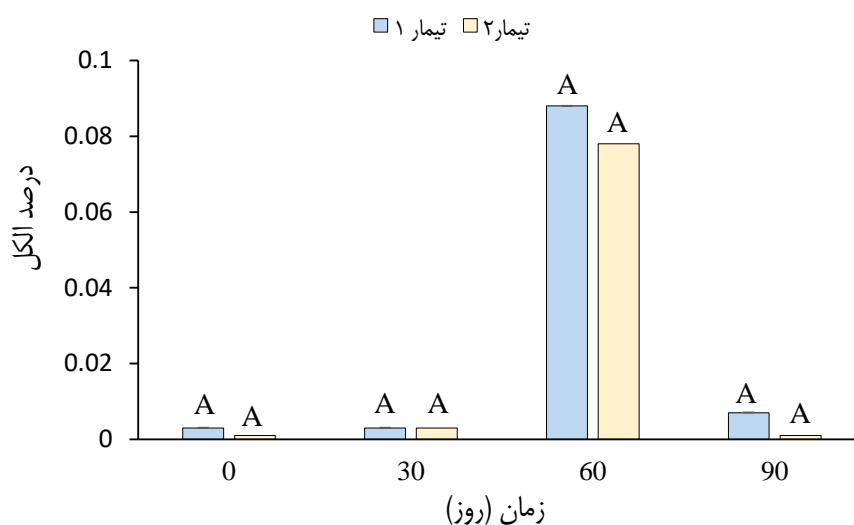
نمودار (۱) - تغییرات میزان بریکس در تیمارهای مختلف نوشیدنی تهیه شده در طی زمان ۹۰ روز در دمای یخچالی؛ تیمار ۱: ۱۲ میلی لیتر شیره انگور، ۲۵ میلی لیتر عرق پوست لیمو و  $10^8$  CFU/ml باسیلوس کواگولانس، تیمار ۲: ۹ میلی لیتر شیره انگور، ۲۵ میلی لیتر عرق پوست لیمو و  $10^8$  CFU/ml باسیلوس کواگولانس، حروف نامتشابه (A,B) در هرروز نشان دهنده تفاوت معنی داری ( $p < 0/05$ ) می باشد.



نمودار (۲) - تغییرات میزان اسیدیته برحسب اسیدلاکتیک در تیمارهای مختلف نوشیدنی تهیه شده در طی زمان ۹۰ روز در دمای یخچالی؛ تیمار ۱: ۱۲ میلی لیتر شیره انگور، ۲۵ میلی لیتر عرق پوست لیمو و  $10^8$  CFU/ml باسیلوس کواگولانس، تیمار ۲: ۹ میلی لیتر شیره انگور، ۲۵ میلی لیتر عرق پوست لیمو و  $10^8$  CFU/ml باسیلوس کواگولانس، حروف نامتشابه (A,B) در هرروز نشان دهنده تفاوت معنی داری ( $p < 0/05$ ) می باشد.



نمودار (۳)- تغییرات میزان pH در تیمارهای مختلف نوشیدنی تهیه شده در طی زمان ۹۰ روز در دمای یخچالی؛ تیمار ۱: ۱۲ میلی لیتر شیره انگور، ۲۵ میلی لیتر عرق پوست لیمو و  $10^8$  CFU/ml باسیلوس کواگولانس، تیمار ۲: ۹ میلی لیتر شیره انگور، ۲۵ میلی لیتر عرق پوست لیمو و  $10^8$  CFU/ml باسیلوس کواگولانس، حروف نامتشابه (A,B) در هر روز نشان دهنده تفاوت معنی داری ( $p < 0/05$ ) می باشد.



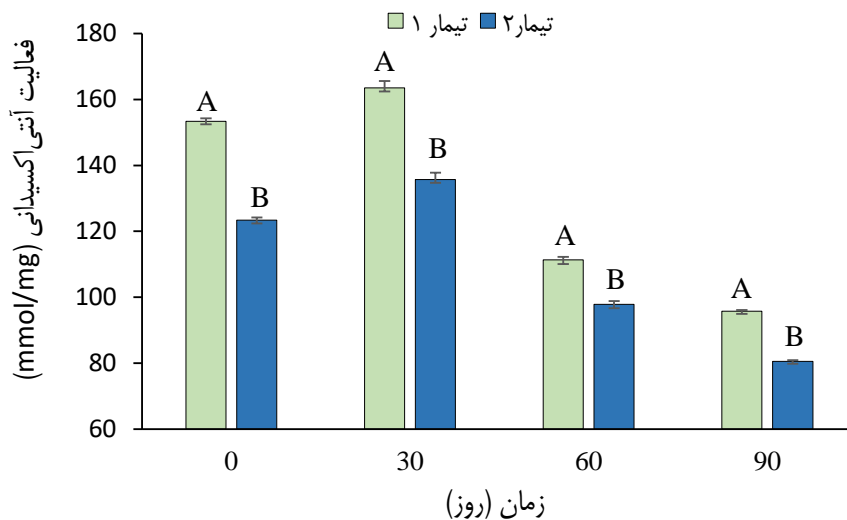
نمودار (۴)- تغییرات میزان الكل در تیمارهای مختلف نوشیدنی تهیه شده در طی زمان ۹۰ روز در دمای یخچالی؛ تیمار ۱: ۱۲ میلی لیتر شیره انگور، ۲۵ میلی لیتر عرق پوست لیمو و  $10^8$  CFU/ml باسیلوس کواگولانس، تیمار ۲: ۹ میلی لیتر شیره انگور، ۲۵ میلی لیتر عرق پوست لیمو و  $10^8$  CFU/ml باسیلوس کواگولانس، حروف نامتشابه (A,B) در هر روز نشان دهنده تفاوت معنی داری ( $p < 0/05$ ) می باشد.



## - بررسی میزان فعالیت آنتی اکسیدانی

۹۷/۷۲ (میلی مول  $Fe^{+2}$  در گرم) و در تیمار ۲ از ۱۲۳/۳۵ به ۸۰/۵۲ (میلی مول  $Fe^{+2}$  در گرم) کاهش پیدا کرده است. همچنین در هرروز تفاوت معنی داری بین تیمارها مشاهده شد ( $p < 0/05$ ).

همان گونه که از نمودار ۵ مشخص است، میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در طی ۹۰ روز در تمامی تیمارها به طور معنی داری کاهش یافت ( $p < 0/05$ ). به طوری که میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در تیمار ۱ از ۱۵۳/۴ به

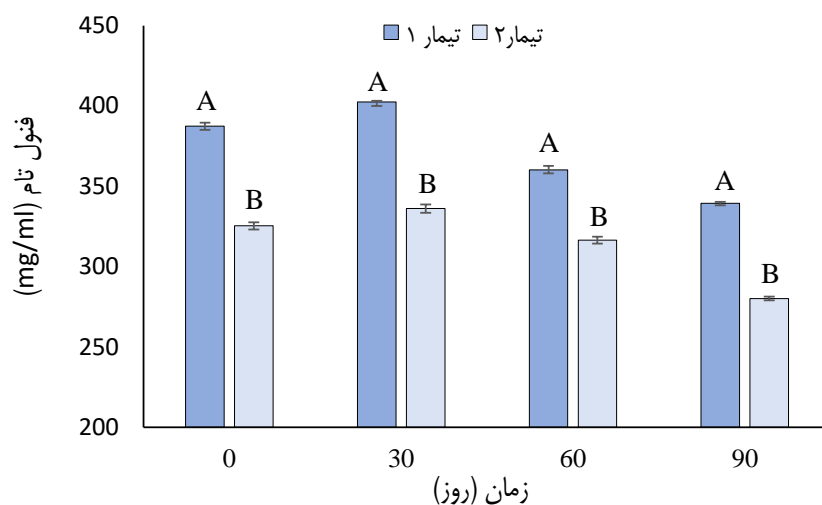


نمودار (۵)- تغییرات میزان فعالیت آنتی اکسیدانی به روش احیا آهن در تیمارهای مختلف نوشیدنی تهیه شده در طی زمان ۹۰ روز در دمای یخچالی؛ تیمار ۱: ۱۲ میلی لیتر شیره انگور، ۲۵ میلی لیتر عرق پوست لیمو و  $10^8$  CFU/ml باسیلوس کواگولانس، تیمار ۲: ۹ میلی لیتر شیره انگور، ۲۵ میلی لیتر عرق پوست لیمو و  $10^8$  CFU/ml باسیلوس کواگولانس، حروف نامتشابه (A,B) در هرروز نشان دهنده تفاوت معنی داری ( $p < 0/05$ ) می باشد.

## - بررسی میزان ترکیبات فنولیک

و در تیمار ۲ از ۳۲۵/۴ به ۲۸۰/۲۱ (میلی گرم در گرم معادل اسید گالیک) نزول پیدا کرده است. همچنین در هرروز تفاوت معنی داری بین تیمارها مشاهده شد ( $p < 0/05$ ).

بر اساس نتایج به دست آمده میزان فنول تام در طی ۹۰ روز در تمامی تیمارها به طور معنی داری کاهش یافت (نمودار ۶). به طوری که میزان فنول تام در تیمار ۱ از ۳۸۷/۴ به ۳۳۹/۳۶ (میلی گرم در گرم معادل اسید گالیک)



نمودار (۶) - تغییرات میزان فنول تام در تیمارهای مختلف نوشیدنی تهیه شده در طی زمان ۹۰ روز در دمای یخچالی؛ تیمار ۱: ۱۲ میلی لیتر شیر انگور، ۲۵ میلی لیتر عرق پوست لیمو و  $10^8$  CFU/ml باسیلوس کوآگولانس، تیمار ۲: ۹ میلی لیتر شیر انگور، ۲۵ میلی لیتر عرق پوست لیمو و  $10^8$  CFU/ml باسیلوس کوآگولانس، حروف نامتشابه (A,B) در هر روز نشان دهنده تفاوت معنی داری ( $p < 0/05$ ) می باشد.

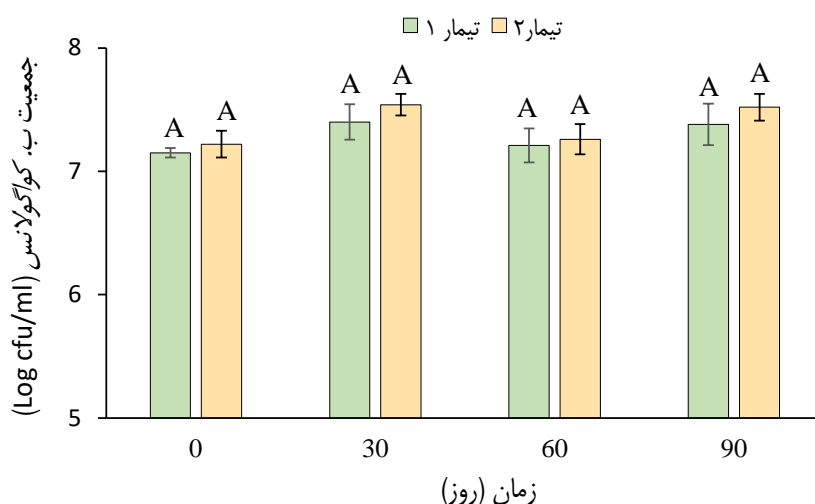
#### - آزمون های میکروبی

تعداد باکتری های باسیلوس کوآگولانس تغییر معنی داری

مشاهده نشد (نمودار ۷).

بر اساس نتایج، هیچ کدام از نوشیدنی ها آلودگی به

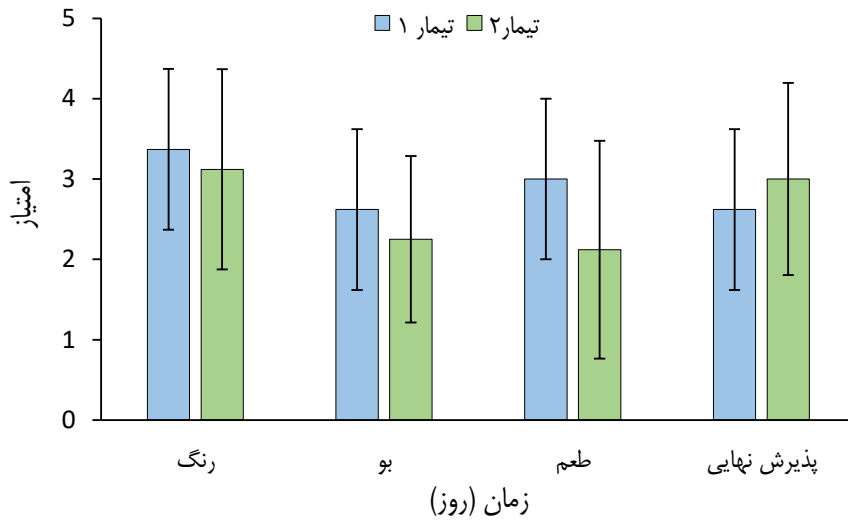
کلی فرم، /شیریشیا کولای، کپک و مخمر نداشتند و در



نمودار (۷) - تغییرات میزان شمارش باسیلوس کوآگولانس در تیمارهای مختلف نوشیدنی تهیه شده در طی زمان ۹۰ روز در دمای یخچالی؛ تیمار ۱: ۱۲ میلی لیتر شیر انگور، ۲۵ میلی لیتر عرق پوست لیمو و  $10^8$  CFU/ml باسیلوس کوآگولانس، تیمار ۲: ۹ میلی لیتر شیر انگور، ۲۵ میلی لیتر عرق پوست لیمو و  $10^8$  CFU/ml باسیلوس کوآگولانس، حروف نامتشابه (A,B) در هر روز نشان دهنده تفاوت معنی داری ( $p < 0/05$ ) می باشد.

## - ارزیابی حسی

طبق نتایج آزمون هدونیک، تفاوت معنی داری بین تیمارهای ۱ و ۲ در خواص مختلف رنگ، بو، طعم و پذیرش نهایی مشاهده نشد (نمودار ۸).



نمودار (۸) - خواص ارگانولپتیک نوشیدنی‌های مختلف؛ تیمار ۱: ۱۲ میلی‌لیتر شیره انگور، ۲۵ میلی‌لیتر عرق پوست لیمو و  $10^8$  CFU/ml باسیلوس کواگولانس، تیمار ۲: ۹ میلی‌لیتر شیره انگور، ۲۵ میلی‌لیتر عرق پوست لیمو و  $10^8$  CFU/ml باسیلوس کواگولانس، حروف نامتشابه (A,B) در هر روز نشان‌دهنده تفاوت معنی داری ( $p < 0/05$ ) می‌باشد.

## بحث و نتیجه‌گیری

۰/۱ گرم در صد میلی‌لیتر). میزان pH در طی زمان ۹۰ روزه در تمامی تیمارها روند کاهشی نشان داد، ولی در محدوده استاندارد قرار داشت (ISIRI/1487/2016). میزان بریکس در دامنه ۸/۱ تا ۱۰/۶ درصد قرار دارد. بریکس در تیمار ۱ به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار ۲ بود و دلیل آن‌هم احتمالاً ناشی از غلظت بالاتر شیره انگور در تیمار ۱ می‌باشد. میزان الکل اتیلیک در طی زمان ۹۰ روزه در تمامی تیمارها تغییری نشان نداد که این نشان از عدم تولید الکل در محصول و یک فرآورده غیرالکلی می‌باشد. این میزان با میزان استاندارد ملی مطابقت داشت (ISIRI/1487/2014).

در این مطالعه تجربی، تیمارهای حاوی ۱۲ درصد شیره انگور (تیمار ۱) و ۹ درصد شیره انگور (تیمار ۲) به همراه ۲۵ درصد عرق پوست لیموترش و CFU/ml  $10^7$  باکتری باسیلوس کواگولانس تهیه شد و آزمون‌های میکروبی و شیمیایی به مدت ۹۰ روز انجام گرفت. نتایج آزمایش‌های حاصل از آزمون‌های شیمیایی نشان داد که با افزایش میزان شیره انگور محتوی پروتئین و قند افزایش معنی‌داری در تیمار ۱ نسبت به تیمار ۲ نشان داده است ( $p < 0/05$ ). میزان اسیدیته در تیمارها مطابق با استاندارد می‌باشد (به ترتیب بیشینه ۰/۵ و ۰/۷ -

سوپراکسید، نیتریک اکسید و مهار پراکسیداسیون لیپیدها در عصاره برگ مشاهده می‌شود ( Pourakbarand Adli, 2017). در مطالعه‌ای که در استان فارس بر روی عصاره هسته انگور انجام شد، سنجش مهار رادیکال آزاد با روش DPPH، خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره تأیید شد. همچنین مشخص شد این عصاره دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بالقوه با مهار اکسیداسیون چربی و فعالیت ضد میکروبی در مقابل پاتوژن‌های مواد غذایی مانند لیستریا مونوسیتوژنز، سالمونلا تیفی موریوم و کامپیلوباکتر ژرژونی در جلوگیری از آلودگی‌های پاتوژنی است (Hoseinzadeh, 2019). در مطالعه‌ای که بر روی عصاره انگور تخمیر شده انجام دادند، مشخص شد فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره می‌تواند تحت تأثیر ساختارهای متفاوت اسیدهای فنولیک و فلاونوئیدها و همچنین مشتقات این ترکیبات باشد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسیدهای فنولیک و مشتقات آن همانند استرها، وابسته به تعداد گروه‌های هیدروکسیل در مولکول است. این نتیجه نشان می‌دهد که نوع ترکیب فنولیک، بیشتر از مقدار آن در فعالیت آنتی‌اکسیدانی نقش دارد (Ashrafi Yorghanloo et al., 2015).

تحقیقات نشان داده است که لیموترش نیز دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است و خاصیت بازدارندگی پراکسیداسیون لیپید به وسیله اسانس لیمو تقریباً برابر یا بیشتر از قدرت آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک BHT و BHA می‌باشد. فنل‌ها و فلاونوئیدهای گیاهی، ممانعت پراکسیداسیون لیپید را با مهار رادیکال‌های پروکسی و احیا یا شلاته کردن آهن در آنزیم لیپوکسیژناز و ممانعت از شروع واکنش پراکسیداسیون لیپید انجام می‌دهند. این مطالعه مؤید این است که ارتباط مستقیمی بین محتوای

این نتایج با نتایج به دست آمده توسط سایر محققین مطابقت داشت. به عنوان مثال افزودن شیره انگور به بستنی به طور معنی‌داری pH را کاهش و اسیدیته را افزایش داده است (Frarji Kafshgari et al., 2015). در بررسی دیگری نشان دادند که در انتهای دوره نگهداری در یخچال، اسیدیته نوشیدنی پروبیوتیک روند افزایشی و pH روند کاهشی داشته است. همچنین تعداد باکتری‌ها بیش از میزان پیشنهادی برای تأمین اثرات سلامتی بخش ( $10^6-10^7$  CFU/ml) بود (Dastras et al., 2019). در یک پژوهش نشان دادند که با افزودن شیره خرما به فرمولاسیون نوشیدنی کفیر میزان اسیدیته به نمودار معنی‌داری افزایش پیدا کرده و از میزان pH به طور معنی‌داری کاسته شده است. همچنین با افزایش درصد شیره خرما در تهیه نوشیدنی کفیر، میزان بریکس به نمودار معنی‌داری افزایش پیدا می‌کند (Taherian and Sadeghi Mahoonak, 2015).

این مطالعه نشان داد که، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فنول تام در تیمار ۱ بیشتر از تیمار ۲ بود. این نتایج با توجه به حضور مقدار بیشتر شیره انگور در تیمار ۱ قابل توجیه بود. در یک بررسی نشان داده شد با افزایش درصد آبیوه (آلبالو-زرشک) به فرمولاسیون شیر سویا نیز میزان ترکیبات فلاونوئیدی، میزان آنتوسیانین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی به دلیل وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در آلبالو و زرشک افزایش یافت (Nazarian et al., 2013). در بررسی محتوای ترکیبات فنولی و ظرفیت ضد اکسایشی در برگ، غوره، کشمش و شیره انگور کشمشی قرمز نشان داده شد که شیره انگور بیشترین محتوای فنلی و فلاونوئیدی را دارا می‌باشد و بیشترین درصد جمع‌آوری رادیکال DPPH،

اسانس گشنیز و لیموترش در مقابل میکروارگانیزم‌های اشرشیاکلی و سودوموناس آئوروزنس خاصیت ضد میکروبی نشان دادند، اما تأثیر معنی‌داری بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نداشتند. تأثیر ضد میکروبی اسانس لیمو بر سودوموناس به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از اسانس گشنیز بود (Sedaghat et al., 2015). در ماهی کیلکا عصاره نارنج و پوست لیموترش اثر ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی مطلوبی دارند و باعث افزایش ماندگاری آن می‌گردند (Shahpoori, 2016). نتایج بررسی نوشیدنی فراسودمند نشان‌دهنده عدم رشد میکروبی بود که دلیل این امر را می‌توان با اعمال فرآیند حرارتی نوشیدنی‌ها مرتبط دانست (Khamirian et al., 2017). در نوشیدنی فراسودمند حاوی شیره خرما و لاکتوباسیلوس رامنوسوس، آلودگی کپک، مخمر و باکتری‌های مزوفیل هوازی مشاهده نشد و ارزیابی حسی نیز تغییرات معنی‌داری را در پارامترهای اندازه‌گیری شده نشان نداد (Karbasi et al., 2014). یافته‌های حاصل از بررسی دو گز معمولی و گز بدون قند نشان داد که تعداد کلی باکتری‌ها بلافاصله بعد از تولید پس از ۴ ماه ماندگاری از  $10^6$  CFU/g کمتر نشد و این تعداد باکتری تقریباً ثابت ماند (Daliran-Firooz et al., 2014).

با توجه به نتایج آزمون‌های انجام‌شده بر روی هر دو نوع تیمار، تمامی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و میکروبی در محدوده استاندارد ملی ایران برای نوشیدنی قرار دارند. با توجه به خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنولی شیره انگور و عرق پوست لیموترش و با توجه به زنده‌مانی باکتری باسیلوس کوآگولانس ( $10^7$  CFU/ml) می‌توان نتیجه گرفت، نوشیدنی مورد مطالعه فراسودمند

فنلی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها و اسانس‌ها وجود دارد (Sharafi et al., 2010). مطالعات اخیر نشان داده است که لیموترش خاصیت مغذی، دارویی، آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی دارد. حضور ترکیباتی نظیر تانین، استروئید، فولیک اسید، ترپنویید، فلاونویید و ساپونین خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی لیموترش را توجیه می‌کند. مواد استخراج شده از پوست لیموترش روی اشریشیا کولای، لیستریا مونوسیتوژنز، سالمونلا تیفی موریم، باسیلوس سریوس و انتروکوکوس فکالیس هم تأثیر دارد (Hoseinzadeh, 2019). در تحقیقی بر روی اثر اسانس چای سبز و لیموترش بر ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی، میکروبی و حسی کیک روغنی نشان دادند با افزایش زمان نگهداری میزان رطوبت و pH کاهش و میزان اسیدیته افزایش می‌یابد. مقایسه خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی کیک‌های روغنی حاوی اسانس چای سبز و لیموترش با شاهد نشان داد استفاده از اسانس‌ها، از افزایش اندیس پراکسید و تیوباریتوریک و رشد کپک و مخمر طی دوره نگهداری جلوگیری می‌نماید (Tajik et al., 2017).

نتایج حاصل از آزمون‌های میکروبی در این مطالعه نشان داد که محصولات تولیدشده قابلیت ماندگاری تا ۹۰ روز را در شرایط یخچالی داشتند. بنابراین محصول تولیدشده به‌عنوان یک نوشیدنی پروبیوتیکی طبق استاندارد ملی با میزان حداقل پروبیوتیک در یک فرآورده  $10^6$  CFU/ml تطابق دارد (ISIRI/11325/2018). عصاره‌های گیاهی دارای خواص ضد میکروبی می‌باشند. اسانس لیموترش حاوی لیمونن و فلاندرن است که خاصیت ضد میکروبی این ترکیبات به اثبات رسیده است (Sedaghat et al., 2015). در یک بررسی در گوشت، فیلم‌های حاوی

## تعارض منافع

بوده و می‌تواند جهت تولید و عرضه تجاری موردتوجه

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی برای اعلام

قرار گیرد.

ندارند.

## منابع

- Adibpour, N., Hosseinezhad, M., Pahlevanlo, A., Hussain, M.A. (2019). A review on *Bacillus coagulans* as a Spore-Forming Probiotic. *Applied Food Biotechnology*, 6(2): 91-100.
- Ahmed, Z., Banu, H., Akhter, F., Faruquzzaman, M. and Haque, S. (2001). Concept on Sugar-A Review. *Journal of Biological Sciences*, 1(9): 883-894.
- Ashrafi Yorghanloo, R., Alizadeh Khaledabad, M., Rezazad Bari, M. and Pour Akbar, L. (2015). Total phenolics, flavonoids content and antioxidant capacities of grape pomace fermented by *Aspergillusoryzae*. *Journal of Food Hygiene*, 4(4): 55-67. [In Persian]
- Al-Farsi, M., Alasalvar, C., Al-Abid, M., Al-Shoaily, K., Al-Amry, M. and Al-Rawaly, F. (2007). Compositional and functional characteristics of dates, syrups, and their by-products. *Food Chemistry*, 104(3): 943-947.
- Anal, A.K., Singh, H. (2001). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5): 240-251.
- Bilgicli, N. and Akbulut, M. (2009). Effects of different pekmet (fruit molasses) types on chemical, nutritional content and storage stability of cake. *Journal of Food Quality*, 32(1): 96-107.
- Daliran-Firooz, G., Alizade, S. and Goharian, M. (2014). Study Viability of *Bacillus coagulans* in cotton candy and sugar free cotton candy. *Biotechnology and Applied Microbiology*, 3(1): 9-16. [In Persian]
- Dastras, M., Soltanzadeh, M. and Peighambaroust, H. (2019). Production of Cereal- based Probiotic Beverage Optimized by Response Surface Methodology and Investigation of Its Properties. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 14(1): 47-56 [In Persian]
- Donkor, O.N., Nilmini, S.L.I., Stolic, P., Vasiljevic, T., Shah, N.P. (2007). Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal*, 17(6): 657-665.
- Ebrahimsaray, N., Javadi, A. and Bodbodak, S. (2018). Effect of Sugar Replacement with two sweeteners of date liquid sugar and date syrup on physico-chemical, microbiological and sensory properties of low calorie and functional ice cream. *Food Science and Technology*, 15(77): 316-303. [In Persian]
- Frarji Kafshgari, S., Fallah Shojaee, M. and Akbarian Meymand, M.J. (2015). The effect of replacing sugar with concentrated grape juice on physicochemical and sensory properties of vanilla ice cream. *The journal of Innovative Food Technologies*, 2(2): 85-93. [In Persian]
- Hoseinzadeh, F. (2019). Study of antioxidant and antimicrobial properties of grape seed extract and evaluation of its sensory characteristics in sponge cake. *Food Science and Technology*, 15(85): 165-178. [In Persian]
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (ISIRI), (2018). Lime/ Lemon Juice-Specifications and test methods. 6<sup>nd</sup> Revision, ISIRI No. 117. [In Persian]
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (ISIRI), (1990). meat and meat products Determination of Reference method (nitrogen Content). ISIRI No. 1029. [In Persian]
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (ISIRI), (2014). Rose Water- Test Methods. 2<sup>nd</sup> revision, ISIRI No.1487. [In Persian]
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (ISIRI), (2007). Fruit juices – Test methods. 1<sup>st</sup> revision, ISIRI No.2685. [In Persian]

- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (ISIRI), (2016). Fruit drinks (non-carbonated)-specifications. 3<sup>rd</sup> revision, ISIRI No.2837. [In Persian]
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (ISIRI), (2004). Microbiology of food and animal feeding stuffs -Detection and enumeration of presumptive Escherichia coli -Most probable number technique. 2<sup>nd</sup> revision, ISIRI No.2946. [In Persian]
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (ISIRI), (2007). Microbiology of herbaceous distillates – Specifications. 1<sup>st</sup> revision, ISIRI No.3545. [In Persian]
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (ISIRI), (2007). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds - Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0.95. 1<sup>st</sup> revision, ISIRI No.10899-1. [In Persian]
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (ISIRI), (2016). non-carbonated herbal extract drink specifications and test methods. 1<sup>nd</sup> revision, ISIRI No.11077. [In Persian]
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (ISIRI), (2008). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms – Most probable number technique. 1<sup>st</sup> edition, ISIRI No.11166. [In Persian]
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (ISIRI), (2018). Probiotic yogurt- Specifications and test methods. 1<sup>st</sup> edition, ISIRI No.11325. [In Persian]
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (ISIRI), (2018). Grape Syrup concentrate – Specification and test methods. 1<sup>st</sup> edition, ISIRI No.14725. [In Persian]
- Jafarpour, D., Maleki, M. (2018). Optimization of flavored drinking yoghurt formula containing fig syrup and *Bacillus coagulans* and evaluation of some physicochemical characteristics and its overall acceptability. Journal of Babol University of Medical Science, 20(1): 1-5.
- Kamali, M., Khosroyar, S., Jalilvand M.R. (2014). Evaluation of phenolic, flavonoids, anthocyanin contents and antioxidant capacities of different extracts of aerial parts of *Dracocephalum kotschyi*. Journal of North Khorasan University of Medical Science, 6(3): 627-634.
- Karbasi, M., Mousavi, S.M. and Yarmand, M.S. (2014). Production and packaging of fermented functional beverage from date syrup by lactobacillus rhamnosus. Journal of Food Processing and Preservation, 7(2): 17-38. [In Persian]
- Khamirian, R.A., Jooyandeh, H., Hesari, J. and Barzegar, H. (2017). Optimization and investigation on physicochemical, microbial and sensory quality of permeate-based probiotic orange beverage. Food Science and Technology, 14(65): 185-196. [In Persian]
- Mirheidar, H. (2005). Herbal Science: The Use of Plants in the Prevention and Treatment of Diseases 1. 3<sup>th</sup> Edition, Islamic Culture Publication Office, pp. 4-35
- Nazarian, A., Mortazavi, S.A., Bolandi, M. and Armin, M. (2013). Production and evaluation physicochemical properties of the new soymilk beverage base of sour cherry- barberries juice. Journal of Innovation in Food Science and Technology, 4(13): 1-11. [In Persian]
- Pourakbar, L. and Adli Fard, M. (2017). Investigation of phenolic compounds and antioxidant capacity in leaves, unripe, ripe, sundried and molasses of red raisin grape. Food Science and Technology, 14(6): 74-81. [In Persian]
- Sedaghat, N., Mohammad Hosseini, M., Khoshnoudi-nia, S., Habibi Najafi, M. and Koocheki, A. (2015). Antimicrobial Properties of CMC-based Edible Films Incorporated with Coriander and Citrus Lemon Essential oils on the Shelf-life of Fresh Lamb-meat at Refrigerator Temperature. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology, 9(4): 53-62. [In Persian]

- Shahidi, B., Kalantari, M. and Boostani, S. (2017). Preparation and characterization of sponge cake made with grape juice. *Iranian Food Science and Technology Research*, 13(2): 415 – 425.
- Shahpoori, S. (2016). Antioxidant and Bacterial Effect of Citrus aurantium Extract and their Composition on Chemical, Microbial and Sensory Changes in Kilka Fish at Glacial Temperature. National Conference on Sustainable Agriculture and Natural Resources.
- Sharafi, S.M., Rasooli, I., Allahghadri, T., Jalali Nadoushan, M.R. and Rezaei, M.B. (2010). Antimicrobial, antioxidant, hematologic and cytotoxic properties of Citrus limon L. essential oil. *Iranian Journal of Medical and Aromatic Plants*. 26(3): 423-437. [In Persian]
- Sharafati-chaleshtori, R., Sharafati-chaleshtori, F., Rafieian-kopaei, M. and Ashrafi, K. (2011). Ethanolic walnut kernel phenolic compounds and its antimicrobial effect. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*, 19(4):525-32.
- Specter, S.E. and Setser, C.S. (1994). Sensory and physical properties of a reduced calorie frozen dessert system made with milk fat and sucrose substitutes. *Journal of Dairy Science*, 77(3):708-717.
- Soukoulis, C. and Tzia, C. (2010). Response surface mapping of the sensory characteristics and acceptability of chocolate ice cream containing alternate sweetening agents. *Journal of sensory Studies*, 25(1): 50-75.
- Taherian, A., Sadeghi Mahoonak, A. (2015). Effect of date syrup on physicochemical, microbial and sensory properties of kefir. *The journal of Innovative Food Technologies*, 2(2): 31-42. [In Persian]
- Tajik, Z., Nateghi, L. and Berenji, S. (2017). The effect of green tea and lemon essential oils on the physicochemical, microbial and sensory properties of oily cake. *Journal of Food Science Research*, 27(3): 125-137. [In Persian]
- Tavakoli pour, H., Kalbasi-Ashtari, A. (2013). Determination of rheological properties of grape molasses. *Food Science and Technology*, 10(40): 129-137. [In Persian]