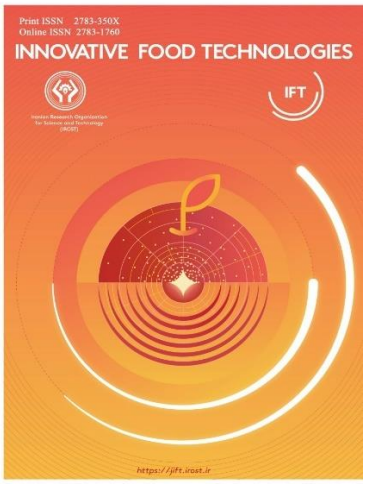
Journal Pre-proofs



Physicochemical Properties of Bitter Orange Juice Enriched with Olive Seeds Protein Hydrolysate During Storage

Mona Ranjbar, Alireza Sadeghi Mahoonak ,Mohammad Ghorbani

DOI: https://doi.org/10.22104/ift.2026.8547.2335

To appear in: Innovative Food Technologies (IFT)

Received Date: 13 September 2026
Revised Date: 17 October 2026
Accepted Date: 19 October 2026

Please cite this article as Mona Ranjbar, Alireza Sadeghi Mahoonak ,Mohammad Ghorbani, Physicochemical Properties of Bitter Orange Juice Enriched with Olive Seeds Protein Hydrolysate During Storage, *Innovative Food Technologies (2026)*, doi: https://doi.org/ 10.22104/ift.2026.8547.2335

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2026 The Author(s). Published by irost.org.

Journal Pre-proof

Journal Pre-proofs

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آب نارنج غنی‌شده با هیدرولیزات پروتئین هسته زیتون طی مدت نگهداری

منا رنجبر[۱]، علیرضا صادقی ماهونک[*۲]، محمد قربانی[۳]

۱- دانشجوی دکتری رشته علوم وصنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۳- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

چکیده

افزودن ترکیبات زیست‌فعال به آب‌میوه‌ها به دلیل ناپایداری و برهم‌کنش با ماتریس غذایی با محدودیت مواجه است. کپسوله‌سازی می‌تواند راهکاری برای بهبود پایداری این ترکیبات باشد. هدف پژوهش حاضر، بررسی اثر هیدرولیزات پروتئین هسته زیتون در فرم آزاد و ریزپوشانی‌شده در نانولیپوزوم بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آب نارنج طی ۳۰ روز نگهداری بود. هیدرولیزات با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، در سطوح افزودن ۲ و ۴ درصد (حجمی/حجمی) به نمونه افزوده شد. فعالیت مهار رادیکال DPPH، شاخص قهوه‌ای‌شدن، ابری‌شدن، دوفازشدن و شاخص‌های رنگی L*، a* و b* ارزیابی شدند. نتایج نشان داد فعالیت مهار رادیکال DPPH در تمام تیمارها طی نگهداری کاهش یافت؛ بااین‌حال، در تیمار حاوی ۴ درصد هیدرولیزات ریزپوشانی‌شده، این شاخص از ۹۳/۲ درصد در روز دهم به ۸۷/۹ درصد در روز سی‌ام رسید، درحالی‌که در شاهد از ۷۸/۵۶ به ۵۲/۶ درصد کاهش یافت. شاخص قهوه‌ای‌شدن شاهد از ۰/۵۶۵ به ۰/۶۹۲ افزایش یافت، اما کمترین مقادیر در تیمار ریزپوشانی‌شده ۲ درصد مشاهده شد. دوفازشدن شاهد از ۴۶/۲۵ به ۵۰/۳۷ درصد افزایش یافت؛ این مقادیر در تیمار ریزپوشانی‌شده ۴ درصد به‌ترتیب ۳۴/۲۵ و ۳۷/۸۴ درصد بود. شاخص ابری‌شدن در تمام تیمارها افزایش یافت و در تیمار ریزپوشانی‌شده ۴ درصد بیشینه بود. همچنین، نمونه‌های ریزپوشانی‌شده روشنایی و زردی بیشتری نشان دادند. در مجموع، ریزپوشانی، به‌ویژه در سطح ۴ درصد، با حفظ بهتر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش قهوه‌ای‌شدن و دوفازشدن همراه بود و می‌تواند رویکردی بالقوه برای بهبود پایداری کیفی نمونه باشد.

واژگان کلیدی: هیدرولیزات پروتئین هسته زیتون؛ پپتیدهای زیست‌فعال؛ نانولیپوزوم‌ها؛ فعالیت آنتی‌اکسیدانی؛ ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آب نارنج.

[*] Sadeghiaz@gau.ac.ir

Journal Pre-proofs

۱- مقدمه

در سال‌های اخیر، افزایش آگاهی مصرف‌کنندگان نسبت به نقش تغذیه در پیشگیری از بیماری‌ها، موجب رشد چشمگیر تقاضا برای غذاها و نوشیدنی‌های فراسودمند شده است. نوشیدنی‌های فراسودمند علاوه بر تأمین نیازهای تغذیه‌ای، به دلیل دارا بودن ترکیبات زیست‌فعال، می‌توانند اثرات سودمندی بر سلامت انسان داشته باشند (Maggonage et al., 2025). آب میوه نارنج (*Citrus aurantium L.*) حاوی طیف متنوعی از ترکیبات زیست‌فعال، از جمله ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی، اسیدهای آلی و اسید آسکوربیک است که می‌توانند در ویژگی‌های تغذیه‌ای و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن نقش داشته باشند. در میان ترکیبات فنولی این محصول، فلاوانون‌ها، فلاونوئیدهای گلیکوزیدی و پلی‌متوکسیله، اسیدهای هیدروکسی‌سینامیک و سایر اسیدهای فنولی و همچنین کومارین‌ها شناسایی شده‌اند که برخی از آن‌ها با فعالیت آنتی‌اکسیدانی مرتبط هستند (Wen et al., 2021). با این حال، ترکیبات زیست‌فعال آب نارنج می‌توانند تحت تأثیر فرآوری و شرایط نگهداری قرار گیرند. این تغییرات موجب کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، تغییر رنگ، افت کیفیت حسی و کاهش ارزش تغذیه‌ای محصول می‌شود. از این‌رو، توسعه راهکارهایی برای افزایش پایداری این ترکیبات، یکی از چالش‌های مهم صنایع غذایی به شمار می‌رود (Rezagholizade et al., 2024).

یکی از رویکردهای نوین برای بهبود کیفیت و ارزش تغذیه‌ای نوشیدنی‌ها، استفاده از پروتئین‌های هیدرولیز شده است. هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها منجر به تولید پپتیدهای زیست‌فعال با خواصی نظیر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، قدرت احیاکنندگی، مهار رادیکال‌های آزاد، فعالیت ضدمیکروبی و قابلیت شلاته کنندگی فلزات می‌شود (Kaveh et al., 2025). این پپتیدها علاوه بر افزایش ارزش تغذیه‌ای محصولات غذایی، می‌توانند از اکسیداسیون ترکیبات حساس جلوگیری کرده و پایداری فیزیکوشیمیایی فرآورده‌ها را بهبود بخشند. در سال‌های اخیر، استفاده از منابع گیاهی برای تولید پپتیدهای زیست‌فعال به دلیل دسترسی مناسب، ارزش اقتصادی و سازگاری با ملاحظات زیست‌محیطی، مورد توجه ویژه قرار گرفته است (Farzanfar et al., 2025).

هسته زیتون یکی از مهم‌ترین محصولات جانبی صنعت روغن زیتون است که سالانه در مقادیر قابل توجهی تولید می‌شود و بخش عمده‌ای از آن بدون استفاده رها شده یا به عنوان ضایعات دفع می‌شود. این در حالی است که هسته زیتون حاوی مقادیر قابل توجهی پروتئین و ترکیبات زیست‌فعال بوده و می‌تواند به عنوان منبعی ارزشمند برای تولید پروتئین هیدرولیز شده مورد استفاده قرار گیرد (Bartolomei et al., 2022). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که پروتئین هیدرولیز شده هسته زیتون دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و قدرت احیاکنندگی مطلوبی است و قابلیت استفاده در توسعه غذاهای عملکردی را دارا می‌باشند. بهره‌گیری از این منبع، علاوه بر افزایش ارزش افزوده محصولات جانبی صنایع غذایی، در راستای توسعه اقتصاد چرخشی و کاهش ضایعات کشاورزی نیز اهمیت فراوانی دارد (Pérez-Gálvez et al., 2024).

با وجود مزایای فراوان، کاربرد مستقیم پروتئین هیدرولیز شده در مواد غذایی با محدودیت‌هایی همراه است. پپتیدهای زیست‌فعال در برابر شرایط فرآوری و نگهداری ناپایدار بوده و ممکن است در اثر اکسیداسیون، برهم‌کنش با سایر اجزای ماتریس غذایی یا تجزیه، بخشی از فعالیت زیستی خود را از دست بدهند (Manjili et al., 2024). علاوه بر این، حضور مستقیم پروتئین هیدرولیز شده می‌تواند برخی ویژگی‌های فیزیکی و حسی محصول از جمله رنگ، کدورت و طعم را تحت تأثیر قرار دهد. از این‌رو، استفاده از فناوری‌های کپسوله‌سازی به عنوان راهکاری مؤثر برای محافظت از ترکیبات زیست‌فعال، کنترل آزادسازی، افزایش فراهمی زیستی و بهبود پایداری آن‌ها مورد توجه قرار گرفته است (Pateiro et al., 2021).

در میان سامانه‌های مختلف کپسوله‌سازی، نانولیپوزوم‌ها به دلیل زیست‌سازگاری، غیرسمی بودن، توانایی محصورسازی ترکیبات آب‌دوست و آب‌گریز و محافظت مؤثر از ترکیبات حساس در برابر عوامل محیطی، یکی از مناسب‌ترین حامل‌ها برای کاربرد در صنایع غذایی محسوب می‌شوند (Kaveh et al., 2022). نانولیپوزوم‌های تهیه‌شده از لسیتین و کلسترول علاوه بر افزایش پایداری ترکیبات زیست‌فعال، می‌توانند پایداری فیزیکی سامانه، ویژگی‌های رئولوژیکی و کیفیت محصول نهایی را نیز بهبود بخشند. به همین دلیل، کاربرد این سامانه‌ها در توسعه نوشیدنی‌های فراسودمند در سال‌های اخیر با استقبال گسترده‌ای روبه‌رو شده است (Khan et al., 2020).

اگرچه مطالعات متعددی به بررسی استفاده از پروتئین هیدرولیز شده یا سامانه‌های نانولیپوزومی در محصولات غذایی پرداخته‌اند، برای مثال، Farzanfar و همکاران (۲۰۲۵) از نانولیپوزوم‌های آنتی‌اکسیدانی برای بهبود پایداری اکسیداتیو فیله ماهی قزل‌آلا (*Oncorhynchus mykiss*) استفاده کردند. اما اطلاعات موجود درباره کاربرد پروتئین هیدرولیز شده هسته زیتون در فرم آزاد و ریزپوشانی شده در آب نارنج و تأثیر آن بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و پایداری محصول طی نگهداری بسیار محدود است. به‌ویژه، تاکنون مطالعه جامعی که اثر همزمان غلظت پروتئین هیدرولیز شده و کپسوله‌سازی آن را بر شاخص‌هایی نظیر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، تغییرات رنگ، پایداری فیزیکی و سایر خصوصیات فیزیکوشیمیایی آب نارنج بررسی کرده باشد، گزارش نشده است. بنابراین، هدف از این پژوهش، بررسی اثر پروتئین هیدرولیز شده هسته زیتون در دو سطح ۲ و ۴ درصد، در دو فرم آزاد و ریزپوشانی شده در نانولیپوزوم، بر برخی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، پایداری رنگ و پایداری فیزیکی آب نارنج طی ۳۰ روز نگهداری در دمای یخچال (۴ درجه‌سانتی گراد) بود.

۲- مواد و روش‌ها

زیتون از رقم زر زیتون و نارنج از بازار محلی گرگان تهیه گردید. مواد شیمیایی از جمله هگزان، اسید کلریدریک، سود، DPPH، کلسترول، لسیتین از شرکت مرک آلمان تهیه گردید.

۲-۱- روش‌ها

۲-۱-۱- آماده‌سازی هسته زیتون و تولید کنسانتره پروتئینی

هسته‌های زیتون پس از جداسازی و کاهش رطوبت، به طور کامل آسیاب شده (Silver، SC800G، آلمان) تا پودری یکنواخت حاصل گردد. چربی‌گیری از پودر با استفاده از حلال هگزان به مدت ۲۴ ساعت (با نسبت ۱۰ به ۱ حلال نسبت پودر هسته زیتون) در دمای محیط انجام شد. پس از تبخیر حلال، پودر چربی‌گیری‌شده از الک مش ۵۰ عبور داده شده و در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. برای استخراج پروتئین، پودر چربی‌گیری‌شده با آب مقطر به نسبت ۱:۱۰ (وزنی/حجمی) مخلوط و با استفاده از سدیم هیدروکسید ۱ نرمال، pH مخلوط به ۱۱/۵ رسانده شد تا حلالیت پروتئین به حداکثر برسد. محلول حاصل پس از یک ساعت اختلاط در دمای محیط، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و نیروی گریز از مرکز ۶۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ (رایمند، ایران) گردید. سوپرناتانت جمع‌آوری‌شده با اسید کلریدریک ۱ نرمال به نقطه ایزوالکتریک (pH=۴/۰) رسانده شد تا پروتئین‌ها رسوب کنند. سوسپانسیون نهایی مجدداً تحت شرایط مشابه سانتریفیوژ شده و رسوب حاصل با آب مقطر شست‌وشو و نهایتاً با استفاده از خشک‌کن انجمادی (اوپرون، کره جنوبی) به پودر کنسانتره پروتئینی خشک تبدیل گردید (Kaveh et al., 2025).

۲-۱-۲- تهیه پروتئین هیدرولیز شده هسته زیتون

برای هیدرولیز آنزیمی، کنسانتره پروتئینی به میزان ۵ درصد (وزنی/حجمی) در بافر فسفات با pH=۸ پراکنده شد. آنزیم آلکالاز با نسبت آنزیم به سوبسترا ۲ درصد (وزنی/وزنی) به مخلوط افزوده گردید. فرآیند هیدرولیز در دمای بهینه ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار (ممرت، آلمان) با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه انجام شد. برای توقف واکنش آنزیمی، مخلوط در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده و سپس سریعاً سرد شد. جهت جداسازی بخش نامحلول، سانتریفیوژ در ۵۰۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه صورت گرفت و نهایتاً سوپرناتانت حاوی پروتئین هیدرولیز شده با خشک‌کن انجمادی خشک گردید (Manjili et al., 2024).

۲-۱-۳- تولید نانوحامل‌های لیپیدی

لیپوزوم با استفاده از روش هیدراسیون لایه نازک تولید شد. فرآیند تولید لیپوزوم شامل انحلال به ترتیب، ۰/۰۹ و ۰/۰۲ گرم لسیتین سویا و کلسترول در ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم بود. فرآیند تبخیر و تشکیل فیلم نازک در انتهای بالن ته‌گرد با استفاده از اواپراتور چرخان

(IKA, RV10digital7، آلمان) با دور ۶۰ rpm در دمای ۶۰ درجه‌سانتی گراد انجام شد. بالن مدور برای اطمینان از حذف کامل حلال، به‌مدت ۱۲ تا ۱۸ ساعت در دسیکاتور و در دمای محیط نگهداری شد. سپس فیلم لیپیدی خشک شده با استفاده از ۱۰ میلی لیتر بافرفسفات نمکی ۷ = pH حاوی ۲۰ mg/ml پروتئین هیدرولیزشده، به‌مدت ۱ دقیقه با استفاده از ورتکس مجددا هیدراته شد. محلول حاصل با استفاده از اواپراتور چرخان در دمای ۶۰ درجه‌سانتی گراد به‌مدت ۲ دقیقه دمای محیط همزده و خنک شد. پس از آن تیمار اولتراسوند (۱۰ دقیقه و فرکانس ۲۰۰kHz) (پروپ‌دار،آلمان، Hielscher) بر محلول فوق صورت گرفت و در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری شد (Farzanfar et al., 2025).

۲-۱-۴- افزودن نانولیپوزوم پروتئین هیدرولیز شده به فرمولاسیون آب نارنج

نارنج (*Citrus aurantium L*) بعد از شست و شو و پوست‌گیری آن عمل آبگیری انجام شد (با استفاده از دستگاه آب‌میوه‌گیری (پارس خزر، ایران، Limonade) آبگیری شدند و تفاله به‌وسیله دستگاه جدا شد). سپس پروتئین‌های هیدرولیزشده به فرم آزاد و ریزپوشانی شده (غلظت ۲۰ mg/ml پروتئین هیدرولیز شده در سطح ۲ و ۴ درصد) به آب نارنج افزوده شد. به منظور پاستوریزاسیون نوشیدنی-های فرموله شده آن‌ها را در شیشه‌های درب دار ریخته و درون بن‌ماری ۹۸ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. سپس در آب خنک و یخ به مدت۲ دقیقه قرار گرفتند تا سریعا خنک شود. نمونه‌ها در دمای یخچال و در تاریکی قرار گرفت. سپس ارزیابی خصوصیات فیزیکوشیمیایی آنها طی ۳۰ روز انجام شد (Punoo et al., 2023).

۲-۲- اندازه‌گیری ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی

۲-۲-۱- مهار رادیکال آزاد DPPH

ابتدا محلول DPPH با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار در متانول تهیه و در ظرف تیره و دور از نور نگهداری شد. سپس مقدار مشخصی از نمونه آب نارنج، پس از آماده‌سازی و در صورت نیاز رقیق‌سازی، با حجم مشخصی از محلول DPPH مخلوط شد. مخلوط‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شدند. پس از پایان زمان واکنش، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (جن‌وی، کره جنوبی) اندازه‌گیری شد. برای هر نمونه (AS)، آزمون حداقل در سه تکرار انجام شد. محلول DPPH بدون افزودن نمونه به‌عنوان کنترل و متانول به‌عنوان بلانک (AC) مورد استفاده قرار گرفت (Kaveh et al., 2025).

مهار رادیکال آزاد DPPH = $((A_C-A_S)/As)*100$

۲-۲-۲- اندازه‌گیری شاخص قهوه‌ای شدن

شاخص قهوه‌ای شدن نمونه‌ها با اندازه‌گیری جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر UV–Vis تعیین شد. آب مقطر به عنوان بلانک مورد استفاده قرار گرفت (Velázquez et al., 2019).

۲-۲-۳- اندازه‌گیری ابری شدن

شاخص ابری شدن با اندازه‌گیری جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۶۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر UV–Vis تعیین شد. افزایش جذب در این طول موج بیانگر افزایش میزان ابری شدن نمونه‌ها بود (Velázquez et al., 2019).

۲-۲-۴- اندازه‌گیری دوفاز شدن

به منظور بررسی پایداری فیزیکی، مقدار مشخصی از هر نمونه در استوانه مدرج ریخته شد و در طول دوره نگهداری بدون هم‌زدن نگهداری گردید. درصد دوفاز شدن از رابطه زیر محاسبه شد (Lepaus et al., 2022):

$$\text{Phase separation (\%)} = \frac{Hs}{Ht}*100$$

Hs ارتفاع لایه جداشده و Ht ارتفاع کل می باشد.

۲-۲-۵- اندازه‌گیری رنگ

Journal Pre-proofs

ویژگی‌های رنگی نمونه‌ها در روز ۱۰ نگهداری (*L، *a و *b) با استفاده از دستگاه هانترلب (کالرفلکس، آمریکا) اندازه‌گیری شد (Velázquez et al., 2019).

۲-۳- تجزیه و تحلیل آماری

ویژگی‌های مورد بررسی طی ۳۰ روز در روزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ اندازه‌گیری شدند. تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد و نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش گردید. تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و به روش تحلیل واریانس دو طرفه (Two-way ANOVA) انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ($P<0.05$) صورت گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- مهار رادیکال آزاد DPPH

نتایج فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه‌های آب نارنج در طول دوره نگهداری در شکل ۱ ارائه شده است. در تمامی تیمارها با افزایش مدت نگهداری، مقدار قدرت آنتی اکسیدانی بطور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) کاهش یافت. بیشترین کاهش مربوط به نمونه شاهد بود، به‌طوری که از ۷۸/۶ درصد در روز دهم به ۵۲/۶ درصد در روز سی‌ام بطور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) کاهش پیدا کرد و کمترین مقدار فعالیت آنتی اکسیدانی را در پایان دوره نگهداری به خود اختصاص داد. در بین تیمارهای حاوی پروتئین هیدرولیز شده، نمونه ۴ درصد ریزپوشانی شده بیشترین قدرت آنتی اکسیدانی را در تمام زمان‌های نگهداری نشان داد، به‌طوری که مقدار آن از ۹۳/۲ درصد در روز دهم به ۸۷/۹ درصد در روز سی‌ام رسید و در تمام دوره نگهداری نسبت به سایر تیمارها برتری خود را حفظ کرد. پس از آن، تیمار ۲ درصد ریزپوشانی شده با مقادیر ۸۹، ۸۶/۱ و ۸۲/۶ درصد در روزهای۱۰، ۲۰ و ۳۰ قرار گرفت. نمونه‌های حاوی پروتئین هیدرولیز شده آزاد نیز نسبت به شاهد بطور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) مقادیر بالاتری از فعالیت آنتی اکسیدانی داشتند. تیمار ۴ درصد آزاد از ۹۷/۴ درصد در روز دهم به ۷۵/۶ درصد در روز سی‌ام و تیمار ۲ درصد آزاد از ۸۹/۶ درصد به ۶۵ درصد در همین دوره بطور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) کاهش یافت. به‌طور کلی، تمامی تیمارهای حاوی پروتئین هیدرولیز شده در مقایسه با نمونه شاهد، مقادیر بالاتری از فعالیت آنتی اکسیدانی را در طول دوره نگهداری نشان دادند و روند کاهش این شاخص در نمونه‌های ریزپوشانی شده کمتر از نمونه‌های آزاد بود. به عبارت دیگر، در تمامی زمان‌های نگهداری، تیمارهای ریزپوشانی شده مقادیر بالاتری از فعالیت آنتی اکسیدانی را نسبت به نمونه‌های آزاد با غلظت مشابه نشان دادند. همچنین افزایش میزان پروتئین هیدرولیز شده از ۲ به ۴ درصد، چه در فرم آزاد و چه در فرم ریزپوشانی شده، با افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی در طول دوره نگهداری همراه بود. با مقایسه تیمارها مشخص شد که نمونه‌های حاوی پروتئین هیدرولیز شده، در هر دو فرم آزاد و ریزپوشانی شده، در تمام طول دوره نگهداری فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری نسبت به نمونه شاهد داشتند. همچنین، نمونه‌های ریزپوشانی شده در مقایسه با نمونه‌های حاوی پروتئین هیدرولیز شده آزاد، فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری را حفظ کردند و روند کاهش این شاخص طی مدت نگهداری در آن‌ها کمتر بود. علاوه بر این، افزایش میزان پروتئین هیدرولیز شده از ۲ به ۴ درصد، چه در فرم آزاد و چه در فرم ریزپوشانی شده، با افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی همراه بود. به طور کلی، تیمارهای ریزپوشانی شده عملکرد بهتری نسبت به تیمارهای آزاد نشان دادند، در حالی که نمونه شاهد در تمام زمان‌های نگهداری کمترین فعالیت آنتی اکسیدانی را داشت. مطابق نتایج آزمون آماری، اختلاف‌های مورد مقایسه معنی‌دار بودند.

حفظ بیشتر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در تیمارهای ریزپوشانی‌شده را می‌توان به نقش سامانه کپسوله‌سازی در محافظت از پپتیدهای زیست‌فعال در برابر تخریب ناشی از اکسیژن، نور و سایر عوامل اکسیدکننده طی نگهداری نسبت داد (Prakash et al., 2022). این یافته با مطالعاتی همخوانی دارد که نشان داده‌اند کپسوله‌سازی ترکیبات زیست‌فعال در نوشیدنی‌ها می‌تواند به حفظ ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و افزایش پایداری این ترکیبات طی نگهداری کمک کند (Osungbade et al., 2021). در مقابل، تماس مستقیم

پپتیدهای موجود در هیدرولیزات آزاد با ماتریس آب نارنج ممکن است احتمال اکسیداسیون و کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش دهد (Falsafi et al., 2025).

Bopitiya و همکاران (۲۰۲۲) گزارش کردند که پروتئین‌های غنی از اسیدهای آمینه گوگرددار، به‌ویژه متیونین و سیستئین، همراه با سایر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در ایزوله پروتئین خردل، می‌توانند در مهار تولید پراکسید هیدروژن ناشی از اکسیداسیون خودبه‌خودی در آب‌میوه نقش داشته باشند. همچنین، Punoo و همکاران (۲۰۲۳) افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آب پرتقال حاوی ترکیبات زیست‌فعال پروتئین سویا را گزارش کردند. پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئین می‌توانند از طریق اهدای الکترون یا اتم هیدروژن، رادیکال‌های آزاد را خنثی کنند. افزون بر این، برهم‌کنش احتمالی این پپتیدها با ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طبیعی آب‌میوه، از جمله اسید آسکوربیک، کاروتنوئیدها و ترکیبات فنولی، ممکن است در تقویت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نوشیدنی نقش داشته باشد.

همچنین، عملکرد بهتر تیمارهای حاوی ۴ درصد هیدرولیزات نسبت به تیمارهای ۲ درصد نشان‌دهنده وابستگی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به غلظت ترکیبات زیست‌فعال افزوده‌شده است. افزایش غلظت هیدرولیزات احتمالاً مقدار پپتیدهای دارای توانایی اهدای الکترون یا هیدروژن را افزایش داده و در نتیجه به بهبود مهار رادیکال‌های آزاد کمک کرده است. این موضوع، در کنار اثر محافظتی ریزپوشانی، می‌تواند حفظ بهتر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی طی نگهداری را توضیح دهد؛ موضوعی که با یافته‌های Zabot و همکاران (۲۰۲۲) درباره نقش ریزپوشانی و غلظت ترکیبات زیست‌فعال در حفظ ظرفیت آنتی‌اکسیدانی همخوانی دارد.

Tanwar و همکاران (۲۰۲۲) نیز گزارش کردند که افزودن ترکیبات پروتئینی حاصل از آب‌پنیر به نوشیدنی‌های میوه‌ای می‌تواند ظرفیت مهار رادیکال‌های آزاد و مقدار ترکیبات فنولی کل را افزایش دهد. به‌طور مشابه، Vieira و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که استفاده از منابع پروتئینی در فرمولاسیون نوشیدنی‌ها می‌تواند ظرفیت آنتی‌اکسیدانی محصول را بهبود بخشد. در مجموع، نتایج این مطالعات در کنار یافته‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهد که نوع و غلظت پروتئین هیدرولیزشده و روش ریزپوشانی می‌توانند در تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نوشیدنی مؤثر باشند.

Fig **(1)**. DPPH radical scavenging activities of different treatments of bitter orange Juice/
نمودار (**۱**). میزان مهار رادیکال DPPH در تیمارهای مختلف آب نارنج

۳-۲- میزان قهوه‌ای شدن

نتایج نشان داد که شاخص قهوه‌ای‌شدن در تمامی تیمارها با افزایش زمان نگهداری افزایش یافت (شکل ۲). در نمونه شاهد، مقدار این شاخص از ۰/۵۶۵ در روز دهم به ۰/۶۹۲ در روز سی‌ام رسید و بیشترین میزان قهوه‌ای‌شدن را در میان تیمارها نشان داد. در نمونه‌های حاوی پروتئین هیدرولیزشده هسته زیتون نیز شاخص قهوه‌ای‌شدن طی نگهداری افزایش یافت، اما مقادیر آن نسبت به نمونه شاهد کمتر بود. در بین تیمارهای ریزپوشانی‌شده، نمونه ۲ درصد کمترین شاخص قهوه‌ای‌شدن را نشان داد؛ به‌طوری‌که مقدار آن از ۰/۴۰۳ در روز دهم به ۰/۴۷۶ در روز سی‌ام افزایش یافت. در تیمار ۴ درصد ریزپوشانی‌شده، این شاخص از ۰/۴۶۱ به ۰/۵۷۲ رسید. همچنین، مقدار شاخص قهوه‌ای‌شدن در تیمارهای ۲ و ۴ درصد هیدرولیزات آزاد به‌ترتیب از ۰/۴۸۸ به ۰/۵۸۶ و از ۰/۵۵۶ به ۰/۶۸ افزایش یافت. مقایسه فرمولاسیون‌ها نشان داد که در غلظت‌های مشابه، نمونه‌های ریزپوشانی‌شده شاخص قهوه‌ای‌شدن کمتری نسبت به نمونه‌های حاوی هیدرولیزات آزاد داشتند. همچنین، در فرم ریزپوشانی‌شده، افزایش غلظت از ۲ به ۴ درصد با افزایش شاخص قهوه‌ای‌شدن همراه بود. در مجموع، کمترین و بیشترین مقادیر این شاخص در پایان دوره نگهداری به‌ترتیب در تیمار ۲ درصد ریزپوشانی‌شده و نمونه شاهد مشاهده شد. بر اساس نتایج آزمون آماری، تفاوت‌های مورد بررسی معنی‌دار بودند ($p<0/05$).

افزایش شاخص قهوه‌ای‌شدن با افزایش غلظت هیدرولیزات از ۲ به ۴ درصد، احتمالاً تا حدی به رنگ ذاتی پروتئین هیدرولیزشده مربوط است. بااین‌حال، در هر دو سطح افزودن، نمونه‌های ریزپوشانی‌شده شاخص قهوه‌ای‌شدن کمتری نسبت به نمونه‌های حاوی

هیدرولیزات آزاد نشان دادند. این تفاوت ممکن است به ویژگی‌های نوری اجزای تشکیل‌دهنده سامانه نانولیپوزومی مربوط باشد؛ به‌طوری‌که رنگ روشن‌تر مواد تشکیل‌دهنده حامل می‌تواند تا حدی رنگ ذاتی هیدرولیزات را تعدیل کند و جذب اندازه‌گیری‌شده در طول موج ۴۲۰ نانومتر را کاهش دهد (Punoo et al., 2023). افزون بر این، محصورشدن هیدرولیزات در ساختار نانولیپوزوم می‌تواند تماس مستقیم آن با محیط آب نارنج را کاهش دهد و احتمال تشکیل یا تشدید ترکیبات رنگی ناشی از اکسیداسیون و واکنش‌های قهوه‌ای‌شدن را طی نگهداری محدود کند (Almeida et al., 2024).

افزایش شاخص قهوه‌ای‌شدن در تمامی تیمارها طی نگهداری می‌تواند به تغییرات شیمیایی و اکسیداتیو ترکیبات آب نارنج نسبت داده شود. این تغییرات ممکن است شامل اکسیداسیون ترکیبات فنولی، در صورت باقی‌ماندن فعالیت آنزیم‌های مرتبط، و واکنش‌های قهوه‌ای‌شدن غیرآنزیمی باشد. کاهش این شاخص در نمونه‌های حاوی هیدرولیزات، به‌ویژه فرم ریزپوشانی‌شده، ممکن است با حفظ بهتر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و محدودشدن واکنش‌های اکسیداتیو مرتبط باشد. در مقابل، تماس مستقیم ترکیبات فعال هیدرولیزات آزاد با ماتریس آب نارنج می‌تواند احتمال تغییرات اکسیداتیو را افزایش دهد و با شدت بیشتر قهوه‌ای‌شدن همراه باشد (El Hosry et al., 2025). این یافته‌ها با گزارش‌های مربوط به کاربرد ترکیبات زیست‌فعال و سامانه‌های ریزپوشانی در نوشیدنی‌های میوه‌ای همخوانی دارد (Naseem et al., 2026; Dorris et al., 2018).

Grosso و همکاران (۲۰۲۵) گزارش کردند که نوشیدنی جو دوسر حاوی پروتئین هیدرولیزشده سویا در مقایسه با نمونه شاهد رنگ تیره‌تری داشت؛ این تغییر احتمالاً به رنگ ذاتی پودر پروتئین هیدرولیزشده سویا مربوط بود. همچنین، Punoo و همکاران (۲۰۲۳) و Vieira و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند که نوع و ویژگی‌های فیزیکی ترکیبات افزوده‌شده، از جمله رنگ ذاتی و تأثیر آن‌ها بر پراکندگی نور، می‌تواند بر ویژگی‌های ظاهری نوشیدنی‌ها اثر بگذارد. علاوه بر این، برهم‌کنش میان پروتئین‌ها، پلی‌فنول‌ها، پکتین و سایر ترکیبات موجود در آب نارنج ممکن است به تشکیل تجمعات و افزایش ذرات معلق منجر شود و از طریق تغییر پراکندگی نور، کدورت محصول را افزایش دهد (Yang et al., 2025).

Fig **(2)**. Browning Index of different treatments of bitter orange Juice/
نمودار (**۲**). شاخص قهوه‌ای شدن در تیمارهای مختلف آب نارنج

۳-۳- میزان ابری شدن

نتایج ارزیابی شاخص ابری‌شدن نمونه‌های آب نارنج طی دوره نگهداری در شکل ۳ ارائه شده است. در تمامی تیمارها، جذب در طول موج ۶۶۰ نانومتر با افزایش زمان نگهداری افزایش یافت که نشان‌دهنده افزایش تدریجی ابری‌شدن نمونه‌ها بود. نمونه شاهد کمترین مقدار این شاخص را در طول دوره نگهداری نشان داد؛ به‌طوری‌که جذب آن از ۰/۰۸ در روز دهم به ۰/۰۹۶ در روز سی‌ام افزایش یافت. افزودن پروتئین هیدرولیزشده هسته زیتون و افزایش غلظت آن از ۲ به ۴ درصد، در هر دو فرم آزاد و ریزپوشانی‌شده، با افزایش شاخص ابری‌شدن همراه بود. همچنین، در غلظت‌های مشابه، نمونه‌های ریزپوشانی‌شده در مقایسه با نمونه‌های حاوی هیدرولیزات آزاد، مقادیر بالاتری نشان دادند. در پایان دوره نگهداری، بیشترین و کمترین مقادیر این شاخص به‌ترتیب در تیمار ۴ درصد ریزپوشانی‌شده و نمونه شاهد مشاهده شد. بر اساس نتایج آزمون آماری، تفاوت‌های مورد بررسی معنی‌دار بودند ($p<0/05$).

افزایش شاخص ابری‌شدن طی نگهداری را می‌توان به افزایش ذرات معلق و تغییرات تدریجی در سیستم کلوئیدی آب نارنج نسبت داد (Li et al., 2025). افزایش غلظت پروتئین هیدرولیزشده نیز ممکن است از طریق افزایش تعداد ذرات و تقویت برهم‌کنش آن‌ها با ترکیباتی مانند پکتین و پلی‌فنول‌ها، پراکندگی نور را افزایش دهد و در نتیجه موجب افزایش این شاخص شود (Ilona et al., 2026). بالاتر بودن شاخص ابری‌شدن در نمونه‌های ریزپوشانی‌شده نسبت به نمونه‌های حاوی هیدرولیزات آزاد احتمالاً به حضور ذرات نانولیپوزومی در محیط مربوط است. این ذرات کلوئیدی می‌توانند با پراکندگی نور، جذب اندازه‌گیری‌شده در طول موج ۶۶۰ نانومتر را افزایش دهند؛ بنابراین، افزایش ابری‌شدن در این نمونه‌ها لزوماً نشان‌دهنده ناپایداری سامانه نیست و ممکن است به حضور و توزیع ذرات نانولیپوزومی در ماتریس آب نارنج مربوط باشد (Naghavi et al., 2016). اختلاف ضریب شکست ذرات

نانولیپوزومی، متشکل از لسیتین و کلسترول، با فاز آبی نیز می‌تواند پراکندگی نور و در نتیجه جذب اندازه‌گیری‌شده را افزایش دهد (Marsanasco et al., 2021). افزون بر این، پایداری ساختاری نانولیپوزوم‌ها ممکن است با محدودکردن تجمع و ته‌نشینی ذرات، به حفظ پایداری فیزیکی سامانه کمک کند. این نتایج با مطالعات انجام‌شده درباره سامانه‌های نانولیپوزومی و سایر حامل‌های نانوساختار در نوشیدنی‌های عملکردی همخوانی دارد؛ به‌طوری‌که حضور ذرات نانومقیاس می‌تواند ضمن کمک به حفاظت از ترکیبات زیست‌فعال، پراکندگی نور و شاخص ابری‌شدن را نیز افزایش دهد (Javadi et al., 2024; Poudel et al., 2019).

Fig **(3)**. Cloudiness Index of different treatments of bitter orange Juice/
نمودار (**۳**). شاخص ابری شدن شدن در تیمارهای مختلف آب نارنج

۳-۴- میزان دو فاز شدن

نتایج ارزیابی دوفاز شدن نمونه‌های آب نارنج طی دوره نگهداری (شکل ۴) نشان داد که این شاخص در تمامی تیمارها با افزایش زمان نگهداری افزایش یافت. نمونه شاهد بیشترین میزان دوفاز شدن را نشان داد؛ به‌طوری‌که مقدار آن از ۴۶/۲۵ درصد در روز دهم به ۵۰/۳۷ درصد در روز سی‌ام رسید. در مقابل، افزودن پروتئین هیدرولیزشده هسته زیتون موجب کاهش دوفاز شدن شد و این اثر در نمونه‌های ریزپوشانی‌شده مشهودتر بود. تیمار ۴ درصد ریزپوشانی‌شده کمترین میزان دوفاز شدن را در میان تیمارها داشت؛ به‌طوری‌که مقدار آن از ۳۴/۲۵ درصد در روز دهم به ۳۷/۸۴ درصد در روز سی‌ام افزایش یافت. همچنین، تیمار ۲ درصد ریزپوشانی‌شده در مقایسه با نمونه‌های حاوی هیدرولیزات آزاد و نمونه شاهد، دوفاز شدن کمتری نشان داد. اگرچه در نمونه‌های حاوی هیدرولیزات آزاد نیز دوفاز شدن نسبت به شاهد کاهش یافت، این اثر از تیمارهای ریزپوشانی‌شده ضعیف‌تر بود. بر اساس نتایج آزمون آماری، تفاوت‌های مورد بررسی معنی‌دار بودند ($p<۰/۰۵$).

افزایش دوفاز شدن طی نگهداری را می‌توان به ناپایداری تدریجی سیستم کلوئیدی آب نارنج نسبت داد. با گذشت زمان، تجمع ذرات معلق، برهم‌کنش میان پروتئین‌ها، پکتین و سایر ترکیبات موجود در آب نارنج و در نهایت ته‌نشینی آن‌ها می‌تواند احتمال جدایش فازی را افزایش دهد (Bazaraa et al., 2020). کاهش دوفاز شدن در نمونه‌های حاوی هیدرولیزات ریزپوشانی‌شده احتمالاً با نقش نانولیپوزوم‌ها در بهبود پایداری فیزیکی سامانه مرتبط است. لسیتین، به‌عنوان یک فسفولیپید آمفی‌فیلی، می‌تواند با کاهش کشش بین‌سطحی و بهبود پراکنش ذرات، احتمال تجمع و ته‌نشینی آن‌ها را کاهش دهد. همچنین، کلسترول با افزایش استحکام و یکپارچگی غشای نانولیپوزوم، می‌تواند به پایداری ساختاری حامل کمک کند و احتمال آزادسازی زودهنگام هیدرولیزات و برهم‌کنش مستقیم آن با اجزای آب نارنج را کاهش دهد. این عوامل ممکن است به حفظ یکنواختی سامانه و کاهش جدایش فازی منجر شوند (Nouraddini et al., 2025). عملکرد بهتر تیمار ۴ درصد ریزپوشانی‌شده نیز نشان می‌دهد که در شرایط این پژوهش، افزایش غلظت هیدرولیزات در حضور سامانه نانولیپوزومی با پایداری فیزیکی مطلوب‌تری همراه بوده است. در مقابل، در نمونه‌های حاوی هیدرولیزات آزاد، تماس مستقیم پپتیدها با ترکیبات موجود در آب نارنج ممکن است احتمال تشکیل تجمعات و جدایش فازی طی نگهداری را افزایش دهد (Poudel et al., 2019).

مطالعات Goudarzi و همکاران (2015) نشان داد که افزودن هیدرولیزات پروتئین آب‌پنیر به آب‌سیب می‌تواند با کاهش اندازه ذرات و بهبود پایداری کلوئیدی، از رسوب‌گذاری جلوگیری کند .همچنین، Yadavو همکاران (2016) گزارش کردند که هیدرولیز پروتئین آب‌پنیر موجب بهبود پایداری نوشیدنی انبه در محیط اسیدی شد؛ به‌طوری‌که برخلاف پروتئین هیدرولیزنشده، هیدرولیزات در غلظت‌های مختلف توانست نوشیدنی پایداری ایجاد کند .این نتایج با یافته‌های پژوهش حاضر درباره کاهش جدایش فازی در نمونه‌های حاوی هیدرولیزات پروتئینی، به‌ویژه نمونه‌های دارای هیدرولیزات کپسوله‌شده، هم‌راستا هستند.

Fig **(4)**. Phase Separation of different treatments of bitter orange Juice/
نمودار (**۴**). میزان دو فاز شدن در تیمارهای مختلف آب نارنج

Journal Pre-proof

۳-۵- شاخص‌های رنگی *L، *a و *b

بررسی ویژگی‌های رنگی نشان داد که افزودن پروتئین هیدرولیزشده هسته زیتون بر رنگ آب نارنج تأثیر معنی‌داری داشت (شکل ۵). نمونه‌های حاوی هیدرولیزات ریزپوشانی‌شده، در مقایسه با نمونه‌های حاوی هیدرولیزات آزاد، روشنایی (L*) و مؤلفه زردی (b*) بیشتری نشان دادند؛ در مقابل، افزودن هیدرولیزات آزاد، به‌ویژه در سطح بالاتر، با کاهش این شاخص‌ها همراه بود. همچنین، شاخص a* در تمامی نمونه‌ها منفی بود و تغییرات محدودتری نسبت به L* و b* نشان داد. به‌طور کلی، ریزپوشانی هیدرولیزات در مقایسه با فرم آزاد، با حفظ مطلوب‌تر ویژگی‌های رنگی آب نارنج همراه بود. بر اساس نتایج آزمون آماری، تفاوت‌های مورد بررسی معنی‌دار بودند.

تغییرات شاخص‌های رنگی *L، a* و b* در طول نگهداری را می‌توان به تغییرات تدریجی در ترکیبات رنگی و زیست‌فعال آب نارنج، از جمله اکسیداسیون ترکیبات فنولی، تخریب رنگدانه‌های طبیعی و اسید آسکوربیک و تشکیل ترکیبات قهوه‌ای ناشی از واکنش‌های اکسیداتیو نسبت داد. این فرآیندها می‌توانند روشنایی، شدت زردی و مؤلفه قرمز–سبز محصول را تغییر دهند و بر ویژگی‌های ظاهری آن اثر بگذارند (Buvé et al., 2021). در نمونه‌های حاوی هیدرولیزات، به‌ویژه فرم ریزپوشانی‌شده، تغییرات شاخص‌های روشنایی و زردی نسبت به نمونه‌های حاوی هیدرولیزات آزاد محدودتر بود. این پایداری نسبی ممکن است با فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز و نقش محافظتی ساختار نانولیپوزومی در برابر واکنش‌های اکسیداسیونی مرتبط باشد (Wang et al., 2024). محصورشدن هیدرولیزات در ساختار نانولیپوزوم می‌تواند تماس مستقیم ترکیبات زیست‌فعال با اکسیژن و سایر عوامل اکسیدکننده را کاهش دهد و در نتیجه، از تخریب ترکیبات حساس و تغییرات نامطلوب رنگ جلوگیری کند (Punoo et al., 2023). بنابراین، حفظ بهتر L* و b* در نمونه‌های ریزپوشانی‌شده می‌تواند نشان‌دهنده نقش حفاظتی سامانه نانولیپوزومی در حفظ روشنایی و مؤلفه زردی آب نارنج طی نگهداری باشد. افزون بر این، پایداری ساختار نانولیپوزوم در حضور لسیتین و کلسترول می‌تواند به حفظ ترکیبات محصورشده و آزادسازی تدریجی‌تر هیدرولیزات کمک کند و در نتیجه، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سامانه را طی نگهداری بهتر حفظ نماید (Marsanasco et al., 2021). افزایش سطح افزودن هیدرولیزات نیز ممکن است از طریق افزایش مقدار ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، حفاظت بیشتری در برابر فرآیندهای اکسیداتیو فراهم کند؛ بااین‌حال، شدت این اثر به فرم هیدرولیزات و برهم‌کنش آن با ماتریس آب نارنج وابسته است. این یافته‌ها با نتایج سایر شاخص‌های اندازه‌گیری‌شده در این پژوهش، از جمله فعالیت آنتی‌اکسیدانی و شاخص قهوه‌ای‌شدن، همخوانی دارد و نشان می‌دهد که حفظ ظرفیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزات، به‌ویژه در فرم ریزپوشانی‌شده، ممکن است یکی از عوامل مؤثر در پایداری ویژگی‌های رنگی آب نارنج طی نگهداری باشد (Abd El-Aziz et al., 2024).

نتایج پژوهش حاضر درباره تأثیر نوع فرمولاسیون بر ویژگی‌های رنگی آب نارنج با یافته‌های مطالعات پیشین درباره نوشیدنی‌های میوه‌ای غنی‌شده با ترکیبات پروتئینی قابل مقایسه است. Punoo و همکاران (۲۰۲۳) در بررسی نوشیدنی‌های آب پرتقال غنی‌شده با آب‌پنیر سویا گزارش کردند که افزایش سهم جزء پروتئینی با افزایش شاخص روشنایی (L*) و کاهش مؤلفه زردی (b*) همراه بود؛ تغییری که به تفاوت رنگ اجزا و اثر رقیق‌سازی نسبت داده شد. در مقابل، در پژوهش حاضر، نمونه‌های حاوی هیدرولیزات ریزپوشانی‌شده در مقایسه با نمونه‌های حاوی فرم آزاد، روشنایی و زردی بیشتری نشان دادند. این تفاوت نشان می‌دهد که اثر افزودن ترکیبات پروتئینی بر رنگ نوشیدنی به ماهیت ترکیب افزوده‌شده، غلظت آن و نحوه حضور آن در ماتریس محصول وابسته است. همچنین، Buvé و همکاران (۲۰۲۱) تأکید کردند که تغییر رنگ آب‌میوه‌ها طی نگهداری می‌تواند تحت تأثیر تخریب اسید آسکوربیک، واکنش‌های قهوه‌ای‌شدن غیرآنزیمی، ترکیب محصول و دسترسی به اکسیژن قرار گیرد. از سوی دیگر، نتایج Marsanasco و همکاران (۲۰۲۲) درباره پایداری ترکیبات زیست‌فعال در سامانه‌های لیپوزومی غذایی، اهمیت ارزیابی نقش حامل‌های لیپیدی در حفاظت از ترکیبات محصورشده را نشان می‌دهد.

Fig **(5)**. Lab Index of different treatments of bitter orange Juice/
نمودار (**۵**). شاخص رنگی (L*a*b*) در تیمارهای مختلف آب نارنج

Journal Pre-proofs

۴- نتیجه گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که افزودن پروتئین هیدرولیز شده هسته زیتون به آب نارنج، به‌ویژه در فرم ریزپوشانی شده، نقش مؤثری در بهبود کیفیت فیزیکوشیمیایی و افزایش پایداری محصول در طول دوره نگهداری داشت. اگرچه افزایش غلظت پروتئین هیدرولیز شده باعث افزایش شاخص‌هایی مانند قهوه‌ای شدن شد که عمدتاً به رنگ ذاتی پروتئین هیدرولیز شده و افزایش ذرات معلق نسبت داده می‌شود، اما در مقابل موجب افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، حفظ رنگ، کاهش دو فاز شدن گردید. ریزپوشانی پروتئین هیدرولیز شده در نانولیپوزوم‌های حاوی لسیتین و کلسترول، علاوه بر محافظت از ترکیبات زیست‌فعال، اثرات نامطلوب ظاهری ناشی از پروتئین هیدرولیز شده آزاد را نیز تا حد زیادی کاهش داد. نمونه‌های ریزپوشانی شده در مقایسه با فرم آزاد، تغییر رنگ کمتری داشتند، شفافیت بیشتری را حفظ کردند، دوفاز شدن کمتری نشان دادند و از پایداری فیزیکی بالاتری برخوردار بودند. این نتایج نشان می‌دهد که نانولیپوزوم‌ها با افزایش پایداری کلوئیدی و کنترل آزادسازی پروتئین هیدرولیز شده، توانستند کیفیت محصول را در طول نگهداری حفظ کنند. در میان تیمارهای مورد بررسی، نمونه حاوی ۴ درصد پروتئین هیدرولیز شده ریزپوشانی شده بهترین عملکرد را از نظر حفظ فعالیت آنتی‌اکسیدانی، پایداری رنگ، کاهش دوفاز شدن و بهبود ویژگی‌های فیزیکی محصول نشان داد. در مجموع، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که استفاده از پروتئین هیدرولیز شده هسته زیتون ریزپوشانی شده در نانولیپوزوم، به‌ویژه در سطح ۴ درصد، راهکاری مؤثر برای توسعه نوشیدنی‌های فراسودمند بر پایه آب نارنج با ارزش تغذیه‌ای بالاتر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر و پایداری فیزیکوشیمیایی مطلوب‌تر در طول نگهداری است. این رویکرد علاوه بر ایجاد ارزش افزوده برای یکی از محصولات جانبی صنایع فرآوری زیتون، می‌تواند زمینه استفاده از آن را در تولید نوشیدنی‌های فراسودمند فراهم کند. بااین‌حال، کاربرد این سامانه در مقیاس صنعتی مستلزم بررسی محدودیت‌هایی مانند پذیرش حسی نوشیدنی و هزینه‌های ناشی از آماده‌سازی پودر هسته زیتون و ریزپوشانی پروتئین هیدرولیزشده است.

۵- تعارض منافع

"هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است."

۶- دسترسی به داده ها

"اسناد و داده های پشتیبان مقاله، در صورت درخواست، قابل ارائه خواهد بود".

منابع

Abd El-Aziz, N. M., Mehany, T., & Shehata, M. G. (2024). Characterization of orange peel extract-cross linking whey protein nanoparticles and their influences on the physical and sensory properties of orange juice. *LWT*, 208, 116745.

Almeida, R. F., Gomes, M. H. G., & Kurozawa, L. E. (2024). Enzymatic hydrolysis improves the encapsulation properties of rice bran protein by increasing retention of anthocyanins in microparticles of grape juice. *Food Res. Int.*, 180, 114090.

Bartolomei, M., Capriotti, A. L., Li, Y., Bollati, C., Li, J., Cerrato, A., & Lammi, C. (2022). Exploitation of olive (*Olea europaea L.*) seed proteins as upgraded source of bioactive peptides with multifunctional properties: Focus on antioxidant and dipeptidyl-dipeptidase-IV inhibitory activities, and glucagon-like peptide 1 improved modulation. *Antioxidants*, 11(9), 1730.

Bazaraa, W. A., Ammar, A. S., & Aqlan, A. M. (2020). Effects of kiwi's pectin methylesterase inhibitor, nanomilling and pasteurization on orange juice quality. *Food Sci. Nutr.*, 8(12), 6367–6379.

Bopitiya, D., Hearn, M. T., Zhang, J., & Bennett, L. E. (2022). Demonstration of anti-oxidant properties of mustard seed (*Brassica juncea*) protein isolate in orange juice. *Food Chem.*, 396, 133648.

Journal Pre-proofs

Buvé, C., Pham, H. T. T., Hendrickx, M., Grauwet, T., & Van Loey, A. (2021). Reaction pathways and factors influencing nonenzymatic browning in shelf-stable fruit juices during storage. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 20(6), 5698–5721.

Dorris, M. R., Voss, D. M., Bollom, M. A., Krawiec-Thayer, M. P., & Bolling, B. W. (2018). Browning index of anthocyanin-rich fruit juice depends on pH and anthocyanin loss more than the gain of soluble polymeric pigments. *J. Food Sci.*, 83(4), 911–921.

El Hosry, L., Elias, V., Chamoun, V., Halawi, M., Cayot, P., Nehme, A., & Bou-Maroun, E. (2025). Maillard reaction: Mechanism, influencing parameters, advantages, disadvantages, and food industrial applications: A review. *Foods*, 14(11), 1881.

Falsafi, S. R., Puniabangar, S., Trif, M., Samborska, K., Barańska, A., Aaliya, B., ... Rostamabadi, H. (2025). How do various encapsulation techniques improve the oral delivery of food protein hydrolysates? *Food Front.*, 6(1), 40–64.

Farzanfar, F., Mahoonak, A. S., Ghorbani, M., Ghaboos, S. H. H., & Kaveh, S. (2025). Encapsulation of ultrasound-assisted flaxseed meal protein hydrolysate in nanoliposomal systems by new formulation: Physicochemical properties, release behavior under simulated gastrointestinal conditions. *Food Chem. X*, 27, 102389.

Goudarzi, M., Madadlou, A., Mousavi, M. E., & Emam-Djomeh, Z. (2015). Formulation of apple juice beverages containing whey protein isolate or whey protein hydrolysate based on sensory and physicochemical analysis. *International Journal of Dairy Technology*, 68(1), 70-78.

Grosso, A. L., Cestonaro, G., Scampicchio, M., Ferrentino, G., & Costanzo, E. (2025). Development of a protein-enriched oat beverage: Enhancing antioxidant activity, functional properties and stability with soy protein hydrolysates. *LWT*, 222, 117644.

Ilona, B., Magdalena, M., & Alina, K. S. (2026). Chemical precursors of flocs in sweetened beverages: Mechanisms of formation, analytical methods, and industrial strategies. *Molecules*, 31(8), 1246.

Javadi, B., Farahmand, A., Soltani-Gorde-Faramarzi, S., & Hesarinejad, M. A. (2024). Chitosan-coated nanoliposome: An approach for simultaneous encapsulation of caffeine and roselle-anthocyanin in beverages. *Int. J. Biol. Macromol.*, 275, 133469.

Kaveh, S., Mahoonak, A. S., Erfani-Moghadam, V., Ghorbani, M., Gholamhosseinpour, A., & Raeisi, M. (2025). Protein hydrolysates of niosome-encapsulated skipjack (*Katsuwonus pelamis*) viscera: Antioxidant, anticancer, and release properties. *Appl. Food Res.*, 5(1), 100733.

Kaveh, S., Mahoonak, A. S., Ghorbani, M., & Jafari, S. M. (2022). Fenugreek seed (*Trigonella foenum graecum*) protein hydrolysate loaded in nanosized liposomes: Characteristic, storage stability, controlled release and retention of antioxidant activity. *Ind. Crops Prod.*, 182, 114908.

Khan, A. A., Allemailem, K. S., Almatroodi, S. A., Almatroudi, A., & Rahmani, A. H. (2020). Recent strategies towards the surface modification of liposomes: An innovative approach for different clinical applications. *3 Biotech*, 10(4), 163.

Lepaus, B. M., de Oliveira Santos, A. K. P., Spaviero, A. F., Daud, P. S., & de São José, J. F. B. (2022). Stability parameters during refrigerated storage and changes on the microstructure of orange-carrot blend juice processed by high-power ultrasound. *Front. Sustain. Food Syst.*, 6, 891662.

Li, Q., Wang, Y., Yan, S., Huang, J., Yang, S., Xu, J., & Shen, P. (2025). Changes in the molecular structures of water-soluble pectin from cloud precipitation of not-from-concentrate (NFC) orange juice during refrigerated storage. *Food Chem.*, 492, 145238.

Maggonage, M. H. U., Manjula, P., Abeyrathne, E. D. N. S., Shu, D., Huang, X., & Ahn, D. U. (2025). Identifying the potential of ovalbumin and its' hydrolysates to be used in a liquid food system to develop functional beverages. *Poult. Sci.*, 104(1), 104515.

Manjili, Z. N., Mahoonak, A. S., Ghorbani, M., Tabarestani, H. S., & Moghadam, V. E. (2024). Composite alginate-based hydrogel delivery of antioxidant pumpkin protein hydrolysate in simulated gastrointestinal condition. *Curr. Res. Food Sci.*, 8, 100739.

Marsanasco, M., & Alonso, S. D. V. (2021). Physicochemical, functional, and sensory characterization of orange juice containing food additives with bioactive compounds under heat treatment and storage conditions. *Food Biosci.*, 44, 101393.

Naghavi, S., Peighambardoust, S. H., Azadmard-Damirchi, S., & Khiabani, M. S. (2016). Preparation and evaluation of nanoliposomes containing green tea extract and investigating its efficacy in extending the shelf life of fresh orange and pomegranate juices. *Biol. Forum*, 8, 73–87.

Naseem, Z., Wani, S. M., Mir, S. A., & Nisar, N. (2026). Sustainable delivery of encapsulated probiotics and their survival in fruit-based beverages and under simulated gastrointestinal conditions. *Sustain. Food Technol.*, 4(2), 2146–2158.

Nooshi Manjili, Z., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., & Shahiri Tabarestani, H. (2024). Aloe vera drink fortification with free and microcapsulated pumpkin seed protein hydrolysate. *J. Food Process. Preserv.*, 2024(1), 9923437.

Nouraddini, M., Mohtarami, F., & Esmaiili, M. (2025). Enhancing orange juice shelf life using soy lecithin-stabilized lemongrass essential oil nanoemulsions: Formulation, optimization, and application. *Food Sci. Nutr.*, 13(6), e70398.

Osungbade, O. R., Ikujenlola, A. V., & Gbadamosi, S. O. (2021). Influence of Kersting's (*Kerstingiella geocarpa*) groundnut proteins on the physicochemical, bioactive properties and storage stability of orange juice. *Heliyon*, 7(2).

Pateiro, M., Gómez, B., Munekata, P. E., Barba, F. J., Putnik, P., Kovačević, D. B., & Lorenzo, J. M. (2021). Nanoencapsulation of promising bioactive compounds to improve their absorption, stability, functionality and the appearance of the final food products. *Molecules*, 26(6), 1547.

Pérez-Gálvez, R., Maldonado-Valderrama, J., Jones, N. C., Hoffmann, S. V., Guadix, E., & Garcia-Moreno, P. J. (2024). Influence of the enzymatic treatment and pH on the interfacial and emulsifying properties of sunflower and olive protein hydrolysates. *Food Hydrocolloids*, 154, 110135.

Poudel, A., Gachumi, G., Wasan, K. M., Dallal Bashi, Z., El-Aneed, A., & Badea, I. (2019). Development and characterization of liposomal formulations containing phytosterols extracted from canola oil deodorizer distillate along with tocopherols as food additives. *Pharmaceutics*, 11(4), 185.

Prakash, P. K., Eligar, S. M., Prakruthi, M., & Jyothi Lakshmi, A. S. (2022). Comparative assessment of antioxidant and immunomodulatory properties of skimmed milk protein hydrolysates and their incorporation in beverage mix. *J. Sci. Food Agric.*, 102(14), 6414–6422.

Punoo, H. A., Rather, J. A., & Muzaffar, A. (2023). Development of soy whey fortified orange juice beverages: Their physicochemical, rheological, antioxidant, and sensory properties. *Explor. Foods Foodomics*, 1(4), 206–220.

Rezagholizade-Shirvan, A., Soltani, M., Shokri, S., Radfar, R., Arab, M., & Shamloo, E. (2024). Bioactive compound encapsulation: Characteristics, applications in food systems, and implications for human health. *Food Chem. X*, 24, 101953.

Tanwar, T. K., Wagh, R. V., Mehta, N., Malav, O. P., Kour, S., & Kumar, P. J. P. I. J. (2022). Preparation of functional beverage from whey-based mango juice. *Pharma Innov.*, 11(7), 4710–4716.

Velázquez-Estrada, R. M., Hernández-Herrero, M. M., Guamis-López, B., & Roig-Sagues, A. X. (2019). Influence of ultra-high pressure homogenisation on physicochemical and sensorial properties of orange juice in comparison with conventional thermal processing. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 54(5), 1858–1864.

Vieira, A. H., Balthazar, C. F., Guimaraes, J. T., Rocha, R. S., Pagani, M. M., Esmerino, E. A., ... Cruz, A. G. (2020). Advantages of microfiltration processing of goat whey orange juice beverage. *Food Res. Int.*, 132, 109060.

Wang, R., Ma, C., Yan, H., Zhao, H., Wang, P., Zhang, S., & Yin, Z. (2024). Lecithin/cholesterol/Tween 80 liposomes for co-encapsulation of vitamin C and xanthoxylin. *ACS Appl. Nano Mater.*, 7(6), 5982–5995.

Wen, L., He, M., Yin, C., Jiang, Y., Luo, D., & Yang, B. (2021). Phenolics in *Citrus aurantium* fruit identified by UHPLC-MS/MS and their bioactivities. *LWT*, 147, 111671.

Yang, S., Xu, J., Liu, S., Cheng, Y., Cai, F., Zhang, Y., & Li, Q. (2025). Structural characterization of water-soluble pectin in NFC orange juice during cloud destabilization. *Food Chem.*, 146718.

Yadav, D. N., Vishwakarma, R. K., Borad, S., Bansal, S., Jaiswal, A. K., & Sharma, M. (2016). Development of protein fortified mango based ready-to-serve beverage. *Journal of food science and technology*, 53(10), 3844-3852.

Zabot, G. L., Schaefer Rodrigues, F., Polano Ody, L., Vinícius Tres, M., Herrera, E., Palacin, H., ... Olivera-Montenegro, L. (2022). Encapsulation of bioactive compounds for food and agricultural applications. *Polymers*, 14(19), 4194.

Journal Pre-proofs

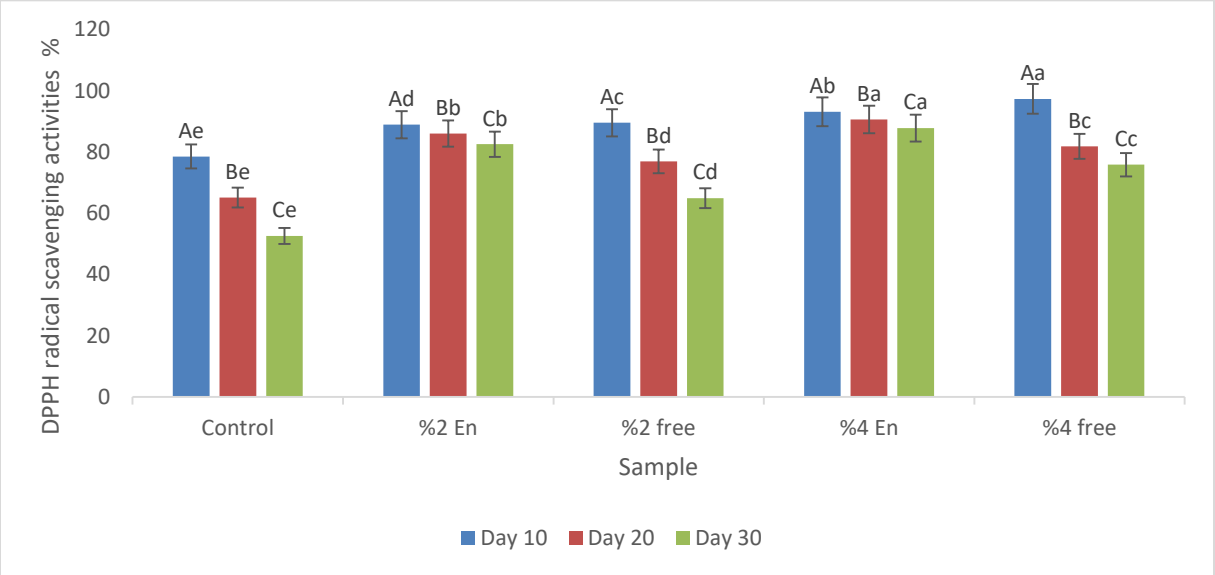


Fig **(1)**. DPPH radical scavenging activities of different treatments of bitter orange Juice (Control: untreated sample without any additives; Free: free olive seeds protein hydrolysate; En: olive seeds protein hydrolysate encapsulated in nanoliposomes). Different uppercase letters indicate significant differences among storage times within the same treatment, whereas different lowercase letters indicate significant differences among treatments at the same storage time ($p < 0.05$).

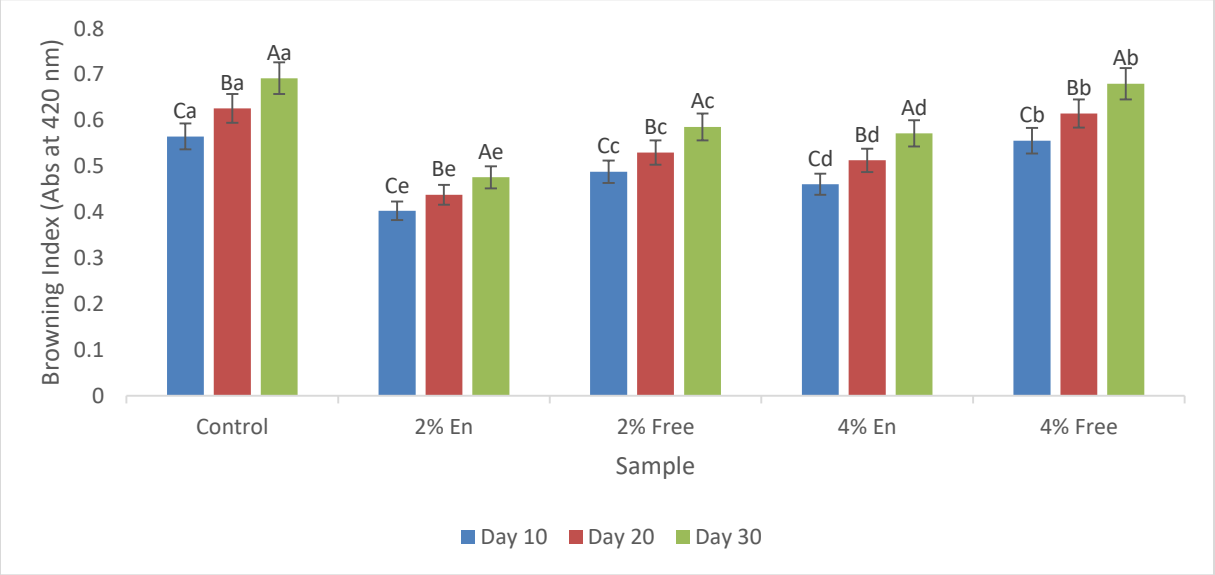


Fig **(2)**. Browning Index of different treatments of bitter orange Juice (Control: untreated sample without any additives; Free: free olive seeds protein hydrolysate; En: olive seeds protein hydrolysate encapsulated in nanoliposomes). Different uppercase letters indicate significant differences among storage times within the same treatment, whereas different lowercase letters indicate significant differences among treatments at the same storage time ($p < 0.05$).

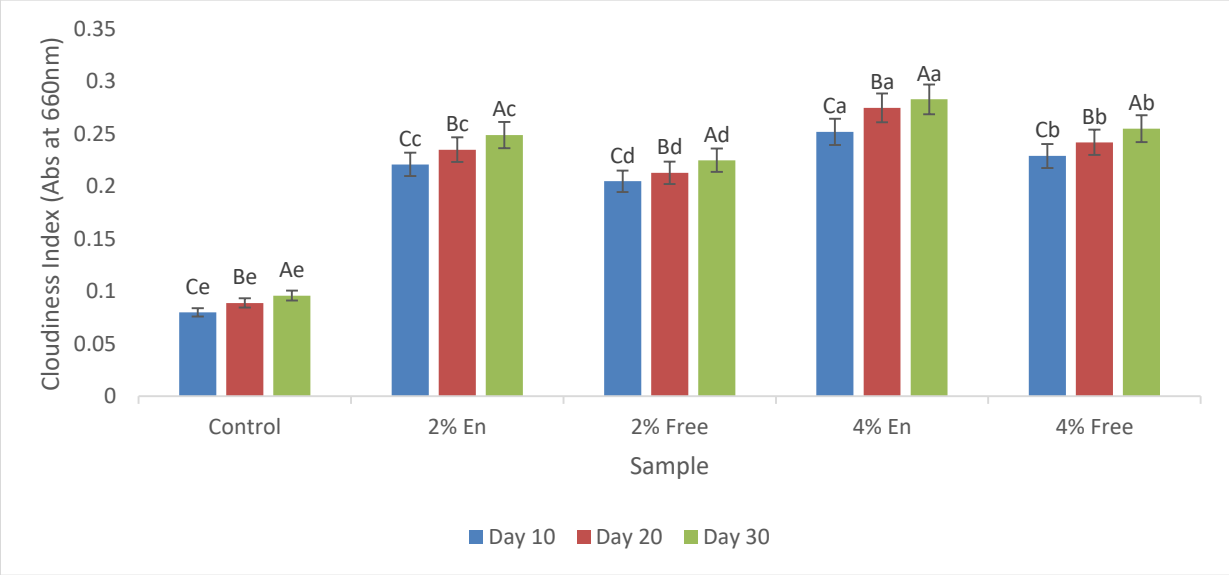


Fig **(3)**. Cloudiness Index of different treatments of bitter orange Juice (Control: untreated sample without any additives; Free: free olive seeds protein hydrolysate; En: olive seeds protein hydrolysate encapsulated in nanoliposomes). Different uppercase letters indicate significant differences among storage times within the same treatment, whereas different lowercase letters indicate significant differences among treatments at the same storage time ($p < 0.05$).

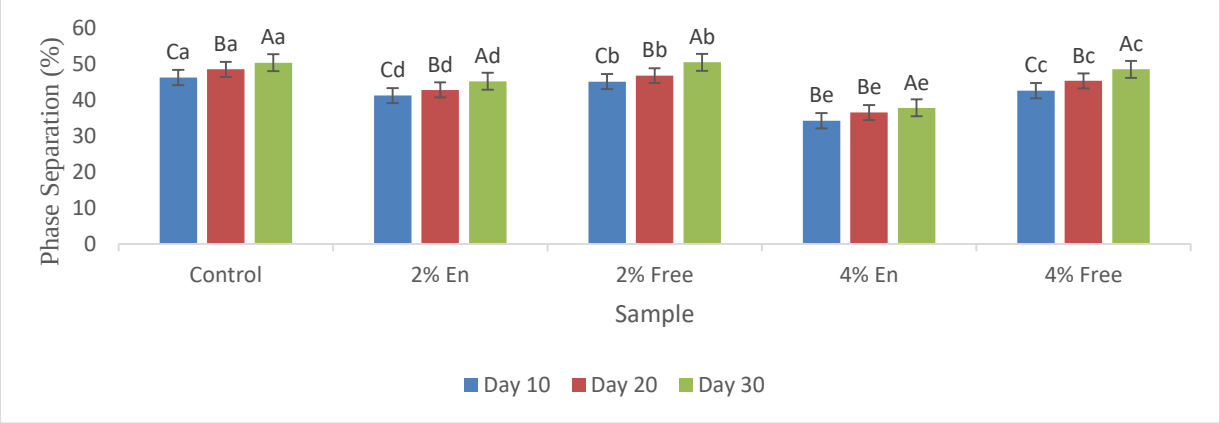


Fig **(4)**. Phase Separation of different treatments of bitter orange Juice (Control: untreated sample without any additives; Free: free olive seeds protein hydrolysate; En: olive seeds protein hydrolysate encapsulated in nanoliposomes). Different uppercase letters indicate significant differences among storage times within the same treatment, whereas different lowercase letters indicate significant differences among treatments at the same storage time ($p < 0.05$).

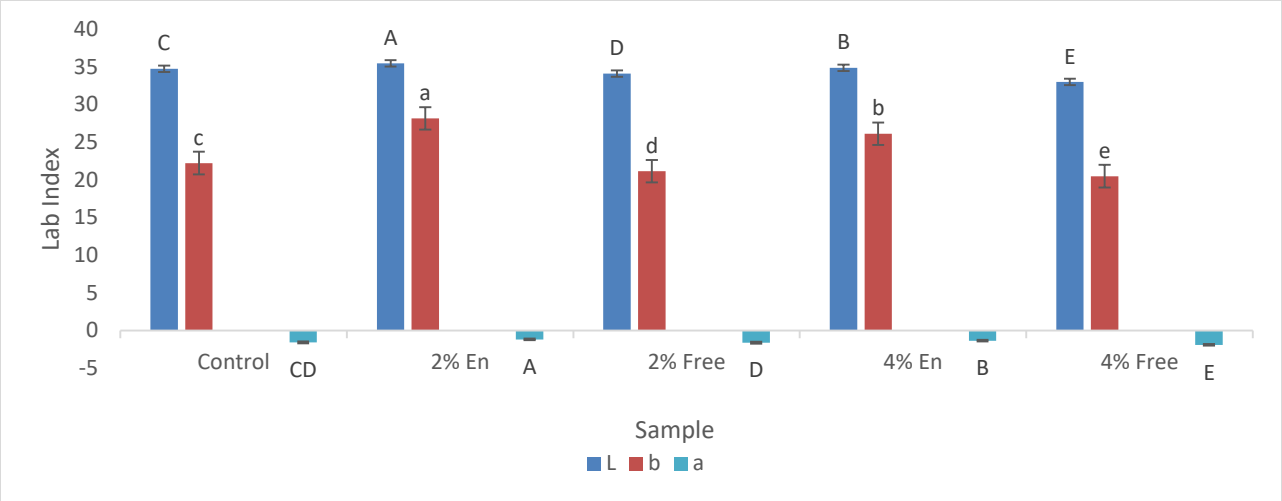


Fig **(5)**. Lab Index of different treatments of bitter orange Juice (Control: untreated sample without any additives; Free: free olive seeds protein hydrolysate; En: olive seeds protein hydrolysate encapsulated in nanoliposomes). Different uppercase letters indicate significant differences among storage times within the same treatment, whereas different lowercase letters indicate significant differences among treatments at the same storage time ($p < 0.05$).

Journal Pre-proofs

Physicochemical Properties of Bitter Orange Juice Enriched with Olive Seeds Protein Hydrolysate During Storage

Mona Ranjbar[1], Alireza Sadeghi Mahoonak[*2] ,Mohammad Ghorbani[3]

1- PhD Student of Food Chemisrty, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources (GUASNR), Gorgan, Iran.
2- Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources (GUASNR), Gorgan, Iran.
3- Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources (GUASNR), Gorgan, Iran

Abstract

Introduction: The incorporation of bioactive compounds into fruit juices is limited by their instability and interactions with the food matrix. Encapsulation may help preserve their functionality and improve beverage stability.

Materials and Methods: This study investigated the effects of free and nanoliposome-encapsulated olive kernel protein hydrolysate on the physicochemical properties of bitter orange juice during 30 days of storage at 4°C. Hydrolysate solution (20 mg/mL) was added at 2% and 4% (v/v) in free or encapsulated form. DPPH radical scavenging activity, browning index, cloudiness, phase separation, and color parameters were evaluated every 10 days.

Results and Discussion: DPPH radical scavenging activity decreased in all treatments during storage. However, the 4% encapsulated treatment retained higher activity, decreasing from 93.2% on day 10 to 87.9% on day 30, compared with a decrease from 78.6% to 52.6% in the control. The control browning index increased from 0.565 to 0.692, whereas the lowest values were observed in the 2% encapsulated treatment (0.403 to 0.476). Phase separation in the control increased from 46.25% to 50.37%, compared with 34.25% to 37.84% in the 4% encapsulated treatment. Cloudiness increased in all treatments and was highest in the 4% encapsulated treatment. Encapsulated samples also exhibited greater lightness and yellowness than samples containing free hydrolysate.

Conclusions: Nanoliposome encapsulation, particularly at 4%, improved antioxidant retention and reduced browning and phase separation, indicating its potential for developing more stable functional fruit beverages.

Keywords: Olive seeds protein hydrolysate; Bioactive peptides; Nanoliposomes; Antioxidant activity; Bitter Orange juice.

Journal Pre-proofs

* sadeghiaz@gau.ac.ir