دراسة الشروط المثلى لاستخدام الكيتوزان في عملية الترويق مقارنة بالطريقة التقليدية وتأثير ذلك على جودة عصير التفاح خلال التخزين

محمد علي[1] رمضان عطرة [2] نسرين البيطار [3]

الملخص:

بحثت هذه الدراسة في تقييم تأثير الكيتوزان ومواد الترويق التقليدية (البنتونيت والجيلاتين والسيليكا) في الصفات الفيزيائية والكيميائية لعصير التفاح خلال التخزين لمدة ثلاثة أشهر عند درجتي حرارة C°4 و C°25 . وتم تحديد الشروط المثلى لاستخدام الكيتوزان في ترويق العصير باستخدام منهجية سطح الاستجابة (RSM) وهي: تركيز الكيتوزان 186.97 mg/100ml ودرجة حرارة الترويق C°40 وزمن الترويق 150 min ، وتم تقييم التغيرات في خصائص الجودة مثل العكارة، رقم الحموضة، الحموضة القابلة للمعايرة، اللون، محتوى المواد الصلبة المنحلة ومحتوى الفينولات الكلية. أظهرت النتائج أنه يمكن ترويق عصير التفاح باستخدام الكيتوزان وحده مقارنة بمواد الترويق التقليدية التي تستخدم مجتمعة لإنتاج عصير مروق، كما تبين أن العصير المروق بالكيتوزان أبدى استقراراً أعلى خلال التخزين مقارنة بمواد الترويق التقليدية مع تباطؤ واضح في معدلات التغير في الخصائص المدروسة، تشير هذه النتائج إلى أن الكيتوزان يعد مادة ترويق فعالة وقابلة للتطبيق الصناعي ويمكن أن يشكل بديلاً واعداً للمواد التقليدية في تحسين جودة واستقرار عصير التفاح أثناء التخزين.

الكلمات المفتاحية: كيتوزان، بنتونيت، جيلاتين، سيليكا، منهجية سطح الاستجابة، جودة عصير التفاح.

Studying of the Optimal Conditions for Using Chitosan in the Clarification Compared to the Conventional Fining Agents and its Effect in Apple Juice Quality during Storage

Mohamad Ali[(1)] Ramadan Atra[(2)] Nisreen Al-Bitar[(3)]

Abstract

This study aimed to evaluate the effects of chitosan and conventional fining agents (bentonite, gelatin, and silica) in the physicochemical quality attributes of apple juice during storage for three months at 4 °C and 25 °C. The optimal clarification conditions for chitosan were determined using Response Surface Methodology (RSM), yielding a chitosan concentration of 186.97 mg/100 mL, a clarification temperature of 40 °C, and a clarification time of 150 min. Changes in key quality parameters, including turbidity, pH, titratable acidity, color, total soluble solids, and total phenolic content, were monitored throughout storage. The results demonstrated that apple juice could be effectively clarified using chitosan alone, in contrast to conventional fining agents, which are typically applied in combination to achieve satisfactory clarification. Moreover, chitosan-treated juice exhibited significantly higher stability during storage, characterized by a pronounced reduction in the rates of change of the investigated quality parameters compared to juices clarified with conventional agents. These findings indicate that chitosan is an efficient and industrially applicable fining agent and represents a promising alternative to traditional fining materials for enhancing the quality and storage stability of apple juice.

Keywords: Chitosan, Bentonite, Gelatin, Kieselsol, Response surface methodology, Apple juice quality.

1. المقدمة:

يُعد عصير التفاح (*Malus domestica.*) من أكثر عصائر الفاكهة استهلاكاً على مستوى العالم نظراً لخصائصه الحسية الجيدة كطعمه اللذيذ ولونه الجميل فقد سماه البعض بالسائل الذهبي، بالإضافة لفوائده الصحية حيث ارتبط استهلاكه بشكل منتظم بآثار إيجابية على صحة القلب والأوعية الدموية وتقليل الإجهاد التأكسدي بفضل محتواه الغني من متعددة الفينولات ومضادات الأكسدة [1,2]، إن عكارة عصير التفاح هي أحد أهم المشكلات التي تواجه المصنعين حيث تظهر العكارة خلال عمليات التصنيع وقد تظهر خلال التخزين مما يؤثر في جودة العصير.

ويعرف عصير التفاح العكر على أنه معلق غروي يحتوي على البكتين والبروتين ومتعددة الفينولات وبقايا الخلايا [3] مما يؤثر على لونه وطعمه، ولتلبية أذواق المستهلكين ومعايير الغذاء الدولية يخضع عصير التفاح لمرحلة مهمة أثناء تصنيعه ألا وهي مرحلة الترويق، وتهدف عمليات الترويق إلى إزالة الجزيئات المعلقة وتعزيز ثبات اللون وتحسين الخصائص الحسية مع الحفاظ على القيمة الغذائية للعصير، وتشمل الترشيح الميكانيكي، الترسيب، الطرد المركزي، مصحوبة غالباً بمعالجات أنزيمية [4] أو كيميائية [5] أو فيزيائية [6] ، وتتم عملية الترويق من خلال الاستخدام المشترك لما يسمى بعوامل الترويق والتي تعتبر ممارسة صناعية شائعة عند إنتاج العصائر، ويمكن أن تكون هذه العوامل من أصل معدني (مثل البنتونيت) أو من أصل بروتيني (مثل الكازئين، الجيلاتين) أو مواد صناعية (مثل البوليمرات، بولي فينيل بيروليدون) [7].

تجرى عملية الترويق لإزالة الجسيمات الغروية المسببة للعكارة وذلك للحصول على عصائر صافية تماماً،ولتسهيل إنتاج مركزات عصير الفاكهة، يكون لون عصير التفاح العكر ناتج عن جسيمات غروية ذات غلاف خارجي سالب الشحنة يتكون من بكتين منزوع الميتيل

جزئياً ونواة بروتينية موجبة الشحنة، وتستخدم مستحضرات البكتيناز عادة لتفكيك طبقة البكتين جزئياً كاشفةً النواة موجبة الشحنة مما يؤدي إلى التكتل المتبادل للجسيمات الغروية التي يمكن إزالتها بسهولة من خلال عمليات الترشيح [8].

تمثل المعالجات المسبقة باستخدام عوامل الترويق مثل الجيلاتين ومحلول السيليكا والبنتونيت ممارسة صناعية شائعة لتسهيل تكتل الغرويات المسببة للعكارة [3]، حيث يعمل الجيلاتين كعامل مساعد في تكتل الجسيمات الغروية المشحونة سلباً، كما يمكنه ربط المركبات الفينولية من خلال التفاعلات الكارهة للماء والروابط الهيدروجينية [9,10] نظراً لشحنته الموجبة عند درجة الحموضة المنخفضة لعصير التفاح، ويستخدم محلول السيليكا المشحون سلباً مع الجيلاتين للمساعدة في ترسيبه كي لا يحدث زيادة في الترويق [11]، ويستخدم البنتونيت لمنع تكوين عكارة ثانوية ذات طبيعة بروتينية حيث أن سطحه المشحون سلباً فعال للغاية في امتصاص البروتينات [12].

الكيتوزان poly-β-(1,4)-d-glucosamine- هو منتج منزوع الأسيتيل من chitin - poly-β-(1,4)-N-acetyl-d-glucosamine وهو أحد أكثر السكريات الطبيعية وفرة يوجد في تركيب أصداف القشريات وجدران الخلايا الفطرية [13] وله وزن جزيئي مرتفع يستخدم في الصناعات الغذائية نظراً لخصائصه المضادة للبكتيريا والفطريات [14]، كما يستخدم كعامل ترويق في صناعة العصائر، حيث تم استخدام الكيتوزان لترويق عصير التفاح بتركيز 0.7 g\L ودرجة حرارة 40°C قد وصل إلى أقصى درجات الترويق [15]، كما تبين أن إضافة الكيتوزان بتركيز (0.1 – 0.5) g/L إلى عصير التفاح زادت من نفاذيته إلى 91% وبالتالي انخفضت عكارته وتحسن لونه وبقيت مستويات الحموض والسكريات في عصير التفاح دون تغيير بعد إضافة الكيتوزان [16]، ووجد أن الترويق باستخدام الكيتوزان قد خفض بشكل كبير من عكارة عصير التفاح حيث أصبحت

امتصاصية العصير عند 660 nm تقريباً 0.14 مقارنة بعصير التفاح الخام التي بلغت حوالي 0.31 [17].

يعد تركيز الكيتوزان متغيراً مهماً يؤثر على قيمة العكارة للعصير المروق [27]، كما وجد أن لون عصير التفاح يتأثر بشكل كبير بثلاثة عوامل وهي: درجة الحرارة، تركيز الكيتوزان ومصدر الكيتوزان [28]، ويكون الكيتوزان قادراً على تخثير المكونات الأنيونية مثل البكتين والبروتين ثم يتم فصل الجزيئات المعلقة في العصير وبالتالي تقل عكارته، ويرتبط هذا السلوك بالخصائص الفيزيائية والكيميائية للكيتوزان المتعلقة بوجود مجموعات الأمين[15].

وتمت دراسة تأثير الترويق باستخدام الجيلاتين والبنتونيت ومحلول السيليكا والكيتوزان القابل للذوبان في الماء في المركبات الفينولية ونشاط مضادات الأكسدة ولون عصير التفاح وقد أظهرت النتائج أن استخدام الكيتوزان والجيلاتين قلل من تركيز البروسيانيدينات البوليمرية بنسبة 46-63% في عصير التفاح بينما لم يلاحظ أي تأثير يذكر لعوامل الترويق المختارة على القدرة المضادة للأكسدة [5]، ولوحظ انخفاضاً في إجمالي الفينولات (28%) عند استخدام الجيلاتين والبنتونيت معاً في ترويق عصير التفاح[18].

2. هدف البحث:

يهدف البحث إلى:

- تحديد الشروط المثلى لترويق عصير التفاح باستخدام الكيتوزان.
- مقارنة استخدام الجيلاتين والبنتونيت والسيليكا كعوامل ترويق تقليدية مع الكيتوزان وتأثيرها على الخصائص الفيزيائية والكيميائية لعصير التفاح خلال التخزين.

3. مواد وطرق البحث Materials and methods:

المواد Material:

1. عصير التفاح: تم شراء التفاح من صنف جولدن (Golden DeliCious variety) في مرحلة النضج المناسبة من قرية برشين في محافظة حمص في شهر أيلول من العام 2025 وتم فحص التفاح للتأكد من سلامته، غُسلت الثمار السليمة وتم تقطيعها وإزالة البذور منها، ثم تم استخراج العصير بواسطة عصارة الفاكهة (RIMEX, SPAIN) بعدها تم تصفية العصير باستخدام مصافي قماشية، ثم استخدام الطرد المركزي 4000 rpm لمدة 5 دقائق.

2. تحضير مواد الترويق:

تزداد فعالية عوامل الترويق بزيادة قدرتها على احتباس الماء أو الانتفاخ [19]، وتم تحضير مواد الترويق وفق [20] مع بعض التعديل على الشكل الآتي:

تحضير محلول الجيلاتين: تم إذابة 2 g من الجيلاتين (ErbiGel, Erbslöh, Geisenheim, Ger many) في 100 ml من الماء المقطر الساخن (70-80°C) وتم تحضير محلول الجيلاتين قبل 5 ساعات من استخدامه في الترويق.

تحضير محلول السيليكا (Kieselgel): تم خلط 15 g من هلام السيليكا (Klar-Sol 30, Erbslöh, Geisenheim, Ger many) مع 100 ml من الماء المقطر، ثم استخدام الطرد المركزي 4000 rpm لمدة 5 دقائق، استخدم السيليكا الرطب (kieselsol) في الترويق.

تحضير محلول البنتونيت (Bentonite): تم خلط 10 g من مسحوق البنتونيت (Bentonite UF, Erbslöh, Geisenheim, Germany) مع 100 ml من الماء

المقطر وترك المزيج في درجة حرارة الغرفة لمدة 6 ساعات، ثم تم استخدام الطرد المركزي 4000 rpm لمدة 5 دقائق، استخدم البنتونيت الرطب في الترويق.

3. ترويق العصير باستخدام البنتونيت والجيلاتين والسيليكا:

تم استخدام مواد الترويق وفق [21] مع بعض التعديل، حيث تمت عملية الترويق بإضافة البنتونيت الرطب بتركيز (10% w/v, 0.715 g/L) إلى عصير التفاح وتركه عند درجة حرارة الغرفة لمدة ساعتين، بعدها تمت عملية إضافة محلول الجيلاتين بتركيز (2% w/v, 7.5 ml/L)، وإضافة محلول السيليكا الرطب بتركيز (15% w/v, 2.6 ml/L) إلى العصير المعالج بالبنتونيت وخلط المزيج باستخدام محرك مغناطيسي (VELP, ITALY) لمدة 5 دقائق، ترك العصير لمدة 30 دقيقة لحين اكتمال عملية الترويق، ثم استخدم الطرد المركزي 4000 rpm لمدة 5 دقائق لترسيب الندف المتشكلة وإزالة مواد الترويق، تم فصل العصير الرائق وتعبئته في عبوات زجاجية محكمة الاغلاق سعة 100ml وبسترتها(85- 90 °C لمدة 1 دقيقة) في حمام مائي ثم التبريد السريع إلى درجة حرارة الغرفة والحفظ في الدرجة 4°C و25°C.

4. ترويق العصير باستخدام الكيتوزان:

لترويق عصير التفاح بالكيتوزان (Carboxymethyl chitosan, CAS No. 83512-85-0,Qingdao Reach International Inc. Company ,China) تم إجراء تصميم مركزي مركب (CCD) بثلاثة متغيرات تشمل تركيز الكيتوزان (X1) ودرجة حرارة الترويق (X2) وزمن الترويق (X3) عند ثلاث مستويات واعتبرت كمتغيرات مستقلة وكانت متغيرات الدراسة هي: تركيز الكيتوزان (mg/100ml من عصير تفاح)، درجة حرارة الترويق (C°)، وزمن الترويق (دقيقة) المستخلصة من منهجية سطح الاستجابة

Response Surface Methodology (RSM) وتم اختيار مجال تركيز الكيتوزان المستخدم في RSM وفق [26] مع بعض التعديل وهي: تركيز الكيتوزان 250 – 10) mg/100ml) ودرجة حرارة الترويق (°C 40-20) وزمن الترويق (min 150-30)، وكانت دالة الاستجابة (Y) المقاسة هي عكارة عصير التفاح قبل الطرد المركزي، يبين الجدول (1) التصميم المركزي المركب لتجارب ترويق عصير التفاح بالكيتوزان.

الجدول (1) التصميم المركزي المركب لتجارب ترويق عصير التفاح بالكيتوزان

Turbidity (NTU) Y	Time (min) X_3	Temperature (C°) X_2	Chitosan (mg/100ml) X_1	Pt x	No.
11.21	90	30	130	0	1
16.89	90	20	130	-1	2
17.09	30	40	250	1	3
13.03	150	20	250	1	4
285	150	20	10	1	5
12.27	90	30	130	0	6
13.48	90	30	130	0	7
12.45	90	30	250	-1	8
13.05	90	30	130	0	9
18.60	30	20	250	1	10
12.87	90	30	130	0	11
270	150	40	10	1	12
13.72	90	40	130	-1	13
11.59	150	40	250	1	14
300	30	20	10	1	15
22.70	30	30	130	-1	16

17	-1	130	30	150	13.37
18	-1	10	30	90	290
19	1	10	40	30	295
20	0	130	30	90	12.98

يمثل x المستوى المشفر للمتغيرات، ويمثل X المستوى الفعلي للمتغيرات.

طرق البحث Methods of Analysis:

تقدير المادة الصلبة المنحلة (TSS): باستخدام جهاز الريفراكتومتر (Kruss, DR301-95,Germany) عند درجة حرارة 20°C وتم التعبير عن النتائج كنسبة مئوية وزنية Brix% وفق [22].

تقدير رقم الحموضة pH: باستخدام جهاز pH-meter من نموذج (Sartorius PB-11) بدرجة حرارة 20°C وفق [23].

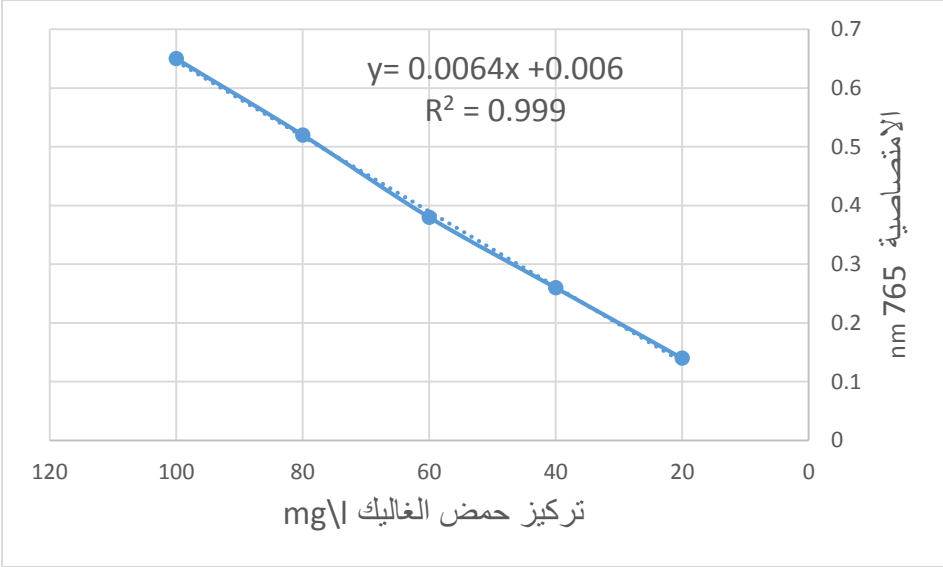
تقدير الحموضة الكلية القابلة للمعايرة: بالمعايرة بمحلول NaOH 0.1N للوصول لقيمة pH:8.1 وقدرت على أساس حمض الماليك، وفق [23].

تقدير اللون: تم تقدير تحسن لون عصير التفاح بقياس النفاذية (Transmittance) عند طول موجة 440nm باستخدام جهاز UV–SPECTROPHOTOMETER نموذج (UV-1800,SHIMADZU,Jaban) فكلما كانت قيمة النفاذية أعلى كان لون العصير أفضل وأكثر شفافية وأقل امتصاصية للضوء، وفق [24].

تقدير العكارة: باستخدام جهاز Turbidimeter نموذج 2100P (HASH, U.S.A)

تقدير الفينولات الكلية: باستخدام طريقة Folin-Ciocalteu وفق [25] مع بعض التعديل، حيث خلط 0.5 ml من العصير المخفف بمقدار 100-10 ضعف مع 2.5 ml من كاشف

فولين المخفف بمقدار 10 أضعاف، وحُضن لمدة دقيقة واحدة، قبل إضافة 2 ml من Na_2CO_3 7.5% وترك الخليط لمدة 30 دقيقة، بعدها حددت قيمة الامتصاصية مقارنةً بالعينة الخام المحضرة عند طول موجة 765 nm (باستخدام جهاز UV– spectrophotometer نموذج (UV-1800,SHIMADZU,Jaban) بالمقارنة مع المنحني العياري لحمض الغاليك النقي، ويمثل الشكل (1) المنحني العياري لحمض الغاليك:



الشكل (1) المنحني العياري لحمض الغاليك

وتم التعبير عن النتائج النهائية كمكافئ لحمض الغاليك (GAE) لكل 1 ليتر من العصير وفق المعادلة التالية:

$$\text{TPC (mg GA \ L)} = \frac{A - b}{a} \times D$$

حيث: TPC: كمية المركبات الفينولية (mg GA \ L).

A: امتصاصية العينة عند nm765.

b: الجزء المقطع من المنحني العياري (0.006).

a: ميل المنحني العياري (0.0064).

D: معامل التخفيف.

الاختبارات الميكروبيولوجية:

تم تحضير وسط التمديد وفق المواصفة القياسية الدولية (ISO 6887) [33] وذلك بمزج ماء البيبتون مع ملح الطعام بنسبة 1 g بيبتون و 8.5 g ملح طعام ثم إكمال الحجم بالماء المقطر حتى 1000 ml وضبطت درجة الحموضة pH:7 وعقم الوسط بدرجة حرارة C°121 لمدة 20 دقيقة، بعدها حضرت سلسلة التمديدات بأخذ 10 ml من عصير التفاح وإضافته إلى 90 ml من وسط التمديد المحضر لنحصل بذلك على التمديد الأول 10^{-1} ثم بقية التمديدات، واتبعت طريقة الزرع على بيئة غذائية صلبة بالنسبة للتعداد العام للبكتريا وفق المواصفة القياسية الدولية (ISO 4833) [34] باستخدام وسط Nutrient Agar، وكذلك بالنسبة للخمائر والفطور وفق المواصفة القياسية الدولية (ISO 7954) [35] باستخدام وسط Potato Dextrose Agar (PDA)، وبعد انتهاء فترة التحضين عدت المستعمرات في الأطباق المحضنة وحسب التعداد العام في العينات وفق المعادلة التالية:

$$N = \frac{\sum c}{(M1 + 0.1M2)d}$$

حيث:

N: تعداد الأحياء الدقيقة في 1 ml من العينة مقدرة ب CFU/ml.

c: مجموع المستعمرات الموجودة في كل الأطباق المعتمدة.

M_1: عدد الأطباق المعتمدة للتمديد الأول.

M_2: عدد الأطباق المعتمدة للتمديد الثاني.

d: عامل التمديد المعتمد الأول 10^{-1}.

التقييم الحسـي: أجريت التقييمات الحسـية للعينات وفق [36] مع بعض التعديل، من قبل لجنة مؤلفة من 5 أشـــخاص وتم تقييم اللون والطعم والرائحة والقبول العام للعينات على مقياس من 9 نقاط (1: غير مقبول ، 4: مقبول، 7: جيد جداً، 9: ممتاز).

التحليل الاحصائي: أجري تحليل التباين (ANOVA) واختبار Tukey باستخدام برنامج Minitab 22 عند قيمة ($p<0.05$) حيث تم استخدام ثلاث مكررات لكل عينة.

4. النتائج والمناقشة:

تم تخزين عصير التفاح المروق باستخدام الكيتوزان (AJ_C) و عصير التفاح المروق باستخدام الجيلاتين والبنتونيت والسيليكا (AJ_T) عند درجتي حرارة 4°C و 25°C لمدة 3 أشهر، وتم دراسة التغيرات في خصائص الجودة مثل العكارة والحموضة القابلة للمعايرة TA واللون T_{440} ومحتوى الفينولات الكلي TFC ومحتوى المواد الصلبة المنحلة TSS ورقم الحموضة pH أثناء التخزين، وكانت قيمة العكارة في عصير التفاح الخام AJ (540 NTU)، وقيمة العكارة في عصير AJ_T (18.50 NTU) بينما كانت في عصير AJ_C (21.73 NTU) قبل الطرد المركزي عند 4000 rpm لمدة 5 دقائق، وبعد الطرد المركزي كانت قيمة العكارة لعصير AJ_T و AJ_C هي 5.80 و 6.43 (NTU) على الترتيب.

1.4 تأثير تركيز الكيتوزان ودرجة حرارة ووقت عملية الترويق في عكارة عصير التفاح

تم إجراء تحليل التباين لتحديد التأثيرات المهمة لمتغيرات العملية على الاستجابة (العكارة) ولتطبيق نموذج كثير الحدود من الدرجة الثانية، وقد بلغت قيمة R^2 0.9998 كما لوحظ تقارب كبير بين معامل التحديد المعدل (adj R^2 =0.9996) ومعامل التحديد التنبؤي (pred R^2 =0.9980)، مما يعكس قدرة النموذج العالية على التنبؤ، وعلى الرغم من أن اختبار عدم التوافق ((Lack of Fit) كان ذو دلالة إحصائياً فإن الانخفاض الكبير في الخطأ المتبقي والقيم المرتفعة لمعاملات التحديد تشير إلى أن النموذج مناسب لوصف سلوك عصير التفاح ذو التركيب المعقد لمكوناته.

ويتضح أن تركيز الكيتوزان كان العامل الأكثر تأثيراً في خفض قيمة العكارة وهذا يتفق مع [26]، وكانت العكارة مرتبطة بشكل سلبي (عكسي) بالتأثير الخطي لتركيز الكيتوزان (p < 0.0001) ودرجة حرارة العملية وزمن العملية، كما أظهرت النتائج وجود تأثير تربيعي معنوي لتركيز الكيتوزان ($p < 0.0001$) مما يدل على وجود تركيز أمثل للكيتوزان فعند زيادة التركيز لأعلى من ذلك ستزداد قيمة العكارة، كما كانت التفاعلات الثنائية بين تركيز الكيتوزان وكل من درجة الحرارة وزمن المعالجة ذات دلالة إحصائياً ($p < 0.05$) مما يدل على أن فعالية الكيتوزان في خفض العكارة تعتمد بشكل كبير على ظروف عملية الترويق، بينما لم يكن التفاعل بين درجة الحرارة وزمن المعالجة ذو دلالة إحصائياً مما يشير إلى محدودية تأثيرهما المشترك مقارنة بتفاعلهما مع الكيتوزان، فيما يلي معادلة العكارة بدلالة المتغيرات:

$$Turbidity = 348.7 - 3.6876X_1 - 0.160X_2 - 0.2282X_3 + 0.009422X_1^2 - 0.0024X_2^2 + 0.000691X_3^2 + 0.001776X_1.X_2 + 0.000502X_1.X_3 - 0.00207X_2.X_3$$

تم تحديد الشروط المثلى لترويق عصير التفاح بالكيتوزان باستخدام RSM وهي: تركيز الكيتوزان 186.97 (mg/100ml) ودرجة حرارة الترويق 40°C وزمن الترويق 150 min، تم اختبار مدى ملاءمة معادلة النموذج للتنبؤ بقيمة العكارة حيث بلغت 25.45 NTU بينما بلغت العكارة وفق التجارب عند الشروط المثلى قيمة 24.15 NTU، ووصلت هذه القيمة بعد الطرد المركزي إلى 4.61 NTU.

2.4 المواصفات الفيزيائية والكيميائية لعصير التفاح المروق خلال مدة التخزين

تم تعبئة عصير التفاح في عبوات زجاجية محكمة الإغلاق وتخزينها على الدرجة 4°C والدرجة 25°C وتم متابعة التغير في المواصفات الفيزيائية والكيميائية للعينات خلال التخزين لمدة ثلاثة أشهر. يبين الجدول (2) المواصفات الفيزيائية والكيميائية لعصير التفاح خلال التخزين.

الجدول (2) المواصفات الفيزيائية والكيميائية لعصير التفاح خلال التخزين

العكارة NTU	درجة حرارة التخزين	AJ_T	AJ_C
بداية التخزين		5.45 ± 0.04^{G}	4.61 ± 0.05^{I}
الشهر الأول	4°C	6.08 ± 0.03^{EF}	6.92 ± 0.05^{D}
	25°C	6.82 ± 0.03^{D}	5.38 ± 0.03^{G}
الشهر الثاني	4°C	5.93 ± 0.03^{F}	7.16 ± 0.04^{C}

	25°C	5.06 ± 0.10^{H}	6.14 ± 0.05^{E}
الشهر الثالث	4°C	7.64 ± 0.07^{B}	6.67 ± 0.05^{D}
	25°C	9.27 ± 0.05^{A}	9.22 ± 0.07^{A}
اللون T_{440}%			
بداية التخزين		81.62 ± 0.11^{B}	87.74 ± 0.25^{A}
الشهر الأول	4°C	73.42 ± 0.24^{D}	80.81 ± 0.16^{B}
	25°C	67.57 ± 0.38^{G}	71.09 ± 0.97^{E}
الشهر الثاني	4°C	59.14 ± 0.16^{J}	77.28 ± 0.27^{D}
	25°C	50.36 ± 0.16^{K}	69.45 ± 0.47^{F}
الشهر الثالث	4°C	62.72 ± 0.18^{I}	73.57 ± 0.54^{D}
	25°C	47.62 ± 0.39^{L}	64.29 ± 0.54^{H}
Brix° TSS			
بداية التخزين		11.97 ± 0.005^{A}	11.68 ± 0.005^{D}
الشهر الأول	4°C	11.97 ± 0.005^{A}	11.63 ± 0.005^{E}
	25°C	11.97 ± 0.005^{A}	11.60 ± 0.005^{F}
الشهر الثاني	4°C	11.88 ± 0.01^{B}	11.42 ± 0.005^{G}
	25°C	11.88 ± 0.01^{B}	11.42 ± 0.005^{G}
الشهر الثالث	4°C	11.73 ± 0.015^{C}	11.21 ± 0.01^{H}
	25°C	11.62 ± 0.01^{EF}	11.18 ± 0.005^{I}
% TA			
بداية التخزين		0.27 ± 0.005^{K}	0.22 ± 0.005^{L}
الشهر الأول	4°C	0.40 ± 0.005^{HI}	0.34 ± 0.01^{J}
	25°C	0.47 ± 0.01^{G}	0.38 ± 0.005^{I}
الشهر الثاني	4°C	0.61 ± 0.005^{D}	0.42 ± 0.01^{H}
	25°C	0.66 ± 0.005^{BC}	0.51 ± 0.01^{F}
الشهر الثالث	4°C	0.68 ± 0.005^{B}	0.55 ± 0.005^{E}

	25°C	0.77 ± 0.01^{A}	0.64 ± 0.005^{C}
pH		3.63 ± 0.01^{B}	3.68 ± 0.005^{A}
الشهر الأول	4°C	3.63 ± 0.01^{B}	3.68 ± 0.005^{A}
	25°C	3.61 ± 0.005^{BC}	3.60 ± 0.005^{C}
الشهر الثاني	4°C	3.54 ± 0.005^{E}	3.57 ± 0.005^{D}
	25°C	3.50 ± 0.005^{F}	3.48 ± 0.005^{FG}
الشهر الثالث	4°C	3.48 ± 0.005^{G}	3.39 ± 0.005^{I}
	25°C	3.42 ± 0.005^{H}	3.34 ± 0.005^{J}
TPC (mg GA \ L)			
بداية التخزين		251.00 ± 8.00^{CD}	239.67 ± 8.50^{D}
الشهر الأول	4°C	272.00 ± 7.55^{B}	276.67 ± 6.11^{AB}
	25°C	260.00 ± 5.00^{BC}	268.33 ± 4.04^{BC}
الشهر الثاني	4°C	279.33 ± 6.66^{AB}	295.67 ± 5.13^{A}
	25°C	234.33 ± 6.03^{D}	275.67 ± 4.51^{B}
الشهر الثالث	4°C	86.33 ± 7.09^{G}	115.67 ± 7.37^{EF}
	25°C	96.67 ± 6.11^{FG}	120.67 ± 7.23^{E}

حسبت النتائج كمتوسط حسابي ± الانحراف المعياري (n=3)، القيم التي لا تتشارك بنفس الحرف في الصف الواحد تدل على وجود فرق معنوي مهم إحصائياً($p<0.05$).

بلغت قيمة العكارة في بداية فترة التخزين لكل من عصير AJ_T و AJ_C 5.45 و 4.61 NTU على الترتيب، حيث تبين أن البنتونيت والجيلاتين والسيليكا أقل فعالية من الكيتوزان في تخفيض عكارة عصير التفاح رغم أنها من المواد الشائعة في ترويق العصائر، كما لوحظ زيادة تدريجية في العكارة لكل من عصير AJ_T و AJ_C خلال التخزين وخاصة عصير التفاح المخزن عند 25°C حيث لوحظت وجود فروق معنوية في عكارة عصير التفاح تبعاً لفترات التخزين ($p<0.05$) وتراوحت قيمة العكارة من 5.45 إلى 9.27 NTU

لعصير AJ_T، ومن 4.61 إلى 9.22 NTU لعصير AJ_C، أما خلال فترة التخزين على 4°C تراوحت قيمة العكارة من 6.08 إلى 7.64 NTU لعصير AJ_T، ومن 6.92 إلى 6.76 NTU لعصير AJ_C ، وعند نهاية التخزين على 25°C نلاحظ عدم وجود فرق معنوي في قيمة العكارة حيث بلغت 9.27 و 9.22 NTU لكل من نوعي العصير المروق على الترتيب ($p>0.05$)، وتتفق هذه النتائج مع [15] حيث تبين بأن عكارة عصير التفاح المروق بالكيتوزان الفطري (0.7 g / L) بلغت 2.708 NTU كما وجد انخفاض في العكارة عند معالجة عصير التفاح باستخدام كل من الكيتوزان الفطري وكيتوزان الروبيان (0.1-0.7g/L)، كما تتفق هذه النتائج مع [29] حيث تبين أن البنتونيت أو الجيلاتين المستخدم عادة كمادة مخثرة كان أقل فعالية بكثير من الكيتوزان أثناء الترويق، ويمكن للكيتوزان أن يخثر المركبات الأنيونية مثل البكتين والبروتين حيث تقل عكارة العصير بعد فصل هذه الجزيئات المعلقة [30].

بالنسبة لتغير لون العصير نلاحظ من الجدول (2) أن قيمة T_{440}% في بداية التخزين لكل من عصير AJ_T و AJ_C كانت 81.62 و87.74 ($p<0.05$) على الترتيب، ومع زيادة فترة التخزين ودرجة حرارة التخزين نلاحظ انخفاض قيمة T440%، وكانت هناك فروق معنوية في قيم T440% لكلا نوعي العصير تبعاً لفترات التخزين ($p<0.05$)، حيث تراوحت بين 73.42 (الشهر الأول) و62.72 (الشهر الثالث) لعصير AJ_T، وبين 80.81 (الشهر الأول) و73.57(الشهر الثالث) لعصير AJ_C عند 4°C ، كما انخفضت قيمة T_{440}% لكلا نوعي العصير المخزن عند 25°C بشكل أكبر مقارنة بالعينات المخزنة عند 4°C. ويمكن تفسير انخفاض النفاذية خلال التخزين بتشكل العكارة الثانوية التي تنتج غالباً من أكسدة المركبات الفينولية أو وجود بقايا من البكتينات والبروتينات وتشكل رواسب في قعر عبوة العصير.

نلاحظ من الجدول (2) أن قيمة TSS في بداية التخزين لكل من عصير AJ_T و AJ_C كانت 11.97 و 11.68 °Brix ($p<0.05$) على الترتيب، ووجد انخفاض تدريجي لإجمالي محتوى المواد الصلبة الذائبة لكلا نوعي العصير أثناء التخزين، ولوحظ أن إجمالي محتوى المواد الصلبة الذائبة في عصير AJ_T انخفض بعد شهرين من التخزين وقد يكون هذا الانخفاض بسبب تجمع بعض المكونات الذائبة في نهاية فترة التخزين وترسبها، وهذا يتفق مع [30].

كما هو موضح في الجدول (2) فإن الحموضة القابلة للمعايرة في عصير التفاح المروق بالكيتوزان أقل منها في الطريقة التقليدية للترويق عند بداية التخزين ($p < 0.05$) وقد يعزى ذلك لقدرة الكيتوزان على الارتباط بالمركبات سالبة الشحنة مثل الحموض العضوية ومتعددة الفينولات وترسيبها، بينما يرسب البنتونيت البروتينات بشكل رئيسي ويعمل الجيلاتين على ترسيب التانينات ومتعددة الفينولات، ولوحظ وجود زيادة تدريجية في الحموضة القابلة للمعايرة في كلا نوعي العصير تبعاً لفترة التخزين، وفي نهاية فترة التخزين كانت قيمة للحموضة القابلة للمعايرة في عصير AJ_C المخزن عند 25°C تساوي 0.64 بينما كانت قيمتها لعصير AJ_T هي 0.77، ويعزى ذلك لقدرة الكيتوزان الأكبر على إزالة المركبات التفاعلية وامتلاكه تأثيراً مثبطاً للنمو الميكروبيولوجي.

بالنسبة لتغير قيمة pH نلاحظ من الجدول (2) أن هناك فرق معنوي ($p<0.05$) في قيمة pH بعد الترويق، فقد كانت 3.63 و 3.68 على الترتيب لكل من عصير AJ_T و AJ_C في بداية فترة التخزين، وبدأت قيمته بالانخفاض عند الشهر الثاني من التخزين وتابعت حتى نهاية فترة التخزين، حيث بلغت قيمته 3.42 و 3.34 على الترتيب لكلا نوعي العصير في نهاية فترة التخزين عند 25°C.

قبل التخزين كان إجمالي محتوى الفينولات لكل من عصير AJ_T و AJ_C هو 251 و239 (mg GA \ L) على الترتيب ($p > 0.05$)، وأظهرت النتائج (الجدول 2) أن إجمالي محتوى الفينولات لكل من عصير AJ_T و AJ_C ازداد بسرعة في نهاية الشهر الثاني من التخزين، وكانت هناك فروق معنوية لكلا النوعين في إجمالي محتوى الفينولات بين درجات حرارة التخزين في نفس شهر التخزين (قيمة $p < 0.05$)، وكان إجمالي محتوى الفينولات في عصير AJ_C أعلى منه في AJ_T حيث بلغ 120.67 و 96.67 (mg GA \ L) على الترتيب عند نهاية فترة التخزين، ومن المعروف أن المركبات الفينولية تنخفض أثناء التخزين بسبب تفاعلات مثل الأكسدة والبلمرة وهذا يفسر ارتفاع قيمة العكارة خلال التخزين [31].

4-3-التحليل الميكروبيولوجي لعصير التفاح خلال التخزين

تم بسترة العصير الناتج (90-85° C لمدة 1 دقيقة)، ويبين الجدول (3) نتائج التعداد العام للبكتريا لعصير التفاح خلال التخزين لمدة ثلاثة أشهر، كما يبين الجدول (4) نتائج التعداد العام للخمائر والفطور لعصير التفاح خلال التخزين لمدة ثلاثة أشهر، حيث نلاحظ انخفاض التعداد العام للبكتريا والخمائر والفطور في عصير التفاح بعد الترويق وبالأخص في عينات العصير المروق بالكيتوزان مقارنة بالعصير الخام، كما يلاحظ تأثير درجة حرارة التخزين في التعداد العام للأحياء الدقيقة وهذا يبين أهمية التخزين المبرد في تحسين جودة العصائر، قد يعود نمط تثبيط الكيتوزان لنمو البكتيريا والفطور إلى تفاعله مع الأغشية أو مكونات جدار الخلية، ويعتقد أن آلية تثبيط نمو البكتيريا تتمثل في أن مجموعة الأمين الموجبة الشحنة تتحد مع مكونات أنيونية مثل حمض N–أسيتيل موراميك (N acetylmuramic acid) وحمض السياليك (sialic acid) وحمض النيورامينيك (neuraminic acid) على سطح الخلية، وقد تثبط نمو البكتيريا عن طريق إعاقة التبادل

مع الوسط وربط أيونات الوسط الانتقالي وتثبيط الإنزيمات وذلك بسبب الشحنة الموجبة مما يؤدي إلى زيادة نفاذية الأغشية وتسرب مواد الخلية من الأنسجة، أو بسبب قدرة الكيتوزان على ربط الماء وتثبيط العديد من الأنزيمات وفق [37].

الجدول (3) نتائج التعداد العام للبكتريا لعصير التفاح خلال التخزين لمدة ثلاثة أشهر

التعداد العام للبكتريا(CFU/ml)	درجة حرارة التخزين	عصير خام	AJ_T	AJ_C
بداية التخزين		1.0×10^2	3.0×10^1	1.7×10^1
الشهر الأول	4°C	1.2×10^2	6.0×10^1	4.0×10^1
	25°C	4.0×10^2	2.0×10^2	9.2×10^1
الشهر الثاني	4°C	1.6×10^2	6.2×10^1	7.0×10^1
	25°C	1.4×10^3	5.0×10^2	1.8×10^2
الشهر الثالث	4°C	2.1×10^2	9.0×10^1	1.7×10^2
	25°C	3.5×10^3	1.5×10^3	4.3×10^2

الجدول (4) نتائج التعداد العام للخمائر والفطور لعصير التفاح خلال التخزين لمدة ثلاثة أشهر

التعداد العام للخمائر والفطور(CFU/ml)	درجة حرارة التخزين	عصير خام	AJ_T	AJ_C
بداية التخزين		1.8×10^2	8.0×10^1	3.7×10^1
الشهر الأول	4°C	2.1×10^2	1.0×10^2	6.0×10^1
	25°C	1.0×10^3	4.0×10^2	1.9×10^2
الشهر الثاني	4°C	2.5×10^2	1.4×10^2	6.5×10^1

	25°C	2.7×10^3	1.6×10^2	5.0×10^2
الشهر الثالث	4°C	3.4×10^2	1.9×10^2	8.8×10^1
	25°C	5.8×10^3	3.7×10^3	1.3×10^3

4-4 -التقييم الحسي لعصير التفاح بعد التخزين

يبين الجدول (5) نتائج التقييم الحسي لعصير التفاح بعد التخزين لمدة ثلاثة أشهر، تمثل البيانات متوسط الدرجات التي سجلت من قبل 5 أشخاص للعينة الواحدة لكل من اللون والطعم والرائحة والقبول العام على مقياس من 9 نقاط، وأظهرت هذه البيانات تحسن لون عصير التفاح بعد عملية الترويق(بداية التخزين) لكلا النوعين (AJ_T , AJ_C) مقارنة مع العصير الخام وهذا مؤشر لأهمية عملية الترويق في تحسين لون العصير، وبعد التخزين لمدة ثلاثة أشهر انخفض مؤشر اللون بشكل أكبر عند درجة حرارة C°25 مقارنة بالتخزين عند C°4 وهذا يظهر أهمية عملية التبريد في تحسين جودة العصير المخزن، بالنسبة للطعم والرائحة والقبول العام لم يكن هناك فرق معنوي ($p<0.05$) في المؤشرات الثلاثة بعد عملية الترويق، لكنها انخفضت بشكل ملحوظ في نهاية التخزين عند C°25 مقارنة بالتخزين عند الدرجة C°4، عموماً يلاحظ تحسن بسيط في الخصائص الحسية لعصير التفاح المروق باستخدام الكيتوزان مقارنة بالطريقة التقليدية، وتتفق هذه النتائج مع دراسة [29] ومع دراسة [33] حيث أشارتا إلى تحسن في القبول العام واللون عند معالجة عصير التفاح بالكيتوزان.

جدول (5) التقييم الحسي لعصير التفاح بعد التخزين لمدة ثلاثة أشهر

نوع العصير	اللون	الطعم	الرائحة	القبول العام

عصير خام (غير مروق)		3.4±1.34 BC	7.8±1.09 A	6.4±1.34 A	6.4±1.34 AB
بداية التخزين	AJ_T	7.8±1.09 A	7.8±1.09 A	7.0±0.00 A	7.4±0.89 A
	AJ_C	7.4±0.89 A	7.4±0.89 A	7.4±0.89 A	7.8±1.09 A
نهاية التخزين عند 4°C	AJ_T	5.2±1.64 AB	6.4±1.34 AB	5.2±1.64 ABC	5.8±1.64 ABC
	AJ_C	5.8±1.64 AB	5.8±1.64 ABC	5.8±1.64 AB	7.0±0.00 A
نهاية التخزين عند 25°C	AJ_T	2.2±1.64 BC	4.6±1.34 BC	3.4±1.34 C	4.0±0.00 C
	AJ_C	3.4±1.34 C	4.0±0.00 C	4.0±0.00 BC	4.6±1.34 BC

حسبت النتائج كمتوسط حسابي ± الانحراف المعياري (n=5)، القيم التي لا تتشارك بنفس الحرف في العمود الواحد تدل على وجود فرق معنوي مهم إحصائياً($p<0.05$).

5. الاستنتاجات والتوصيات

1- أدى استخدام الكيتوزان في عملية ترويق عصير التفاح وفق الشروط المثلى المستخلصة من منهجية سطح الاستجابة (تركيز الكيتوزان 186.97mg/100ml ودرجة حرارة الترويق 40°C وزمن الترويق 150 min) لزيادة استقرار الخصائص الفيزيائية والكيميائية والحسية لعصير التفاح خلال التخزين مقارنة مع الطريقة التقليدية.

2- إن طريقة الترويق باستخدام الكيتوزان مناسبة وسهلة التطبيق ووقت إنجاز العملية قصير مقارنةً بالطريقة التقليدية وهذا يتوافق مع متطلبات تصنيع عصائر الفاكهة.

3- حافظ العصير المروق باستخدام الكيتوزان على كمية أكبر من المركبات الفينولية في نهاية فترة التخزين مقارنة بالطريقة التقليدية، وهذا يحسن من القيمة الغذائية وجودة العصير المخزن.

4- تكمن أهمية تحديد الشروط المثلى لاستخدام الكيتوزان في ترويق عصير التفاح بأنه لا يوجد تركيز أمثل يمكن تطبيقه في صناعة عصير التفاح بشكل خاص والعصائر بشكل عام فقد يختلف التركيز حسب نوع التفاح وصنفه والعوامل البيئية المؤثرة.

إن التكلفة العالية للكيتوزان تعد من العيوب المهمة مقارنةً بعوامل الترويق التقليدية إلا أننا نتوقع أن إمكانية استخدام الكيتوزان في صناعة عصائر الفاكهة ستزداد مع تحسين طرق إنتاجه بتكلفة أرخص مع تطور التكنولوجيا. نوصي بتوسيع دراسات استخدام الكيتوزان في عمليات ترويق عصائر الفاكهة الأخرى مع إمكانية دمجه مع مواد أخرى أو مع عمليات الترشيح الدقيق والفائق لتحسين شروط العملية وتقليل الوقت والتكلفة الاقتصادية.

المراجع:

1. Vallée Marcotte, B., Verheyde, M., Pomerleau, S.,Doyen, A., & Couillard, C. (2022). Health benefits of apple juice consumption: A review of interventional trials on humans. Nutrients, 14(4), 821.
2. Tsoupras, A., Gkika, D. A., Markopoulos, T., Curran, R., Scallon, C., Karali, M., & Kyzas, G. Z. (2024). Apple products (apple juice and cider) and by-products (apple pomace): Bioactive compounds and biological properties. In J.-M. Mérillon, C. Rivière, & G. Lefèvre (Eds.), Natural products in beverages: Botany, phytochemistry, pharmacology and processing (pp. 1–42). Springer.

3. Benítez, E. I., & Lozano, J. E. (2007). Effect of gelatin on apple juice turbidity. Latin American Applied Research, 37(4), 261–266.
4. Sharma, H. P., Patel, H., & Sugandha. (2017). Enzymatic added extraction and clarification of fruit juices—A review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 57(6), 1215–1227.
5. Oszmiański, J., & Wojdyło, A. (2007). Effects of various clarification treatments on phenolic compounds and color of apple juice. European Food Research and Technology, 224, 755–762.
6. Sarbatly, R., Sariau, J., & Krishnaiah, D. (2023). Recent developments of membrane technology in the clarification and concentration of fruit juices. Food Engineering Reviews, 15, 420–437.
7. Wongmaneepratip, W., Tongkhao, K., & Vangnai, K. (2023). Effect of clarifying agent type and dose on the reduction of pyrethroid residues in apple juice. Food Control, 153, 109909.
8. Candrawinata, V., Blades, B. L., Golding, J. B., Stathopoulos, C. E., & Roach, P. D. (2012). Effect of clarification on the polyphenolic compound content and antioxidant activity of commercial apple juices. International Food Research Journal, 19, 1055–1061.
9. Prigent, S. V. E., Voragen, A. G. J., van Koningsveld, G. A., Baron, A., & Renard, C. M. G. C. (2009). Interactions between globular proteins and procyanidins of different degrees of polymerization. Journal of Dairy Science, 92(12), 5843–5853.
10. Frazier, R. A., Deaville, E. R., Green, R. J., Stringano, E., Willoughby, I., & Mueller-Harvey, I. (2010). Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 51(2), 490–495.

11. Mirzaaghaei, M., Goli, S. A. H., & Fathi, M. (2017). Clarification of apple juice using activated sepiolite as a new fining clay. Clay Minerals, 52(4), 497–508.
12. Shirvani, A., Mirzaaghaei, M., & Goli, S. A. H. (2023). Application of natural fining agents to clarify fruit juices. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 22(4), 4190–4216.
13. Philibert, T., Lee, B. H., & Fabien, N. (2017). Current status and new perspectives on chitin and chitosan as functional biopolymers. Applied Biochemistry and Biotechnology, 181(4), 1314–1337.
14. Agulló, E., Rodríguez, M. S., Ramos, V., & Albertengo, L. (2003). Present and future role of chitin and chitosan in food. Macromolecular Bioscience, 3(10), 521–530.
15. Rungsardthong, V., Wongvuttanakul, N., Kongpien, N., & Chotiwaranon, P. (2006). Application of fungal chitosan for clarification of apple juice. Process Biochemistry, 41(3), 589–593.
16. Abdelmalek, B. E., Sila, A., Haddar, A., Bougatef, A., & Ayadi, M. A. (2017). B-Chitin and chitosan from squid gladius: Biological activities of chitosan and its application as clarifying agent for apple juice. International Journal of Biological Macromolecules, 104, 953–962.
17. Belghheisi, S., & Esmaeilzadeh Kenari, R. (2019). Improving the qualitative indicators of apple juice by chitosan and ultrasound. Food Science & Nutrition, 7(4), 1214–1221.
18. Gökmen, V., Acar, J., & Kahraman, N. (2003). Influence of conventional clarification and ultrafiltration on the phenolic composition of Golden Delicious apple juice. Journal of Food Quality, 26(4), 257–266.
19. Koyuncu, H., Kul, A. R., Calimli, A., Yıldız, N., & Ceylan, H. (2007). Adsorption of dark compounds with bentonites in

apple juice. LWT – Food Science and Technology, 40(3), 489–497.

20. Mirzaaghaei, M., Goli, S. A. H., & Fathi, M. (2016). Application of sepiolite in clarification of pomegranate juice: Changes in quality characteristics during processing. International Journal of Food Science & Technology, 51(7), 1666–1673.
21. Türkyılmaz, M., Yemiş, O., & Özkan, M. (2012). Clarification and pasteurisation effects on monomeric anthocyanins and percent polymeric colour of black carrot juice. Food Chemistry, 134(2), 1052–1058.
22. AOAC International. (2000). Official method 942.15: Acidity (titratable) of fruit products. AOAC International.
23. AOAC International. (2006). Official method 932.14: Solids in syrups. In Official methods of analysis (18th ed.). AOAC International.
24. Çoklar, H., & Akbulut, M. (2010). Effect on phenolics, HMF and some physicochemical properties of apple juice concentrate of activated carbon applied at different temperatures. Journal of Food Process Engineering, 33(2), 370–383.
25. Eyiz, V., Tontul, I., & Türker, S. (2020). Optimization of green extraction of phytochemicals from red grape pomace by homogenizer-assisted extraction. Journal of Food Measurement and Characterization, 14, 39–47.
26. Taştan, Ö., & Baysal, T. (2017). Chitosan as a novel clarifying agent in clear apple juice production: Optimization of process conditions and changes in quality characteristics. Food Chemistry, 237, 818–824.
27. Rizzo, L., Di Gennaro, A., Gallo, M., & Belgiorno, V. (2008). Coagulation/chlorination of surface water: A comparison between chitosan and metal salts. Separation and Purification Technology, 62(1), 79–85.

28. Rao, L., Hayat, K., Lv, Y., Karangwa, E., Xia, S., Zhong, F., & Zhang, X. (2011). Effect of ultrafiltration and fining adsorbents on the clarification of green tea. Journal of Food Engineering, 102(4), 321–326.
29. Chatterjee, S., Chatterjee, S., Chatterjee, B. P., & Guha, A. K. (2004). Clarification of fruit juice with chitosan. Process Biochemistry, 39(12), 2229–2232.
30. Taştan, Ö., & Baysal, T. (2015). Clarification of pomegranate juice with chitosan: Changes in quality characteristics during storage. Food Chemistry, 180, 211–218.
31. Garcia-Hernandez, C., Salvo-Comino, C., Martin-Pedrosa, F., Garcia-Cabezon, C., & Rodriguez-Mendez, M. L. (2020). Analysis of red wines using an electronic tongue and infrared spectroscopy: Correlations with phenolic content and color parameters. LWT – Food Science and Technology, 118, 108785.
32. Abd, A. J., & Niamah, A. K. (2012). Effect of chitosan on apple juice quality. International Journal of Agriculture and Food Science, 2(4), 153–157.
33. International Organization for Standardization. (2017).Microbiology of the food chain Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions (ISO 6887-1:2017). Geneva, Switzerland: ISO.
34. International Organization for Standardization. (2013). Microbiology of the food chain Horizontal method for the enumeration of microorganisms Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique (ISO 4833-1:2013). Geneva, Switzerland: ISO.
35. International Organization for Standardization. (1987). Microbiology General guidance for enumeration of yeasts and

moulds Colony count technique at 25 °C (ISO 7954:1987). Geneva, Switzerland: ISO.

36. Larmond, E. (1977). Laboratory methods for sensory evaluation of foods. Ottawa, Canada: Agriculture Canada, Research Branch.
37. Limam, Z.; Selmi,S.;Sadok,S. and Elabed ,A.(2011). Extraction and characterization of chitin and chitosan from crustacean by-products: biological and physicochemical properties .African J. of Biotechnology, 10(4):640-647.