

# Utjecaj različitih postupaka obrade i konzerviranja na održivost soka od krušaka

---

**Bjelobrk, Ivona**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:734125>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#) / [Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-05**

REPOZITORIJ

**PTF**

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

**dabar**  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

**Ivona Bjelobrk**

**UTJECAJ RAZLIČITIH POSTUPAKA OBRADE I  
KONZERVIRANJA NA ODRŽIVOST SOKA OD KRUŠAKA**

**DIPLOMSKI RAD**

Osijek, rujan, 2024.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Sveučilišni diplomski studij Prehrambeno inženjerstvo

Zavod za ispitivanje hrane i prehrane/Zavod za prehrambene tehnologije  
Katedra za biologiju i mikrobiologiju/Katedra za tehnologiju voća i povrća  
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Tema rada** je prihvaćena na IX. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 28. lipnja, 2024.  
**Mentor:** prof. dr. sc. Hrvoje Pavlović  
**Pomoć pri izradi:** prof. dr. sc. Nela Nedić Tiban

**Utjecaj različitih postupaka obrade i konzerviranja na održivost soka od krušaka**  
Ivona Bjelobrk, 0149220439

### Sažetak:

Cilj rada bio je istražiti i usporediti kvalitativna svojstva tradicionalne sorte kruške Miholjače i komercijalne sorte kruške Viljamovka. Uz fizikalno-kemijske parametre i mikrobiološku stabilnost, zadatak je bio i primijeniti i usporediti konvencionalnu metodu – pasterizaciju s odabranim tehnikama minimalnog procesiranja: mikrovalovima, ultrazvukom i kombinacijom mikrovalova i ultrazvuka. Plodovi Miholjače su manje prosječne mase s većim udjelom suhe i topljive tvari, ukupnih kiselina, pektina, fenola te ukupnih i reducirajućih šećera za razliku od plodova Viljamovke koji su veće prosječne mase i niže pH vrijednosti. Pasterizacijom, mikrovalovima, ultrazvukom i kombinacijom mikrovalova i ultrazvuka povećava se udio polifenola u kašastom soku Miholjače što nije primijećeno u soku Viljamovke. Pasterizacija se pokazala najučinkovitijim tretmanom soka Miholjače uz potpunu redukciju broja mikroorganizama i u 40tom danu skladištenja pri 4°C. Za kašasti sok Viljamovke, preporučeni tretmani su pasterizacija i primjena mikrovalova bez kvarenja do 40tog dana čuvanja. Kombinacijom mikrovalova i ultrazvuka oba soka kruške su mikrobiološki stabilni do 8. dana čuvanja. Primjena ultrazvuka je uzrokovala smanjenje aerobnih bakterija za 10 puta, ali nije bila učinkovita na kvasce i plijesni. Patogeni mikroorganizmi i indikatori fekalne kontaminacije nisu ustanovljeni u analiziranim uzorcima.

**Ključne riječi:** sok od kruške, pasterizacija, minimalno procesiranje, mikrobiološka stabilnost

**Rad sadrži:** 51 stranica  
10 slika  
10 tablica  
0 priloga  
44 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** Hrvatski

### Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

1. prof. dr. sc. Mirela Kopjar	predsjednik
2. prof. dr. sc. Hrvoje Pavlović	član-mentor
3. prof. dr. sc. Nela Nedić Tiban	član-komentor
4. prof. dr. sc. Anita Pichler	zamjena člana

**Datum obrane:** 30. rujna, 2024.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku, pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek  
Faculty of Food Technology Osijek  
University Graduate Study Food Engineering

Department of Department of Food and Nutrition Research/Department of Food Technologies  
Subdepartment of Biology and Microbiology/Subdepartment of Fruits and Vegetables Technology  
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. IX held on June 28, 2024.

**Mentor:** Hrvoje Pavlović, PhD, prof.

**Technical assistance:** Nela Nedić Tiban, PhD, prof.

**The Impact of Different Processing and Preservation Methods on the Shelf-Life Extension of Pear Juice**  
Ivona Bjelobrk, 0149220439

### Summary:

The aim of the work was to investigate and compare the qualitative properties of the traditional pear variety Miholjača and the commercial pear variety Viljamovka. In addition to physico-chemical parameters and microbiological stability, the aim was to apply and compare a conventional method - pasteurization - with selected minimal processing techniques: microwaves, ultrasound and a combination of microwaves and ultrasound. The Miholjača fruits have a lower average mass with a higher proportion of dry matter and soluble matter, total acids, pectin, phenols, total and reducing sugars, in contrast to the Vilyamovka fruits, which have a higher average mass and lower pH values. Pasteurization, microwaves, ultrasound and a combination of microwaves and ultrasound increase the content of polyphenols in the juice from Miholjača, which was not observed in the juice from Viljamovka. Pasteurization proved to be the most effective treatment of Miholjača juice with a complete reduction in the number of microorganisms even on the 40th day of storage at 4°C. For the Viljamovka juice, the recommended treatments are pasteurization and the use of microwaves, which were effective until the 40th day of storage at 4°C. The combination of microwaves and ultrasound made both pear juices microbiologically stable until the 8th day. The use of ultrasound resulted in a 10-fold reduction of aerobic bacteria, but was not effective against yeasts and molds. Pathogenic microorganisms and indicators of fecal contamination were not found in the samples examined.

**Keywords:** pear juice, pasteurization, minimal processing, microbiological stability

**Thesis contains:** 51 pages  
10 figures  
10 tables  
0 supplements  
44 references

**Original in:** Croatian

### Defense committee:

- |                                 |               |
|---------------------------------|---------------|
| 1. Mirela Kopjar, PhD, prof.    | chair person  |
| 2. Hrvoje Pavlović, PhD, prof.  | supervisor    |
| 3. Nela Nedić Tiban, PhD, prof. | co-supervisor |
| 4. Anita Pichler, PhD, prof.    | stand-in      |

**Defense date:** September, 30, 2024

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

**DIPLOMSKI RAD JAVNO JE OBRANJEN DANA**

30. rujne 2024.

**TE OCIJENJEN USPJEHOM**

izostau (5)

**Pred Povjerenstvom za obranu diplomskog rada:**

1. prof. dr. sc. Mirela Kopjar

predsjednik

Mirela Kopjar  
(potpis)

2. prof. dr. sc. Hrvoje Pavlović

član

Hrvoje Pavlović  
(potpis)

3. prof. dr. sc. Nela Nedić Tiban

član

Nela Nedić Tiban  
(potpis)

*Ogromnu zahvalnost dugujem svojim roditeljima i zaručniku koji su bili uz mene na ovom putu.*

# Sadržaj

## Sadržaj

<b>DIPLOMSKI RAD JAVNO JE OBRANJEN DANA .....</b>	<b>IV</b>
<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Mikrobiološka populacija krušaka i soka od krušaka .....</b>	<b>4</b>
2.1.1. Sok od kruške .....	4
2.1.2. Kruške .....	7
<b>2.2. Proizvodnja soka .....</b>	<b>9</b>
2.2.1. Postupci za osiguranje kvalitete krušaka .....	11
2.2.2. Skladištenje ploda.....	12
2.2.3. Pranje voća .....	13
2.2.4. Proizvodnja voćne kaše i završna priprema soka .....	14
<b>2.3. Konzerviranje soka.....</b>	<b>16</b>
2.3.1. Termički tretmani .....	16
2.3.2. Ne-termičke metode konzerviranja.....	21
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1. Zadatak rada.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2. Materijali.....</b>	<b>27</b>
3.2.1. Priprema kaše za fizikalno-kemijske analize .....	28
3.2.2. Priprema soka .....	28
<b>3.3. Metode .....</b>	<b>28</b>
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>35</b>
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>45</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>47</b>

## Popis oznaka, kratica i simbola

1-MCP	1-metilciklopropan
ACC	1-amilociklopropan-1-karboksilna kiselina
AMB	aerobne, mezofilne bakterije
BP	Bioyield point / maksimalna sila penetracije
CA	Controlled atmosphere / kontrolirana atmosfera
CFU	colony forming units / broj živih stanica
CO <sub>2</sub>	ugljičkov dioksid
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
DPP	dobra proizvođačka praksa / dobra poljoprivredna praksa
D <sub>T</sub>	vrijeme decimalne redukcije
E	enterobakterije
FDA	Food and Drug Administration/Uprava za hranu i lijekove
FF	Flesh firmness / čvrstoća mezokarpa
HACCP	Hazard Analysis Critical Control Point
HHP	High hydrostatic pressure/visoki hidrostatski tlak
HTLT	High temperature long time
HTST	High temperature short time
k <sub>T</sub>	konstanta mikrobiološke inaktivacije
MTLT	Mild temperature long time
MTST	Mild temperature short time
NHS	National Health Service
PE	pektinesteraza
PEF	Pulsed electric field/pulsirajuće električno polje



PDA	krumpirov glukozni agar
PG	poligalakturonaza
POD	peroksidaza
PPO	polifenoloksidaza
RH	relativna vlažnost
SPS	Sulphite Polymyxin Sulfadiazine
SRK	sulfitoreducirajuće klostridije
SSOP	Sanitation Standard Operating Procedures
TDP	Thermal death point
TGK	Triptički agar s glukozom i ekstraktom kvasca
TNTC	too numerous to count / prevelik broj za prebrojavanje
TST	topljiva suha tvat
UV	ultra-violet/ultra-ljubičasto
VRBGA	žučni glukozni agar
XLD	ksiloza lizin deoksikolatni agar
z	termalni koeficijent

## **1. UVOD**

Postoje dokazi kako prehrana obogaćena voćem i povrćem može smanjiti mogućnost nastanka kroničnih bolesti. Također, dokazano je kako s povećanom konzumacijom voća i povrća postoji manji rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti i moždanog udara (Southon i Faulks, 2002). Kruške (*Pyrus communis* L.) su izvor prehrambenih vlakana te sadržavaju mnoge fitonutrijente poput flavonoida, uključujući katehine i kvercetine kao i cimetnu kiselinu. Dokazano je kako prehrambena vlakna iz kruške posjeduju mogućnost vezanja sa žučnim kiselinama u crijevima čime smanjuju njihovu koncentraciju i tako smanjuju sintezu kolesterola. Vlakna vežu posebnu vrstu žučnih kiselina, točnije, sekundarne žučne kiseline, koje u crijevima mogu povećati rizik od kolorektalnog karcinoma ukoliko su prisutne u previsokoj koncentraciji. Vežući te sekundarne žučne kiseline, vlakna iz kruške mogu smanjiti njihovu koncentraciju i samim time smanjiti i rizik od karcinoma (Mateljan, 2015). Zahvaljujući visokom udjelu prehrambenih vlakana i ugodnom okusu te nutritivnoj vrijednosti, kruške se, osim za sokove, često koriste i kao sastojci hrane za djecu i u sokovima koji sadržavaju više od jedne vrste voća i povrća (Saeeduddin i sur., 2015). Kako sezona krušaka ovisi o sorti same kruške, uz pravilno skladištenje, često ih možemo pronaći na tržištu kroz cijelu godinu, međutim, vrhunac sezone krušaka je u razdoblju od kolovoza do listopada (Mateljan, 2015). Dokazano je kako prvi plodovi na drvetu kruške dolaze nakon četvrte godine od sadnje (Klamer de Almeida, Fioravanço i Bettio Marodin, 2019). Konzumacija soka seže još od Egipćana i antičkih Grka, međutim sama riječ „sok“ koja je označavala „vodeni dio voća“ se prvi puta spominje u 14. stoljeću (Rajauria i Tiwari, 2018). Danas, Codex Alimentarius (2022) voćni sok definira: „voćni sok je nefermentirana, ali fermentirajuća tekućina dobivena iz jestivog dijela zdravog, zrelog i svježeg voća ili voća koje se skladišti u dobrom stanju sa prikladnim sredstvima uključujući tretmane nakon branja koji se primjenjuju u skladu s primjenjivim odredbama Komisije za Codex Alimentarius“. Općenito, možemo reći kako je sok zapravo ekstrakt ili ekstrahirajuća tekućina stanica ili tkiva dobivena mehaničkim cijedenjem ili prešanjem iz zrelih plodova voća bez upotrebe drugih otapala i bez primjene topline (Rajauria i Tiwari, 2018). Osim što su prirodni sokovi zdravi i nutritivno bogati, predstavljaju vrlo elegantno rješenje kada su potrošači u potrazi za brzim međuobrokom. Prema preporukama NHS-a (National Health Service), osoba bi trebala dnevno unijeti 5 porcija voća i povrća, pri čemu 150 mL nezaslađenog, 100% prirodnog soka od voća ili povrća predstavlja jednu porciju (Rajauria i Tiwari, 2018).

Zadatak ovog diplomskog rada je pokazati kakva je održivost soka krušaka primjenom različitih termalnih ali i ne-termalnih postupaka konzerviranja.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. Mikrobiološka populacija krušaka i soka od krušaka

### 2.1.1. Sok od kruške

Nepasterizirani, 100% prirodni voćni sokovi postaju sve popularniji na tržištu zbog zahtjeva potrošača za svježom, minimalno procesiranom hranom. Iako se izbjegavanjem pasterizacije očuvaju sve termo-labilne komponente (poput nekih vitamina, boje i minerala), ovako proizvedeni sokovi mogu biti izvor patogenih mikroorganizama i mikroorganizama uzročnika kvarenja (Jackson-Davis i sur. 2018).

pH vrijednosti soka jabuke i soka kruške kreću se između 5,0 i 5,5, unatoč kiselom okruženju, zabilježene su brojne bolesti povezane s nepasteriziranim sokovima što ukazuje na činjenicu kako sama kiselost medija nema zadovoljavajući konzervirajući efekt te su potrebne dodatne metode konzerviranja kako bi se osigurala sigurnost za konzumaciju (Jackson-Davis i sur., 2018).

Voćni sokovi mogu se dobiti jednostavnim cijedenjem (primjerice citrusi) ili se mogu pripremiti dezintegracijom tkiva u pulpu (za, primjerice, jabuke, kruške, jagode). Sokovi mogu biti razbistreni, čime dobivamo bistre sokove, ili mogu imati određenu količinu suspendiranih čestica. Iako većina sokova ima pH vrijednost nižu od 4,6, kiselost ovisi o samoj sirovini pa, ovisno o stanju sirovine, kiselost može značajno varirati od ove vrijednosti (Danyluk, 2012).

Devedesetih godina prošlog stoljeća došlo je do više slučajeva izbijanja bolesti vezanih uz svježe sokove uzrokovanih bakterijama roda *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 i *Cryptosporidium parvum*. Uslijed toga, FDA (Food and Drug Administration) je uvela regulativu koja je zahtijevala proizvodnju svih sokova prema načelima HACCP-a (Hazard Analysis and Critical Control Point) uz primjenu DPP-a (dobra proizvođačka praksa) i SSOP-a (Sanitation Standard Operating Procedures). Ova regulacija nadalje nalaže kako svi voćni sokovi moraju pokazati 5-log smanjenje relevantnog mikroorganizma, koji predstavlja najotporniji mikroorganizam, koji je moguća opasnost za ljudsko zdravlje, a moguće ga je pronaći u soku (Danyluk, 2012).

Osim bakterija, važno je napomenuti kako prisutnost i rast plijesni na samim plodovima voća ili u gotovom proizvodu, odnosno soku, može dovesti do razvoja mikotoksina koji, također, predstavljaju veliku opasnost za potrošače. Patulin je iznimno rašireni mikotoksin

kojega proizvode različite vrste roda *Penicillium*, *Aspergillus* i *Byssoschlamys*. Ovaj mikotoksin se pojavio u različitim vrstama sokova, uključujući komercijalno proizvedeni sok od jabuka (koncentracija: 1 ppm), ali i u soku od grožđa, borovnica i malina (Danyluk, 2012).

Primjena gnojiva životinjskog porijekla također može biti problematična jer je upravo to mogući izvor kontaminacije bakterijom *S. Typhimurium* koja je bila pronađena u soku od jabuke 1974. godine nakon što su jabuke koje su se koristile za dobivanje soka skupljene s tla. Sokovi od citrusa su, također, bili povezani s brojnim izbijanjima bolesti uzrokovanih virusima i bakterijama. Ponekad je uzrok bio i neoprezno rukovanje samom sirovinom gdje je asimptomatski radnik u tvornici bio izvor kontaminacije, a u konačnici i zaraze, soka virusom hepatitisa A. Također, loša sanitacija samog prostora u kojem se prerađuje sok moguć je izvor kontaminacije. Tako je salmonela izolirana iz različitih izvora kao što su neoprane podloge na kojima stoji sama sirovina. Iako je danas rijetkost da su sokovi izvor zaraze, zbog primjene mjera sanitacije, ipak je bilo slučajeva pojave botulizma povezanog sa sokom od rajčice. Prijavljeno je čak četiri slučaja botulizma uzrokovanog upravo tim sokom (1935., 1965., 1969. i 1974. godine). Također, u 2006. godini u SAD-u i Kanadi prijavljeno je 6 slučajeva botulizma povezanog sa sokom od mrkve. Sokovi su bili pasterezirani, ali nisu bili zagrijani na dovoljno visoku temperaturu koja bi uništila spore *Clostridium botulinum* (Danyluk, 2012).

### 2.1.1.1. Mikroorganizmi uzročnici kvarenja

Promjene u izgledu, mirisu ili okusu, koje proizvod čine neprihvatljivim za potrošača, ukazuju na kvarenje proizvoda. Svježi, netretirani sokovi su podložniji kvarenju (Aneja i sur., 2014).

Različiti mikroorganizmi mogu uzrokovati kvarenje soka. Tako kvasci posjeduju sposobnost rasta na podlogama s niskim pH, visokom koncentracijom šećera i niskim aktivitetom vode. Voćni sokovi su naročito bogati jednostavnim ugljikohidratima i izvorima dušikovih spojeva što ih čini idealnom podlogom za rast i razvoj kvasaca. Prisutnost kvasaca u voćnom soku može ukazivati na loše vođenje procesa pasterezacije ili na loše održavanje higijene u pogonu. Kvarenje uzrokovano kvascima primjećuje se pojavom mjehurića ugljikova dioksida (CO<sub>2</sub>) i alkohola. Kvasci, također, proizvode i enzim pektinesterazu koja razgrađuje pektin izazivajući tako kvarenje, pojavu organskih kiselina i acetaldehida u soku dajući mu tako okus na „fermentirano“. *Pichia*, *Candida*, *Saccharomyces* i *Rhodotorula* su najčešći rodovi

kvasaca koji se mogu pronaći u soku i glavni su uzročnici kvarenja soka. Vrste koje sa najčešće pronalaze u voćnim sokovima su: *Pichia membranifaciens*, *Candida maltosa*, *C. sake*, *Saccharomyces bailii*, *S. bisporus*, *S. cerevisiae*, *S. rouxii*, *S. bayanus*, *Brettanomyces intermedius*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulopsis holmii*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Dekkera bruxellensis*, *D. naardenensis*, *Torulospora delbrueckii* i *Zygosaccharomyces microellipsoides*. Neke od ovih vrsta su osjetljive na termičku pasterizaciju koja se primjenjuje za pasteriziranje voćnih sokova. Međutim, postoje i kvasci koji su otporni i na konzervanse kao što su: *Zygosaccharomyces bailii*, *Candida krusei*, *Saccharomyces bisporus*, *Schizosaccharomyces pombe* i *Pichia membranifaciens*. Njihova otpornost pripisuje se enzimu fosfofruktokinazi (Aneja i sur., 2014).

Plijesni, također, mogu rasti pri niskom pH i u visokoj koncentraciji šećera što ih čini čestim uzročnicima kvarenja voćnih sokova. Plijesni mogu biti termo-labilne i termo-rezistentne. Dominantne plijesni koje se mogu pronaći u voćnim sokovima, su: *Penicillium* sp, *Cladosporium* sp., *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *Botrytis* sp. i *Aureobasidium pullulans*. *Rhizopus* i *Mucor* su također povezani s kvarenjem voćnih sokova. Neke plijesni mogu proizvesti mikotoksine što ih čini izrazito opasnim za ljudsko zdravlje. Neki od mikotoksina koji su povezani s voćnim sokovima su: bisoklaminska kiselina (*Byssochlamys fulva*, *B. nivea*), patulin (*B. fulva*, *B. nivea*, *P. expansum*) i citrinin (*P. expansum*, *P. citrinum*) (Aneja i sur., 2014).

Zbog relativno niske pH vrijednosti, bakterije su nešto slabije prisutne u voćnim sokovima, međutim mogu se pojaviti acidofilne bakterije i uzrokovati kvarenje soka. Tako su heterofermentativne bakterije mliječne kiseline i bakterije octene kiseline uz *Erwinia* sp., *Enterobacter* sp., *Clostridium* sp., *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Propionibacterium cyclohexanicum*, *Pseudomonas* sp. i *Bacillus* sp. bakterije koje se mogu pojaviti u voćnim sokovima i uzrokovati njihovo kvarenje. Bakterije mliječne kiseline su gram-pozitivne, štapićaste bakterije. Heterofermentativne bakterije mliječne kiseline su se pokazale kao najvažniji uzročnici kvarenja voćnih sokova. Rodovi *Lactobacillus* i *Leuconostoc* su najčešće izolirani iz voća i pokvarenog soka. Ove bakterije proizvode mliječnu kiselinu, octenu i glukonsku kiselinu, etanol i CO<sub>2</sub>, a neke vrste mogu proizvesti i diacetil što voćnim sokovima može dati okus po maslacu. Bakterije octene kiseline, naročito *Acetobacter*, *Gluconobacter* i *Gluconacetobacter* su gram pozitivne i gram negativne, aerobne bakterije. Mogu rasti na

podlozi s niskom vrijednošću pH što ih čini još jednim uzročnikom kvarenja voćnih sokova. Pokazatelj kvarenja soka ovim bakterijama je kiseo okus nalik na ocat uslijed stvaranja octene kiseline. Nadalje, kontaminacija soka bakterijama roda *Alicyclobacillus* uzrokuje kvarenje koje se teže detektira jer nema proizvodnje metabolita koji su specifični za ovaj rod, ali dolazi do proizvodnje spojeva koji daju antiseptički neugodan miris. *Streptomyces* bakterije također daju neugodan miris koji se pripisuje spojevima poput 2-metil izoborneol i 2-izobutil-3-metoksi pirazin (Aneja i sur., 2014).

### **2.1.1.2. Patogeni mikroorganizmi**

Patogene bakterije, uglavnom, nisu toliki problem u voćnim sokovima i napitcima, međutim postoje primjeri u kojima je došlo do razvoja bolesti kod ljudi nakon konzumacije nepasteriziranih voćnih sokova (Vasavada, 2003).

Površina voća može biti kontaminirana fekalnim materijalom što može dovesti do razvoja mikroorganizama uzročnika bolesti kod ljudi. Neki sojevi *Echerichia coli*, *Shigella* i *Salmonella* mogu preživjeti više dana, čak i tjednima, u kiselom okruženju. Tako *Shigella flexneri* i *S. sonnei* mogu preživjeti u soku od jabuke (pH 3,3) pri 7°C najmanje 14 dana. Isto tako, *E. coli* O157:H7 je povezana s mnogobrojnim izbijanjima bolesti nakon konzumacije nepasteriziranog soka od jabuka, a *Salmonella* je povezana s bolestima uzrokovanim konzumacijom nepasteriziranog soka od naranče. *Clostridium botulinum* je pronađen u domaćim nepasteriziranim sokovima od mrkve (Aneja i sur., 2014).

*Cryptosporidium parvum* je uzročnik gastrointestinalnih bolesti kod imunodeficijentnih i imunokompromitiranih pojedinaca, a detektiran je 1993. i 1996. godine u jabukovači, što je dovelo do oboljenja kod čak 191 osobe. Vjeruje se kako je do kontaminacije došlo uslijed pada jabuka na tlo gdje se odvijala ispaša stoke koja je ispuštala oociste *C. parvum* ili tijekom pranja jabuka kontaminiranom vodom (Vasavada, 2003).

Uz bakterije, nekoliko patogenih kvasaca uključujući *Candida famata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* i *Saccharomyces cerevisiae* mogu se naći u voćnim sokovima, međutim, ovi kvasci ne izazivaju veliku opasnost kod zdravih pojedinaca (Vasavada, 2003).

### **2.1.2. Kruške**

Ozbiljnije proizvodnje krušaka u Hrvatskoj gotovo i nema za razliku od ostalih europskih

---



zemalja, stoga Hrvatska teško zadovoljava potrebe vlastitog tržišta. Stare, tradicionalne sorte danas se sve više istražuju, ne samo zbog visokovrijednih sirovina kakve su kruške, već i zbog povoljnog utjecaja na razvoj ruralnih područja. U svijetu se najveći postotak krušaka troši u svježem stanju, a manji dio se prerađuje u različite prerađevine (kao kompote, sokove, voćne salate, dehidrirane proizvode, destilate, odnosno rakije). Od sorti za industrijsku preradu najviše se koristi Viljamovka i to prvenstveno za destilaciju kvalitetne rakije (Gliha, 1997).

Najvažnije komponente krušaka su ugljikohidrati, biljna vlakna i antioksidansi. Kruška posjeduje visoku nutritivnu vrijednost, bogata je vitaminima A, B1, B2, B3, C, i mineralima kao što su natrij, kalij, kalcij, fosfor i magnezij. Studije su dokazale da fitokemijski sastav krušaka jako varira između različitih sorti, te tijekom zrenja i dozrijevanja, međutim, dostupni podaci su ograničeni na najpoznatije komercijalne sorte krušaka. Polifenolni sastav čine brojni spojevi, u koje se ubrajaju i flavonoidi, za koje je dokazan pozitivan učinak na zdravlje ljudi.

### Sorta Miholjača

Tradicionalna sorta Miholjača pripada skupini moštenki. Pokazuje svojstva vrlo slična sorti Tepka. Postoji više naziva za ovu sortu koja dopijeva krajem rujna oko blagdana svetog Mihaela, u narodu zvano Miholje, pa je zato dobila naziv Mioljača, Miholjka, Miolja. Plodovi su okrugli, svjetlijih i tamnijih nijansi zelene boje. Okus krušaka je opor sve do potpunog zrenja. Zbog slabe istraženosti ove sorte, nema dostupne literature o njoj, stoga su bilo kakva istraživanja o sorti Miholjači i više nego poželjna.

### Sorta Viljamovka

Viljamovka potječe iz Engleske. U svjetskoj znanstvenoj i stručnoj literaturi ta sorta nosi ime Williams Bon Chretien (Dobri kršćanin Williams). Odlikuje se dobrom i redovitom rodnošću pa zaslužuje veliku pažnju za uzgoj u komercijalnim voćnjacima i kućnim vrtovima. Kasna je ljetna sorta jer joj plodovi dozrijevaju od 15. do 25 kolovoza, a u pojedinim godinama oko 1. rujna. Plodovi se uglavnom troše za preradu u destilat, u kompote i sokove, a u manjoj mjeri i za potrošnju kao stolno voće. Viljamovka je prikladna za berbu kad joj tvrdoća ploda iznosi od 6 do 7 kg/cm<sup>2</sup>. Plod je velik, kruškolika oblika. Kožica ploda je vrlo lijepe svjetlucavo žute boje s crvenilom na sunčanoj strani. Meso je bijelo, vrlo sočno, lako topivo u ustima, slatko - kiselkasta okusa, vrlo harmonično s intenzivnim ugodnim mirisom (Miljković, 2008).

Kvaliteta same sirovine izravno utječe na kvalitetu gotovog proizvoda, odnosno soka. Kao jedan od najvažnijih parametara kvalitete ističe se mikrobiološka stabilnost, zato je od iznimne važnosti poznavati mikrobiološku populaciju same sirovine kako bi se kasniji proces proizvodnje, uključujući tretmane konzerviranja, mogao učinkovito optimirati.

Osim što sirovina mora biti zadovoljavajuće kvalitete, voće mora biti sortirano tako da su uklonjeni svi truli plodovi, kako bi se smanjio rizik prijenosa mikroorganizama na zdrave plodove voća. Prisutnost nekih bakterija, kao što je *E. coli*, ukazuje na fekalno zagađenje sirovine, što zapravo i nije rijetkost jer je sirovina često izložena ovakvim vrstama bakterija tijekom dozrijevanja i branja (Borozan i sur., 2010).

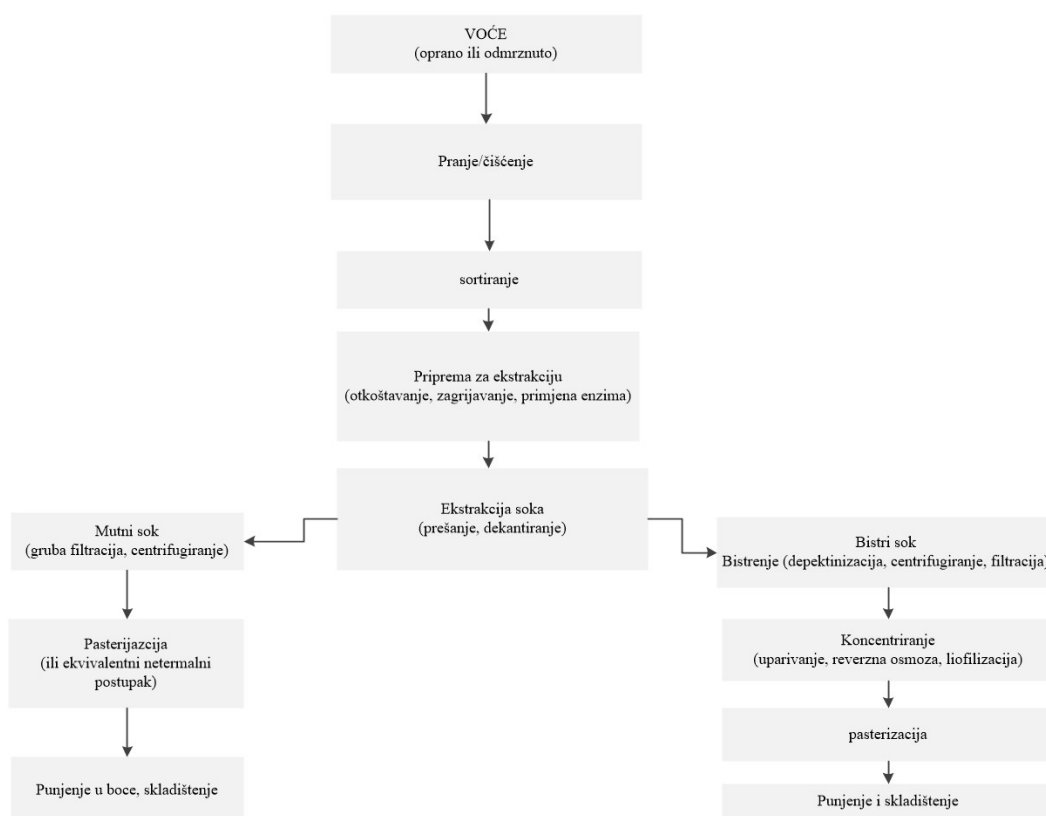
U istraživanju Janakiev i sur. (2022) dokazano je kako je na površini kruške roda Williams uočeno 6 rodova i 8 vrsta bakterija. Najbrojnije su bile iz roda *Pseudomonas* uz identifikaciju idućih vrsta: *P. graminis*, *P. putida* i *P. congelans*. Ostali rodovi koji su pronađeni uključuju: *Pantoea*, *Rhizobium*, *Crutobacterium*, *Rahnella* i *Frigoribacterium*. Što se tiče plijesni, najrašireniji su bile iz roda *Fusarium* (*F. incarnatum*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. sporotrichioides*), zatim *Trichoderma*, *Phoma* i *Aspergillus*.

### 2.2. Proizvodnja soka

Kako bi se osigurala kvaliteta voćnih sokova, postoje neke smjernice koje valja pratiti:

- Kvaliteta soka uvelike ovisi o kvaliteti sirovine, neovisno koliko je proces dobar, ukoliko je sirovina loše početne kvalitete, ishod će biti proizvod loše kvalitete. Kvaliteta sirovine često je ovisna o zrelosti i stupnju dozrijevanja. Metode određivanja zrelosti voća uključuju mjerenje topljive suhe tvari, kiselost, prisutnost škroba, boje, senzorsku ocjenu i mjerenje čvrstoće,
- Svako rukovanje sirovinom mora biti pažljivo zbog mogućeg oštećenja i kontaminacije voća. Posebna briga je potrebna i tijekom transporta; naročito je potrebno paziti da voće ne pada s velike visine i da ne dođe do drugih oštećenja,
- Skladišta u kojima se voće nalazi prije prerade moraju biti primjereno optimizirana za vrstu i zrelost primljenog voća. Uz hlađenje, preporučuje se primjena kontrolirane atmosfere kako bi se produžio vijek trajanja voća,
- Tijekom svih operacija proizvodnje voćnog soka potrebno je pridodati veliku važnost higijeni svih prostora i uređaja (McLellan i Padilla-Zakour, 2005).

Proces proizvodnje voćnog soka, prikazan na **Slici 1**, započinje u samom voćnjaku, nakon branja zrelog, zdravog ploda potrebno ga je primjereno uskladištiti. Proces proizvodnje nastavlja se pranjem plodova kako bi se uklonio otpad (poput lišća, granja i sličnog) i kako bi se uklonila prljavština s ploda (blato, prašina). Nakon pranja slijedi sortiranje kako bi se uklonili truli plodovi i oni vidno zahvaćeni plijesnima, ovim postupkom se odmah na početku smanjuje inicijalan broj mikroorganizama, ali i smanjuje mogućnost nastanka nepoželjnih aroma. Nadalje, za većinu voća je potrebno ukloniti sjemenke te ih usitniti. Toplinski i enzimski tretmani se, također, mogu primijeniti prije gnječenja. Gnječenje se provodi ili mehaničkim prešanjem ili enzimskim tretmanom popraćenim dekantiranjem. Ekstrahirani sok se, zatim, tretira ovisno o tome kakav proizvod želimo dobiti. Za mutne sokove (sa suspendiranim česticama), nije potrebno uvijek vršiti pročišćavanje, ali se koriste gruba filtracija ili kontrolirano centrifugiranje kako bi se uklonile veće čestice. Za bistre sokove potrebna je potpuna depektinizacija, koja se postiže primjenom enzima, finom filtracijom ili centrifugiranjem kako bi se dobio sok bez vidljivih otopljenih čestica. Idući korak u proizvodnji soka je, uglavnom, termički tretman ili jednako učinkovit ne-termički tretman konzerviranja. Za koncentrate soka, sok odlazi na uparivanje kako bi izgubio dio vode i kako bi se postigla zadovoljavajuća koncentracija koncentrata. Osim uparivanja, za koncentriranje soka se mogu koristiti još i reverzna osmoza i liofilizacija, koje su primjenjive kod sokova s visokom koncentracijom termo-labilnih sastojaka. Nakon proizvodnje slijede završne obrade te pakiranje i skladištenje ili plasman na tržište (McLellan i Padilla-Zakour, 2005).



**Slika 1** Shematski prikaz proizvodnje nekkih vrsta sokova (McLellan i Padilla-Zakour 2005)

Postupci proizvodnje kašastih sokova ili nektara značajno se razlikuju od postupaka kojima se dobivaju bistri sokovi. Proizvodnja kašastih sokova podrazumijeva unošenje u sok dijela pulpe, tj. netopljivih dijelova tkiva voća, što se postiže ekstrakcijom i izdvajanjem soka koji se mora stabilizirati i homogenizirati.

### 2.2.1. Postupci za osiguranje kvalitete krušaka

Mnoge agronomske aktivnosti tijekom proizvodnje voća mogu utjecati na kasniju sigurnost proizvoda. Sve, od sadnje biljke, tretiranja biljke, sazrijevanja ploda, ubiranja ploda i rukovanja samim plodom, igra veliku ulogu u kasnijoj kvaliteti konačnog proizvoda. HACCP i DPP (Dobra Poljoprivredna Praksa) su jedni od glavnih načela kojih se valja pridržavati, kako tijekom uzgoja ploda, tako i tijekom proizvodnje konačnog proizvoda (Early, 2002). Izgled, okus i aroma te tekstura jedni su od glavnih parametara koje valja sačuvati nakon berbe.

Respiracija, uz produkciju etilena i starenje ploda, predstavljaju glavne čimbenike na koje treba paziti nakon berbe ploda (Aked, 2002). Kod samog ubiranja ploda potrebno je izbjegavati pad sirovine, oštećene, trule i plodove kontaminirane fekalnim sadržajem ptica potrebno je odbaciti, potrebno je koristiti čiste posude za skupljanje i sortiranje plodova, te osigurati zadovoljavajuće higijenske uvjete za radnike koji sudjeluju u branju plodova. Također, potrebno je održavati sljedivost same sirovine evidencijom datuma, izvora i vrste ploda koji se kupuje te je potrebno prikladno skladištiti zaprimljeno voće u prikladnim skladištima (Vasavada, 2003).

### **2.2.2. Skladištenje ploda**

Ukoliko je skladištenje krušaka predugo ili prekratko, kruške mogu omekšati uz nastanak suhe, grube teksture. Tekstura, uz održavanje okusa, predstavlja jedan on najvažnijih čimbenika na koje treba pripaziti tijekom skladištenja krušaka. Tekstura kruške je ovisna o mogućnosti promjene stanične strukture stanične stjenke tijekom dozrijevanja, a sama tekstura ovisi o mnogim čimbenicima uključujući vrijeme berbe, uvijete i trajanje skladištenja i dozrijevanje nakon berbe (Eccher Zerbini, 2002).

Tijekom dugotrajnog skladištenja može doći do većeg razvoja mikroorganizama i tako može doći do kvarenja sirovine nakon branja. Tako, primjerice, plijesni iz porodice *Alternaria* mogu uzrokovati kvarenje krušaka tijekom skladištenja. Do infekcije dolazi još na nedozrelom plodu kruške gdje se ova plijesan zadržava kroz cijeli rast i dozrijevanje kruške. Tijekom ovog perioda ne dolazi do kvarenja kruške jer su spore plijesni u latentnom stanju, iz ovog stanja izlazi kada je kruška zrela i tek tada uzrokuje kvarenje. Dokazano je kako su nakon 30 dana skladištenja dominantne bile vrste bakterija roda *Acetobacter* i *Gluconobacter*. *Gluconobacter* koje uzrokuju truljenje i posmeđivanje ploda kao i vrste roda *Acetobacter* koja može prouzročiti značajne ekonomske gubitke (Gao i sur., 2023).

Osim što je potrebno voditi računa o mikrobiološkoj stabilnosti tijekom skladištenja, značajnu ulogu u gubicima krušaka ima i dozrijevanje tijekom skladištenja. Kruške moraju biti ubrane u fiziološkoj zrelosti, kada su uglavnom dosta tvrde, i trebaju biti uskladištene u hladnim uvjetima (-1 do 0°C i 90% RH (relativna vlažnost)) kako bi dosegle optimalnu kvalitetu za konzumaciju (Zucoloto i sur., 2016). Važnu ulogu u dozrijevanju tijekom skladištenja igra etilen. Produkcija etilena započinje već na temperaturama od 10°C i nižim. Ova hladna sinteza

etilena je uzrokovana povećanom aktivnosti 1-aminociklopropan-1-karboksilne kiseline (ACC) i ACC-oksidade (Prange i Harrison Wright, 2023).

Skladištenje u kontroliranoj atmosferi (CA) se zasniva na održavanju relativno niskih razina kisika i povećanoj koncentraciji dušika u komori za skladištenje. Niska koncentracija kisika inhibira respiraciju, ali i sintezu etilena, čime se usporava dozrijevanje krušaka (Prange i Harrison Wright, 2023). Skladištenje uz primjenu kontrolirane atmosfere može zaštititi kruške od površnih opekotina i dopušta produljenje trajnosti krušaka do 6 mjeseci (Rizzolo, Grassi i Vanoli, 2015).

Gubitak vode iz kruške tijekom skladištenja ovisi o tri glavna faktora, to su: površina voća, propusnost površine voća za vodu i razlika između tlaka vodene pare između unutarnje i vanjske strane ploda. Stoga je potrebno pomno pratiti relativnu vlažnost zraka (RH) unutar komore za skladištenje (Prange i Harrison Wright, 2023).

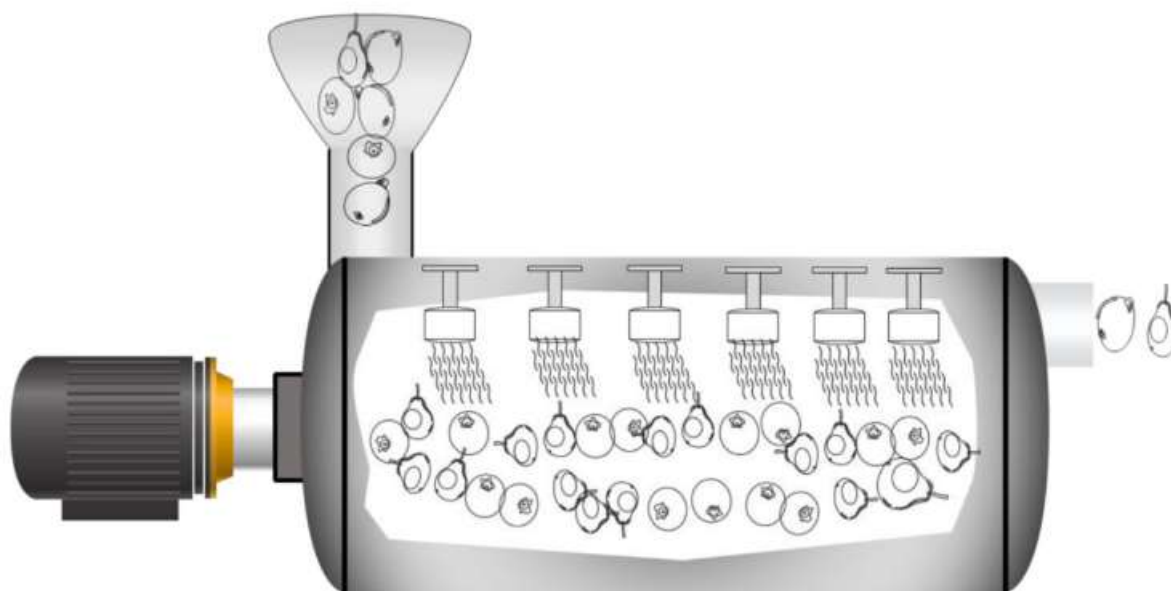
Površinske opekotine su još jedan značajan faktor koji treba uzeti u obzir tijekom skladištenja krušaka. Očituju se u pojavi smeđe boje na površini kruške uslijed nekroze tkiva epiderme. Dva su glavna uzročnika površinskih opekotina na kruškama, to su oštećenja uzrokovana hladnoćom i oksidativni stres. Kako bi se spriječio nastanak površinskih opekotina na kruškama, nekada su se kruške tretirale etoksikvinom, međutim, on je zabranjen za upotrebu u Europskoj Uniji. Tretiranje 1-MCP-om (1-metilciklopropan) nije potpuno učinkovito u sprječavanju nastanka površinskih opekotina (Bonora i sur., 2021).

Botes i Caleb (2024) dokazali su kako se za optimalno skladištenje kruške „Abbe fetel“ kroz 4 do 6 mjeseci, najučinkovitijim pokazalo skladištenje na temperaturi od 0.5 do 1°C uz dodatak 1-metilciklopropana. Tretiranje 1-MCP-om tijekom berbe, kao i tijekom skladištenja utjecalo je na fiziološko stanje i kvalitetu „Abbe fetel“ krušaka. Tretman 1-MCP-om značajno je reducirao produkciju etilena, smanjio je žutenje korice i omekšanje kruške skladištene pri -0,5°C (Rizzolo, Grassi i Vanoli, 2015).

### **2.2.3. Pranje voća**

Glavna zadaća pranja voća u industriji proizvodnje voćnih sokova, uređaj prikazan na **Slici 2**, je svesti na minimum kontaminaciju fizikalnim i kemijskim kontaminantima koji su završili na voću prije nego je uopće dospjelo do tvornice za preradu. Učinkovito pranje i čišćenje voća

drastično reducira i mikrobiološku kontaminaciju i tako produljuje trajnost samog soka. Ova metoda zahtjeva veliki utrošak vode i može dovesti do mehaničkog oštećenja plodova. Drugi nedostatak ove jedinične operacije je taj što pranjem nije moguće ukloniti smole i voskove (Mushtaq, 2018).



**Slika 2** Uređaj za industrijsko pranje voća (Mushtaq, 2018)

### 2.2.4. Proizvodnja voćne kaše i završna priprema soka

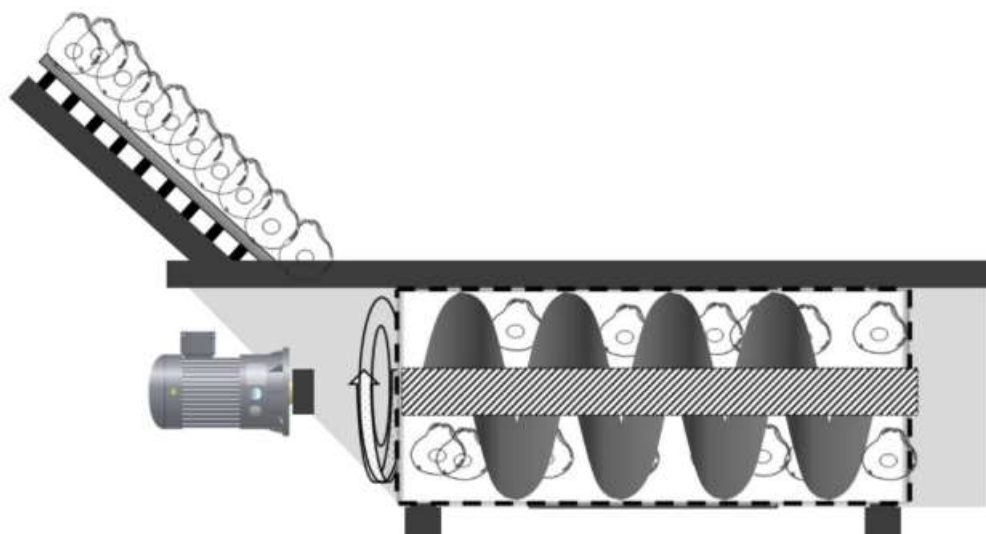
Nakon pranja, za većinu vrsta voća potrebno je izvršiti dodatne mjere prije same ekstrakcije. To uključuje uklanjanje sjemenkin nekada guljenje. Međutim, za voće poput krušaka, guljenje nije potrebno. Kako bi se poboljšala raspodijeljenost stanica voća i kako bi se osigurao izlaz tekućine iz stanica voća, voće se melje u kašu. To se postiže uređajima s noževima, drobilicama, strojevima za rezanje i mlinovima čekićarima. Prethodna toplinska obrada u proizvodnji kaše ima višestruku ulogu, prije svega omekšavanje tkiva i inaktiviranje enzima.

Primjer uređaja pomoću kojeg se odvija mljevenje prikazan je na **Slici 3**. Uređaj se sastoji od oštih noževa koji se nalaze na osovini i rotiraju unutar kućišta. Ulaskom voća u uređaj dolazi do dezintegracije ploda i nastanka voćne kaše (Mushtaq, 2018). Mljevenje je nužno kako

bi došlo do dezintegracije staničnog tkiva i kako bi iskorištenje kod pasiranja bilo što veće. Potrebno je dobiti čestice veličine 5 do 8 mm (McLellan i Padilla-Zakour, 2005).

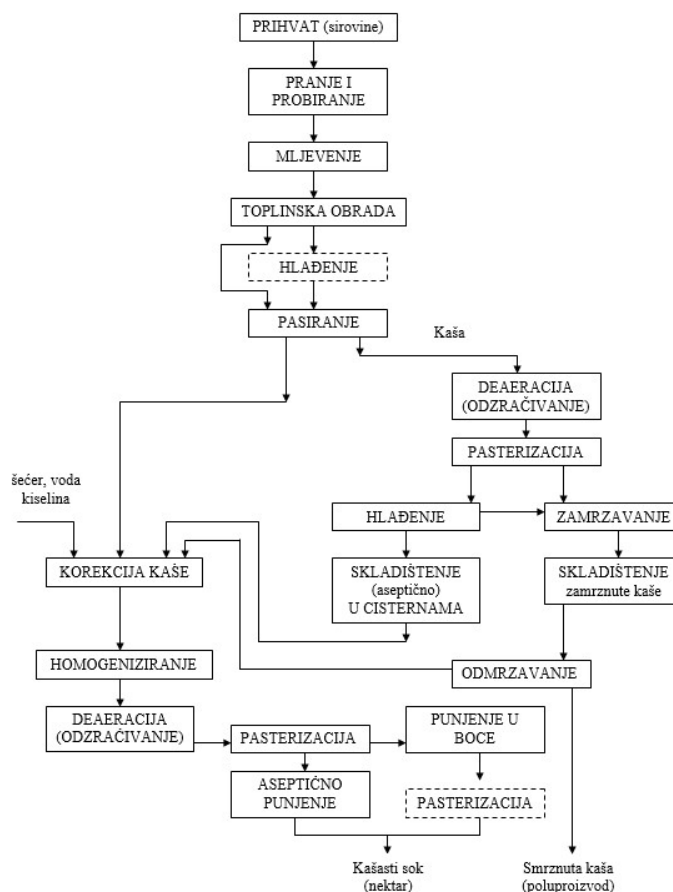
Skladištenje kaše kao polupreradevine u proizvodnji kašastih sokova moguće je ostvariti konzerviranjem pasterizacijom i čuvanjem u aseptičnim uvjetima u velikim spremnicima ili zamrzavanjem i čuvanjem u hladnjači pri temperaturi ispod  $-18^{\circ}\text{C}$  (Lovrić i Piližota, 1994). Završna priprema kašastih sokova u pravilu uključuje miješanje kaše sa šećernim sirupom, kiselinom i, po potrebi, nekim stabilizatorom, zatim homogenizaciju, odzračivanje, pasterizaciju i punjenje u prodajnu ambalažu. Danas se sve više primjenjuje tehnika aseptičnog pakiranja.

Udio voćne kaše u proizvodu mora biti u skladu s važećim zakonskim normama (Pravilnik o voćnim sokovima i njima sličnim proizvodima namijenjenim za konzumaciju). Kašasti kokteli dobivaju se miješanjem kaša više vrsta voća uz korekciju šećernim sirupom, te ako je potrebno kiselinom uz eventualno druge dopuštene dodatke (stabilizatore, vitamine idr.).



**Slika 3** Uređaj za mljevenje krušaka (Mushtaq, 2018)





Slika 4 Shema proizvodnje kašastog soka (nektara) od jabučastog voća (Lovrić i Piližota, 1994)

## 2.3. Konzerviranje soka

### 2.3.1. Termički tretmani

Konzerviranje hrane termičkim postupcima podrazumijeva primjenu termalne energije za mikrobiološku i enzimsku inaktivaciju, koja se postiže denaturacijom i topljenjem lipidnih komponenti. Tijekom obrade, hrana se zagrijava ogrjevnim medijem do postizanja željene temperature, potom se hrana zadržava određeno vrijeme na toj temperaturi (koja je prethodno određena) i na kraju se hladi rashladnim medijem. Termičko konzerviranje se bazira na temelju otpornosti organizma koji je najstabilniji pri visokim temperaturama. Mikroorganizam mora biti prethodno definiran (Augusto, Soares i Castanha, 2018).

Termičko konzerviranje može se provoditi kada je proizvod već zapakiran ili prije samog pakiranja. Tekuće se namirnice, u pravilu, mogu tretirati i prije i nakon pakiranja, međutim, kako je manja mogućnost naknadne kontaminacije, češće se koristi termičko konzerviranje nakon pakiranja (Augusto, Soares i Castanha 2018).

Iako postoje mnoge netermičke metode konzerviranja voćnih sokova, termičko procesiranje i dalje je najekonomičniji način osiguranja mikrobiološke sigurnosti i enzimske deaktivacije. Neki od nedostataka termičke obrade voćnih sokova su spor prijenos topline kondukcijom i konvekcijom i negativan utjecaj na senzorske, nutritivne i funkcionalne karakteristike. Optimizacijom termičkog tretmana moguće je postići ravnotežu između sigurnosti i nutritivne kvalitete proizvoda (Petruzzi i sur., 2017).

HTLT (High temperature long time) metoda je najčešće korištena za obradu sokova i drugih napitaka, primjenjuju se temperature više od 80°C uz zadržavanje tekućine više od 30 sekundi. HTLT metode možemo podijeliti na pasterizaciju (temperature niže od 100°C) i sterilizaciju (temperature više od 100°C). Sokovi s pH vrijednošću većom od 4,5 zahtijevaju žešće tretmane kako bi se postigao željeni rok trajnosti. Nadalje, HTLT metode mogu smanjiti ili inaktivirati enzime čija aktivnost dovodi do nepoželjnih organoleptičkih promjena. Neki od tih enzima su polifenoloksidaza (PPO), peroksidaza (POD), pektinesteraza (PE) i poligalakturonaza (PG). PPO je enzim koji uzrokuje posmeđivanje prirodno prisutnih pigmenta i drugih polifenola što dovodi do nepoželjne pojave smeđe boje i smanjene antioksidativne aktivnosti. POD sudjeluje u više biljnih metaboličkih procesa kao što su lignifikacija staničnog zida i posmeđivanje koje ubrzava oksidacijske procese. PE i PG sudjeluju u razgradnji pektina što dovodi do promjene u viskoznosti i do promjene senzorskih svojstava soka. HTLT metodom moguće je u potpunosti inhibirati aktivnost PPO i POD enzima u soku od krušaka, međutim zabilježeno je i drastično smanjenje antioksidativne aktivnosti (Petruzzi i sur., 2017).

HTST (high temperature short time) metoda se razvila kako bi se smanjili nepoželjni učinci HTLT metode uz održavanje sigurnosti proizvoda. HTST pasterizacija je metoda koja koristi temperature veće od 80°C uz zadržavanje soka kraće od 30 sekundi (Petruzzi i sur., 2017).

MILT (mild temperature long time) podrazumijeva primjenu temperatura do 80°C uz zadržavanje duže od 30 sekundi. Neke od prednosti primjene ove metode su: povećana stabilnost boje i viskoznosti u soku od kruške, povećano zadržavanje koncentracije askorbinske

kiseline te povećanje sadržaja ukupnih fenola. Patogeni mogu preživjeti u soku zbog mogućnosti adaptacije u kiselom mediju i zbog razvoja adaptivnih mehanizama genetičkim i fiziološkim promjenama. MTLT metodom su, također, značajno smanjene aktivnosti enzima PPO i POD u soku od kruške (Petruzzi i sur, 2017).

MTST (mild temperature short time) metoda koristi temperature niže od 80°C uz vrijeme zadržavanja kraće od 30 sekundi (Petruzzi i sur., 2017).

Mikrobiološka inaktivacija ima eksponencijalan odnos s temperaturom. Inaktivacija se, dakle, može prikazati jednadžbom za kinetiku prvog reda (jednadžba **(1)**), što znači da je redukcija mikroorganizama na određenoj temperaturi (T) funkcija početne količine mikroorganizama (C) u određeno vrijeme. Inaktivacija mikroorganizama se izražava vremenom decimalne redukcije ( $D_T$ ) koje se definira kao vrijeme potrebno kako bi se broj mikroorganizama smanjio za 90% pri zadanoj temperaturi.  $D_T$  je u direktnom odnosu s konstantom mikrobiološke inaktivacije ( $k_T$ ) što je prikazano u jednadžbi **(2)**.  $D_T$  vrijednosti postaju sve manje sa svakim povećanjem temperature pa je tako definiran i termalni koeficijent (z) koji predstavlja temperaturnu razliku potrebnu za promicanje smanjenja od jednog logaritamskog ciklusa (90%) u  $D_T$  vrijednostima. Odnos između  $D_T$  i z prikazan je u jednadžbi **(3)** (Augusto Soares i Castanha, 2018).

$$\ln\left(\frac{C_0}{C}\right) = k_T * t \quad (1)$$

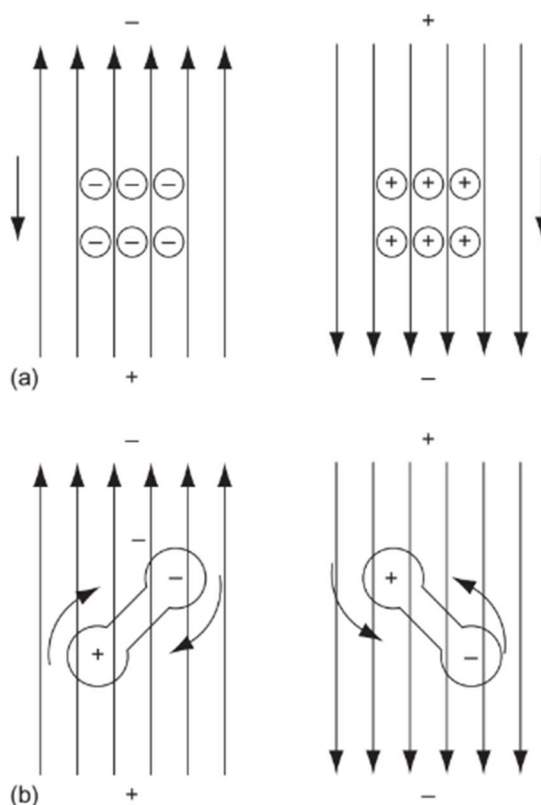
$$\log\left(\frac{C_0}{C_f}\right) = \frac{t}{D_T} \quad (2)$$

$$\log\left(\frac{D_{T_2}}{D_{T_1}}\right) = \frac{T_1 - T_2}{z} \quad (3)$$

### 2.3.1.1. Mikrovalno zagrijavanje

Dielektrično zagrijavanje bazira se na korištenju elektromagnetskog zračenja poput mikrovalova i radiofrekvencije. Mikrovalno zagrijavanje pokazalo se kao učinkovit proces u prehrambenoj industriji. Kada mikroval dođe do namirnice, dio njegove energije se prenosi, a dio se reflektira, dok se ostatak energije apsorbira. Zagrijavanje namirnice je posljedica interakcije komponenata eklektičnog polja vala s nabijenim česticama materijala koji se zagrijava. Ako su nabijene čestice slobodne unutar materijala, struja će teći u fazi s poljem, što je pojava koja se naziva ionska polarizacija ili ionska kondukcija. Ako su ipak nabijene čestice

vezane unutar materijala, električno polje će dovesti do njihove rotacije sve dok se suprotne sile ne uravnoteže s električnim poljem. Ovaj fenomen zove se dipolarna polarizacija (**Slika 5**). Kako je frekvencija polja visoka, ovo okretanje se događa vrlo brzo (ako je frekvencija mikrovala 2450 MHz, polarnost se mijenja 2,45 milijardi puta u sekundi) te dolazi do brzog razvoja topline (Hebbar i Rastogi, 2012).



**Slika 5** prikaz a) ionske polarizacije i b) dipolarne rotacije unutar mikrovalnog polja (Hebbar i Rastogi, 2012)

Dva su procesa zaslužna za mikrovalnu inaktivaciju mikroorganizama:

- Mikroorganizmi postaju potpuno inaktivirani djelovanjem mikrovalnog zagrijavanja. Uslijed razvoja topline dolazi do denaturacije enzima, nukleinskih kiselina, proteina i ostalih komponenata uz istovremeno razaranje staničnih membrana,
- Mikroorganizmi ozračeni mikrovalovima odumiru na temperaturama nižim od njihovog uobičajenog TDP-a (Thermal Death Point) i dokazana je veća razina razaranja stanica nego kod uobičajenih tehnika zagrijavanja. Ovaj ne-termalni

učinak mikrovalova je povezan s promjenom u strukturi proteina promjenom smjera biokemijskih reakcija (Kernou i sur., 2023).

Mikrovalno zagrijavanje pronašlo je primjenu u proizvodnji voćnih sokova. Tako je dokazano kako je izlaganje soka od jabuke mikrovalnom zagrijavanju rezultiralo smanjenjem mikrobne populacije. Pasterizacija mikrovalovima na 720-900 W kroz 60-90 sekundi pokazala je 2-4 log redukciju mikrobne populacije unutar soka od jabuke. Učinkovitost mikrovalnog procesiranja ovisna je o parametrima sustava, ali i o parametrima samog materijala koji se podvrgava ovakvoj vrsti zagrijavanja. Među parametrima materijala svakako se ističu dielektrična svojstva materijala na koja utječu mikrovalna frekvencija, temperatura, udio vlage i ostalih komponenata hrane. Mikrovalno zagrijavanje se danas koristi za: pasterizaciju, blanširanje, odmrzavanje i koncentriranje tekućih namirnica te za sušenje, pečenje, kuhanje, temperiranje i ekstrakciju. Dokazano je i kako mikrovalni tretman utječe na brojne parametre kvalitete proizvoda kao što su boja, tekstura i zadržavanje nutritivno važnih komponenata hrane (Hebbar i Rastogi, 2012). Mikrovalovi, dakle, inaktiviraju mikroorganizme i enzime u vrlo kratkom vremenu što omogućuje veće očuvanje nutritivno važnih sastojaka hrane u odnosu na konvencionalno korištene termičke metode (Navida i sur., 2022).

### **2.3.1.2. Ohmsko zagrijavanje**

Ohmsko zagrijavanje je tehnika zagrijavanja koja se bazira na prolasku električne struje kroz proizvod koji ima određeni električni otpor. Toplina se razvija odmah unutar materijala i ovisna je o gradijentu napona i električnoj konduktivnosti. Ohmsko zagrijavanje pruža mnogobrojne prednosti među kojima se ističu zadržavanje boje i nutritivne vrijednosti hrane te kratkotrajno tretiranje i veće iskorištenje. Ohmsko zagrijavanje se koristi u prehrambenoj industriji za predgrijavanje, blanširanje, pasterizaciju, sterilizaciju i ekstrakciju. Mikrobiološka inaktivacija tijekom ohmskog zagrijavanja posljedica je uobičajenih termalnih efekata. Iako postoje dokazi kako postoje dodatni električni efekti koji utječu na smanjenje broja mikroorganizama, oni još uvijek nisu stopostotno potvrđeni. Niska frekvencija koja se koristi kod ohmskog zagrijavanja (50-60 Hz) omogućava stanicama da se električni nabiju i stvaraju pore. Elektroporacija podrazumijeva nastanak pora u membranama stanica što dovodi do veće propusnosti membrana (Icier, 2012).

### 2.3.2. Ne-termičke metode konzerviranja

Iako termičko konzerviranje pruža sigurnost hrane kroz duži period, dovodi do gubitka mnogobrojnih nutritivno važnih termo-labilnih komponenata poput nekih vitamina, antocijana i minerala. Nove tehnike konzerviranja, posebice tretiranje ultrazvukom, ozonom, visokim tlakom i UV svjetlom, su trenutno vrlo popularne zbog brojnih prednosti koje pružaju. Iako možda ne-termalne tehnike konzerviranja neće u potpunosti inaktivirati neke od enzima i neće uništiti sve mikroorganizme, kombiniranje više tehnika pokazalo je izuzetne rezultate. Primjena više tehnika rezultira očuvanjem kvalitete, stabilnosti i sigurnosti gotovog proizvoda (Navida i sur., 2022). Zdravstvene prednosti uglavnom su povezane se nutrijentima koje pronalazimo u njima, poput fenolnih tvari, vitamina i minerala. Zbog toga je od iznimne važnosti sačuvati te komponente kako bi ih gotov proizvod sadržavao u što većoj koncentraciji. Glavni cilj ne-termičkih metoda konzerviranja je upravo očuvanje nutritivne vrijednosti namirnica uz što bolju inaktivaciju mikroorganizama i nepoželjnih enzima, kako bi se produžila trajnost proizvoda i osigurala sigurnost za potrošača (Saeeduddin i sur., 2016).

#### 2.3.2.1. Tretiranje visokim tlakom

Tlak se definira kao djelovanje sile na jedinicu površine. Postoje različite vrste tlakova koje je moguće primijeniti: izostatski tlak (tlak je ravnomjerno raspoređen preko cijele površine), ne-izostatski tlak (postoji gradijent u primjeni tlaka) i dinamički tlak (ekstremno visoki tlak razvijen kroz vrlo kratko vrijeme) (Barba i sur., 2018).

HHP (High hidrtostatic pressure) je izostatsko povećanje tlaka u tekućini zbog kompresije tekućine i općenito se oslanja na primjenu tlakova u rasponu od 100 do 700 MPa. U prehrambenoj industriji provodi se pomoću vakuumske pakiranja u fleksibilnom pakovanju koje se stavlja u tlačnu komoru koja sadržava medij za prijenos tlaka. Povećanje tlaka se postiže kompresijom medija za prijenos tlaka, pomoću djelovanja pumpe i klipa (Barba i sur., 2018).

Iako je tretiranje tlakom ne-termička metoda, to ne znači da uopće nema razvoja topline. Temperatura proizvoda, ali i medija za prijenos tlaka, se mijenja/povećava. Naime, dolazi do adijabatskog zagrijavanja zbog topline kompresije korištene tekućine za prijenos tlaka, što rezultira temperaturnim gradijentima unutar sustava (Barba i sur., 2018).

Tekuće namirnice s visokim aktivitetom vode mogu se pasterizirati pri sobnim ili nižim temperaturama korištenjem tlaka u rasponu 400-600 MPa uz tretiranje kraće od 10 minuta. HHP

metoda inaktivira patogene i bakterije uzročnike kvarenja, plijesni, kvasce i viruse. Međutim, ova metoda ima ograničeno djelovanje na spore i enzime. Mogućnost inaktivacije bakterija, također, ovisi o vrsti mikroorganizma, sastavu namirnice, pH i aktivitetu vode. Stanice u eksponencijalnoj fazi rasta su slabije otporne nego one u stacionarnoj fazi rasta. Gram-pozitivne bakterije su otpornije od gram-negativnih. Na sobnim temperaturama spore mogu preživjeti tlakove iznad 1000 MPa što ih čini izrazito otpornima (Gupta i Balasubramaniam, 2012).

Kvasci i plijesni su najosjetljiviji na djelovanje visokog tlaka, međutim njihove spore nisu. Gram pozitivne bakterije su otpornije na HHP tretman, zbog debele membrane, od gram negativnih bakterija. Osim toga, manje, okruglije bakterije su otpornije na HHP tretman od onih koje su veće i štapićastog oblika. HHP, djelovanjem na ne-kovalentne veze, uzrokuje oštećenje genetskog materijala mikroorganizama zbog enzimske inaktivacije i promjena u metabolizmu, čiji je krajnji ishod oštećenje i smrt mikroorganizma (Roobab i sur., 2018).

Dokazano je kako se djelovanjem tlakova 0,1 do 900 MPa mogu inaktivirati i određeni enzimi, najlakše se inaktivira lipooksigenaza, zatim: laktoperoksidaza, pektinesteraza, lipaza, fosfataza, katalaza, polifenoloksidaza i peroksidaza. Kombiniranje visokog tlaka s umjerenim povećanjem temperature pokazalo je povećanu inaktivaciju enzima. Blanširanje prije tretmana visokim tlakom se, također, pokazalo učinkovitim u kontroliranju enzimske aktivnosti. Male molekule poput vitamina i tvari arome ostale su nepromijenjene djelovanjem visokog tlaka, dok su velike molekule poput proteina, enzima, polisaharida i nukleinskih kiselina zabilježile promjene u svojoj strukturi. Visoki tlak djeluje samo na ne-kovalentne veze poput vodikovih, ionskih i hidrofobnih veza. Teksturalne promjene tijekom procesiranja visokim tlakom se, uglavnom, javljaju zbog staničnih poremećaja i promjena u polimerima stanične stijenke zbog enzimskih i neenzimskih reakcija (Gupta i Balasubramaniam, 2012).

### **2.3.2.2. Tretiranje pulsirajućim električnim poljem**

Glavni efekt PEF-a (Pulsed electric field) je ranije spomenuta elektroporacija odnosno povećanje propusnosti stanične membrane uslijed nastanka pora. Primjena kratkih pulseva različitog intenziteta pokazala se kao obećavajuća metoda za inaktivaciju mikroorganizama uz minimalne promjene organoleptičkih svojstava i nutritivne vrijednosti. Još jedna prednost PEF-a je ta što nema nusprodukata koji su štetni za okoliš ili koji su toksični (Roobab i sur., 2018).

Nekoliko je parametara koji se moraju uzeti u obzir kod primjene PEF-a za sigurnost prehrambenog proizvoda. Ti parametri uključuju intenzitet električnog polja, oblik, širinu i frekvenciju pulsa, ukupno vrijeme tretiranja, konfiguraciju elektrode i temperaturu. Glavni čimbenici presudni za izbor navedenih parametara su vrsta i veličina stanica te količina mikroorganizama. Ostali čimbenici, koji su povezani sa matriksom hrane, uključuju: pH, provodljivost i ionsku jakost (Barba i sur., 2018). Dokazano je kako se PEF tretmanom voćnih sokova može vrlo dobro očuvati boja, viskoznost, kiselost i okus čime se dobiva proizvod visoke kvalitete. Tretman PEF-om nije prouzročio smanjenje koncentracije karotenoida sa antioksidativnom aktivnošću (poput  $\beta$ -karotena i luteina) jer nije bilo promjene u strukturi i bioaktivnosti izoprenih jedinica od kojih su građeni. Isto tako, istraživanja su dokazala kako je smanjenje termo-labilnog vitamina C svega 10% (Elez-Martinez i sur., 2012).

Inaktivacija mikroorganizama PEF-om rezultat je razora stanične membrane, morfoloških i strukturnih promjena stanica, oštećenja genetskog materijala stanica i promjena u ekspresiji gena (Roobab i sur., 2018). Mosqueda-Melgar, Raybaudi-Massilia i Martin-Belloso (2012) su ustanovili kako je mikrobiološka stabilnost soka tretiranog s intenzivnim pulsirajućim električnim poljem osigurana kroz najmanje 91 dan, uz skladištenje na temperaturi od 5°C.

Primjenom PEF-a moguće je proizvesti voćni sok premium kvalitete uz smanjenje mikrobne populacije bez promjene u organoleptičkim svojstvima soka, međutim, ova tehnika je iznimno skupa te postoji mogućnost interakcije elektroda s medijem koji se tretira. Tako je potvrđeno značajno povećanje u količini metala poput Fe, Zn, Mn i Cr u pivu koje je bilo tretirano PEF-om. PEF tretmanom moguće je uništiti samo vegetativne stanice mikroorganizama bez mogućnosti uništenja spora. Zbog ovoga, nužno je uz PEF tretman odraditi i primjereni termički tretman kako bi se osigurala sigurnost proizvoda za potrošača (Roobab i sur., 2018).

### **2.3.2.3. Tretiranje ultrazvukom**

Ultrazvučni valovi su tlačni valovi čija je frekvencija veća ili jednaka od 20 kHz. Ultrazvučni valovi visoke frekvencije od 20 do 100 kHz imaju sposobnost izazivanja kavitacije i koriste se u svrhu smanjenja broja mikroorganizama. Sama kavitacija nije zaslužna za inaktivaciju bakterija, već je to rezultat fluktuacije tlaka uzrokovanog ultrazvučnim valovima tijekom procesa tretiranja ultrazvukom (Kernou i sur., 2023).



Mehanizam djelovanja ultrazvuka, preko kojeg se postiže inaktivacija mikroorganizama, podrazumijeva akustičnu kavitaciju koja onda dovodi do slabljenja i poremećaja u stanicama mikroorganizama. Postoje tri osnovna mehanizma djelovanja ultrazvuka na stanice mikroorganizama, to su:

- Oštećenja stanične stjenke mikroorganizama zbog mehaničkih učinaka izazvanih tlakom koji je nastao uslijed raspada kavitacijskih mjehurića unutar ili u blizini mikroorganizma,
- Smične sile izazvane mikrostrujanjem koje se događa u stanici mikroorganizma,
- Uslijed stvaranja slobodnih radikala tijekom kavitacije, dolazi do njihovog napada na strukturu stanične stjenke što dovodi do dezintegracije. Osim toga, stvaraju se manje količine vodikovog peroksida koji je sam po sebi baktericidan (Tiwari i Mason, 2012).

Dokazano je kako su gram-pozitivne bakterije manje otporne na ultrazvuk od gram negativnih. Ovo se pripisuje debljoj staničnoj stjenci gram pozitivnih bakterija. Ultrazvuk se pokazao kao manje učinkovita opcija kod tretiranja spora. Kvasci su, također, pokazali prilično visoku otpornost na fizikalne efekte ultrazvuka zbog svoje grube strukture koja nije narušena mikrostrujanjima. Za inaktivaciju enzima djelovanjem ultrazvuka potreban je dugotrajniji tretman jer je inaktivacija enzima posljedica denaturacije proteina, kemijskih reakcija djelovanja slobodnih radikala ili djelovanjem mehaničkih sila nastalih kavitacijom mjehurića (Tiwari i Mason, 2012).

Saeeduddin i sur. (2016) dokazali su redukciju početnog broja mikroorganizama, dokazano je i povećanje u sadržaju K, Na, Fe, Mg i Zn, dok je sadržaj glukoze, fruktoze i saharoze u soku od kruške ostao nepromijenjen, a antioksidativna aktivnost se povećala uključujući i koncentraciju askorbinske kiseline. U drugom istraživanju Saeeduddin i sur. (2015) utvrđena je inaktivacija enzima u soku od kruške. Uočeno je kako je aktivnost enzima POD, PE i PPO svedena na 4,3%, 3,25% i 1,91%.

Ultrazvuk se može primijeniti na proizvod različitom opremom uključujući ultrazvučne kupke, ultrazvučne sonde i vibrirajuće sustave koji mogu biti ugrađeni u kontinuiranu procesnu liniju. Za tekuće namirnice, obrada se provodi u reaktorima (diskontinuirano/šaržno) ili u kontinuiranim linijama, gdje se tekućina prenosi kroz ultrazvučnu komoru s paralelnim vibrirajućim pločama ili u radijalnim vibrirajućim cijevima (Barba i sur., 2018).

### 2.3.2.4. Tretiranje zračenjem

Zračenje podrazumijeva izlaganje namirnice elektromagnetskim zrakama, što produljuje trajnost proizvoda kroz inaktivaciju mikroorganizama. UV (ultra-violet) zrake su zrake valne duljine 200-280 nm te su one najkorištenije u prehrambenoj industriji (Roobab i sur., 2018). Među različitim podjelama UV zračenja, UV-C zrake su uključene u tehnologiju očuvanja hrane jer mogu učinkovito inaktivirati bakterije, kvasce, viruse i druge mikroorganizme (Barba i sur., 2018).

Inaktivacija mikroorganizama počinje s DNK (deoksiribonukleinska kiselina) apsorpcijom UV zračenja nakon čega nastaju umrežene pirimidinske nukleozidne baze, koje uzrokuju mutacije DNK. Ovaj proces izravno utječe na normalno funkcioniranje DNK i sprječava reprodukciju mikroorganizama. Energija UV zraka od najmanje 400 J/m<sup>2</sup> je dovoljna za inaktivaciju mikroorganizama, međutim postoje i drugi čimbenici koji utječu na učinkovitost tretmana: vrijeme izlaganja, vrsta mikroorganizama prisutnih u materijalu, doza zračenja, naspina gustoća i debljina hrane (Roobab i sur., 2018). Primjenom UV zračenja moguće je postići i toksikološku sigurnost jer UV zračenje može smanjiti razine toksina, poput patulina u svježoj jabukovači (Gomez-Lopez, Koutchma i Linden, 2012).

Zračenje se često koristi u prehrambenoj industriji sa svrhom produljenja trajnosti proizvoda, sterilizaciju, inhibiciju rasta parazita i insekata, odgađanje dozrijevanja, inaktivaciju određenih patogenih mikroorganizama i virusa, odnosno njihovo smanjenje na sigurnu razinu (Roobab i sur., 2018). Danas postoje komercijalno dostupne lampe koje mogu proizvesti svjetlo u germicidnom području za osiguranje sigurnosti hrane, ali i u medicinske svrhe. Ti izvori uključuju živine (Hg) žarulje koje mogu emitirati kontinuirano UV zračenje ili pulsirajuće UV zračenje (žarulje obično punjene ksenonom (Xe)). Kontinuirana emisija je niske razine snage dok je pulsirajuće zračenje visoke snage (Barba i sur., 2018).

Zbog relativno male mogućnosti ulaska u materijal, UV zračenje se koristilo samo za površinsku dekontaminaciju i za dekontaminaciju pakiranja. Međutim, razvojem novih reaktora omogućena je učinkovita primjena UV zraka u tretiranju tekućih namirnica. Uslijed slabije mogućnosti prodiranja UV zraka u materijal, postoji mogućnost gdje mikroorganizmi smješteni daleko od izvora UV zračenja ostaju aktivni (Gomez-Lopez, Koutchma i Linden, 2012).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. Zadatak rada

Zadatak rada je ispitati odabrana kvalitativna svojstva tradicionalne kruške Miholjače i jedne od najpoznatijih komercijalnih sorti krušaka, Viljamovke. Nadalje, cilj je usporediti odabrane fizikalno-kemijske parametre, te mikrobiološku stabilnost u kašastom soku obje sorte konzervirane konvencionalnim putem, odnosno pasterizacijom, i obrađene primjenom tehnika minimalnog procesiranja: mikrovalovima, ultrazvukom, i njihovom kombinacijom.

Zadatak:

1. Izmjeriti čvrstoću cijelih plodova ispitivanih sorti
2. Odrediti fizikalno-kemijske parametre krušaka: ukupnu i topljivu suhu tvar, šećere (ukupni i reducirajući), ukupne kiseline, pH vrijednost, sadržaj pektinskih i fenolnih tvari
3. Izmjeriti parametre boje kaša nakon blanširanja
4. Pripremiti kašaste sokove i provesti zadane metode obrade
5. Ispitati odabrane fizikalno-kemijske parametre (topljivu suhu tvar i pH vrijednost), sadržaj fenolnih tvari i mikrobiološku stabilnost sokova nulti dan (neposredno nakon pripravljanja uzoraka)
6. Pratiti održivost sokova, odnosno mikrobiološku stabilnost tijekom 40 dana.

### 3.2. Materijali

Ispitivanja su provedena na plodovima kruške Miholjače ubrane u voćnjaku OPG Golub, u okolici Našica. Sorta Viljamovka nepoznatog je proizvođača, iz okolice Osijeka. Korišteni su neoštećeni plodovi približno iste veličine (**Slika 6**).



**Slika 6** Kruške sorte Miholjača i Viljamovka

Reagensi korišteni u analizama nabavljeni su od proizvođača Kemika (Zagreb).

### 3.2.1. Priprema kaše za fizikalno-kemijske analize

Plodovi krušaka oprani su i posušeni. Za mjerenje čvrstoće korišteni su cijeli plodovi. Za ostale analize, nakon odvajanja otpada (peteljka, dijelovi sjemene lože, ostaci čaške), plodovi su djelomično usitnjeni nožem i pomoću ručnog miksera samljeveni u kašu.

Ekstrakcija uzoraka provedena je u etanolu pri 20 °C tijekom 15 minuta, pod utjecajem ultrazvuka (DT 52 H, Bandelin, Njemačka). Dobiveni ekstrakti nakon filtracije korišteni su za određivanje ukupnih fenola.

### 3.2.2. Priprema soka

Kruške su oprane i osušene na zraku na sobnoj temperaturi. Nakon čišćenja i rezanja, kriške krušaka blanširane su u kipućoj otopini 1%-tne limunske kiseline 3 minute, ohlađene i usitnjene štapnom miješalicom. Pire je pripremljen pomoću električnog mlina pasiranjem kroz sito veličine pora 1 mm. Zatim je priređen neobrađeni (kontrolni) nektar koji je korišten za daljnju obradu. Udio kaše u nektaru određen je sukladno Pravilniku (NN 48/2013). Homogenizacijom sastojaka: kaše (50%), šećera (8 %), limunske kiseline (0,15 %) i vodovodne vode pripremljeni su uzorci ispitivanih sokova. Nektari su tretirani u ultrazvučnoj kupki (Bandelin Sonorex RK 100, Njemačka) 15 minuta, u mikrovalnoj pećnici (Daewoo, KOR-63A5, Južna Koreja) pri 800 W 2 minute, ili kombinirano. Svaki uzorak je sadržavao 13,5%, odnosno 13,8% topljive suhe tvari, uz pH vrijednost 3,2. Pasterizirani nektar (P) pripremljen je pasterizacijom pri 85 °C u trajanju od 20 minuta, u bočicama volumena 100 mL.

## 3.3. Metode

### Fizikalno-kemijske analize

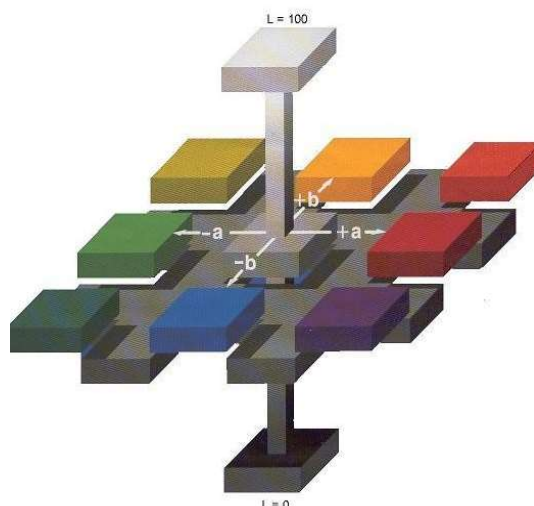
Metode koje su korištene za analizu fizikalno-kemijskog sastava su:

- **mjerenje boje**



**Slika 7** Kromametar Minolta CR-300 s nastavkom CR-A70

Mjerenje boje uzoraka provedeno je pomoću kromametra CR-300 (Minolta, Japan) prikazanog **Slikom 7**. Mjerna glava ovog kromametra koristi difuzno osvjetljenje pri  $0^\circ$ . Tijekom mjerenja svjetlost koja se reflektira okomito od površine uzorka skuplja se u šest silikonskih fotoćelija. Računalo zapisuje podatke, koji mogu biti izraženi u pet sustava. U radu su korišteni sustavi  $L^*a^*b^*$  (**Slika 8**) i  $L^*C^*h^\circ$ .  $L^*$  vrijednost određuje je li nešto svijetlo ili tamno. Ako  $L^*$  iznosi 0, tada je predmet crne boje, a ako  $L^*$  iznosi 100, onda je bijele boje.  $a^*$  vrijednost može biti pozitivna ili negativna. Ako je pozitivna, tada je rezultat mjerenja crvena boja, a ako je negativna onda je rezultat zelena boja.  $b^*$  vrijednost također može biti pozitivna ili negativna. Pozitivna vrijednost predstavlja nijansu žute boje, a negativna plave boja.  $L^*C^*h^\circ$  sustav ima jednaki parametar  $L^*$  kao i Lab sustav. Sadrži i parametar  $C^*$  (engl. *chroma*), koji predstavlja intenzitet boje, i parametar  $h^\circ$  (engl. *hue*), koji se odnosi na nijansu boje. Ukoliko je vrijednost parametra  $C^*$  pozitivna boja je neutralna, a negativna znači da je boja potpuno zasićena. Kut promjene boje *hue angle* ima vrijednosti od  $0$  do  $360^\circ$ . Kada je vrijednost  $0^\circ$ , tada je boja crveno-purpurna,  $90^\circ$  je žuta nijansa,  $180^\circ$  je zelena, a  $270^\circ$  plava.



**Slika 8** Prikaz boja u  $L^*a^*b^*$  sustavu

Mjerenje boje kaše provedeno je u nastavku CR-A50, koji je namijenjen za mjerenje kašastih, pastoznih i dehidratiranih uzoraka, a mjerenje soka u kivetu, koja se postavlja u nastavak CR-A70.

Na temelju izmjerenih  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  vrijednosti obavljen je izračun ukupne promjene boje ( $\Delta E$ ), prema izrazu (4):

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2} \quad (4)$$

$\Delta L$ ,  $\Delta a$  i  $\Delta b$  - razlika vrijednosti u odnosu na nulti dan ili kontrolni uzorak ( $\Delta E_K$ )

**Tablica 1** Veza između izračunate promjene boje ( $\Delta E$ ) i ljudske percepcije boje

$\Delta E$	Vidljivost razlike ljudskim okom
< 0,2	Nije vidljiva razlika
0,2 – 1	Vrlo mala vidljivost razlike
1 – 3	Mala vidljivost razlike
3 – 6	Prosječna vidljivost razlike
> 6	Velika vidljivost razlike

- mjerenje teksture

Teksturometar (**Slika 9**) je u ovom radu korišten za mjerenje sile penetracije mjernog tijela u uzorak. Uzorak se stavlja na podlogu instrumenta („heavy – duty” platform, engl.), a kao mjerno tijelo koristio se cilindrični nastavak promjera 2 mm, izrađen od nehrđajućeg čelika.

- parametri testa kompresije:

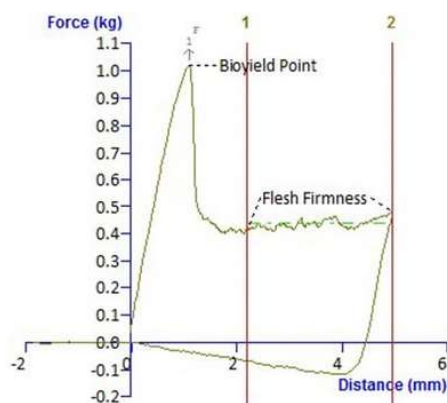
Brzina prije i tijekom mjerenja: 1,5 mm/s; Brzina nakon mjerenja: 10 mm/s; Sila reagiranja: 25 g; Dubina mjerenja: 5 mm

Na svakom od 10 plodova napravljena su dva mjerenja, odnosno izmjerene su dvije strane ploda.

Rezultati mjerenja maksimalne sile penetracije (*bioyield point*, BP) i čvrstoće (*flesh firmness*, FF) obrađeni su na računaru u programima Texture Expert Version 1.22 Software (Stable Micro System, Velika Britanija) i MS Excel.



**Slika 9** Teksturometar TA.XT plus (Stable Micro Systems, Velika Britanija)



**Slika 10** Parametri teksture mjereni teksturometrom

- određivanje ukupne suhe tvari - sušenjem u vakuum sušioniku (VS-50 SC, Kambič, Slovenia)
- određivanje topljive suhe tvari - refraktometrijski (Carl Zeiss, Njemačka)
- određivanje ukupnih kiselina, izražene kao limunska kiselina (titracijski)



- određivanje pH vrijednosti - pomoću pH metra (Mettler Toledo, Švicarska)
- određivanje šećera (prirodnih i ukupnih) metodom po Luff-Schoorlu
- određivanje pektinskih tvari (gravimetrijski, kao Ca – pektat)
- određivanje ukupnih fenola spektrofotometrijski (modificiranom Folin-Ciocalteu-ovom metodom)

#### Mikrobiološke analize

Mikrobiološke analize uzoraka netretiranog i tretiranog soka kruške su obuhvatile sljedeće skupine mikroorganizama:

- aerobne, mezofilne bakterije (AMB)
- enterobakterije (E)
- sulfitoreducirajuće klostridije (SRK)
- bakterije roda *Salmonella*
- plijesni i kvasce

#### Aerobne, mezofilne bakterije

Nakon pripreme osnovnog razrjeđenja  $10^{-1}$  (10 g/mL uzorka + 90 mL sterilne fiziološke otopine), uzorak je, metodom dilucije, serijski razrijeđen kroz niz epruveta s 9 mL sterilne fiziološke otopine. Poslije prenošenja volumena inokuluma u petrijeve zdjelice i ulijevanja podloge za bakterije (TGK agar, Triptički agar s glukozom i ekstraktom kvasca, Liofilchem, Italija), uzorci su inkubirani do 7 dana pri 25°C. Porasle kolonije su prebrojane i broj preračunat na 1 g uzorka (CFU, colony forming units ili broj živih stanica).

#### Enterobakterije

Iz osnovnog razrjeđenja ( $10^{-1}$ ), 0,5 mL inokuluma je preneseno u zdjelice, uliven je sterilan ljubičasto crveni žučni glukozni agar (VRBGA, Liofilchem, Italija), rastopljen i ohlađen pri 45°C. Nakon skrutnjavanja podloge, u zdjelice je uliveno dodatnih 15 mL sterilne podloge radi postizanja fakultativno anaerobnih uvjeta. Zdjelice su inkubirane pri 37°C 24 sata. Enterobakterije na VRBGA podlozi rastu u obliku crvenih kolonija većih od 0,5 mm s crvenom zonom.

#### Sulfitoreducirajuće klostridije

Osnovno razrjeđenje  $10^{-1}$  je pasterizirano u vodenoj kupelji 10 minuta pri 80°C radi uništavanja svih vegetativnih oblika stanica. Nakon hlađenja, 0,1 mL inokuluma preneseno je u epruvete sa sterilnom podlogom SPS agarom (Sulphite Polymyxin Sulfadiazine agar,

Liofilchem, Italija). Nakon skrutnjavanja podloge u hladnoj vodi, epruvete su inkubirane pri 37°C 3-5 dana. Sulfitoreducirajuće klostridije rastu kao crne kolonije u dubini agara.

Bakterije roda *Salmonella*

Bakterije roda *Salmonella* su, u analiziranim uzorcima, određene metodom izravnog prebrojavanja. Iz osnovnog razrjeđenja, prenesen je 0,1 mL inokuluma na površinu ksiloza lizin dezoksikolatnog agara (XLD agar, Liofilchem, Italija) i razmazan sterilnim štapićem po Drigalskom. Nakon inkubacije od 24 – 48 h pri 37°C, salmonele rastu u obliku crnih kolonija.

Plijesni i kvasci

Nakon pripreme osnovnog razrjeđenja, prenesen je odgovarajući inokulum (nakon razrjeđivanja metodom dilucije) u zdjelicu u koju je ulivena podloga za plijesni i kvasce krumpirov glukozni agar (PDA, Liofilchem, Italija). Poslije inkubacije od 7 dana pri 25°C, prebrojane su kolonije kvasaca i plijesni i njihov broj je preračunat na 1 g uzorka.

Sve analize su napravljene u dva ponavljanja, a aerobne, mezofilne bakterije te plijesni i kvasci iz dva razrjeđenja.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Očuvanje starih voćki kao vrijednog izvora genetskog materijala i svojstava koja imaju pojedine tradicionalne i udomaćene sorte od izuzetne je važnosti. Stoga je jedan od zadataka rada usporediti fizikalna i fizikalno-kemijska svojstva tradicionalne kruške sorte Miholjača (M), s udomaćenom komercijalnom sortom Viljamovkom (V). Kako bi se ispitaio utjecaj pojedinih metoda obrade i procesiranja na održivost kašastih sokova, cilj rada je provesti mikrobiološku analizu sokova nakon pripreme i tijekom čuvanja sokova. Istraživanje je obuhvatilo i analizu boje sokova, te sadržaj ukupnih fenola u ispitivanim sokovima.

Literaturni podaci o svojstvima i sastavu krušaka uglavnom su ograničeni na komercijalne sorte krušaka, pa je pretpostavka da će neki od rezultata dati doprinos boljem upoznavanju skupine moštenki, kojoj pripada ispitivana tradicionalna sorta Miholjača. Prosječna masa plodova sorte Miholjača mjerena na 20 plodova bila je  $126,88 \pm 8,63$  g. Ispitivani plodovi sorte Viljamovka imali su prosječnu masu  $182,33 \pm 4,51$  g, što je u skladu s literaturnim vrijednostima (Gliha, 1997).

Ispitivanje čvrstoće koristi se kao mjera zrelosti mnogih vrsta voća, između ostalog i krušaka. Rezultati sorte Viljamovka sukladni su literaturnim vrijednostima (Gliha, 1997). Usporedbom dviju ispitivanih sorti nije zabilježena značajna razlika u čvrstoći (**Tablica 2**). Za sortu Miholjaču, po našim saznanjima, ne postoje literaturni podaci o čvrstoći plodova mjerenoj teksturometrom, osim prethodnih istraživanja (Golubić, 2023).

**Tablica 2** Maksimalna sila penetracije i čvrstoća plodova kruške sorte Miholjača (M) i Viljamovka (V)

Uzorak	BP (g)	FF (g)
<b>M</b>	$488,11 \pm 29,77$	$170,99 \pm 40,11$
<b>V</b>	$482,32 \pm 68,06$	$161,64 \pm 22,70$

$\bar{x} \pm SD$  srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija

BP - bioyield point - maksimalna sila penetracije

FF - flesh firmness - čvrstoća mezokarpa

U plodovima obje sorte su određeni parametri: ukupna suha tvar, topljiva suha tvar, ukupne kiseline i pH vrijednost, zatim udio reducirajućih i ukupnih šećera, sadržaj pektinskih i fenolnih tvari.

Na osnovi rezultata kemijskog sastava (**Tablica 3**) može se zaključiti da je tradicionalna sorta Miholjača, zahvaljujući većoj suhoj tvari, bogatija ispitivanim parametrima kemijskog sastava od Viljamovke. Usporedbom dobivenih rezultata za kemijski sastav sorte Miholjače veći je i udio topljive suhe tvari u koji najvećim dijelom ulaze ukupni šećeri i kiseline, ali i drugi spojevi topljivi u vodi.

**Tablica 3** Neki parametri kemijskog sastava i pH vrijednost svježih plodova

Parametar	M	V
Ukupna suha tvar (%)	24,45 ± 0,31	16,44 ± 0,02
Topljiva suha tvar (%)	18,6 ± 0,00	13,70 ± 0,00
Ukupne kiseline (%)	0,32 ± 0,00	0,23 ± 0,00
pH	4,29 ± 0,00	4,05 ± 0,00
Šećeri - reducirajući (%)	7,89 ± 0,00	7,84 ± 0,00
Šećeri - ukupni (%)	9,17 ± 0,00	8,02 ± 0,00
Pektinske tvari (%)	0,372 ± 0,02	0,275 ± 0,06
Fenolne tvari (g/L)	0,381 ± 0,05	0,370 ± 0,02

Boja je jedan od najvažnijih čimbenika kvalitete svježih krušaka i proizvoda od krušaka. Plodovi krušaka su najprije zelene boje koja se tijekom zrenja mijenja zbog razgradnje klorofila, i do izražaja dolaze dominantni pigmenti iz skupine flavonoida.

Mjerenje boje obuhvatilo je najprije kaše iz kojih su priređeni sokovi. Budući oštećenje tkiva stimulira respiraciju, inducira sintezu etilena, oksidaciju fenola, enzimsku aktivnost i razvoj mikroorganizama, sve to vodi ubrzanom gubitku kakvoće, posebice u pogledu boje (Permadi i sur., 2024). Zbog toga je blanširanje provedeno u 1%-tnoj otopini limunske kiseline. Cijeli postupak pripreme sokova bilo je potrebno provesti u što kraćem vremenu nakon blanširanja. U **Tablici 4** prikazani su rezultati mjerenja boje blanširane kaše.

**Tablica 4** Parametri boje blanširane kaše kruške korištene za pripremu soka

Uzorak	L*	a*	b*	C*	h°
M	35,81 + 0,19	3,97 + 0,19	12,94 + 0,19	13,55 ± 0,06	73,10 ± 0,30
V	44,12 + 0,18	-1,77 + 0,02	13,46 + 0,19	13,26 ± 0,35	97,40 ± 0,30

U tehnološkoj zrelosti meso ploda Viljamovke je žućkasto-bijele boje, za razliku od Miholjače koja ima žuto-smeđu boju mesa. Parametar C\* pokazao je pozitivne vrijednosti što znači da je boja kaše neutralna, odnosno nije potpuno zasićena. Kao što je i očekivano, višu L\* vrijednost, koja označava svjetlinu uzoraka, nižu a\* vrijednost (označava prijelaz od zelene prema crvenoj boji) i višu h° vrijednost, koja pokazuje kut promjene boje u odnosu na a\* parametar imala je kaša Viljamovke (vrijednost 0 ° je crveno-purpurna, 90 ° označava žutu nijansu).

Polifenoli su bioaktivne tvari koje posjeduju antioksidativna svojstva te na taj način pozitivno djeluju na zdravlje ljudi. Poznato je kako kora (pokožica) krušaka kod komercijalnih sorti sadrži veći udio fenolnih spojeva u odnosu na mezokarp (meso kruške) te su spojevi koji čine fenolni profil u kori brojniji (fenolne kiseline, flavoni, flavonoli, flavanoli i dr.). Prethodna istraživanja sorte Miholjača potvrdila su višu prisutnost polifenolnih spojeva u kori kruške (Golubić, 2023). Dobiveni sadržaj ukupnih fenola u pokožici (0,429 g/L) bio je i više nego dvostruko veći od udjela u mesu ploda kruške (0,183 g/L), dok je sadržaj polifenola u cijelom plodu niži od rezultata prikazanih u **Tablici 3** (0,247 g/L).

Budući je predmet istraživanja ovog rada sok, za očekivati je kako će koncentracija fenolnih tvari u mezokarpu ploda više doprinijeti ukupnom sadržaju polifenola. Za razliku od kontrolnog, neobrađenog soka (N), u obrađenim sokovima udio fenolnih tvari značajno je različit, što je vidljivo iz **Tablice 5**.

**Tablica 5** Udio fenolnih tvari u ispitivanim sokovima neposredno nakon pripreme

Uzorak	M	V
N	0,238 ± 0,002	0,230 ± 0,020
UZV	0,451 ± 0,006	0,147 ± 0,002
MV	0,690 ± 0,011	0,131 ± 0,009
UZV+MV	0,580 ± 0,010	0,222 ± 0,016
P	0,493 ± 0,008	0,263 ± 0,001

N-neobrađeni sok; UZV-sok obrađen ultrazvukom; MV-sok obrađenim mikrovalovima; KOMB-sok obrađen ultrazvukom i mikrovalovima; P-pasterizirani sok

U usporedbi s komercijalnom, tradicionalna sorta sadržavala je podjednaku koncentraciju polifenola u neobrađenom soku (0,238 g/L, odnosno 0,230 g/L), ali su u sokovima Miholjače nakon obrade, odnosno konzerviranja, zabilježene značajno veće koncentracije fenolnih tvari. Razlog za to može biti bolje otpuštanje polifenola, odnosno uspješnija ekstrakcija iz kruške Miholjače, zahvaljujući djelovanju ultrazvuka, mikrovalova i njihove kombinacije. Osim toga, zbog izuzetno mekane teksture u središtu ploda, sorta Miholjača je pokazala bolje iskorištenje kod pasiranja, pa su stoga i uvjeti ekstrakcije bili povoljniji.

Topljiva suha tvar (TST) i pH vrijednost sokova nakon pripreme i tijekom čuvanja pri 4 °C nije se mijenjala (rezultati nisu prikazani). Saeduddin i sur. (2015) su istražujući utjecaj ultrazvuka i pasterizacije na TST, ukupne kiseline i pH vrijednost soka kruške došli do istog zaključka. U uzorcima soka od sorte Miholjača TST iznosila je 13,8%, uz pH 3,2, dok je u sokovima Viljamovke TST bila 13,5%, uz istu pH vrijednost.

U **Tablicama 6 i 7** prikazane su izmjerene vrijednosti parametara boje. Isto tako, prikazane su vrijednosti ukupne promjene boje izračunate u odnosu na kontrolni, neobrađeni uzorak ( $\Delta E_k$ ) i promjena boje unutar uzorka ( $\Delta E$ -izračunato u odnosu na parametre izmjerene nulti dan).

Tablica 6 Parametri boje u sokovima sorte Miholjača tijekom skladištenja pri 4 °C

N	L*	a*	b*	C*	h°	$\Delta E_k$	$\Delta E$
„0“	38,51 ± 0,22	2,29 ± 0,11	15,97 ± 0,28	15,99 ± 0,52	79,20 ± 0,44	-	-
8.	-	-	-	-	-	-	-
40.	-	-	-	-	-	-	-
UZV	L*	a*	b*	C*	h°	$\Delta E_k$	$\Delta E$
„0“	35,07 ± 0,33	2,04 ± 0,10	14,27 ± 0,40	14,82 ± 0,26	81,41 ± 1,28	3,85	-
8.	36,04 ± 0,07	2,19 ± 0,02	14,89 ± 0,14	15,07 ± 0,05	81,20 ± 0,30	2,70	1,16
40.	-	-	-	-	-	-	-
MV	L*	a*	b*	C*	h°	$\Delta E_k$	$\Delta E$
„0“	35,25 ± 0,10	2,09 ± 0,05	14,88 ± 0,20	14,94 ± 0,30	81,08 ± 0,40	3,44	-
8.	35,56 ± 0,18	2,11 ± 0,10	14,89 ± 0,30	14,98 ± 0,20	81,00 ± 0,66	3,15	0,31
40.	-	-	-	-	-	-	-
KOMB	L*	a*	b*	C*	h°	$\Delta E_k$	$\Delta E$
„0“	35,64 ± 0,09	2,18 ± 0,03	14,67 ± 0,08	14,83 ± 0,04	81,60 ± 0,20	3,15	0,51
8.	36,01 ± 0,07	2,30 ± 0,05	15,00 ± 0,10	15,21 ± 0,15	80,99 ± 0,30	2,68	2,11
40.	37,61 ± 0,12	2,70 ± 0,03	15,23 ± 0,07	15,63 ± 0,06	79,80 ± 0,20	1,24	-
P	L*	a*	b*	C*	h°	$\Delta E_k$	$\Delta E$
„0“	44,57 ± 0,22	1,44 ± 0,05	9,39 ± 0,10	9,46 ± 0,23	80,70 ± 0,30	8,99	-
8.	40,72 ± 0,61	2,31 ± 0,16	10,11 ± 0,25	10,06 ± 0,13	78,99 ± 0,55	6,26	4,01
40.	34,08 ± 0,07	3,67 ± 0,13	11,09 ± 0,06	11,53 ± 0,16	71,90 ± 0,40	6,73	10,86

$\Delta E_k$  - ukupna promjena boje u odnosu na kontrolni, neobrađeni uzorak (N)

$\Delta E$  - ukupna promjena boje unutar uzorka

Iz rezultata je vidljivo da su najsvjetliji uzorci kod obje sorte nulti dan bili svježi sokovi i pasterizirani sokovi. Boja neobrađenog soka Miholjače izmjerena je samo neposredno nakon pripreme, budući je sok 8. dan mjerenja bio pokvaren. Sokovi Viljamovke pokazivali su više vrijednosti žute boje, zatim zelenu nijansu boje (negativne vrijednosti  $a^*$ , vrijednosti  $h^\circ$  više od  $90^\circ$ ). Sokovi sorte Miholjača bilježili su crvenu nijansu boje (pozitivne  $a^*$  vrijednosti), što je u skladu i s nižim  $h^\circ$  vrijednostima (ton boje) koje nisu prelazile  $82^\circ$  ( $0^\circ$ , crveno-purpurna boja,  $90^\circ$  je žuta nijansa). Parametar  $C^*$  pokazao je pozitivne vrijednosti što znači da je boja sokova neutralna. Više  $C^*$  vrijednosti zabilježene su u sokovima Miholjače. Najveći utjecaj na promjenu boje sokova imala je pasterizacija, posebno u soku sorte Miholjača ( $\Delta E$  vrijednosti  $> 6$ ), što, s obzirom na ljudsku percepciju, znači veliku promjenu boje. Osim uzoraka pasteriziranog soka, vrijednosti  $\Delta E$  u uzorcima u odnosu na nulto mjerenje su  $< 3$ , što označava malu vidljivost razlike. Kada se promatra ukupna promjena boje u odnosu na neobrađeni uzorak tijekom skladištenja,  $\Delta E_k$  vrijednosti su pokazale da uzorci obrađeni UZV i MV pokazuju vrlo malu i malu vidljivost razlike, opet uz izuzetak pasteriziranog soka. Önal i sur. (2021) su



također utvrdili pozitivan učinak predtretmana ultrazvukom na kvalitativna svojstva sušenih krušaka.

**Tablica 7** Parametri boje u sokovima sorte Viljamovka tijekom skladištenja pri 4 °C

N	L*	a*	b*	C*	h°	$\Delta E_K$	$\Delta E$
„0“	41,50 ± 0,32	-1,11 ± 0,07	5,54 ± 0,38	5,38 ± 0,32	101,20 ± 0,46	-	-
8.	-	-	-	-	-	-	2,72
40.	-	-	-	-	-	-	-
UZV	L*	a*	b*	C*	h°	$\Delta E_K$	$\Delta E$
„0“	39,37 ± 0,53	-1,04 ± 0,05	4,37 ± 0,42	4,86 ± 0,09	103,13 ± 1,98	2,43	-
8.	41,52 ± 0,40	-0,73 ± 0,05	5,46 ± 0,28	5,48 ± 0,09	97,20 ± 0,10	0,39	2,18
40.	-	-	-	-	-	-	-
MV	L*	a*	b*	C*	h°	$\Delta E_K$	$\Delta E$
„0“	37,93 ± 0,02	-1,34 ± 0,03	3,72 ± 0,17	3,84 ± 0,08	109,10 ± 0,87	4,01	-
8.	39,53 ± 0,09	-1,02 ± 0,09	4,44 ± 0,18	4,00 ± 0,31	103,70 ± 0,92	2,26	1,78
40.	-	-	-	-	-	-	-
KOMB	L*	a*	b*	C*	h°	$\Delta E_K$	$\Delta E$
„0“	38,40 ± 0,03	-1,18 ± 0,01	3,91 ± 0,11	4,59 ± 0,36	105,70 ± 0,62	3,50	-
8.	39,35 ± 0,29	-0,82 ± 0,06	4,05 ± 0,23	4,14 ± 0,33	102,00 ± 1,15	2,63	1,03
40.	-	-	-	-	-	-	-
P	L*	a*	b*	C*	h°	$\Delta E_K$	$\Delta E$
„0“	42,41 ± 0,48	-1,48 ± 0,04	4,78 ± 0,03	4,87 ± 0,32	107,93 ± 0,83	1,24	-
8.	39,52 ± 0,18	-1,20 ± 0,07	3,03 ± 0,07	3,19 ± 0,03	111,53 ± 0,93	3,20	3,39
40.	38,02 ± 0,52	1,10 ± 0,22	5,23 ± 0,55	6,10 ± 0,20	105,09 ± 0,87	4,13	5,11

$\Delta E_K$  -ukupna promjena boje u odnosu na kontrolni, neobrađeni uzorak (N)

$\Delta E$  -ukupna promjena boje unutar uzorka

Tijekom skladištenja pri 4 °C, kako je i očekivano, najbolju održivost je postigao pasterizirani sok.

Mikrobiološki rezultati

**Tablica 8** Rezultati mikrobioloških parametara plodova kruške Miholjače i Viljamovke\*

Uzorak	Aerobne, mezofilne bakterije	Plijesni i kvasci
M	1,75 × 10 <sup>3**</sup>	7 × 10 <sup>2</sup>
V	8,7 × 10 <sup>3</sup>	1,7 × 10 <sup>3</sup>

\* niti u jednom analiziranom uzorku u ovom radu nisu pronađene enterobakterije, sulfitoreducirajuće klostridije niti bakterije *Salmonella* sp.

\*\* rezultati predstavljaju broj živih stanica u 1 g uzorka

Iz **tablice 8** može se uočiti kako je broj aerobnih, mezofilnih bakterija u uzorku kruške Miholjače gotovo 5 puta manji, u usporedbi s rezultatima kruške sorte Viljamovka. Slično je i s rezultatima plijesni i kvasaca gdje je njihov broj gotovo 2,5 puta manji u Miholjači, u usporedbi s Viljamovkom. Potrebno je napomenuti kako se sorta Miholjača konzumira kada započne proces gnjiljenja (slično kao mušmula) budući je prije toga trpkog okusa. Mikroorganizmi, uz proces zrenja, potpomažu razvoju ugodnog i slatkog okusa. Naravno, što je plod više gnjio, u njemu je prisutno i više mikroorganizama. Ako se usporede vrijednosti aerobnih, mezofilnih bakterija u potpuno zrelih plodovima kruške Miholjače, njihov broj može prelaziti i  $10^8$  stanica/g. Iako se, općenito, smatra kako broj ove skupine bakterije od  $10^6$  stanica/g je posljedica kvarenja, u slučaju plodova koji se konzumiraju u ovakvom stanju, povećan broj bakterija i plijesni i kvasaca (i do  $10^5$  stanica/g) ne znači i njegovo kvarenje.

**Tablica 9** Rezultati mikrobioloških parametara soka kruške Miholjače\*

Uzorak	Aerobne, mezofilne bakterije			Plijesni i kvasci		
	0. dan	8. dan	40. dan	0. dan	8. dan	40. dan
<b>Kontrola Nepasterizirani</b>	$3,8 \times 10^4$ *	TNTC***	-	$2,1 \times 10^3$	TNTC	-
<b>Pasterizirani</b>	0	0	0	0	0	0
<b>Mikrovalovi</b>	0	$7,3 \times 10^2$	TNTC	0	$8,5 \times 10^2$	TNTC
<b>Ultrazvuk</b>	$2,3 \times 10^3$	TNTC	TNTC	$2,33 \times 10^3$	TNTC	TNTC
<b>Kombinacija ultrazvuka i mikrovalova</b>	0	$1,4 \times 10^2$	TNTC	0	$1,4 \times 10^2$	TNTC

\* niti u jednom analiziranom uzorku u ovom radu nisu pronađene enterobakterije, sulfitoreducirajuće klostridije niti bakterije *Salmonella* sp.

\*\* rezultati predstavljaju broj živih stanica u 1 g uzorka

\*\*\* TNTC = too numerous to count, prevelik broj za prebrojavane

Rezultati prikazani **tablicom 9** upućuju na pasterizaciju kao najučinkovitiji tretman soka od kruške budući su i aerobne, mezofilne bakterije te plijesni i kvasci uspješno uništeni primjenom topline. Za kraće čuvanje može se preporučiti i kombinacija ultrazvuka i mikrovalova stoga što je broj i bakterija i gljiva jednak, 140 stanica/g, međutim, upravo zbog njihove prisutnosti, tj. preživljavanja, stanice se umnožavaju i uzorak se kvare do 40 dana skladištenja. Iako nije moguće dugo skladištenje uzoraka tretiranih kombinacijom ultrazvuka i mikrovalova, zbog većeg očuvanja nutritivno i zdravstveno vrijednih sastojaka primjena ove kombinacije nije zanemariva, pod uvjetom pažljivog skladištenja pri niskoj temperaturi. Iako se mikrovalovima postiže smanjenje početnog broja mikroorganizama, preostali se umnožavaju i uzrokuju neželjenu fermentaciju, tj. kvarenje soka. Primjena ultrazvuka se nije pokazala dovoljno učinkovitom, iako se može uočiti smanjenje broja aerobnih, mezofilnih bakterija i to za više od 16,5 puta, njihov zaostali broj uzrokuje vrlo brzo kvarenje. Djelovanjem ultrazvuka na plijesni i kvasce nije postignuto smanjenje broja stanica koji nastavljaju svoj rast i metaboličku aktivnost te pridonose kvarenju soka.

**Tablica 10** Rezultati mikrobioloških parametara soka kruške Viljamovke\*

Uzorak	Aerobne, mezofilne bakterije			Plijesni i kvasci		
	0. dan	8. dan	40. dan	0. dan	8. dan	40. dan
<b>Kontrola Nepasterizirani</b>	$8,7 \times 10^3$	$1,27 \times 10^5$	-	$2 \times 10^3$	$4,6 \times 10^6$	-
<b>Pasterizirani</b>	0	0	0	0	0	0
<b>Mikrovalovi</b>	0	0	0	0	0	0
<b>Ultrazvuk</b>	$5,4 \times 10^3$	$5,48 \times 10^5$	$5,62 \times 10^6$	$2,82 \times 10^4$	$3,32 \times 10^6$	-
<b>Kombinacija ultrazvuka i mikrovalova</b>	0	$1 \times 10^3$	TNTC	0	10	TNTC

\* niti u jednom analiziranom uzorku u ovom radu nisu pronađene enterobakterije, sulfitoreducirajuće klostridije niti bakterije *Salmonella* sp.

\*\* rezultati predstavljaju broj živih stanica u 1 g uzorka

\*\*\* TNTC = too numerous to count, prevelik broj za prebrojavane

Kao što se može vidjeti iz rezultata populacije aerobnih, mezofilnih bakterija iz **tablica 9 i 10**, u kruški sorte Viljamovka, njihov broj je gotovo 4,5 puta manji, u usporedbi sa sokom kruške sorte Miholjača. Samim tim, budući je početna populacija soka kruške Viljamovke manja, i rezultati tretiranja te skladištenja su bolji, tj. u istom vremenskom periodu skladištenja manje je prisutnih mikroorganizama. Za razliku od bakterijske populacije, broj plijesni i kvasaca je gotovo identičan. Klasičan termički tretman – pasterizacija se i kod soka kruške Viljamovke pokazao jednako učinkovit kao i kod soka Miholjače, međutim, i primjena mikrovalnog tretiranja se pokazala jednako učinkovitom u produženju skladištenja što je posljedica potpunog uništavanja prisutne mikrobne populacije. Nadalje, kombinacija ultrazvuka i mikrovalova se, također pokazala jednako učinkovitom (barem do 8. dana skladištenja), dok se prisutna mikrobna populacija tijekom skladištenja umnožavala i uzrokovala kvarenje soka u 40. danu skladištenja. Ultrazvuk, primijenjen samostalno, iako je uzrokovao 16,5 puta smanjenje populacije aerobnih, mezofilnih bakterija, zaostale stanice su se umnožavale i do 8. dana ih je bilo više od  $10^5$ /mL što je prevelik broj budući njihovim metabolizmom nastaju produkti koji su u soku nepoželjni.

Iako vrlo učinkovite, tradicionalne termičke metode zaštite hrane od kvarenja mikroorganizmima, zbog nepoželjnog učinka na nutritivno vrijedne sastojke i senzorske promjene, sve češće se nastoje zamijeniti ili kombinirati s drugim tehnikama sprječavanja rasta mikroorganizama. Primjena mikrovalova može poslužiti kao jednakovrijedna alternativa pasterizaciji, posebno kada se radi o manjoj mikrobnoj populaciji uzorka. Nadalje, kombinacija ultrazvuka i mikrovalova se može smatrati učinkovitom za kraći vremenski period skladištenja – do 8 dana čuvanja.

## **5. ZAKLJUČCI**

Na temelju provedenog istraživanja, može se zaključiti sljedeće:

1. Kruške sorte Miholjača su manje prosječne mase, u usporedbi s plodovima sorte Viljamovka. Čvrstoća plodova obje sorte se nije međusobno razlikovala.
2. Kruške sorte Miholjača sadrže veći udio ukupne suhe tvari, topljive suhe tvari, ukupnih kiselina, pektina, fenola te ukupnih i reducirajućih šećera. pH vrijednost kruške Viljamovke je niža u usporedbi s kruškom Miholjačom.
3. Tretiranje ultrazvukom, mikrovalovima, pasterizacijom i kombinacijom ultrazvuka i mikrovalova povećava udio polifenola za 2 i više puta u soku kruške Miholjače, dok navedena tretiranja soka Viljamovke nisu uzrokovala povećanje njihovog udjela.
4. Pasterizacija je najsnažnije utjecala na promjenu boje soka Miholjače, za razliku od tretiranja ultrazvukom i mikrovalovima
5. Pasterizacija se pokazala kao najučinkovitiji tretman na sok kruške Miholjače, uz potpunu redukciju mikroorganizama tijekom skladištenja pri 4°C.
6. Pasterizacija i primjena mikrovalova su se pokazale kao najučinkovitiji tretmani čuvanja soka Viljamovke, bez porasta mikroorganizama i u 40-tom danu skladištenja pri 4°C. Kombinacija ultrazvuka i mikrovalova je učinkovita do 8. dana skladištenja, dok se primjena ultrazvuka nije pokazala učinkovitom u sprječavanju kvarenja.
7. Odabir metode tretiranja soka ovisi o početnom broju mikroorganizama. Pri većoj kontaminaciji uočena je prednost tradicionalnog termičkog tretmana – pasterizacije, dok se pri manjem opterećenju uzorka mikroorganizmima dovoljno učinkovita primjena mikrovalova. Kombinacija ultrazvuka i mikrovalova je učinkovita tijekom kraćeg vremena skladištenja pri 4°C.
8. U analiziranim uzorcima nije dokazana prisutnost patogenih mikroorganizama.

## **6. LITERATURA**

Aked, J. (2002) 'Maintaining the Post-Harvest Quality of Fruits and Vegetables' u Jongen, W. (ur.) *Fruit and Vegetable Processing Improving Quality*. 4. izdanje. Boca Raton: Woodhead Publishing Ltd i CRC Press LLC, str. 5-21.

Aneja, K.R., Dihman, R., Aggarwal, N.K. i Aneja, A. (2014) 'Emerging Preservation Techniques for Controlling Spoilage and Pathogenic Microorganisms in Fruit Juices', *International Journal of Microbiology*, 2014, br. 758942.

Augusto, P.E.D., Soares, B.M.C. i Castanha, N. (2018) 'Conventional Technologies for Food Preservation' u Barba, F.J., Sant'Ana, A.S., Orlie, V. i Koubaa, M. (ur.) *Innovative Technologies for Food Preservation*. 1. izdanje. Amsterdam: Elsevier, str. 3-22.

Barba, F.J., Ahrné, L., Xanthakis, E., Landerslev, M.G. i Orlie, V. (2018) 'Innovative Technologies for Food Preservation', u Barba, F.J., Sant'Ana, A.S., Orlie, V. i Koubaa, M. (ur.) *Innovative Technologies for Food Preservation*. 1. izdanje. Amsterdam: Elsevier, str 25-47.

Bonora, S., Muzzi, E., Franceschini, C., Boini, A., Bortolotti, G., Bresilla, K., Perulli, G.D., Venturi, M., Manfrini, L. i Grappadelli, L.C. (2021) 'Preharvest Factors Affecting Quality on „Abate Fetel“ Pears: Study of Superficial Scald with Multivariate Statistical Approach', *Journal of Food Quality*, 2021, 9921834, DOI: 10.1111/2021/9921834.

Borožan, A.B., MariaBorden, D., Dogaru, D., Miscă, C.D., Filimon M.N., Dirlea, A. i Hărmănescu, M. (2010) 'Microbiological Study of Fresh and Pasteurised Pulped Fruit Juices', *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 16(4), str. 461-465.

Botes, W.J. i Caleb, O.J. (2024) 'Optimum Storage Conditions for 'Abate Fetel' Pears', *Acta Horticulturae*, 1386, str 101-106.

Danyluk, M.D., Parish, M.E., FDA/CFSAN Office of Food Safety, Goodrich-Schneider, R.M. i Worobo, R.W. (2012) 'Microbial Decontamination of Juices', u Demirci, A. i Ngadi, O. (ur.) *Microbial Decontamination in the Food Industry*. 1. izdanje. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, str. 163-190.

Early, R. (2002) 'Maintaining the Post-Harvest Quality of Fruits and Vegetables', u Jongen, W. (ur.) *Fruit and Vegetable Processing Improving Quality*. 4. izdanje. Boca Raton: Woodhead Publishing Ltd i CRC Press LLC, str. 91-117.

Eccher Zerbini, P. (2002) 'The Quality of Pear Fruit', *Acta Horticulturae*, 596, str. 805-810.

Elez-Martinez, P., Sorbino-López, Á., Soliva-Fortuny, R. i Martín-Belloso, O. (2012) 'Pulsed Electric Field Processing of Fluid Foods', u Cullen, P., Tiwari, B.K. i Valdramidis, V.P. (ur.) *Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods*. 1. izdanje. Amsterdam: Elsevier, str. 63-109.

FAO, WHO (2005) 'General Standard for Fruit Juices and Nectars', CXS 247-2005, Dostupno na: [https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/jp/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B247-2005%252FCXS\\_247e.pdf](https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/jp/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B247-2005%252FCXS_247e.pdf) (Pristupljeno: 21.9.2024.).

Gao, Q., Zhang, Y., Gao, C., Li, H., Cheng, Y., Qian, X., Zhang, L., Liu, J., Ogunyemi, S.O. i Guan, J. (2023) 'The Microbial Diversity in Relation to Postharvest Quality and Decay: Organic vs. Conventional Pear Fruit', *Foods*, 12, str. 1-14.



- Gliha, R. (1997) *Sorte krušaka u suvremenoj proizvodnji*. Zagreb: Fragaria
- Golubić, P. (2023) 'Značajke tradicionalne kruške Moštenke', Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek. Dostupno na: <https://repositorij.unios.hr/islandora/object/ptfos:2701> (Pristupljeno: 25.9.2024.).
- Gomez-Lopez, V.M., Koutchma, T. i Linden, K. (2012) 'Ultraviolet and Pulsed Light Processing of Fluid Foods' u Cullen, P., Tiwari, B.K. i Valdrumidis, V.P. (ur.) *Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods*. 1. izdanje. Amsterdam: Elsevier, str. 185-223.
- Gupta, R. i Balasubramaniam, V.M. (2012) 'High-Pressure Processing of Fluid Foods' u Cullen, P., Tiwari, B.K. i Valdrumidis, V.P. (ur.) *Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods*. 1. izdanje. Amsterdam: Elsevier, str. 109-133.
- Hebbar, H.U. i Rastogi, N.K. (2012) 'Microwave Heating of Fluid Foods' u Cullen, P., Tiwari, B.K. i Valdrumidis, V.P. (ur.) *Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods*. 1. izdanje. Amsterdam: Elsevier, str. 369-409.
- Icier, F. (2012) 'Ohmic Heating of Fluid Foods' u Cullen, P., Tiwari, B.K. i Valdrumidis, V.P. (ur.) *Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods*. 1. izdanje. Amsterdam: Elsevier, str. 305-367.
- Jackson-Davis, A., Mendonca, A., Hale, S., Jackson, J., King, A. i Jackson, J. (2018) 'Microbial Safety of Unpasteurized Fruit and Vegetable Juices Sold in Juice Bars and Small Retail Outlets' u Ricke, S., Atungulu G., Rainwater, C. i Park S.H. (ur.) *Food and Feed Safety Systems and Analysis*. 1. izdanje. St. Louis: Elsevier, str. 213-221.
- Janakiev, T., Berić, T., Stević, T., Stanković, S., Bačić, J., Majstorović, H., Fira, Dj. i Dimkić, I. (2022) 'The Microbiome of the 'Williams' Pear Variety Grown in the Organic Orchard and Antifungal Activity by the Autochthonous Bacterial and Yeast Isolates', *Microorganisms*, 10, br. 1282.
- Kernou, O., Kaanin, G., Behbahi, A. i Adel, K. (2023) 'Ultrasound-Microwave Technologies as Alternative Methods for Inactivation Bacterias in Fruit Juice', *International Journal of Analytical and Applied Chemistry*, 8, str. 31-40.
- Klamer de Almeida, G., Fioravanzo, J.C. i Bettio Marodin, G.A. (2019) 'Vegetative Growth and Productive Performance of 'Abate Fetel' and 'Rocha' Pear Trees on Quince Rootstocks', *Pasquisa Agropecuária Brasileira*, 55, str. 1-10.
- Lovrić, T. i Piližota, V. (1994) *Konzerviranje i prerada voća i povrća*. Zagreb: Nakladni zavod Globus
- Mateljan, G. (2015) 'Voće' u Mateljan, G. *Najzdravije namirnice svijeta*. Zagreb: Mozaik knjiga i Udruga Zdravi grad, str. 564-570.
- McLellan, M.R. i Padilla-Zakour, O. (2005) 'Juice Processing' u Jongen, W. (ur.) *Fruit and Vegetable Processing Improving Quality*. 4. izdanje. Boca Raton: Woodhead Publishing Ltd i CRC Press LLC, str. 73-96.
- Miljković, I. (2008) 'Ljetne sorte krušaka', *Glasnik zaštite bilja*, 5, str. 18-29.
- Mosqueda-Melgar, J., Raybaudi-Massilia, R.M. i Martin-Belloso, O. (2012) 'Microbiological Shelf Life and Sensory Evaluation of Fruit Juices Treated by High-Intensity Pulsed Electric Fields and Antimicrobials', *Food and Bioproducts Processing*, 90, str. 205-214.

Mushtaq, M. (2018) 'Extraction of Fruit Juice: An Overview' u Rajauria, G. i Tiwari, B.K. (ur.) *Fruit juices Extraction, Composition, Quality and Analysis*. 1. izdanje. London: Elsevier, str.131-156.

Navida, M., Nadeem, M., Qureshi, T.M., Pashameah, R.A., Malik, F., Iqbal, A., Sultan, M., Abo-Dieg, H.M. i Alanazi, A.K. (2022) 'The Synergistic Effects of Sonication and Microwave Processing on the Physicochemical Properties and Phytochemicals of Watermelon (*Citrullus cantus*) Juice', *Agriculture*, 12, br. 1434.

NN 48/2013 Pravilnik o voćnim sokovima i njima sličnim proizvodima namijenjenim za konzumaciju. Dostupno na: [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013\\_04\\_48\\_941.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_04_48_941.html) (Pristupljeno: 25.9.2024.).

Önal, B., Adiletta, G., Di Matteo, M., Russo, P., Ramos, I.N. i Silva, C.L.M. (2021) 'Microwave and Ultrasound Pre-Treatments for Drying of the „Rocha“ Pear: Impact on Phytochemical Parameters, Color Changes and Drying Kinetics', *Foods*, 10, br. 853.

Permadi, N., Akbari, S.I., Prismantoro, D., Indriyani, N.N., Nurzaman, M., Alhasnawi, A.N., Doni, F. i Euis Julaeaha, E. (2024) 'Traditional and Next-Generation Methods for Browning Control in Plant Tissue Culture: Current Insights and Future Directions', *Current Plant Biology*, 38, br. 100339.

Petruzzi, L., Campaniello, D., Speranza, B., Corbo, M.R., Sinigaglia, M. i Bevilacqua, A. (2017) 'Thermal Treatments for Fruit and Vegetable Juices and Beverages: A Literature Overview', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2017, str. 668-691.

Prange, R.K. i Harrison Wright, A. (2023) 'A Review of Storage Temperature Recommendations for Apples and Pears', *Foods*, 12, br. 466.

Rajauria, G. i Tiwari, B.K. (2018) 'Fruit Juices: An Overview' u Rajauria, G. i Tiwari, B.K. (ur.) *Fruit Juices Extraction, Composition, Quality and Analysis*. 1. izdanje. London: Elsevier, str. 3-15.

Rizzolo, A., Grassi, M. i Vanoli, M. (2015) 'Influence of Storage (Time, Temperature, Atmosphere) on Ripening, Ethylene Production and Texture of 1-MCP Treated 'Abbe Fétel' Pears', *Postharvest Biology and Technology*, 109, str. 20-29.

Roobab, U., Aadil, R.M., Madni, G.M. i Bekhit, A.E.D. (2018) 'The Impact of Nonthermal Technologies on the Microbiological Quality of Juices: A Review', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17, str. 437-457.

Saeeduddin, M., Abid, M., Jabbar, S., Hu, B., Hasim, M.M., Khan, M.A., Xie, M., Wu, T. i Zeng, X. (2016) 'Physicochemical Parameters, Bioactive Compounds and Microbial Quality of Sonicated Pear Juice', *International Journal of Food Science and Technology*, 51, str. 1552-1559.

Saeeduddin, M., Abid, M., Jabbar, S., Wu, T., Hasim, M.M., Awad, F.N., Hu, B., Lei, S. i Zeng, X. (2015) 'Quality Assessment of Pear Juice under Ultrasound and Commercial Pasteurization Processing Conditions', *LWT- Food Science and Technology*, 64, str. 452-458.

Southon, S. i Faulks, R. (2002) 'Health Benefits of Increased Fruit and Vegetable Consumption' u Jongen, W. (ur.) *Fruit and Vegetable Processing Improving Quality*. 4. izdanje. Boca Raton: Woodhead Publishing Ltd i CRC Press LLC, str. 5-21.

Tiwari, B.K. i Mason, T.J. (2012) 'Ultrasound Processing of Fluid Foods' u Cullen, P., Tiwari, B.K. i Valdramidis, V.P. (ur.) *Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods*. 1. izdanje. Amsterdam: Elsevier, str. 135-165.

Vasavada, P.C. (2003) 'Microbiology of Fruit Juices and Beverages' u Foster, T. i Vasavada, P.C. (ur.) *Beverage Quality and Safety*. 1. izdanje. Boca Raton: CRC Press, str. 95-118.

Zucoloto, M., Antonioli, L.R., Lopes Siqueira, D., Czermainiski, A.B.C. i Chamhum Salomão, L.C. (2016) 'Conditioning Temperature for Inducing Uniform Ripening of 'Abate Fetel' Pears', *Rerisita Ciência Agronômica*, 47, str. 344-350.