

Utjecaj hladne plazme na kvalitetu nektra soka jabuke tijekom skladištenja

Modec, Matea

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:204532>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-24**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Matea Modec
6401/PT

UTJECAJ HLADNE PLAZME NA KVALITETU NEKTRA
SOKA JABUKE TIJEKOM SKLADIŠTENJA
ZAVRŠNI RAD

Modul: Prehrambeno-procesno inženjerstvo 1

Mentor: prof.dr.sc. Zoran Herceg

Zagreb, 2015.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno – biotehnološki fakultet

Zavod za prehrambeno – tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za procesno - prehrambeno inženjerstvo

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

UTJECAJ HLADNE PLAZME NA KVALITETU NEKTRA SOKA JABUKE TIJEKOM SKLADIŠTENJA

Matea Modec 6401/PT

Sažetak: Cilj ovog rada je bio utvrditi utjecaj hladne plazme na fiziološka (pH, boju, vitamin C) i mikrobiološka svojstva 50%-tnog nektra soka jabuke tijekom skladištenja te zaključiti može li se tretmanom hladne plazme produžiti rok trajnosti voćnih sokova. Korišten je uređaj za generiranje hladne plazme pri tri različite frekvencije (60, 90, 120 Hz) te su uzorci zagrijani na tri različite temperature (30, 40, 50 °C). Na temelju rezultata iz rasta mikrobnih kultura, došlo se do zaključka da hladna plazma je dobar način za produženje roka trajnosti, ponajviše ako se uzorak tretira pri višoj temperaturi i višoj frekvenciji, ali ako se želi zadržati što veća koncentracija vitamina C u nektru jabuke, potrebno je tretirati uzorak pri nižim temperaturama i frekvenciji. Također hladna plazma nije imala značajan utjecaj na promjenu boje nektra jabuke, nego proces skladištenja u kojem su svi uzorci postali svjetliji što se duže skladište zbog razaranja obojenih komponenata soka.

Ključne riječi: nektar jabuke, hladna plazma, vitamin C, boja, mikroorganizmi

Rad sadrži: 27 stranice, 14 slika, 4 tablice, 22 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *prof.dr.sc. Zoran Herceg*

Pomoć pri izradi: *Tomislava Vukušić, mag.ing.*

Rad predan: 9.9.2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Food Engineering

Laboratory for Food Processes Engineering

Undergraduate studies Food Technology

THE EFFECT OF COLD PLASMA TRETAMENT ON THE QUALITY OF APPLE NECTAR DURING THE PROCESS OF STORAGE

Matea Modec 6401/PT

Abstract: The aim of this work was to examine the effect of cold plasma on physiological (value of pH, vitamin C and colour) and microbiological properties of the 50% apple nectar and also determine will the cold plasma tretament prolong shelf-life of fruit juices. Cold plasma was generated in three different frequencies (60, 90, 120 Hz) and the samples were heated in three different temperatures (30, 40, 50 °C). The conclusion based on the results of the growth of microbiological cultures was that cold plasma is a good way for prolonging shelf-life, mostly for samples treated on higher frequencies and higher temperatures, but for perservation of higher concentration of vitamin C in apple nectar, it was necessary to treat the sample on lower frequencies and temperatures. Also, cold plasma tretament didn't have a considerable effect on the change of colour in apple nectar. Significant effect on the change of colour had storage process in which all the samples became lighter in colour, because of degradation of coloured compounds in the juice.

Key words: apple nectar, cold plasma, colour, microorganisms

Thesis conteins: 27 pages, 14 figures, 5 tables, 22 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology , 23 Kačićeva street, Zagreb

Mentor: *PhD, Zoran Herceg, Full professor*

Technical support and assistance: *Tomislava Vukušić, MSc*

Thesis delivered: September, 2015

SAŽETAK

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1 JABUKA	2
2.2 SKLADIŠTENJE	2
2.3 VOĆNI NEKTAR	3
2.4 HLADNA PLAZMA	4
2.4.1 Pobuđivanje plazme	5
2.4.2 Plazma stvorena mjehurićima.....	5
2.4.3 Utjecaj hladne plazme na inaktivaciju mikroorganizama.....	5
3. EKSPERIMENTALNI DIO	7
3.1 MATERIJALI	7
3.1.1 Sirovine za pripremu i analizu uzoraka.....	7
3.1.1.1 Označavanje uzoraka.....	8
3.2 METODE	9
3.2.1 Priprema sokova.....	9
3.2.1.1 Malt extract bujon + Agar	9
3.2.2 Načina rada uređaja za generiranje hladne plazme.....	10
3.2.3 Određivanje pH-vrijednosti.....	10
3.2.4 Određivanje vitamina C.....	10
3.2.5 Određivanje boje nektra jabuke.....	11
3.2.6 Neizravno određivanje broja živih mikroorganizama.....	12
4. REZULTATI	14
4.1 MIKROORGANIZMI	14
4.2 VITAMIN C	14
4.3 pH-VRIJEDNOST	15
4.4 PROMJENA BOJE	15
5. RASPRAVA	20
5.1 MIKROORGANIZMI	20
5.2 PROMJENA BOJE	21
5.3 VITAMIN C	22
5.4 pH-VRIJEDNOST	23
6. ZAKLJUČCI	24

7. REFERENCE.....25

1. UVOD

Na temelju *Pravilnika o voćnim sokovima i njima srodnim proizvodima namijenjenim za konzumaciju* (NN 20/09) voćni nektar je proizvod koji može fermentirati ali je nefermentiran, a koji se proizvodi dodavanjem vode s ili bez dodatka šećera i/ili meda voćnoj kaši i/ili koncentriranoj voćnoj kaši i/ili mješavini tih proizvoda. Kaša se priprema mehaničkim istiskivanjem raznovrsnog voća te su zbog svoga sastava podložni kvarenju mikroorganizama, do kojeg dolazi kroz određeni period vremena.

U posljednje vrijeme mnoga istraživanja usmjerena su na razvoj novih postupaka obrade hrane, sa ciljem dobivanja prehrambenih proizvoda visoke kvalitete.

Mnogo napora je uloženo za razvijanje alternativnih tehnika sterilizacije kao što su metode korištenja ozona, UV zračenje, ultrazvuk, i druge fizikalne i kemijske metode. Međutim, ovi pristupi imaju nedostatke u smislu troškova, potencijalne opasnosti, te kontrole održavanja i ponovljivi uvjeti primjene, što ograničava njihovu veliku praktičnost korištenja.

Sterilizacijske metode kao što su toplina i razne kemikalije koriste se za površinske dezinfekciju voća, sjemenki i začina itd. te su često dugotrajni procesi koju mogu biti štetni (Thirumndas i sur., 2014)

Tijekom razvitka novih tehnologija, primjena hladne plazme koja se zasniva na tlaku okoline u zraku (ili drugim radnim plinovima i plinskim smjesama), dobila je značajno mjesto za korištenje u biološkim i biomedicinskim područjima.

Primjena plazme npr. u biomedicinskim sektoru koristi se za hladnu sterilizaciju instrumenata i proteze kao i mnogih termolabilnih materijala.

Van de Veen i sur. (2014) iznijeli su da je učinak hladne plazme na bakterijske spore veći nego od drugih sterilizacijskih tehnika kao što su toplina, kemikalije i UV tretman.

U ovom radu hladnom plazmom je tretiran nektar soka jabuke (sastav šećera 11-11.5° Bx) te su praćene promjene skladištenja soka tokom deset dana.

Cilj je bio utvrditi utjecaj hladne plazme na fiziološka (pH, boju, vitamin C) i mikrobiološka svojstva navedenog nektra tijekom skladištenja te zaključiti može li se tretmanom hladne plazme produžiti rok trajnosti voćnih sokova.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 Jabuka

Jabuka (*Malus Mill.*), divlje šumsko drvo i voćka; pripada cvjetnicama (*Phanerogamaeae*) na visokom stupnju filogenetske razvijenosti, redu *Rosales*, porodici *Posaceae*, potporodici *Pomoideae*, rodu *Malus*. U divljoj flori zastupljena je sa više od 30 posebnih vrsta. Dugotrajnom evolucijom u različitim podnebljima jabuka je postala izrazito adaptivna i rasprostranjena na područjima iznad ekvatora. (Magdić, 2003)

Zauzima značajno mjesto u prehrani jer je bogat izvor monosaharida, minerala, prehrambenih vlakana te različitih biološki aktivnih spojeva poput vitamina C (askorbinska kiselina) i fenolnih spojeva (Boyer i sur, 2004). Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti. Obuhvaćaju veliku skupinu bioloških aktivnih spojeva koji povećavaju nutritivnu vrijednost sirovine.

2.2 Skladištenje

Prilikom prerade voća nastoji se izbjeći dugotrajno skladištenje jer dolazi do gubitka svježine i nutritivnih značajki. Transpiracija voća je različita i ovisi o vrsti, sorti, morfološkoj građi te kemijskom sastavu voća. Voće koje ima veću transpiraciju ima manju mogućnost skladištenja, podložnije je kvarenju. No, na transpiraciju utječe i vlažnost okolnog zraka i iz tog razloga je potrebno provjeravati relativnu vlažnost prostora u kojem se voće skladišti. Hladnjače s kontroliranom atmosferom koriste, osim niskih temperatura i promijenjenu atmosferu unutar komora sa sniženim udjelom kisika i povećanim udjelom ugljikova dioksida. Količina ugljikova dioksida je važna jer je dokazano da dolazi do oštećenja plodova ako je njegova koncentracija prevelika. U komorama mora biti visoka relativna vlažnost zraka, najčešće od 90 do 95%. Ako bi vlažnost zraka bila niža, došlo bi do jače transpiracije i plodovi bi postali smežurani i bez tržišne vrijednosti.

Ambalažni sok čuva se do isporuke u hladnom, suhom i tamnom prostoru, na sobnoj temperaturi. U toku skladištenja mogu se javiti neželjene promjene soka kao što su smanjivanje sadržaja vitamina, promjena boje i ukusa. Temperatura skladištenja je glavni faktor koji utječe na ove promjene. Što je temperatura skladištenja viša negativne promjene su izraženije.

Po *Pravilniku o općem deklariranju ili označavanju hrane* (NN 114/04), navođenje minimalnog roka trajanja nije obavezno kod bezalkoholnih osvježavajućih pića, voćnih

sokova i nektara te alkoholnih pića namijenjenih dobavljačima na veliko, koji su pakirani u ambalažu veću od 5 litara.

2.3 Voćni nektar

Voćni nektar je proizvod koji može fermentirati ali je nefermentiran, a koji se proizvodi dodavanjem vode s ili bez dodatka šećera i/ili meda voćnoj kaši i/ili koncentriranoj voćnoj kaši i/ili mješavini tih proizvoda, i udovoljava zahtjevima iz Priloga 4. *Pravilnika o voćnim sokovima i njima sličnim proizvodima za konzumaciju.*

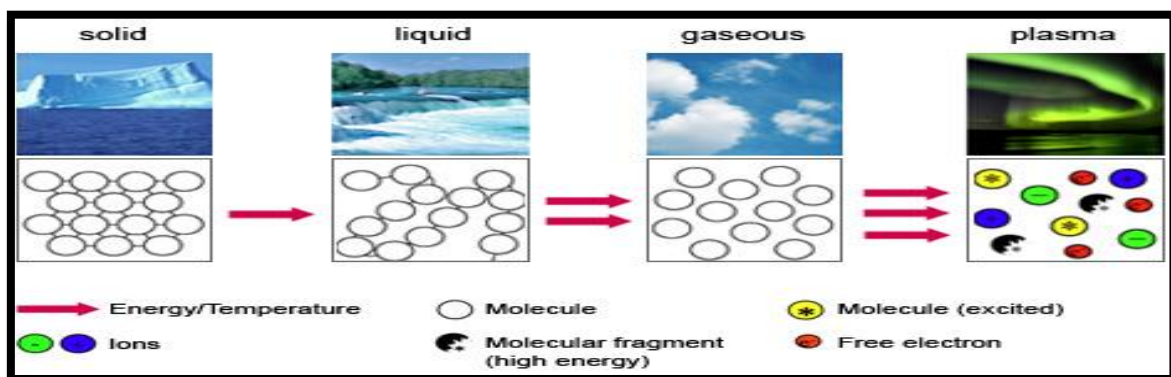
Ne dovodeći u pitanje *Pravilnik o prehranbenim i zdravstvenim tvrdnjama* («Narodne novine» broj 84/10., 113/11. i 42/13.), kada se voćni nektari proizvode bez dodatka šećera ili sa smanjenom energetsom vrijednosti, šećeri se mogu u potpunosti ili djelomično zamijeniti sa sladilima u skladu s *Pravilnikom o prehranbenim aditivima.*

Kakvoća takvog soka ovisi o svojstvima pojedine voćne vrste i fiziološkim procesima nastalim nakon berbe. Jako je važan odnos između kiselina i šećera.

Aroma, pulpa i čestice voćnog tkiva koje su dobivene odgovarajućim fizikalnim postupcima iz iste vrste voća mogu biti vraćeni u voćni nektar. Dozvoljeno je dodavanje šećera i/ili meda u količini do 20 % u odnosu na ukupnu masu gotovog proizvoda. U proizvodnji nektara dozvoljeno je dodavanje vode u količini takvoj da količina voćnog soka i/ili voćne kaše gotovog proizvoda nije manja od vrijednosti navedenih u Prilogu 3. *Pravilnika o voćnim sokovima i njima sličnim proizvodima za konzumaciju.*

2.4 Hladna Plazma

Riječ plazma dolazi od grčke riječi *plásma*, što u slobodnom prijevodu znači samooblikovanje materijala. Izraz plazma prvi je upotrijebio Irving Langmuir 1926. godine kako bi opisao pojavu električnog pražnjenja. Plazmu se često naziva četvrtim agregatnim stanjem s obzirom da se sastoji od pozitivnih i negativnih iona, elektrona i neutralnih čestica, te postoji u prirodi. Konvencionalne termalne metode sterilizacije hrane nisu prikladne za voće i povrće, budući da zagrijavanje izaziva neizbježne promjene boje, mirisa, okusa i gubitak hranjive vrijednosti. Mnogo napora je uloženo za razvijanje alternativnih tehnika sterilizacije kao što su metode korištenja ozona, UV zračenje, ultrazvuk, i druge fizikalne i kemijske metode. Međutim, ovi pristupi imaju nedostatke u smislu troškova, potencijalne opasnosti, te kontrole održavanja i ponovljivi uvjeti primjene, što ograničava njihovu veliku praktičnost korištenja. U posljednje vrijeme, tijekom razvitka novih tehnologija, primjena hladne plazme koja se zasniva na tlaku okoline u zraku (ili drugim radnim plinovima i plinskim smjesama), dobila je značajno mjesto za korištenje u biološkim i biomedicinskim područjima. Primjenom takve plazme postiže se učinkovita inaktivacija mikroorganizama uključujući bakterije, spore bakterija, gljivica i biofilmova, te se postiže degradacija makromolekule kao što su proteini i šećeri. Temperatura hladne plazme je između 30-60°C, i ta temperatura je poželjna u prehrambenoj industriji jer je potrebna mala količina energije da se stvori plazma (Wang i sur., 2012). Kod plazme inaktivacija mikroorganizama može biti posljedica utjecaja topline, nabijenih čestica, električnih polja, UV fotona i određenih reaktivnih vrsta kao što su atomski kisik, metastabilne kisikove molekule. Elektroni u hladnoj plazmi imaju višu temperaturu od težinskih ionskih čestica u plazmi zbog čega se ova plazma još naziva i neravnotežna plazma (engl. non-equilibrium plasma) (Chen i sur, 2004).



Slika 1. Plazma – četvrto agregatno stanje

2.4.1 Pobuđivanje Plazme

Električni potencijal i odgovarajuće električno polje uzrokuju privlačenje elektrona prema anodi, dok jezgru privlači elektroda. Kada je postignuta dovoljno visoka potencijalna razlika između dviju elektroda u plinu, plin postaje ioniziran, plin se disocira na pozitivne ione i elektrone što se smatra električnim izbijanjem - pražnjenjem plina. Kada su postignute potencijalne razlike između elektroda elektroni se ubrzavaju stvarajući električno i magnetno polje i sudaraju se s neutralnim atomima. Udar elektrona i neutralnog atoma stvara nove elektrone i pozitivno nabijene ione. (Bogaerts i suradnici, 2002)

Nastanak plazme očituje se vidljivim sjajem, a boja plazme karakteristična je za primijenjeni plin. Boja nastaje kada elektroni prelaze iz pobuđenog u osnovno stanje, pri čemu emitiraju energiju u obliku vidljive svjetlosti.

2.4.2 Plazma stvorena mjehurićima

Mehanizam električne razgradnje tekućina je složeniji nego u krutim tvarima ili plinovima, jer tekućine su mnogo gušće u odnosu na plinove, a ne pokazuju dugi doseg reda viđen kod krutih tvari. Dodatna komplikacija su plinovi koje čine mikro-mjehuriće u tekućini, a oni igraju značajnu ulogu u procesu razgradnje.

Proces razgradnje se najvjerojatnije događa unutar mjehurića ili u mjestu dodira tekućine i plina. Većina eksperimentalnih podataka podupire teoriju da mjehurići potiču raspadanje u vodi. Podaci pokazuju da unatoč pažljivim tehnikama pročišćavanja i deaeracije, mali mjehurići plina su uvijek prisutni.

2.4.3 Utjecaj hladne plazme na inaktivaciju mikroorganizam

Surowsky i sur. (2013) istražili su utjecaj hladne plazme na inaktivaciju bakterije *Citrobacter freundii* u soku od jabuke. Plazma koja se koristila u eksperimentu stvara antimikrobno aktivne hidroksilne (OH) i kisikove radikale (O), kao i male količine molekularnog dušika. Osim određenih koncentracija ozona također su prisutne i nabijene čestice kao što su ioni i elektroni u plazmi. Mendis i sur. (2000) i Laroussi i sur. (2003) su istražili da nabijene čestice mogu inaktivirati bakterije tako što izazivaju probijanje citoplazmatske membrane. Pokazali su da elektrostatske sile uzorkovane akumulacijom nabijenih čestica na vanjskoj strani membrane mogu prevladati elastičnost membrane te uzrokovati njeno pucanje. Ova pojava je

karakteristična kod gram-negativnih bakterija, jer njihova membrana ima nepravilnu površinu. Ove nepravilnosti daju mali radijus zakrivljenosti, koji uzrokuje lokalizirane, visoke vanjske elektrostatske sile. Budući da se u ovom istraživanju koristio mikroorganizam *C. freundii* koji je gram-negativna bakterija najvjerojatnije je do inaktivacije došlo zbog probijanja citoplazmatske membrane djelovanjem nabijenih čestica.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 MATERIJALI

3.1.1 Sirovine za pripremu i analizu nektara

Na osnovu receptura pripremljenih sukladno zahtjevima iz *Pravilnika o voćnim sokovima i njima srodnim proizvodima namijenjenim za konzumaciju* (NN 20/09) kao i *Pravilnika o izmjenama i dopunama pravilnika o voćnim sokovima i njima srodnim proizvodima namijenjenim za konzumaciju* (NN 27/11) pripremljen je 50% nektar jabuka sa min. 11 °Bx.

Fizikalno-kemijski i mikrobiološki parametri korištenih koncentriranih voćnih sokova su u skladu sa *Pravilnikom o voćnim sokovima i njima srodnim proizvodima namijenjenim za konzumaciju* (NN 20/09 i NN 27/11) kao i *Vodičem za mikrobiološke kriterije za hranu* (3. izmijenjeno izdanje, ožujak 2011.).

Za pripremu sokova korištena su sljedeće sirovine

1. Koncentrirani voćni sok odnosno koncentrirani sok jabuke $70 \pm 0,5$ °Bx
(Dona trgovina d.o.o., Matije Gupca 10, G.Stubica, Hrvatska)
2. Deionizirana voda
3. Kristal šećer

Za pripremu bistrih voćnih nektara sukladno definiranim recepturama korišten je bijeli kristal šećer („Viro“ Tvornica šećera d.d., Matije Gupca 254, Virovitica).

Za određivanje vitamina C koristili smo sljedeće reagense:

1. Otopina EDTA
2. 0,025 % otopina 2,6 diklorindofenola
3. Pufer pH = 1
4. Standardna otopina askorbinske kiseline

Laboratorijsko posuđe potrebno za naciepljivanje mikroorganizama:

1. Eppendorf epruvete od 1.5 ml
2. Sterilne falkonice
3. Sterilni nastavci za mikropipete od 10-100 µL te od 100-1000 µL

3.1.1.1 Označavanje uzoraka

Za svaku vrstu nektara soka jabuke pripremljeno je 5 različitih uzorka u svrhu tretiranja. Svi pripremani uzorci se označavaju sljedećom metodologijom:

Tablica 1. **Oznaka načina obrade i njegovo značenje**

OZNAKA NAČINA OBRADE	ZNAČENJE OBRADE
N	netretirano
P	pasterizirano
1-3	tretirano hladnom plazmom na 3 različite kombinacije amplitude, temperature i vremena obrade

Tablica 2. **Oznake uzoraka za 50% nektar jabuke (B)**

Oznaka uzoraka	Način obrade	Frekvencija (Hz)	Temperatura (°C)	Vrijeme obrade (min)
N	-	-	-	-
P	-	-	80	2
B1	Hladna plazma	120	50	3
B2	Hladna plazma	90	40	6
B3	Hladna plazma	60	30	9

3.2 METODE

Metode se baziraju na tretmanu nektra jabuke hladnom plazmom pri određenim uvjetima koji su navedeni u tablici broj 3 te određivanja boje (svaki 2. dan), vitamina C (nulti, 5. te 10. dan), pH-vrijednosti (1. i 10. dan) i naciepljivanja uzoraka za određivanje mikroorganizama svakih 2 dana.

3.2.1 Priprema sokova

Sokove je potrebno pripremiti prema važećem *Pravilniku o voćnim sokovima i njima srodnim proizvodima namijenjenim za konzumaciju* NN 20/09. Sok je pripremljen dodatkom određene količine konzumnog bijelog šećera (navedenog pod materijalima (3)). Nektar jabuke minimalno 11 °Brixa, dodatkom šećera i destilirane vode u određenom omjeru.

Suha topljiva tvar izražena u °Bx određivana je uz pomoć ručnog refraktometra MoM Gyem (Budapest, N2.61674) svim uzorcima, kako bi se provjerilo da li su pripremljeni sokovi u skladu sa važećim *Pravilnikom NN 20/09 i 27/11*.

Za pripremu nektra korišteno je 80 ml koncentrata soka od jabuke koji je razrijeđen destiliranom vodom te otopinom šećera čija je vrijednost suhe tvari iznosi 11 °Brixa, kako bi se dobio nektar u skladu sa Pravilnikom. Također je tijekom svakog slijedećeg određivanja boje pripremljen novi uzorak nektra jabuke koji je uspoređivan sa parametrima boje već pripremljenih uzoraka. Rađen je u istom omjeru šećera i destilirane vode kao i osnovni nektar, ali u manjem volumenu (30 ml). Pomiješani uzorci koncentrata i otopljenog šećera su dali nektar jabuke 11° Brixa. Nakon pripreme nektra i naknadne obrade plazmom naciepljen je početni broj mikroorganizama prisutnih u nektru.

3.2.1.1 Malt extract bujon + Agar

Za pripremu 1 L podloge odvagnuto je 32 g dehidrirane hranjive podloge te je otopljeno u 1 L destilirane vode. Potom u otopljenu podlogu je dodano oko 20 g agara. Zatim je autoklavirano pri 121 °C kroz 15 minuta. Nakon autklaviranja podloga je razlivena u pripremljene petrijeve zdjelice. Razlijevanje podloga se izvodilo u laminaru gdje se podloge i čuvaju.

3.2.2 Način rada uređaja za generiranje hladne plazme

Za generiranje plazme korišten je pulsni visokonaponski generator (Spellman, UK). Tijekom eksperimenta je varirana frekvencija 60-120 Hz dok je izlazni napon bio 20 kV s kondenzatorom kapaciteta 0,75nF. Napon je mjeran naponskom sondom Tektronix (P6015A) spojenim na osciloskop (Hantek D505202BM). Reaktor je bio volumena 300 ml, s gumenim čepom s prilagođenim otvorom za elektrodu uzemljenja. Eksperimenti su provedeni šaržno pri različitim temperaturama tretmana. Uzorci su prethodno zagrijani na dane temperature koje su navedene u tablici 3. Konfiguracija elektroda u reaktoru bila je postavljena u obliku točka-ploča, odnosno s igličnom visokonaponskom elektrodom (igla od nehrđajućeg čelika, otvora 1.5" odnosno 3.75 cm), te pločastom elektrodom uzemljenja od nehrđajućeg čelika promjera 4.5 cm. Kroz igličnu elektrodu upuhivan je zrak koji je omogućio miješanje uzorka, te samo pražnjenje u mjehurićima upuhivanog zraka.

3.2.3 Određivanje pH-vrijednosti

Mjerenje pH-vrijednosti određivano je na pH-metar uređaju (pH 340i/SET, WTW, Weilheim, Germany). Mjerenje se vršilo tako da se elektroda uronila u uzorak te nakon stabilizacije, pH-vrijednost iste se očitala na displeju uređaja. pH-vrijednost je mjerena samo na netretiranom, pasteriziranom i trima tretiranim uzrocima tijekom 1. i 10. dana.

3.2.4 Određivanje C vitamina

Određivanje se zasniva na oksidaciji askorbinske kiseline u dehidroaskorbinsku pri čemu se 2,6-diklorindofenol reducira u leuko bazu, a višak reagensa u kiseloj sredini prelazi u crvenkastu koja označava kraj titracije. Na taj način se odredila askorbinska kiselina, dok dehidroaskorbinska kiselina nije reagirala.

Izvagano je 12,5 g uzorka, dodano 50 mL pufera te ručno dobro homogenizirano da sav vitamin C prijeđe u otapalo.

U Erlenmeyerovu tikvicu, označenu sa "A" stavljeno je 1 mL standardne otopine askorbinske kiseline, 10 mL uzorka, 5 mL otopine EDTA i titrirano sa 2,6-diklorindofenolom dok se ne postigne obojenje koje se zadržava 30 sekundi.

U Erlenmeyerovu tikvicu označenu sa "B" stavljeno je 1 mL, 10 mL uzorka, 5 mL otopine EDTA te tako istitrirano.

Na isti način je titrirana slijepa proba "C" koja se sastojala od 6 mL pufera, 5 mL vode i 5 mL otopine EDTA.

Račun:

$$mg/100g = \frac{B-C}{A-B} \times 0.5D \quad (1)$$

A – mL 2,6-dikloroindofenola utrošenih za titraciju tikvice "A"

B – mL 2,6-dikloroindofenola utrošenih za titraciju tikvice "B"

C – mL 2,6-dikloroindofenola utrošenih za titraciju slijepa probe

D – faktor razrjeđenja = 50

Iz računa smo dobili koliko se miligrama askorbinske kiseline (vitamina C) nalazi u 100 g našeg uzorka.

3.2.5 Određivanje boje nektra jabuke

Za određivanje boje korišten je kolorimetar Konica Minolta CM-700d/600d (Osaka, Japan). Izmjerene su L^* (svjetlina i tama), a^* (zelenilo ili crvenilo), b^* (plavilo ili žutilo), C^* (kromatičnosti) i H^* (zasićenost boje) i ΔE (ukupna razlika boja) vrijednosti (CIE LAB, 1976). Ukupna promjena boje (ΔE) izračunata je na osnovu izmjerenih parametara:

$$\Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad (2)$$

$$\Delta L^* = L(\text{uzorak}) - L(\text{standard}) \quad (3)$$

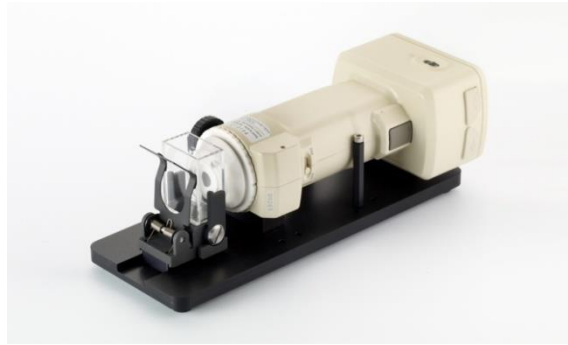
$$\Delta a^* = a(\text{uzorak}) - a(\text{standard}) \quad (4)$$

$$\Delta b^* = b(\text{uzorak}) - b(\text{standard}) \quad (5)$$

Kolorimetar je uređaj koji mjeri tristimulusne vrijednosti boja (na način sličan ljudskom doživljaju boja), u pravilu podešenom prema krivulji standardnog promatrača. Mjerenje boja kolorimetrom temelji se na uspoređivanju ispitivane boje s bojom nastalom u kolorimetru miješanjem osnovnih boja aditivne sinteze, prema Grassmanovim zakonima. Većina kolorimetara prikazuje vrijednosti u jednom od CIE prostora boja (XYZ, LAB ili LUV). Jedna od najvažnijih prednosti kolorimetra je da omogućava izračunavanje ΔE razlike boja, na temelju razlika u svjetlini, tonu i kromatičnosti. Glavni nedostatak kolorimetra je nemogućnost registriranja metamernih boja. Oni su ograničeni na standardnog promatrača i na samo jedan standardni izvor svjetla (D50 ili D65), pa ne mogu provjeriti da li se dva

različita uzorka boja vizualno poklapaju pod različitim izvorima svjetla. (Strgar Kurečić, godina nepoznata).

Uzorci su prije određivanja bili smješteni u hladnjaku na +4 °C. Nekoliko minuta prije samog mjerenja bili su skladišteni na sobnoj temperaturi. Za analizu je uzeto 10 mL uzorka, koje su stavljani u plastične kivete dimenzija (v/š/d 5/3,5/1 cm). Rezultati su obrađeni u programu "Spectra Magic NX".



Slika 2. Konica Minolta CM-700d/600d

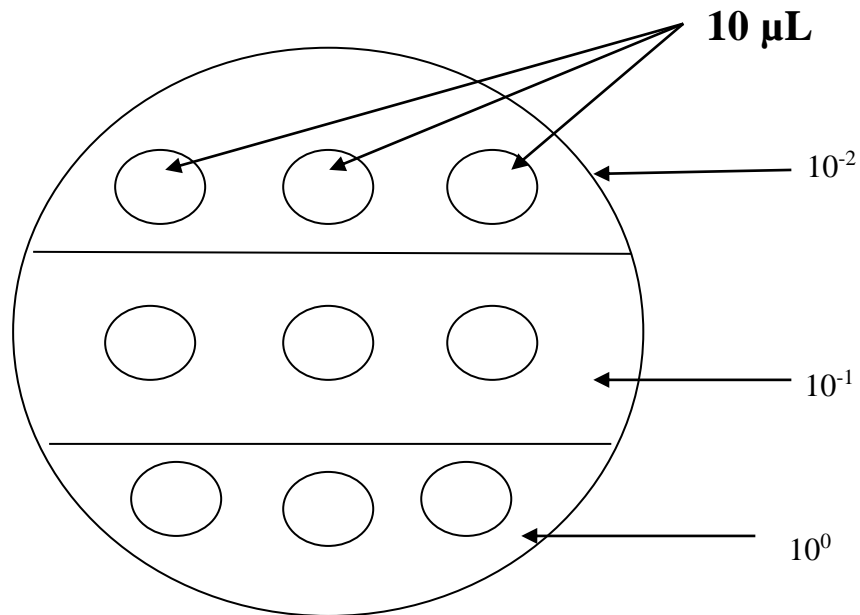
Značenje dobivenih vrijednosti ukupne promjene boje:

($+\Delta L$) uzorak je svjetliji od standarda, ($-\Delta L$) uzorak je tamniji od standarda, ($+\Delta a$) uzorak je crveniji od standarda, ($-\Delta a$) uzorak je više zelene nijanse od standarda, ($+\Delta b$) uzorak je više žute nijanse od standarda i ($-\Delta b$) uzorak je više plave nijanse od standarda.

3.2.6 Neizravno određivanje broja živih mikroorganizama

Broj živih stanica određujemo radi procjene broja živih mikroorganizama u nekom materijalu. Metoda se bazira na tome da iz svake žive stanice dobijemo porast pojedinačnih kolonija mikroorganizama (Markuš, 2012) Ako je način izvođenja metode neizravan, provodi se naciepljivanje poznatog volumena suspenzije na čvrstu podlogu na kojoj se očekuje razvoj kolonija. Učinjena je serija decimalnih razrjeđenja kulture mikroorganizama. Razrjeđenja su rađena u omjeru 1:9, što bi značilo da je 10 μ L uzorka dodavano u 90 μ L sterilne destilirane vode i tako do na -3 razrjeđenje, odnosno do na -2 razrjeđenje. Na jednu petrijevu zdjelicu naciepljeno je po 3 razrjeđenja u tri paralele po 10 μ L. Uzorci su inkubirani u termostatu na 30°C tijekom 48 sati. Kolonije mikroorganizama koje su porasle na hranjivoj podlozi predstavljaju stvaran broj živih stanica. Cijeli postupak je vođen u sterilnim uvjetima kako bi izbjegli kontaminaciju uzoraka. Porasle kolonije su prebrojane na brojaču kolonija. Dobivene vrijednosti označavamo kao CFU vrijednost (Colony Forming Units).

$$CFU = \frac{\text{broj poraslih kolonija}}{\text{upotrebljeni volumen uzorka}} \times \text{recipročna vrijednost decimalnog razr.} \quad (6)$$



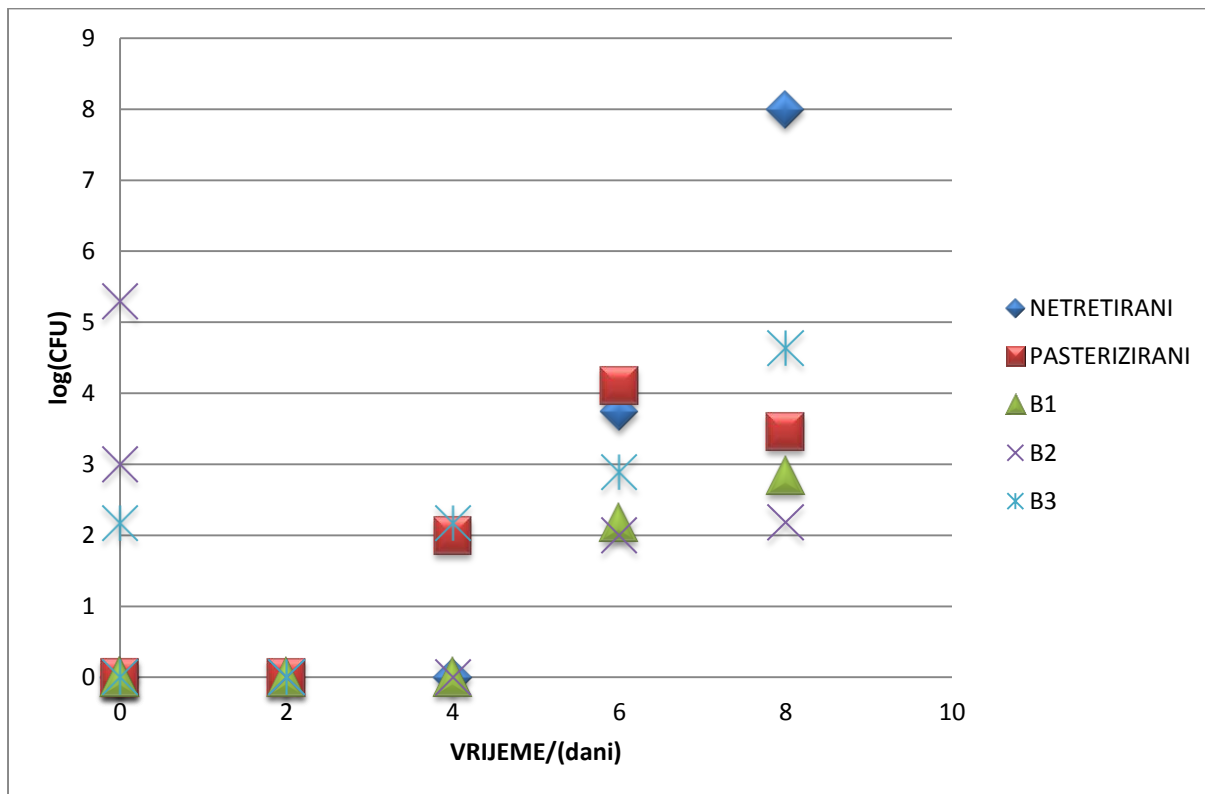
Slika 3. Petrijeva zdjelica sa 3 uzastopna razrjeđenja i 3 paralele

Tablica 3. Prikaz uzastopnih razrjeđenja

Razrjeđenje	10^0		10^{-1}		10^{-2}
Volumen	1ml	10μL →	90 μ + 10	10 μL →	90 μL + 10

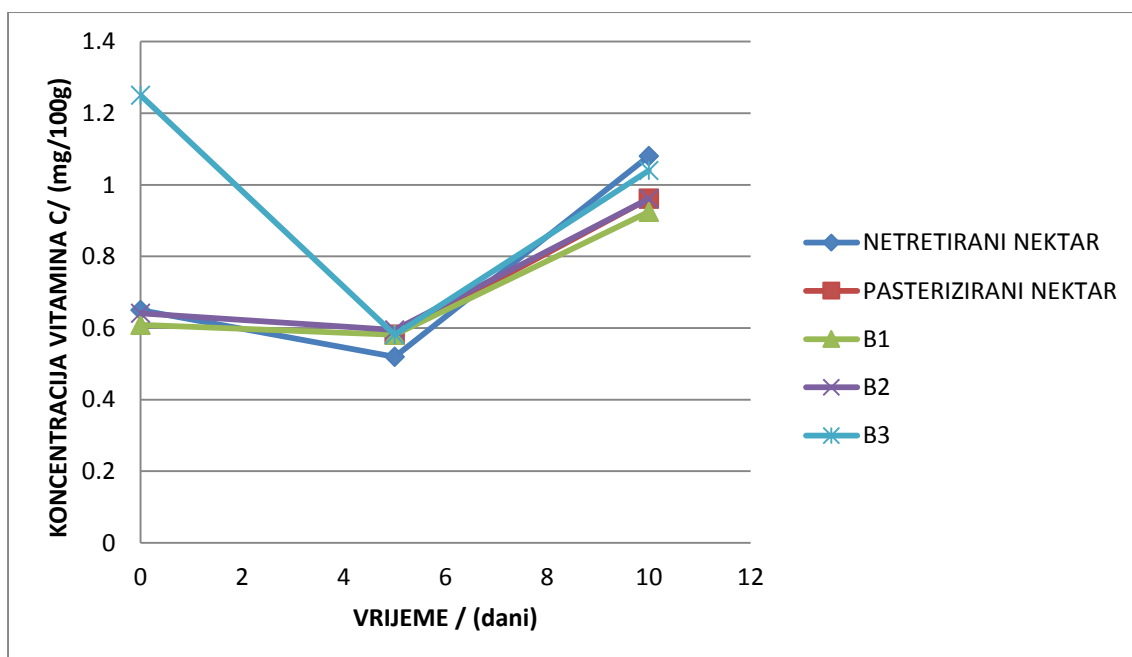
4. REZULTATI

4.1 MIKROORGANIZMI



Slika 4. Mikrobiološka stabilnost nektra jabuke tokom skladištenja

4.2 VITAMIN C



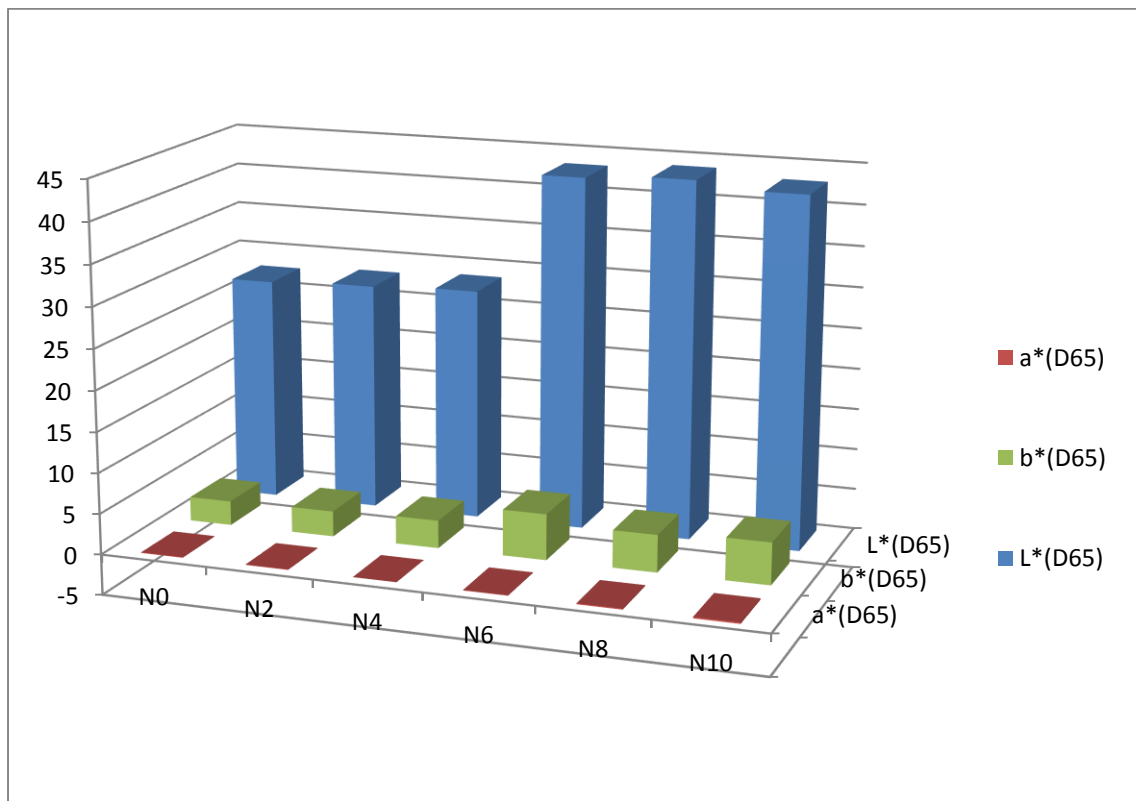
Slika 5. Koncentracija vitamina C u nektru jabuke tokom skladištenja

4.3 pH – VRIJEDNOST

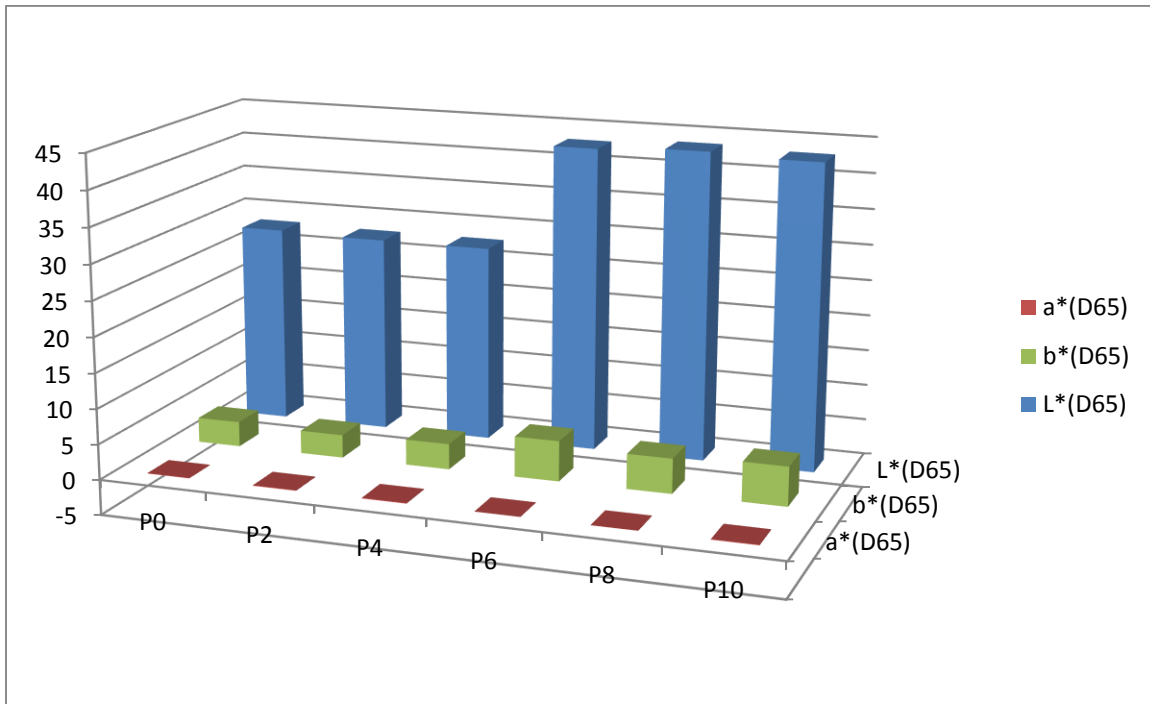
Tablica 4. pH – vrijednost nektra tijekom 1. i 10. dana skladištenja

VRIJEME	1. DAN	10. DAN
N	3.69	3.79
P	-	3.8
B1	3.58	3.79
B2	3.58	3.8
B3	3.6	3.8

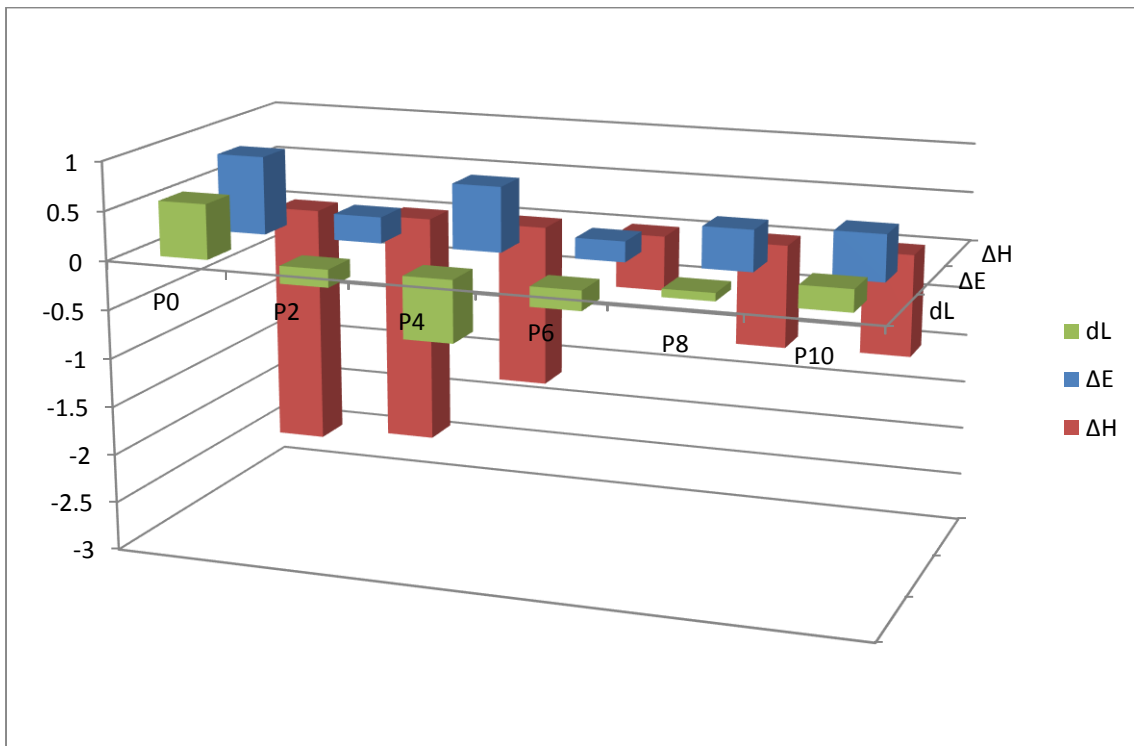
4.4 PROMJENA BOJE



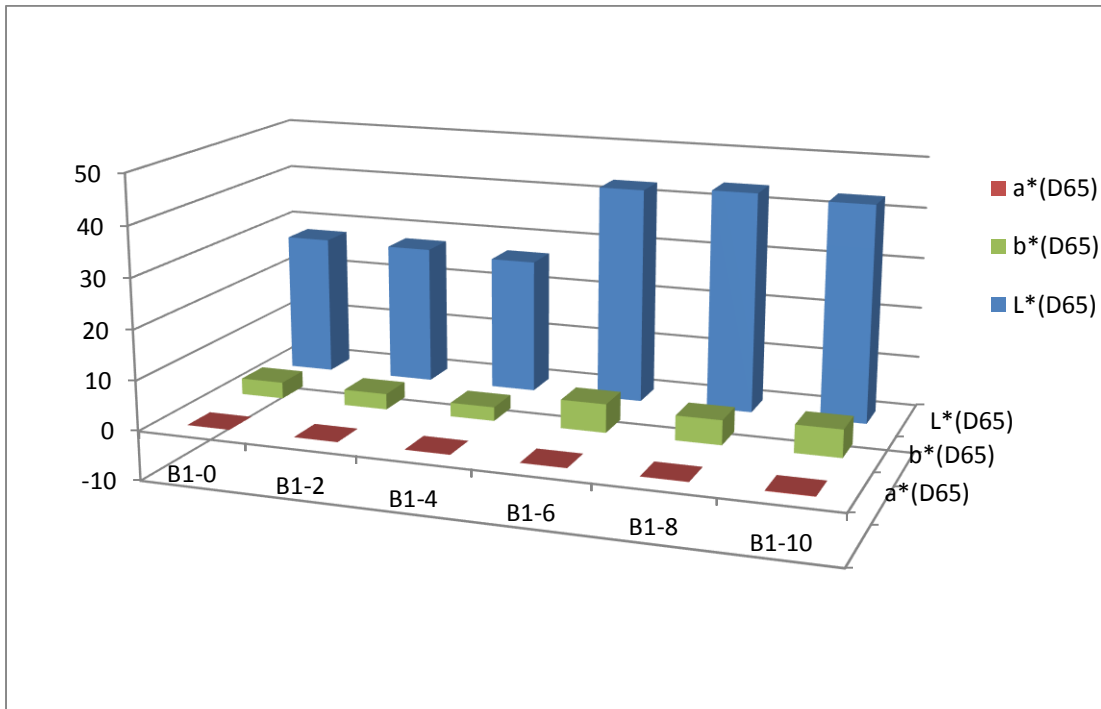
Slika 6. Vrijednosti za L*, a* i b* za netretirani nektar jabuke



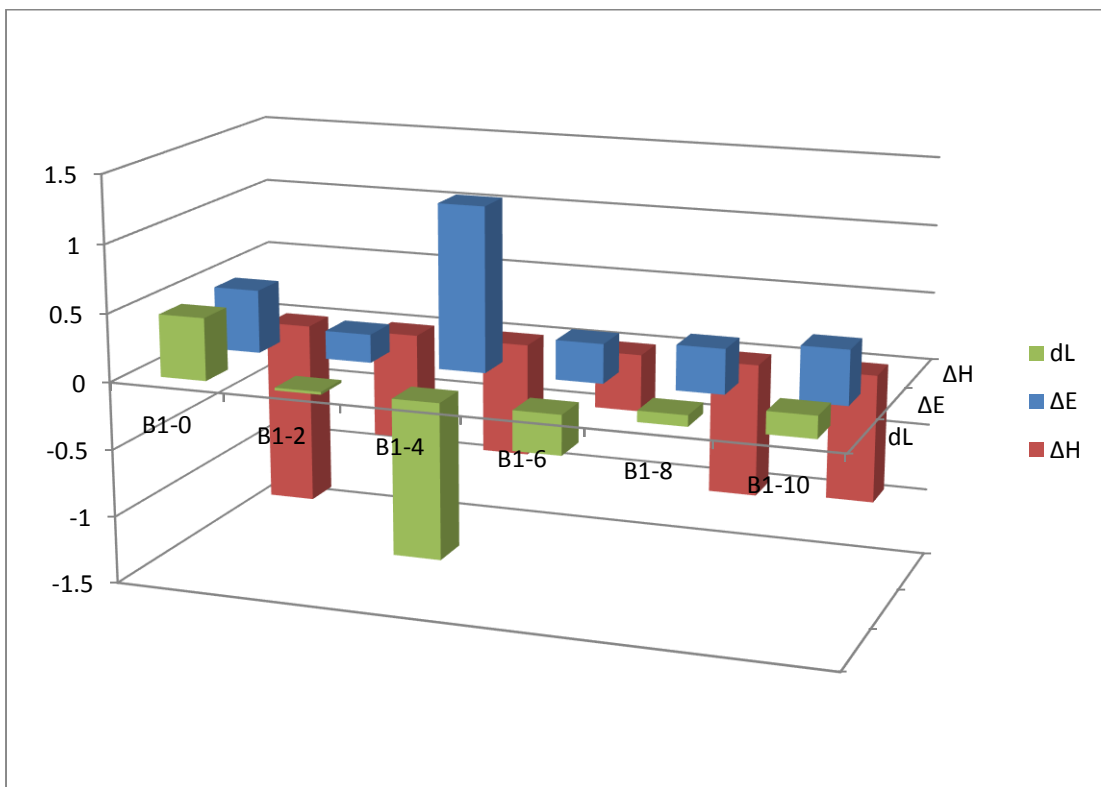
Slika 7. Vrijednosti za L*, a* i b* za pasterizirani nektar jabuke



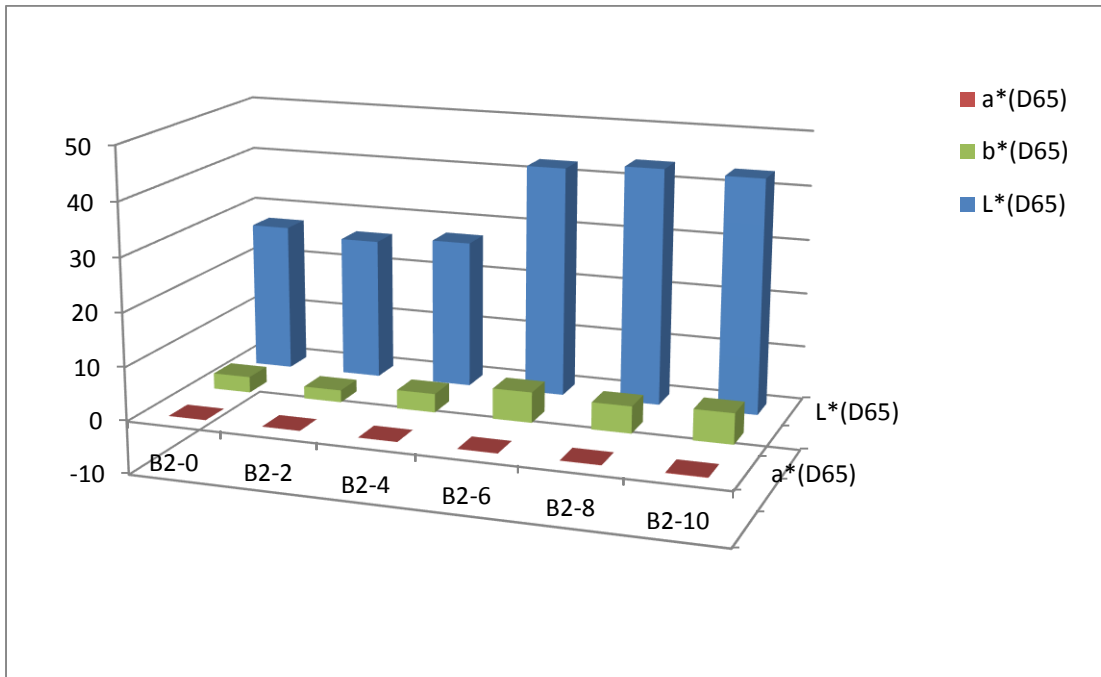
Slika 8. Vrijednosti ΔH, ΔL i ΔE za pasterizirani nektar jabuke



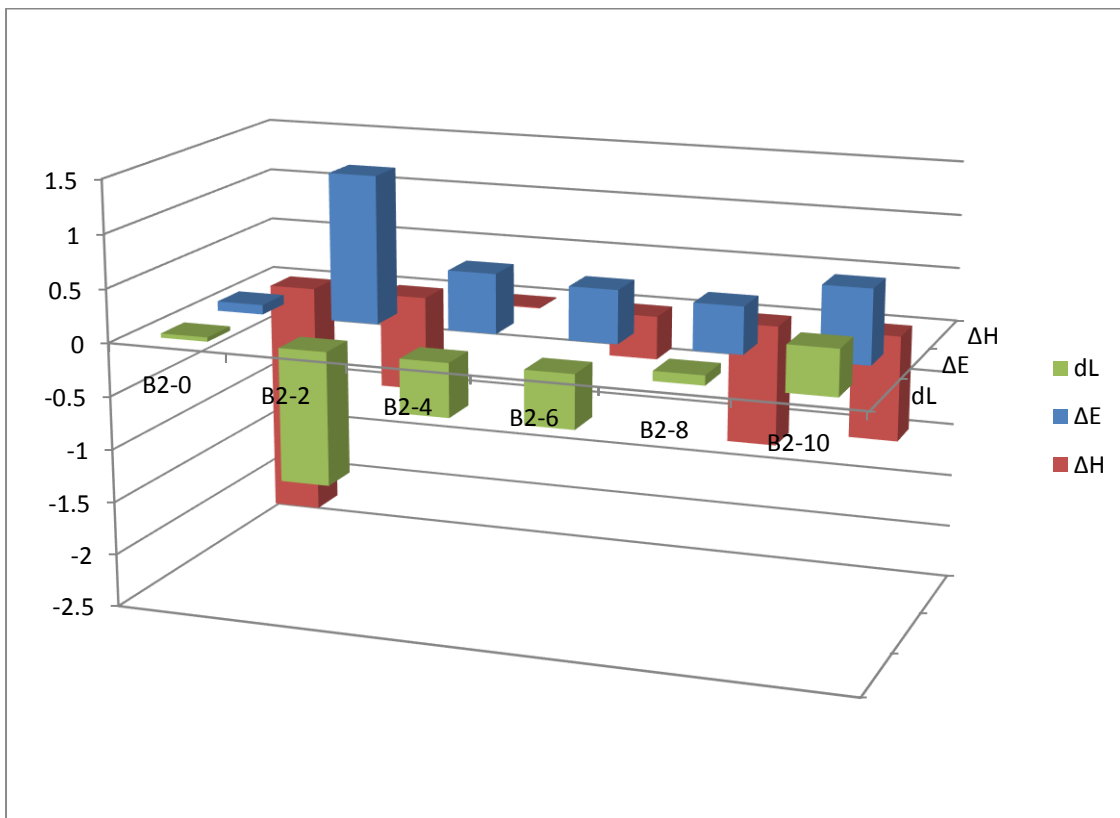
Slika 9. Vrijednosti za L*, a* i b* za uzorak B1



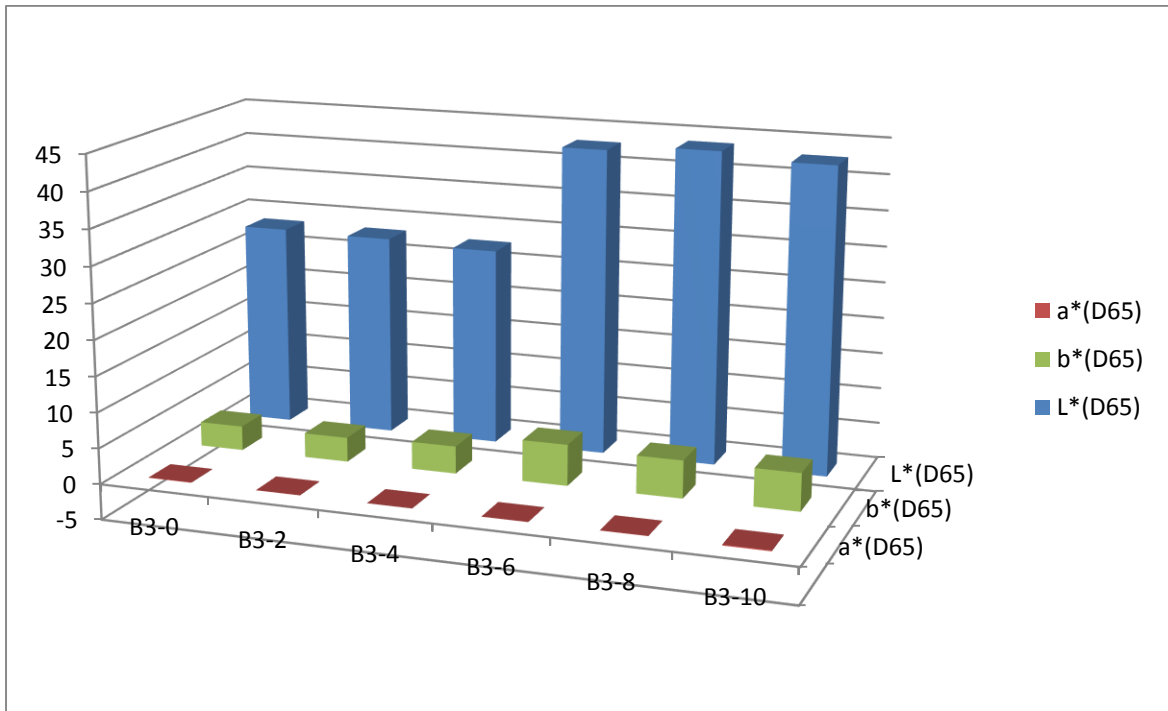
Slika 10. Vrijednosti ΔH, ΔL i ΔE za uzorak B1



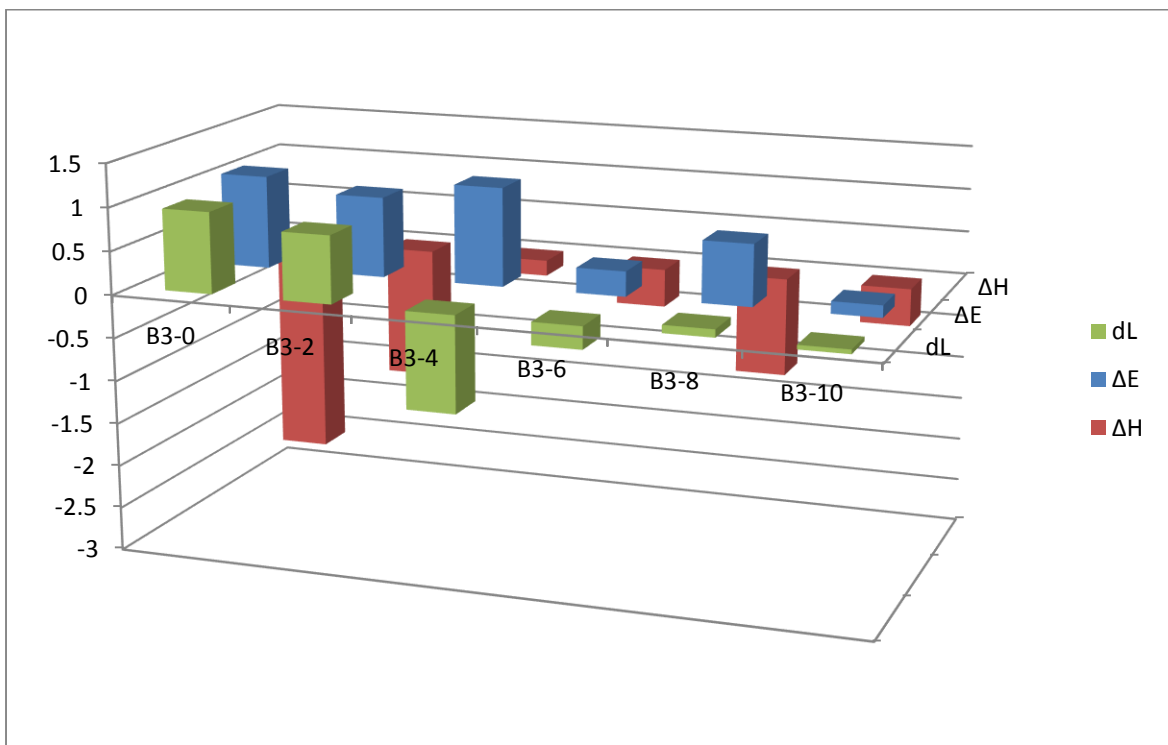
Slika 11. Vrijednosti za L^* , a^* i b^* za uzorak B2



Slika 12. Vrijednosti ΔH , ΔL i ΔE za uzorak B2



Slika 13. Vrijednosti za L*, a* i b* za uzorak B3



Slika 14. Vrijednosti ΔH, ΔL i ΔE za uzorak B3

5. RASPRAVA

5.1 MIKROORGANIZMI

Mikroorganizmi prisutni u koncentratu soka jabuke, korištenom u pripravku nektra, po važećem *Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu* (3. izmijenjeno izdanje, ožujak 2011) su aerobne mezofilne bakterije te kvasci i plijesni.

Po slici 4. nakon obrade hladnom plazmom vidljiva je potpuna redukcija za sve uzorke, a najviše je vidljiva kod uzorka B3 koji je u netretiranom obliku imao prisutan određen broj kolonija mikroorganizama, točnije log redukcija je bila 2.176, a poslije tretiranja hladnom plazmom ta vrijednost je pala na nulu. Također uzorak B2 je prije tretiranja imao određen broj kolonija mikroorganizama, no nakon tretiranja broj se reducirao, ali ne na nultu vrijednost, odnosno log redukcija za uzorak B2 se smanjila sa 5.3031 na točno 3. Tek četvrtog dana nakon tretiranja broj mikroorganizama za uzorak B2 se u potpunosti reducirao. Iz toga se može zaključiti da je za taj uzorak možda bila potrebna viša temperatura tretiranja kako bi se pri zadanoj frekvenciji od 90 Hz inaktivirali svi prisutni mikroorganizmi. U četvrtom danu nakon tretiranja mikroorganizmi prisutni u pasteriziranom uzorku i uzorku B3 ulaze u eksponencionalnu fazu. Pasterizirani uzorak zadnjeg dana naciepljivanja imao blagi pad, točnije sa log redukcije 4.11, na vrijednost log redukcije 3.46, dok B3 je imao kolonije mikroorganizama u porastu. Također se može vidjeti da u zadnjem danu broj poraslih kolonija za pasterizirani uzorak manja nego za uzorak B3, iz čega se zaključuje da iako je uzorak B3 imao najduži tretman (9 min), frekvencija (60 Hz) i temperatura (30 °C) nisu bili dovoljni visoki kako bi usporili rast kolonija, za razliku od pasteriziranog uzorka koji je samo bio tretiran na temperaturi od 80 °C.

Nakon šestog dana naciepljivanja svi ostali uzorci (N, B1, B2) ulaze u eksponencionalnu fazu što se održava do zadnjeg dana naciepljivanja. Najveći rast kolonija mikroorganizama pokazuje netretirani uzorak, a potom uzorak B3, pa pasterizirani uzorak, potom uzorak B1 i najmanji porast kolonija je imao uzorak B2. Uzorci B1 i B2 se po broju poraslih kolonija u zadnjem danu naciepljivanja razlikuju za malu vrijednost, što znači da su oba tipa tretiranja imala sličan rezultat. Konačni zaključak je da B2 tretman je najbolji za smanjenje ukupnog broja mikroorganizama u nektru jabuke.

5.2 PROMJENA BOJE

L* vrijednost označava koliko je neki uzorak svjetliji (100) ili tamniji (0). Iz navedenih grafova (Slike 6., 7., 9., 11., 13.) vidljivo je da svi uzorci postaju svjetliji što se duže skladište zbog razaranja obojenih komponenata soka. Komponenta b* određuje je li neki uzorak nijansom bliže žutoj (+) ili plavoj (-) boji. Kod navedenih uzoraka komponenta b* se povećava što znači da je bliže žutoj boji nego plavoj, odnosno po Ahmed i sur. (2002), vrijednosti a* i b* bi trebale biti linearne sa L* vrijednošću, što je slučaj za komponentu b*, ali nije za komponentu a*. Komponenta a* određuje koliko je neki uzorak nijansom bliže zelenoj (-) ili crvenoj (+) boji. Netretirani uzorak je od početka bio bliže zelenoj nijansi odnosno bila je negativna vrijednost i uzorak je svakim danom skladištenja bio sve bliže zelenoj nijansi. Ostali uzorci (P, B1, B2, B3) su u početku bili bliže crvenoj nijansi, ali tijekom četvrtog dana skladištenja im se vrijednost počela smanjivati i do zadnjeg dana skladištenja bili su bliže zelenoj nijansi.

Vrijednosti ΔH , ΔL i ΔE su grafički prikazani (Slike 8., 10., 12., 14.) za sve uzorke, osim za netretirani uzorak koji je uzet kao referentni uzorak pri izračunavanju zadanih vrijednosti.

ΔH označava ton boje te se u svakom uzorku vrijednost mijenjala između -2.57 koja je zabilježena prvi dan odmah nakon tretiranja do vrijednosti -0.43 koja je zabilježena nakon desetog dana skladištenja. Iz toga možemo zaključiti da se ton boje u svim uzorcima promijenio iz tamnijeg tona prema svjetlijem, makar je ostao u tamnijoj zoni zbog negativne vrijednosti rezultata. ΔL nam daje usporedbu referentnoj (netretiranog) uzorka i ostalih uzoraka da se vidi koji su uzorci svjetliji, a koji tamniji od netretiranog uzorka. Svi uzorci osim uzorka B3 su u početku bili svjetliji od referentnog uzorka, a potom nakon dva dana skladištenja postali su tamniji od referentnog uzorka te u posljednja četiri dana skladištenja su ponovno postali svjetliji, ali ta svjetlina je bila slabije vrijednosti (0.08-0.22) nego svjetlina na početku skladištenja (0.45-0.94). Uzorak B3 iskače od ostalih zbog toga što se njemu tek u posljednja dva dana skladištenja povećala svjetlina, ali za puno slabiju vrijednost od ostalih uzoraka (0.05). ΔE po Strgar Kurečić (godina nepoznata) označava ukupnu razliku boja između referentnog (netretiranog) uzorka i ostalih uzoraka. Ovisno o rezultatima mogući su sljedeće mogućnosti:

$\Delta E < 0,2$ razlika boja se ne vidi

$\Delta E = (0,2 - 1)$ razlika boja se primjećuje

$\Delta E = (1 - 3)$ razlika boja se vidi

$\Delta E = (3 - 6)$ razlika boja se dobro vidi

$\Delta E > 6$ očigledna odstupanja boja.

Po rezultatima koji su vidljivi u grafovima, rezultati variraju između 0.2-1, što govori da se razlika boje primjećuje, dok neke vrijednosti čak pokazuju iznad 1, što znači da se razlika boja vidi.

5.3 VITAMIN C

Vitamin C je najnestabilniji od svih vitamina, te ga je lako uništiti tijekom prerade i skladištenja. Stopa uništenja povećava se djelovanjem metala, posebno bakra i željeza te enzima. (Skelin, 2011) Raspoloživost kisika, odnosno dugotrajno zagrijavanje u prisutnosti kisika i izloženosti svjetlu, štetni su faktori koji utječu na sadržaj vitamina C u hrani (Deman, 1990). Askorbinska kiselina je vrlo termolabilna i osjetljiva na različite uvjete obrade. Mehanizam razgradnje askorbinske kiseline slijedi aerobni i/ili anaerobni put i ovisi o mnogim uvjetima prerade. (Tannenbaum, 1976; Vieira i sur, 2000).

Svi uzorci koji su analizirani nulti dan (osim pasteriziranog uzorka), odmah nakon tretiranja su pokazali slične vrijednosti koncentracije vitamina C, osim uzorka B3 koji je pokazao najveću vrijednost od svih. Budući da je uzorak B3 tretiran na najnižoj temperaturi (30°C) te najnižoj frekvenciji (60 Hz) ovaj tretman je pokazao najmanje štetan utjecaj na koncentraciju vitamina C. Nakon petog dana skladištenja ponovno je izmjerena koncentracija te su zabilježene najmanje vrijednosti iz čega se zaključuje da koncentracija vitamina C opada što je skladištenje duže.

No, analizom tijekom desetog dana skladištenja vrijednosti vitamina C su porasle i veće su čak i od vrijednosti tijekom nultog dana skladištenja. Objašnjenje je sljedeće da tijekom skladištenja, askorbinska kiselina oksidira u dehidroksiaskorbinsku kiselinu, koja zadržava aktivnost askorbinske kiseline. Nakon toga, može se ireverzibilno hidrolizirati u 2,3-diketoglukonsku kiselinu, koja ne posjeduje biološku aktivnost. Ovaj zadnji korak je više temperaturno osjetljiv, nego oksidacija askorbinske kiseline i dehidroksiaskorbinske kiseline (Beliz i Grosch, 1999; Cooke i Moxon, 1981; Giannakourou i Taoukis, 2003; Karhan i sur., 2004; Tannenbaum 1976; Vieira i sur., 2000). Iz čega se može pretpostaviti da se do desetog dana skladištenja sva askorbinska kiselina oksidirala u dehidroksiaskorbinsku kiselinu, a pošto ona ima aktivnost kao askorbinska kiselina, reagens 2,6-diklorindofenol će se reducirati u leuko bazu, kada dehidroksiaskorbinska kiselina hidrolizira u 2,3-diketoglukonsku kiselinu,

a višak reagensa u kiseloj sredini prelazi u crvenkastu koja označava kraj titracije. Pretpostavka je da je došlo do pogreške titracije. Na temelju rezultata zadnjeg dana skladištenja i objašnjenja vezanih uz moguće lažno povećanje koncentracije C vitamina, vidljivo je najmanje lažno povećanje za uzorak B1, jer se u početku tretiranjem pri najvišoj temperaturi (50 °C) i najjačoj frekvenciji (120 Hz) izgubio jedan dio askorbinske kiseline te je zbog toga manje askorbinske kiseline oksidiralo i išlo u daljnji ireverzibilni tijek reakcije. Uzorak B3 koji je u početku imao najveću koncentraciju askorbinske kiseline ima i najveće lažno povećanje, jer je više askorbinske kiseline oksidiralo u dehidroksiaskorbinsku kiselinu.

5.4 pH – vrijednost

Na temelju rezultata tablice 4. zaključak je da se pH-vrijednost u deset dana skladištenja nije značajno promijenila, ostala je u granicama do pH=4, unutar kojeg se može kontrolirati boja nektra. Kada je pH manji od 4 inaktivirani su enzimi posmeđivanja te se onemogućuje posmeđivanje nektra jabuke (Laurila i sur, 1998). Utjecaj na vitamin C nije značajan, jer je do smanjenja vitamina C došlo iz drugih razloga koji su prethodno navedeni. Također se može zaključiti da, u ovom slučaju, utjecaj hladne plazme ne dovodi do značajnih promjena pH-vrijednosti.

6. ZAKLJUČCI

1. Na temelju rezultata iz rasta mikrobnih kultura, hladna plazma je dobar način za produženje roka trajnosti nektra jabuke, ponajviše ako se uzorak tretira pri višoj temperaturi i višoj frekvenciji.
2. Ako se želi zadržat što veća koncentracija vitamina C u nektru jabuke, potrebno je tretirati uzorak pri nižim temperaturama i frekvenciji.
3. Hladna plazma nije imala značajan utjecaj na promjenu boje nektra jabuke, nego proces skladištenja u kojem su svi uzorci postali svjetliji što se duže skladište zbog razaranja obojenih komponenata soka.
4. Hladna plazma nije imala značajan utjecaj na promjenu pH-vrijednosti nektra jabuke te nije došlo do posmeđivanja soka zbog pH-vrijednosti nektra jabuke koji je ostao unutar granica do pH=4.

7. REFERENCE

- Ahmed Shivahare, U.S. Ramswany (2004) H.S. Thermal degradation of color in red chilly puree and paste, *LWT, Food Science and Technology*, 35, 497-503
- Belitz, H., Grosch, W., (1999), *Vitamins. Food Chemistry.* (2. izd), Germany. Springer-Verlag. 383-387.,
- Bogaerts A., Neyts E., Gijbels R., Mullen J. (2002) Gas discharge plasmas and their applications. *Spectrochimica Acta Part B*
- Boyer, J., Lui, R. (2000), Apple phytochemicals and their health benefits, *Nutri. Jour., Wine nutri.*, 16, 3,5. 692-694,
- Chen, Y.S., X.S. Zhang, Y.C. Dai and W.K. Yuan (2004) Pulsed high-voltage discharge plasma for degradation of phenol in aqueous solution. *Sep. Purif. Technol.*, 34(1-3), 5-12
- Cooke, J., Moxon, R. (1981) Detection and measurement of vitamin C (Ut. Counsell, J. i Horning, D.) *Vitamin C Ascorbic Acid*, England: Applied Science Publishers, 167-168
- Demian J. (1990) *Principles of food chemistry*, 2.iz, New York: Van Nostrand Reinhold, 350-351,
- Giannakourou, M.C., Taoukis (2003) P.S., Kinetic modelling of vitamin C loss in frozen green vegetables under variable storage conditions, *Food Chem.*, 83, 33-41,
- H.B. Van de Veen, H. Xie, E. Esveld et al. (2014) *Food Microbiol.*
- Karhan, M., Aksu, M., Tetik N., Turhan, I. (2004) Kinetic modeling of anaerobic thermal degradation of ascorbic acid in rose hip (*rosa canina L.*) pulp. *Journal of Food Quality*, 27. 311-319.,
- Laurila, E., Kervinen, R., & Ahvenainen, R. (1998) The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits, *Postharvest News and Information*

- Laroussi, M., Leipold, F. (2004) Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *Int. J. Mass Spectrom.* **233**, 81-86
- Magdić D. (2003) Modeliranje dinamičkih promjena boje i čvrstoće jabuka tijekom skladištenja, 3-5
- Markuš B. (2012) Utjecaj ultrazvuka na inaktivaciju bakterija u čistoj kulturi, str. 17,
- Mendis D.A., Rosenberg, M., Azam, F. A note on the possible electrostatic disruption of bacteria. *IEEE Trans. Plasma Sci.* **28** (no.4), 2010.
- R.X. Wang, W.F. Nian, H.Y. Wu, H.Q. Feng, K. Zhang, J. Zhang, W.D. Zhu, K.H. Becker, and J. Fang (2012) Atmospheric-pressure cold plasma treatment of contaminated fresh fruit and vegetable slices: inactivation and physiochemical properties evaluation. *The European Phys. Jour. D.* **66**, 276
- Rohit Thirumdas, Chaitanya Sarangapani, & Uday S. Annapure (2014) Cold Plasma: A novel non-thermal technology for food processing,
- Skelin, M. (2011) Utjecaj termosonifikacije na stabilnost vitamina C u soku od jabuke, str.33,
- Strgar Kurečić, Maja, Osnove o boji (Kontrola boja – od percepcije do mjerenja), 27-36, godina nepoznata
- Surowsky, B., Frohling, A., Gottschalk, N., Schluter, O., Knorr, D. (2013) Impact of cold plasma on *Citrobacter freundii* in apple juice: Inactivation kinetics and mechanisms. *International Journal of Food Microb.* **174**, 63-71
- Tannenbaum (1976) S. Ascorbic acid (ur. Fennema O.) *Principals od Food Science Part I. Food chemistry*, 2 izd., New York: Marcel Dekker, 477-544

Vieira, M. C., Teixeira, A. A., Silva, C. L. M. (2000) Mathematical modeling of the thermal degradation kinetics of vitamin C in cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) nectar, *Journal of Food Engineering*, 43, 1-7