

# MIKROBIOLOŠKA KONTROLA U PROIZVODNJI LEDENOG ČAJA

---

**Fabijanić, Ivan**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Karlovac  
University of Applied Sciences / Veleučilište u Karlovcu**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:128:597527>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-13**



**VELEUČILIŠTE U KARLOVCU**  
Karlovac University of Applied Sciences

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Karlovac University of Applied  
Sciences - Institutional Repository](#)



zir.nsk.hr



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

**VELEUČILIŠTE U KARLOVCU**  
**STRUČNI STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA**  
**PRERADA MLIJEKA**

**IVAN FABIJANIĆ**

**MIKROBIOLOŠKA KONTROLA**  
**U PROIZVODNJI LEDENOG ČAJA**

**ZAVRŠNI RAD**

**KARLOVAC, 2020.**



**Veleučilište u Karlovcu**  
Stručni studij prehrambena tehnologija  
Prerada mlijeka

Ivan Fabijanić

**Mikrobiološka kontrola u proizvodnji ledenog čaja**

Završni rad

Mentor: dr. sc. Bojan Matijević, prof. v.š.

Broj indeksa studenta: 0314610039

Karlovac, svibanj 2020.

*Veliko hvala mentoru dr.sc. Bojanu Matijeviću, prof.v.š. koji je uvijek imao vremena za sve moje upite te je svojim savjetima i smjernicama pomogao u izradi ovog rada.*

*Također, hvala i Analitičko-mikrobiološkom laboratoriju tvrtke Jana d.o.o. u kojemu je izrađen ovaj rad.*

*I na kraju, veliko hvala mojoj obitelji i djevojci na podršci i razumijevanju.*

## IZJAVA O AUTENTIČNOSTI ZAVRŠNOG RADA

Ja, **Ivan Fabijanić**, ovime izjavljujem da je moj završni rad pod naslovom **Mikrobiološka kontrola u proizvodnji ledenog čaja** rezultat vlastitog rada i istraživa te se oslanja se na izvore i radove navedene u bilješkama i popisu literature. Ni jedan dio ovoga rada nije napisan na nedopušten način, odnosno nije prepisan iz necitiranih radova i ne krši autorska prava.

Sadržaj ovoga rada u potpunosti odgovara sadržaju obranjenoga i nakon obrane uređenoga rada.

Karlovac, 26. svibanj 2020.

Ivan Fabijanić

---

Veleučilište u Karlovcu  
Odjel prehrambene tehnologije  
Stručni studij prehrambena tehnologija

Završni rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### MIKROBIOLOŠKA KONTROLA U PROIZVODNJI LEDENOG ČAJA

*Ivan Fabijanić*

Rad je izrađen u Analitičko-mikrobiološkom laboratoriju tvrtke Jana d.o.o.

Mentor: Dr.sc. *Bojan Matijević*, prof. v.š.

#### Sažetak

Čaj je piće koje se po konzumaciji nalazi odmah iza vode. U ljetnim mjesecima pije se ledeni čaj, kao alternativa gaziranim pićima. Ovaj osvježavajući napitak dobiva se miješanjem sastojaka kao što je prirodni ekstrakt čaja, voćni sokovi, arome, bojila i zaslađivači s vodom. Ledeni čaj je medij siromašan hranjivim tvarima i ima relativno nisku pH – vrijednost te u njemu može rasti mali broj mikroorganizama, neke vrste bakterija, kvasci ili plijesni. Mikrobiološki problemi u proizvodnji ledenog čaja najčešće se vezuju uz mikroorganizme kvarenja i narušavanje senzorskih svojstva. Stoga je cilj rada bio pratiti mikrobiološku ispravnost sirovina, tehnološki proces proizvodnje i gotovi proizvod, ledeni čaj s okusom breskve. Mikrobiološke analize obuhvatile su određivanje aerobnih bakterija, kvasce i plijesni, koliformne bakterije, *Pseudomonas aeruginosa* i fekalne streptokoke. Dobiveni rezultati pokazuju da se iz mikrobiološki ispravnih sirovina, mikrobiološki čistog postrojenja i ambalaže dobije proizvod, ledeni čaj s okusom breskve siguran za potrošača.

**Broj stranica:** 28

**Broj slika:** -

**Broj tablica:** 8

**Broj literaturnih navoda:** 16

**Broj priloga:** -

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** ledeni čaj, kontrola kvalitete, mikrobiologija, proizvodnja

**Datum obrane:** 26. svibanj 2020.

#### Stručno povjerenstvo za obranu:

1. dr.sc. *Sandra Zavadlav*, v.pred.
2. dr.sc. *Marijana Blažić*, prof.v.š..
3. dr. sc. *Bojan Matijević*, prof.v.š.
4. dr. sc. *Jasna Halambek*, v. pred. (zamjena)

Rad je pohranjen u knjižnici Veleučilišta u Karlovcu, I. Meštrovića 10, 4700 Karlovac, Hrvatska.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

**Karlovac University of Applied Sciences**  
**Department of Food Technology**  
**Professional Study of Food Technology**

**Final paper**

**Scientific Area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific Field: Food Technology**

### MICROBIOLOGICAL CONTROL IN THE PRODUCTION OF ICE TEA

*Ivan Fabijanić*

**Final paper performed at Analytical microbiology laboratory of Jana d.o.o. company**

**Supervisor:** Ph.D. *Bojan Matijević*, college prof.

#### **Abstract**

Tea is the second most widely consumed beverage, after water. During the summer months, iced tea is consumed as alternative to carbonated drinks. This refreshing beverage is produced by mixing ingredients as natural tea extract, juice, flavourings, food colourings and sweeteners with water. Iced tea is medium with a lack of nutrients and relatively low pH – value, so low number of microorganisms, some bacterial species and yeasts or moulds are capable to grow in it. Microbiological problems in iced tea production are related to microorganisms that induce deterioration of product and its sensorical properties. Therefore, the aim of this paper was to monitor microbiological quality of raw materials, production process and final product, peach flavored iced tea. Microbiological analysis have included determination of aerobic bacteria, yeasts and moulds, coliform bacteria, *Pseudomonas aeruginosa* and fecal streptococci. The obtained results show that using microbiologically confirmed raw materials, microbiologically sterile production line and packaging result in production of finished product, peach iced tea which is safe for consumer.

**Number of pages:** 28

**Number of figures:** -

**Number of tables:** 8

**Number of references:** 16

**Original in:** Croatian

**Key words:** iced tea, microbiology, quality control, production

**Date of the final paper defense:** May 26, 2020

#### **Reviewers:**

1. Ph.D. *Sandra Zavadlav*, sen. lecturer
2. Ph.D. *Marijana Blažić*, college prof.
3. Ph.D. *Bojan Matijević*, college prof.
4. Ph.D. *Jasna Halambek*, sen. lecturer (substitute)

**Final paper deposited in:** Library of Karlovac University of Applied Sciences, I. Meštrovića 10, Karlovac, Croatia.



## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1. Podjela bezalkoholnih pića .....	2
2.1.1. Stimulativna pića .....	2
2.1.2. Osvježavajuća pića .....	3
2.1.3. Voćni sokovi .....	4
2.2. Negazirana bezalkoholna pića – ledeni čaj .....	5
2.3. Sirovine za proizvodnju ledenog čaja .....	5
2.3.1. Voda .....	5
2.3.2. Biljni ekstrakti .....	6
2.3.3. Arome .....	7
2.3.4. Regulatori kiselosti .....	8
2.3.5. Antioksidansi .....	8
2.4. Tehnološki postupak proizvodnje ledenog čaja .....	9
2.4.1. Miješanje sirovina .....	9
2.4.2. Pasterizacija ledenog čaja .....	10
2.5. Pakiranje i skladištenje ledenog čaja .....	10
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	12
3.1. Materijali .....	12
3.2. Metode rada .....	13
3.2.1. Odabir mjesta uzorkovanja .....	13
3.2.2. Obrada uzoraka vode za analizu .....	14
3.2.3. Određivanje ukupnog broja mikroorganizama na 37 °C .....	14
3.2.4. Određivanje koliformnih bakterija .....	15
3.2.5. Određivanje fekalnih streptokoka .....	15
3.2.6. Određivanje bakterija <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	16
3.2.7. Određivanje ukupnog broja mikroorganizama na 30 °C te kvasaca i plijesni ...	16
3.2.8. Određivanje pH vrijednosti i udjela suhe tvari (° Brix) .....	18
3.2.9. Senzorska ocjena gotovog proizvoda (ledenog čaja) .....	18
3.2.10. Obrada rezultata .....	19
<b>4. REZULTATI</b> .....	20
4.1. Mikrobiološke ispravnosti sirovina za proizvodnju ledenog čaja .....	20

4.2.	Higijenska ispravnosti punilice i ambalažnog materijala .....	22
4.3.	Mikrobiološka ispravnosti ledenog čaja .....	24
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA</b> .....	<b>25</b>
5.1.	Mikrobiološke ispravnosti sirovina za proizvodnju ledenog čaja .....	25
5.2.	Higijenska ispravnosti punilice i ambalažnog materijala .....	26
5.3.	Mikrobiološka ispravnost ledenog čaja .....	26
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI</b> .....	<b>27</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>28</b>

## 1. UVOD

Razvoj tehnologije omogućio je mnoštvo različitih proizvoda na bazi čaja i učinio ovaj drevni napitak popularnijim nego ikad prije. Vrlo popularan proizvod je ledeni čaj i dobra je zamjena za gazirana bezalkoholna pića u ljetnim mjesecima. Godišnje se u svijetu popije oko 44.000 milijuna litara ledenog čaja s godišnjim rastom od 4,4 % (Nutraceutical World, 2020).

Ledeni čaj isporučen na tržište treba biti zdravstveno ispravan i siguran za potrošača. Zdravstvena ispravnost je širok pojam koji obuhvaća, između ostalog i nalaz različitih mikroorganizama čija prisutnost može uzrokovati neželjene posljedice. Uz proizvodnju ledenog čaja veže se niz mikroorganizama, ali samo neki od njih sposobni su uzrokovati kvarenje. Mikrobiološko kvarenje dovodi do narušavanje senzorskih svojstva i obično se manifestira lošim okusom i mirisom te promjenama u izgledu. Do kvarenja dolazi zbog prisutnosti određenog kritičnog broj stanica ( $10^5$ - $10^6$  CFU/mL), ali i mikrobnog rasta. Pored izravnog kvarenja uzrokovanog živim stanicama, promjenu senzorskih svojstva ledenog čaja može uzrokovati i prenošenje mikrobnih metabolita iz pokvarenih sirovina iako nisu prisutni živi mikroorganizmi. Osim sirovina, kvarenje može uzrokovati nečista procesne opreme i ambalaža ili neadekvatno provedeni postupci toplinske obrade ledenog čaja (Juvonen i sur., 2011).

Utvrđivanje mikrobiološke ispravnosti u proizvodnji ledenog čaja obuhvaća sirovine, proizvodni proces, ambalažu i gotovi proizvod, a usmjereno je na određenu grupu mikroorganizama ili specifičan mikroorganizama svojstven za kvarenje. Pregled preporučenih i obaveznih mikroorganizama s navedenim kriterijima koje treba pratiti u ledenom čaju naveden je u Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu (2011) i predstavlja smjernice za utvrđivanje mikrobiološke ispravnosti.

Cilj ovoga rada bio je pratiti mikrobiološku ispravnost sirovina, tehnološki proces proizvodnje i gotovi proizvod, ledeni čaj s okusom breskve.

## 2. TEORIJSKI DIO

Pojam osvježavajućih pića odnosi se na pića koja imaju osvježavajuća i stimulativna svojstva te svojstvo utaživanja žeđi. Takva pića konzumiraju se u svrhu kompenziranja gubitka tjelesnih tekućina znojenjem, za osvježenje i dobivanje energije, kao dio društvenog rituala te prije i poslije jela. Pića se dijele u dvije skupine, a to su alkoholna i bezalkoholna pića (Anilakumar i sur., 2016).

### 2.1. Podjela bezalkoholnih pića

Pojam bezalkoholnih pića odnosi se na sva pića koja ne sadrže alkohol ili sadrže manje od 0.5 vol% alkohola u svom sastavu. To uključuje široki spektar pića, od toplih do hladnih napitaka te jednostavna i egzotična pića.

U bezalkoholna pića spadaju stimulativna pića (čaj, kava, kakao), osvježavajuća pića (mineralna voda, tonik, gazirani sokovi) i voćni sokovi.

#### 2.1.1. Stimulativna pića

Pića koja podižu nivo psihološke i živčane aktivnosti u tijelu nazivaju se stimulativnim pićima. Taj stimulativni efekt imaju zahvaljujući svom sastavu. Tako primjerice kava sadrži velike količine kofeina, točnije oko 133 mg kofine u količini od 200 g kave. Čaj sadrži supstancu tein koja je također jedan oblik kofeina. Kakao također pada u stimulativna pića iako sadrži svega 9 mg kofeina na 200 g kakaa. Kofein spada u dušične alkaloidne te djeluje kao stimulans na centralni živčani sustav što znači da uzrokuje ubrzani rad srca, povišenje krvnog tlaka i stezanje krvnih žila.

Kava je jedno od najviše konzumiranih bezalkoholnih pića koje se dobiva prženjem zrna kave. Dvije najčešće kultivirane vrste kave su *Coffea Robusta* (porijeklom iz Konga) i *Coffea Arabica* (porijeklom iz Etiopije). Te vrste kave najčešće se uzgajaju u područjima tropske i subtropske klime kao što su Latinska Amerika, Jugoistočna Azija i Afrika. Postoje dva postupka proizvodnje kave iz zrna kave:

- Mokri postupak: U tom postupku, prije početka sušenja, odvajaju se pulpa i zrno kave. Zrna kave se sortiranjem uranjaju u vodu pri čemu oštećena zrna plutaju na površini vode, a ona dobra potonu na dno. Dobra zrna se izdvajaju iz vode te se zatim suše na suncu.

- Suhi postupak: Nakon branja, zrna kave se čiste i suše na suncu pri čemu se ručno okreću kako bi se osiguralo ravnomjerno sušenje zrna. Takav postupak sušenja, ovisno o vremenskim uvjetima, traje i do 4 tjedna.

Osušena zrna kave zatim sortiraju ovisno o boji, veličini i kvaliteti te se prže do određenog stupnja kako bi se postigla željena aroma. Stupnjevi prženja su lagani (do 193 °C pri čemu se zadržava delikatna i blaga aroma kave), srednji (na 205 °C čime se postiže jača aroma) i potpuni (na 218 °C čime se postiže tamna boja i gorčina kave) (Anonymus, 1998).

Drugo najčešće konzumirano stimulativno piće je čaj, a dobiva se infuzijom suhih listova tropske zimzelene vrste *Camellia Sinensis*. Sadržaj theina (kofeina) u čaju je upola manji od sadržaja kofeina u kavi, a također djeluje opuštajuće na mišiće i stimulativno na centralni živčani sustav. Čaj ne sadrži ugljikohidrate, masti i proteine, ali sadrži puno antioksidansa što ga čini vrlo popularnim pićem. Proces proizvodnje čaja uključuje različite metode sušenja lišća biljaka ubranog s plantaža čaja (Rao i Ramalakshmi, 2011).

U stimulativna pića još spadaju i pića na bazi kakaa kao što je na primjer vruća čokolada. Takva pića pripremaju se od rastopljene čokolade ili kakao praha, vrućeg mlijeka ili vode i šećera. Postupak proizvodnje kakao praha je složen postupak koji zahtijeva tehnologiju i praćenje procesa. Nakon branja, zrna kakaa se otvaraju pri čemu se u posebne kante odvajaju pulpa i sjemenke koje zatim odstoje nekoliko dana. Tijekom tih dana dolazi do prelaska pulpe u tekuće stanje uslijed fermentacije, a zaostaju sjemenke kakaa koje se potom skupljaju. Tako prikupljene sjemenke se zatim čiste, suše i prže te melju u tekućinu koja sadrži 55% masti. Zatim se sadržaj masti smanjuje na 25%, a zaostala masa se melje u kakao prah (Anilakumar i sur., 2016).

### 2.1.2. Osvježavajuća pića

Pića koja nadoknađuju tjelesne tekućine izgubljene u procesu znojenja nazivaju se osvježavajućim pićima. Budući da se takva pića najčešće konzumiraju ohlađena, njihovom konzumacijom snižava se tjelesna temperatura čime se dobiva osvježavajući osjećaj. U takva pića spadaju voda, tonik i gazirana pića.

Voda se dijele u dvije grupe: mineralnu i izvorsku vodu. Mineralna voda sadrži otopljene mineralne tvari koje joj daju specifičan okus ili ljekovita svojstva. Takva voda može prirodno sadržavati veće količine CO<sub>2</sub> ili se može dodatno gazirati u procesu punjenja u ambalažu. Izvorska voda se dobiva iz prirodnih podzemnih izvora pri čemu je obogaćena prirodnim mineralima prisutnima u tlu.

Tonik je gazirana voda koja sadrži male količine kinina, alkaloida gorkog okusa koji se dobiva iz kore tropskog kininovca.

Gazirana pića su zakiseljena, zaslađena, obojena i često kemijski konzervirana pića koja se proizvode od pročišćene vode i različitih aditiva čime su postižu njihove različite boje i okusi (Anilakumar i sur., 2016).

### 2.1.3. Voćni sokovi

Voćni sokovi su polidisperzni sustavi koji se razlikuju po veličini čestica voća i njihovoj topljivosti u vodi. Takvi sokovi najčešće sadrže oko 11% topljive suhe tvari određene refraktometrom.

Voćni sokovi dijele se na:

- Voćni sok koji se proizvodi mehaničkom preradom jedne ili više vrsta voća;
- Koncentrirani voćni sok koji se proizvodi fizičkim izdvajanjem određene količine vode iz voćnog soka;
- Voćni sok od koncentriranog voćnog soka koji se proizvodi dodavanjem određene količine vode voćnom koncentratu;
- Dehidratirani ili voćni sok u prahu koji se proizvodi fizičkim izdvajanjem gotovo ukupne količine vode iz voćnog soka;
- Voćni nektar koji se proizvodi dodavanjem određene količine vode, šećera i meda.

Budući da je gore navedeno da su voćni sokovi polidisperzni sustavi, također se mogu podijeliti prema veličini i topljivosti čestica voćnog tkiva na bistre, mutne i kašaste voćne sokove. Bistri voćni sokovi dobivaju se bistrenjem soka uz primjenu dozvoljenih sredstava i filtiranjem kako bi se uklonili sastojci koji uzrokuju mutnoću soka. Mutni voćni sokovi dobivaju se djelomičnim bistrenjem te uz topljive sastojke soka sadrže i fino dispergirane koloidne čestice, a nerijetko se u njima pojavljuju i male količine taloga. Kašasti voćni sok uz topljive sastojke sadrži i netopljive sastojke voća koji se mogu djelomično taložiti u soku (Horváth-Kerkai, 2006).

## **2.2. Negazirana bezalkoholna pića – ledeni čaj**

Ledeni čaj postao je popularan u Južnoj Americi 1904. godine kada je Richard Blechynden (izumitelj ledenog čaja) na iznadprosječno vrući dan dodao led u svoj vrući čaj. Taj događaj zbio se na sajmu u St. Louisu i od tog dana ledeni čaj postao je izuzetno popularno piće najprije u Americi, a zatim i diljem svijeta. Švedska je najveći potrošač ledenog čaja pri čemu potrošnja iznosi 39 litara po glavi stanovnika godišnje. Prosjek ostatka Europe iznosi svega 6 litara (Powers, 2016).

## **2.3. Sirovine za proizvodnju ledenog čaja**

### **2.3.1. Voda**

Voda je osnovna sirovina za proizvodnju ledenog čaja koja mu daje pitkost i osvježavajući učinak prilikom konzumacije. Voda koja ulazi u sastav ledenog čaja mora biti bez boje, okusa i mirisa te u potpunosti bistra. Količina minerala u vodi ovisi prvenstveno o izvoru iz kojeg se voda crpi, a redovni sastojci u vodi su kisik, ugljikov dioksid, dušik te otopljene soli natrija, kalija, kalcija i magnezija.

Voda koja ulazi u sastav ledenog čaja priprema se prolaskom vode kroz filter s aktivnim ugljenom. Kada voda prolazi kroz aktivni ugljen iz nje se uklanja klor, fenoli, organski spojevi kao što su pesticidi i različite druge krupnije nečistoće. Nakon filtriranja slijedi omekšavanje vode u ionskom izmjenjivaču. Ionski izmjenjivači su visokopolimerni spojevi (smole) koji imaju svojstvo vezanja iona iz otopine oslobađajući pritom ekvivalentnu količinu istoimeno nabijenih iona. Ovisno o strukturi dijeli se na anionske i kationske izmjenjivače. U ionskom izmjenjivaču kalcijevi i magnezijevi ioni zamjenjuju se ionima natrija i na taj način postiže se omekšavanje vode. Tvrdća vode se prolaskom kroz ionski izmjenjivač smanjuje s 12 °Nj na vrijednost od svega 0-4 °Nj čime se otklanja mogućenost stvaranja vodenog kamenca.

Omekšana voda se prikuplja u sabirni spremnik, a regeneracija ionskog izmjenjivača provodi se propuštanjem otopine kuhinjske soli čime on postaje spreman za novi ciklus omekšavanja vode.

Osim što je voda osnovna sirovina koja ulazi u sastav ledenog čaja, ona je također i nezamjenjivo sredstvo za pranje proizvodnih površina pogona, uređaja, ambalaže, a također i radni medij, u obliku vruće vode i vodene pare, važan za toplinsku obradu (Ashurst i Hargitt, 2009).

## Sredstva za zaslađivanje

Sredstva za zaslađivanje (sladila) dijele se u 3 skupine:

- Prirodna sladila (šećeri) – šećer (saharoza), invertna šećerna otopina, dekstroza, fruktoza, laktoza i škrobni sirupi;
- Zamjene za šećer (šećerni polioli) – sorbitol, sorbitolni sirup, izomalt, maltitol, maltitolni sirup, laktitol, ksilitol;
- Umjetna sladila – acetsulfan – K, ciklaminska kiselina, saharin, tamautin, glicirhizin, neohesperidin DC.

Od prirodnih sladila najpoznatija i najzastupljenija je saharoza, a često su korišteni i visokofruktozni kukuruzni sirup, dekstroza, med, javorov sirup i laktoza. Budući da prirodna sladila uzrokuju karijes, sve popularnije su zamjene za šećer, tzv. šećerni polioli, odnosno šećerni alkoholi. Mana šećernih alkohola je njihov laksativni učinak zbog čega je bitno regulirati njihov unos.

Umjetna sladila također nemaju kemijsku strukturu šećera i ne uzrokuju karijes. Od saharoze su slađi i preko 30 puta te se dodaju ledenom čaju u vrlo malim količinama. Dodani i u vrlo malim količinama mogu imati nepovoljan učinak na zdravlje čovjeka te se njihova količina u ledenom čaju regulira nacionalnim zakonima i propisima.

Za proizvodnju ledenog čaja važna je i šećerovina, tj. vodena otopina šećera saharoze. U industrijskim pogonima šećerovina se priprema u tankovima u koje se dozira filtrirana i omekšana voda u koju se preko usipnog koša dodaje šećer. Nakon miješanja, šećerovina se uzorkuje, a njena koncentracija određuje se refraktometrijski. U slučaju da koncentracija nije zadovoljavajuća, podešava se dodavanjem vode ili šećera dok ne bude u skladu s proizvodnim zahtjevima.

Ledeni čajevi u prosjeku sadrže 8 g na 100 g proizvoda. Na tržištu postoji i veliki broj ledenih čajeva koji nose oznaku light te ne sadrže šećer uopće i imaju nisku kalorijsku vrijednost (Strawbridge, 2012).

### 2.3.2. Biljni ekstrakti

Ekstrakcija je metoda odvajanja bitnih (funkcionalnih) od manje bitnih sastojaka ljekovite biljke. Neke ljekovite biljke ne treba ekstrahirati, već se koristi njihov osnovni dio kao što je primjerice korijen đumbira i sjemenke lana, no većinu biljaka prije upotrebe treba „pripremiti“, odnosno ekstrahirati vrijedne sastojke.



Uporaba biljnih ekstrakata u industriji pića je veliki trend današnjice. Dodavanjem biljnih ekstrakata postižu se funkcionalna svojstva pića pri čemu se najviše dodaju dobro poznati ekstrakti kao što su zeleni i crni čaj, a zatim i ekstrakti Mace, Acaia, Hibiskusa i slično. Ekstrakt zelenog čaja sadrži epigalokatehin-3-galat (EGCG) iz skupine katehina koji je kao antioksidans 25-100 puta jači od C i E vitamina, te 10 puta jači od beta-karotena. Istraživanja su također pokazala da EGCG djeluje na redukciju tjelesne težine, a posebno je učinkovit u kombinaciji s redovitom tjelovježbom. Djelovanje EGCG očituje se u stimuliranju oksidacije masti čime se ubrzava metabolizam i smanjuju se zalihe masti u organizmu.

Ekstrakti Ginko Bilobe i Guarane dodaju se u pića s funkcijom povećanja energije. Ekstrakt korijena biljke valerijana dodaje se u opuštajuća pića, no u tom slučaju je problem okus koji zaostaje u ustima nakon konzumacije zbog čega takva pića nisu pretjerano popularna na tržištu. Također je važno spomenuti i ekstrakte ružmarina i sladića koji se dodaju u pića protiv mamurluka (Rao i Ramalakshmi, 2011).

Uporaba biljnih ekstrakata u pićima ograničena je pravilima Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA) budući da uporaba određenih ekstrakata još uvijek nije odobrena.

### 2.3.3. Arome

U sastav ledenog čaja ulaze i arome koje po kemijskom sastavu spadaju u skupine alkohola, estera, etera, aldehida, ketona, eteričnih ulja, karboksilnih kiselina i njima sličnih spojeva.

Prirodne arome dobivaju se putem fizikalnih postupaka iz biljnih i životinjskih sirovina, a sastoje se od čistih eteričnih ulja te se koriste za aromatiziranje bombona, žvakaćih guma, pudinga i brojnih drugih proizvoda.

Umjetne arome dobivaju se sintetskim putem te su po kemijskom sastavu najčešće esteri, aldehidi i ketoni. Za identifikaciju aroma te njihovu analitiku potrebno je izvesti vrlo komplicirane i zahtjevne laboratorijske tehnike. Uporaba aroma u proizvodnji namirnica regulirana je propisima te usklađena s normama svjetske zdravstvene organizacije (WHO). Kod kontrole aroma, kao i kod svih drugih aditiva, uzimaju se podaci o toksičnosti, podaci o metabolizmu, analogija s tvarima koje se već nalaze u upotrebi, dopuštena količina u praksi te dopušteni dnevni unos, međutim, najvažniji podaci su svakako oni o identitetu i čistoći arome (Baines i Seal, 2012).

#### 2.3.4. Regulatori kiselosti

Regulatori kiselosti su aditivi koji se u pića dodaju kako bi promijenili ili održavali određenu pH vrijednost. U industriji osvježavajućih bezalkoholnih pića potrebno je dodati regulatore kiselosti kako bi pH vrijednost proizvedenog pića bila 4 do 3,5. Dozvoljeni regulatori kiselosti spadaju u skupine organskih i anorganskih kiselina i njihovih soli, a najčešće korištene su:

- Limunska kiselina – slaba organska kiselina, prirodni konzervans i pojačivač kiselosti koji se dodaje različitim vrstama hrane i bezalkoholnih pića;
- Jabučna kiselina – karboksilna kiselina koja daje kiselkasti okus voću te se vrlo često koristi kao aditiv;
- Mliječna kiselina – prirodni regulator kiselosti i konzervans koji nastaje kao proizvod anaerobne razgradnje ugljikohidrata u živim stanicama;
- Askorbinska kiselina – jedan od glavnih antioksidansa koji uklanja molekule slobodnih radikala i mikroba uz pomoć drugih vitamina i minerala, dodaje se također u ulogu regulatora kiselosti, ali i u funkcionalna pića koja ima dvojaku ulogu kao što su primjerice osvježavajuća i uloga podizanja imuniteta (Jongen, 2002).

#### 2.3.5. Antioksidansi

Antioksidansi su tvari koje štite organizam od štetnog djelovanja slobodnih radikala na način da za sebe vežu čestice slobodnih radikala te tako sprječavaju njihovu oksidaciju i stvaranje destruktivne lančane reakcije. Kao što povoljno djeluju na organizme tako i sprječavaju oksidativne promjene u hrani i piću ili pak pojačavaju antioksidativni učinak drugih tvari u smjesi. Dodatkom antioksidansa produžuje se rok trajanja hrane i pića.

Antioksidansi mogu biti prirodni i umjetni, a da bi se smjeli dodati u hranu i piće moraju biti bez boje, okusa i mirisa, dobro topljivi, netoksični i efikasni ukoliko su dodani i u vrlo malim količinama. U prehrambenoj industriji najčešće se koriste askorbinska kiselina i njene soli (natrijeve i kalcijeve) te esteri masnih kiselina kao što su askorbil palmitat i stearat (Baines i Seal, 2012).

## 2.4. Tehnološki postupak proizvodnje ledenog čaja

Proizvodnja ledenog čaja provodi se na tehnološkim linijama za tzv. sekundarnu preradu što znači da se proizvodnja zasniva na korištenju poluproizvoda. Primarna proizvodnja, tj. proizvodnja aroma i koncentrata koji čine osnovnu sirovinu za proizvodnju ledenog čaja, najčešće se provodi odvojeno u drugim tvornicama.

Tehnološki postupak proizvodnje može se podijeliti u dvije faze:

1. Kreiranje ledenog čaja, tj. miješanje sirovina u unaprijed određenim omjerima;
2. Proizvodni postupak na liniji u kojem se kontinuirano provodi pasterizacija, punjenje i finalizacija proizvoda (Niketić-Aleksić, 1988).

### 2.4.1. Miješanje sirovina

Miješanje sirovina je postupak u kojem se kreira ledeni čaj prema unaprijed definiranoj recepturi. Dio proizvodnog pogona za miješanje sirovina sastoji se od miješalice, izmjenjivača topline, filtera i pumpe.

Već ranije u radu je istaknuto da voda koja ulazi u sastav ledenog čaja mora biti filtrirana, deaerirana i omekšana te se takva skuplja u sabirni spremnik. Dio tako pripremljene vode koristi se za pripremu šećerovine, odnosno šećernog sirupa. Šećerovina je koncentrirana (cca 60%) otopina šećera fruktoze i sadrži 30-50% konačnog volumena vode. Šećerovina se može pripremiti po hladnom ili toplom postupku koji se češće primjenjuje u praksi. U toplom postupku primjenjuju se temperature više od 60 °C pri čemu se uklanja zrak i inaktiviraju prisutni enzimi što rezultira stabilnijim sirupom bolje kvalitete. Šećerni sirup se zatim pasterizira 2 minute na 80 °C u pločastom izmjenjivaču topline i filtrira.

Pripremljenom šećernom sirupu se zatim dodaju arome, biljni ekstrakti, regulatori kiselosti, antioksidansi i ostali sastojci čime se dobiva tzv. kupaži sirup. Kupažni sirup može se pripremiti na način da se šećernom sirupu dodaju komponente koje su prethodno otopljene u zasebnim tankovima ili da se sastojci koji čine ledeni čaj miješaju posebnim sustavom cjevovoda i ventila na samoj liniji. Drugi oblik miješanja naziva se dinamičkim miješanjem, no unatoč tome što se dinamički može miješati i do 8 različitih komponenata, miješanje zasebnih komponenata u miješačima je i dalje češće primjenjivani postupak u industriji (Niketić-Aleksić, 1988).

#### 2.4.2. Pasterizacija ledenog čaja

Pojam pasterizacije odnosi se na proces uništavanja vegetativnih oblika mikroorganizama i istovremenu inaktivaciju enzima prisutnih u namirnicama. U tom procesu namirnice se izlažu letalnoj temperaturi i vremenu koji ovise o vrsti hrane i mikroorganizmima koji se u njoj žele uništiti.

Pasterizacija ledenog čaja može se provoditi prije ili nakon punjenja u ambalažu, a visina temperature kreće se u rasponu od 75 – 100 °C. Vrijeme pasterizacije određuje se ovisno o vrsti proizvoda, tj. broju prisutnih mikroorganizama, kiselosti pića i veličini ambalaže. Važno je naglasiti da se pasterizacijom uništavanju samo mikroorganizmi te da se pritom ne mijenjaju sastav, okus i prehrambena vrijednost namirnice.

Pasterizacija ledenog čaja provodi se kontinuiranim postupkom u pločastim ili cijevnim izmjenjivačima topline prije punjenja ili u tunelskom pasteru nakon punjenja u boce. Češće primjenjivani je kontinuirani postupak budući da je ledeni čaj stalno u protoku i kratkotrajno je izložen djelovanju visokih temperatura. U slučaju tunelske pasterizacije ledeni čaj se grije na temperaturu 82 – 85 °C, puni u boce, zatvara i pasterizira na temperaturi 84 – 88°C u trajanju 15 – 45 minuta ovisno o veličini ambalaže. Nakon toga se proizvod hladi na sobnu temperaturu, etiketira i skladišti u sekundarnu ambalažu.

Također se primjenjuje i aseptični postupak obrade u kojem se ledeni čaj pasterizira u protoku u zatvorenom sustavu na temperaturi 100 – 110 °C u trajanju od pola minute do minute. Nakon aseptičnog postupka proizvod se hladi u uvjetima u kojima naknadna mikrobiološka kontaminacija nije moguća te se na samom kraju puni u sterilnu ambalažu (Paquin, 2009).

#### 2.5. Pakiranje i skladištenje ledenog čaja

Nakon provedenog postupka pasterizacije ledeni čaj se čuva u aseptičnim spremnicima, a skladištenje se provodi u dvije faze:

1. Pranje i sterilizacija cjevovoda, pastera i cijele procesne linije;
2. Punjenje pasteriziranog ledenog čaja u cisterne pod aseptičnim uvjetima i čuvanje do punjenja u ambalažu.

Uobičajena industrijska praksa je toplo punjenje u ambalažu pri čemu temperatura ledenog čaja u trenutku punjenja mora biti iznad 80 °C kako bi se osigurala sterilnost. Ukoliko se punjenje provodi u aseptičnim uvjetima, nije potrebno da bude zagrijan prije punjenja.

Za pakiranje ledenog čaja koristi se najviše PET ambalaža te staklo za potrebe pakiranja proizvoda za ugostiteljske objekte. U slučaju uporabe staklenih boca potrebno je najprije provesti njihovo pranje toplom vodom, otopinom NaOH ili detergentom. Pranje se provodi kontinuirano u zasebnom uređaju, a nakon pranja boce se dodatno ispiru i vizualno pregledaju. Ledeni čaj se puni u tople oprane boce kako bi se spriječila temperaturna razlika koja može dovesti do loma stakla. Nakon punjenja boce se zatvaraju prethodno steriliziranim krunskim zatvaračima ili zatvaračima s navojem (Paquin, 2009).

Tako napunjeni gotovi proizvod do isporuke se čuva na hladnom, suhom i tamnom mjestu u uvjetima sobne temperature. Pravilne uvjete skladištenja potrebno je osigurati i održavati kako nebi došlo do degradacije proizvoda u vidu promjene boje, okusa i mirisa.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

Za provedbu eksperimentalnog dijela ovog rada korišteni su sljedeći materijali:

1. Sterilne bočice i vrećice za uzorkovanje
2. Uzorak vode nakon procesa omekšavanje i vode za ispiranje punjača
3. Hranjivi agar (Plate count agar „Liofilchem“ REF 610040; „Biokar diagnostic“, BK 144HA, „Merck“, 1.0540.0500) za određivanje ukupnog broja heterotrofnih mikroorganizama
4. Wort agar za dokazivanje kvasaca i plijesni
5. Prazne začepljene boce na izlazu iz punjača
6. Uzorci čepova
7. Uzorak šećerovine
8. Uzorak koncentrata breskve
9. Uzorak proizvedenog ledenog čaja (okusa breskve)

Za provedbu istraživanja također je bila potreba i sljedeća oprema:

1. Analitička vaga
2. Vodena kupelj
3. Lijevak za vakuum filtraciju
4. Autoklav
5. Plamenik
6. Termostat
7. Sterilna komora

## 3.2. Metode rada

### 3.2.1. Odabir mjesta uzorkovanja

#### *Uzorkovanje vode*

Voda je glavna sirovina u procesu proizvodnje ledenog čaja te je potrebno osigurati njenu mikrobiološku ispravnost u svim točkama proizvodnog procesa. Kao mjesta uzorkovanja vode odabrani su sabirnik mineralne vode, ugljeni filter za omekšavanje vode, sabirnik filtrirane vode i ulaz u mješač ledenog čaja.

Osim kao sirovina voda se također koristi i za ispiranje u sterilnoj zoni punjača te su kao mjesto uzorkovanja odabrane dizne za ispiranje grla boce u zoni punjača. Uzorkovanje je provedeno tako što su prije početka sterilizacije sterilne zone na liniji punjenja postavljene dvije sterilne, začepljene bočice za uzorkovanje vode. Bočice su otvorene u zadnjem koraku ispiranja sterilne zone, uzeti su uzorci sterilne vode te su potom zatvorene i ostavljene u sterilnoj zoni punjača do kraja šarže. Po završetku šarže su izvađene iz punjača i odnijete u laboratorij na analizu.

#### *Uzorkovanje plastičnih boca i čepova*

Tijekom proizvodnje za mikrobiološku analizu uzete su prazne zatvorene boce na izlazu iz punjača. Uzeto je ukupno 13 boca. Također, U sterilnoj zoni punjača postavljena je sterilna vrećica u koju je uzeto 10 – 15 plastičnih čepova prije početka proizvodnje.

#### *Uzimanje uzoraka u prostoru linije punjenja*

Provjera sterilnosti linije punjenja provedena je uzimanjem briseva i postavljanjem otvorenih Petrijevih zdjelica. Brisevi su uzeti sa sljedećih mjesta uzorkovanja: vodilice čepova (donji dio), dna zvijezde izlaza punjača, zvijezde ulaza u punjač, zvijezde izlaza iz punjača, zvijezde ulaza u ispiralicu, dna ispod zvijezde ulaza u ispiralicu, zvijezde izlaza iz ispiralice, dna ispod zvijezde izlaza iz ispiralice, plastike na kojoj su rukavice i s nosača u tunelu čepova.

Otvorene Petrijeve zdjelice postavljene su na dno ispod čepilice (desna strana), desno i lijevo dno u kutu ispiralice te na traci nosača vreće čepova.

#### *Uzorkovanje sirovina – koncentrata i šećerovine*

Prije početka proizvodnje uzeti su uzorci koncentrata i šećerovine u sterilne bočice. Bočicama je zatim spaljeno grlo te su spremljene u hladnjak do naciepljivanja.

### *Uzorkovanje ledenog čaja s okusom breskve*

Prije puštanja ledenog čaja u liniju punjenja, potrebno je provesti preliminarne analize u laboratoriju što uključuje određivanje pH vrijednosti i udjela suhe tvari. Nakon što su sastojci ledenog čaja u mješaču u potpunosti izmiješani, uzet je uzorak na otvoru tanka. Pritom je prva mala količina ledenog čaja koja je prošla otvorom odbačena, a sljedeća je uzeta za analizu.

Po završetku punjenja ledenog čaja u PET boce sa čepom uzeti su uzorci gotovog proizvoda te čuvani minimalno 3 dana prije analize u standardnim uvjetima skladištenja, tj. na suhom mjestu i na sobnoj temperaturi.

#### 3.2.2. Obrada uzoraka vode za analizu

Uzorci vode za analizu obrađeni su metodom membranske filtracije. To je praktična, jednostavna, ekonomična i ponovljiva metoda za kvantitativno određivanje prisutnih mikroorganizama. Metoda se temelji na koncentriranju mikroorganizama iz uzorka na površini membranskog filtera te na naciepljivanju mikroorganizama na hranjivu podlogu.

Uređaj za filtraciju sastavljen je od lijevka cilindričnog oblika, stativa i poroznog filtra, a od opreme su također korišteni i vakuum pumpa, Woulfova boca, plamenik, mikrobiološka pinceta, Petrijeve zdjelice te membrane za filtraciju.

Metalni dijelovi aparature sterilizirani su spaljivanjem pomoću plamenika. Membrana je postavi na prozirni filtracijski dio koristeći sterilnu pincetu. Na membranu je zatim postavljen i pričvršćen lijevak, a pipac na stativu je zatvoren okomito na cijev. Uzorak vode ulije se u lijevak, a grlić boce s uzorkom je prethodno spaljen. Nakon takvog postupka pripreme uključena je pumpa i otvoren pipac na stativu čime započinje filtracija. Kada je postupak filtracije završen, aparatura je rastavljena, a membrana pomoću pincete postavljena u Petrijeve zdjelice s podlogom koje se zatim stave na inkubaciju na određenu temperaturu i vrijeme ovisno o vrsti bakterija koje se određuju.

#### 3.2.3. Određivanje ukupnog broja mikroorganizama na 37 °C

Određivanje ukupnog broja bakterija u vodi značajno je za ocjenu mikrobiološke ispravnosti vode. U tu svrhu je pripremljen hranjivi agar na način da je u bočicu od 500 mL odvagana propisana masa hranjivog agara. Agar je potom otopljen u alikvotu od 300 mL destilirane vode te je bočica dobro začepljena i stavljena na zagrijavanje u vodenoj kupelji do temperature od 95 °C. Tijekom zagrijavanja su bočice bile djelomično otvorene i povremeno protresane radi homogenizacije. Nakon postizanja temperature od 95 °C podloge su zagrijane



do potpunog otapanja, a zatim sterilizirane u autoklavu na temperaturi od 121 °C tijekom 15 minuta. Zatim je provjerena pH vrijednost i nakon hlađenja podloge su pohranjene u hladnjaku na +1 do +4 °C. Prije uporabe regenerirane su u mikrovalnoj pećnici i stavljene u vodenu kupelj na stabilizaciju temperature u rasponu od 44 do 46 °C. Podloge su u Petrijeve zdjelice razlijevane u sterilnoj komori.

Uzorak za analizu obrađen je metodom membranske filtracije koristeći membranu veličine pora od 0,2 µm. Nakon završene filtracije membrana je pomoću pincete aseptično prenesena na Petrijevu zdjelicu s hranjivom podlogom i stavljena na inkubaciju na 37 °C tijekom 48h i na 20 °C tijekom 72h.

#### 3.2.4. Određivanje koliformnih bakterija

Koliformne bakterije su primarno nepatogene bakterije koje normalno obitavaju u debelom crijevu čovjeka i toplokrvnih životinja gdje sudjeluju u pravilnoj probavi hrane. Koliformne bakterije izlučuju se fekalijama te dospijevaju u otpadne vode, a preko njih i u prirodne vode. Zajedno s koliformnim bakterijama u otpadne i prirodne vode dospijevaju i patogene bakterije, no u vrlo niskim koncentracijama što otežava njihovu detekciju. Stoga se koliformne bakterije koriste kao tzv. indikatorske bakterije za detekciju eventualno prisutnih patogenih bakterija.

Uzorak za analizu također je obrađen metodom membranske filtracije koristeći membranu veličine pora od 0,45 µm. Nakon završene filtracije membrana je pomoću pincete aseptično prenesena na Petrijevu zdjelicu s podlogom od hranjivog Endo agara koja je pripremljena na prethodno opisan način u poglavlju 3.2.3. i stavljena na inkubaciju na 37 °C tijekom 24h.

#### 3.2.5. Određivanje fekalnih streptokoka

Baš kao i koliformne bakterije, fekalni streptokoki se normalno nalaze u probavnom sustavu ljudi i životinja. Te bakterije nisu štetne za ljudsko zdravlje te se također koriste kao indikatorske bakterije čija prisutnost u vodi ukazuje na vjerojatnu prisutnost patogenih bakterija.

Uzorak za analizu fekalnih bakterija obrađen je metodom membranske filtracije koristeći membranu veličine pora od 0,45 µm. Nakon završene filtracije membrana je pomoću pincete aseptično prenesena na Petrijevu zdjelicu s podlogom od azid hranjivog agara koja je

pripremljena na prethodno opisan način u poglavlju 3.2.3. i stavljena na inkubaciju na 37 °C tijekom 48h.

### 3.2.6. Određivanje bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

Bakterija *Pseudomonas aeruginosa* jedan je od najčešćih patogena koji se prenose pitkom vodom. U uzorku vode od 100 mL ne smije biti prisutna, a ukoliko dođe u pitku vodu može kod ljudi prouzročiti teške upale organa te dovesti do smrtnih posljedica.

Uzorak za analizu obrađen je metodom membranske filtracije koristeći membranu veličine pora od 0,45 µm. Nakon završene filtracije membrana je pomoću pincete aseptično prenesena na Petrijevu zdjelicu s podlogom od *Pseudomonas selective* agara koja je pripremljena na prethodno opisan način u poglavlju 3.2.3. i stavljena na inkubaciju na 37 °C tijekom 48h.

### 3.2.7. Određivanje ukupnog broja mikroorganizama na 30 °C te kvasaca i plijesni

Hranjiva podloga je nakon termostatiranja u vodenoj kupelji na temperaturi od 44 do 46 °C sterilnom tehnikom rada ulivena u bocu i kružnim pokretima razlivena po cijeloj površini unutarnje stijenke te ostavljena da se ohladi. Tako nacijepljene boce stavljene su na inkubaciju na 30 °C tijekom 72h.

U vrećicu s uzorcima 10 – 15 čepova uliveno je 500 mL sterilne fiziološke otopine te je sve dobro izmiješano. Uzorak fiziološke otopine u kojoj su bili natopljeni čepovi obrađen je postupkom membranske filtracije te je membrana pincetom prenesena u Petrijeve zdjelice s hranjivom podlogom koje su postavljene na inkubaciju na 30 °C tijekom 72h.

#### *Analiza vode za ispiranje u sterilnoj zoni punjača*

Postupak se također sastoji od obrade uzoraka vode membranskom filtracijom nakon čega je membrana postavljena u Petrijeve zdjelice s hranjivom podlogom na inkubaciju na 30 °C tijekom 72h.

### *Provjera sterilnosti prostora linije punjenja*

Kod provjere sterilnosti uzimanjem briseva posude sa sterilnim štapićima postavljene su na odabrana mjesta uzorkovanja opisani u poglavlju 3.2.1. Nakon završetka šarže, sterilni štapići su sterilnom tehnikom rada izvađeni iz posuda te su uzeti uzorci s površina od cca 5 x 5 cm. Na Petrijeve zdjelice s podlogama nanesen je uzorak brisa prvo na Wort agar, a zatim je isti uzorak nanesen na hranjivi agar. U svrhu određivanja kvasaca i plijesni Petrijeve zdjelice s podlogom od Wort agara stavljene su na inkubaciju na  $27 \pm 2$  °C tijekom 5 dana. U svrhu određivanja ukupnog broja mikroorganizama Petrijeve zdjelice s podlogom od hranjivog agara stavljene su na inkubaciju na  $30 \pm 1$  °C tijekom 72h.

Kod provjere sterilnosti putem otvorenih Petrijevih zdjelica provedeno je uzorkovanje na način da su prije početka sterilizacije postavljene po dvije Petrijeve zdjelice (jedna s Wort, a druga s hranjivim agarom) na mjesta navedena u poglavlju 3.2.1. Nakon završetka šarže Petrijeve zdjelice su otvorene sterilnom tehnikom rada unutar sterilnih komora te su tako ostavljene tijekom 30 minuta. Potom su zatvorene, izvađene i stavljene na inkubaciju; one s Wort agarom na  $27 \pm 2$  °C tijekom 5 dana, a one s hranjivim agarom na  $30 \pm 1$  °C tijekom 72h.

U svrhu analize Wort i hranjivi agar termostatirani su u vodenoj kupelji na temperaturi od 44 do 46 °C. Uzorci sirovina (koncentrata breskve i šećerovine) sterilnom tehnikom rada su pipetirani (1 mL uzorka) u Petrijeve zdjelice te su zalijevani hranjivim i Wort agarom, homogenizirani i ostavljeni da se ohlade. Nakon hlađenja stavljenu su na inkubaciju na temperaturu od 30 °C tijekom 72h za hranjivi agar, odnosno na 25 °C tijekom 5 dana za Wort agar.

### *Mikrobiološka analiza ledenog čaja*

U dvije Petrijeve zdjelice je otpipetirano po 1 mL ledenog čaja. Jedna Petrijeva zdjelica je zalivena s Wort agarom, a druga s hranjivim agarom. Podloga i uzorak su pomiješani kružnim pokretima u obliku broja 8 i ostavljene da se ohlade. Petrijeve zdjelice s podlogom Wort agara su inkubirane na  $27 \pm 2$  °C tijekom 5 dana, a one s hranjivim agarom na  $30 \pm 1$  °C tijekom 72h.

### 3.2.8. Određivanje pH vrijednosti i udjela suhe tvari (° Brix)

Prilikom analize sirovine osim mikrobioloških pokazatelja kvalitete važni su i fizikalno – kemijski. pH vrijednost koncentrata breskve određena je uranjanjem elektrode prethodno baždarenog pH metra u čašicu s uzorkom.

Za određivanje udjela suhe tvari uzorak je prethodno temperiran na 20 °C te je nekoliko kapi nanijeto na za to predviđeno mjesto na digitalnom refraktometru. Na skali refraktometra očitana je rezultat, a važno je napomenuti da je prije svakog mjerenja refraktometar testiran destiliranom vodom čiji postotak suhe tvari iznosi 0.

### 3.2.9. Senzorska ocjena gotovog proizvoda (ledenog čaja)

Senzorske analize obuhvaćaju ispitivanje mirisa, okusa, mutnoće i boje gotovog proizvoda.

#### *Miris*

Miris u ledenom čaju određen je organoleptički na sobnoj temperaturi. Intenzitet mirisa raste s porastom temperature pa se na višim temperaturama lakše određuje. Kvaliteta mirisa određuje se opisno, a intenzitet izražava brojevima od 0 do 5 pri čemu vrijede sljedeće relacije: 0 – bez mirisa (okusa), 1 – vrlo slab miris (okus), 2 – slab miris (okus), 3 – osjetan miris (okus), 4 – jasan, upadljiv miris (okus) i 5 – vrlo jak miris (okus).

#### *Okus*

Da bi se okus mogao pravilno ocijeniti usna šupljina mora biti „pripremljena“. To znači da se prije ocjenjivanja okusa ne smije piti ni jesti ništa gorko, kiselo, ljuto ili bilo što drugo jakog okusa. Također, ne smije se pušiti niti konzumirati alkoholna pića. Jedan gutljaj ispitivanog ledenog čaja unese se u usta te malo zadrži na jeziku i nepcu, kao pri ispiranju grla. Usnu šupljinu prethodno treba isprati ispitivanim proizvodom.

Prilikom ocjenjivanja okusa potrebno je naznačiti karakteristike okusa (primjerice: bljutav, slan, gorak, kiseo i slično) te naglasiti intenzitet (bez okusa, vrlo slab, jasan, vrlo jak itd.). Poželjno je da u senzorskoj ocjeni proizvoda sudjeluje barem 3 do 5 osoba.

#### *Mutnoća*

Ispitivanje mutnoće proizvoda provodi se golim okom, bez uporabe optičkih sprava.

### *Izgled gotovog proizvoda*

Ocjena izgleda gotovog proizvoda sastoji se od izgleda boce, paketa i palete. Kod boca je promatran opći izgled, nivo napunjenosti, ispravnost ispisanog datuma (pozicija, rok trajanja), ispravnost etikete (odgovarajuće tržište, količina ljepila, položaj), ispravnost boce (oblik, čvrstoća), izgled i ispravnost čepa prilikom otvaranja.

Kod paketa je promatran izgled i prikladnost za odgovarajuće tržište u vidu ručkica i folije dok je kod palete uz izgled promatrano odgovara li deklaracija tržištu kojem je proizvod namijenjen.

#### 3.2.10. Obrada rezultata

Dobiveni rezultati obrađeni su statistički u programu Microsoft Office Excel 2010 pri čemu su iskazane minimalne i maksimalne vrijednosti analiziranih parametara, srednja vrijednost i standardna devijacija.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Mikrobiološke ispravnosti sirovina za proizvodnju ledenog čaja

**Tablica 1.** Mikrobiološka ispravnost vode za proizvodnju ledenog čaja.

Pokazatelj kakvoće		Mjesto uzorkovanja			
		Sabirnik mineralne vode	Ugljeni filter za omekšavanje vode	Sabirnik filtrirane vode	Mješač ledenog čaja
Koliformne bakterije	Min	0,0	0,0	0,0	0,0
	Max	0,0	0,0	0,0	0,0
	$\bar{x} \pm \sigma$	0,0 ± 0,0000	0,0 ± 0,0000	0,0 ± 0,0000	0,0 ± 0,0000
Aerobne bakterije (37°C)	Min	0,0	0,0	0,0	0,0
	Max	0,0	0,0	0,0	0,0
	$\bar{x} \pm \sigma$	0,0 ± 0,0000	0,0 ± 0,0000	0,0 ± 0,0000	0,0 ± 0,0000
Aerobne bakterije (20°C)	Min	0,0	0,0	0,0	0,0
	Max	0,0	0,0	0,0	0,0
	$\bar{x} \pm \sigma$	0,0 ± 0,0000	0,0 ± 0,0000	0,0 ± 0,0000	0,0 ± 0,0000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Min	0,0	0,0	0,0	0,0
	Max	0,0	0,0	0,0	0,0
	$\bar{x} \pm \sigma$	0,0 ± 0,0000	0,0 ± 0,0000	0,0 ± 0,0000	0,0 ± 0,0000
Fekalni streptokoki	Min	0,0	0,0	0,0	0,0
	Max	0,0	0,0	0,0	0,0
	$\bar{x} \pm \sigma$	0,0 ± 0,0000	0,0 ± 0,0000	0,0 ± 0,0000	0,0 ± 0,0000

**Tablica 2.** Mikrobiološka ispravnost šećerovine.

	Ukupan broj m.o. (30°C/72h)
Min	0,0
Max	0,0
$\bar{x} \pm \sigma$	0,0 ± 0,0000

**Tablica 3.** Osnovni pokazatelji kakvoće.

	Pokazatelj kakvoće	
	Stupnjevi Brix-a	pH
Min	47,1	3,02
Max	47,5	3,06
$\bar{x} \pm \sigma$	47,3 ± 0,2	3,04 ± 0,02

**Tablica 4.** Mikrobiološka ispravnost koncentrata breskve.

	Pokazatelj kakvoće	
	Aerobne bakterije (30 °C)	Kvasci i plijesni
Min	0,0	0,0
Max	0,0	0,0
$\bar{x} \pm \sigma$	0,0 ± 0,0000	0,0 ± 0,0000

#### 4.2. Higijenska ispravnosti punilice i ambalažnog materijala

Tablica 5. Higijenske ispravnosti punilice za ledeni čaj.

<b>Pozicija brisa</b>	<b>Ukupan broj m.o. (30°C/72h)</b>	<b>Kvasci i plijesni (25°C/5 dana)</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b><math>\bar{x} \pm \sigma</math></b>
Vodilica čepova	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0000
Dno zvijezde izlaza punjača	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0000
Zvijezda ulaza u punjač	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0000
Zvijezda izlaza iz punjača	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0000
Zvijezda ulaza u ispiralicu	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0000
Dno ispod zvijezde ulaza u ispiralicu	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0000
Zvijezda izlaza iz ispiralice	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0000
Dno ispod zvijezde izlaza iz ispiralice	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0000
Plastika na kojoj su rukavice	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0000
Dno nosača u tunelu čepova	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0000
<b>Pozicija Petrijeveke</b>	<b>Ukupan broj m.o. (30°C/72h)</b>	<b>Kvasci i plijesni (25°C/5 dana)</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b><math>\bar{x} \pm \sigma</math></b>
Dno ispod čepilice (desna strana)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0000
Dno – desno u kutu ispiralice	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0000
Dno – lijevo u kutu ispiralice	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0000
Traka nosača vreća čepova	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0000
<b>Provjera sterilnosti</b>	<b>Ukupan broj m.o. (30°C/72h)</b>	<b>Kvasci i plijesni (25°C/5 dana)</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b><math>\bar{x} \pm \sigma</math></b>
Čepovi	0,0	/	0,0	0,0	0,0 ± 0,0000
Laminar	/	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0000
Sterilna voda L	0,0	/	0,0	0,0	0,0 ± 0,0000
Sterilna voda D	0,0	/	0,0	0,0	0,0 ± 0,0000



**Tablica 6.** Mikrobiološka ispravnost boca i čepova prije punjenja ledenog čaja.

	<b>Boce</b>
	Aerobne bakterije (30 °C)
Min	0,0
Max	0,0
$\bar{x} \pm \sigma$	$0,0 \pm 0,0000$
	<b>Čepovi</b>
	Aerobne bakterije (30 °C)
Min	0,0
Max	0,0
$\bar{x} \pm \sigma$	$0,0 \pm 0,0000$

### 4.3. Mikrobiološka ispravnosti ledenog čaja

**Tablica 7.** Mikrobiološka ispravnost ledenog čaja s okusom breskve prije punjenja.

		Mjesto uzorkovanja		
		Mješač	Paster	Distributer soka na pu
Aerobne bakterije (30°C)	Min	0,0	0,0	0,0
	Max	0,0	0,0	0,0
	$\bar{x} \pm \sigma$	0,0 ± 0,0000	0,0 ± 0,0000	0,0 ± 0,0000
Kvasci i plijesni	Min	0,0	0,0	0,0
	Max	0,0	0,0	0,0
	$\bar{x} \pm \sigma$	0,0 ± 0,0000	0,0 ± 0,0000	0,0 ± 0,0000

**Tablica 8.** Mikrobiološka ispravnost ledenog čaja s okusom breskve napunjenog u boce.

	Aerobne bakterije (37 °C)	Kvasci i plijesni
Min	0,0	0,0
Max	0,0	0,0
$\bar{x} \pm \sigma$	0,0 ± 0,0000	0,0 ± 0,0000

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Mikrobiološke ispravnosti sirovina za proizvodnju ledenog čaja

Mikrobiološka analiza vode koja se koristi kao sirovina u proizvodnji ledenog čaja provedena je uzimanjem uzoraka s četiri različita mjesta u pogonu za proizvodnju ledenog čaja, a to su: sabirnik mineralne vode, ugljeni filter za omekšavanje vode, sabirnik filtrirane vode i mješač ledenog čaja. Rezultati mikrobiološke analize ukupnog broja heterotrofnih mikroorganizama na 37°C bili su negativni, što znači da nakon inkubacije od 48 sati na temperaturi od 37°C nije bilo poraslih mikroorganizama. Uz to, na temperaturi od 20°C i u vremenu inkubacije od 72h također nije bilo poraslih heterotrofnih mikroorganizama. Kod određivanja ukupnih koliformnih bakterija, na hranjivoj podlozi nakon inkubacije od 24 sata na 37°C nije ništa poraslo. U uzorku vode koji je bio u inkubaciji od 24 sata, na 37°C nije bila prisutna bakterija *Pseudomonas aeruginosa*, a na istim uvjetima inkubacije nisu bili prisutni niti fekalni streptokoki. Dobiveni rezultati pokazali su da je voda ispravna te da se može koristiti za proizvodnju ledenog čaja, a skupni rezultati prikazani su u tablici 1.

Provjera sterilnosti aseptičke zone linije punjenja ledenog čaja provedena je uzimanjem briseva te putem otvorenih Petrijevih zdjelica na pozicijama prikazanim u tablici 2. Na temperaturi od 30°C u vremenu inkubacije od 72h nije bilo poraslih mikroorganizama, a također nije došlo niti do razvoja kvasaca i plijesni na temperaturi od 25°C tijekom 5 dana inkubacije. Time je dokazana sterilnost svih ključnih pozicija linije punjača važna za osiguranje mikrobiološke ispravnosti proizvedenog ledenog čaja.

U tablici 3 prikazani su rezultati mikrobiološke analize uzorka pripremljene šećerovine. Tijekom inkubacije od 72 h na temperaturi 30°C nije bilo poraslih mikroorganizama čime je dokazano da je pripremljena šećerovina mikrobiološki ispravna i pogodna za korištenje u proizvodnom procesu.

Za proizvodnju ledenog čaja s okusom breskve neophodan je i koncentrat breskve kojemu su izmjereni udio suhe tvari i pH-vrijednost. Izmjereni udio suhe tvari iznosio je 47,3°Bx, a pH vrijednost 3,04 što je u propisanim granicama. Osim fizikalno-kemijske analize, na koncentratu breskve provedena je i mikrobiološka analiza koja je pokazala da na temperaturi 30°C tijekom 72h nije bilo poraslih mikroorganizama, a također niti kvasaca i plijesni na temperaturi 25°C tijekom 5 dana. Rezultati su prikazani u tablicama 4. i 5. te pokazuju da je ispitivani koncentrat breskve pogodan za korištenje u proizvodnji ledenog čaja.

## **5.2. Higijenska ispravnosti punilice i ambalažnog materijala**

Provedenom mikrobiološkom analizom utvrđena je higijenska ispravnost punilice za ledeni čaj (tablica 5.) Uzorci s kontrolnih mjesta na punilici nisu sadržavali porasle kolonije aerobnih mezofilnih bakterija i kvasca i plijesni. Također, mikrobiološkom analizom utvrđena je i sterilnost plastičnih boca i čepova (tablica 6). Odnosno, uzorci 15 čepova i 13 plastičnih boca bili su sterilni.

## **5.3. Mikrobiološka ispravnost ledenog čaja**

Mikrobiološka analiza ledenog čaja tijekom proizvodnog postupka provedena je uzimanjem uzoraka iz mješaača ledenog čaja, pastera i distributera ledenog čaja na punjač. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 7. i pokazuju da na temperaturi od 30°C tijekom inkubacije od 72h nije bilo poraslih mikroorganizama niti na jednom od analiziranih uzoraka. Također nije bilo poraslih kvasaca i plijesni na temperaturi 25°C tijekom 5 dana inkubacije.

Tako pripremljeni ledeni čaj je pakiran u PET boce sa čepom i nasumično odabrani uzorci su analizirani. Rezultati mikrobiološke analize pakiranog soka su također bili negativni što znači da na temperaturi od 30°C tijekom inkubacije od 72h nije bilo poraslih mikroorganizama niti na jednom od analiziranih uzoraka. Također nije bilo poraslih kvasaca i plijesni na temperaturi 25°C tijekom 5 dana inkubacije (Tablica 8).

## 6. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata istraživanja i provedene rasprave mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Uzorci vode koja se koristi kao sirovina u proizvodnji ledenog čaja su mikrobiološki ispravni i ne sadržavaju heterotrofne mikroorganizme, koliforme bakteriji niti fekalne streptokoke i bakteriju *Pseudomonas aeruginosa*. Tako analizirana vode pogodna je za uporabu u proizvodnom procesu.
2. Provjera sterilnosti aseptičke zone linije punjača ledenog čaja pokazala je odsutnost mikroorganizama, kvasaca i plijesni čime je pokazano da su osigurani sterilni uvjeti u proizvodnom procesu.
3. Šećerovina i koncentrat breskve također su mikrobiološki ispravni, a uz to koncentrat breskve ima udio suhe tvari i pH vrijednost koji su u zadanim granicama i odgovaraju propisanim vrijednostima.
4. Ambalaža u koju se pripremljeni ledeni čaj puni također je analizirana i pokazano je da je mikrobiološki ispravna.
5. Uzorci uzeti na mješaču ledenog čaja, pasteru i distributeru punjača također su pokazali mikrobiološku ispravnost što znači da je proces pasterizacije uspješno proveden.
6. Gotovi ledeni čaj napunjen u PET boce sa čepom nije sadržavao nikakve mikroorganizme niti kvasce i plijesni te je kao takav mikrobiološki u potpunosti ispravan.

## 7. LITERATURA

1. Anilakumar, K.R., Rajendran, C., Sharma, R.K. (2016.): Non-alcoholic beverages – Market potential and opportunities, *Indian Food Industry Mag*, **35** (4), 15-19.
2. Anonymus (2018.): <https://science.umd.edu/classroom/bsci124/lec28.html>, pristupljeno (10.11.2019.)
3. Anonymus, (1998.): Stimulate beverages, Undergraduate Program in Plant Biology, University of Maryland.
4. Ashurts, P., Hargitt, R. (2009): *Soft Drink and Fruit Juice Problems Solved*, Woodhead Publishing, Cambridge.
5. Baines, D., Seal, R. (2012): *Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings*, Woodhead Publishing, Cambridge.
6. Benussi-Skukan, A., Boroš, K., Brlek-Gorski, D., Grizelj, N., Hegedušić, P., Hengl, B., Humski, A., Karačić, T., Kovaček, I., Majić, K., Palčić-Jakopović, K., Putnik, P., Vazdar, R. (2011): *Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu*, 3. izdanje, Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, Zagreb.
7. Evans, J.R., Lindsay, W.M. (1998.): *The Management and Control of Quality*, South Western Educational Publishing, Cengage.
8. Horváth-Kerkai, E. (2006): *Manufacturing Fruit Beverages*, Handbook of Fruits and Fruit Processing, Blackwell Publishing, Iowa, 204 - 206.
9. ISO (1996.) *Upravljanje kakvoćom i osiguravanje kakvoće*, HRN EN ISO 8402
10. ISO (2015.): *Upravljanje kvalitetom*, HRN EN ISO 9000
11. Jongen, W., (2002.): *Fruit and vegetable processing*, CRC Press, New York
12. Juran, J.M. (1995.): *A History of Managing for Quality: The Evolution, Trends, and Future Directions of Managing for Quality*, J.M. Juran, ASQC Quality Press, Michigan, 552-560.
13. Juvonen, R., Virkajärvi, V., Phila, O., Laitila, A. (2011): *Microbiological spoilage and safty risks in non-beer beverages*, Julkaisija-Utgivare, Finska
14. Niketić – Aleksić, G., 1988: *Tehnologija bezalkoholnih pića*, Beograd.
15. Nutraceutical World (2020): *Iced Tea Market to Grow 22% by 2021*, [https://www.nutraceuticalsworld.com/issues/2017-06/view\\_breaking-news/iced-tea-market-to-grow-22-by-2021/](https://www.nutraceuticalsworld.com/issues/2017-06/view_breaking-news/iced-tea-market-to-grow-22-by-2021/) (pristupljeno 05.05.2020.)
16. Paquin, P. (2009.): *Functional and speciality beverage technology*, Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC

17. Powers, S., (2016): Sweet Tea: A History Of The 'Nectar Of The South', <https://www.gpbnews.org/post/sweet-tea-history-nectar-south>, pristupljeno (26.11.2019.)
18. Rao, L.J.M., Ramalakshmi, K. (2011): High impact value-added products of tea, Recent Trends in Soft Beverages, Woodhead Publishing, India, 113-145.
19. Strawbridge, H. (2012.): Artificial sweeteners: sugar-free, but at what cost?, Harvard Health Publishing, Harvard Medical School, <https://www.health.harvard.edu/blog/artificial-sweeteners-sugar-free-but-at-what-cost-201207165030>, pristupljeno (01.12.2019.)