

Inaktivasi Termal Spora *Bacillus Licheniformis* dalam Jus Nanas

¹⁾Dewi Sunarti, ²⁾Evelyn, ²⁾Syelvya Putri Utami

¹⁾Mahasiswa Program Studi Teknik Kimia, ²⁾Dosen Jurusan Teknik Kimia
Fakultas Teknik, Universitas Riau
Kampus Binawidya Jl. HR Subrantas Km 12,5 Pekanbaru 28293

ABSTRACT

Bacillus licheniformis is a bacteria that has high heat resistance. The purpose of this study was to determine the effect of temperature (T : 85 ° C, 90 ° C, 95 ° C) at soluble solid SS: 12 ° Brix on the thermal inactivation of *B. licheniformis*. Then determine the value of D and Z . This study uses the thermal method of pasteurization process and spore calculation using the spread plate method. The D -values obtained at SS 12 ° Brix for temperatures 85, 90 and 95 ° C were 16.56; 7.63; and 3.52 minutes and the Z -value obtained is in the at 14,88 ° C. It was shown that haiger temperature resulted in the decreasing of the time needed to inactivate the spores. The results of this study emphasize the importance of temperature to the D and Z value for pineapple juice pasteurization.

Keywords: *bacillus licheniformis*, endospore, inactivation, pasteurization, pineapple juice.

1. Pendahuluan

Keamanan pangan di Indonesia telah diatur dalam Undang-Undang No 7 Tahun 1996 upaya untuk menyediakan pangan yang bebas atau terkendali dari bahaya biologis, kimia, dan benda yang dapat menimbulkan gangguan kesehatan pada manusia. Dalam industri pengolahan buah-buahan yang melibatkan proses pemanasan, keamanan pangan sering dikaitkan dengan proses pengawetan yang ditujukan untuk menginaktivasi mikroorganisme *pathogen*. Beberapa bakteri *pathogen* seperti *Bacillus* dan *Clostridium* dapat membentuk spora yang mempunyai ketahanan panas tinggi. Ketahanan panas spora bakteri dipengaruhi oleh banyak faktor seperti jenis spesies, *strain*, lingkungan kationik dari media sporulasi, dan pH.

Bacillus licheniformis biasanya ditemukan di alam seperti di tanah (Ghani dkk, 2013; Voigt dkk, 2014) dan dapat juga ditemukan di lingkungan ekstrim (Llarch, 1997). Spora *B. licheniformis* dapat bertahan

pada suhu tinggi (Lü cking dkk, 2013) dan *B. licheniformis* menyebabkan keracunan makanan dan pembusukan makanan. Pada tahun 1976, wabah keracunan makanan disebabkan oleh *B. licheniformis* terjadi di Inggris . Sebanyak 48 orang terinfeksi keracunan makanan dan satu meninggal setelah makan siang (Jephcott dkk, 1977). *Toxigenic strain B. licheniformis* terlibat dalam kasus-kasus keracunan makanan juga diisolasi dari berbagai sumber termasuk produk susu di Kerajaan Inggris, Norwegia dan Finlandia. Data yang dikumpulkan menunjukkan bahwa infeksi *B. licheniformis* memiliki gejala seperti kram perut, muntah, diare, mual, sakit perut dan rasa terbakar di mulut (Salkinoja-Salonen dkk, 1999).

Selain kekhawatiran atas ketahanan termal spesies *B. licheniformis*, bakteri ini bisa tumbuh dalam makanan asam dan meningkatkan pH di atas 4,8 di mana *Clostridium botulinum* bisa memulai pertumbuhan dan menghasilkan *toxin*. Banyak kasus keracunan makanan hingga

kematian disebabkan oleh *C. botulinum* (Rodriguez dkk, 1993). Oleh karena itu, diperlukan pengolahan yang tepat pada produk makanan dan minuman terkhusus pada industri pengolahan buah.

Provinsi Riau mempunyai potensi penghasil buah nanas yang cukup tinggi menempati urutan keempat dengan jumlah total produksi mencapai 1,7 juta ton per tahun (BPS, 2015). Nanas (*Ananas comosus* L. Merr) mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai komoditi ekspor. Buah ini disukai karena memiliki cita rasa yang khas baik untuk dimakan, segar sebagai pencuci mulut maupun olahan. Namun dalam keadaan segar buah nanas tidak tahan lama, hanya tahan 7 hari pada kondisi kamar (suhu 28-30 °C). Sifat buah yang demikian akan menjadikan kendala dalam pengolahannya. Hal ini karena pada umumnya produk hortikultura merupakan struktur hidup yang masih mengalami perubahan kimiawi dan biokimiawi yang disebabkan oleh aktivitas mikroba. Produk segar hortikultura memiliki kandungan air yang tinggi, sehingga peka terhadap kelayuan, pengkeriputan dan kerusakan mekanik serta rentan terhadap serangan cendawan dan bakteri.

Teknik pengawetan jus buah yang umum dilakukan selama ini adalah teknik pasteurisasi *low temperature long time* (LTLT) pada suhu 65°C selama 30 menit (Hariyadi, 2010). Kondisi pasteurisasi ini belum tentu cukup untuk menginaktivasi spora dari *B. licheniformis*, sehingga bakteri ini kemungkinan dapat tetap hidup dan tumbuh dalam produk sehingga mengkontaminasi buah-buahan dan merusak produk. Dengan kata lain, bahwa temperatur dan waktu pasteurisasi termal yang selama ini diterapkan tidak didasarkan pada ketahanan panas mikroorganismenya. Oleh karena itu,

diperlukan kajian berapa ketahanan panas dari spora bakteri yang memiliki ketahanan panas yang tinggi seperti spora bakteri *B. licheniformis* untuk desain proses pasteurisasi jus.

Penelitian ini akan mengkaji ketahanan atau resistensi spora bakteri *B. licheniformis* dalam jus nanas menggunakan teknologi termal dengan variasi temperatur dan tingkat kemanisan jus dalam rangka meningkatkan keamanan produk dan memperpanjang umur simpan jus nanas. Teknologi pasteurisasi termal ini merupakan metode konvensional yang paling banyak diaplikasikan baik skala industri maupun skala rumah tangga. Analisis ketahanan panas dinyatakan dalam kinetika reaksi orde pertama yakni menentukan nilai *D* dan nilai *z*. Diharapkan penelitian ini dapat memberikan banyak manfaat bagi industri pengolahan buah-buahan pada khususnya dan masyarakat pada umumnya. Selain itu, data-data yang didapatkan dari penelitian ini selanjutnya dapat dipublikasikan pada jurnal nasional maupun internasional.

2. Metodologi Penelitian

2.1 Bahan yang digunakan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur bakteri *B. licheniformis* (*type strain N-INACC B1088*) koleksi INA-CC LIPI Cibinong Jawa Barat, Nutriet Agar, MnSO₄, alkohol 70%, spiritus, BPW, aqua DM, jus nanas dan bahan lainnya sesuai prosedur kerja.

2.2 Alat yang digunakan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *Waterbath*, Termometer, *Autoclaf All America* model 1925/KY-23D, *Vortex Mixer Genie 2TM*, Inkubator, *Centrifuge*, Mikropipet, *Eppendorf, Blue tip*, lampu bunsen, batang L, pH meter, Refraktometer, Jarum ose, cawan petri, timbangan analitik, tabung reaksi dan alat-alat standar

laboratorium lainnya sesuai prosedur kerja.

2.3 Prosedur Penelitian

Penelitian ini melalui beberapa tahapan dalam pengerjaannya, yaitu:

2.3.1 Sporulasi jamur *Bacillus Licheniformis* (N-INACC B1088)

Sporulasi ini menggunakan metode dari Evelyn dan Silva (2015). Persiapkan 0,3% larutan $MnSO_4$ dengan melarutkan padatan $MnSO_4$ dalam aquades. Persiapkan 100 ml *Nutrient Agar* ke dalam erlenmeyer dan sterilisasi pada 121 °C selama 15 menit. Media yang telah cair didinginkan pada sampai suhu 50 °C. Pada kondisi steril tambahkan 0,1 ml $MnSO_4$. Tuangkan media yang telah dicampurkan $MnSO_4$ ke dalam cawan petri. Media diinkubasi selama 3 hari pada suhu 35 °C untuk melihat pertumbuhan sel vegetatif dan dipastikan tidak ada tanda-tanda kontaminasi. Tahap sporulasi (pembentukan spora) dimulai dengan menginkubasi pada media selama 14 hari pada suhu 35 °C sampai spora dihasilkan (pengamatan dengan mikroskop). Terakhir spora dipanen dengan sentrifugasi pada 4000xg untuk 10 menit dan dicuci 3 kali dengan *sterile distilled water*. Pelet/endapan spora disimpan dalam 150 ml *sterile distilled water* dan disimpan di *refrigerator* pada temperatur 2-4 °C hingga digunakan.

2.3.2 Inokulasi jus nanas

Jus nanas digunakan sebagai medium suspensi untuk menginaktivasi spora *B. licheniformis*. Spora *B. licheniformis* diambil sebanyak 1 ml lalu di inokulasi ke dalam 9 ml jus nanas sehingga didapat konsentrasi awal spora (N_0).

Jus nanas yang telah dibuat digunakan sebagai medium suspensi untuk menginaktivasi spora *E. Javanicum*. Spora yang telah disimpan pada lemari pendingin diambil sebanyak 1 ml lalu di

inokulasi ke dalam 2 ml jus nanas sehingga konsentrasi dapat ditentukan konsentrasi awal spora N_0 .

2.3.3 Inaktivasi spora dengan proses termal

Metode ini dilakukan pada tiga suhu berbeda yaitu 85, 90 dan 95 °C. Pertama, *waterbath* dipanaskan hingga temperatur 85 °C lalu sampel jus nanas 12°Brix yang telah diinokulasi dengan spora bakteri *B. licheniformis* pada tabung reaksi dimasukkan ke dalam *waterbath* selama waktu yang telah ditentukan. Kemudian sampel-sampel dikeluarkan dan didinginkan dalam air es lalu dilakukan penghitungan/pencacahan spora. Prosedur diulang dengan variasi tingkat kemanisan jus 20 dan 30°Brix, serta temperatur 90 dan 95 °C. Eksperimen diulang kembali pada masing-masing temperatur minimal tiga kali pengulangan atau dua kali eksperimen dengan sampel duplo tiap kalinya.

2.3.5 Pencacahan spora

Suspensi dari inokulasi spora *B. licheniformis* dan jus nanas hasil proses termal digunakan untuk penentuan konsentrasi spora atau jumlah koloni dengan metode *spread plate* pada *Nutrient Agar* (NA). Sebelumnya dilakukan pengenceran bertingkat menggunakan larutan *Buffered Peptone Water* (BPW). Sebanyak 1 ml

suspensi spora dimasukkan kedalam 9 ml *Buffered Peptone Water* (BPW) 0.1% (w/v). Setiap pengenceran tabung dicampur berulang kali menggunakan *mixer vortex* berkecepatan tinggi untuk menghasilkan suspensi spora homogen. Piring *Nutrient Agar* (NA) kemudian dibalik dan diinkubasi pada 35 °C selama 24 jam hingga koloni terbentuk pada kisaran 30 hingga 300 koloni (Evelyn dan Silva, 2015a). Koloni yang terbentuk dihitung konsentrasinya dan

dinyatakan dalam CFU/ml jus. Adapun blok diagram inaktivasi termal

2.3.4 Analisis Data

Jumlah koloni spora yang hidup hasil pencacahan dengan *spread plate* (dinyatakan dalam $\text{Log } N/N_0$, CFU/ml) diplotkan terhadap waktu pemanasan (t , menit) pada tiga suhu dan tingkat kemanisan ($^\circ$ Brix) yang berbeda. Grafik regresi antara t vs. $\text{Log } N/N_0$ digunakan untuk menghitung nilai D yaitu waktu (menit) pada suhu tertentu yang diperlukan untuk menurunkan jumlah spora, dimana merupakan nilai *inverse* dari *slope* pada kurva. Nilai Z yaitu besarnya perubahan suhu yang diperlukan untuk merubah nilai D yang diperoleh dari 5 plot antara temperatur terhadap logaritmik nilai D . Untuk mendapatkan tingkat keakuratan data, jumlah koloni spora yang diplotkan merupakan nilai rata-rata \pm standar deviasi (SD). Koefisien determinasi (R^2) dan standar error (SE) dalam penentuan nilai parameter kinetika first order (D dan Z) juga akan

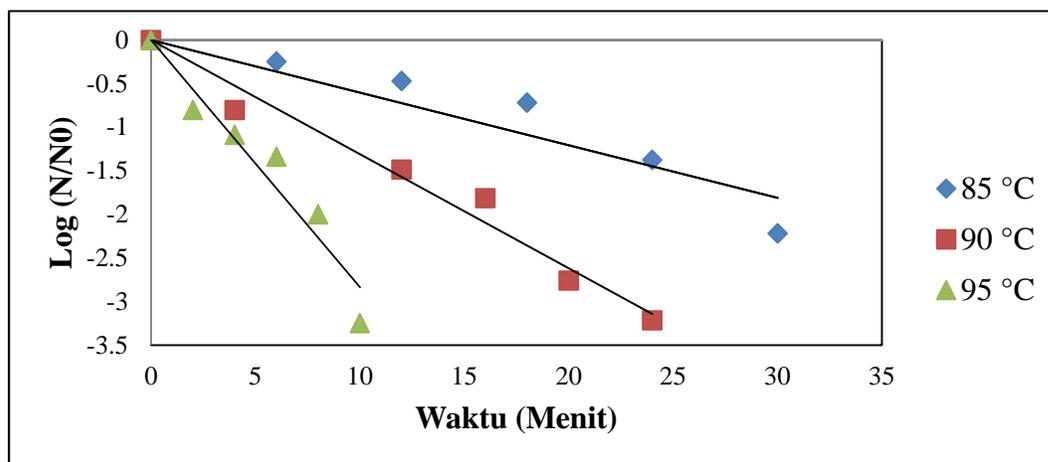
spora bakteri *B. licheniformis* dapat dilihat pada

diberikan dengan menggunakan Microsoft Excel 2010.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Pengaruh Temperatur terhadap Reduksi Logaritmik Spora *Bacillus Licheniformis*

Pada penelitian ini dilakukan proses termal berupa pemanasan di dalam unit *waterbath* bertujuan untuk melihat kemampuan atau ketahanan spora terhadap perlakuan panas sekaligus untuk mereduksi jumlah populasi spora *B. licheniformis* di dalam jus nanas. Variasi temperatur yang digunakan adalah 85°C , 90°C dan 95°C . Penentuan waktu pemanasan dilakukan karena analisis penghitungan jumlah konsentrasi spora di setiap titik (pada setiap interval waktu) secara manual dengan metode *spread plate*. Adapun hasil reduksi logaritmik spora terhadap variasi temperatur dapat dilihat pada Gambar 3.1



Gambar 3.1 Reduksi logaritmik spora *B. licheniformis* sebesar 1 log terhadap variasi temperatur, rata-rata dari duplo eksperimen pada SS:12 $^\circ$ Brix.

Berdasarkan Gambar 3.1 dapat dilihat bahwa pengurangan log spora *B. Licheniformis* semakin cepat dengan meningkatnya temperatur. Misalnya, pada SS 12 $^\circ$ Brix terjadi pengurangan 1 log

dalam waktu 16,56 menit untuk temperatur 85°C , waktu 7,63 menit untuk temperatur 90°C dan waktu 3,52 menit untuk temperatur 95°C . Hasil penelitian yang diperoleh sesuai dengan penelitian

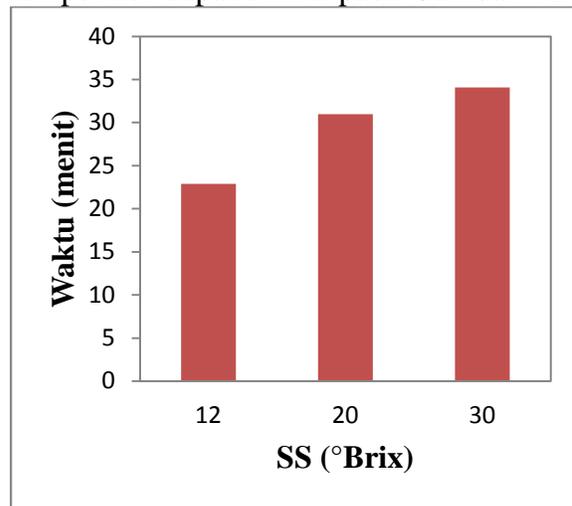
terdahulu dimana waktu yang dibutuhkan untuk mereduksi 1 log spora adalah 18 menit pada suhu 85 °C, 9,4 menit pada suhu 90 °C, dan 5,1 menit pada suhu 95 °C (Montville dan Sapers,1981).

Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat dilihat bahwa peningkatan temperatur pemanasan sangat mempengaruhi laju pengurangan endospora *B. Licheniformis* di dalam jus nanas. Besarnya jarak setiap interval waktu mengindikasikan bahwa temperatur pemanasan sangat berperan aktif dalam proses inaktivasi endospora, dimana pemberian panas dapat mempengaruhi komponen-komponen penting inti sel/spora yaitu air dan piridin-2,6-dikarbonat (asam dipicolinic, DPA). Spesies *Bacillus* diketahui mengandung 27-55% kadar air pada inti, dimana semakin rendah kadar air inti semakin tinggi pula ketahanan spora terhadap panas. DPA menyusun dari 5-15% dari berat kering spora dari spesies *Bacillus* (dan *Clostridium*) yang bertanggung jawab dalam resistensi spora terhadap panas (Gerhard dan Marquis, 1989). Pemanasan menyebabkan pelepasan DPA dari inti sel sehingga akhirnya menyebabkan kematian spora bakteri. Kehilangan/pelepasan senyawa DPA berlangsung lambat selama perlakuan panas, dengan perubahan mendadak dalam struktur protein spora (denaturasi protein) sehingga dinding sel kehilangan nutrisi. Semakin tinggi panas yang diberikan maka akan semakin cepat proses inaktivasi spora *B. licheniformis* di dalam jus nanas. Pada industri pengolahan jus buah teknik pasteurisasi yang umum dilakukan pada suhu 90 °C selama 1,5 menit untuk jus nanas Zheng dan Lu (2011). Ini menandakan bahwa teknologi yang biasa digunakan pada industri belum cukup untuk menginaktivasi spora mikroorganisme dimana dari hasil penelitian untuk mereduksi 1 log spora pada suhu 90 °C dibutuhkan waktu sebesar 7,63 menit. Maka sebaiknya proses pasteurisasi jus nenas pada

suhu 90 °C dilakukan dengan waktu diatas 7,63 menit.

3.2 Pengaruh *Soluble Solid* (SS) atau Tingkat Kemanisan terhadap Reduksi Logaritmik Spora *Bacillus licheniformis*.

Penelitian ini menggunakan variasi *Soluble Solid* (SS) yaitu 12 °Brix, 20 °Brix dan 30 °Brix pada temperatur 90 °C. Dimana SS merupakan total kandungan gula terlarut dari suatu larutan yang dalam hal ini adalah total kandungan gula sukrosa di dalam jus nanas. Proses ini bertujuan untuk menyelidiki pengaruh inaktivasi spora terhadap pemberian variasi SS di dalam jus nanas. Adapun hasil reduksi logaritmik endospora terhadap variasi SS pada setiap temperatur dapat dilihat pada Gambar 4.2



Gambar 3.2 Reduksi logaritmik spora *B. licheniformis* sebesar 3 log terhadap variasi SS 12 °Brix, 20 °Brix dan 30°Brix pada 90 °C.

Menurut Evelyn dan Silva (2016), tingkatan level kontaminasi jus buah oleh mikroba sekitar 10^2 - 10^3 cfu/mL, sehingga sebaiknya minimal 3 log spora harus direduksi atau diinaktivasi. Adapun hasil reduksi logaritmik endospora terhadap variasi SS pada temperatur 90°C dapat dilihat pada Gambar 3.2

Berdasarkan Gambar 3.2 dapat dilihat waktu pengurangan sebesar 3 log endospora pada temperatur 90 °C ;SS 12 °Brix terjadi selama 22,9 menit, selama

30,96 menit untuk SS 20 °Brix dan selama 34,09 menit untuk SS 30 °Brix. Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa semakin tinggi SS maka semakin *heat resistance* spora *B. licheniformis* di dalam jus nanas. Artinya pada temperatur yang sama semakin tingginya SS maka semakin lama waktu yang dibutuhkan untuk mengurangi populasi spora. Penelitian tentang inaktivasi spora *B. licheniformis* dengan variasi SS belum pernah dilakukan sampai saat ini. Namun beberapa penelitian terdahulu dengan spora jenis lainnya telah menunjukkan bahwa resistensi spora semakin meningkat dengan pengaruh kenaikan SS. Silva, dkk (1999) telah melakukan penelitian pada *A. acidoterrestris* dengan temperatur 85-90 °C, dimana dengan kenaikan SS (5 menjadi 60 °Brix) maka ketahanan panas *A. acidoterrestris* meningkat.

3.3 Kinetika First Order (Nilai D dan z) Spora *Bacillus licheniformis*

Proses panas secara komersial umumnya didesain untuk menginaktivkan mikroorganisme (baik sel vegetatif atau spora) yang ada pada bahan pangan dengan cara mengurangi jumlah populasi mikroorganisme pembusuk ke tingkat yang rendah, sehingga peluang terjadinya kebusukan sangat rendah. Analisis ketahanan panas dinyatakan dengan kinetika *first order* (orde satu) yaitu nilai *D* dan *z*. Kinetika orde satu yang dipelajari pada setiap titik waktu pemanasan endospora sehingga menghasilkan persamaan linear ($R^2 = 0,93-0,98$) yang digunakan untuk menentukan nilai *D* dan *z*. Nilai *D* merupakan waktu pada suhu tertentu yang diperlukan untuk menurunkan jumlah spora atau sel vegetatif tertentu sebesar satu logaritmik dalam siklus logaritma pengurangan mikroorganisme. Sedangkan nilai *z* adalah besarnya perubahan suhu yang diperlukan untuk merubah nilai *D* dalam satu siklus logaritma, nilai *z* juga ditentukan

untuk mengetahui seberapa besar ketergantungan temperatur pemanasan terhadap inaktivasi spora *B. licheniformis* dalam jus nanas.

Nilai D_{85} spora *B. licheniformis* yang diperoleh sebesar 16,56 menit untuk SS 12 °Brix, D_{85} sebesar 19,57 menit untuk SS 20 °Brix dan D_{85} sebesar 19,57 menit untuk SS 30 °Brix. Kemudian nilai *D* berbanding terbalik dengan temperatur. Nilai *z* pada penelitian ini adalah 14,88 °C. Nilai *z* tersebut masih berada dalam rentang nilai *z* untuk jus buah pada umumnya, dimana nilai *z* untuk jus buah pada umumnya berada pada rentang 7,2-241 °C (Agcam dkk, 2018). Selanjutnya, data-data yang didapatkan dapat digunakan sebagai referensi untuk menghitung kecukupan termal pasteurisasi jus nanas skala industri.

4. Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah pengurangan log spora *B.licheniformis* semakin cepat dengan meningkatnya temperatur. Pengurangan log spora berbanding terbalik dengan meningkatnya SS. Ketahanan panas askospora/nilai *D* berbanding lurus dengan *Soluble Solid* (SS) dan berbanding terbalik dengan temperature. Dan nilai *Z* yang didapatkan untuk waktu (penurunan nilai *D* untuk spora *B. licheniformis* dalam rentang nilai *z* untuk jus buah pada umumnya) umumnya tidak rentan terhadap perubahan temperatur.

Daftar Pustaka

- Agcam, E., Akyildiz, A & Dundar, B. 2018. *Thermal Pasteurization And Microbial Inactivation of Fruit Juices*. Cukurova university. Turkey.
- Badan Pusat Statistik (BPS). 2015. *Produksi tanaman buah-buahan*. Badan Pusat Statistika, Jakarta.
- Evelyn & Silva, F. V. M. 2015. Inactivation of *Byssochlamys nivea* ascospores in strawberry puree by high pressure, power ultrasound and thermal

- processing. *International Journal of Food Microbiology*.
- Evelyn & Silva, F. V. M. 2016. High Pressure Processing Pretreatment Enhanced the Thermosonication Inactivation of Alicyclobacillus Acidoterrestris spores in Orange Juice. *Food Control*.
- Ghani, M., Ansari, A., Aman, A., Zohra, R. R., Siddiqui, N. N., & Qader, S. A. U. 2013. Isolation and characterization of different strains of *Bacillus licheniformis* for the production of commercially significant enzymes. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*.
- Hariyadi, P. 2010. *Susu: Berbagai Sumber Nutrisi Pertumbuhan Anak*. Yayasan Penerbitan Ikatan, Jakarta.
- Jephcott, A. E., Barton, B. W., Gilbert, R. J., & Shearer, C. W. 1977. An unusual outbreak of food-poisoning associated with meals-on-wheels. *The Lancet*, 310(8029).
- Llarch, À., Logan, N. A., Castellví, J., Prieto, M. J., & Guinea, J. 1997. Isolation and characterization of thermophilic *Bacillus* spp. from geothermal environments on Deception Island, South Shetland Archipelago. *Microbial Ecology*.
- Lücking, G., Stoeckel, M., Atamer, Z., Hinrichs, J., & Ehling-Schulz, M. 2013. Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *International Journal of Food Microbiology*.
- Montville, T.J., Sapers, G.M., 1981. Thermal resistance of spores from pH elevating strains of *Bacillus licheniformis*. *Journal of Food Science*.
- Rodriguez, J. H., Cousin, M. A & Nelson, P. E. 1993. Thermal Resistance and Growth of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* in Tomato Juice. *Journal of Food Protection*.
- Salkinoja-Salonen, M. S., Vuorio, R., Andersson, M. A., Kämpfer, P., Andersson, M. C., Honkanen-Buzalski, T., & Scoging, A. C. 1999. Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Silva, F. M, Gibbs, P., Vieira, M. C & Silva, L. M. 1999. Thermal Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* Spore Under Different Temperature, Soluble Solid and pH Condition for The Design of Fruit Processes, *International Journal of Food Microbiology*.
- Voigt, B., Schroeter, R., Schweder, T., Jürgen, B., Albrecht, D., Dijl, J. M. v., Maurer, K. H., & Hecker, M. 2014. A proteomic view of cell physiology of the industrial workhorse *Bacillus licheniformis*. *Journal of Biotechnology*.
- Zheng H, Lu H. 2011. Use of kinetic, Weibull and PLSR models to predict the retention of ascorbic acid, total phenols and antioxidant activity during storage of pasteurized pineapple juice. *LWT - Food Sci Technol*.