Primjena visokonaponskog električnog pražnjenja pri inaktivaciji kvasca Rhodotorula spp.74

Mišković, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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:159:379020

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno – biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Petra Mišković
6470/PT

PRIMJENA VISOKONAPONSKOG ELEKTRIČNOG PRAŽNJENJA PRI INAKTIVACIJI KVASCA *Rhodotorula* spp.74

ZAVRŠNI RAD

Modul: Prehrambeno-procesno inženjerstvo 1
Mentor: prof. dr.sc. Zoran Herceg

Zagreb, 2016.

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za procesno-prehrambeno inženjerstvo

PRIMJENA VISOKONAPONSKOG ELEKTRIČNOG PRAŽNJENJA PRI INAKTIVACIJI KVASCA *Rhodotorula* spp.74

Petra Mišković, 6470/PT

Sažetak: U ovom radu ispitivan je utjecaj visokonaponskog električnog pražnjenja pri inaktivaciji kvasca *Rhodotorula* u soku od jabuke. Praćena je promjena pH, temperature, električne vodljivosti i boje soka, te su određivani metali i broj stanica kvasca prije i nakon tretiranja hladnom plazmom. Tretmani su se provodili u trajanju od 5 i 10 minuta pri frekvenciji od 120 Hz. Primjenjivale su se dvije vrste hladne plazme, tekućinska i plinska, s upuhivanjem zraka i s upuhivanjem argona. Ispitivanjem utjecaja hladne plazme pri inaktivaciji kvasca *Rhodotorula* utvrđeno je da nema znatnog utjecaja na fizikalno-kemijska svojstva (pH, temperatura, električna vodljivost). Tretiranje hladnom plazmom ne utječe znatno na promjenu boje soka od jabuke. U soku tretiranom hladnom plazmom nema opasnosti od prisustva metala. Na temelju rezultata može se zaključiti da se primjenjenom metodom može ostvariti inaktivacija kvasca *Rhodotorula*, te se najveća inaktivacija postiže primjenom hladne tekućinske plazme s upuhivanjem argona.

Ključne riječi: hladna plazma, pH-vrijednost, električna vodljivost, temperatura, boja, metali, kvasac, argon

Rad sadrži: 23 stranice, 7 slika, 4 tablice, 30 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Dr.sc. Zoran Herceg , red.prof

Pomoć pri izradi: Tomislava Vukušić, mag. ing.

Višnja Stulić, mag. ing.

Rad predan: rujan, 2016.

Final work

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Undergraduate studies Food Technology

Department of Food Engineering

Laboratory for Food-Process Engineering

APPLICATION OF HIGH VOLTAGE ELECTRICAL DISCHARGE PLASMAS FOR INACTIVATION OF YEAST *Rhodotorula* spp.74

Petra Mišković, 6470/PT

Abstract: The aim of this thesis was to examine the effect of high voltage electrical discharge for inactivation of the yeast *Rhodotorula* in apple juice. Parameters that were monitored before and after the treatment are pH, temperature, electrical conductivity and the color of apple juice, as well as metals and the number of living yeast cells. The treatments lasted for 5 and 10 minutes at the frequency of 120 Hz. Two different methods were applied, using gas and liquid cold plasma, with argon or air blowed into. The study of the effect of cold plasma in the inactivation of yeast *Rhodotorula* showed that it doesn't have a major influence on physical-chemical features (pH, temperature, electrical conductivity). The treatment doesn't have a major influence on changing the color of apple juice. There is no danger of presence of metals in apple juice after the treatment. Considering the results it can be concluded that the *Rhodotorula* inactivation can be achieved, and the best results were given when cold liquid plasma with argon was applied.

Keywords: cold plasma, pH, temperature, electrical conductivity, temperature, color, metals, yeast, argon

Thesis contains: 23 pages, 7 figures, 4 tables, 30 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, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Ph.D. Zoran Herceg , Full professor

Technical support and assistance: Tomislava Vukušić, *MSc*

Višnja Stulić, mag. *MSc*

Thesis delivered: September, 2016

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2.TEORIJSKI DIO 2
2.1. JABUKA I SOK OD JABUKE 2
2.2. VISKONAPONSKO ELEKTRIČNO PRAŽNJENJE – HLADNA PLAZMA 3
2.3. KVASCI 4
2.4. *Rhodotorula* 4
3. MATERIJALI I METODE 5
3.1. MATERIJALI 5
3.1.1. HRANJIVE PODLOGE 5
3.1.2. PRIBOR I APARATURA 5
3.1.3 UZORCI 6
3.2. METODE RADA 6
3.2.1. PRIPREMA PODLOGA 6
3.2.2. PRIPREMA SOKA 6
3.2.3. PRIPREMA UZORKA KVASCA *Rhodotorula* 7
3.2.4. PLAN PROVOĐENJA EKSPERIMENTA 7
3.2.5. PROVEDBA EKSPERIMENTA 8
3.2.6. ODREĐIVANJE pH-VRIJEDNOSTI, ELEKTRIČNE PROVODLJIVOSTI I TEMPERATURE 9
3.2.7. ODREĐIVANJE BOJE 9
3.2.8. ODREĐIVANJE PRISUTNOSTI METALA 10
3.2.9. NEIZRAVNO ODREĐIVANJE BROJA ŽIVIH STANICA KVASCA *Rhodotorula* 10
4. REZULTATI 12
4.1. pH-VRIJEDNOST, ELEKTRIČNA PROVODLJIVOST I TEMPERATURA 12
4.2. BOJA 12
4.3. METALI 15
4.4. BROJ STANICA KVASCA 16
5. RASPRAVA 17
5.1. UTJECAJ HLADNE PLAZME NA pH, ELEKTRIČNU PROVODLJIVOST I TEMPRATURU SOKA OD JABUKE OD KONCENTRIRANOG SOKA OD JABUKE 17

5.2. UTJECAJ HLADNE PLAZME NA BOJU SOKA OD JABUKE OD KONCENTRIRANOG SOKA OD JABUKE 17
5.3. UTJECAJ HLADNE PLAZME NA PRISUTNOST METALA U UZORCIMA SOKA OD JABUKE OD KONCENTRIRANOG SOKA OD JABUKE 18
5.4. UTJECAJ HLADNE PLAZME NA BROJ STANICA KVASCA U UZORCIMA SOKA OD JABUKE OD KONCENTRIRANOG SOKA OD JABUKE 19
6. ZAKLJUČAK 20
LITERATURA 21

1. UVOD

Prehrambena industrija svakim danom postaje sve razvijenija te se konstantno radi na usavršivanju dosadašnjih procesa, a sve u cilju poboljšavanja kvalitete prehrambenih proizvoda. Sterilizacija je jedan od važnijih procesa koji se provode u prehrambenoj industriji, pa se u zadnje vrijeme puno radi na optimizaciji tehnika sterilizacije, te mogućem uvođenju novih procesa s istim učinkom. Upravo je korištenje visokonaponskog električnog pražnjenja, odnosno hladne plazme, jedna od novina u prehrambenoj industriji, kojom se pri nižim temperaturama postižu učinci sterilizacije.

Plazma se uz krutine, tekućine i plinove smatra četvrtim agregatnim stanjem. Opisuje se kao djelomično ili potpuno ionizirani plin s karakterističnim električnim, kemijskim i fizikalnim svojstvima. Plazma se u laboratoriju najčešće dobiva visokonaponskim električnim pražnjenjem.

Hladna plazma smatra se modernom nekonvencionalnom metodom koja se pokazala djelotvorna kod inaktivacije mikroorganizama a pri čemu se održava kvaliteta svježeg proizvoda. U medicini hladna plazma ima već široku primjenu za sterilizaciju raznih instrumenata i termolabilnih materijala, dok se u prehrambenu industriji polako uvodi a koristi se za inaktivaciju mikroorganizama u voću, voćnim proizvodima, mesnim proizvodima, siru itd.

U ovom radu tretiran je kvasac *Rhodotorula* u 100%-tnom soku jabuke te je određivana sposobnost inaktivacija kvasca i promjene fizikalno-kemijskih karakteristika soka jabuke nakon tretmana hladnom plazmom. Cilj je bio odrediti utjecaj hladne plazme na kvasac *Rhodotorula,* odnosno u kojoj se količini on inaktivira i zaključiti je li hladna plazma djelotvoran postupak inaktivacije kvasca *Rhodotorula* u soku jabuke.

2.TEORIJSKI DIO

2.1. JABUKA I SOK OD JABUKE

Jabuka je biljna vrsta roda *Malus* iz porodice ruža (*Rosaceae*) carstva *Plantae*. Jabuka kakva se danas uzgaja potječe iz Središnje Azije, točnije Kazahstana, odakle je preko Perzije prenesena u Europu. Jabuke imaju vjerski i mitološki značaj u brojnim kulturama, uključujući nordijske, grčke i europske kršćanske tradicije. Listopadno je drvo koje dostiže visinu od 1.8-4.6 m u uzgoju, a do 12 m u divljini. Ovalni tamnozeleni listovi s nazubljenim rubovima i dlakavom donjom površinom naizmjenično su raspoređeni po granama. Poznato je više od 7500 sorti jabuka (Mratić, 2013). Plod jabuke ima puno hranjivih sastojaka čiji udio zavisi o vrsti i uzgoju biljke. Najzastupljeniji sastojci jabuke su voda i ugljikohidrati, čine više od 90% ukupnih sastojaka. Također, jabuka ime nešto masti, proteina i celuloze. Osim ovih osnovnih sastojaka sadrži šećere, netopiva vlakna, organske kiseline, tvari arome, pigmente, vitamine i minerale.

Po količini proizvodnje jabuka je najzastupljenija kontinentalna vrsta. Budući da danas postoje mnoga dobra moderna tehnička rješenja za skladištenje jabuke, omogućena je potrošnja svježih plodova i proizvoda od jabuke tijekom cijele godine.
U prehrambenoj industriji jabuke se koriste za proizvodnju soka, kompota, marmelada, pekmeza, octa i dr. (Hodak, 2010). Sok jabuke jedan je od popularnijih voćnih sokova i ima veliku zastupljenost na svjetskom tržištu. Velika količina uzgojenih jabuka svake je godine iskorištena za proizvodnju jabučnog soka. Visoka komercijalna vrijednost soka pripisuje se njegovim dobrim senzorskim svojstvima kao što su boja, okus i aroma. Danas postoje različite vrste jabučnog soka, a to su bistri, mutni i kašasti sok. U ovom radu korišten je bistri sok, napravljen od koncentrata soka jabuke. Kod dužeg skladištenja dolazi do gubitka svježine i narušavanja mikrobiološke sigurnosti, te nutritivne kvalitete soka od jabuka. Kako bi se to spriječilo ili umanjilo, koriste se razne metode, a jedna od njih je upravo hladna plazma.

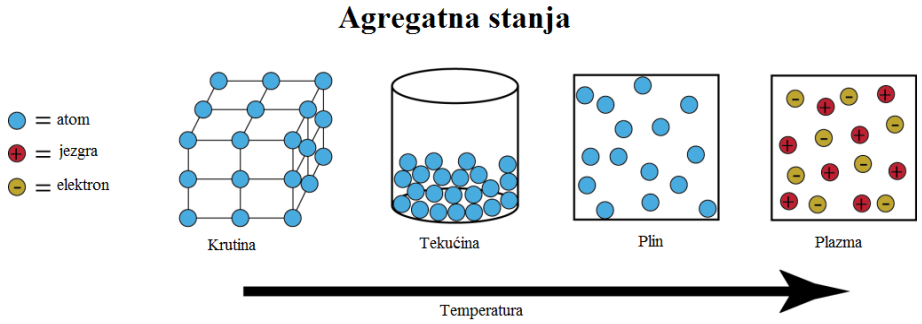
2.2. VISKONAPONSKO ELEKTRIČNO PRAŽNJENJE – HLADNA PLAZMA

Razlikujemo tri agregatna stanja tvari u kojima postoji većina tvari na Zemlji, kruto, tekuće i plinovito. Međutim svemir, koji je beskonačan, sastoji se uglavnom od četvrtog agregatnog stanja – plazme. Dakle, plazma se smatra četvrtnim agregatnim stanjem tvari. Riječ plazma prvi je upotrijebio Irving Langmuir 1928. godine kako bi opisao četvrto agregatno stanje tvari koje je djelomično ili potpuno ionizirano stanje plina (Langmuir, 1928). Do promjene faza iz krutog u tekuće pa do plinovitog dolazi dovođenjem topline. Na isti način dovođenjem topline iznad određene vrijednosti dolazi do ionizacije molekula u plinu pri čemu dolazi do stvaranja plazme (Thirumdas, 2014).

Kada je upotrebljena dovoljna razlika potencijala između dvije elektrode, plin se raspada na pozitivne ione i elektrone (Bogaerts i sur., 2002). Dakle, stvara se električno polje i razlika potencijala što dovodi do ubrzavanja elektrona i privlačenja elektrona na katodu, a pri čemu se elektroni sudaraju s atomima plina. To dovodi do pobuđivanja elektrona i ionizacije plina, odnosno do viskonaponskog električnog pražnjenja - stvaranja plazme koja se očituje vidljivim sjajem.

U prošlosti je hladna plazma korištena samo za sterilizaciju osjetljivih materijala, a danas je njena upotreba proširena na prehrambenu industriju kao inovativna metoda (Thirumdas, 2014). Hladna plazma se smatra korisnom kod inaktivacije mikroorganizama, a pri čemu ostaje očuvana kvaliteta i svježina proizvoda. Ova je metoda korištena također i za inaktivaciju endogenih enzima, naročito polifenol oksidaze i peroksidaze, koji su odgovorni za reakcije posmeđivanja.

Hladna se plazma koristi za inaktivaciju mikroorganizama u proizvodima od mesa, voću i voćnim proizvodima, siru itd. To je ekološki prihvatljiva metoda koja se koristi za konzerviranje u prehrambenoj industriji kao alternativa tradicionalnim metodama.



Slika 1. Plazma - četvrto agregatno stanje (Anonymous, 2016b)

2.3. KVASCI

Kvasci su skupina mikroskopskih gljiva koja broji oko 700 različitih vrsta, a kojima je tijelo u osnovnom obliku jednostanično. Kvasci nisu taksonomska kategorija i obuhvaćaju vrste različitih skupina koje međusobno nisu srodne (Anonymus, 2016c). Mogu se definirati kao askomicetne i bazidiomicetne gljive, koje se mogu razmnožavati vegetativno pupanjem i staničnom diobom, sa ili bez stvaranja hifa ili pseudohifa i one koje imaju seksualni oblik koji se ne nalazi u plodnom tijelu. Neki se kvasci mogu razmnožavati seksualno, što dovodi do izmjene generacija s karakterisitičnim stanicama u kojima se odvija mejoza (Grba, 2010). U tzv. sporogene kvasce ubrajaju se vrste koje spolnim razmnožavanjem stvaraju askuse (redovi *Saccharomycetales* i *Schizosaccharomycetales* iz odjeljka askomiceta) ili bazidije (npr. red *Sporidiales* iz odjeljka bazidiomiceta). Kvasci kod kojih nije poznat spolni oblik razmnožavanja nazivaju se asporogenim kvascima. Najpoznatiji su kvasci askomiceti iz roda *Saccharomyces* (red *Saccharomycetales*), koji su važni kao uzročnici vrenja (fermentacije). Jedna od najznačajnijih vrsta kvasca je tzv. pekarski kvasac *Saccharomyces cerevisiae,* čiji se brojni oblici upotrebljavaju u proizvodnji kruha, piva i vina. U ovom radu korišten je kvasac *Rhodotorula* koji je detaljnije opisan u točki 2.3.1.

2.3.1. *Rhodotorula*

Rod *Rhodotorula* obuhvaća kvasce s crvenim pigmentom koji ne stvaraju askospore. Danas su poznate 62 različite vrste roda *Rhodotorula,* a najviše istraživana vrsta je *Rhodotorula glutinis* (C.A. Batt, 2014). Neke od brojnih različitih osobina koje karakteriziraju kvasce iz roda *Rhodotorula* su: nesposobnost odvijanja fermentacije, formiranje crvenog ili žutog pigmenta i odsutnost ksiloze iz cijelih stanica.

Tri se vrste iz ovog roda smatraju ljudskim patogenima, a to su *R. glutinis*, *R. minuta* i *R. mucilaginosa*. Ovi kvasci mogu rasti na niskim temperaturama od 0,5 do 5 °C i na višim temperaturama do 35 °C. Međutim, postoje brojna istraživanja koja dokazuju prisutnost *Rhodotorule* na temperaturama ispod 0 °C i iznad 62,5 °C. Minimalna a_w vrijednost na kojoj je dokazan rast nekih vrsta je 0,92 a minimalni pH 2,2. Sposobnost kvasca za rast i razvoj u različitim uvjetima čini ga potencijalnim uzročnikom kvarenja hrane. Ubrzani rast pri niskim temperaturama znači da se vrste *Rhodotorule* povezuju s mliječnim proizvodima, svježim i prerađenim proizvodima od mesa, morskim plodovima i raznim smrznutim povrćem.

Preživljavanje pri niskim pH vrijednostima omogućava im rast u koncentratima sokova, citrusnim proizvodima i maslinama, dok im preživljavanje na višim temperaturama omogućava rast na raznim toplinski obrađenim proizvodima. Također, neka su istraživanja pokazala prisutnost *Rhodotorule* u različitim proizvodima kao što su kikiriki, trešnje, sir, mlijeko, kobasice i jabučni sok.

Rhodotorula se razmnožava pupanjem, a njene su stanice sferičnog ili duguljastog oblika. Stanična stijenka *Rhodotorule* znatno je tanja nego što je to slučaj kod nekih drugih kvasaca, te nema jasnih pokazatelja da se ona sastoji od dvije odvojene membrane (Thyagarajan, 1962).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. HRANJIVE PODLOGE

Od hranjivih podloga korištene su Malt Extract Agar i Malt Extract Bujon.

3.1.2. PRIBOR I APARATURA

- Petrijeve zdjelice Φ 90 mm
- mikropipeta 1-100 µL
- mikropipeta 1-10 mL
- nastavci za mikropipetu
- laboratorijska čaša 300 mL i 1000 mL
- menzura 100 mL i 1000 mL
- Eppendorf epruvete od 1,5 mL
- refraktometar
- autoklav
- laminar
- centrifuga

- vorteks
- termostat
- digitalni pH-metar
- digitalni konduktometar

- kolorimetar Konica Minolta CM-700d/600d

3.1.3 UZORCI

- Koncentrat soka jabuke
- Kultura kvasca *Rhodotorula*

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema podloga

Za uzgoj kvasaca korištene su podloge Malt Extract Bujon i Malt Extract Agar. Hranjiva podloga Malt Extract Bujon priprema se suspendiranjem 8 g dehidriranog bujona u 1000 mL destilirane vode, a Malt Extract Agar suspendiranjem 8 g dehidriranog bujona i 10 g dehidriranog agara u 1000 mL destilirane vode. Pripremljene otopine steriliziraju se u autoklavu 15 min pri temperaturi 121°C i tlaku 101 325 Pa. Nakon sterilizacije podloga Malt Extract Agar se još vruća razlije u Petrijeve zdjelice pri sterilnim uvjetima u laminaru. Malt Extract Bujon se ohladi i čuva u frižideru.

3.2.2. Priprema soka

Za pripremu 190 mL 100%-tnog soka jabuke dodaje se 25 mL koncentrata soka jabuke (69°Brix-a) u 165 mL destilirane vode. Suha tvar ovako pripremljenog soka iznosi 12,5° Brix-a, a određuje se pomoću digitalnog refraktometra (Digitalni refraktometar MA871 0-85 Brix). Kap soka stavi se na refraktometar i očita se vrijednost stupnjeva Brix-a.

3.2.3. Priprema uzorka kvasca *Rhodotorula*

Priprema uzorka kvasca započinje nacjepljivanjem 20 µL kvasca u 10 mL bujona, te inkubacijom u termostatu na temperaturi od 30°C. Nakon 5 sati inkubacije kvasac se nalazi u fazi rasta dok nakon 24 sata inkubacije ulazi u stacionarnu fazu. Kultura kvasca se nakon inkubacije izdvaja od bujona, centrifugiranjem u tri faze po 10 minuta, te trostrukim ispiranjem u 10 mL fosfatnog pufera (engl. phosphate-buffered saline). Ovim postupkom pročišćavanja uzorak je pripremljen za tretiranje.

3.2.4. Plan provođenja eksperimenta

Tijekom provedbe eksperimentalnog dijela koristili su se uzorci navedeni pod točkom 3.1.3. Prilikom tretiranja hladnom plazmom definirani su sljedeći parametri: frekvencija (120 Hz) i vrijeme tretiranja (5 i 10 min).

Prilikom provođenja eksperimenta prije i nakon tretiranja uzorka hladnom plazmom mjerili su se parametri: pH, električna provodljivost i temperatura, udio metala i boja.

Tijekom provedbe eksperimentalnog dijela koristio se sok jabuke koji se tretirao različitim vrstama plazme. Uzorci su se označavali metodologijom prikazanoj u Tablici 1.

Tablica 1. Oznake uzoraka

OPIS UZORKA	OZNAKA UZORKA
Netretirani sok	N
Pasterizirani sok	PAS
Sok tretiran plinskom plazmom	P (zrak)
Sok tretiran tekućinskom plazmom uz argon	TM (argon)
Sok tretiran plinskom plazmom uz argon	P (argon)
Sok tretiran tekućinskom plazmom	T (zrak)

3.2.5. Provedba eksperimenta

Pripremljeni uzorak prebacuje se iz laboratorijske čaše u reaktor te započinje eksperimentiranje. Tretiranje hladnom plazmom traje 10 minuta, a odvija se na sljedeći način. Plazma je generirana pomoću pulsnog visokonaponskog generatora. Tijekom provedbe pokusa korištena je frekvencija od 120 Hz, a izlazni napon iznosio je 30 kV. Reaktor je bio volumena 1000 mL s otvorom na dnu za elektrodu uzemljenja promjera 4,5 cm, a začepljen gumenim čepom s otvorom prilagođenim za prolaz iglične visoko naponske elektrode. Kod stvaranja tekućinske plazme igličasta visokonaponska elektroda bila je uronjena u uzorak, a kod plinske plazme postavljena je iznad uzorka. U eksperimentima u kojima je korišten Argon, upuhivao se u reaktor kroz cijev koja je prolazila kroz gumeni čep reaktora a protok je iznosio 4 L/min.

Prije početka tretiranja, nakon 5 minuta i nakon 10 minuta tretiranja uzimaju se uzorci od 1 mL pomoću mikropipete, zbog daljnje mikrobiološke analize.



Slika 2. Tretiranje tekućinskom plazmom



Slika 3. Tretiranje plinskom plazmom

3.2.6. Određivanje pH-vrijednosti, električne provodljivosti i temperature

Vrijednosti svih parametara mjere se pomoću jednog digitalnog uređaja (pH 340i/SET, WTW, Weilheim, Germany) koji ima različite elektrode za mjerenje pH i električna provodljivosti. Mjerenje pH vrijednosti netretiranih uzoraka kao i onih tretiranih 5 i 10 minuta provodi se na način da se kombinirana staklena elektroda uranja u uzorak i nakon što se pH vrijednost stabilizira, očitava se i zapisuje. Električna provodljivost se mjeri na isti način. Temperatura uzorka određuje se pomoću laserske sonde (InfraRed Tehrmometer, PCE-777, PCE Instruments).

3.2.7. Određivanje boje

Bitna osobina svih voćnih sokova pa tako i soka jabuke je boja soka, odnosno njezin intenzitet. Ona ovisi o kvaliteti sirovine, tehnološkoj obradi soka i skladištenju.

Za objektivno mjerenje boje soka koristi se uređaj koji radi na principu mjerenja stupnja reflektirane svjetlosti od mjerne površine, a mjerenje se temelji na parametrima

trodimenzionalnog spectra boja.Referentna metoda mjerenja boje soka (Honikel, 1998) je ona koja koristi L*, a*, b* spektar boja. Parametar L* je mjera svjetlosti soka prikazana vrijednostima od 0 do 100 (0 = crno; 100 = bijelo). Vrijednost parametra a* je mjera crvenila soka prikazana vrijednostima od -60 do 60, a prikazuje spektar od crvene do zelene boje, pri čemu veća vrijednost a* parametra karakterizira crveniju boju. Vrijednost b* parametra prikazuje spektar nijansi između plave i žute boje, a njegova veća vrijednost označava izraženost žutog dijela spektra (Yiu i sur., 2001).

Za određivanje boje 100%-tnog soka jabuke korišten je kolorimetar Konica Minolta CM-700d/600d (Osaka, Japan). Izmjerene su L*, a* i b* vrijednosti (CIE, 1976).

U kivetu se ulije 25 mL netretiranog soka te se stavi na posebno predviđeno mjesto u uređaju. Pokrene se program SpectraMagic NX te izmjere vrijednosti L*, a* i b*, prema kojima se zatim izračunaju ton boje, h i zasićenost boje, C. Isto se učini sa preostalim tretiranim uzorcima. Prilikom mjerenja koristila se bijela podloga kako bi utjecaj okolnih boja bio sveden na minimum. Na ovaj se način mjerila boja netretiranog i tretiranog 100%-tnog soka jabuke Kao referentni uzorak uzet je bio 100%-tni sok jabuke pripremljen postupkom opisanim pod točkom 3.2.2.

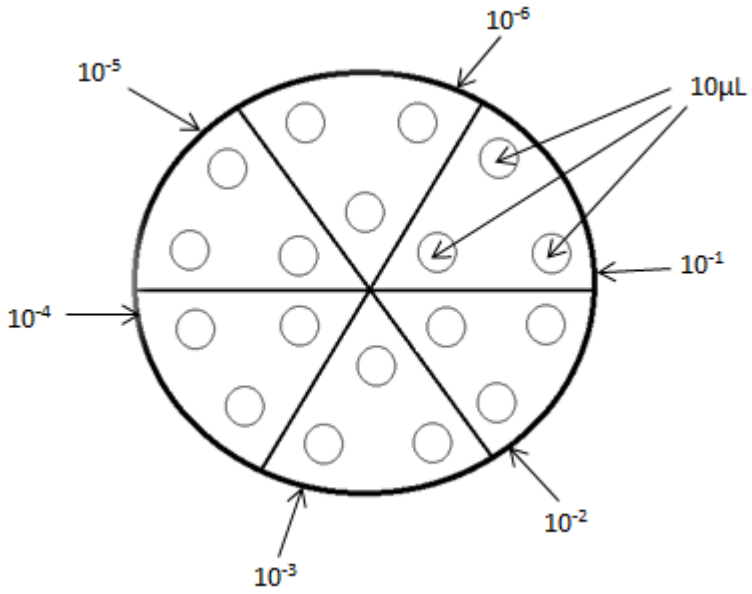
3.2.8. Određivanje prisutnosti metala

Prisutnost metala određivana je metodom atomske apsorpcijske spektrometrije na Nastavnom Zavodu za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije. Za određivanje željeza i cinka korištena je metoda plamene atomske apsorpcijske spektrometrije (HRN ISO 8288:1998), a za određivanje mangana i srebra je korištena metoda grafitne atomske apsorpcijske spektrometrije (HRN ISO 15586:2008).

3.2.9. Neizravno određivanje broja živih stanica kvasca *Rhodotorula*

Broj živih stanica kvasca određuje se radi procjene broja živih stanica u početnom uzorku, u tretiranim uzorcima nakon 5 i 10 minuta i kako bi se odredila vrijednost redukcije broja živih stanica. Metoda određivanja broja živih stanica zasniva se na tome da iz svake žive stanice dobijemo porast pojedinačnih kolonija kvasaca. Korištena metoda je neizravna i

provodi se na način da se određeni volumen uzorka nacjepljuje na čvrstu hranjivu podlogu na kojoj se očekuje porast kolonija. Napravljena je serija decimalnih razrijeđenja uzoraka. Razrijeđenja su se radila u omjeru 1:9, odnosno 10 µL uzorka dodavano je u 90 µL PBS-a i tako sve do zarijeđenja na -6. Na jednu petrijevu zdjelicu nacjepljeno je po 6 razrijeđenja u tri paralele po 10 µL. Zatim su se petrijeve zdjelice inkubirale u termostatu na 30ºC tijekom 24 sata. Cijeli je opisani postupak rađen u laminaru u sterilnim uvjetima kako bi se izbjegla bilo kakva kontaminacija. Nakon inkubiranja slijedilo je brojanje poraslih kolonija na brojaču kolonija.



Slika 4. Petrijeva zdjelica sa 6 uzastopnih razrjeđenja i 3 paralele

4. REZULTATI

U ovom poglavlju prikazani su rezultati analize pH vrijednosti, električne provodljivosti, temperature te broja živih stanica mikroorganizama u netretiranim i tretiranim uzorcima. Također prikazani su i rezultati određivanja intenziteta boje i prisutnosti metala u soku od jabuke. Rezultati su prikazani grafovima i tablično.

4.1. Fizikalne karakteristike (pH-vrijednost, električna provodljivost i temperatura)

Izmjerene vrijednosti pH, električne provodljivosti i temperature soka od jabuke, prije i nakon tretiranja, prikazane su u tablici 2.

Tablica 2. Izmjerene vrijednosti pH, električne provodljivosti i temperature soka od jabuke

	pH_{prije}	pH_{nakon}	σ_{prije} [ms/cm]	σ_{nakon} [ms/cm]	t_{prije} [°C]	t_{nakon} [°C]
TM (zrak)	3,66	3,61	2,43	2,39	18,00	21,55
TM (argon)	3,54	3,55	1,87	1,90	18,10	21,65
P (zrak)	3,61	3,55	1,88	1,83	18,70	22,40
P (argon)	3,63	3,51	1,87	1,83	18,90	22,55

4.2. Boja

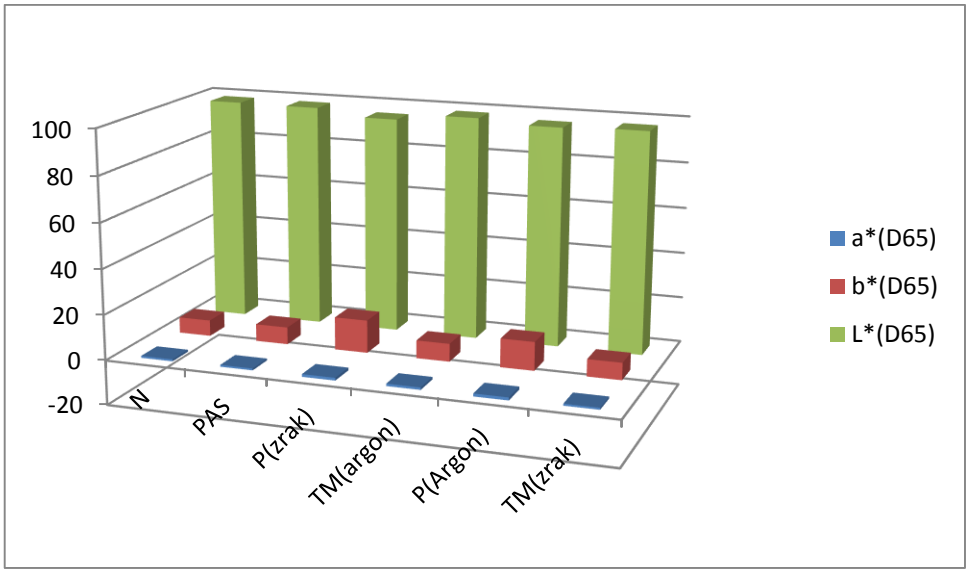
Određivani parametri boje bili su: L*, a*, b*, ΔH i ΔE vrijednost. U tablici 3 prikazani su navedeni parametri. Izmjereni su kolorimetrom, a obrađeni pomoću računalnog programa SpectraMagic NX.

Dobiveni rezultati prikazani su na slikama 5 i 6.

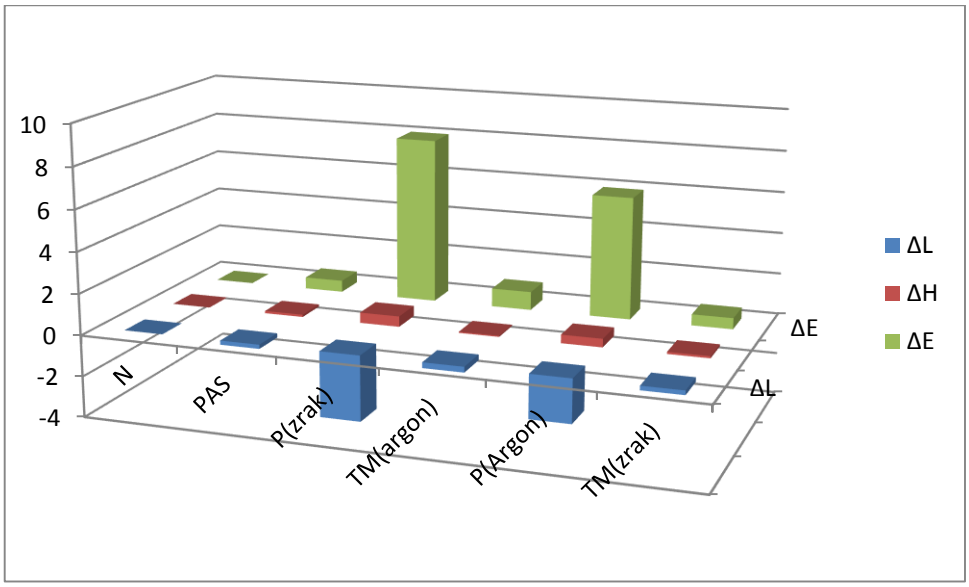
Tablica 3. Parametri boje za netretirani i tretirani sok od koncentriranog soka od jabuke

Parametar	**N**	**PAS**	**P(zrak)**	**TM(argon)**	**P(Argon)**	**TM(zrak)**
L*(D65)	98,61	98,41	95,46	98,34	96,51	97,38
a*(D65)	-0,86	-0,82	-1,19	-1,05	-1,27	-0,85
b*(D65)	7,05	7,58	14,42	7,89	12,59	7,55
a^2	0,74	0,67	1,42	1,10	1,61	0,72
b^2	49,70	57,46	207,94	62,25	158,51	57,00
C	7,11	7,63	14,47	7,96	12,65	7,60
ΔL	-	-0,20	-3,15	-0,27	-2,10	-0,21
Δa	-	0,04	-0,33	-0,19	-0,41	0,01
Δb	-	0,53	7,37	0,83	5,54	0,50
ΔL^2	-	0,04	9,92	0,07	4,41	0,04
Δa^2	-	0,00	0,11	0,04	0,17	0,00
Δb^2	-	0,28	54,32	0,69	30,69	0,25
ΔC	-	0,52	7,36	0,85	5,54	0,49
ΔC^2	-	0,27	54,17	0,72	30,69	0,24
ΔE	-	0,57	8,02	0,89	5,93883	0,54
ΔE^2	-	0,32	64,35	0,80	35,27	0,29
H	96,95	6,19	94,71	97,59	95,75	96,40
ΔH	-	0,11	0,51	0,05	0,41	0,10

Na slici 5 prikazan je grafički odnos parametara boje, a*, b* i L* tretiranog i netretiranog soka od koncentriranog soka od jabuke, a na slici 6 je grafički prikaz parametara ΔL, ΔH i ΔE tretiranog i netretiranog soka od koncentriranog soka od jabuke.



Slika 5. Grafički prikaz parametara a*, b* i L* netretiranog i tretiranog soka od koncentriranog soka od jabuke



Slika 6. Grafički prikaz parametara ΔL, ΔH i ΔE netretiranog i tretiranog soka od koncentriranog soka od jabuke

4.3. Metali

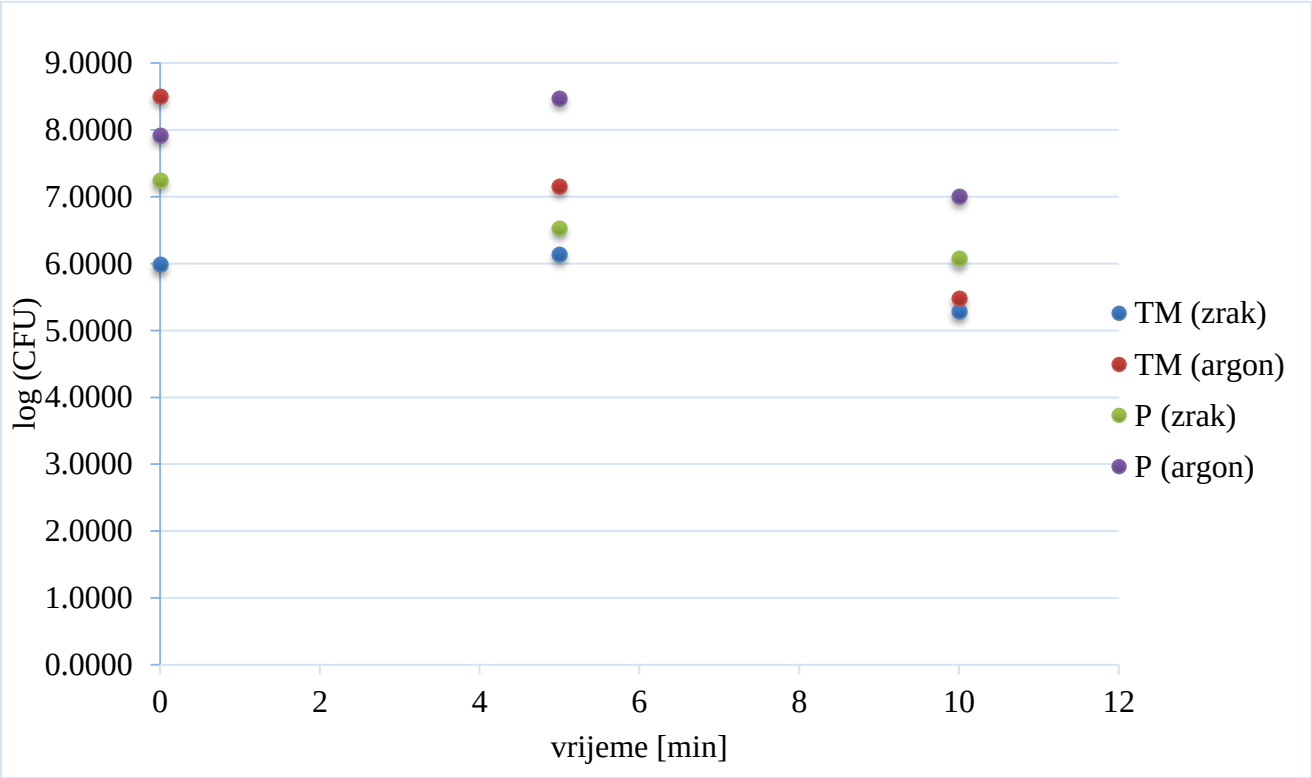
U tablici 4 prikazani su rezultati analize prisutnosti metala za pojedine uzorke tretiranog i netretiranog soka od koncentriranog soka od jabuke dobiveni plamenom i grafitnom tehnikom atomske apsorpcijske spektrometrije.

Tablica 4. Rezultati analize prisutnosti metala u uzorcima tretiranog i netretiranog soka od koncentriranog soka od jabuke dobiveni plamenom i grafitnom tehnikom atomske apsorpcijske spektrometrije

Uzorak	Fe (mg/L)	Zn (mg/L)	Mn (mg/L)
N	1.995	1.612	0.468
PAS	1.099	0.247	0.383
P (argon)	3.358	2.085	0.325
TM (argon)	1.053	1.238	0.343
P (zrak)	2.600	0.761	0.369
TM (zrak)	0.878	0.331	0.333

4.4. Broj stanica kvasca

Broj živih stanica kvasca *Rhodotorula* prije tretiranja, nakon pet minuta tretiranja i po završetku tretiranja prikazani su na slici 7.



Slika 7. Prikaz broja živih stanica kvasca *Rhodotorula* prije, za vrijeme i nakon tretiranja

5. RASPRAVA

5.1. Utjecaj hladne plazme fizikalno- kemijske karakteristike soka jabuke (pH, električna vodljivost, temperatura, boja)

Utjecaj hladne plazme na fizikalna svojstva soka od jabuke ispitan je mjerenjem pH i električne vodljivosti prije i nakon tretiranja. Budući da hladna plazma spada u netermičku obradu, praćena je promjena temperature prije i nakon tretiranja. Iz rezultata prikazanih u Tablici 2 mogu se uočiti neznatne promjene navedenih fizikalnih svojstava soka od jabuke prije i nakon tretiranja hladnom plazmom. Najveća promjena pH dogodila se tijekom tretiranja plinskom plazmom s upuhivanjem argona pri čemu se vrijednost smanjila za 0,12 pH jedinica, a najmanja promjena pH dogodila se tijekom tretiranja tekućinskom plazmom s upuhivanjem argona pri čemu se vrijednost povećala za 0,01 pH jedinicu. Do najveće promjene električne vodljivosti došlo je kod tretiranja plinskom plazmom s upuhivanjem zraka, pri čemu je vrijednost porasla za 0,05 mS/cm. Najmanja promjena električne vodljivosti uočena je kod tretiranja tekućinskom plazmom s upuhivanjem argona i iznosila 0,03 mS/cm pri čemu je došlo do povećanja vrijednosti. Kod praćenja temperature važno je naglasiti da je tretman trajao 10 minuta, te tijekom tretmana nije došlo do većih promjena temperature. Kod svih tretiranih uzoraka došlo je do povećanja temperature, a najveća zabilježena promjena temperature izmjerena je kod tretiranja plinskom plazmom s upuhivanjem zraka pri čemu je došlo do povećanja od 3,7 °C. Najmanji porast temperature od 3,55 °C izmjeren je nakon tretmana tekućinskom plazmom s upuhivanjem zraka i argona.

5.2. Utjecaj hladne plazme na boju soka od jabuke

Utjecaj tretmana hladnom plazmom na boju soka od jabuke od koncentriranog soka od jabuke određivan je mjerenjem boje netretiranog i tretiranog soka te usporedbom dobivenih rezultata. Boja soka određivana je CIELAB metodom koja je ustanovljena od strane Commision Internationale de L' Eclairage. To je najčešće korištena metoda za instrumentalno određivanje boje, a prema kojoj se boja određuje mjerenjem parametara L*, a* i b*. Navedeni parametri objašnjeni su u točki 3.2.7.

Rezultati provedene analize prikazani su u tablici 3 i na slikama 5 i 6. Vidljivo je da tretiranja soka od jabuke hladnom plazmom nema znatnog utjecaja na parametre boje soka. Do veće promjene parametara L* i b* došlo je u slučaju tretiranja plinskom plazmom s upuhivanjem zraka. Značajnija promjena parametra a* nije zabilježena. Kod tretmana plinskom plazmom s upuhivanjem zraka došlo je do smanjenja parametra L*, odnosno povećanja parametra b* što znači da je tretirani sok tamniije boje i ima izraženiji žuti dio spektra u usporedbi s netretiranim sokom.

Sanchez-Moreno i sur. (2005) u svom su istraživanju ispitivali utjecaj visokog tlaka, plazme i pasterizacije na boju soka naranče. Njihovi rezultati pokazali su da pojedini tretmani ne utječu znatno na promjenu parametra L*, odnosno na svjetlinu soka. Rezultati tretmana visokim tlakom i hladnom plazmom pokazuju smanjenje parametra b* i a* što znači smanjeni intenzitet žute i crvene boje soka.

5.3. Utjecaj hladne plazme na prisutnost metala u uzorcima soka od jabuke

Tijekom čitavog tretmana elektroda uzemljenja bila je u direktnom kontaktu s uzorkom soka, a visokonaponska titanska elektroda varirala je ovisno o tretmanu. Prilikom tretiranja tekućinskom plazmom visokonaponska elektroda bila je u direktnom kontaktu sa sokom, a prilikom tretiranja plinskom plazmom nalazila se iznad soka. Kako bi se očuvao naboj u prostoru između elektrode i soka dolazi do raznih elektrokemijskih reakcija pri čemu postoji mogućnost otpuštanja metala u sok uslijed korozije elektrode (Roodenburg i sur., 2005). Iz rezultata ovog rada može se zaključiti da tijekom tretmana od 10 minuta nije došlo do erozije. Pravilnikom o toksinima, metalima, metaloidima te drugim štetnim tvarima koje se mogu nalaziti u hrani (NN 16/2005) regulirana je najviša dopuštena količina željeza i cinka u soku od voća i povrća, koncentriranom soku i voćno sirupu izražena kao mg metala po kg ili L soka. Najviša dopuštena količina željeza je 15 mg/L, a cinka 5 mg/L. Prisutnost metala u ovom je radu određivana atomskom apsorpcijskom spektrometrijom. Za određivanje željeza i cinka korištena je metoda plamene atomske apsorpcijske spektrometrije (HRN ISO 8288:1998), a za određivanje mangana je korištena metoda grafitne atomske apsorpcijske spektrometrije (HRN ISO 15586:2008). Rezultati analize prikazani su u tablici 4. Uspoređivala se količina metala u netretiranim i tretiranim uzorcima. Vidljivo je da se količina željeza povećala u slučaju tretiranja plinskom plazmom, no te su vrijednosti daleko

ispod najviše dopuštene količine. U slučaju tretiranja tekućinskom plazmom količina željeza se smanjila. Koncentracija cinka povećala se u slučaju tretiranja soka plinskom plazmom s upuhivanjem argona, a kod ostalih tretmana se količina smanjila. Koncentracija mangana u netretiranim i tretiranim uzorcima se ne razlikuje značajno, a niža je u tretiranim uzorcima.

5.4. Utjecaj hladne plazme na broj stanica kvasca u uzorcima soka od jabuke

Tretiranjem uzoraka hladnom plazmom, mikroorganizmi su izloženi intenzivnim bombardiranjem od strane slobodnih iona, izazivajući oštećenje njihove površine. Reaktivni ioni uzrokuju oksidacijski efekt na površini stanica mikroorganizama (Thirumdas i sur., 2014). Rezultati inaktivacije grafički su prikazani na slici 10. Iz rezultata je vidljivo da je kod svih uzoraka došlo do redukcije broja stanica kvasca. Tretiranje uzorka tekućinskom plazmom s upuhivanjem zraka postignut je log redukcije nešto manji od 1, a s upuhivanjem argona postignut je log redukcije 3. U slučaju tretiranja uzorka plinskom plazmom s upuhivanjem zraka i s upuhivanjem argona ostvarena je log redukcije 1. Dakle, najveća vrijednost log redukcije postignuta je tretiranjem uzorka tekućinskom plazmom s upuhivanjem argona, a kod svih ostalih uzoraka postignut je log redukcije 1. U istraživanjima u kojima je ispitana inaktivacija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u soku od jabuke primjenom pulsirajućeg električnog polja i visokog tlaka, u slučaju inaktivacije kvasca primjenom visokog tlaka najmanja postignuta vrijednost log redukcije je 3, dok je najveća iznosila čak 6 logova, a što je ovisilo o primijenjenom tlaku (Zook, 1999). Primjenom pulsirajućeg električnog polja također je postignut log redukcije 6 (Qin, 1995). U znanstvenom radu u kojem se istraživala inaktivacija pojedinih bakterija primjenjivala se hladna plazma s upuhivanjem argona, a postignut je log redukcije 6 (Niemira, 2012). Usporedbom svih dobivenih rezultata u ovom radu može se zaključiti da je tekućinska plazma s upuhivanjem argona najpogodonija za tretiranje soka od jabuke od koncentriranog soka od jabuke budući da upravo takav tretman pokazuje najmanji utjecaj na fizikalno – kemijska svojstva i neznatan utjecaj na boju soka. Također, u uzorcima koji su na taj način tretirani zabilježena je niska količina metala i postignuta je najveća vrijednost log redukcije kvasca *Rhodotorule*. Ipak, može se zaključiti da tretman hladnom plazmom nije najbolja metoda za inaktivaciju kvasca roda *Rhdotorula* u soku od jabuke budući da postoje istraživanja koja dokazuju veću uspješnost drugih metoda.

6. ZAKLJUČAK

Tretiranje hladnom plazmom ranije je dokazano kao uspješan postupak konzerviranja hrane. Ovim radom istražen je utjecaj tretiranja hladnom plazmom na fizikalno-kemijska svojstva, boju, prisutnost metala i broj stanica kvasca u soku od jabuke od koncentriranog soka od jabuke. Na temelju dobivenih rezultata i provedene rasprave zaključujemo sljedeće:

- Tretiranje hladnom plazmom nema znatan utjecaj na fizikalno-kemijska svojstva soka od jabuke, odnosno nema znatnih razlika između pH vrijednosti, električne vodljivosti i temperature tretiranog i netretiranog soka.
- Tretiranje hladnom plazmom nema znatan utjecaj na boju soka. U soku tretiranom plinskom plazmom s upuhivanjem zraka zamijećena je neznatna degradacija boje.
- Koncentracije metala (Fe, Zn, Mn) u tretiranom soku su znatno niže od najviših dopuštenih koncentracija, te zaključujemo da ne postoji opasnost od prisutnosti metala u soku tretiranom hladnom plazmom.
- Rezultati inaktivacije kvasaca prikazuju da je najveći utjecaj na redukciju broja stanica kvasca u soku od jabuke imao tretman tekućinskom plazmom s upuhivanjem argona.

LITERATURA

Aguilar-Rosas, S. F., Ballinas-Casarrubias, M. L., Nevarez-Moorillon, G. V., Martin-Belloso, O., & Ortega-Rivas, E. (2007) Thermal and pulsed electric fields pasteurization of apple juice: Effects on physicochemical properties and flavour compounds. *J. Food Eng.* **83(1)**, 41–46. doi:10.1016/j.jfoodeng.2006.12.011

Albertyn, J., Pohl, C. H., & Viljoen, B. C. (2014) *Rhodotorula*. Encyclopedia of Food Microbiology, 3, 291

Anonymus (2016a) Hranjiva vrijednost jabuke, <http://pinova.hr/hr_HR/baza-znanja/vocarstvo/vocne-vrste/jabuka/hranjiva-vrijednost-jabuke>. Pristupljeno 27. travnja 2016.

Anonymus (2016b) States of Matter, <http://mrdclassified.weebly.com/states-of-matter.html>. Pristupljeno 27. travnja 2016.

Bogaerts, A., Neyts, E., Gijbels, R., & Van der Mullen, J. (2002) Gas discharge plasmas and their applications. *Spectrochim. Acta, Part B.* **57(4)**, 609–658. doi:10.1016/S0584-8547(01)00406-2

Butler, M. E. (1971) Journal of Microbiology.

Cletus , K., Fell, J., & Boekhout, T. (2011) The Yeasts: A Taxonomic Study (5th ed., Vol. 1). Elsevier

Doores, S. (1983) The microbiology of apples and apple products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **19(2)**, 133–149. doi:10.1080/10408398309527372

Anonymus (2016c) Kvasci, <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=34894>. Pristupljeno 21. lipnja 2016.

Hodak, D. (2010) Jabuka - rentabilna, ali vrlo osjetljiva voćna vrsta, <http://www.agrochem-maks.com/index.php/en/news/154-jabuka-rentabilna-ali-vrlo-osjetljiva-vona-vrsta>.Pristupljeno 27. travnja 2016.

Komthong, P., Igura, N., & Shimoda, M. (2007) Effect of ascorbic acid on the odours of cloudy apple juice. *Food chem.* ***100*****(4)**, 1342–1349. doi:10.1016/j.foodchem.2005.10.070

Kreger-Van Rij, N. J. W., & Veenhuis, M. (1971) A Comparative Study of the Cell Wall Structure of Basidiomycetous and Related Yeasts. *J. Gen. Microbiol.* **68**, 87–95. doi:10.1099/00221287-68-1-87

Langmuir I. (1928) Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A., Oscillations in ionized gases

Microbiological, C., & Box, P. O. (1975) Heat Resistance Studies. *J. Appl. Bact.* **40**, 135–152.

Mratić, E. (2013) Jabuka, Partenon, Beograd.

Niemira, B. A. (2012). Cold plasma decontamination of foods. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* ***3*****(1)**, 125–142. http://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101132

Qin, B. L., Chang, F. J., Barbosa-Cánovas, G. V., & Swanson, B. G. (1995). Nonthermal inactivation of Saccharomyces cerevisiae in apple juice using pulsed electric fields. *LWT Food Sci. Technol.* **28**, 564–568.

Rawson, A., Patras, A., Tiwari, B. K., Noci, F., Koutchma, T., & Brunton, N. (2011) Effect of thermal and non thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: Review of recent advances. *Food Res. Int.* **44(7)**, 1875–1887. doi:10.1016/j.foodres.2011.02.053

Riu-Aumatell, M., Castellari, M., López-Tamames, E., Galassi, S., & Buxaderas, S. (2004) Characterisation of volatile compounds of fruit juices and nectars by HS/SPME and GC/MS. *Food chem.* **87(4)**, 627–637. doi:10.1016/j.foodchem.2003.12.033

Roodenburg, B., Morren, J., Berg, H. E., & de Haan, S. W. H. (2005). Metal release in a stainless steel pulsed electric field (PEF) system Part II. The treatment of orange juice; related to legislation and treatment chamber lifetime. *Innov. food. sci. emerg.* ***6*****(3)**, 337–345. http://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.04.004

Roodenburg, B., Morren, J., Berg, H. E., & de Haan, S. W. H. (2005). Metal release in a stainless steel Pulsed Electric Field (PEF) system Part I. Effect of different pulse shapes;

theory and experimental method. *Innov. food. sci. emerg.* **6(3)**, 327–336. http://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.04.006

Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., Elez-Martínez, P., De Ancos, B., Martín-Belloso, O., & Cano, M. P. (2005) Impact of high pressure and pulsed electric fields on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice in comparison with traditional thermal processing. *J. Agric. Food. Chem.* **53(11)**, 4403–4409. doi:10.1021/jf048839b

Shi, X. M., Zhang, G. J., Wu, X. L., Li, Y. X., Ma, Y., & Shao, X. J. (2011) Effect of low-temperature plasma on microorganism inactivation and quality of freshly squeezed orange juice. *IEEE Trans. Plasma Sci.* **39(7)**, 1591–1597. doi:10.1109/TPS.2011.2142012

Grba, Slobodan (2010) Kvasci u Biotehnologiji. Zageb: Plejada d.o.o..

Stratton, G. R., Bellona, C. L., Dai, F., Holsen, T. M., & Thagard, S. M. (2015) Plasma-based water treatment: Conception and application of a new general principle for reactor design. *Chem. Eng. J.* **273**, 543–550. doi:10.1016/j.cej.2015.03.059

Thirumdas, R., Sarangapani, C., & Annapure, U. S. (2014) Cold Plasma: A novel Non-Thermal Technology for Food Processing. *Food Biophys.* **10(1)**, 1–11. doi:10.1007/s11483-014-9382-z

Thyagarajan, T. R., Conti, S. F., & Naylor, H. B. (1962) Electron microscopy of *Rhodotorula* glutinis. *J. Bacteriol.* **83**, 381–394.

Tiwari, B. K., Muthukumarappan, K., O'Donnell, C. P., & Cullen, P. J. (2008) Colour degradation and quality parameters of sonicated orange juice using response surface methodology. *LWT Food Sci. Technol.* **41(10)**, 1876–1883. doi:10.1016/j.lwt.2007.11.016.

Zhu, D., Ji, B., Eum, H. L., & Zude, M. (2009) Evaluation of the non-enzymatic browning in thermally processed apple juice by front-face fluorescence spectroscopy. *Food chem.* **113(1)**, 272–279. doi:10.1016/j.foodchem.2008.07.009

Zook, C. D., Parish, M. E., Braddock, R. J., & Balaban, M. O. (1999). (5) High Pressure Inactivation Kinetics of Saccharomyces cerevisiae Ascospores in Orange and Apple Juices. *Journal of Food Science*, ***64*(3)**, 533–535. http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1999.tb15078.x