

# Mikrobiološka kontrola soka šipka tretiranog netoplinskim tehnikama

---

**Samardžić, Ana**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2018**

*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:159:425563>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-10-13**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Ana Samardžić**

7080/BT

**Mikrobiološka kontrola soka šipka tretiranog  
netoplinskim tehnikama**

**ZAVRŠNI RAD**

**Mentor:** Izv. prof. dr. sc. Damir Stanzer

**Zagreb, 2018.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju vrenja i kvasaca

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

### Mikrobiološka kontrola soka šipka tretiranog netoplinskim tehnikama

*Ana Samardžić, 0058206840*

**Sažetak:** Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj tretmana netoplinskim tehnikama, ultrazvukom i hladnom plazmom - pojedinačno i u kombinaciji, na mikrobiološku kvalitetu svježeg iscijeđenog šipkovog soka te soka nakon 7. i 14. dana skladištenja pri + 4 °C. Uzorci su tretirani ultrazvukom i hladnom plazmom različitih amplituda i frekvencija te je zatim provedena mikrobiološka kontrola kako bi se utvrdilo koja od ovih tehnika i primijenjeni režim tretiranja je primjenjiv u inaktivaciji mikroorganizama. Najboljom se pokazala kombinacija ove dvije tehnike u uzorku koji je tretiran ultrazvukom amplitude 75  $\mu\text{m}^{-1}$  u trajanju od 2,5 minute te hladnom plazmom frekvencije 60 Hz u trajanju od 5 minuta.

**Ključne riječi:** hladna plazma, mikrobiološka kontrola, netoplinske tehnike, šipak, ultrazvuk

**Rad sadrži:** 30 stranica, 7 slika, 8 tablica, 21 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** izv.prof.dr.sc Damir Stanzer

**Pomoć pri izradi:** Karla Hanousek Čiča, mag.ing., asistent

**Datum obrane:** 10. rujna 2018.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Bachelor thesis**

**University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Biotechnology**

**Department of Food Engineering  
Laboratory for Fermentation and Yeast Technology**

**Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology**

### **Microbiological control of pomegranate juice treated with non-thermal techniques**

*Ana Samardžić, 0058206840*

**Abstract:** The aim of this study was to determine the effect of the treatment of non-thermal techniques, ultrasound and cold plasma - individually and in combination, on the microbiological quality of freshly squeezed pomegranate juice, as well as after the 7th and 14th day of storage at + 4 ° C. Samples were treated by ultrasound and cold plasma of different amplitudes and frequencies, and microbiological control was then performed to determine which of these techniques was superior to inactivation of microorganisms. The combination of these two techniques which was the best in inactivation was at a sample which was treated by ultrasound amplitude with a value of 75  $\mu\text{m}^{-1}$  for 2.5 minutes and a cold plasma of 60 Hz for 5 minutes.

**Keywords:** cold plasma, microbiological control, non-thermal techniques, pomegranate juice, ultrasound

**Thesis contains:** 30 pages, 7 figures, 8 tables, 21 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** PhD Damir Stanzer, Assistant Professor

**Technical support and assistance:** Karla Hanousek Čiča, mag.ing., Scientific Assistant

**Defence date:** 10<sup>th</sup> September 2018.

## Sadržaj

<b>1. Uvod</b> .....	1
<b>2. Teorijski dio</b> .....	2
2.1. Šipak i proizvodnja šipkovog soka .....	2
2.1.1. Šipak ( <i>Punica granatum</i> ).....	2
2.1.2. Kemijski sastav ploda šipka .....	3
2.1.3. Proizvodnja šipkovog soka.....	4
2.2. Metode prerade u prehrambenoj industriji .....	5
2.2.1. Netoplinske metode prerade.....	5
2.2.1.1. Ultrazvuk kao netoplinska metoda prerade.....	5
2.2.1.2. Hladna plazma kao netoplinska metoda prerade .....	5
2.2.2. Toplinske metode prerade.....	6
2.2.2.1. Pasterizacija kao toplinska metoda prerade .....	6
2.3. Mikroorganizmi koji uzrokuju kvarenje hrane.....	7
<b>3. Eksperimentalni dio</b> .....	9
3.1. Materijali .....	9
3.1.1. Sok od šipka .....	9
3.1.2. Hranjive podloge.....	9
3.1.3. Korišteni uređaji.....	11
3.2. Metode .....	11
3.2.1. Tretiranje soka od šipka ultrazvukom i hladnom plazmom .....	11
3.2.2. Mikrobiološka kontrola .....	14
3.2.2.1. Određivanje broja kvasaca i plijesni.....	14
3.2.2.2. Određivanje broja aerobnih mezofilnih bakterija .....	14
3.2.2.3. Određivanje broja stafilokoka ( <i>Staphylococcus aureus</i> ) .....	14
3.2.2.4. Određivanje broja enterobakterija .....	14
3.2.2.5. Određivanje broja sulfito-reducirajućih klostridija.....	15
3.2.2.6. Određivanje broja <i>Salmonella</i> vrsta .....	15
<b>4. Rezultati i rasprava</b> .....	16
<b>5. Zaključak</b> .....	28
<b>6. Literatura</b> .....	29

## 1. Uvod

Šipak (lat. *Punica granatum*) je jedna od ekonomski značajnijih vrsta iz carstva biljaka. Osim u prehrambenoj industriji gdje se prerađuje u sok ili džem, plod šipka koristi se i u farmaceutske i medicinske svrhe (Da Silva i sur., 2013.). Također, sok od šipka kao jedan od prehrambenih proizvoda, poznat je po svojim antioksidativnim svojstvima, koja su istraživanjima pokazana kao bolja od raznih drugih voćnih sokova (Gil i sur., 2000.).

Budući da je sok od šipka podložan mikrobiološkom kvarenju, koriste se razne tehnike koje pomažu očuvanju njegove trajnosti te sprječavanju kontaminacije. Uobičajene tehnike prerade koje se koriste u očuvanju trajnosti i inaktivaciji mikroorganizama su toplinske tehnike, najčešće pasterizacija. Nedostatak toplinskih tehnika obrade namirnica je primjena visokih temperatura pri kojima dolazi do degradacije termolabilnih spojeva, čime se smanjuje nutritivna vrijednost soka te se mijenja i boja soka. Zato se u novije vrijeme pristupilo istraživanju moguće primjene netoplinskih tehnika kao što su ultrazvuk, plazma, primjena visokog tlaka, pulsirajućeg električnog polja i drugih u obradi prehrambenih sirovina i proizvoda (Herceg i sur., 2009.). Prednost takvih metoda je ušteda energije i tretiranje namirnica pri sobnoj temperaturi čime se smanjuje mogućnost gubitka vrijednih spojeva koji daju soku nutritivnu vrijednost.

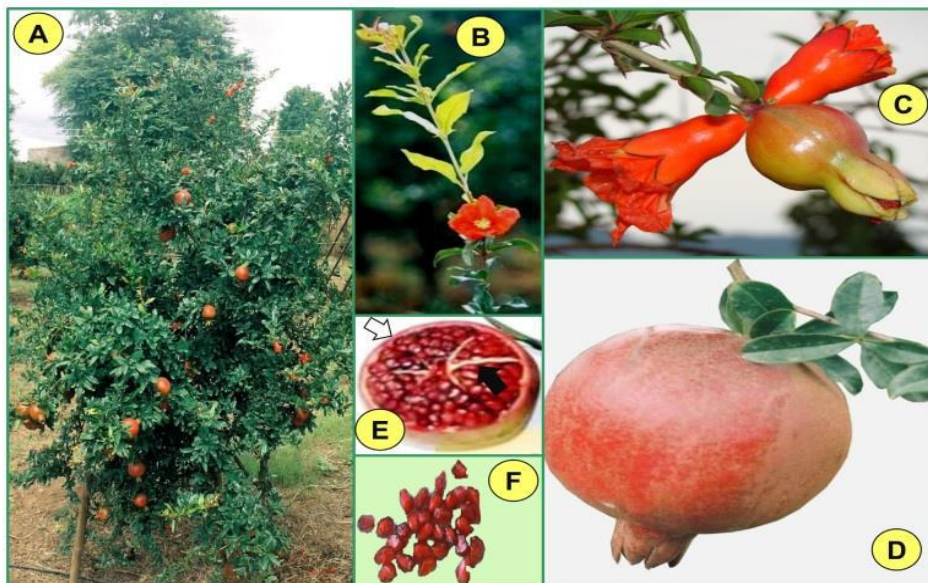
Cilj ovog rada je ispitati utjecaj tretmana netoplinskim tehnikama, ultrazvukom i hladnom plazmom - pojedinačno i u kombinaciji, na mikrobiološku kvalitetu svježeg iscijeđenog šipkovog soka te soka nakon 7. i 14. dana skladištenja pri + 4 °C.

## 2. Teorijski dio

### 2.1. Šipak i proizvodnja šipkovog soka

#### 2.1.1. Šipak (*Punica granatum*)

Šipak, morganj ili nar (lat. *Punica granatum*) je biljka iz reda *Myrtales*, porodice *Lythraceae* te roda *Punica*. U rod *Punica*, osim vrste *Punica granatum* spada i *Punica protopunica*. Naziv ove biljke izveden je iz latinskih riječi *pomum* što znači jabuka te *granatus* što znači sjemenkast. Smatra se da šipak potječe iz centralne Azije, posebice iz nekih dijelova Irana, odakle se kasnije proširio na ostale dijelove svijeta. Danas se uzgaja na čitavom Sredozemlju, Sjevernoj Americi, u subtropskom i tropskom području. Grmolika je biljka, visine 5 do 10 metara, tamnosive kore te trnovite stabljike. Cvjetovi su zvonolikog oblika te crvenkaste boje. Plod šipka je okruglast, promjera 10 do 12 cm, smeđo - žute do crvene boje u punoj zrelosti (Slika 1). Plod ima kožastu koru ispod koje je unutrašnjost podijeljena na nekoliko nepravilno raspoređenih pretinaca, a u svakom je jestivi dio šipka, sitna zrna kojih u prosjeku ima 600 u jednom plodu (Da Silva i sur., 2013).



Slika 1. Šipak (*Punica granatum* L.): (A) grm šipka; (B) cvijet šipka; (C) plod u razvoju; (D) zreli plod šipka; (E) unutrašnjost ploda; (F) arile (Da Silva i sur., 2013)

Šipak je ekonomski vrlo vrijedna biljka i koristi se od samih početaka ljudske vrste. Smatra se da je nar jedna od prvih kultiviranih voćaka zajedno sa maslinom, grožđem, smokvom i datuljom (4000 do 3000 g pr.K.). Tijekom stoljeća predstavljao je simbol zdravlja, plodnosti i ponovnog rođenja, imao je mistična iscjeliteljska svojstva, ali i praktičnu primjenu kao boja ili

ukras. Svoje mjesto našao je i u brojnim mitovima i umjetničkim djelima, od Rafaela do Cézannea, od Homera do Shakespearea. Danas se najčešće koristi u prehrane svrhe, ali i u medicinske te farmaceutske. Što se tiče uporabe u prehrani, osim konzumiranja svježeg ploda šipka, iz šipka se također proizvodi sok te džem. Plod šipka obiluje vitaminima, polifenolima te je poznat po svom antioksidativnom učinku, na čemu se temelji njegova primjena u medicini. Kroz povijest se koristio kao prirodni lijek za razne bolesti kao što su tumor, dijareja, bronhitis, poremećaji krvnog tlaka i slično. Uz to šipak je našao svoje mjesto i u kozmetičkoj industriji, budući da razne frakcije te ekstrakti šipka pomažu pri oporavku kože (Da Silva i sur., 2013).

Šipak je česta tema znanstvenih radova, čiji broj raste iz godine u godinu. Istražuju se utjecaji raznih tehnika u obradi proizvoda dobivenih od ploda šipka s ciljem očuvanja senzorskih i nutritivnih svojstava te produženja njihove trajnosti. Sok od šipka poznat je po svojim antioksidativnim svojstvima kao i antiateraskleroznim učincima (Karasu i sur., 2012.; Shema-Didi i sur., 2012.). Također, istraživanja su pokazala da sok od šipka sadrži veću količinu antioksidansa nego većina drugih voćnih sokova te da konzumiranje šipkovog soka smanjuje rizik od nekih kroničnih bolesti, uključujući bolesti kardiovaskularnog sustava te neke oblike karcinoma (Gil i sur., 2000).

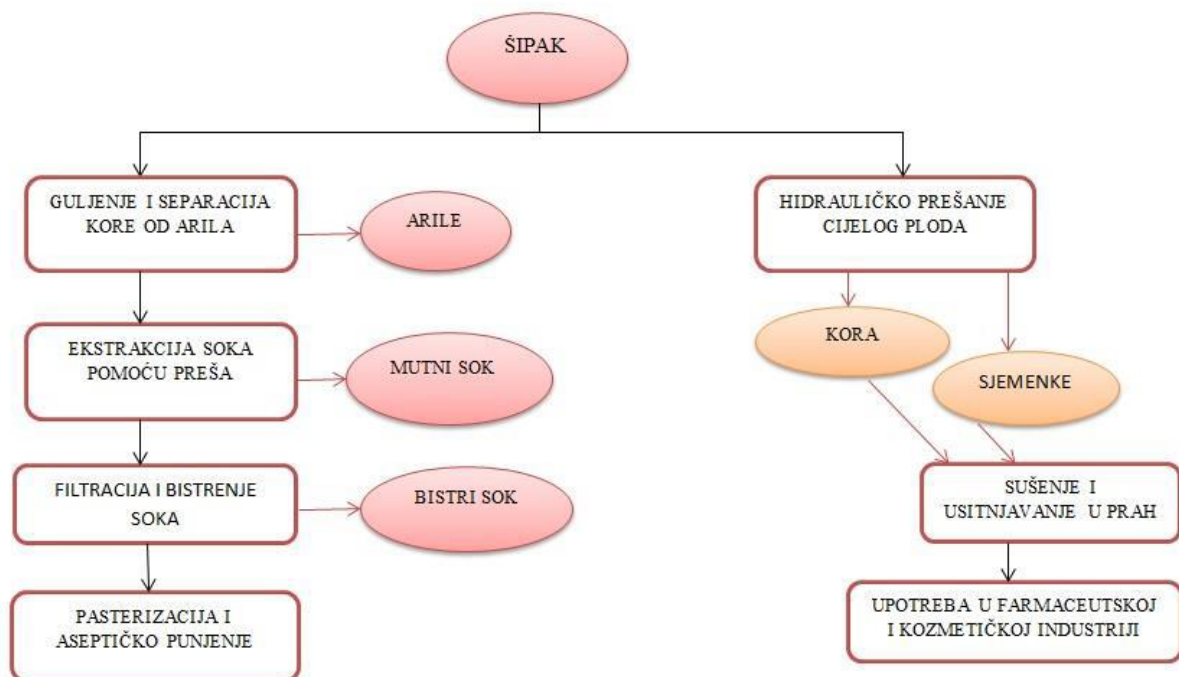
#### 2.1.2. Kemijski sastav ploda šipka

Kemijski sastav šipka ovisi o raznim faktorima kao što su geografski položaj, klima, način uzgoja, sorta šipka te stupnju zrelosti šipka. Jestivi dio šipka, plod, sastoji se od sjemenki i arila. Arile su jestivi dio ploda koji sadrži 80% soka i 20% sjemenki. Sok se sastoji od 85% vode i 10% ukupnih šećera (glukoza, fruktoza, saharoza). Uz to sadrži i 1,5% pektina, organskih kiselina (limunska, jabučna, askorbinska), masnih kiselina (konjugirana linolna, linolenska), aminokiselina (valin, metionin, prolin) te raznih drugih bioaktivnih spojeva (Akpınar-Bayizit, 2012). Sjemenke ploda su izvor rijetke konjugirane masne kiseline, punične kiseline ( $\omega$ -5 dugolančana polinezasićena masna kiselina), koja može biti prisutna u sastavu sjemenke čak do 20%. Punična kiselina ima protuupalna te antitumorska djelovanja jer smanjuje stvaranje upalnih prostagladnina (Grossmann i sur., 2010. ). Udio mineralnih tvari u soku ovisi o sorti šipka, ali i o agro-klimatskim uvjetima, što je dokazano u istraživanju Al-Maiman i Ahmad (2002). Rezultati ovog istraživanja pokazali su kako su u soku, ali i u sjemenkama šipka, najzastupljeniji minerali kalcij, kalij, natrij. Slijede ih magnezij, fosfor i željezo.



### 2.1.3. Proizvodnja šipkovog soka

Prema zakonskoj regulativi Republike Hrvatske voćni sok je proizvod koji se dobiva iz jestivog dijela voća koje je zdravo, svježije ili konzervirano (hlađenjem ili zamrzavanjem), a ima boju, okus i aromu karakterističnu za voće od kojeg potječe (Pravilnik NN, 48/13). Podaci iz 2013. godine pokazuju da je svjetska proizvodnja soka od šipka oko 1,5 milijuna tona godišnje, a u proizvodnji prednjače Indija, Iran, Španjolska i SAD (Da Silva i sur., 2013). Sok od šipka moguće je proizvesti na dva načina (Slika 2). Prvi je da se cijeli plod šipka preša, a drugi da se arile odvoje od kore prije ekstrakcije pomoću posebnih uređaja. Zatim slijedi ekstrakcija kojom se dobiva mutni sok. Ekstrakcija se može provoditi pomoću mehaničkih ili hidrauličkih preša. Sok od šipka često sadrži koloidne tvari kao i proteine te bi takav mogao izazvati zamućenja tijekom skladištenja pa se često filtrira te bistri (Vardin, 2003). Zatim slijedi pasterezacija i punjenje u ambalažu pri aseptičnim uvjetima (Dhinesh i Ramasamy, 2016).



Slika 2. Shematski prikaz proizvodnje šipkovog soka (Dhinesh i Ramasamy, 2016)

## 2.2. Metode prerade u prehrambenoj industriji

Kako znanost napreduje, tako se osim klasičnih toplinskih metoda prerade (sterilizacija, pasterizacija) počinju koristiti i netoplinske tehnike prerade namirnica, koje će održati kakvoću tih namirnica, a omogućiti uštedu energije, kraće trajanje procesa i slično (Herceg i sur., 2009).

### 2.2.1. Netoplinske metode prerade

U netoplinske metode prerade ubrajaju se primjena visokog tlaka, ultrazvuka, pulsirajućeg električnog polja, hladne plazme, elektromagnetskog zračenja i dr. Kao što je već rečeno svrha ovih postupaka je dobiti kvalitetne namirnice, jednake kakvoće i dobre nutritivne vrijednosti, a istovremeno postići kraće trajanje procesa te uštedu energije. Ono što je zajedničko svim tim procesima je to da se materijali, odnosno namirnice tretiraju na sobnoj temperaturi (bez značajnog porasta temperature) i da sam proces tretiranja kratko traje (od 1 do 10 minuta) (Herceg i sur., 2009.).

#### 2.2.1.1. Ultrazvuk kao netoplinska metoda prerade

Ultrazvuk su zvučni valovi čija je frekvencija u intervalu od 16 000 do 18 000 Hz, što je više od granice koju može čuti ljudsko uho (16 do 16 000 Hz). U prehrambenoj industriji koriste se dva tipa ultrazvuka, a to su dijagnostički ultrazvuk i ultrazvuk visoke snage. Dijagnostički ultrazvuk ili ultrazvuk niskog intenziteta ima frekvenciju 1 do 10 MHz te malu snagu (manje od  $1 \text{ W cm}^{-2}$ ). Može se koristiti u analitičke svrhe (određivanje sastava, viskoznosti ili strukture hrane) te za stimulaciju aktivnosti živih stanica, kristalizaciju, emulgaciju, površinsko čišćenje hrane i drugo. Drugi tip ultrazvuka, ultrazvuk visokog intenziteta, ima frekvenciju 20 do 100 kHz i visoku snagu ( $10 \text{ do } 1000 \text{ W cm}^{-2}$ ). Taj tip ultrazvuka uzrokuje fizička oštećenja tkiva te određene kemijske reakcije, što ga čini djelotvornim pri inaktivaciji mikroorganizama. Djelovanje ultrazvuka na mikroorganizme uvelike ovisi o otpornosti mikroorganizama (veći mikroorganizmi osjetljiviji na djelovanje ultrazvuka kao i gram-pozitivne bakterije te aerobne vrste) (Herceg i sur., 2009).

#### 2.2.1.2. Hladna plazma kao netoplinska metoda prerade

Plazma se smatra jednim od četiri agregatnih stanja uz plinovito, tekuće te čvrsto agregatno stanje. Sastoji se od pozitivno i negativno nabijenih čestica te neutralnih čestica. Kad dođe do zagrijavanja krute tvari, dolazi do povećanja njene kinetičke energije te kruta tvar prelazi iz čvrstog u tekuće agregatno stanje. Daljnjim zagrijavanjem, opet se povećava kinetička energija čestica te tvar prelazi iz tekućeg u plinovito stanje. U tom stanju molekule unutar plina disociraju na atome uz primjenu jako visoke energije (npr. električno

pražnjenje) te tako nastane plazma (Chu i Lu, 2014). Plazma se može podijeliti prema više kriterija, a neki od njih su prema termodinamičkoj ravnoteži, stupnju ionizacije, temperaturi i dr. S obzirom na temperaturu, plazma se može podijeliti na vruću i hladnu. Vruća plazma je plazma koja je u stanju termodinamičke ravnoteže, što znači da su sve čestice u plazmi jednake temperature. Kod hladne plazme situacija je drugačija, temperatura elektrona, odnosno negativno nabijenih čestica veća je u odnosu na temperaturu drugih iona i neutralnih čestica. Zbog toga se hladna plazma još može nazvati i neravnotežna plazma. Temperatura elektrona može doseći vrijednost do nekoliko desetaka tisuća kelvina dok temperatura ostalih iona i čestica ostaje pri sobnoj temperaturi što omogućuje zadržavanje plina na sobnoj temperaturi (Ercegović i Čunko, 2009).

### 2.2.2. Toplinske metode prerade

Toplinske metode prerade su najčešće korištene metode prerade namirnica. Pod toplinske metode prerade ubrajaju se metode kao što su sterilizacija, pasterizacija, sušenje, kuhanje, blanširanje i dr. Pomoću ovih metoda moguća je inaktivacija raznih mikroorganizama koji uzrokuju kontaminacije te postizanje dobrih senzorskih svojstava namirnica i proizvoda. Tijekom toplinske obrade događaju se razne promjene koje ovise o temperaturi i vremenu provođenja procesa, samom načinu provođenja procesa te usitnjenosti sirovine koja se želi obraditi. Te promjene mogu biti poželjne (promjene boje, teksture, promjena okusa, promjena pH), ali i nepoželjne (gubitak hranjivih tvari, pojava nepoželjne boje izazvane oksidacijom ili hidrolizom pigmenata, nepoželjna promjena okusa i mirisa) (Herceg i sur., 2009).

#### 2.2.2.1. Pasterizacija kao toplinska metoda prerade

Pasterizacija je zagrijavanje namirnice u pravilu pri temperaturi višoj od 70 °C, ali manjoj od 100 °C. Ta je temperatura dovoljna da se u određenom vremenu nepovratno inaktiviraju enzimi i mikroorganizmi u kiselim namirnicama. Može se primjeniti i za slabo kisele namirnice, ali se tako uništavaju samo patogeni mikroorganizmi. Budući da temperatura pasterizacije (u uobičajenom trajanju procesa) nije dovoljna za uništenje spora, može doći do razmnožavanja mikroorganizama i shodno tome do kontaminacije te kvarenja. Zato se u takvim situacijama, kada se žele uništiti i spore mikroorganizama, ne koristi pasterizacija već se koriste tehnike sterilizacije. U takvim se tehnikama primjenjuju temperature više od 100 °C (Herceg i sur., 2009).

### 2.3. Mikroorganizmi koji uzrokuju kvarenje hrane

Hranu koju svakodnevno konzumiramo, osim ljudi i životinja, koriste i mikroorganizmi kao supstrat za rast. Takav rast koji nije kontroliran dovodi do kvarenja hrane te štete u prehrambenoj industriji. Samo kvarenje namirnica može izazvati trovanje osobe koja takvu kontaminiranu, odnosno pokvarenu hranu konzumira. U velikom broju namirnica nalazi se velik broj bakterija te spora koje ne uzrokuju infekcije, ali ipak neke vrste znaju stvarati brojne teškoće. Postoji velik broj čimbenika koji utječu na kvarenje i kontaminaciju namirnica, a neki od njih su osobine mikrobne populacije i njihova enzimska aktivnost, priroda namirnica, okolišni uvjeti, temperatura skladištenja i dr. Neki od najpoznatijih toksikogenih bakterija u namirnicama su *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* (Duraković i sur., 1991).

Kvasci i plijesni su mikroorganizmi koji spadaju u carstvo gljiva. Plijesni su nakupine hifa (vlaknastih, razgranatih cjevastih stanica) koje tvore micelij, odnosno tijelo plijesni. Plijesni koje najčešće uzrokuju kontaminaciju namirnica, odnosno toksikotvorne plijesni su *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*. Kvasci su jednostanični, nemicelijski organizmi od kojih neki proizvode pseudomicelij u anaerobnim uvjetima. Rodovi kvasaca koje su uglavnom odgovorne za kontaminaciju hrane su *Candida*, *Saccharomyces* te *Rhodotorula* (Duraković i sur., 1991).

Aerobne mezofilne bakterije kao što im i naziv kaže, za rast trebaju kisik te im je rast optimalan u temperaturnom rasponu od 20 do 45 °C, što uključuje i čovjekovu tjelesnu temperaturu. Mezofilni mikroorganizmi mogu uzrokovati razne bolesti te je iz tog razloga potrebno u prehrambenim proizvodima pratiti njihov broj. Kao potencijalni patogen poznata je *Listeria monocytogenes* koja može uzrokovati zaraznu bolest listeriozu (Duraković i sur., 1991).

Stafilokoki (*Staphylococcus sp.*) su okrugle bakterije u grozdastim nakupinama. Bakterije tog roda često mogu biti dio normalne kožne mikroflore čovjeka kao i važni agensi u bolestima ljudi (npr. toksički šok sindromi). *Koki* općenito su kuglaste bakterije, čiji je prosječan promjer 0,4-2,0 µm. Često se pojavljuju u raznim nakupinama u kojima stanice nisu potpuno podjeljene u tijeku razmnožavanja, kao što je slučaj sa stafilokokima. (Duraković i sur., 1991).

Enterobakterije (*Enterobacteriaceae*) su mikroorganizmi koji se nalaze u probavnom sustavu sisavaca. Prije pojave antibiotika bili su istraživani kao uzročnici bolesti urinarnog i probavnog sustava. Najveći broj vrsta raste tvoreći mutne, suhe ili sluzave te sive kolonije. (Duraković i sur., 1991).

Sulfito-reducirajuće klostridije su karakteristične po stvaranju spora u nepovoljnim uvjetima (visoka/niska temperatura, kemijska obrada) te rastu u uvjetima bez kisika. Infekcijska doza ovih bakterija je vrlo niska, a otrovanja mogu imati teže posljedice. Najpoznatiji primjer je *Clostridium botulium* koja uzrokuje botulizam, bolest uzrokovanu nepravilno konzerviranom hranom (Duraković i sur., 1991).

*Samonella* je rod gram-negativnih bakterija koji pripada porodici *Enterobacteriaceae*. *Salmonella sp.* su nesporogene bakterije, kemotrofi koji energiju dobivaju oksidacijsko-redukcijskim reakcijama organskih spojeva te su fakultativni anaerobi. Trovanje bakterijom iz ovog roda razlikuje se od drugih trovanja po tome da se nakon trovanja javljaju infekcije pa je izrazito bitno da u hrani za konzumiranje nema bakterija ovog roda (Duraković i sur., 1996).

### 3. Eksperimentalni dio

U ovom radu ispitivan je utjecaj netoplinskih tehnika, ultrazvuka i hladne plazme na mikrobiološku kvalitetu šipkovog soka te je također radi usporedbe netoplinskih i toplinskih metoda paralelno provedena pasterizacija soka u termostatiranoj kupelji pri 90 °C u vremenu od 1 minute.

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Sok od šipka

Za pripravu šipkovog soka koji je korišten u istraživanju korišten je sokovnik Vervita PRO (Kuvings, Koreja). Sok je pripremljen neposredno prije netoplinskog i toplinskog tretmana, a plodovi šipka koji su se koristili su nabavljeni u trgovačkoj mreži. Vrijednost suhe tvari soka mjerena digitalnim refraktometrom iznosila je 15,50 %, a pH soka 3,44.

##### 3.1.2. Hranjive podloge

Za uzgoj i izolaciju mikroorganizama korištene su sljedeće hranjive podloge koje su pripremljene prema uputama proizvođača :

- Hranjivi agar (Biolife, Italija):

Sastav:	gL <sup>-1</sup>
Goveđi ekstrakt	3,0
Pepton	5,0
Agar	15,0
pH 7,0 ± 0,2	

- Sladni agar (Biolife, Italija)

Sastav:	gL <sup>-1</sup>
Maltoza	12,5
Dekstrin	2,5
Glicerol	1,0
Pepto-kompleks	2,6
Agar	17,0
pH 4,6 ± 0,2	

- Baird-Parker agar

<b>Sastav:</b>	<b>gL<sup>-1</sup></b>
Kazein	10,0
Goveđi ekstrakt	5,0
Kvašček ekstrakt	1,0
Natrijev piruvat	10,0
Glicin	12,0
Litijev klorid	5,0
Agar	15,0
pH 7,2 ± 0,2	

- Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG)

<b>Sastav:</b>	<b>gL<sup>-1</sup></b>
Glukoza	10,0
Hidrolizat želatine	7,0
Natrijev klorid	5,0
Kvašček ekstrakt	3,0
Žučne soli	1,5
Prirodna crvena boja	0,03
Kristal violet	2,0
Agar	15,0
pH 7,4 ± 0,2	

- Sulfitni agar

<b>Sastav:</b>	<b>gL<sup>-1</sup></b>
Kazein pepton	15,5
Kvašček ekstrakt	10,0
Ferijev citrat	0,5
Natrijev sulfat	0,5
Sulfadiazin	0,12
Polimiksin B sulfat	0,01
Agar	13,0
pH 7,0 ± 0,2	

- Rappaport-Vassiliadis bujon (RVS)

<b>Sastav:</b>	<b>gL<sup>-1</sup></b>
Sojin pepton	4,5
Natrijev klorid	7,2
Kalij dihidrogen fosfat	1,26
Di-kalijev hidrogen fosfat	0,18
Magnezijev klorid (bevodni)	13,58
Malahitno zeleno	0,036
pH 5,2	

### 3.1.3. Korišteni uređaji

- Digitalni refraktometar (ATAGO, PAL)
- pH metar (Mettler Toledo Seven easy )
- Ultrazvučni procesor SONICATOR S-4000 (Misonix Sonicators, Newtown, Connecticut, SAD )
- Termočlanak (model: HI 9063, Hanna Instruments Ltd., Leighton Buzzard LU7 4AD, UK)
- Pulsni visokonaponski generator (Spellman, UK )
- Igljučna visokonaponska elektroda ( igla od nehrđajućeg čelika Microlance TM 3,81 cm)
- Rotavapor (Büchi B-490, Švicarska )

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Tretiranje soka od šipka ultrazvukom i hladnom plazmom

Za tretiranje soka ultrazvukom visoke snage korišten je ultrazvučni procesor SONICATOR S-4000, čije su karakteristike sljedeće: 600 W maksimalne izlazne snage, frekvencija 20 Hz, 50-60 Hz frekvencija strujne mreže, 100-240 V strujnog napona. Pripremljeni sok od šipka tretiran je ultrazvukom visoke snage pri amplitudama od 90-120  $\mu\text{m}$  (75% i 100 %) u vremenu od 2 i 2,5 min. Uzorci su tretirani pojedinačno (UZ1-UZ4) i kombinirano (1-16) na način prikazan u Tablici 1. Promjer ultrazvučne sonde koja je korištena iznosi 12,7 mm, a uronjena je u dubinu dva promjera iste od dna čašice (2,5 cm). Na uređaj je spojen termočlanak kojim se mjeri porast temperature te je tijekom cijelog procesa uronjen u staklenu čašu s uzorkom prilikom tretiranja. Temperatura tijekom tretiranja uzoraka nije prelazila 51 °C. Uređaj se nakon svakih 30 minuta rada mora hladiti 10 minuta, a nakon svakih sat vremena potrebno je promijeniti sondu.



Za tretiranje soka hladnom plazmom korištena je tekućinska plazma s mjehurićima. Uzorci su kao i kod ultrazvuka tretirani pojedinačno (P1-P4) i kombinirano (1-16) na način prikazan u Tablici 1. Kako bi se generirala plazma, korišten je pulsni visokonaponski generator. Strujni krug sastoji se od kondenzatora kapaciteta 0,75 nF, otpornika koji su spojeni serijski (ukupno 9,5 M $\Omega$ ), visokonaponskog napajanja, rotirajuće sklopke tzv. „spark-gap“ komore koja je spojena na elektromotor s regulatorom frekvencije te kontrolne jedinice napajanja. Volumen reaktora iznosi 300 mL, a reaktor je zatvoren gumenim čepom s otvorom za elektrodu uzemljenja. Konfiguracija elektrode u reaktoru postavljena je s igličnom visokonaponskom elektrodom i elektrodom uzemljenja od nehrđajućeg čelika (oblik točka-točka). Kroz igličnu elektrodu upuhivan je argon (4 L min<sup>-1</sup>) koji je omogućio miješanje te pražnjenje u mjehurićima.

Tablica 1. Oznake uzoraka šipkovog soka s pripadajućim parametrima tretmana šipkovog soka

Opis uzorka	OZNAKA UZORKA	ULTRAZVUK		PLAZMA	
		Amplituda	t (min)	Frekvencija	t (min)
Svježi sok	<b>SS</b>	/	/	/	/
Pasterizirani sok	<b>PS</b>	/	/	/	/
Kombinirani Tretmani	<b>1</b>	75	2,5	60	2,5
	<b>2</b>	75	2,5	60	5
	<b>3</b>	75	2,5	90	2,5
	<b>4</b>	75	2,5	90	5
	<b>5</b>	75	5	60	2,5
	<b>6</b>	75	5	60	5
	<b>7</b>	75	5	90	2,5
	<b>8</b>	75	5	90	5
	<b>9</b>	100	2,5	60	2,5
	<b>10</b>	100	2,5	60	5
	<b>11</b>	100	2,5	90	2,5
	<b>12</b>	100	2,5	90	5
	<b>13</b>	100	5	60	2,5
	<b>14</b>	100	5	60	5
	<b>15</b>	100	5	90	2,5
	<b>16</b>	100	5	90	5
Ultrazvuk	<b>UZ-1</b>	75	2,5	/	/
	<b>UZ-2</b>	75	5	/	/
	<b>UZ-3</b>	100	2,5	/	/
	<b>UZ-4</b>	100	5	/	/
Plazma	<b>P-1</b>	/	/	60	2,5
	<b>P-2</b>	/	/	60	5
	<b>P-3</b>	/	/	90	2,5
	<b>P-4</b>	/	/	90	5

### 3.2.2. Mikrobiološka kontrola

Prema postojećem/važećem Pravilniku o mikrobiološkim kriterijima za hranu u voćnim sokovima (Pravilnik NN, 74/08) obavezno se provjerava prisutnost i broj kvasaca i plijesni, aerobnih mezofilnih bakterija, stafilokoka, enterobakterija, sulfito-reducirajućih bakterija te *Salmonella* vrsta.

#### 3.2.2.1. Određivanje broja kvasaca i plijesni

Za određivanje broja kvasaca i plijesni korišten je sladni agar (Malt extract agar). Sladni agar osigurava ugljik, proteine i hranjive sastojke koji su potrebni za rast mikroorganizama, u ovom slučaju kvasaca i plijesni. Kiseli medij, odnosno pH podloge  $\sim 5,5$  inhibira rast bakterija. Uzorci soka šipka (10  $\mu\text{L}$ ) prije i nakon tretmana nacijepjeni su u tri paralele. Ploče su ostavljene u inkubatoru pri 37 °C te su nakon dva dana brojane porasle kolonije.

#### 3.2.2.2. Određivanje broja aerobnih mezofilnih bakterija

Za određivanje broja aerobnih mezofilnih bakterija koristi se hranjivi agar (Nutrient agar). Hranjivi agar je medij koji potpomaže rastu velikog broja mikroorganizama. Sadrži pepton koji osigurava organski dušik, goveđi i kvašćev ekstrakt koji osiguravaju vitamine, ugljikohidrate, dušik i potrebne soli te sadrži natrijev klorid koji daje smjesi svojstva slična citoplazmi. Na podloge se nacijepi uzorak soka šipka po tri paralele od 10  $\mu\text{L}$ . Uzorci se ostave u inkubatoru pri 37 °C te se nakon dva dana broje porasle kolonije.

#### 3.2.2.3. Određivanje broja stafilokoka (*Staphylococcus aureus*)

Za određivanje prisutnosti i broja stafilokoka koristi se Baird-Parker agar (BP agar). BP agar koristi se za izolaciju Gram-pozitivnih bakterija. Sadrži litijev klorid i telurit. Ako su prisutni u uzorku, stafilokoki će narasti kao crne kolonije. Crna boja kolonija rezultat je redukcije telurita u mediju. Na BP podlogu nacijepi se po 50  $\mu\text{L}$  uzorka soka šipka, ostavi se u inkubatoru pri 37 °C te se nakon dva dana gleda ima li poraslih crnih kolonija.

#### 3.2.2.4. Određivanje broja enterobakterija

Za određivanje prisutnosti i broja enterobakterija koristi se Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG). VRBG agar sadrži želatinu kao izvor ugljika, dušika, vitamina i minerala. Kvašćev ekstrakt izvor je B vitamina koji simuliraju rast bakterija. Soli i ljubičasti kristali inhibiraju rast Gram-pozitivnih bakterija, a natrijev klorid osigurava osmotsku ravnotežu. Na VRBG podlogu nacijepjuju se uzorci i to tako da se nacijepi 100  $\mu\text{L}$  svakog uzorka, osim za pasterezirani sok gdje se nacijepi po 1,10 i 100  $\mu\text{L}$ . Nacijepjene podloge se ostave u inkubatoru pri 37 °C dva dana nakon čega se broje porasle kolonije. Ako su enterobakterije prisutne u uzorku, one će

fermentirati glukozu iz podloge, proizvodit će kisele produkte te formirati crvene ili tamnoljubičaste kolonije.

#### 3.2.2.5. Određivanje broja sulfito-reducirajućih klostridija

Za određivanje prisutnosti i broja sulfito-reducirajućih klostridija koristi se sulfitni agar. Sadrži kazein pepton koji je izvor dušika, vitamina, minerala, aminokiselina bitnih za rast. Ferijev citrat i natrijev sulfit su indikatori za sumporovodik. Uzorak nacijepljen na sulfitni agar, inkubira se pri 37 °C dva dana. Nakon dva dana gleda se jesu li nastale crne kolonije čija je boja posljedica djelovanja klostridija. Naime, klostridije reduciraju sulfite do sulfida koji reagiraju sa željezom i formiraju crni talog željezova sulfida.

#### 3.2.2.6. Određivanje broja *Salmonella* vrsta

Za određivanje prisutnosti vrsta *Salmonella sp.* u uzorku koristi se Rappaport-Vassiliadis bujon (RVS bujon). RVS bujon sadrži magnezijev klorid koji povisuje osmotski tlak u mediju. Malahitno zelena boja inhibira sve mikroorganizme osim *Salmonella sp.* U RVS bujon otpipetira se 1 mL uzorka te se inkubira pri 37 °C dva dana. U prisutnosti *Salmonella* vrsta bujon mijenja boju iz plave u mliječno bijelu.

#### 4. Rezultati i rasprava

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj netoplinskih tehnika, ultrazvuka i hladne plazme - pojedinačno i u kombinaciji, na mikrobiološku kvalitetu svježe iscijeđenog šipkovog soka te soka nakon 7. i 14. dana skladištenja pri + 4 °C.

Radi usporedbe netoplinskih i toplinskih tehnika pripremljen je i pasterizirani sok od šipka, a pasterizacija je provedena u termostatiranoj kupelji pri 90 °C tijekom 1 min. Prema Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu (Benussi-Skukan i sur., 2011.) potrebno je ispitati prisutnost aerobnih mezofilnih bakterija, *Salmonella* spp., *Enterobacteriaceae* te kvasaca i plijesni. Ti kriteriji prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Mikrobiološki kriteriji za nepasterizirane voćne sokove i sokove iz povrća ( Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu, Web stranica MPRRR , 2011.)

	Hrana	Preporučeni parametri	Plan uzorkovanja		Kriteriji
			n	c	
10.2.	Nepasterizirani voćni sokovi i sokovi od povrća (svježi i sokovi iz aparata)	Aerobne mezofilne bakterije	5	2	m=10 <sup>3</sup> CFU/mL M=10 <sup>4</sup> CFU/mL
		<i>Salmonella</i> spp.	5	0	M=0 CFU/25mL
		<i>Enterobacteriaceae</i>	5	1	m=10 CFU/mL M=10 <sup>2</sup> CFU/mL
		Kvasci i plijesni	5	2	m=10 <sup>2</sup> CFU/mL M=10 <sup>3</sup> CFU/mL

U sljedećim tablicama prikazani su rezultati provedenih eksperimenata, odnosno određen je broj navedenih mikroorganizama prethodno navedenim metodama. Nakon tablica, priložene su slike gdje je vidljiv porast mikroorganizama na hranjivim podlogama.

Tablica 3. Rast aerobnih mezofilnih bakterija (CFU mL<sup>-1</sup>) u soku šipka tijekom skladištenja na +4°C

Uzorci	Broj kolonija(0.dan)	Broj kolonija(7.dan)	Broj kolonija(14.dan)
<b>SS</b>	1,95x10 <sup>2</sup> ±586,9	5,43x10 <sup>5</sup> ±139379,6	NO
<b>PS</b>	0 *	0 *	0 *
<b>1</b>	2,65x10 <sup>3</sup> ±3323,4	3,97x10 <sup>3</sup> ±3467,88	NO
<b>2</b>	10 <sup>4</sup>	3,597x10 <sup>3</sup> ±1494,28	NO
<b>3</b>	3,33x10 <sup>2</sup>	7,97x10 <sup>4</sup> ±57007,36	NO
<b>4</b>	10 <sup>2</sup>	2,77x10 <sup>3</sup> ±861,78	NO
<b>5</b>	5,5x10 <sup>2</sup> ±636,39	1,083x10 <sup>3</sup> ±921,50	1,1x10 <sup>4</sup> ±6363,96
<b>6</b>	10 <sup>2</sup>	5,75x10 <sup>2</sup> ±493,29	10 <sup>2</sup>
<b>7</b>	5,5x10 <sup>2</sup> ±636,39	6,5x10 <sup>2</sup> ±408,25	10 <sup>2</sup>
<b>8</b>	10 <sup>2</sup>	1,67x10 <sup>2</sup> ±115,47	10 <sup>3</sup>
<b>9</b>	10 <sup>2</sup>	5,86x10 <sup>4</sup> ±29485,77	NO
<b>10</b>	5,5x10 <sup>2</sup> ±636,39	7,53x10 <sup>4</sup> ±59539,44	NO
<b>11</b>	5,5x10 <sup>2</sup> ±636,39	3,03x10 <sup>4</sup> ±29483	NO
<b>12</b>	5,5x10 <sup>2</sup> ±636,39	7,83x10 <sup>2</sup> ±711,10	2x10 <sup>2</sup>
<b>13</b>	5,835x10 <sup>2</sup> ±473,76	4,56x10 <sup>4</sup> ±34375,54	NO
<b>14</b>	5,835x10 <sup>2</sup> ±473,76	4,27x10 <sup>5</sup> ±194285,01	NO
<b>15</b>	6x10 <sup>2</sup> ±565,69	1,89x10 <sup>6</sup> ±1044230,18	NO
<b>16</b>	1,33x10 <sup>2</sup>	4,03x10 <sup>3</sup> ±2547,68	NO
<b>UZ-1</b>	7,65x10 <sup>2</sup> ±332,34	1,17x10 <sup>6</sup> ±558489,03	NO
<b>UZ-2</b>	5,665x10 <sup>2</sup> ±613,06	4,28x10 <sup>3</sup> ±3364,45	NO
<b>UZ-3</b>	4,67x10 <sup>2</sup>	3,06x10 <sup>4</sup> ±18479,66	NO
<b>UZ-4</b>	6x10 <sup>2</sup> ±565,69	8,74x10 <sup>5</sup> ±527598,33	NO
<b>P-1</b>	3,6x10 <sup>2</sup>	2,16x10 <sup>6</sup> ±1573456,12	NO
<b>P-2</b>	2,3x10 <sup>2</sup>	7,39x10 <sup>5</sup> ±343698,67	NO
<b>P-3</b>	5,067x10 <sup>3</sup> ±6977,02	1,02x10 <sup>4</sup> ±7116,27	NO
<b>P-4</b>	2x10 <sup>2</sup>	2,45x10 <sup>3</sup> ±1423,73	NO

0\*-nije zabilježeno, NO-nije određeno

Tablica 4. Rast kvasaca i plijesni (CFU mL<sup>-1</sup>) u soku šipka tijekom skladištenja na +4°C

Uzorci	Broj kolonija(0.dan)	Broj kolonija(7.dan)	Broj kolonija(14.dan)
<b>SS</b>	1,1x10 <sup>3</sup> ±1272,79	7,32x10 <sup>5</sup> ±369075,42	NO
<b>PS</b>	0 *	0 *	0 *
<b>1</b>	10 <sup>3</sup>	1,12x10 <sup>3</sup> ±687,75	NO
<b>2</b>	0 *	4,12x10 <sup>3</sup> ±687,75	NO
<b>3</b>	5,5x10 <sup>2</sup> ±636,39	4,12x10 <sup>3</sup> ±4588,34	NO
<b>4</b>	0 *	1,72x10 <sup>3</sup> ±328,63	NO
<b>5</b>	0 *	3,3x10 <sup>2</sup> ±57,74	10 <sup>3</sup>
<b>6</b>	0 *	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>
<b>7</b>	0 *	0 *	1,1x10 <sup>3</sup> ±636,4
<b>8</b>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	1,43x10 <sup>3</sup> ±400,72
<b>9</b>	10 <sup>2</sup>	7,83x10 <sup>3</sup> ±3694,48	NO
<b>10</b>	10 <sup>2</sup>	8,68x10 <sup>4</sup> ±67056,67	NO
<b>11</b>	10 <sup>2</sup>	7,83x10 <sup>3</sup> ±1767,92	NO
<b>12</b>	0 *	5,84x10 <sup>2</sup> ±419,32	1,3x10 <sup>3</sup> ±494,97
<b>13</b>	3x10 <sup>2</sup>	7,89x10 <sup>4</sup> ±59416,21	NO
<b>14</b>	0 *	7,1x10 <sup>5</sup> ±500000	NO
<b>15</b>	6,165x10 <sup>2</sup> ±542,35	8,29x10 <sup>4</sup> ±72570,27	NO
<b>16</b>	10 <sup>2</sup>	2,8x10 <sup>3</sup> ±1408,55	NO
<b>UZ-1</b>	1,33x10 <sup>2</sup>	1,057x10 <sup>6</sup> ±790358,57	NO
<b>UZ-2</b>	0 *	2,03x10 <sup>3</sup> ±1178,13	NO
<b>UZ-3</b>	2,33x10 <sup>2</sup>	4,51x10 <sup>3</sup> ±3405,88	NO
<b>UZ-4</b>	6,5x10 <sup>2</sup> ±494,97	1,82x10 <sup>4</sup> ±11870,83	NO
<b>P-1</b>	1,67x10 <sup>2</sup>	2,86x10 <sup>6</sup> ±208166,6	NO
<b>P-2</b>	5,5x10 <sup>3</sup>	9x10 <sup>3</sup> ±3000	NO
<b>P-3</b>	1,1x10 <sup>3</sup> ±1272,79	6,93x10 <sup>3</sup> ±3712,08	NO
<b>P-4</b>	5,5x10 <sup>3</sup> ±6363,9	3,05x10 <sup>3</sup> ±1189,54	NO

0\*-nije zabilježeno, NO-nije određeno

Tablica 5. Rast stafilokoka (CFU mL<sup>-1</sup>) u soku šipka tijekom skladištenja na + 4 °C

Uzorci	Broj kolonija(0.dan)	Broj kolonija(7.dan)	Broj kolonija(14.dan)
<b>SS</b>	0 *	0 *	0 *
<b>PS</b>	0 *	0 *	0 *
<b>1</b>	10	10	0 *
<b>2</b>	10	0 *	0 *
<b>3</b>	0 *	10	0 *
<b>4</b>	0 *	0 *	0 *
<b>5</b>	0 *	10 <sup>2</sup>	0 *
<b>6</b>	0 *	0 *	0 *
<b>7</b>	0 *	0 *	0 *
<b>8</b>	0 *	0 *	0 *
<b>9</b>	10	110	0 *
<b>10</b>	0 *	300	0 *
<b>11</b>	0 *	0 *	0 *
<b>12</b>	0 *	0 *	0 *
<b>13</b>	0 *	350	0 *
<b>14</b>	30	0 *	0 *
<b>15</b>	0 *	240	0 *
<b>16</b>	0 *	0 *	0 *
<b>UZ-1</b>	20	90	0 *
<b>UZ-2</b>	30	70	0 *
<b>UZ-3</b>	10	80	0 *
<b>UZ-4</b>	0 *	220	0 *
<b>P-1</b>	30	120	0 *
<b>P-2</b>	0 *	10	0 *
<b>P-3</b>	0 *	0 *	0 *
<b>P-4</b>	0 *	0 *	0 *

0\*-nije zabilježeno



Tablica 6. Rast enterobakterija (CFU mL<sup>-1</sup>) u soku šipka tijekom skladištenja na + 4 °C

Uzorci	Broj kolonija(0.dan)	Broj kolonija(7.dan)	Broj kolonija(14.dan)
<b>SS</b>	0 *	4(1mL),1(100 μL)	0 *
<b>PS</b>	0 *	0 *	0 *
<b>1</b>	0 *	0 *	0 *
<b>2</b>	0 *	0 *	0 *
<b>3</b>	0 *	0 *	0 *
<b>4</b>	0 *	0 *	0 *
<b>5</b>	0 *	0 *	0 *
<b>6</b>	0 *	0 *	0 *
<b>7</b>	0 *	0 *	0 *
<b>8</b>	0 *	0 *	0 *
<b>9</b>	0 *	0 *	0 *
<b>10</b>	0 *	0 *	0 *
<b>11</b>	0 *	0 *	0 *
<b>12</b>	0 *	0 *	0 *
<b>13</b>	0 *	0 *	0 *
<b>14</b>	0 *	0 *	0 *
<b>15</b>	0 *	0 *	0 *
<b>16</b>	0 *	0 *	0 *
<b>UZ-1</b>	0 *	0 *	0 *
<b>UZ-2</b>	0 *	0 *	0 *
<b>UZ-3</b>	0 *	0 *	0 *
<b>UZ-4</b>	0 *	0 *	0 *
<b>P-1</b>	0 *	0 *	0 *
<b>P-2</b>	0 *	0 *	0 *
<b>P-3</b>	0 *	0 *	0 *
<b>P-4</b>	0 *	0 *	0 *

0\*-nije zabilježeno

Tablica 7. Rast *Salmonella sp.* (CFU mL<sup>-1</sup>) u soku šipka tijekom skladištenja na + 4 °C

Uzorci	Broj kolonija(0.dan)	Broj kolonija(7.dan)	Broj kolonija(14.dan)
SS	0 *	0 *	0 *
PS	0 *	0 *	0 *
1	0 *	0 *	0 *
2	0 *	0 *	0 *
3	0 *	0 *	0 *
4	0 *	0 *	0 *
5	0 *	0 *	0 *
6	0 *	0 *	0 *
7	0 *	0 *	0 *
8	0 *	0 *	0 *
9	0 *	0 *	0 *
10	0 *	0 *	0 *
11	0 *	0 *	0 *
12	0 *	0 *	0 *
13	0 *	0 *	0 *
14	0 *	0 *	0 *
15	0 *	0 *	0 *
16	0 *	0 *	0 *
UZ-1	0 *	0 *	0 *
UZ-2	0 *	0 *	0 *
UZ-3	0 *	0 *	0 *
UZ-4	0 *	0 *	0 *
P-1	0 *	0 *	0 *
P-2	0 *	0 *	0 *
P-3	0 *	0 *	0 *
P-4	0 *	0 *	0 *

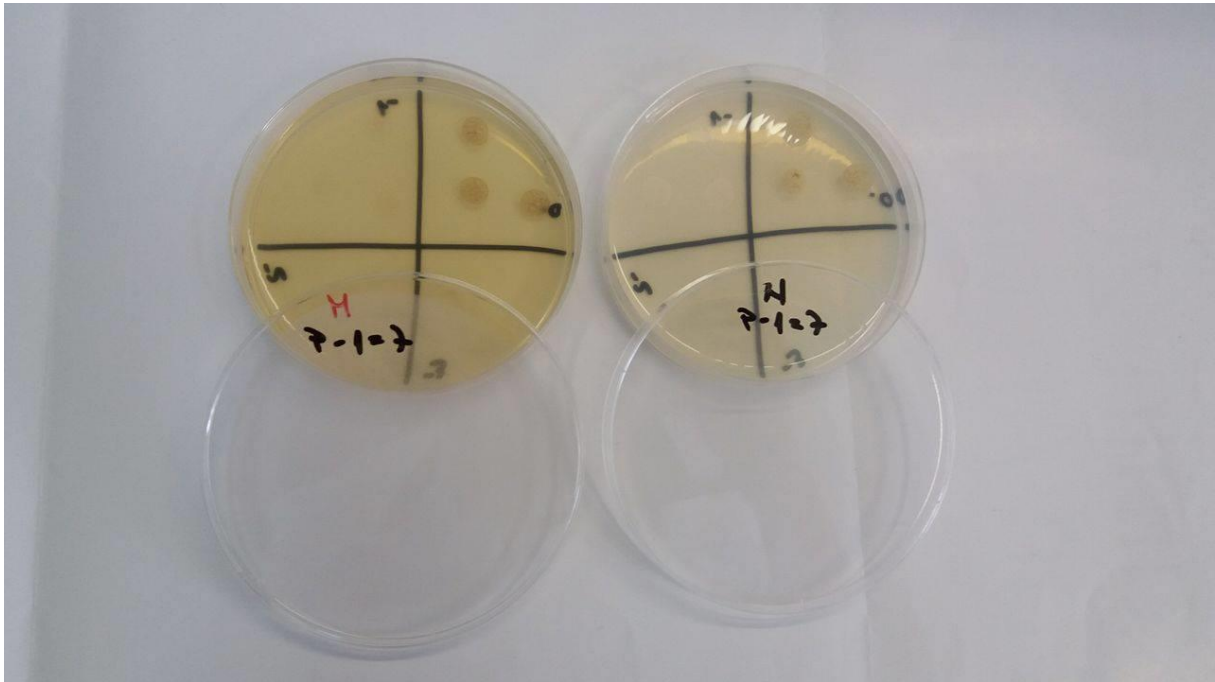
0\*-nije zabilježeno

Tablica 8. Rast sulfito-reducirajućih klostridija(CFU mL<sup>-1</sup>) u soku šipka tijekom skladištenja na + 4 °C

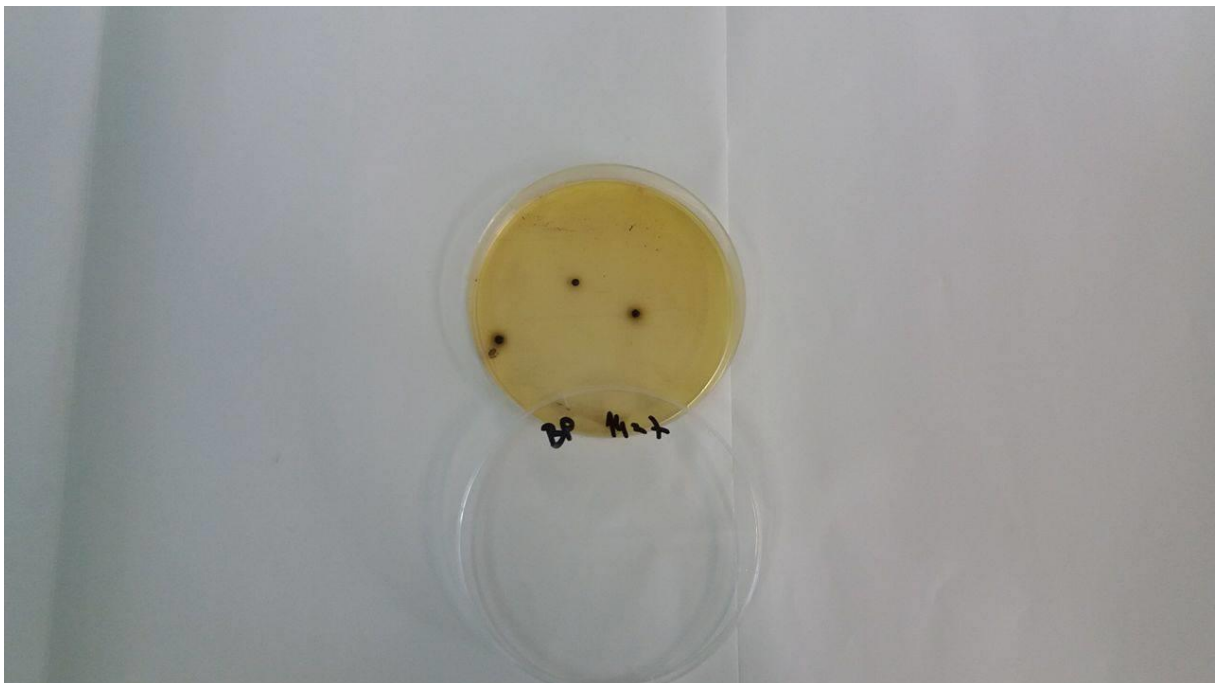
Uzorci	Broj kolonija(0.dan)	Broj kolonija(7.dan)	Broj kolonija(14.dan)
SS	0 *	0 *	0 *
PS	0 *	0 *	0 *
1	0 *	0 *	0 *
2	0 *	0 *	0 *
3	0 *	0 *	0 *
4	0 *	0 *	0 *
5	0 *	0 *	0 *
6	0 *	0 *	0 *
7	0 *	0 *	0 *
8	0 *	0 *	0 *
9	0 *	0 *	0 *
10	0 *	0 *	0 *
11	0 *	0 *	0 *
12	0 *	0 *	0 *
13	0 *	0 *	0 *
14	0 *	0 *	0 *
15	0 *	0 *	0 *
16	0 *	0 *	0 *
UZ-1	0 *	0 *	0 *
UZ-2	0 *	0 *	0 *
UZ-3	0 *	0 *	0 *
UZ-4	0 *	0 *	0 *
P-1	0 *	0 *	0 *
P-2	0 *	0 *	0 *
P-3	0 *	0 *	0 *
P-4	0 *	0 *	0 *

0\*-nije zabilježeno

Na slikama (Slika 3, Slika 4 i Slika 5) vidljive su izrasle kolonije porasle na pločama nakon naciepljivanja uzoraka tretiranog soka skladištenog 7. i 14. dana.



Slika 3. Porasle kolonije aerobnih mezofilnih bakterija, kvasaca te plijesni (uzorak P-1)



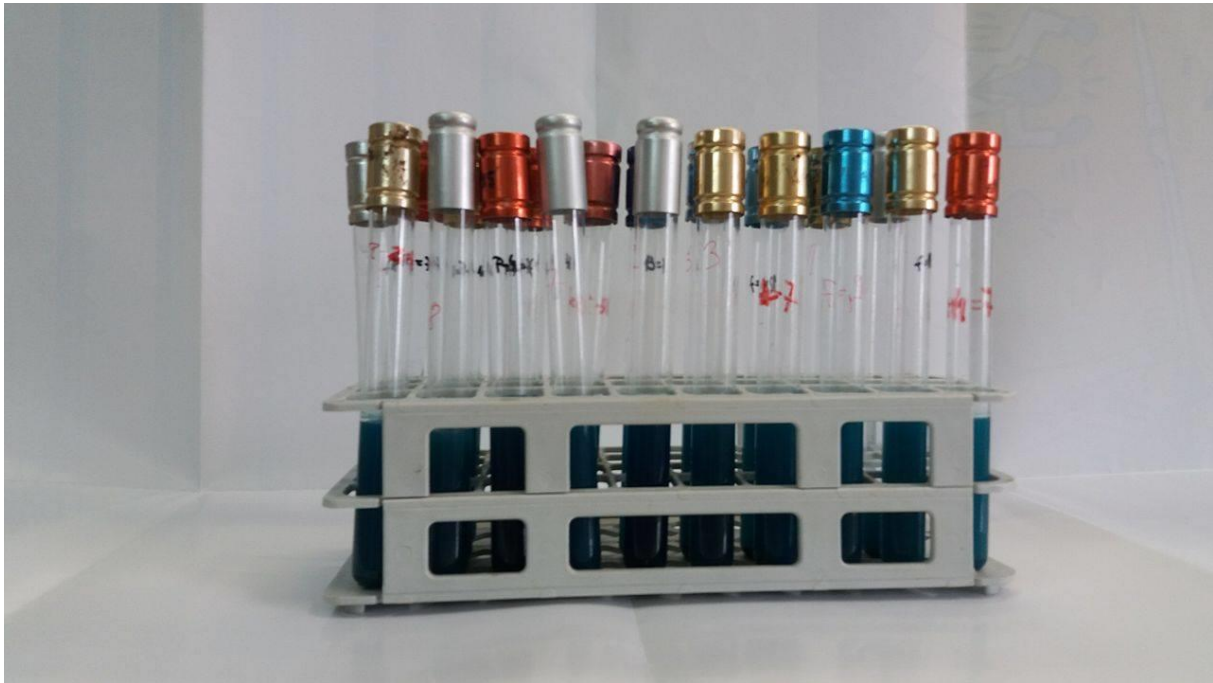
Slika 4. Porasle kolonije stafilokoka (uzorak 14=7)



Slika 5. Porasle kolonije enterobakterija (uzorak 3=7)



Slika 6. Sulfitni agar koji se koristi za određivanje prisutnosti sulfito-reducirajućih klostridija



Slika 7. RVS bujon koji se koristi za određivanje prisutnosti *Salmonella sp.*

Na prikazanim slikama može se vidjeti rast mikroorganizama u tretiranim uzorcima. Na slikama 6 i 7 vidljivo je da nema rasta mikroorganizama jer nije došlo do promjene boje RVS bujona u žuto te kod sulfitnog agara nema prisutnih sulfito-reducirajućih bakterija koje bi formirale crne nakupine.

Prema Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu (Benussi-Skukan i sur., 2011.), sok od šipka testiran je na prisutnost aerobnih mezofilnih bakterija, kvasce i plijesni, enterobakterije te neke vrste salmonele. Iako nije naznačeno u zakonu, također je testirana prisutnost sulfito-reducirajućih klostridija te stafilokoka. Što se tiče aerobnih mezofilnih bakterija, sljedeći tretirani uzorci sokova sadrže prevelik broj mikroorganizama ( $>10^4$  CFU mL<sup>-1</sup>) te nisu zdravstveno ispravni: 3, 9, 10, 11, 13, 14, 15, UZ-1, UZ-3, UZ-4, P-1, P-2, P-3 (nakon 7.dana) te većina uzoraka nakon 14. dana skladištenja. Uzorci koji su bili ispravni nakon 14. dana skladištenja su uzorci 6, 7, 8 i 12. Ti uzorci su tretirani objema metodama, što pokazuje da se više aerobnih mezofilnih bakterija inaktivira kombiniranim metodama nego zasebnim metodama ultrazvuka ili hladne plazme. Od navedenih uzoraka, najmanju koncentraciju mikroorganizama imao je uzorak 6, koji je tretiran ultrazvukom amplitude čija je vrijednost  $75 \mu\text{m}^{-1}$  u trajanju od 2,5 minute te hladnom plazmom frekvencije 60 Hz u trajanju od 5 minuta. Kao najmanje efikasna metoda za inaktivaciju aerobnih mezofilnih bakterija pokazala se metoda tretiranja hladnom plazmom frekvencije 60 Hz u trajanju od 2,5 minute. Nakon 7. dana skladištenja koncentracija aerobnih mezofilnih bakterija u tretiranom uzorku (P-1)

iznosila je  $2,16 \times 10^6$  CFU mL<sup>-1</sup> što je znatno više od dozvoljene koncentracije. Kod mikrobiološke kontrole broja kvasaca i plijesni, uzorci koji nisu zdravstveno ispravni zbog prekomjernog broja kontroliranih mikroorganizama ( $>10^3$  CFU mL<sup>-1</sup>) su: P-2, P-3, P-4 (0.dan), 1, 2, 3, 4, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, UZ-1, UZ-2, UZ-3, UZ-4, P-1, P-2, P-3, P-4 (nakon 7.dana skladištenja) te većina uzoraka nakon 14. dana skladištenja. Uzorci koji su bili mikrobiološki ispravni nakon 14. dana skladištenja su uzorci 5 i 6, tretirani kombiniranim tehnikama. Kao i kod aerobnih mezofilnih bakterija, kombinacija tretmana kojom je tretiran uzorak 6 pokazala se najboljom u inaktivaciji mikroorganizama. Također kao i kod aerobnih mezofilnih bakterija, najlošijom se pokazala metoda tretiranja hladnom plazmom kojom je tretiran uzorak P-1. Koncentracija kvasaca i plijesni je nakon 7. dana skladištenja iznosila  $2,86 \times 10^6$  CFU mL<sup>-1</sup> što je duplo više od dozvoljene koncentracije. Porast tih vrsta mikroorganizama je vidljiv na Slici 3. Što se tiče ostalih mikroorganizama, sok od šipka odgovara kriterijima i zdravstveno je ispravan (*Salmonella sp.* = 0 CFU mL<sup>-1</sup>, enterobakterije  $<10^2$  CFU mL<sup>-1</sup>). Porast stafilokoka nakon 14 dana vidljiv je na Slici 4., a porast enterobakterija na Slici 5. Također iz priloženih rezultata možemo vidjeti da su za inaktivaciju mikroorganizama bolje kombinirane tehnike u kojima se uzorci tretiraju i ultrazvukom i hladnom plazmom, od onih kod kojih se uzorci tretiraju samo jednom od ove dvije netermalne tehnike. Osobito uspješnom se pokazala kombinirana metoda tretiranja kojom je tretiran uzorak 6. Uzorak je tretiran ultrazvukom vrijednosti amplitude  $75 \mu\text{m}^{-1}$ , a vrijeme tretiranja uzorka iznosilo je 2,5 minute, u kombinaciji s tretmanom pomoću hladne plazme, čija je frekvencija 60 Hz, a vrijeme tretiranja 5 minuta.

Razne druge netermalne tehnike su korištene za inaktivaciju mikroorganizama i produljenje trajnosti soka od šipka. Tako su Varela-Santos i sur. (2012) istraživali utjecaj visokog tlaka na fizikalno-kemijska svojstva, bioaktivne sastojke i mikroorganizme u soku od šipka. Uzorke soka od šipka tretirali su različitim vrijednostima visokog tlaka (350, 450 i 550 MPa) te su nakon tretmana uzorke čuvali 35 dana na temperaturi od 4 °C. Dobiveni rezultati su pokazali da je tretman sa 350 MPa dovoljan da se uspješno smanji broj mikroorganizama koji uzrokuju kontaminaciju te da se ti mikroorganizmi ne pojave tijekom 35 dana skladištenja.

Još jedna netermalna tehnika korištena je za inaktivaciju broja mikroorganizama u soku od šipka, a to je gama zračenje. Alighourchi i sur. (2008) istraživali su utjecaj gama zračenja na stabilnost antocijanina i prisutnost mikroorganizama u soku šipka. Uzorci su bili tretirani raznim intenzitetima gama zraka te su rezultati pokazali da pri vrijednosti od 2,0 kGy broj bakterija i plijesni znatno opada, ali pri vrijednostima većim od navedene znatno se smanjila koncentracija antocijana pa se ne preporučuje korištenje većeg intenziteta gama zraka.

Također, primjena netermalnih tehnika za inaktivaciju mikroorganizama koristi se u raznim drugim voćnim sokovima. Tako su Shi i sur. (2011.) ispitivali utjecaj hladne plazme na inaktivaciju mikroorganizama te kvalitetu svježe cijedenog soka od naranče. Uzorke su tretirali hladnom plazmom u različitim vremenskim intervalima. Dobiveni rezultati pokazali su da se produženjem vremena tretiranja soka od naranče, broj prisutnih mikroorganizama smanjuje.

Utjecaj ultrazvuka na mikrobnu populaciju u soku od naranče istraživali su Valero i sur. (2007.). Tretirali su uzorke soka od naranče različitim frekvencijama te su pokazali da više frekvencije ultrazvuka značajnije djeluju na aerobne mezofilne bakterije, dok se za inaktivaciju kvasaca i plijesni ultrazvuk treba kombinirati sa drugim tehnikama jer inače ne dolazi do značajnijeg smanjenja njihovog broja.

Također, može se napraviti usporedba ovog eksperimenta te eksperimenta opisanih u istraživanju Vergara i sur. (2013.) gdje je ispitan utjecaj pasterizacije na boju soka od šipka te prisutnost mikroorganizama u samom soku. U istraživanju su korištena dva tipa pasterizacije, pasterizacija pomoću niske temperature te pasterizacija pomoću visoke temperature. Rezultati koje su dobili pokazali su da oba procesa sprečavaju pojavu mikroorganizama do 120 dana skladištenja. U ovom eksperimentalnom radu, pasterizirani sok je također bio mikrobiološki ispravan nakon 14. dana skladištenja.

Mena i sur. (2013.) ispitivali su promjene u mikrobiologiji, boji, bioaktivnim sastojcima i antioksidativni učinak pasteriziranog soka od šipka. Pasterizacija se provodila pri niskim, srednjim i visokim temperaturama. Za razliku od ovog eksperimentalnog rada, u njihovom soku je unatoč pasterizaciji bio prisutan određeni broj kvasaca i plijesni te mezofilnih aerobnih bakterija.

Iz navedenih istraživanja i provedenog eksperimentalnog rada, vidljivo je da su netoplinske tehnike obrade hrane postale sve učestalije pored klasičnih toplinskih tehnika te da su primjenom optimalnog režima tretiranja uspješne pri inaktivaciji mikroorganizama i povećanju trajnosti namirnica.



## 5. Zaključak

Na temelju proučene literature, provedenog eksperimentalnog rada, dobivenih rezultata i provedene rasprave, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Uzorci soka šipka koji zadovoljavaju sve mikrobiološke kriterije nakon 7. dana skladištenja soka pri + 4 °C su: 5, 6, 7, 8, 12. Svi navedeni uzorci tretirani su s obje ispitivane tehnike : ultrazvukom amplitude 75  $\mu\text{m}^{-1}$  u vremenu trajanja tretiranja od 5 minuta te hladnom plazmom frekvencije 60 Hz s vremenom tretiranja 5 minuta (uzorak 6) ili frekvencije 90 Hz s vremenom trajanja od 2,5 ili 5 minuta (uzorci 7 i 8). Također kombinirana metoda tretmana se pokazala dobrom u slučaju uzorka 12, koji je tretiran ultrazvukom amplitude 100  $\mu\text{m}^{-1}$  kroz 2,5 minute, a hladnom plazmom uzorak je tretiran pri frekvenciji od 90 Hz u vremenu tretiranja od 5 minuta. Ostali uzorci sadrže veći broj mikroorganizama od dopuštenog prema Zakonu o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu te Vodiču za mikrobiološke kriterije hrane.
2. Kao najmanje efikasna netoplinaska tehnika pokazala se tehnika tretiranja hladnom plazmom frekvencije 60 Hz u vremenu trajanja tretiranja uzorka 2,5 minute. Uzorak tretiran tom tehnikom (uzorak P-1) sadržavao je puno veće koncentracije mikroorganizama od dozvoljene.
3. Svi netopliniski tretirani uzorci soka šipka nakon 14 dana skladištenja pri +4 °C nisu mikrobiološki ispravni.
4. Pasterizirani sok od šipka i nakon 14 dana skladištenja pri +4 °C mikrobiološki je ispravan te se na temelju toga potvrđuje veća učinkovitost ove toplinske tehnike u inaktivaciji mikroorganizama u odnosu na netoplinске tehnike.

## 6. Literatura

- Akpinar-Bayazit A., Ozcan T., Yilmaz-Ersan L. (2012) The Therapeutic Potential of Pomegranate and Its Products for Prevention of Cancer. U: Cancer prevention- From Mechanisams to Translational Benefits. [online] (Georgakilas, A. G., ured.), InTech Europe, Rijeka, str. 331-372, <<http://www.intechopen.com/books/cancer-prevention-from-mechanisms-to-translational-benefits>>. Pristupljeno 20. travanj 2018.
- Alighourchi H., Barzegar M. , Abbasi S. (2008) Effect of gamma irradiation on the stability of anthocyanins and shelf-life of various pomegranate juices. *Food Chemistry* **110**: 1036–1040.
- Al-Maiman S.A., Ahmad D. (2002) Changes in Physical and Chemical Properties during Pomegranate (*Punica granatum* L.) Fruit Maturation. *Food Chemistry* **76**: 437-441.
- 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. Web stranica Ministarstava poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja. Pristupljeno 29. svibnja 2018.
- Chu P. K., Lu X. (2014) Low temperature plasma technology: Methods and applications, CRC Press – Taylor & Francis Group, London, str. 3-13.
- Da Silva J.A., Rana S. T., Narzary D., Verma N., Meshram D. T., Ranade S. A. (2013) Pomegranate biology and biotechnology: A review. *Scientia Horticulturae* **160**: 85- 107.
- Dhinesh K. V., Ramasamy D. (2016) Pomegranate Processing and Value Addition: Review. *Journal Food Process & Technology* **7**: 565.
- Ercegović Ražić S. E., Čunko R. (2009) Modifikacija svojstava tekstilija primjenom plazme. *Tekstil* **58**: 55-74.
- Gil M. I., Tomas-Barberan F. A., Hess-Pierce B., Holcroft D. M., Kader A. A. (2000) Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 4581-4589.
- Grossmann M. E., Mizuno N. K., Schuster T., Cleary M. P. (2010) Punicic acid is an  $\omega$ -5 fatty acid capable of inhibiting breast cancer proliferation. *International Journal of Oncology* **36**: 421-426.
- Herceg Z., Režek Jambrak A., Rimac Brnčić S. (2009) Procesi konzerviranja hrane, Golden marketing- Tehnička knjiga, Zagreb, str. 53-68.

Karasu C., Cumaoglu A., Gurpinar R. A., Kartal M., Kovacicova L., Milackova I., Stefek M. (2012) Aldose reductase inhibitory activity and antioxidant capacity of pomegranate extracts. *Interdisciplinary Toxicology* **5**: 15-20.

Mena P., Vegara S., Marti N., Garcia-Viguera C., Saura D., Valero M. (2013) Changes on indigenous microbiota, colour, bioactive compounds and antioxidant activity of pasteurised pomegranate juice. *Food Chemistry* **141**: 2122-2129.

Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu (2008.), *Narodne novine* **74** (NN 74/2008)

Pravilnik o voćnim sokovima i njima sličnim proizvodima namijenjenim za konzumaciju (2013.), *Narodne novine* **48** (NN 48/2013)

Shema-Didi L., Sela S., Ore L., Shapiro G., Geron R., Moshe G., Kristal B. (2012) One year of pomegranate juice intake decreases oxidative stress, inflammation, and incidence of infections in hemodialysis patients: A randomized placebo-controlled trial. *Free Radical Biology and Medicine* **53**: 297-304.

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 transactions on plasma science* **39**: 1591-1597.

Valero M., Recrosio N., Saura D., Muñoz N., Martí N., Lizama V. (2007) Effects of ultrasonic treatments in orange juice processing. *Journal of Food Engineering* **50**: 509-516.

Vardin H., Fenerciog˘lu H. (2003) Study on the development of pomegranate juice processing technology: Clarification of pomegranate juice. *Nahrung* **47**: 300–303.

Varela-Santos E., Ochoa-Martinez A., Tabilo-Munizaga G., Reyes J.E., Pérez-Won M., Briones-Labarca V., Morales-Castro J. (2012) Effect of high hydrostatic pressure (HHP) processing on physicochemical properties, bioactive compounds and shelf-life of pomegranate juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **13**: 13–22.

Vegara S., Mena P., Marti N., Saura D., Valero M. (2013) Effect of pasteurization process and storage on color and shelf-life of pomegranate juices. *LWT-Food Science and Technology* **54**: 592-596.

Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

*Ana Samardžić*

---

Ana Samardžić