# STRESZCZENIE

Świadomość społeczeństwa na temat zdrowej żywności wzrasta. Powoduje to duże oczekiwania względem producentów żywności, którzy muszą zapewnić na rynku produkty bezpieczne dla zdrowia oraz w jak najmniejszym stopniu przetworzone. W tym celu prowadzone są procesy utrwalania żywności, których głównym zadaniem jest ochrona przed zepsuciem i skażeniem mikrobiologicznym, ograniczenie niepożądanych zmian sensorycznych oraz zachowanie wysokiej wartości odżywczej. Chociaż klasyczne termiczne metody konserwacji żywności wciąż są najczęściej wykorzystywane, to wysoka temperatura procesu ogranicza ich stosowanie w niektórych gałęziach przemysłu.

Wino to tradycyjny napój alkoholowy, którego kultura produkcji i konsumpcji widoczna jest na całym świecie od wieków. Ze względu na zawartość związków bioaktywnych należących głównie do grupy polifenoli, przypisuje się mu liczne właściwości prozdrowotne. Aby zapewnić trwałość i bezpieczeństwo mikrobiologiczne wina do jego konserwacji powszechnie wykorzystuje się siarczyny. Związki te jednak wywierają negatywny wpływ na zdrowie konsumenta, co potwierdzają badania naukowe. Przyczyniło się to do wzmożonych poszukiwań alternatywnych metod konserwacji wina. Szczególną uwagę poświęca się nietermicznym metodom, które oprócz eliminacji niepożądanych mikroorganizmów, nie wpływałyby znacząco na stabilność końcową produktu. Zimna plazma (CP) ze względu na swoje zalety, do których zaliczyć możemy szerokie działanie przeciwdrobnoustrojowe, niską temperaturę prowadzenia procesu, krótki czas sterylizacji, a także stosunkowo niski koszt staje się obiecującym rozwiązaniem w aspekcie konserwacji napojów alkoholowych.

Głównym celem badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena możliwości wykorzystania zimnej plazmy w konserwacji czerwonego wina zrealizowana poprzez (i) ustalenie mechanizmów działania CP na komórki drobnoustrojów zanieczyszczających wina, uwzględniając charakterystykę zachodzących zmian fizjologicznych i morfologicznych komórek *L. hilgardii* (ii) poznanie oddziaływań CP na właściwości fizykochemiczne i aktywność biologiczną czerwonego wina. (iii) porównanie efektów działania CP z metodami konserwacji wykorzystującymi dodatek pirosiarczynu potasu na jakość czerwonego wina z uwzględnieniem okresu przechowywania.

Stan fizjologiczny bakterii *L. hilgardii* po działaniu CP oceniono poprzez badanie przeżywalności komórek za pomocą klasycznej metody hodowlanej, pomiarów gęstości optycznej $OD_{600}$ oraz z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Do określenia związku między aktywnością metaboliczną a morfologią komórki zastosowano skaningową mikroskopię elektronową (SEM), mikroskopię sił atomowych (AFM), oraz spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR). Połączenie metody AFM z cytometrią przepływową pozwoliło na analizę zmian po działaniu CP w poszczególnych subpopulacjach komórek, co jest podejściem innowacyjnym, dotychczas nie opisanym w literaturze międzynarodowej. Po raz pierwszy także, wpływ CP na właściwości fizykochemiczne i aktywność biologiczną czerwonego wina porównano z metodą tradycyjną i łączoną uwzględniając trzymiesięczny okres przechowywania. Przeprowadzono również jakościowe i ilościowe oznaczenie profilu związków fenolowych oraz amin biogennych metodą UPLC-PDA-MS/MS oraz GC-MS. Analiza chemometryczna została wykorzystana w celu opisania zależności pomiędzy zastosowaną metodą konserwacji a poszczególnymi badanymi parametrami świadczącymi o jakości wina.

W pracy wykazano, że CP opóźnia wzrost i podziały bakterii *L. hilgardii*, a wydłużenie czasu jej działania prowadzi do pełnej eliminacji ich ze środowiska. Ważnym wynikiem badań podjętych w dysertacji było stwierdzenie odzyskiwania żywotności przez komórki bakterii znajdujące się w stanie anabiozy. Ponowna hodowla wydzielonej subpopulacji potwierdziła, że przynajmniej część komórek znajdowało się w stanie VBNC (ang. viable but nonculturable). Ponadto, z wykorzystaniem techniki AFM potwierdzono zmianę morfologii komórek subpopulacji pośredniej, która może wskazywać na adaptację bakterii do niekorzystnych warunków środowiska. Odnotowano także liczne zmiany struktury powierzchni komórek martwych, charakteryzujące się wzrostem chropowatości i elastyczności, mogące wynikać z działania na ścianę komórkową bakterii reaktywnych związków tlenu zawartych w strumieniu plazmy.

Wykazano także, że wpływ CP na zawartość związków fenolowych uzależniony był od warunków prowadzenia procesu oraz budowy chemicznej konkretnego związku reagującego ze składnikami plazmy. W badanych próbkach wina po 3–miesięcznym okresie przechowywania stwierdzono redukcję ogólnej zawartości związków fenolowych oraz obniżenie aktywności przeciwutleniającej niezależnie od zastosowanej metody konserwacji. Efekt ten był najłagodniejszy dla konserwacji metodą tradycyjną oraz CP (5

min; He/$N_2$). W przeprowadzonych badaniach po raz pierwszy wskazano możliwość wykorzystania zimnej plazmy do redukcji amin biogennych w czerwonym winie. Pozytywnie należy ocenić fakt, że konserwacja wina CP nie wpłynęła na pH oraz barwę w sposób, który mógłby być dostrzegalny dla konsumenta. Z wykorzystaniem niehierarchicznej analizy skupień wykazano przyporządkowanie konserwacji metodą CP do klastra z próbkami kontrolnym. Skupienie to charakteryzowało się pośrednimi wartościami poszczególnych parametrów jakościowych wina. Wykorzystując analizę chemometryczną w pracy po raz pierwszy wykazano, że istnieją specyficzne zależności między zastosowaną metodą konserwacji a poszczególnymi parametrami świadczącymi o jakości wina tj. barwa, właściwości przeciwutleniające, zawartość związków fenolowych i amin biogennych oraz czystość mikrobiologiczna.

Wyniki przeprowadzonych analiz dowodzą, że dobór odpowiednich warunków plazmowania może w przyszłości spowodować, iż CP stanie się alternatywną metodą konserwacji wina.

## SUMMARY

Public awareness of healthy food is increasing. This creates high expectations for food producers, who must provide the market with products that are safe for health and as little processed as possible. To this end, food preservation processes are carried out, the main aim of which is to protect against spoilage and microbiological contamination, to reduce undesirable sensory changes and to preserve high nutritional value. Although classical thermal food preservation methods are still the most widely used, the high process temperature limits their use in some industries.

Wine is a traditional alcoholic beverage whose culture of production and consumption has been evident throughout the world for centuries. Due to its content of bioactive compounds belonging mainly to the polyphenol group, it is attributed with numerous health-promoting properties. In order to ensure the shelf-life and microbiological safety of wine, sulphites are commonly used for its preservation. However, these compounds have a negative impact on consumer health, as confirmed by scientific studies. This has contributed to an increased search for alternative wine preservation methods. Particular attention is being paid to non-thermal methods that, in addition to eliminating unwanted microorganisms, would not significantly affect the final stability of the product. Cold plasma (CP) is becoming a promising solution for the preservation of alcoholic beverages due to its advantages, which include a broad antimicrobial effect, low process temperature, short sterilisation time and relatively low cost.

The main objective of the research carried out within the framework of this dissertation was to evaluate the possibility of using cold plasma in the preservation of red wine realised by (i) determining the mechanisms of action of CP on the cells of wine-contaminating microorganisms, taking into account the characteristics of the physiological and morphological changes occurring in *L. hilgardii* cells (ii) finding out the effects of CP on the physicochemical properties and biological activity of red wine. (iii) to compare the effects of CP with preservation methods using the addition of potassium metabisulfite on the quality of red wine, taking into account the storage period.

The physiological state of the bacterium *L. hilgardii* after CP treatment was assessed by examining cell survival using the classical culture method, $OD_{600}$ optical density measurements and using flow cytometry. Scanning electron microscopy (SEM),

atomic force microscopy (AFM), and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) were used to determine the relationship between metabolic activity and cell morphology. The combination of AFM and flow cytometry allowed the analysis of post-CP treatment changes in individual cell subpopulations, an innovative approach not previously reported in the international literature. Also, for the first time, the effect of CP on the physicochemical properties and biological activity of red wine was compared with the traditional and combined method, taking into account a three-month storage period. Qualitative and quantitative determination of the profile of phenolic compounds and biogenic amines by UPLC-PDA-MS/MS and GC-MS was also carried out. A chemometric analysis was used to describe the relationship between the preservation method used and the individual wine quality parameters studied.

In this study, CP was shown to retard the growth and division of *L. hilgardii*, while prolonging its duration of action leads to their complete elimination from the environment. An important result of the research undertaken in the dissertation was the finding of recovery of viability by bacterial cells in a state of anabiosis. Re-culture of the isolated subpopulation confirmed that at least some of the cells were in the VBNC (viable but nonculturable) state. In addition, a change in cell morphology of the intermediate subpopulation was confirmed using AFM, which may indicate adaptation of the bacteria to adverse environmental conditions. Numerous changes in the surface structure of the dead cells, characterised by an increase in roughness and elasticity, were also noted, possibly due to the action of reactive oxygen compounds contained in the plasma stream on the bacterial cell wall.

It was also shown that the effect of CP on the content of phenolic compounds depended on the process conditions and the chemical structure of the specific compound reacting with the plasma components. In the wine samples studied, a reduction in the total phenolic compound content and a decrease in antioxidant activity were found after a 3-month storage period, regardless of the preservation method used. This effect was mildest for preservation by the traditional method and CP (5 min; $He/N_2$). The study indicated for the first time the possibility of using cold plasma to reduce biogenic amines in red wine. On a positive note, CP wine preservation did not affect pH and colour in a way that could be perceived by the consumer. Using non-hierarchical cluster analysis, the allocation of CP preservation to a cluster with control samples was shown. This cluster was characterised by intermediate values of individual wine quality parameters. Using

chemometric analysis, the study showed for the first time that there are specific relationships between the preservation method used and individual parameters indicative of wine quality, i.e., colour, antioxidant properties, content of phenolic compounds and biogenic amines, and microbiological purity. The results of the analyses indicate that the selection of appropriate conditions for the plasma process could make CP an alternative method of wine preservation in the future.