Utjecaj procesa obrade na stresne parametre kod Escherichie coli

Cvitković, Daniela

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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:159:063822

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

Daniela Cvitković

6902/PT

UTJECAJ PROCESA OBRADE NA STRESNE PARAMETRE KOD *Escherichie coli*

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Fizikalna svojstva složenih sustava - hrane

Mentor: Izv. prof. dr. sc. *Anet Režek Jambrak*

Zagreb, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za procesno-prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ PROCESA OBRADE NA STRESNE PARAMETRE KOD *Escherichie coli*

Daniela Cvitković, 0058204872

Sažetak: Cilj ovog rada je usporediti utjecaj toplinskog tretmana pri različitim temperaturama (20, 30, 40, 50 i 60°C) te duljini tretmana (5 i 10 minuta) s netoplinskim tretmanom-hladnom plazmom na izazvane stresne parametre (stupanj redukcije i istjecanje staničnog sadržaja) čiste kulture *Escherichie coli* uz praćenje fizikalno kemijskih parametara (pH, električna vodljivost i koncentracija slobodnih radikala). Kroz rezultate eksperimenata vidljiv je veći stupanj inaktivacije korištenjem hladne plazme pri nižim temperaturama u kraćem vremenu u odnosu na dulje toplinske tretmane kod kojih je ostvaren isti inaktivacijski učinak. Također, analizom kemijskih parametara praćena je prisutnost nastajanja slododnih radikala tijekom tretmana s ciljem određivanja mehanizma inaktivacije *Escherichie coli.*

Ključne riječi: *Escherichia coli,* hladna plazma, stresni parametri, toplinski tretman
Rad sadrži: 25 stranica, 7 slika, 7 tablica, 22 literaturna 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. Anet Režek Jambrak*
Pomoć pri izradi: *doc.dr.sc. Tomislava Vukušić*
Datum obrane: 17. srpnja 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

Department of Food Engineering
Laboratory for Food Processes Engineering

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

THE INFLUENCE OF PROCESSING PROCESS AT STRESS PARAMETERS OF *Escherichia coli*

Daniela Cvitković, 0058204872

Abstract:

The aim of this study is to compare the effect of thermal treatment at different temperatures (20, 30, 40, 50 and 60 ° C) and the length of treatment (5 and 10 minutes) with nonthermal plasma treatment on stress parameters (the degree of reduction and extinction of cellular content) of pure *Escherichia coli* culture with the monitoring of physico-chemical parameters (pH, electrical conductivity and free radical concentration). Through the results of the experiment, a higher degree of inactivity was observed by using cold plasma at lower temperatures in the shortest time compared to longer thermal treatments with the same inactivation effect. Also, by analysis of chemical parameters, the presence of formation of radicals during the treatment was monitored in order to determine the mechanism of inactivation of *Escherichia coli*.

Keywords: Cold plasma, *Escherichia coli,* stress parameter, thermal treatment

Thesis contains: 25 pages, 7 figures, 7 tables, 22 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. Anet Režek Jambrak, Associate Proffesor

Technical support and assistance: Tomislava Vukušić, PhD

Defence date: July 17th 2017

Sadržaj

1. UVOD ... 1
2. TEORIJSKI DIO ... 2
2.1. TOPLINSKI TRETMAN ... 2
2.1.1. Definicija toplinskog tretmana ... 2
2.1.2. Primjena toplinskog tretmana ... 2
2.1.3. Toplinski utjecaj ... 3
2.2. HLADNA PLAZMA ... 4
2.2.1. Definicija plazme ... 4
2.2.2. Generiranje plazme ... 4
2.2.3. Primjena hladne plazme ... 5
2.2.4. Primjeri učinaka hladne plazme ... 5
2.3. *Escherichia coli* ... 6
3. MATERIJALI I METODE ... 8
3.1. MATERIJALI ... 8
3.1.1. Test mikroorganizam ... 8
3.1.2. Hranjive podloge ... 8
3.1.3. Kemikalije ... 8
3.2. METODE ... 9
3.2.1. Priprema uzorka ... 9
3.2.2. Obrada uzoraka toplinskim tretmanom/hladnom plazmom ... 10
3.2.3. Metoda brojenja poraslih kolonija ... 10
3.2.4. Istjecanje staničnog sadržaja ... 11
3.2.5. Određivanje koncentracije slobodnih radikala ... 11
3.2.6. Određivanje pH vrijednosti i provodljivosti ... 11
3.2.7. Obrada ekperimentalnih podataka ... 11
4. REZULTATI I RASPRAVA ... 12
4.1. Utjecaj toplinskog tretmana na inaktivaciju Escherichie coli ... 12
4.2. Utjecaj hladne plazme na inaktivaciju Escherichie coli ... 17
5. ZAKLJUČCI ... 22
6. POPIS LITERATURE ... 23

1. UVOD

Razvojem prehrambene industrije i povećavanjem proizvodnih kapaciteta, danas je više nego ikada neophodan strogi nadzor svih proizvodnih operacija s ciljem dobivanja zdravstveno ispravnih i kvalitetnih prehrambenih proizvoda. Stoga je od presudne važnosti odabrati adekvatne procese konzerviranja hrane s ciljem potpunog uklanjanja potencijalno opasnih mikroorganizama koji narušavaju zdravstvenu ispravnost proizvoda.

Tradicionalne metode konzerviranja se najčešće temelje na termičkoj obradi proizvoda, bilo da se radi o zamrzavanju, hlađenju, sušenju na visokim temperaturama, sterilizaciji, pasterizaciji gdje se često primjenom ekstremnijih temperatura osim uništavanja nekih mikroorganizama narušavaju i nutritivno vrijedni spojevi kao što su vitamini ili pak dolazi do narušavanja senzorskih svojstava proizvoda. Jedna od alternativnih netermičkih metoda konzerviranja je hladna plazma kojom se postiže isti ili čak i bolji konzervirajući učinak od prethodno navedenih metoda i to pri sobnoj temperaturi. U ostale alternativne metode spadaju i gama zrake, beta zrake, UV zrake, ultrazvuk, visoki hidrostatski tlak itd. Zbog krive percepcije potrošača o nekim od alternativnih metoda kao što su beta i gama zračenje, visokih invensticijskih troškova ili pak neadekvatnosti metode za tretiranje namirnica kao što su voće i povrće, upravo je hladna plazma idealan izbor zbog udovoljavanja mnogim zahtjevima (Wang i sur., 2012).

U eksperimentalnom radu je proučavan toplinski utjecaj na inaktivaciju *Escherichie coli* te kombinacija toplinskog i netoplinskog tretmana hladnom plazmom pri temperaturama od 20, 30, 40, 50 i 60℃ s ciljem određivanja mehanizma inaktivacije. Njena prisutnost u procesiranoj hrani je rezultat reinfekcije s obzirom da ove bakterije ne mogu preživjeti konzerviranje hrane (Usajewicz, 2006). Iako je normalni stanovnik probavnog sustava čovjeka i brojnih životinja, ukoliko se unese u organizam hranom, može izazvati različite bolesti. Stoga je izuzetno bitno znati uvjete rasta i ponašanje spomenute bakterije kako bi se odabrali optimalni procesni parametri kojima će se osigurati njena potpuna inaktivacija.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. TOPLINSKI TRETMAN

2.1.1. Definicija toplinskog tretmana

Toplinski tretman je tehnološka operacija kojom se pri određenoj temperaturi u namirnici nastoje uništiti mikroorganizmi koji bi mogli utjecati na zdravlje potrošača ili promijeniti svojstva hrane, deaktivirati aktivnost prisutnih enzima te produljiti vrijeme skladištenja uz dobru kvalitetu namirnice.

Veliki je izazov za prehrambenu industriju riješiti se nepoželjnih mikroorganizama sa namirnica a da pri tome dođe do minimalnih gubitaka nutritivnih tvari u istim prilikom primjene nekog od toplinskih tretmana koji nerijetko izazivaju nepoželjne organoleptičke promjene na termički osjetljivim namirnicama kao što su mlijeko i mliječni proizvodi.

2.1.2. Primjena toplinskog tretmana

Najčešći postupci termičke obrade u prehrambenoj industriji su blanširanje, pasterizacija i sterilizacija. Za utvrđivanje parametara termičkog tretiranja potrebno je prije svega znati koji mikroorganizmi dolaze u obzir kao potencijalni kontaminanti (zagađivači), stoga je važno poznavanje fizikalnih i kemijskih parametara te higijenskih uvjeta proizvodnje i skladištenja. Isto tako je potrebno voditi računa o patogenosti i termorezistentnosti mikroorganizma koji je odlučujući za procjenu učinkovitosti procesa (Lovric, 2003).

Blanširanje je toplinski proces kojem se često podvrgavaju namirnice prije zamrzavanja, sušenja ili konzerviranja s primarnim ciljem inaktivacije enzima koji bi u suprotnom pridonijeli nepoželjnim okusima, promjenama boje ili hranjive vrijednosti tijekom skladištenja. Provodi se provođenjem materijala kroz toplu vodu (eventualno vrelu) ili zasićenu vodenu paru najčešće u trajanju 3-6 minuta (Lovrić, 2003).

Pasterizacija je toplinski proces koji uništava patogene bakterije i vegetativne mikroorganizme ali ne i spore koje su otporne na temperature koje se primjenjuju (75-95°C) (Springer, 2011). S obzirom da primjenom pasterizacije hrana i dalje nije sterilna, pokazalo se da npr. kombinacija pasterizacije i neke druge metode ne samo da ima aditivni ili konzervirajući učinak na namirnicu već pokazuje sinergističko djelovanje. Isto tako,

djelotvornije je koristiti različite konzervanse u malim količinama nego samo jedan u velikoj količini zbog toga što različiti konzervansi utječu na različite ciljane dijelove unutar bakterijske stanice, djelujući sinergistički (Gould, 1995). Mnoge namirnice kao što su jaja, mlijeko, sokovi i začini se pasteriziraju, a parametri kao što su vrijeme i temperatura se reguliraju ovisno o patogenim mikroorganizmima koji se uklanjaju. Tekuće namirnice se obavezno brzo hlade na niske temperature upravo iz već spomenutog razloga a to je konzervirajući učinak.

Sterilizacija je toplinski proces koji se odnosi na postizanje stanja u namirnici u kojoj nema prisutnih mikroorganizama koji su sposobni za reprodukciju a provodi se na 121,1 °C. Stoga se sterilizacija kao termin koristi kod postizanja sterilnih uvjeta primjenom bilo kojeg procesa (Lund, 1988). Ogrijevni medij je voda, vodena para ili suhi zrak. Sterilizaciji se najčešće podvrgavaju namirnice u hermetički zatvorenoj ambalaži te imaju veoma dugu, gotovo neograničenu trajnost.

2.1.3. Toplinski utjecaj

Posljednjih desetljeća je kinetika stanične smrti mikroorganizama kao posljedica toplinskog utjecaja vrlo dobro razrađena te je posve jasno da postoje velika odstupanja od njene linearnosti. Naime, toplina oštećuje različite stanične strukture, uključujući staničnu membranu, ribosome, DNA, RNA i enzime. Neka od ovih staničnih oštećenja mogu biti popravljena tako da je toplinski utjecaj balans između jačine oštećenja te sposobnosti oporavka stanice (Gould, 1995). Što se tiče enzima, prehrambenoj industriji u globalu ne predstavljaju probleme jer toplinski tretmani kojima se uklanjaju ciljani mikroorganizmi prekoračuju temperature potrebne za inaktivaciju enzima.

2.2. HLADNA PLAZMA

2.2.1. Definicija plazme

Plazma, definirana kao ionizirani kvazi-neutralni plin, je četvrto stanje materije koje se može generirati primjenom električnog polja na početno električki neutralni plin (Gaunt i sur., 2006; Wan i sur., 2009). Sastoji se velikog broja različitih vrsta kao što su elektroni, pozitivni i negativni ioni, slobodni radikali itd. Budući da je plazma izvor reaktivnih spojeva kisika, mnogim studijama je dokazano da su upravo ti spojevi najodgovorniji za inaktivaciju mikroorganizama (Hähnel i sur., 2010; Lee i sur., 2006). Tijekom primjene plazme, mikroorganizmi su izloženi intenzivnom bombardiranju radikalima koji najvjerojatnije izazivaju površinske lezije koje žive stanice ne mogu popraviti dovoljno brzo te dolazi do akumulacije naboja koja daje elektrostatsku silu na vanjskoj površini staničnih membrana, što može uzrokovati puknuće staničnih zidova nazvanih kao elektropermeabilizacija a ima isti princip koji se pojavljuje u pulsnim električnim poljima (Thirumdas i sur., 2014).

2.2.2. Generiranje plazme

Uređaji za generiranje plazme koji se koriste za sterilizaciju i dezinfekciju uključuju udaljene odnosno neizravne plazma mlaznice, izravne izvore plazme, kao i hibridne uređaje. Izravni tretman dovodi nabijene energetske čestice u dodir s tretiranim uzorkom/bakterijama i opaža se brže uništenje bakterija (Prochnow i sur., 2014). Prije su tretmani plazmom provođeni u vakuumskim uvjetima ali znanstvenici su sada razvili plazma sustav atmosferskog tlaka što je rezultiralo smanjenim troškovima, bržom provedbom tretmana i industrijskom primjenjivosti (Yoon i Ryu, 2007; Yun i sur., 2010). Plazma jet se koristi kao poseban oblik generiranja plazme gdje je atmosferski mlaz sa tri elektrode izvor plazme a operativni plin je argon. Sastavljen je od teflonskog kućišta na koji je pričvršćena staklena kapilarna cjevčica dužine 7,5 cm, unutarnjeg promjera 0,1 cm, vanjskog promjera 0,15 cm. Unutar cjevčice je smještena bakrena cjevčica promjera 100 μm koja je pričvršćena na izvor visokog napona preko vakuum čvrste spojnice. Izvor od 6 W daje 2,5 kV pri frekvenciji od 25 kHz-a. Realna struja iznosi 3 mA, a realna snaga plazme iznosi 4 W. Na cjevčicu je također spojen izvor argona čiji se protok regulira rotametrom. Unutarnja elektroda ubrzava slobodne elektrone koji se sudaraju sa dovodnim plinom tako producirajući pobuđena molekulska stanja, atome, slobodne radikale i dr. Izlaskom plina, ioni i elektroni se brzo rekombiniraju dok su neutralne metastabilne vrste i radikali i dalje prisutni (Nehra i sur., 2008). Sposobnost netoplinskog

plazma pražnjenja pri atmosferskom tlaku olakšava i pojeftinjuje proces dekontaminacije (Kim i sur., 2011).

2.2.3. Primjena hladne plazme

Zbog svojih svojstava, koristi se u raznim područjima: elektronika, tekstilna industrija, aeronautika, u biomedicinskom sektoru, tehnologija plazme je odličan izbor za sterilizaciju instrumenata i proteza te mnogih drugih termolabilnih materijala. Primjenjuje se kao alat za čišćenje površina tretiranih dezinfekcijskim kemikalijama koje su nanešene na medicinske uređaje izrađene od plastike koja je osjetiljiva na toplinu. Posljednjih godina istraživačkim aktivnostima su se otkrile višestruke primjene hladne plazme u prehrambenoj industriji, npr. za površinsku dekontaminaciju sirove hrane, orašastih plodova te ambalažnog materijala (Misra i sur., 2011). Ogromno obećanje ove netermičke tehnologije proizlazi iz toga što je ekološki prihvatljiva, fleksibilna i štedi energiju.

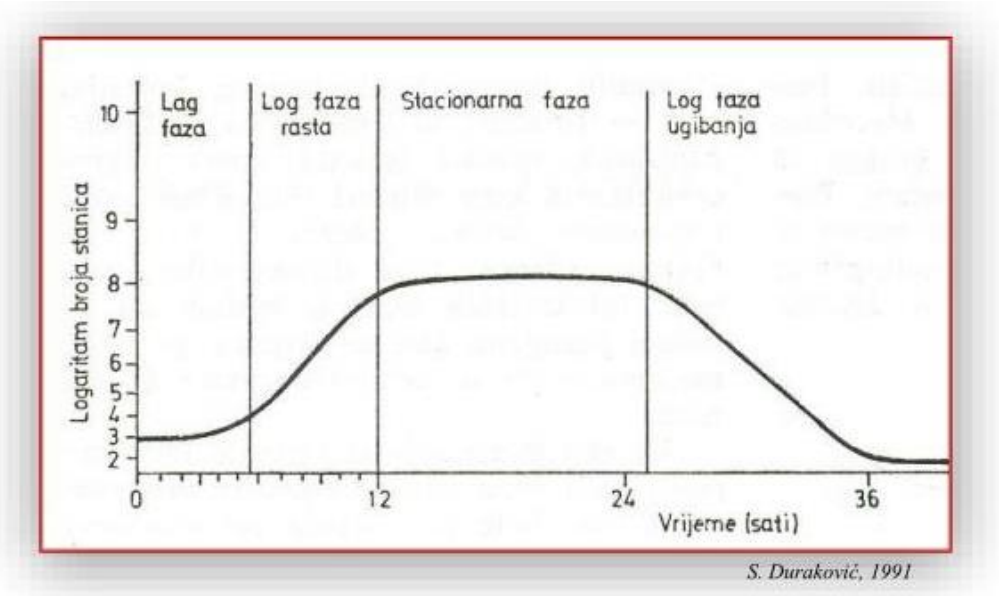
2.2.4. Primjeri učinaka hladne plazme

Glavna razlika u plazma izvorima je u napajanju, dizajnu elektrode te izboru plina. Učinkovitost mikrobiološke inaktivacije ovisi o površini tretirane namirnice, plazma uređaju, sastavu plina te njegovom načinu izlaganja. Gurol i sur. su tretirali sirovo mlijeko niskotemperaturnom plazmom kako bi uništili *Escherichiu coli* te su nakon tri minute tretmana primijetili 54%-tnu redukciju. Eksperimentalni rezultati nekoliko autora sugeriraju da učinkovitost hladne plazme nad određenim mikroorganizmom ovisi o tretiranoj površini. Na primjer, uništenje *Listeria monocytogenes* bilo je puno veće u rezanom siru u usporedbi s rezanom šunkom (8 log redukcije pri 150 W i 120 s kod sira, a kod šunke 0,25 do 1,73 CFU/g pri istim uvjetima) (Thirumdas i sur., 2014). Isto tako, povrće i voće kao što su krumpiri i jagode trebaju više vremena za potpuno uništavanje mikroba zbog postojanja udubina i neravnih površina. Surowsky i suradnici su dokazali da je nakon izlaganja plazmi soka od jabuke pri 480 sekundi te smjesi plina argona i 0,1% kisika došlo do 6 logova redukcije *Citrobacter freundii* uz naknadno vrijeme skladištenja od 24 h.

2.3. *Escherichia coli*

Escherichia coli je vrlo važan rod enterobakterija ili crijevnih bakterija koje spadaju u heterogenu skupinu gram-negativnih bakterija te se nastanjuju u probavnom sustavu ljudi i životinja. Fakultativni je anaerob što znači da ne koriste kisik ali u njegovoj prisutnosti bolje rastu. Njezina prisutnost u vodi i hrani također je važna, jer je pouzdan pokazatelj fekalnog onečišćenja. Najčešće se *E.coli* ne smatra patogenim mikroorganizmom. Međutim, ona može uzrokovati infekcije mokraćnih puteva, a određeni sojevi proizvode enterotoksine koji uzrokuju dijareju (Durakoviċ, 1996).

Escherichia coli sa optimalnom temperaturom rasta između 20°C i 40°C spada u mezofilne mikroorganizme, a većini patogenih mikroorganizama je optimalna temperatura rasta oko 37°C baš kao i tjelesna temperatura ljudskog organizma te mogu brzo rasti i uspostaviti infekciju unutar ljudskog tijela. Analogno tome se, u pravilu, kvarenje kratkotrajnih proizvoda uskladištenih u temperaturnom rasponu rasta mezofila, zbiva puno brže nego u hladnim uvjetima (Durakovic L. i Durakovic S., 2001).



Slika 1. Prikaz faza rasta bakterija (Durakovic, 1991).

Kao što prikazuje krivulja, bakterijski životni ciklus je podijeljen u 4 faze: lag, log, stacionarna te faza odumiranja. Lag-fazu karakterizira prilagodba bakterija na medij; rast stanica, sinteza proteina potrebnih za rast te popravak oštećenih stanica ali broj bakterijskih stanica ostaje nepromjenjiv. U log fazi dolazi do eksponencijalnog porasta broja stanica, stanice pokazuju konstantnu stopu rasta i jedinstvenu metaboličku aktivnost ali su isto tako tada najosjetljivije na vanjske utjecaje. U stacionarnoj fazi dolazi do usporavanja stope rasta budući da dolazi do akumulacije otpadnih tvari, hranjive tvari se iskorištavaju a rezultat toga je stagnacija; broj novostvorenih stanica je ekvivalentan broju umirućih stanica. Fazu odumiranja karakterizira eksponencijalno smanjenje broja stanica, a kao posljedica lize stanica se oslobađa velika količina hranjivih tvari u medij (Parker i sur., 2016).

Valja naglasiti da na svaku od navedenih faza direktan utjecaj ima temperatura, pH, aktivitet vode, prisutnost i koncentracija određenih plinova, osmotski tlak, prisutnost drugih mikroorganizama.

Bakterije su tokom svog života često podvrgnute velikom spektru različitih uvjeta, koji se vrlo brzo mijenjaju stoga posjeduju vrlo važan globalni regulator RpoS te σ^s podjedinicu koji imaju presudnu ulogu u staničnom odgovoru na stres. Većina do sad poznatih gena, njih više od 70 koji su pod kontrolom ove podjedinice, povezani su s rezistencijom na oksidativni stres, UV-zračenje, visoku temperaturu, visoki osmotski tlak, kiseli pH, etanol i druge stresne uvjete (Bačun-Družina i sur., 2011). Ovi geni mogu povećati vjerojatnost opstanka bakterijske populacije u izrazito stresnim uvjetima na način da žrtvuje dio populacije da bi osigurala hranjive sastojke za ostatak, iz primarnog razloga smanjenja negativnog utjecaja stresa na njihov opstanak.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

PRIMJER na *Escherichia coli* MG1655

3.1.1. Test mikroorganizam

Proučavana je inaktivacija bakterije *Escherichia coli* MG1655 koja je pribavljena iz banke mikrobioloških kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta (Zagreb, Hrvatska). *Escherichia coli MG1655* čuva se pri +4°C na Nutrient agaru (Biolife, Milan, Italija). Kako bi se kultura očuvala precjepljivala se svaka 2 tjedna na pripremljeni agar. Agar se pripremao prema uputama proizvođača.

3.1.2. Hranjive podloge

Hranjivi agar

SASTAV: 8 g dehidrirane podloge, 1 L destilirane vode, 12 g agara.

PRIPREMA: Za 1 L hranjivog agra (Biolife, Milan, Italija) odvagalo se 8 g dehidrirane podloge. Dehidrirana podloga otopila se u destiliranoj vodi. Kako bi se podloga održala u čvrstoj fazi pri temperaturi inkubacije od 30-37 °C u 1 L pripremljene podloge dodalo se približno 12 g agara na 1 L podloge. Podloga se sterilizirala u autoklavu ("Sutjeska", model 200-189) 15 min pri 121°C. Podloge su sterilno razlivene u pripremljene Petrijeve zdjelice u laminaru (Klimaoprema, model KTV-A) u struji zraka i uz otvoren plamenik, kako ne bi došlo do naknadne kontaminacije sterilizirane tekuće podloge. Razlivene podloge uz poluotvorene poklopce sušile su se u struji zraka u laminaru. Pripremljeni hranjivi agar čuvao se pri +4 °C kroz 3 mjeseca. Hranjivi agar služi za pripremu i uzgoj čistih kultura odabranih mikroorganizama.

3.1.3. Kemikalije

Indikator listić (Quantofix Peroxyde 25, Macherey-Nagel Germany)

PBS-fosfatni pufer

SASTAV: natrijev klorid (NaCl), kalijev klorid (KCl), natrijev hidrogenfosfat dihidrat (Na_2HPO_4 x $2H_2O$), kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), destilirana voda, klorovodična kiselina (HCl).

PRIPREMA: Izvagalo se 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,62 g Na_2HPO_4 x $2H_2O$ i 0,24 g KH_2PO_4 u 900 mL destilirane vode. Sa HCl se podesio pH na 7,4 te se nadopunio do 1000 mL destiliranom vodom. Pripremljena otopina autoklavirala se pri 121°C kroz 15 min. Autoklavirana otopina čuva se pri +4°C kroz 3 mjeseca.

Titan reagens

SASTAV: titan (IV) oksid, sumporna kiselina (1:1), destilirana voda

PRIPREMA: Titan test reagens se izradio otapanjem 1 g titanij praha tj. titan (IV) oksida (Sigma Aldrich, CAS: 13463-67-7) u 100 mL vruće sumporne kiseline (1:1). Reakcijska smjesa se zatim zagrijavala na oko 190°C i miješala kroz 20h. Titanij je otopljen kada inicijalno bijela otopina postane prozirna (može se dodati destilirane vode tijekom zagrijavanja ako se uoči značajan gubitak vode). Nakon što se sav titanij otopio, reagens otopina se hladila na sobnu temperaturu i razrijedila na volumen od 500 mL destiliranom vodom. Reagens otopina se zatim skladištila na hladnom mjestu.

3.2. METODE

3.2.1. Priprema uzorka

Volumen 10 µL suspenzije mikrobne kulture *Escherichia coli* MG1655, pripremljene u 50% glicerola i čuvane pri temperaturi od -20°C, precijepilo se aseptično u struji zraka u laminaru (Klimaoprema, model KTV-A) u 10 mL nutrient bujona. Da bi se postigao očekivani rast mikrobne kulture, plastična epruveta s nacijepljenim bujonom inkubirala se u termostatu ("Bodalec i Bodalec", model EBT) pri 37°C/24h. Nakon 24h mikrobna kultura je centrifugirana (Hettich, Rotofix 32) pri 10000 RPM/10 min. Nakon centrifugiranja supernatant je odliven, a na biomasu bakterije je nadodan sterilni fosfatni pufer (10 mL). Uzorak se protresao na vorteksu (IKA, Vortex 4 basic; BV) te se postupak odlijevanja sterilnog fosfatnog pufera/destilirane vode, centrifugiranja i ponovnog vorteksiranja ponavljao 3x. Volumen od 10 mL uzorka se prije tretmana miješao sa 190 mL destilirane vode kojoj se električna provodljivost prethodno namjestila na 100 ili 800 µS cm^{-1}. Ona je postignuta postepenim dodavanjem natrijevog nitrata do očitanja željene električne provodljivosti na direktno uronjenom konduktometru.

3.2.2. Obrada uzoraka toplinskim tretmanom/hladnom plazmom

Kako bi se inkubirala bakterijska kultura *Escherichia coli* na točno određenoj temperaturi, koristila se vodena kupelj. Volumen od 10 mL uzorka (suspenzija mikrobne kulture u PBS-u) je dodan u prethodno pripremljenu smjesu destilirane vode i natrijevog nitrata nakon postizanja željene temperature. Laboratorijska čaša s uzorkom se držala u vodenoj kupelji željeno vrijeme (5 ili 10 minuta za svaku temperaturu) te se nakon postizanja potrebnih uvjeta izuzelo 3 mL uzorka kao bi se provele analize opisane u daljnjim metodama. Kod tretmana hladnom plazmom se provodi isti postupak sa zagrijavanjem te se zatim tri izvora plazme urone u čašu s uzorkom do otprilike polovice dubine. Prije uranjanja propušten je plin (argon) zbog mogućnosti začepljenja kapilara, a tek zatim počinje tretman plinskom plazmom kroz kapilare uronjene u tekućinu. Tretirano je 15 uzoraka s dva varijabilna parametra. Vrijeme tretiranja bilo je 5 i 10 min., uz protok 80 L/h i temperaturu uzorka 20, 30, 40, 50 i 60°C. Kao poseban oblik generiranja plazme analizama je obuhvaćeno tretiranje uzoraka „plasmom jet" a kao izvor plazme je korišten atmosferski mlaz s tri elektrode, End-field mlazni tip (Law i sur., 2012). Kao operativni plin je korišten argon čistoće 99,99%.

3.2.3. Metoda brojenja poraslih kolonija

Početni broj nacijepio se u seriji decimalnih razrjeđenja (do 10^{-6}) i to u omjeru 1:9 (uzorak:PBS). Svaki uzorak nacijepio se u triplikatu. Uzorci su nacijepljeni prije i nakon tretiranja na Nutrient agar. Nacijepljene ploče inkubirale su se pri 37 °C kroz 24 h. Nakon nacjepljivanja i brojanja poraslih kolonija odredio se broj živih stanica nakon 24 h prema formuli:

$$CFU = \frac{broj\ poraslih\ kolonija}{upotrebljeni\ volumen\ uzorka} \times recipročna\ vrijednost\ decimalnog\ razrjeđenja$$

Broj kolonija odredio se prema gore navedenoj formuli (1) gdje su se u obzir uzele samo one ploče koje su imale broj poraslih kolonija od 30 - 300 (Reynolds, 2011).

3.2.4. Istjecanje staničnog sadržaja

Na svakom uzorku izuzetom prije i tijekom tretiranja (5 i 10 min) utvrdilo se istjecanje staničnog sadržaja soja *E. coli* MG1655. Alikvot od 3 mL stanične kulture izložene djelovanju hladne plazme i toplinskom tretmanu filtrirao se kroz CHROMAFIL Xtra PTFE-20/25 filtar (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Duren, Germany) sa 0,25 µm veličinom pora. U dobivenom filtratu bez stanica utvrdila se prisutnost nukleinskih kiselina i proteina mjerenjem apsorbancije pri 260 nm i 280 nm (Prieto-Calvo i sur., 2014).

3.2.5. Određivanje koncentracije slobodnih radikala

Nakon tretmana plazmom odredila se koncentracija vodikovog peroksida u uzorku i to UV-Vis spektroskopijom pri 410 nm. 1 mL pripremljenog titan reagensa (Sigma Aldrich, CAS: 13463-67-7) pomiješao se sa 2 mL uzorka te se preko izrađenog baždarnog pravca očitala koncentracija vodikovog peroksida.

3.2.6. Određivanje pH vrijednosti i provodljivosti

Mjerenje pH-vrijednosti i provodljivosti provodilo se na digitalnom pH-metru (pH 340i/SET, WTW, Weilheim, Germany) nakon desetominutnog tretmana slijepe probe.

3.2.7. Obrada ekperimentalnih podataka

Kako bi se odredio utjecaj raznih parametara na učinkovitost tretmana korišteni su centralni složeni dizajn (central composite design, CCD; STATGRAPHICS Centurion, StatPoint Technologies) i površinski centrirani model (Kuehl, 2000). Kao operativni parametri za CCD odabrani su vrijeme tretmana te temperatura uzorka. Provedena je analiza varijance (ANOVA) kako bi se mogla utvrditi odstupanja ($p<0,05$) u provedenim tretmanima. Operativne varijable su promatrane na 3 nivoa tj. niskom (-1), centralnom (0) i visokom (1). Izlazne vrijednosti su $\log_{10}$ CFU/mL te apsorbancija pri 260 i 280 nm. Točnost kvadratnog empirijskog modela provjerena je analizom varijance (ANOVA) s razinom pouzdanosti od 95%.

4. REZULTATI I RASPRAVA

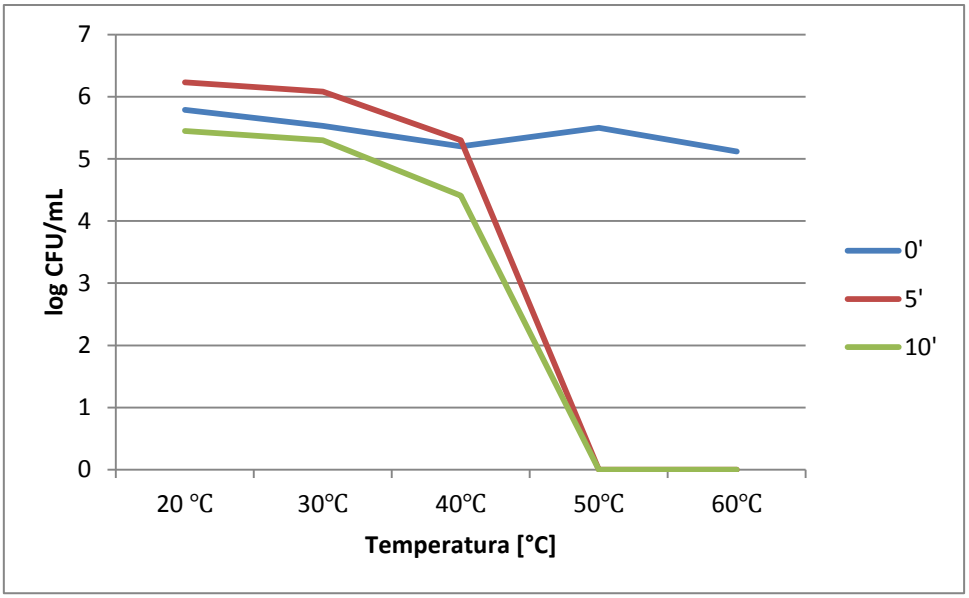
4.1. Utjecaj toplinskog tretmana na inaktivaciju *Escherichie coli*

Tablica 1. Parametri toplinskog tretmana i rezultati inaktivacije

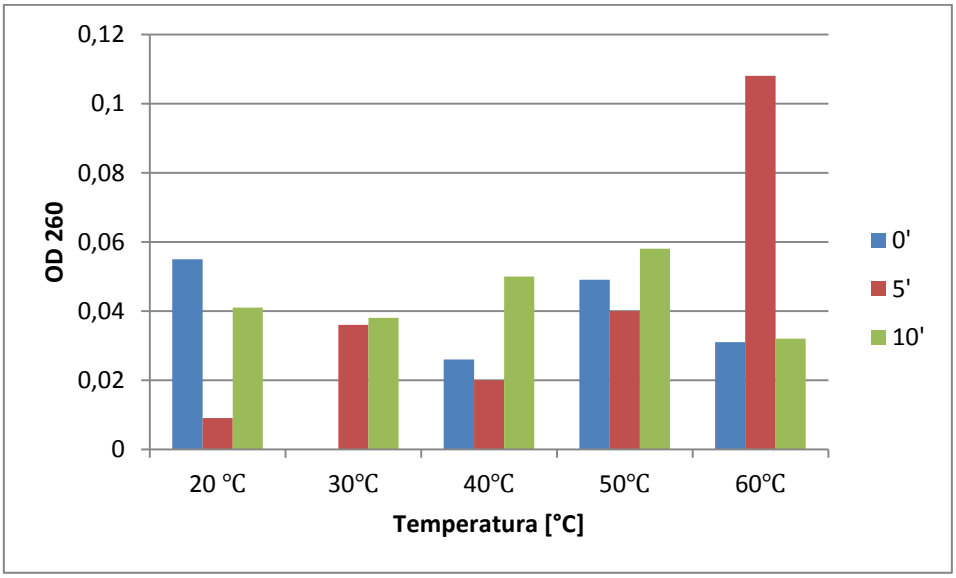
Uzorak	Vrijeme [min]	Temperatura [°C]	log CFU/mL
1	0	20	5,79
2	5	20	6,23
3	10	20	5,45
4	0	30	5,53
5	5	30	6,08
6	10	30	5,30
7	0	40	5,20
8	5	40	5,30
9	10	40	4,41
10	0	50	5,50
11	5	50	<1
12	10	50	<1
13	0	60	5,12
14	5	60	<1
15	10	60	<1

Tablica 2. Očitane vrijednosti električne provodljivosti i pH mjerene nakon 10 minuta tretmana slijepe probe

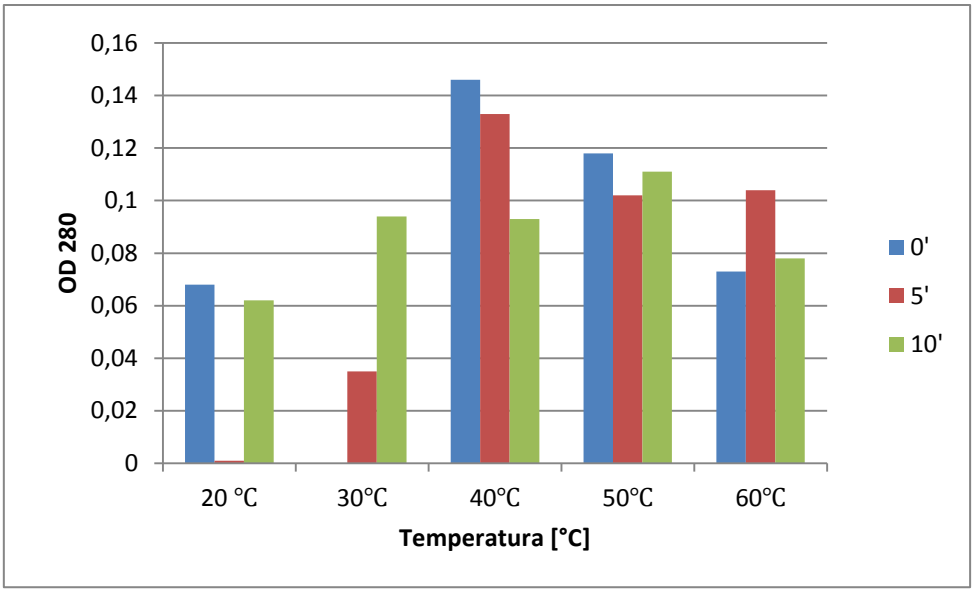
Temperatura [°C]	20	30	40	50	60
Električna provodljivost [µS/cm]	949	1005	993	1260	1724
pH	7,49	7,83	6,47	6,46	6,64



Slika 2. Ovisnost log CFU/mL o temperaturi pri 0, 5 i 10 min tretmana



Slika 3. Ovisnost istjecanja staničnog sadržaja o temperaturi pri 0, 5 i 10 min tretmana



Slika 4. Ovisnost istjecanja staničnog sadržaja o temperaturi pri 0, 5 i 10 min tretmana

Tablica 3. Analiza varijance poraslih kolonija

Izvor	*Zbroj kvadrata*	*Df*	*Srednja vrijednost kvadrata*	*F-omjer*	*P-vrijednost*
GLAVNI UČINCI					
A:temperatura	1,70344E12	4	4,25861E11	3,18	0,0769
B:vrijeme tretiranja	7,08522E11	2	3,54261E11	2,64	0,1314
OSTATAK	1,07202E12	8	1,34003E11		
UKUPNO (ISPRAVLJENO)	3,48399E12	14			

Tablica 3 pokazuje da niti jedan od čimbenika (temperatura i vrijeme tretiranja) nema statistički značajan učinak na kolonije porasle na razini pouzdanosti od 95,0% budući da nema p-vrijednosti niže od 0,05.

Na slikama 3 i 4 iz rezultata optičke gustoće određenim pri valnim duljinama 260 i 280 nm kod 20°C vidljive su puno veće vrijednosti apsorbancije netretiranog uzorka u odnosu na uzorak nakon petominutnog tretmana gdje je došlo do pada apsorbancije jer su bakterije ušle u fazu raspadanja, najvjerojatnije iz tog razloga što je bakterijska kultura bila inkubirana 2 dana tako da su bakterijske stanice već bile u stacionarnoj fazi. Nakon 10 minuta tretmana je vrijednost apsorbancije porasla radi regeneracije nekih bakterijskih stanica.

Temperature toplinskog tretmana pri 20 i 30°C nisu dovele do inaktivacije *Escherichie coli* MG1655 budući da je njen enzimski sustav optimalne aktivnosti pri T od 37°C (Durakovic, 1996). Kod optimalne aktivnosti su enzimi najaktivniji, odnosno imaju maksimalnu aktivnost uz određene supstrate. Valja naglasiti da se porastom temperature povećava i toplinska energija odnosno kinetička energija što onda rezultira većom brzinom enzimskih reakcija a za svakih 10°C se brzina reakcije povećava dva puta. S druge strane, s porastom kinetičke energije raste intenzitet titranja atoma unutar molekula enzima, pa uslijed pojačanog titranja dolazi do kidanja nekovalentnih veza koje stabiliziraju nativne konformacije enzima (grupe izlaze iz radijusa veza) tj. do denaturacije enzima. Pad koncentracije aktivnog enzima rezultira smanjenjem brzine reakcije (Lehninger, 1976). Dakle, udaljavanjem od optimalne temperature (sniženjem ili povišenjem), aktivnost enzima se smanjuje te samim time i brzina rasta stanica bakterija i njihova dioba.

S obzirom da je korištena bakterijska kultura mezofilnog karaktera, na temperaturi od 40°C kod tretmana od 10 minuta se može vidjeti da je došlo do laganog povećanja CFU/mL u odnosu na netretirani uzorak, tj. došlo je do rasta stanica *Escherichie coli* nakon najduljeg tretmana (10 min) jer je upravo navedena temperatura najbliža optimalnoj za njihov rast. Pri mjerenjima optičke gustoće kod 280 nm dolazi do porasta apsorbancije u filtratu uzorka, što znači da je pri toj temperaturi došlo do istjecanja unutarstaničnog sadržaja, u ovom slučaju proteina.

Kod toplinskog tretmana pri temperaturi od 50°C i trajanju tretmana od 5 min su uspješno uništene sve bakterijske stanice *Escherichie coli* (slika 2), stoga se može zaključiti da su upravo to optimalni parametri toplinskog tretmana.

Pri mjerenjima optičke gustoće kod 260 nm došlo je do najvećeg istjecanja staničnog sadržaja pri 60°C, tj. u filtratu je bila najveća koncentracija nukleinskih kiselina koje su nakon staničnog razaranja pod utjecajem topline difundirale u okolnu otopinu i izašle iz stanica.

Stringer i sur. su u svojem radu naveli bitne faktore koji utječu na otpornost *Escherichie coli* prilikom toplinske inaktivacije. Neki od njih su: faza rasta stanica, sastav, pH i aw-aktivnost medija u kojem raste kultura, vrijeme koje je proteklo od uzgoja kulture do termičke obrade, sustav grijanja (otvoreni ili zatvoreni), soj i mnogi drugi. Otpornost na toplinu bila je veća kada su stanice bile u stacionarnoj fazi rasta nego u log fazi rasta (Todd i sur. 1993;Jackson i sur. 1996; Kaur i sur. 1998). Isto tako, vrlo važna je spoznaja da toplinski šok povećava otpornost na toplinu (Stringer i sur., 2000) što opravdava veći broj poraslih kolonija nakon petominutnog toplinskog tretmana u odnosu na početak tretmana (0 min) kod 20, 30 i 40°C.

Kao što to prikazuje tablica 2, električna provodljivost raste proporcionalno porastom temperature; pri 20°C iznosila je 949 µS/cm dok je pri 60°C porasla na 1724 µS/cm. pH-vrijednost se smanjila na 60°C za 0,8 jedinica u odnosu na 20°C.

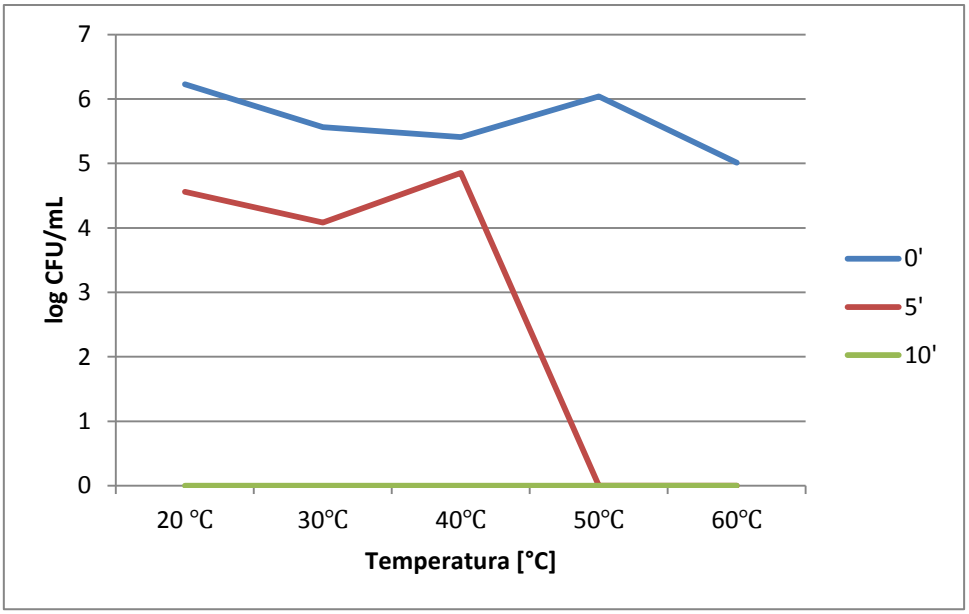
4.2. Utjecaj hladne plazme na inaktivaciju *Escherichie coli*

Tablica 4. Parametri hladne plazme i rezultati inaktivacije

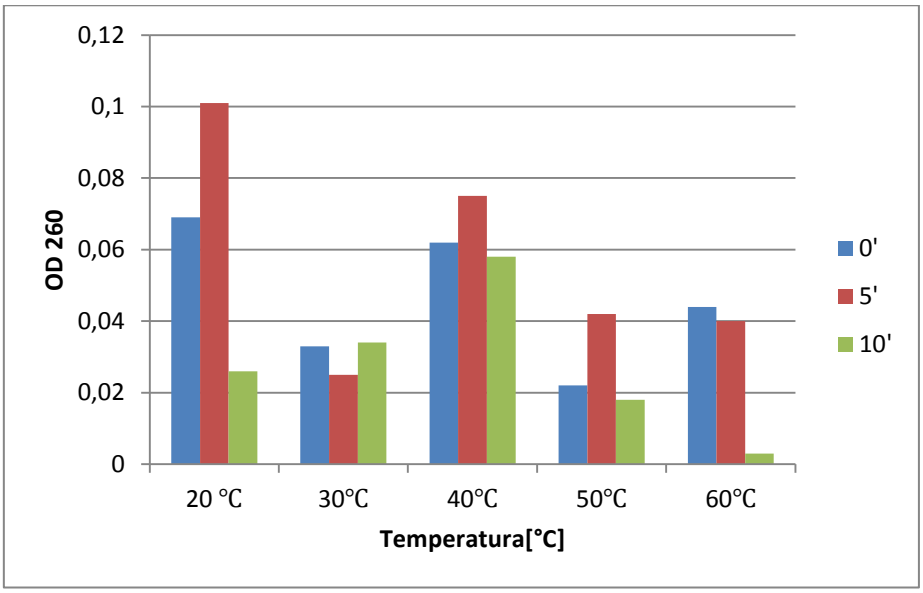
Uzorak	Vrijeme [min]	Temperatura [°C]	log CFU/mL
1	0	20	6,23
2	5	20	4,56
3	10	20	<1
4	0	30	5,56
5	5	30	4,08
6	10	30	<1
7	0	40	5,41
8	5	40	4,85
9	10	40	<1
10	0	50	6,04
11	5	50	<1
12	10	50	<1
13	0	60	5,01
14	5	60	<1
15	10	60	<1

Tablica 5. Očitane vrijednosti električne provodljivosti i pH mjerene nakon 10 minuta tretmana slijepe probe

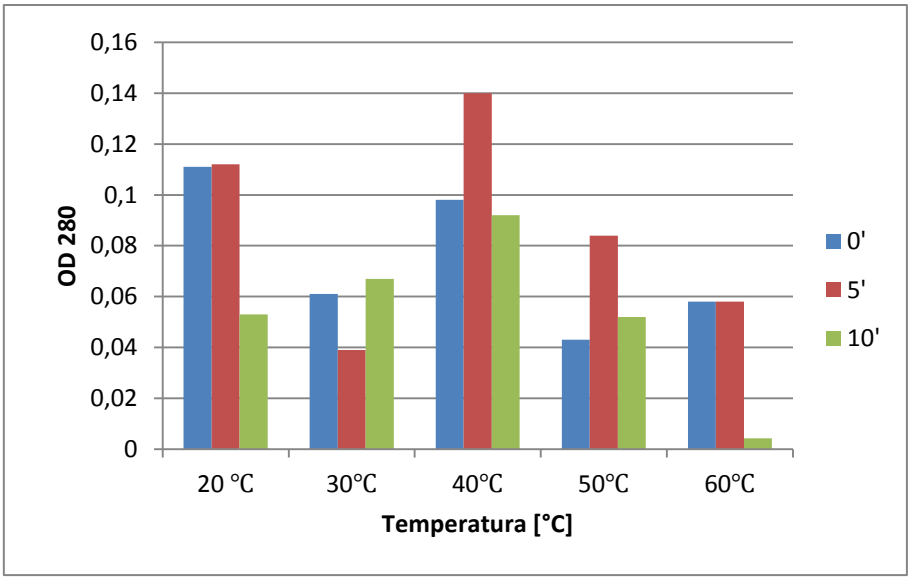
Temperatura [°C]	20	30	40	50	60
Električna provodljivost [µS/cm]	1163	1805	1535	1524	1743
pH	6,50	6,70	6,63	6,50	6,56



Slika 5. Ovisnost log CFU/mL o temperaturi pri 0, 5 i 10 min tretmana



Slika 6. Ovisnost istjecanja staničnog sadržaja o temperaturi pri 0, 5 i 10 min tretmana



Slika 7. Ovisnost istjecanja staničnog sadržaja o temperaturi pri 0, 5 i 10 min tretmana

Tablica 6. Prikaz određene koncentracije slobodnih radikala nakon tretiranja uzoraka hladnom plazmom

c (H2O2)(mg/L)	**20 °C**	**30°C**	**40°C**	**50°C**	**60°C**
0'	5,74	6,57	5,91	5,83	7,48
5'	9,05	8,39	8,39	10,37	9,38
10'	10,95	11,2	11,69	13,26	13,43

Tablica 7. Analiza varijance poraslih kolonija

Izvor	*Zbroj kvadrata*	*Df*	*Srednja vrijednost kvadrata*	*F-omjer*	*P-vrijednost*
GLAVNI UČINCI					
A:temperatura	6,55579E11	4	1,63895E11	1,00	0,4592
B:vrijeme tretiranja	1,50714E12	2	7,53572E11	4,62	0,0465
OSTATAK	1,30599E12	8	1,63249E11		
UKUPNO (ISPRAVLJENO)	3,46871E12	14			

Tablica 7 pokazuje da vrijeme tretiranja kao jedan od čimbenika ima statistički značajan učinak na porasle kolonije na razini pouzdanosti od 95,0% budući da je jedna p-vrijednost manja od 0,05.

Već pri 20°C prilikom primjene hladne plazme je došlo do 6,23 log redukcije u odnosu na toplinski tretman pri istoj temperaturi gdje je log redukcije iznosio svega 0,34, što je i logično s obzirom da ta temperatura nije optimalna za rast korištene kulture te su pri toj temperaturi stanice *E.coli* u lag fazi rasta u kojoj se prilagođavaju na nove uvjete te dolazi do blagog smanjenja njihovog broja. Isto tako se primjenom tretmana hladnom plazmom prilikom određivanja apsorbancije filtrata uzorka bez stanica na 260 nm i 280 nm utvrdila prisutnost nukleinskih kiselina i proteina, najvjerojatnije zbog stresnih uvjeta za kulturu.

Na grafikonima (slika 6 i slika 7) se može vidjeti da do najvećeg istjecanja dolazi na 20°C i 40°C. Na 20°C je vjerojatno razlog prisutnost radikala kao novih stresnih čimbenika i temperaturnog šoka, budući da ta temperatura nije optimalna za rast stanica *Escherichie coli.* Na 40°C koja je približna optimalnoj dolazi do velikog istjecanja jer se stanice nalaze u fazi diobe te sintetiziraju veliku količinu proteina (Polymenis i Aramayo, 2015).

Cho i sur. su u svojoj studiji dokazali izravnu korelaciju između [OH] i brzine inaktivacije *Escherichie coli*, što ukazuje na to da je OH radikal primarna oksidirajuća vrsta odgovorna za inaktivaciju *Escherichie coli* prilikom TiO_2 fotokatalitičke dezinfekcije, tj. dokazano je da OH ima biocidnu aktivnost. Tablica 6 prikazuje da višom temperaturom i duljim tretmanom uzoraka hladnom plazmom proporcionalno raste koncentracija slobodnih radikala u uzorku te se može zaključiti da je upravo njihova prisutnost zaslužna da se pri nižim temperaturama postigne inaktivacija dok kod primjene isključivo toplinskog tretmana to nije slučaj. Potencijalna primjena plazme radi inaktivacije temelji se na činjenici da plazmini reaktivni spojevi oštećuju DNA u kromosomima. Reaktivne vrste reagiraju s vodom, što dovodi do stvaranja OH* iona koji su najreaktivniji i štetni za stanice. Valja istaknuti da su OH* radikali najvažniji jer formirani u hidratacijskom sloju oko DNA molekule izazivaju 90% oštećenja DNA (Thirumdas i sur., 2014).

Može se za zaključiti da su optimalni parametri kojim su uspješno uništene stanice čiste bakterijske kulture temperatura od 20°C i vrijeme trajanja tretmana hladnom plazmom od 10 min pri čemu je došlo do 6,23 log redukcije bez obzira što je na višim temperaturama kod

kraćeg trajanja tretmana došlo do njihovog porasta, bitno je uočiti da je upravo duljina trajanja tretmana presudna (kao što je to pokazala i statitička analiza), stoga se i pri sobnoj temperaturi, a ukoliko je uzorak dovoljno dugo tretiran hladnom plazmom, mogu uništiti sve prisutne bakterijske stanice u njemu.

Tablica 5 prikazuje da (kao i slučaju toplinskog tretmana) električna provodljivost raste proporcionalno porastom temperature; pri 20°C iznosila je 1163 µS/cm dok je pri 60°C porasla na 1743 µS/cm. pH-vrijednost je porasla na 60°C za 0,06 jedinica u odnosu na 20°C i kao što je vidljivo, pri svim temperaturama je približno iste vrijednosti.

5. ZAKLJUČCI

1. Do potpune redukcije bakterijskih stanica *Escherichie coli* kod toplinskog tretmana je došlo pri temperaturi od 50°C i trajanju tretmana od 5 min (5,50 $\log_{10}$ CFU/mL).
2. Tretman hladnom plazmom je u odnosu na toplinski tretman pokazao puno veću učinkovitost kod kojeg je već pri 20°C nakon 10 minuta tretmana došlo do 6,23 log redukcije.
3. Kod toplinskog tretmana niti jedan od čimbenika (temperatura i vrijeme tretiranja) nema statistički značajan učinak na kolonije porasle na razini pouzdanosti od 95,0% budući da nema p-vrijednosti niže od 0,05 dok je kod hladne plazme dokazano vrijeme tretiranja kao čimbenik sa statistički značajnim učinkom.
4. Mjerenjem optičke gustoće nakon toplinskog tretmana kod 260 nm došlo je do najvećeg istjecanja staničnog sadržaja pri 60˚C, dok je mjerenjem iste kod 280 nm došlo pri 40˚C. U slučaju hladne plazme, do najvećeg istjecanja staničnog sadržaja dolazi pri temperaturama od 20°C i 40°C.
5. Zahvaljujući prisutnosti slobodnih radikala čija koncentracija raste proporcionalno duljini tretmana, postiže se inaktivacija mikroorganizama pri nižim temperaturama tj. postiže se sterilizacijski učinak, što čini hladnu plazmu vrlo inovativnom i odličnom zamjenom za termičke metode konzerviranja.

6. POPIS LITERATURE

- Bačun-Družina V., Butorac A., Mrvčić J., Landeka Dragičević T., Stehlik-Tomas V. (2011) Bacterial Stationary-Phase Evolution, *Food Technology and Biotechnology* 49(1), 13–23

- Cho M., Chung H., Choi W., Yoon J. (2003), Linear correlation between inactivation of *E. coli* and OH radical concentration in TiO2 photocatalytic disinfection, *Water Research* 38(4), 1069–1077

- Cox R. A. (2003) Correlation of the rate of protein synthesis and the third power of the RNA : protein ratio in Escherichia coli and Mycobacterium tuberculosis, *Microbiology* 149, 729–737

- Duraković S. (1996) Opća mikrobiologija, Prehrambeno tehnološki-inženjering, Zagreb, str. 175-176

- Durakovic L. i Durakovic S. (2001) Mikrobiologija namirnica, Osnove i dostignuća, Kugler, str. 11

- Food safety site (2012) <http://www.foodsafetysite.com/educators/competencies/general/foodprocessing/processing2.html>Pristupljeno 20. lipnja 2017.

- Gould G.W. (1995) New Methods of Food Preservation, Springer US, str. 9, 180

- HRS Heat Exchangers (2016) <https://www.hrsheatexchangers.com/resource/thermal-treatment-food-industry/>Pristupljeno 16. lipnja 2017.

- Lehninger A. L. (1976) Biochemistry, 2.izd., Worth Publishers Inc., New York, str. 196-197

- Lovrić T. (2003) Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva, Hinus, Zagreb, str. 194

- Lumen learning (2017) <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/how-microbes-grow/>Pristupljeno 12. lipnja 2017.

- Lund D. (1988) Effects of Heat Processing on Nutrients, Nutritional Evaluation of Food Processing, Springer, str. 319-354

- Misra N. N., Tiwari B. K., Raghavarao K. S. M. S. and Cullen P. J. (2011) Nonthermal Plasma Inactivation of Food-Borne Pathogens. *Food Engineering Reviews*, 3(3-4), 159–170.

- Nehra V., Kumar A., Dwivedi H.K. (2008). Atmospheric Non-Thermal Plasma Sources, International Journal of Engineering, 2(1), 53-68.

- Polymenis M. i Aramayo R. (2015) Translate to divide: Control of the cell cycle by protein synthesis. Microbial Cell 2(4), 94-104.

- Prochnow A.M., Murphy A.B., McLean K.M., Kong M.G., Ostrikov K.(K.) (2014) Atmospheric pressure plasmas: Infection control and bacterial responses, International Journal of Antimicrobial Agents, 43(6), 508-517.

- Smith P. G. (2011) Introduction to food process engineering, 2.izd., Springer. Str.250

- Stringer S.C., George S.M., Peck M.W. (2000) Thermal inactivation of Escherichia coli 0157:H7, *Joumal of Applied Microbiology* (Symposium Supplement) 88, 79-89.

- Taboršak N., Anić N., Anić K. (1983). Primjena toplinske energije mikrovalova u prehrambenoj industriji. Mljekarstvo : časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka, 33(6), 174-177.

- Thirumdas R., Sarangapani C., Annapure S.U. (2015) Cold Plasma: A novel Non-Thermal Technology for Food Processing, Food Biophysics, Springer, 10(1), 1-11.

- Usajewicz I., Nalepa B. (2006). Survival of Escherichia coli O157:H7 in Milk Exposed to High Temperatures and High Pressure**. *Food Technology and Biotechnology*, 44(1), 33-39.

- Wang R. X., Nian W. F., Wu H. Y., Feng H. Q., Zhang K., Zhang J., Zhu W. D., Becker K., Fang J. (2012) Atmospheric-pressure cold plasma treatment of contaminated fresh fruit and vegetable slices: Inactivation and physiochemical properties evaluation. *European Physical Journal D*, 66(10), 276.

Izjava o izvornosti

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

Daniela Cvitković