

# Utjecaj hladne plazme na inaktivaciju i oštećenje stanice kvasca *Saccharomyces cerevisiae* S288C

---

Vrančić, Ema

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:159:043568>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-13**



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Ema Vrančić**

6935/PT

**UTJECAJ HLADNE PLAZME NA INAKTIVACIJU I  
OŠTEĆENJE STANICE KVASCA *Saccharomyces  
cerevisiae* S288C**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Fizikalna svojstva složenih sustava – hrane

**Mentor:** Prof. dr. sc. *Anet Režek Jambrak*

**Zagreb, 2018.**

## 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 HLADNE PLAZME NA INAKTIVACIJU I OŠTEĆENJE STANICE KVASCA

*Saccharomyces cerevisiae* S288C

*Ema Vrančić, 0058205474*

**Sažetak:** Svrha ovog rada je odrediti utjecaj hladne plazme na stanice kvasca *Saccharomyces cerevisiae* S288C. Uzorci kvasca su tretirani različitim protocima plina argona (1, 1.5 i 2 L/min) uz različito vremensko trajanje tretmana (1, 3, 5 i 20 min). Uzorcima je prije i nakon tretmana mjerena temperatura, pH, provodljivost, apsorbancija pri 600 nm za određivanje broja stanica te apsorbancija pri 260 i 280 nm za određivanje istjecanja staničnog sadržaja. Rezultati su analizirani metodom odzivne površine (RSM) korištenjem programa STATGRAPHICS Centurion. Iz rezultata je vidljivo da nije došlo do inaktivacije stanica kvasca jer nije uočena razlika u broju živih stanica prije i nakon tretmana. Najveće stanično istjecanje DNA postignuto je u uzorku tretiranom 5 min protokom plina od 2 L/min gdje je došlo do porasta apsorbancije za 0.591, a najveće stanično istjecanje proteina postignuto je u uzorku tretiranom 1 min protokom plina od 1 L/min gdje je zabilježen porast apsorbancije za 0.635.

**Ključne riječi:** hladna plazma, inaktivacija, istjecanje sadržaja, *Saccharomyces cerevisiae*

**Rad sadrži:** 33 stranice, 20 slika, 10 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:** *prof.dr.sc. Anet Režek Jambrak*

**Pomoć pri izradi:** *doc.dr.sc. Igor Stuparević, Višnja Stulić, mag. ing.*

**Rad predan:** 14.09.2018

## 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 EFFECT OF COLD PLASMA TREATMENT ON INACTIVATION AND DAMAGE OF YEAST *Saccharomyces cerevisiae* S288C**

***Ema Vrančić, 0058205474***

**Abstract:** The aim of this study is to determine the effect of cold plasma on *Saccharomyces cerevisiae* S288C. Yeast samples were treated with different argon gas flow rates (1, 1.5 and 2 L/ min) with varying duration of treatment (1, 3, 5 and 20 minutes). Before and after treatment, samples were measured for pH, conductivity, absorbance at 600 nm for cell count and absorbance at 260 and 280 nm for determination of cellular leakage. The results were analyzed by the reaction surface method (RSM) using STATGRAPHICS Centurion program. The results showed that there was no cell inactivation because no difference in the number of live cells before and after treatment was shown. The highest cellular DNA leakage was achieved in a sample treated 5 minutes with a gas flow rate of 2 L/min where absorbance was increased by 0.591. The highest cellular protein leakage was achieved in a sample treated 1 minute with a gas flow rate of 1 L/min where absorbance was increased by 0.635.

**Keywords:** cell leakage, cold plasma, inactivation, *Saccharomyces cerevisiae*

**Thesis contains:** 33 pages, 20 figures, 10 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, Full professor*

**Technical support and assistance:** *Igor Stuparević, PhD, Assoc. Professor, Višnja Stulić, MSc*

**Thesis delivered:** September 14<sup>th</sup> 2018

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. Definicija plazme .....	2
2.2. Podjela plazme .....	2
2.3. Nastajanje plazme .....	3
2.4. Plazma jet.....	4
2.5. Primjena plazme.....	4
2.5.1. Inaktivacija mikroorganizama .....	4
2.5.2. Ostale primjene plazme.....	5
2.5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C .....	6
3. MATERIJALI I METODE .....	7
3.1. MATERIJALI .....	7
3.1.1. Čuvanje mikroorganizma .....	7
3.1.2. Hranjiva podloga .....	7
3.1.3. Priprema suspenzije kvasca .....	7
3.2. METODE .....	7
3.2.1. Priprema uzorka za tretman .....	7
3.2.2. Provedba eksperimenta .....	7
3.2.3. Određivanje temperature .....	8
3.2.4. Određivanje pH i provodljivosti .....	8
3.2.5. Određivanje broja stanica kvasca .....	8
3.2.6. Određivanje istjecanja staničnog sadržaja.....	9
3.2.7. Obrada podataka .....	9
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	10
4.1. Utjecaj hladne plazme na temperaturu .....	10
4.1.1. Rezultati statističke obrade za temperaturu.....	11
4.2. Utjecaj hladne plazme na pH i provodljivost .....	14
4.2.1. Rezultati statističke obrade za pH i provodljivost .....	15
4.3. Utjecaj hladne plazme na inaktivaciju .....	20
4.3.1. Rezultati statističke obrade za broj stanica i inaktivaciju .....	22
4.4. Utjecaj hladne plazme na stanično istjecanje.....	25
4.4.1. Rezultati statističke obrade za stanično istjecanje .....	27
5. ZAKLJUČCI.....	31
6. LITERATURA .....	32

## 1. UVOD

Hladna plazma je ne-toplinska metoda koja je tijekom godina pronašla primjenu u proizvodnji polimera, tekstilnoj industriji, sterilizaciji površina, proizvodnji televizora i mnogim drugim te je pokazala razne prednosti pred dosadašnjim konvencionalnim metodama. U današnje vrijeme sa sve većim razvojem industrija pa tako i prehrambene, sve je veća potreba za procesima koji će osigurati kvalitetu i sigurnost hrane bez narušavanja nutritivnih, funkcionalnih i senzorskih svojstava hrane što je potaklo značajan razvoj i unaprjeđenje ne-termalnih tehnika poput hladne plazme (Wan i sur., 2009).

Polazeći od brige za ljudskim zdravljem, razvijene su mnoge metode za inaktivaciju patogenih mikroorganizama i njihovih spora, a među njima se sve više ističe tretman hladnom plazmom. Djeluje narušavajući strukturu stanice tako da reaktivne vrste čestica plazme oštećuju staničnu membranu mikroorganizma i direktno djeluju na određene dijelove stanice ili uzrokuju istjecanje stanične DNA i proteina (Smet i sur., 2018).

Većina studija usredotočena je na inaktivaciju patogenih mikroorganizama kao što su bakterije ili neke vrste plijesni, no u ovom radu istražit će se utjecaj hladne plazme na aktivnost i strukturu stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* soja S288C. Upotreba kvasaca je široko rasprostranjena u različitim industrijama. Zbog svojih svojstava i jednostavnosti uzgoja postali su neizostavan dio proizvodnje vina i piva te pekarske industrije. U eksperimentalnom dijelu ovoga rada koristit će se plazma jet s operativnim plinom argonom, a ulazni parametri koji će se regulirati su protok plina i vrijeme trajanja tretmana. Uzorak kvasca će se pripremiti u YPD (*engl. yeast extract peptone dextrose*) tekućoj podlozi.

Cilj ovog rada je teorijski opisati princip djelovanja hladne plazme i prikazati njezinu primjenu u industriji te eksperimentalno odrediti jeli tretman uzrokovao inaktivaciju stanica kvasca ili istjecanje staničnog sadržaja. Potrebno je i izmjeriti temperaturu, pH, provodljivost i odrediti broj stanica kvasca prije i nakon tretmana hladnom plazmom te utvrditi imaju li ti parametri utjecaja na tretirane uzorke.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Definicija plazme

Sva postojeća materija može se karakterizirati kao tekuća, kruta ili plinovita. Stjecanjem energije, primjerice zagrijavanjem, tvari prelaze iz krutog u tekuće te iz tekućeg u plinovito agregatno stanje. Do takvih pojava dolazi zbog slabljenja interakcija i veza unutar strukture materijala. Veze u konačnici pucaju te nastaje plinovito stanje koje se sastoji od molekula i pojedinačnih atoma. Pri još većim energijama, dolazi do raspada molekula na atome, a atomi se raspadaju na slobodne elektrone i ione. Plazma je opisana kao četvrto stanje materije. Može se definirati kao ionizirani plin koji se sastoji od neutralnih čestica, slobodnih elektrona te pozitivnih i negativnih iona (Niemira, 2012; Goldston i Rutherford, 1995). Skupine pozitivnog i negativnog naboja u plazmi dovode do stvaranja električnih polja koja utječu na nabijene čestice izvan tih lokalnih skupina naboja. Time svaka nabijena čestica u plazmi istovremeno međudjeluje sa svim ostalim nabijenim česticama uzrokujući karakteristično zajedničko međudjelovanje svojstveno plazmi (Mance, 2017).

### 2.2. Podjela plazme

Plazma se može podijeliti na termalnu i ne-termalnu. Termalne plazme su visoko ionizirane i zadovoljavaju uvjete lokalne termodinamičke ravnoteže (LTE, engl. *local thermodynamic equilibrium*). Da bi se zadovoljili LTE, temperatura elektrona mora biti približno jednaka ionskoj temperaturi, a ona mora biti približno jednaka temperaturi plina. Ne-termalna plazma se može podijeliti na visokotemperaturnu ne-termalnu plazmu i niskotemperaturnu odnosno hladnu plazmu. Ne-termalna plazma je djelomično ioniziran plin koji ne zadovoljava LTE, pri čemu je temperatura elektrona vrlo visoka dok plin ostaje hladan. Kada temperatura plina odgovara sobnoj temperaturi, takva plazma se smatra hladnom. Većina konvencionalnih ne-termalnih plazmi izvedena je u vakuumu ili pri niskim tlakovima, a u novije vrijeme stvoreni su i uvjeti za razvoj plazmi pod atmosferskim tlakom (Mance, 2017).

Termin hladna plazma potječe od karakteristika operativnog plina koji se koristi prilikom generiranja. Operativni plinovi mogu biti zrak, argon ili helij te drugi plemeniti plinovi zbog svoje slabe ili djelomične ioniziranosti. Njihovom upotrebom ioni se unutar nekoliko sekundi mogu ohladiti na sobnu temperaturu što dovodi do stvaranja hladne plazme (Heinlin i sur., 2010). Osim operativnog plina, lako podesivi su i ostali parametri kojima se mogu dobiti različite izvedbe hladne plazme. Neki od njih su tlak, struktura elektromagnetskog polja te izvedba pražnjenja.

Najčešće korišteni tlakovi mogu biti od 0.1 – 101325 Pa. Upotrebom visokih tlakova u plinu dolazi do mnogih sudara čestica što dovodi do učinkovitog prijenosa energije među česticama plazme, a time i jednakih temperatura. Niži tlakovi dovode do manjeg broja sudara čestica te slabije učinkovitog prijenosa energije i različitih temperatura čestica plazme. Elektromagnetska polja služe za zagrijavanje, ubrzavanje i komprimiranje čestica, a u izvedbi se najčešće koriste vanjsko postavljena elektromagnetska polja (Bogaerts i sur., 2001).

Danas postoje različiti instrumenti za generiranje hladne atmosferske plazme (CAP, engl. *cold atmospheric plasma*) prema kojima se imenuju pojedine vrste plazme. Najčešće korištene hladne atmosferske plazme su: atmosferski plazmeni mlaz (APPJ, engl. *atmospheric pressure plasma jet*), izboji s dielektričnom barijerom (DBD, engl. *dielectric barrier discharge*), korona izboji (engl. *corona discharge*) te mikrovalni izboji (engl. *microwave discharge*) (Mance, 2017).

### 2.3. Nastajanje plazme

Plazma se može proizvesti ionizacijom plina. Za ionizaciju se može koristiti bilo koji izvor energije kao što su termalna energija, električna i magnetska polja te radio i mikrovalne frekvencije. Svaki oblik energije utječe na kinetičku energiju elektrona tako da dolazi do povećanog broja sudara između elektrona i drugih atoma dovodeći do oslobađanja novih iona, elektrona, radikala te zračenja različitih valnih duljina uključujući i one u UV spektru (Thirumdas i sur., 2014).

Postoje različiti načini generiranja plazme, no najčešći koji se koristi je pomoću istosmjerne struje. Električno pražnjenje postiže se zbog dovoljno velike razlike potencijala između dvije elektrode priključene na izvor električne energije. Elektroni emitirani s katode sudaraju se s neutralnim česticama plina koje se raspadaju na pozitivno nabijene ione i elektrone. Katoda privlači ione koji pritom otpuštaju elektrone koji ponovo izazivaju sudare s neutralnim česticama plina stvarajući nove ione i elektrone pri čemu dolazi do generiranja plazme. Jedan od načina generiranja plazme može biti i naponom induciranim malim pulsevima čime se generira plazma dobre učinkovitosti i osjetljivosti za analitičke metode. Plazma se može generirati i mikrovalovima te takve vrste plazme podnose širok raspon operativnih uvjeta kao što su tlakovi manji od 0.1 Pa i tlakovi do nekoliko atmosfera, mogućnost korištenja plemenitih i ostalih plinova te podnose različite jakosti struje. Generiranje plazme radiofrekvencijama postiže se primjenom izmjeničnog napona između dvije elektrode tako da svaka elektroda djeluje kao katoda i anoda te se time nakupljeni naboj djelomično neutralizira suprotnim nabojem. Za primjenu izmjeničnog naboja koriste se radiofrekvencije (Bogaerts i sur., 2001).



## 2.4. Plazma jet

U plazma jet izvedbi pražnjenje plazme se pomoću elektromagnetskog polja, udarnog vala ili gradijenta fizikalne veličine poput gustoće čestica, tlaka ili temperature proširuje izvan područja generiranja plazme u okolni prostor. Time plazma nije ograničena definiranim prostorom čime se proširuje njena mogućnost primjene (Kong i sur., 2012). Plazma jet se sastoji od dvije koncentrične elektrode kroz koje se propuštaju plinovi ili smjese plinova. Često se koristi argon, no mogu se koristiti i smjese helija, kisika i drugih plinova. Na unutarnje elektrode pod naponom od 100 – 250 V primjenjuje se radiofrekvencija od 13.56 MHz pri čemu dolazi do pražnjenja. Ionizirani plin izlazi kroz mlaznicu koja ga usmjerava prema supstratu koji se nalazi na udaljenosti od nekoliko milimetara do par centimetara (Schutze i sur., 1998).

## 2.5. Primjena plazme

Tretman hladnom plazmom kroz godine je našao svrhu u različitim industrijama. Ranije, hladna plazma je bila široko korištena u električnoj industriji te industriji polimera gdje se koristila za površinsku modifikaciju i unaprjeđenje funkcija (Pankaj i Keener, 2017). Primjenu je našla i u industriji prerade materijala za tretiranje tekstila, papira, naočala i elektronike (Niemira, 2012) te se može koristiti za taloženje filmova ili obradu, čišćenje i sterilizaciju površina (Bárdos i Baránková, 2010). Posljednjih godina, primjene hladne plazme proširuju se na tretiranje biomedicinskih uređaja, bioloških materijala te hrane (Pankaj i Keener, 2017).

### 2.5.1. Inaktivacija mikroorganizama

Hladna plazma pokazala se kao učinkovita ne-termička metoda za inaktivaciju raznih patogenih i drugih mikroorganizama koji kontaminiraju prehrambene proizvode. Istraživanjima se pokazalo da postoje različiti mehanizmi kojima se može postići inaktivacija. Također je utvrđeno da hladna plazma djeluje drugačije na različite vrste stanica. Jedan od načina inaktivacije mikroorganizama je reaktivnim vrstama kisika koje stvaraju oksidacijski stres stanici, uzrokujući peroksidaciju lipida, inaktivaciju enzima i cijepanje DNA. Pokazano je i kako hladna plazma ima različit utjecaj na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije. Inaktivacija Gram-pozitivnih bakterija događa se uglavnom zbog intracelularnih oštećenja, a kod Gram-negativnih zbog istjecanja staničnog sadržaja (Pankaj i Keener, 2017). Faktori o kojima treba voditi računa prilikom tretmana su operativni plin, sastav i karakteristike elektroda te udaljenost elektroda od supstrata. Kod tekućih uzoraka bitna su i svojstva otapala koja mogu pridonijeti inaktivaciji. Ako otapalo

isparava, može sudjelovati u reakcijama i na taj način dovesti do inaktivacije stanica (Moreau i sur., 2008).

### 2.5.2. Ostale primjene plazme

Tretman hladnom plazmom našao je primjenu i u degradaciji toksina. Danas, sve više pažnje se posvećuje rasprostranjenosti različitih toksina i njihovom djelovanju na čovjekovo zdravlje. Neki od najčešćih toksina koji se mogu nalaziti u hrani su pesticidi i mikotoksini i većina današnjih istraživanja je usmjerena na njihovu degradaciju. Mikotoksini su toksični sekundarni metaboliti filamentoznih gljiva za koje se pokazalo da imaju kancerogeno i mutageno djelovanje. Zbog njihove otpornosti na degradaciju i nemogućnosti potpune inaktivacije konvencionalnim toplinskim tretmanima u novije vrijeme se istražuju drugačije metode inaktivacije. Tretman hladnom plazmom se pokazao uspješnim kod obrade raznih prehrambenih proizvoda, no potrebna je daljnja optimizacija parametara procesa kako bi se povećala učinkovitost i proširila primjena i na ostale prehrambene proizvode.

Upotrebom pesticida poljoprivredna industrija je značajno smanjila oštećenja i gubitke prinosa uzrokovane djelovanjem insekata i time povećala prinose na globalnoj razini. Zbog svoje toksičnosti za ljude upotreba pesticida mora biti strogo regulirana te mora biti ispod određene granice u svim prehrambenim proizvodima. Upotreba hladne plazme pokazala se učinkovitom u razgradnji pesticida u raznim prehrambenim proizvodima zbog stvaranja različitih reaktivnih vrsta poput iona, molekula i slobodnih radikala (Pankaj i Keener, 2017).

Hladna plazma se može primijeniti i na enzime. U poljoprivredi ponekad djelovanje enzima ima negativan učinak, poput enzimskog posmeđivanja koje se odvija u nekom voću i povrću te uzrokuje ubrzano kvarenje. Da bi se izbjegli gubici koriste se različite metode za sprječavanje enzimskog posmeđivanja među kojima je primjenu našla i hladna plazma. Do inaktivacije enzima dolazi zbog oksidacijskih reakcija uzrokovanih slobodnim radikalima i atomskim kisikom.

Da bi se poboljšala učinkovitost upotrebe škroba, proizvode se modificirani škrobovi koji se koriste kao aditivi u prehrani. Prirodni polimeri potrebni za pripremu modificiranih škrobova su osjetljivi na jake kemikalije pa je potrebna upotreba slabijih. Istražuju se i druge metode kojima bi se olakšala priprema. Hladnom plazmom škrob se može modificirati i najčešća dva mehanizma su depolimerizacija i križno povezivanje granula škroba.

Tretman hladnom plazmom se pokazao uspješan za tretiranje sjemenja da bi se postiglo brže klijanje. Utvrđeno je da sjemenke tretirane hladnom plazmom proključaju brže od netretiranih jer

reaktivne čestice plazme ulaze u sjemenke i izravno djeluju u unutrašnjosti stanice. Oštećenje stanične stijenke i DNA može stimulirati prirodni signal za produkciju faktora rasta, mijenjanje strukture proteina i može utjecati na aktivnost enzima koja će potaknuti sjeme na klijanje.

Potpunu obradu otpadne vode teško je postići trenutnim konvencionalnim metodama. Ponekad je potrebno postići potpunu oksidaciju, a plazma pokazuje svojstva za moguću primjenu zbog stvaranja oksidacijskih vrsta poput radikala koji mogu razgrađivati zagađivače ili ih prevesti u neke druge spojeve (Thirumdas i sur., 2014).

Jedna od najširih upotreba hladne plazme je u ambalažnoj industriji. Desetljećima se koristi za graviranje i funkcionalizaciju površina, sterilizaciju ambalažnog materijala te aktivaciju i taloženje površina. Pakiranje hrane je također jedna od širih upotreba te se stalno radi na unaprjeđenju i poboljšanju učinkovitosti procesa pakiranja (Pankaj i Keener, 2017).

## 2.5. *Saccharomyces cerevisiae* S288C

Kvasci su eukariotski organizmi koji pripadaju skupini jednostaničnih gljiva. Najčešće pripadaju koljenima Ascomycotina i Basidiomycotina no neke se svrstavaju i u koljeno Deuteromycotina. Većina kvasaca se reproducira nespolno pupanjem tako da se iz roditeljske stanice formira mali pup koji se povećava, sazrijeva i na kraju odvaja kao samostalna stanica kvasca. Do 1998. godine opisano je preko 700 različitih vrsta te se svakim danom taj broj povećava, a pretpostavlja se da bi opisivanje svih postojećih vrsta moglo potrajati nekoliko stotina godina. Staništa kvasaca mogu biti biljke, životinje, voda i tlo. Također mogu živjeti raspršeni u zraku, a postoje i vrste koje preživljavaju ekstremne uvjete. Za prehranu i razmnožavanje koriste organske oblike ugljika koji se nalaze u jednostavnim šećerima, organskim i masnim kiselinama, alifatskim alkoholima te mnogim drugim izvorima (Walker, 1998). Zbog svojih fermentativnih svojstava, primjena kvasaca postala je neizostavan dio proizvodnje kruha, piva i vina. Industrijski sojevi *Saccharomyces cerevisiae* koriste se u komercijalnim procesima i pridonose brzom i potpunoj fermentaciji šećera, stvaranju željenih okusa i aroma te povećanoj proizvodnji alkohola (Johnson i Echavarri-Erasun, 2011).

Soj S288C je jedan od najšire korištenih laboratorijskih sojeva. Dizajnirao ga je za biokemijske svrhe Robert Mortimer, s posebnim naglaskom na svojstvo da se ne razmnožava u nakupinama te da ima minimalne prehrambene zahtjeve. Soj je potpuno sekvencioniran te je njegova sekvenca pohranjena u SGD (*Saccharomyces Genome Database*) bazi podataka. Ne stvara pseudohife te nije dobar izbor za mitohondrijska istraživanja (Mortimer i Johnston, 1986).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Čuvanje mikroorganizma

Kulture kvasca *Saccharomyces cerevisiae* soja S288C čuvaju se u hladnjaku na temperaturi od 2°C do 8°C.

##### 3.1.2. Hranjiva podloga

Korištena je YPD tekuća hranjiva podloga. U 500 mL destilirane vode dodano je 10 g peptona, 5 g kvašćevog ekstrakta i 10 g glukoze. Podloga je sterilizirana u autoklavu (Tuttnauer, 2540 M) te je po 80 mL podloge uz plamenik preneseno u 4 sterilne Erlenmeyerove tikvice od 250 mL.

##### 3.1.3. Priprema suspenzije kvasca

U Erlenmeyerove tikvice sa sterilnom podlogom naciepljen je kvasac *Saccharomyces cerevisiae* soja S288C. Tikvice su stavljene na tresilicu (LAB SHAKER, Braun) 16 sati pri 180 okretaja u minuti i temperaturi 30 °C.

#### 3.2. METODE

##### 3.2.1. Priprema uzorka za tretman

U sterilnu Petrijevu zdjelicu prenese se 25 mL suspenzije kvasca. 5 mL suspenzije se koristi za određivanje početnih parametara prije tretmana, a ostalih 20 mL se tretira hladnom plazmom.

##### 3.2.2. Provedba eksperimenta

Uzorak se tretira pomoću jet plazme. Kao izvor plazme koristi se atmosferski mlaz s jednom elektrodom, a kao operativni plin se koristi argon. Uzorak u Petrijevoj zdjelici stavlja se na

magnetsku miješalicu. Djelovanjem gravitacijske sile kvasci u tekućoj podlozi zbog svoje težine padaju na dno pa je potrebno postići konstantno miješanje. Kućište za generiranje plazme je sastavljeno od teflonskog kućišta na koje su pričvršćene 3 kapilarne cjevčice dužine 7.5 cm, unutarnjeg promjera 0.1 cm i vanjskog promjera 0.15 cm. Cjevčice su postavljene jedna od druge na najbližu moguću udaljenost koliko dopušta fizika električnog polja stvaranja plazme. Unutar cjevčica se nalazi bakrena cjevčica promjera 100  $\mu\text{m}$  pričvršćena na izvor visokog napona. Izvor od 6 W daje 2.5 kV pri frekvenciji od 25 kHz-a. Realna struja iznosi 3 mA, a realna snaga plazme je 4 W. Na cjevčicu je spojen i izvor argona čiji se protok regulira mjeracem protoka. Udaljenost izvora plazme od uzorka je konstantan i iznosi 2 cm. Ulazni parametri su protok argona (1 L/min, 1.5 L/min i 2 L/min) i vrijeme tretmana (1 min, 3 min, 5 min i 20 min).

### 3.2.3. Određivanje temperature

Temperatura se mjeri infracrvenim termometrom (PCE-777, PCE Instruments) prije i nakon tretmana hladnom plazmom.

### 3.2.4. Određivanje pH i provodljivosti

Za mjerenje pH-vrijednosti i provodljivosti koristi se digitalni pH-metar (pH 340i/SET, WTW, Weilheim, Germany). Mjerenja se izvode na uzorku prije i nakon tretmana hladnom plazmom.

### 3.2.5. Određivanje broja stanica kvasca

Određivanje broja stanica kvasca u uzorku provodi se spektrofotometrijski. Parametar koji se određuje je optička gustoća uzorka. U plastičnu kivetu stavi se 0.3 mL kvasca i 2.7 mL sterilne vode. Sadržaj kivete se dobro homogenizira te se očita apsorbancija uzorka na spektrofotometru pri valnoj duljini od 600 nm. Za slijepu probu se koristi 3 mL sterilne vode. Optička gustoća uzorka mjeri se prije i nakon tretmana hladnom plazmom i izražena je kao razlika apsorbancije uzorka i slijepe probe.

Za provjeru i bolji uvid u broj stanica radi se promatranje broja živih i mrtvih stanica kvasca. Koristi se metoda bojanja stanica metilenskim modrilom prije i nakon tretiranja uzorka hladnom plazmom. Cilj je vidjeti jeli došlo do smrti stanica i u kojem omjeru se nalaze žive i mrtve stanice. Preparat se priprema tako da se na stakalce nanese 10  $\mu\text{L}$  uzorka i razrijedi u 10  $\mu\text{L}$  deionizirane

vode. Dodaje se 10  $\mu\text{L}$  metilenskog modrila i preparat se ostavi 5 minuta da se osuši. Zatim se stavlja pokrovnica te se promatraju stanice pod mikroskopom (Motic, B3 Professional Series) pri povećanju od 400 puta.

### 3.2.6. Određivanje istjecanja staničnog sadržaja

Određivanje elektroporacije, istjecanja staničnog sadržaja je spektrofotometrijska i filtracijska metoda gdje na porama filtra zaostaju stanične makromolekule, proteini i nukleinske kiseline ako je došlo do poracije stanica. Za određivanje se koristi 3 mL tretiranog uzorka koji se filtrira kroz CHROMAFIL Xtra PTFE-20/25 filter (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Duren, Germany) s veličinom pora od 0.25  $\mu\text{m}$ . Dobiveni filtrat se prenosi u kivetu te se određuje apsorbancija pri 260 nm i 280 nm.

### 3.2.7. Obrada podataka

Kako bi se utvrdio statistički utjecaj vremena tretiranja i protoka plina na izlazne parametre te za planiranje, dizajn i obradu podataka korišten je računalni program STATGRAPHICS Centurion (StatPoint tehnologija, Inc.). Provedena je analiza varijance (ANOVA) kako bi se mogla utvrditi odstupanja ( $p < 0.05$ ) u provedenim tretmanima. Izlazni parametri su elektroporacija stanica kvasca, broj stanica kvasca, pH, provodljivost i temperatura. Rezultati su statistički obrađeni te prikazani putem metoda odzivne površine - RSM (eng. Response Surface Methodology). RSM obuhvaća skup statističkih i matematičkih metoda koje se primjenjuju za razvoj, poboljšanje i optimiranje procesa. Točnost kvadratnog empirijskog modela provjerena je analizom varijance (ANOVA) s razinom pouzdanosti od 95 %.

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu cilj eksperimentalnog dijela je odrediti utjecaj hladne plazme na inaktivaciju kvasca *Saccharomyces cerevisiae* S288C. Provedeno je 10 tretmana hladnom plazmom. Uzorak je tretiran 1, 3, 5 i 20 minuta s protokom plina od 1, 1.5 i 2 L/min. Na temelju broja stanica kvasca i elektroporacije stanica, odnosno istjecanja staničnog sadržaja određen je utjecaj hladne plazme na kvasac *Saccharomyces cerevisiae* S288C. Prije i nakon svakog tretmana mjereni su i parametri temperatura, pH i provodljivost.

##### 4.1. Utjecaj hladne plazme na temperaturu

Tablica 1. Rezultati mjerenja temperature prije i nakon tretmana

protok plina [L/min]	vrijeme tretmana [min]	temperatura [°C]
0	0	20,2
1	1	20,2
1,5	1	20,0
2	1	20,1
0	0	17,2
1	3	17,2
1,5	3	18,1
2	3	19,1
1	5	17,9
1,5	5	17,3
2	5	19,0
2	20	19,1

Prema rezultatima mjerenja temperature prije i nakon tretmana prikazanih u tablici 1 za uzorke tretirane 1 minutu nije došlo do značajne promjene temperature pri različitim protocima plina. Za uzorke tretirane 3 i 5 minuta primijećen je lagan porast temperature pri većim protocima plina. Temperatura uzorka tretiranog 3 minute pri protoku plina od 1.5 L/min porasla je za 0.9 °C u odnosu na temperaturu uzorka prije tretmana, a temperatura uzorka tretiranog 3 minute pri protoku plina od 2 L/min porasla je za 1.9 °C u odnosu na uzorak prije tretmana. Kod uzoraka tretiranih 5 minuta primjećuje se također porast temperature. Temperatura pri protoku 1 L/min

porasla je za 0.7 °C, pri protoku 1.5 L/min za 0.1 °C, a pri protoku 2 L/min za 1.8 °C u odnosu na temperaturu uzorka prije tretmana. Uzorak tretiran 20 min bilježi porast temperature za 1.9 °C u odnosu na temperaturu uzorka prije tretmana. Porast temperature u ovim intervalima ne stvara nepovoljne uvjete i ne potiče inaktivaciju odabranog kvasca. Isto tako ne predstavlja maksimalnu temperaturu za razmnožavanje kvasca koju je za sojeve *S. cerevisiae* odredio Walker (1998) i ona iznosi od 35 do 43 °C. Prema tome porast temperature ne utječe na broj stanica kvasca i ne utječe na inaktivaciju. Do porasta temperature dolazi zbog sudaranja atoma i razdvajanja na elektrone pri čemu dolazi do povećanja ukupne kinetičke energije.

#### 4.1.1. Rezultati statističke obrade za temperaturu

Tablica 2. Statistička značajnost varijabli za temperaturu

<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>D<sub>f</sub></i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>F-omjer</i>	<i>P-vrijednost</i>
GLAVNI UČINCI					
A:protok plina	1,40167	1	1,40167	3,53	0,1569
B:vrijeme tretmana	6,40667	1	6,40667	16,14	0,0277
INTERAKCIJE					
AA	0,347222	1	0,347222	0,87	0,4187
AB	0,36	1	0,36	0,91	0,4112
BB	1,86889	1	1,86889	4,71	0,1185
OSTATAK	1,19111	3	0,397037		
UKUPNO (ISPRAVLJENO)	11,5756	8			

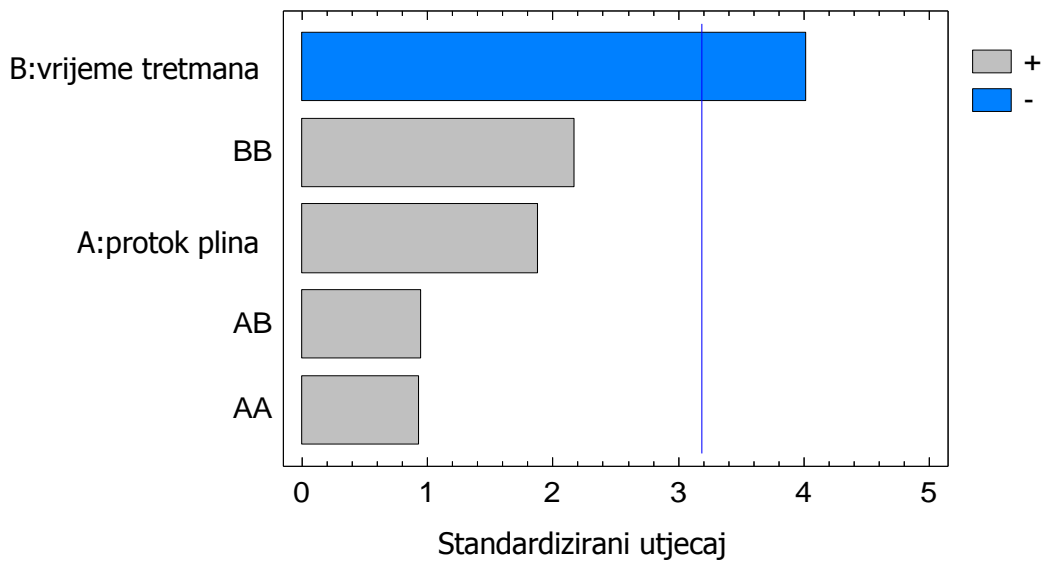
#### INTERAKCIJE

AA – kvadratna interakcija protoka plina

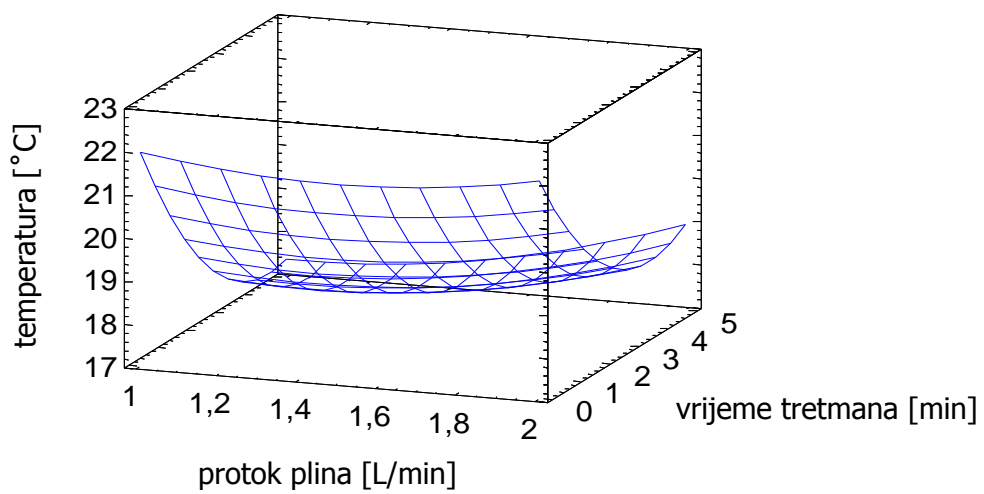
AB – interakcija protoka plina i vremena tretiranja

BB – kvadratna interakcija vremena tretiranja

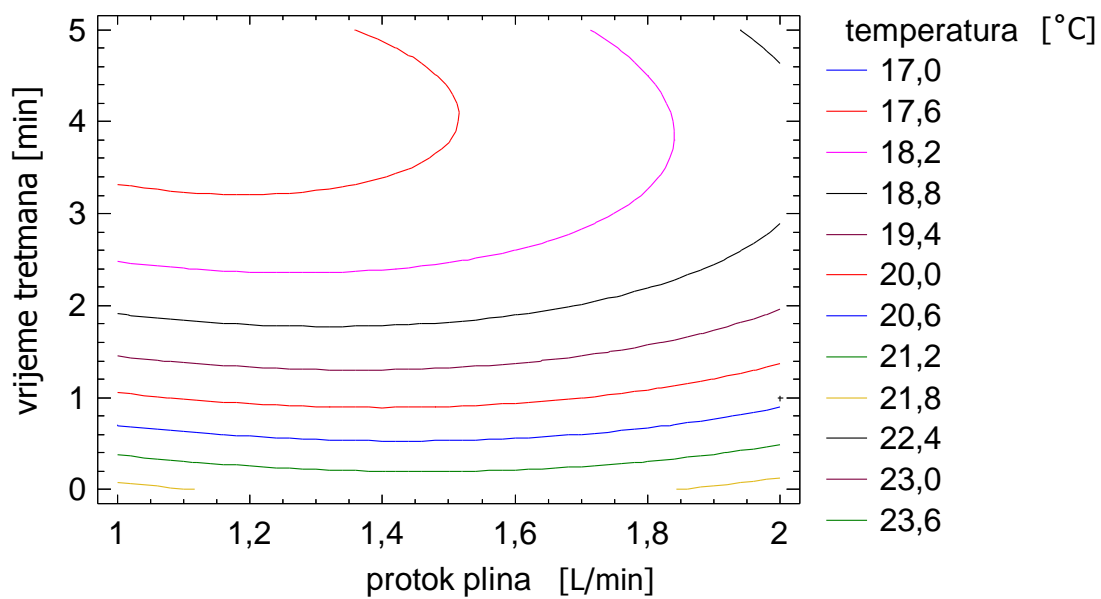




Slika 1. Standardizirani Pareto dijagram za temperaturu



Slika 2. 3D dijagram odzivne površine za temperaturu



Slika 3. Konturni dijagram odzivne površine za temperaturu

Parametri koji imaju p-vrijednost manju od 0.05 imaju statistički značajan utjecaj. Prema tablici 2 i slici 1 parametar koji pokazuje značajan statistički utjecaj na temperaturu je vrijeme tretmana.

#### 4.2. Utjecaj hladne plazme na pH i provodljivost

Tablica 3. Rezultati mjerenja pH i provodljivosti prije i nakon tretmana

protok plina [L/min]	vrijeme tretmana [min]	pH	provodljivost [ $\mu$ S/cm]
0	0	5,08	1894
1	1	5,03	1940
1,5	1	5,03	1965
2	1	5,05	1915
0	0	5,05	1884
1	3	4,96	1910
1,5	3	4,93	1931
2	3	5,01	1923
1	5	5,10	1996
1,5	5	4,97	1955
2	5	4,93	1966
0	0	5,06	1890
2	20	4,95	2112

Prema rezultatima koji su prikazani u tablici 3 tretman hladnom plazmom uzrokuje smanjenje pH vrijednosti. Uzorak tretiran 1 minutu protokom od 1 i 1.5 L/min pokazuje pad pH vrijednosti za 0.05 jedinica, a pri protoku od 2 L/min pad od 0.03 jedinica. Kod uzoraka tretiranih 3 minute protokom 1 L/min pad pH vrijednosti iznosi 0.09 jedinica, pri protoku 1.5 L/min iznosi 0.12 jedinica, a pri protoku od 2 L/min 0.04 jedinice. Slični rezultati primjećuju se i kod uzoraka tretiranih 5 i 20 minuta.

Pošto je optimalan pH za uzgoj kvasaca između 4.5 – 5.5 (Walker, 2009) dobiveni rezultati koji pokazuju pad pH vrijednosti ne utječu na inaktivaciju odabranog kvasca.

Iako pad pH vrijednosti nije značajan, izmjeren je i u radu Smet i sur. (2018) gdje je proučavan utjecaj hladne plazme na hranu kontaminiranu bakterijom *Salmonella Typhimurium* uzimajući u obzir čimbenike kao što su pH vrijednost, koncentracija soli i struktura hrane. U usporedbi s radom Smet, rad Ziuzine i sur. (2013) ukazuje na znatno smanjenje pH vrijednosti uzorka *Escherichie coli* ATCC 25922 u zatvorenom pakiranju. Nakon tretmana hladnom plazmom s dielektričnim barijernim pražnjenjem uočen je veći pad pH vrijednosti, pri čemu je mjerenje pH obavljeno 24 h nakon tretmana. Direktnim tretmanom od 60 s i skladištenjem uzorka 1 h došlo

je do pada pH za 2.8 jedinica, a indirektnim tretmanom od 60 s i skladištenjem od 1h pH vrijednost je pala za 2.4 jedinice.

Promjene u pH vrijednosti mogu se objasniti korištenjem medija različitih sastava. Isto tako utječu i svojstva korištene plazme te plinovi koji se koriste za generiranje.

Rezultati mjerenja provodljivosti također se nalaze u tablici 3 i pokazuju porast provodljivosti svih tretiranih uzoraka u odnosu na one koji nisu tretirani hladnom plazmom. U uzorcima tretiranim 1 i 3 min dolazi do porasta provodljivosti u rasponu od 24 do 71  $\mu\text{S/cm}$ . Kod uzoraka tretiranih 5 min uočen je nešto veći porast provodljivosti u rasponu od 71 do 112  $\mu\text{S/cm}$ , dok je uzorku tretiranom 20 min izmjeren najveći porast provodljivosti od 216  $\mu\text{S/cm}$ . Do porasta provodljivosti dolazi zbog velike količine formiranih iona i nabijenih čestica u korištenom mediju.

#### 4.2.1. Rezultati statističke obrade za pH i provodljivost

Tablica 4. Statistička značajnost varijabli za pH

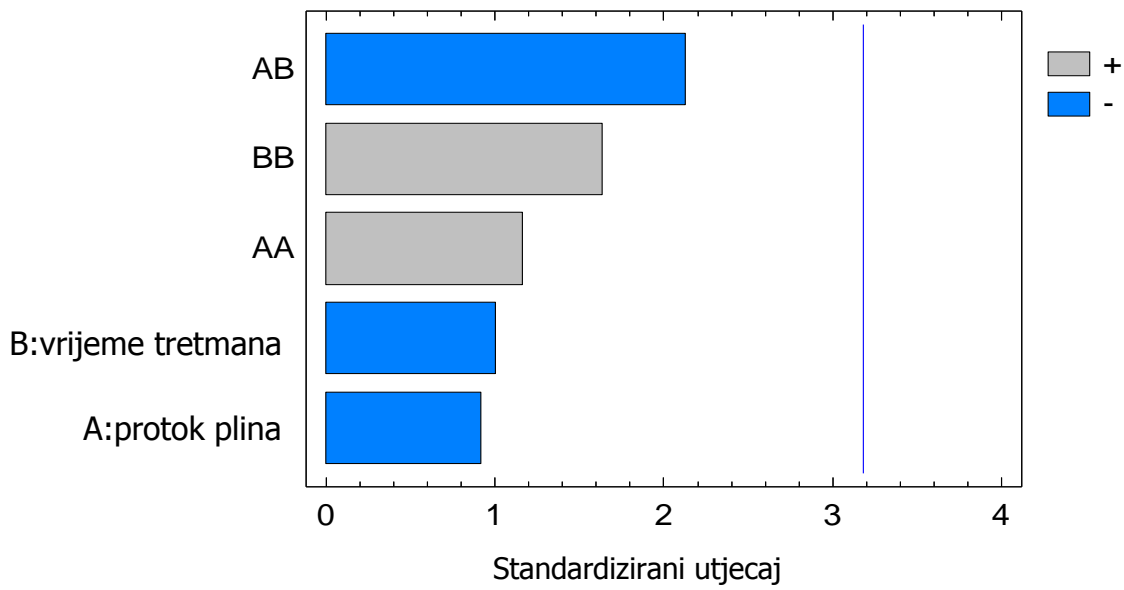
<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>D<sub>f</sub></i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>F-omjer</i>	<i>P-vrijednost</i>
GLAVNI UČINCI					
A:protok plina	0,00166667	1	0,00166667	0,84	0,4270
B:vrijeme tretmana	0,00201667	1	0,00201667	1,02	0,3877
INTERAKCIJE					
AA	0,00268889	1	0,00268889	1,36	0,3285
AB	0,009025	1	0,009025	4,55	0,1227
BB	0,00533889	1	0,00533889	2,69	0,1995
OSTATAK	0,00595278	3	0,00198426		
UKUPNO (ISPRAVLJENO)	0,0266889	8			

#### INTERAKCIJE

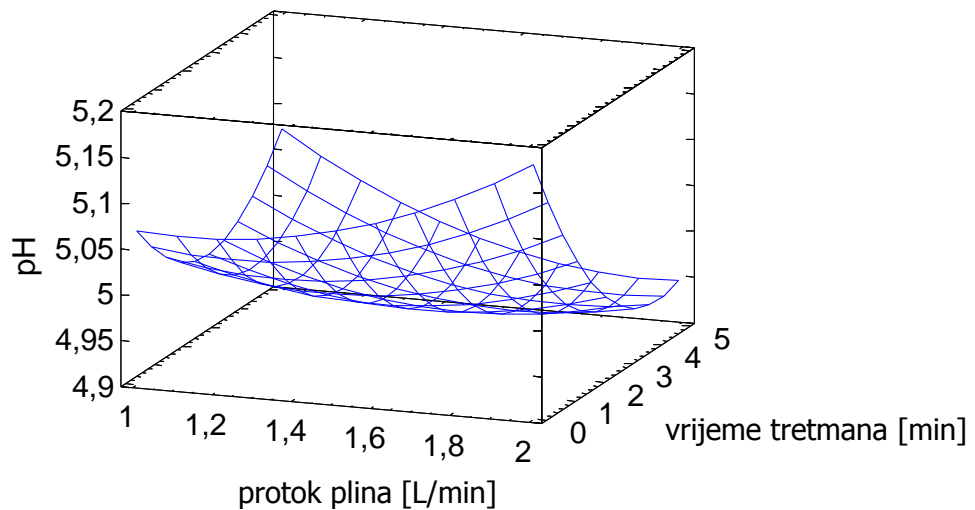
AA – kvadratna interakcija protoka plina

AB – interakcija protoka plina i vremena tretiranja

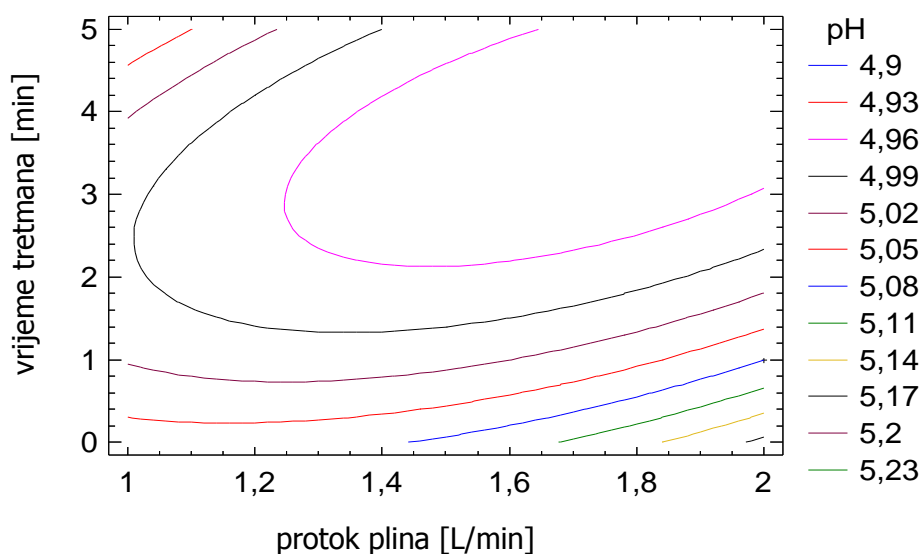
BB – kvadratna interakcija vremena tretiranja



Slika 4. Standardizirani Pareto dijagram za pH vrijednost



Slika 5. 3D dijagram odzivne površine za pH vrijednost



Slika 6. Konturni dijagram odzivne površine za pH vrijednost

Parametri koji imaju p-vrijednost manju od 0.05 imaju statistički značajan utjecaj. Iz tablice 4 i slike 4 vidljivo je da vrijeme tretmana, protok plina i njihove međusobne interakcije nemaju statistički značajan utjecaj na pH vrijednost.

Tablica 5. Statistička značajnost varijabli za provodljivost

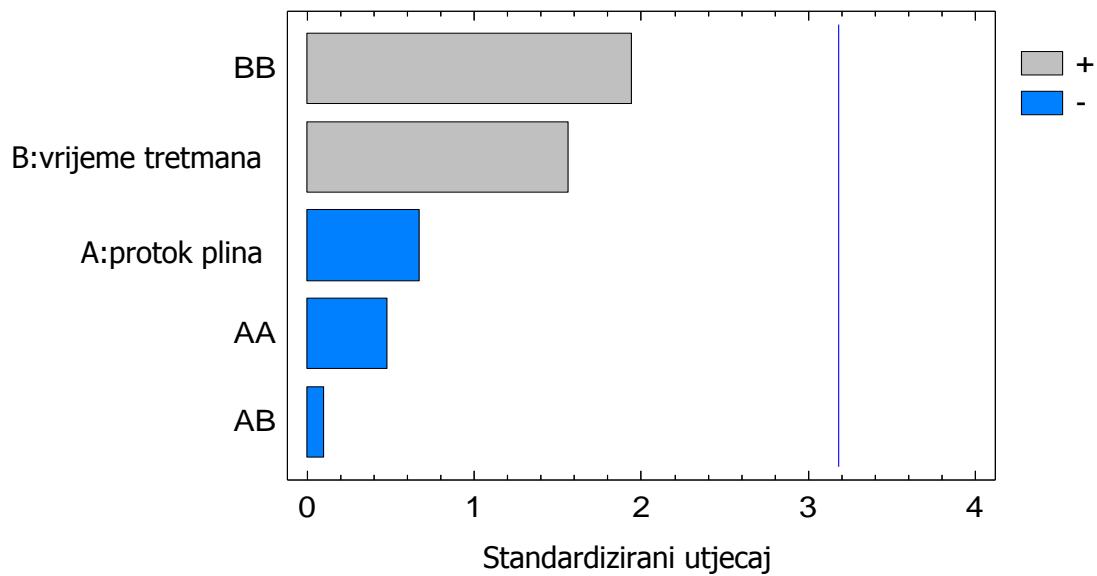
<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>D<sub>f</sub></i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>F-omjer</i>	<i>P-vrijednost</i>
GLAVNI UČINCI					
A:protok plina	294,0	1	294,0	0,46	0,5470
B:vrijeme tretmana	1568,17	1	1568,17	2,44	0,2159
INTERAKCIJE					
AA	150,222	1	150,222	0,23	0,6616
AB	6,25	1	6,25	0,01	0,9276
BB	2426,72	1	2426,72	3,78	0,1470
OSTATAK	1924,86	3	641,62		
UKUPNO (ISPRAVLJENO)	6370,22	8			

## INTERAKCIJE

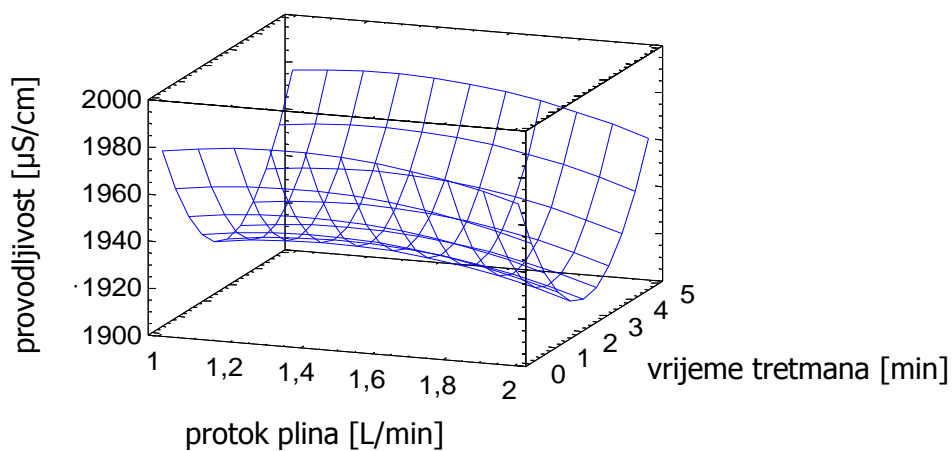
AA – kvadratna interakcija protoka plina

AB – interakcija protoka plina i vremena tretiranja

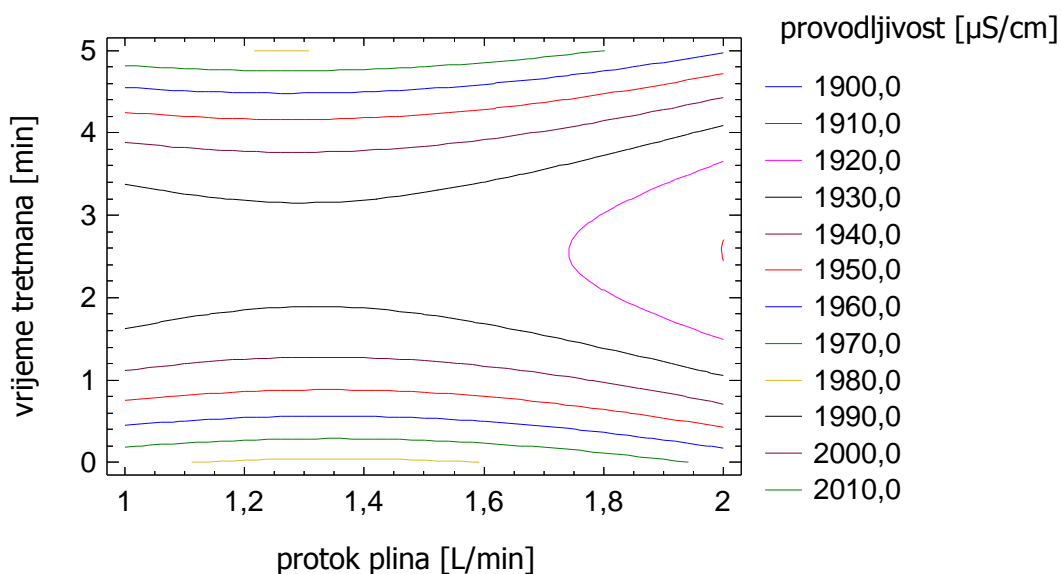
BB – kvadratna interakcija vremena tretiranja



Slika 7. Standardizirani Pareto dijagram za provodljivost



Slika 8. 3D dijagram odzivne površine za provodljivost



Slika 9. Konturni dijagram odzivne površine za provodljivost

Parametri čija je p-vrijednost manja od 0.05 imaju statistički značajan utjecaj. Prema tablici 5 i slici 7 vrijeme tretmana, protok plina i njihove međusobne interakcije nemaju iznos p-vrijednosti manji od 0.05 i time nemaju statistički značajan utjecaj na provodljivost.



#### 4.3. Utjecaj hladne plazme na inaktivaciju

Tablica 6. Rezultati izmjerene apsorbancije pri 600 nm za broj stanica prije i nakon tretmana

protok plina [L/min]	vrijeme tretmana [min]	broj stanica [A 600 nm]
0	0	1,260
1	1	1,157
1,5	1	1,143
2	1	1,175
0	0	1,279
1	3	1,151
1,5	3	1,263
2	3	1,212
1	5	1,176
1,5	5	1,180
2	5	1,074
0	0	1,202
2	20	1,277

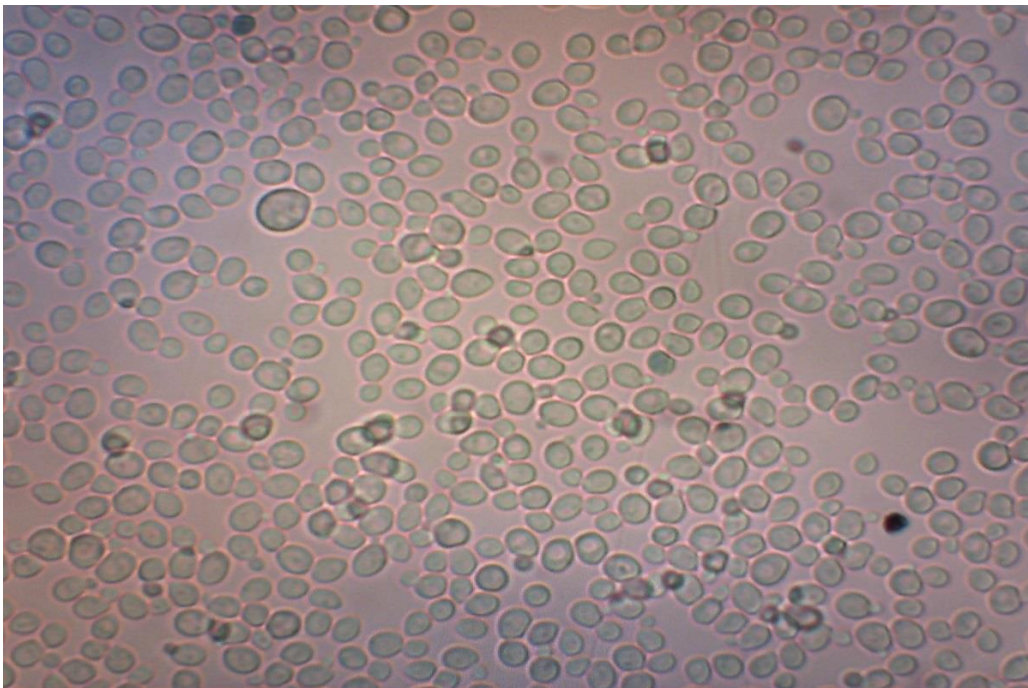
Rezultati očitanih apsorbancija pri valnoj duljini od 600 nm nalaze se u tablici 6 i pokazuju smanjenje apsorbancije svih tretiranih uzoraka osim onog tretiranog 20 min. Najveći pad apsorbancije primijećen je na uzorku tretiranom 5 min protokom plina od 2 L/min, pri čemu se apsorbancija smanjila za 0.205. Najmanji pad apsorbancije pokazuje uzorak tretiran 3 min protokom od 1.5 L/min, pri čemu se apsorbancija smanjila za 0.016. Porast apsorbancije od 0.075 primijećen je na uzorku tretiranom 20 min protokom od 2 L/min.

U radu Lee i sur. (2006) proučavan je utjecaj hladne plazme na inaktivaciju bakterija *Escherichia coli* ATCC 25922 i *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 te kvasca *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7915. Korišteni plinovi su kisik i helij. Kvasac je uzgojen na YPD hranjivoj podlozi, ali je prije tretmana razrijeđen u slanoj otopini. Rezultati su pokazali da su stanice kvasca uspješno inaktivirane, ali da su rezistentnije od bakterija. Vrijeme za potpunu inaktivaciju stanica kvasca je bilo 6 puta duže od vremena potrebnog za inaktivaciju *E. coli*.

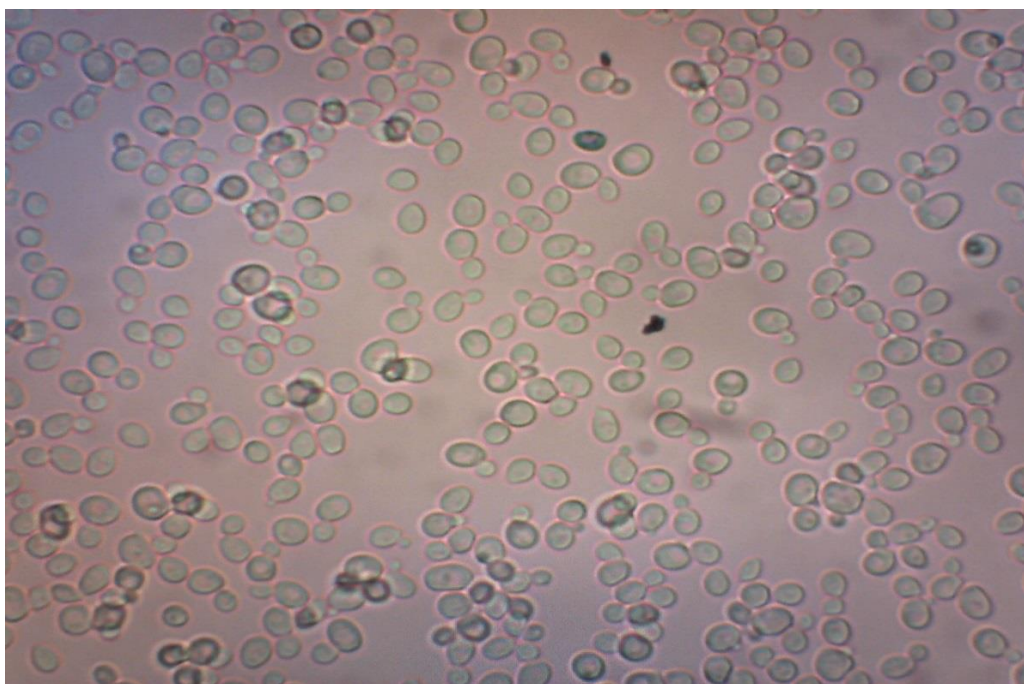
Ryu i sur. (2013) promatrali su utjecaj tekućine u kojoj se nalaze kvasci na učinkovitost inaktivacije. Kvasac koji su odabrali je *Saccharomyces cerevisiae* AH109. Korištena je plazma jet pri atmosferskom tlaku, a kao operativni plin je korišten argon. Prema dobivenim rezultatima,

najveća inaktivacija postignuta je u uzorku kvasaca koji su se nalazili u vodi, nešto manja inaktivacija je postignuta u slanoj otopini, a kod kvasaca u YPD tekućoj podlozi nije primijećena značajna inaktivacija.

Promatrajući stanice kvasca svih netretiranih i tretiranih uzoraka pod mikroskopom nije primijećena inaktivacija, odnosno broj živih stanica u tretiranim uzorcima se nije znatno promijenio u odnosu na netretirane. Takav ishod bi se mogao objasniti strukturom stanice kvasaca koja je rezistentnija od bakterijske te medijem koji okružuje stanice kvasca. Na slici 10 i 11 plavo obojene stanice predstavljaju mrtve stanice kvasca.



Slika 10. Netretirane stanice kvasca



Slika 11. Stanice kvasca tretirane 5 min protokom od 2 L/min

#### 4.3.1. Rezultati statističke obrade za broj stanica i inaktivaciju

Tablica 7. Statistička značajnost varijabli za broj stanica

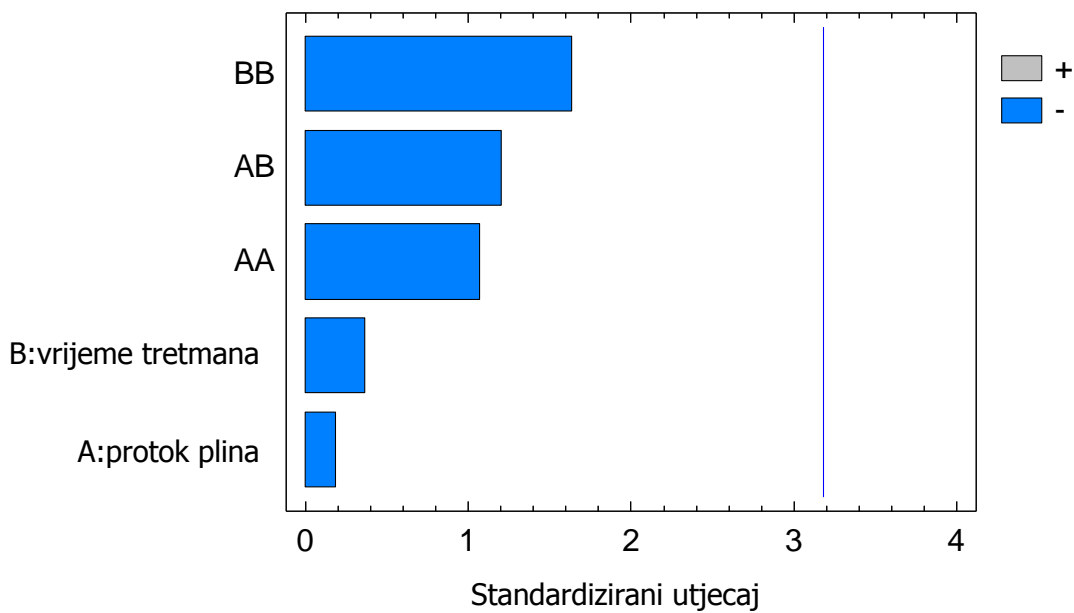
<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>D<sub>f</sub></i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>F-omjer</i>	<i>P-vrijednost</i>
<b>GLAVNI UČINCI</b>					
A:protok plina	0,0000881667	1	0,0000881667	0,04	0,8628
B:vrijeme tretmana	0,0003375	1	0,0003375	0,14	0,7372
<b>INTERAKCIJE</b>					
AA	0,00286272	1	0,00286272	1,15	0,3622
AB	0,0036	1	0,0036	1,45	0,3155
BB	0,00668939	1	0,00668939	2,69	0,1998
OSTATAK	0,00747111	3	0,00249037		
UKUPNO (ISPRAVLJENO)	0,0210489	8			

#### INTERAKCIJE

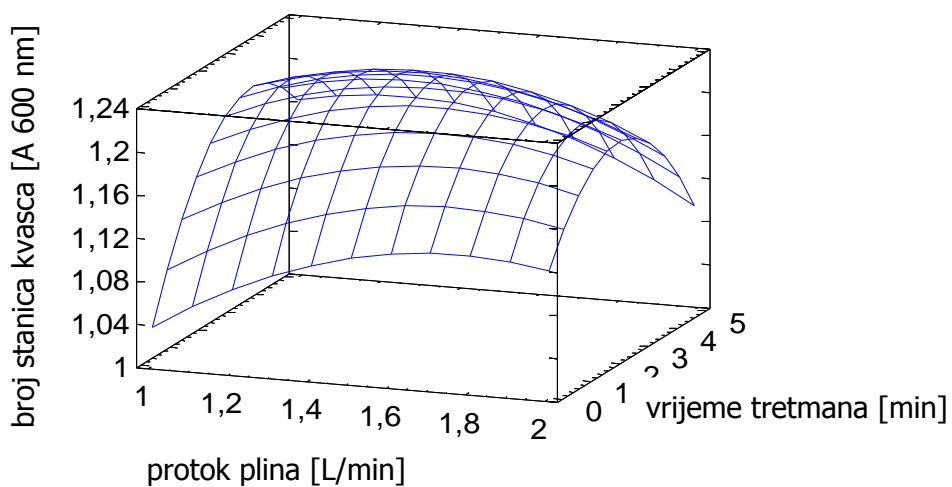
AA – kvadratna interakcija protoka plina

AB – interakcija protoka plina i vremena tretiranja

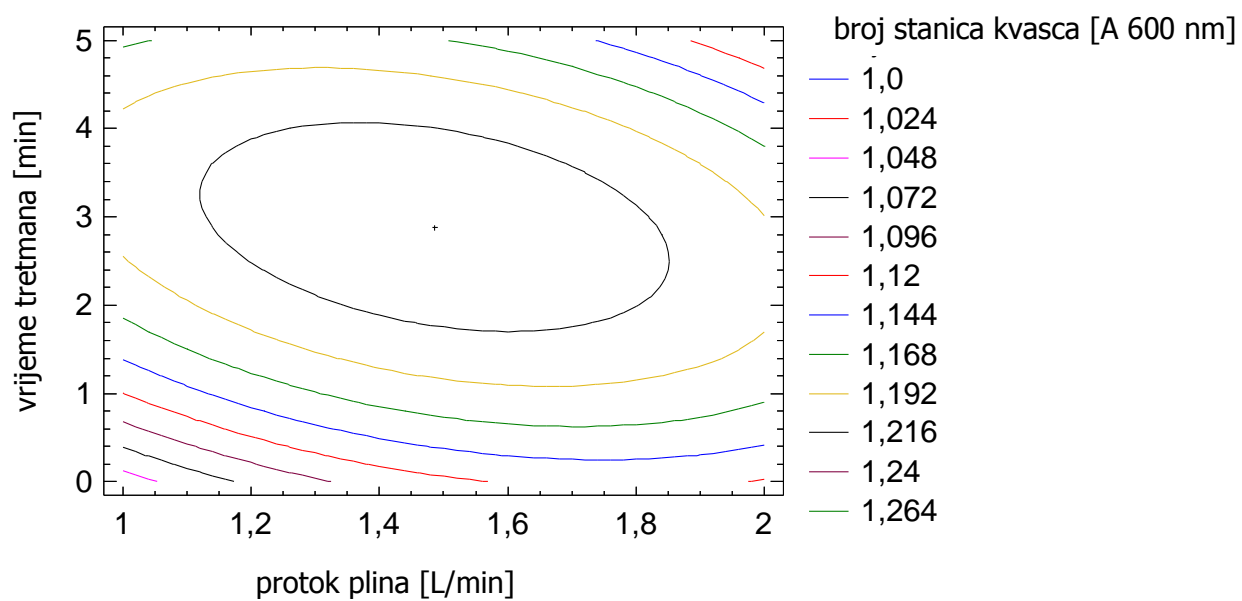
BB – kvadratna interakcija vremena tretiranja



Slika 12. Standardizirani Pareto dijagram za broj stanica



Slika 13. 3D dijagram odzivne površine za broj stanica



Slika 14. Konturni dijagram odzivne površine za broj stanica

Parametri čija je p-vrijednost manja od 0.05 imaju statistički značajan utjecaj. Prema tablici 7 i slici 12 vrijeme tretmana, protok plina i njihove međusobne interakcije nemaju statistički značajan utjecaj na broj stanica kvasca.

#### 4.4. Utjecaj hladne plazme na stanično istjecanje

Tablica 8. Rezultati izmjerene apsorbancije pri 260 i 280 nm za elektroporaciju stanica, odnosno stanično istjecanje

protok plina [L/min]	vrijeme tretmana [min]	elektroporacija [A 260 nm]	elektroporacija [A 280 nm]
0	0	1,584	2,120
1	1	2,012	2,755
1,5	1	1,387	1,913
2	1	1,362	1,946
0	0	1,486	1,898
1	3	1,054	1,437
1,5	3	0,601	0,775
2	3	0,555	0,962
1	5	1,407	2,272
1,5	5	1,778	1,911
2	5	2,077	1,510
0	0	1,700	2,048
2	20	1,577	2,033

Mjerenjem apsorbancije pri 260 nm dobiveni su rezultati koji pokazuju elektroporaciju, odnosno oštećenje stanice. Povećanje apsorbancije ukazuje na istjecanje sadržaja stanice, a pri 260 nm je moguće odrediti istjecanje DNA molekula pošto one apsorbiraju na toj valnoj duljini. Kod uzoraka tretiranih 1 min, protokom plina od 1 L/min došlo je do porasta apsorbancije za 0.428, a kod ostalih uzoraka tretiranih 1 min apsorbancija se smanjila. Svi uzorci tretirani 3 min nisu pokazali porast apsorbancije, što upućuje na to da nije došlo do istjecanja DNA. Uzorak tretiran 5 min, protokom plina od 1,5 L/min pokazuje porast apsorbancije za 0.292, a uzorku tretiranom 5 min, protokom plina od 2 L/min izmjeren je najveći porast apsorbancije za 0.591, što pokazuje da je u tom uzorku došlo do najvećeg istjecanja DNA molekula. Uzorak tretiran 20 min, protokom plina 2 L/min nije pokazao porast apsorbancije.

Daljnijim mjerenjima ispitan je utjecaj hladne plazme na elektroporaciju stanica i istjecanje staničnih proteina koji apsorbiraju na valnoj duljini od 280 nm. Uzorak tretiran 1 min protokom plina od 1 L/min pokazuje porast apsorbancije od 0.635, dok ostali uzorci tretirani 1 min pokazuju pad apsorbancije. Uzorci tretirani 3 min također pokazuju pad apsorbancije, pri čemu

ukazuju na to da nije došlo do istjecanja staničnih proteina. Porast apsorbanije za 0.374 izmjeren je u uzorku tretiranom 5 min protokom plina od 1 L/min, a porast apsorbanije za 0.013 izmjeren je u uzorku tretiranom 5 min protokom plina od 1.5 L/min. U uzorku tretiranom 20 min protokom plina 2 L/min izmjeren je pad apsorbanije.

Ispitujući utjecaj hladne atmosferske plazme na membranu stanice bakterije *Escherichia coli*, Dolezalova i Lukes (2015) ukazuju na istjecanje DNA molekula kroz pore na membrani nastale zbog elektroporacije. Nakon tretmana plazmom, mjerenjem apsorbanije pri 260 nm, uočene su nukleinske kiseline, a dodatnim testiranjem na DNA molekule, potvrđena je prisutnost slobodne DNA u okolnom mediju stanica.

U radu Laroussi i sur. (2003) elektronskom mikroskopijom pokazan je utjecaj hladne plazme na Gram-negativnu bakteriju *Escherichia coli* te Gram-pozitivnu bakteriju *Bacillus subtilis*. Membrana bakterije *E. coli* pokazuje znatna oštećenja nakon tretmana, dok bakterije *B. subtilis* nisu pokazale znatne morfološke promjene, ali je uočen smanjen broj živih stanica, odnosno inaktivacija. Takav ishod ukazuje na drugačiju strukturu bakterije, ali i da postoje drugi mehanizmi kojima plazma utječe na inaktivaciju stanica, kao što je difuzija reaktivnih čestica poput slobodnih radikala kroz membranu stanice. Takve čestice mogu reagirati sa staničnim biomaterijalom i izazvati oštećenja te smrt stanice.

Morfološki, u usporedbi s bakterijskim stanicama, struktura kvasaca je čvršća i zbog toga je teže mehanički oštetiti membranu i postići potpunu inaktivaciju (Lee i sur., 2006), no zbog dobivenih rezultata u tablici 8 vidljivo je da u određenim uvjetima može doći do staničnog istjecanja. Ovakvi rezultati predstavljaju mogućnost korištenja hladne plazme za poraciju stanica kvasca i istjecanje njenog sadržaja. Takve stanice mogle bi se koristiti za različite svrhe te između ostalog i za genetsku manipulaciju.

#### 4.4.1. Rezultati statističke obrade za stanično istjecanje

Tablica 9. Statistička značajnost varijabli za elektroporaciju (A 260 nm)

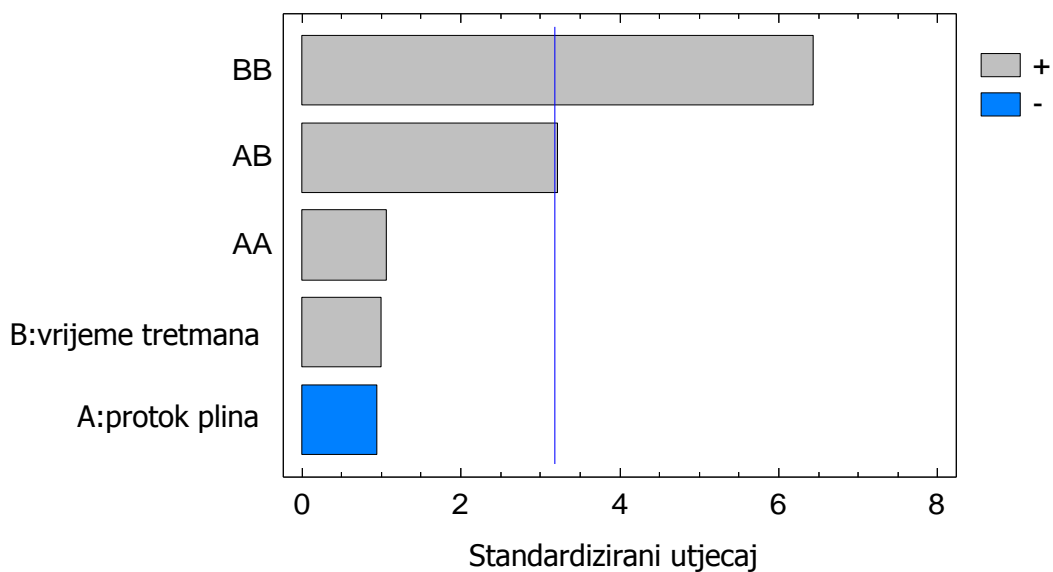
<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>D<sub>f</sub></i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>F-omjer</i>	<i>P-vrijednost</i>
<b>GLAVNI UČINCI</b>					
A:protok plina	0,0382402	1	0,0382402	0,91	0,4108
B:vrijeme tretmana	0,0418335	1	0,0418335	0,99	0,3923
<b>INTERAKCIJE</b>					
AA	0,0485681	1	0,0485681	1,15	0,3614
AB	0,4356	1	0,4356	10,35	0,0487
BB	1,74409	1	1,74409	41,44	0,0076
OSTATAK	0,126264	3	0,0420881		
UKUPNO (ISPRAVLJENO)	2,4346	8			

#### INTERAKCIJE

AA – kvadratna interakcija protoka plina

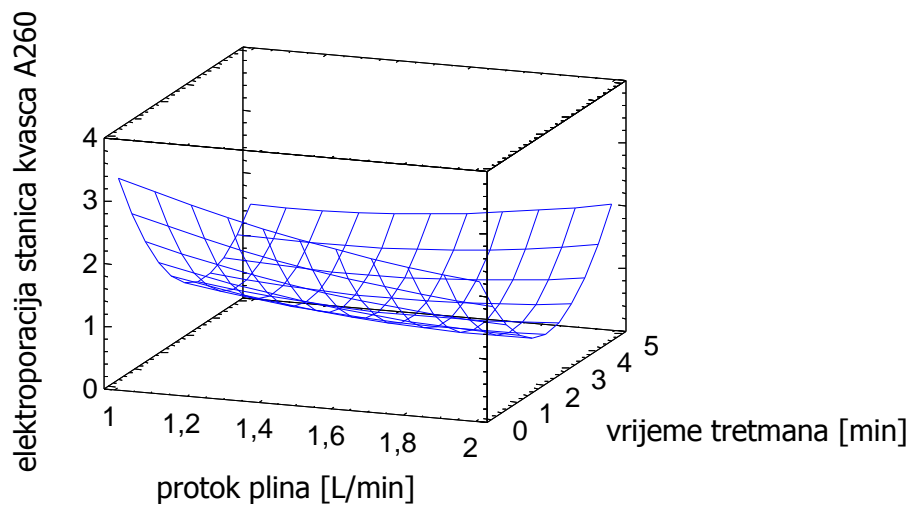
AB – interakcija protoka plina i vremena tretiranja

BB – kvadratna interakcija vremena tretiranja

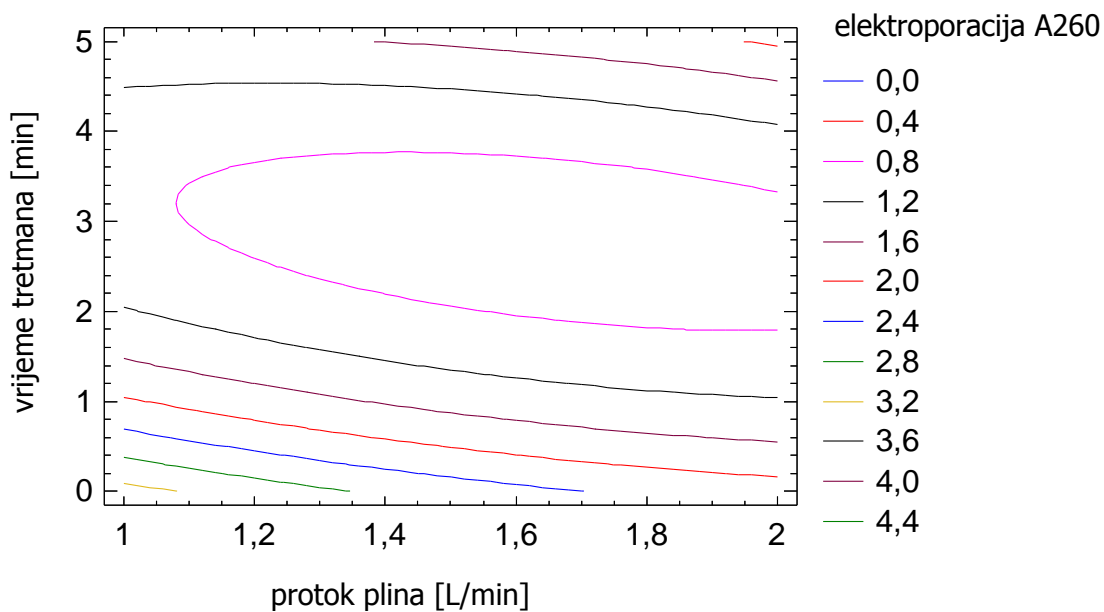


Slika 15. Standardizirani Pareto dijagram za elektroporaciju stanica kvasca A260





Slika 16. 3D dijagram odzivne površine za elektroporaciju stanica kvasca A260



Slika 17. Konturni dijagram odzivne površine za elektroporaciju stanica kvasca A260

Tablica 9 i slika 15 pokazuju da interakcije parametara AB (protok plina i vrijeme tretmana) te BB (kvadratna interakcija vremena tretiranja) imaju p – vrijednost manju od 0.05 te pokazuju statistički značajan utjecaj na elektroporaciju stanica kvasca A260.

Tablica 10. Statistička značajnost varijabli za elektroporaciju (A 280 nm)

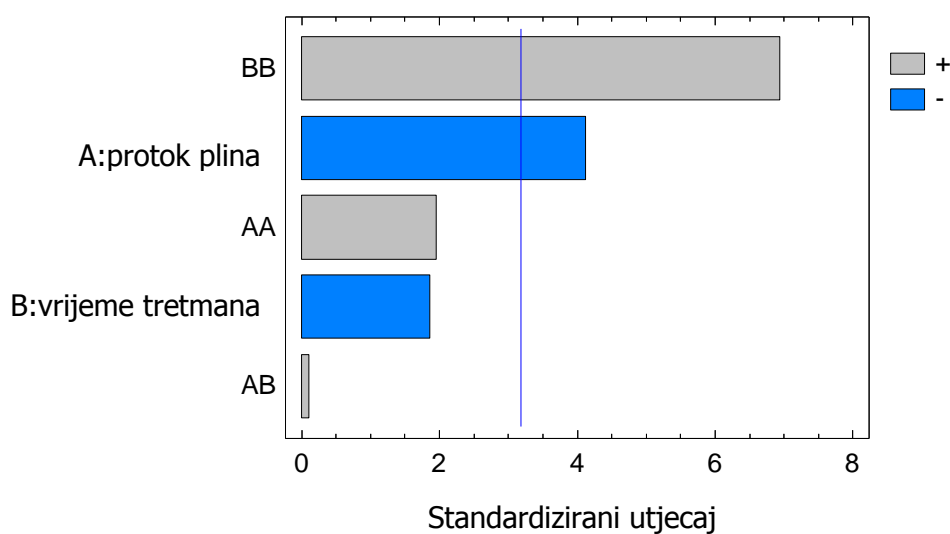
<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>D<sub>f</sub></i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>F-omjer</i>	<i>P-vrijednost</i>
<b>GLAVNI UČINCI</b>					
A:protok plina	0,697686	1	0,697686	17,07	0,0257
B:vrijeme tretmana	0,141373	1	0,141373	3,46	0,1598
<b>INTERAKCIJE</b>					
AA	0,157548	1	0,157548	3,86	0,1444
AB	0,00055225	1	0,00055225	0,01	0,9148
BB	1,97276	1	1,97276	48,28	0,0061
OSTATAK	0,122594	3	0,0408645		
UKUPNO (ISPRAVLJENO)	3,09251	8			

#### INTERAKCIJE

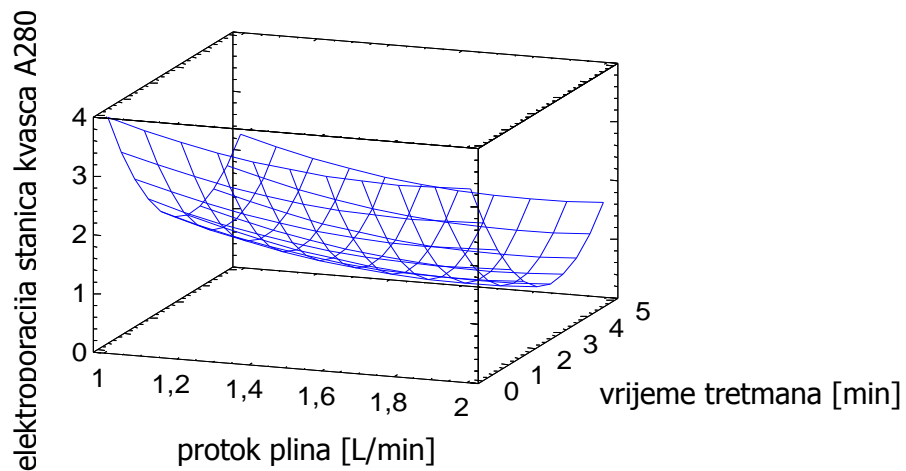
AA – kvadratna interakcija protoka plina

AB – interakcija protoka plina i vremena tretiranja

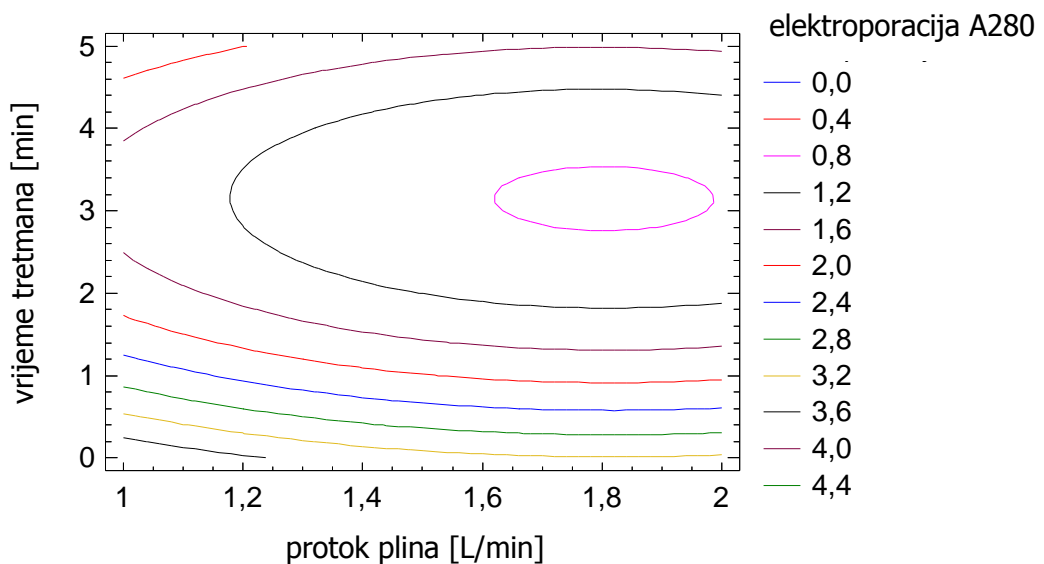
BB – kvadratna interakcija vremena tretiranja



Slika 18. Standardizirani Pareto dijagram za elektroporaciju stanica kvasca A280



Slika 19. 3D dijagram odzivne površine za elektroporaciju stanica kvasca A280



Slika 20. Konturni dijagram odzivne površine za elektroporaciju stanica kvasca A280

Tablica 10 i slika 18 pokazuju da glavni učinak A (protok plina) te interakcije BB (kvadratna interakcija vremena tretiranja) imaju  $p$  – vrijednost manju od 0.05 te pokazuju statistički značajan utjecaj na elektroporaciju stanica kvasca A280.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata te provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Tretmanom hladnom plazmom s protocima plina argona od 1, 1.5 i 2 L/min i vremenom tretiranja od 1, 3, 5 i 20 min nije postignuta inaktivacija stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* soja S288C.
2. Minimalan porast temperature nema utjecaja na inaktivaciju i broj stanica kvasca, no primijećeno je da vrijeme tretmana predstavlja statistički značajan utjecaj na temperaturu uzorka.
3. Prilikom tretmana hladnom plazmom primijećen je pad pH vrijednosti te porast provodljivosti u svim tretiranim uzorcima. Do najvećeg porasta provodljivosti od 216  $\mu\text{S}/\text{cm}$  došlo je za vrijeme tretiranja uzorka 20 min protokom 2 L/min zbog velike količine formiranih iona i nabijenih čestica u samom mediju. Pad pH vrijednosti i porast provodljivosti nisu imali utjecaja na inaktivaciju i broj stanica kvasca.
4. Mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 260 nm određeno je stanično istjecanje DNA molekula u nekim uzorcima. Uzorci tretirani 3 i 20 min nisu pokazali stanično istjecanje, a najveće stanično istjecanje postignuto je u uzorku tretiranom 5 min protokom plina od 2 L/min gdje je došlo do porasta apsorbancije za 0.591.
5. Rezultati mjerenih apsorbancija pri valnoj duljini od 280 nm pokazuju istjecanje staničnih proteina. Najveće stanično istjecanje postignuto je u uzorku tretiranom 1 min protokom plina od 1 L/min gdje je zabilježen porast apsorbancije za 0.635. U ostalim uzorcima tretiranim 1 min te uzorcima tretiranim 3 min i 20 min nije došlo do istjecanja staničnih proteina.

## 6. LITERATURA

- Bárdos L., Baránková H. (2010) Cold atmospheric plasma: Sources, processes, and applications. *Thin Solid Films* **518(23)**: 6705 – 6713.
- Bogaerts A., Neyts E., Gijbels R. (2001) Gas discharge plasmas and their applications. *Spectrochimica Acta Part B* **57**: 609 – 658.
- Dolezalova E., Lukes P. (2015) Membrane Damage and Active but Nonculturable State in Liquid Cultures of *Escherichia coli* Treated with an Atmospheric Pressure Plasma Jet. *Bioelectrochemistry* **103**: 7 – 14.
- Goldston R. J., Rutherford P. H. (1995) Introduction to Plasma Physics, 1. izd., Taylor & Francis Group. str. 1
- Heinlin J., Morfill G., Landthaler M., Stolz W., Isbary G., Zimmermann J. L., Shimizu T., Karrer S. (2010) Plasma medicine: possible applications in dermatology. *Journal of the German Society of Dermatology* **8(12)**: 968 – 976.
- Johnson E. A., Echavarri-Erasun C. (2011) The Yeasts, 5. izd., Elsevier. str. 25.
- Kong M. G., Ganguly B. N., Hicks R. F. (2012) Plasma jets and plasma bullets. *Plasma Sources Science and Technology* **21**: 1 – 3.
- Laroussi M., Mendis D. A., Rosenberg M. (2003) Plasma Interaction with Microbes. *New Journal of Physics* **5**: 41.1 – 41.10.
- Lee K., Paek K., Yu W., Lee Y. (2006) Sterilization of Bacteria, Yeast, and Bacterial Endospores by Atmospheric-Pressure Cold Plasma using Helium and Oxygen. *The Journal of Microbiology* **44(3)**: 269 – 275.
- Mance D. (2017) Primjena plazme u medicini i stomatologiji. *Medicina Fluminensis* **53(2)**: 179 – 190.
- Moreau M., Orange N., Feuilloley M. G. J. (2008) Non-thermal plasma technologies: New tools for bio-decontamination. *Biotechnology Advances* **26(6)**: 610 – 617.
- Mortimer R. K., Johnston J. R. (1986) Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics* **113(1)**: 35 – 43.
- Niemira B. A. (2012) Cold Plasma Decontamination of Foods. *Annual Review of Food Science and Technology* **3**: 125 – 142.

- Pankaj S. K., Keener K. M. (2017) Cold plasma: background, applications and current trends. *Current Opinion in Food Science* **16**: 49 – 52.
- Ryu Y. H., Kim Y. H., Lee J. Y., Shim G. B., Uhm H. S., Park G., Choi E. H. (2013) Effects of Background Fluid on the Efficiency of Inactivating Yeast with Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma. *PLoS ONE* **8(6)**: e66231.
- Schutze A., Jeong J. Y., Babayan S. E., Park J., Selwyn G. S., Hicks R. F. (1998) The atmospheric-pressure plasma jet: a review and comparison to other plasma sources. *IEEE Transactions on Plasma Science* **26(6)**: 1685 – 1694.
- Smet C., Baka M., Steen L., Fraeye I., Walsh J. L., Valdramidis V. P., Van Impe J. F. (2018) Combined Effect of Cold Atmospheric Plasma, Intrinsic and Extrinsic Factors on the Microbial Behavior in/on (Food) Model Systems During Storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 10.1016/j.ifset.2018.05.016.
- Thirumdas R., Sarangapani C., Annapure U. S. (2014) Cold Plasma: A novel Non-Thermal Technology for Food Processing. *Food Biophysics* **10(1)**: 1 – 11.
- Walker G. M. (1998) *Yeast Physiology and Biotechnology*, John Wiley & Sons Ltd. str. 1 – 3; str. 146.
- Walker G. M. (2009) *Yeasts*. U: Desk encyclopedia of microbiology, 2. izd., Schaechter M., ur., Elsevier Inc., Dundee. str. 1174 – 1189.
- Wan J., Coventry J., Swiergon P., Sanguansri P., Versteeg C. (2009) Advances in innovative processing technologies for microbial inactivation and enhancement of food safety – pulsed electric field and low – temperature plasma. *Trends in Food Science & Technology* **20**: 414 – 424.
- Ziuzina D., Patil S., Cullen P. J., Keener K. M., Bourke P. (2013) Atmospheric Cold Plasma Inactivation of *Escherichia coli* in Liquid Media Inside a Sealed Package. *Journal of Applied Microbiology* **114(3)**: 778 – 787.

## 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.*

*Ema MARIĆ*

ime i prezime studenta