

Netoplinski procesi i kvasci u prehrambenoj industriji

Kovačević, Tvrtko Karlo

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:487027>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-18**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno – biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Tvrtko Karlo Kovačević
6882/PT

**NETOPLINSKI PROCESI I KVASCI U PREHRAMBENOJ
INDUSTRIJI**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Fizikalna svojstva složenih sustava – hrane
Mentor: Prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak

Zagreb, 2019.

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno – biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija
Zavod za prehrambeno – tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za procesno - prehrambeno inženjerstvo

NETOPLINSKI PROCESI I KVASCI U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI

Tvrtko Karlo Kovačević 0058204386

Sažetak: Svrha ovog rada je upoznati biološke značajke soja kvasca *Saccharomyces cerevisiae* tzv. pekarskog odnosno pivskog kvasca te se bolje upoznati s upotrebom kvasaca prvenstveno u prehrambenoj industriji, ali i u drugim područjima poput biotehnologije u svrhu razvoja probiotika, industrije biodizela gdje se kvasac kao takav koristi za dobivanje alternativnih izvora goriva, zatim u znanosti gdje se kvasac, točnije soj kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, koristi kao model organizam za istraživanja gena, njihovih lokacija te ekspresija. Nadalje, cilj rada je obližnje opisati biofilm kao mehanizam koji omogućuje velikom broju mikroorganizama preživljavanje u brojnim uvjetima i na brojnim podlogama. Uz navedeno, rad opisuje i nove tehnike procesiranja hrane koje omogućuju procesiranje pri sobnim temperaturama s gotovo nikakvim utjecajem na nutritivna svojstva pri čemu se dobiva proizvod visoke kvalitete. Takve tehnike se još nazivaju netoplinske, a u njih spadaju: ultrazvuk, pulsirajuće električno polje, visoki hidrostatski tlak, UV – C, hladna atmosferska plazme.

Ključne riječi: kvasci, *Saccharomyces cerevisiae*, biofilm, ne toplinski procesi, plazma

Rad sadrži: 28 stranica, 6 slika, 38 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof.dr.sc. Anet Režek Jambrak

Pomoć pri izradi: Višnja Stulić, mag.ing.

Datum obrane: 09.09.2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Food Technology
Department of Food Engineering
Laboratory for Food Processes Engineering

NON-THERMAL TECHNIQUES AND YEASTS IN FOOD INDUSTRY

Tvrtko Karlo Kovačević 0058204386

Abstract: The purpose of this paper is to get acquainted with the biological properties of a yeast strain called *Saccharomyces cerevisiae*, so-called baker's yeast or beer yeast, and to be better acquainted with the use of yeasts primarily in the food industry, but also in other areas, such as biotechnology for the development of probiotics, the biodiesel industry - where yeast as such is used to obtain alternative sources of fuel and then in science where yeast, the *Saccharomyces cerevisiae* strain, is used as a model for gene research, their location and expression. Furthermore, the aim of the paper is to describe biofilm as a mechanism that enables a large number of microorganisms to survive in numerous conditions and on numerous substrates. In addition, the paper describes new food processing techniques that allow processing at room temperature with virtually no influence on nutritional properties, resulting in a high quality product. Such techniques are still termed as non – thermal techniques and they include: ultrasound, pulsating electric field, high hydrostatic pressure, UV – C and cold atmospheric plasma.

Key words: yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, biofilm, non – thermal techniques, plasma

Thesis contains: 28 pages, 6 figures, 38 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, 23 Kačićeva street, Zagreb

Mentor: PhD. Anet Režek Jambrak, Full Profesor

Technical support and assistance: Višnja Stulić, MSc Scientific Assistant

Defence date: September 9th, 2019

Sadržaj

1. UVOD.....	4
2. TEORIJSKI DIO	5
2.1. Definicija kvasaca.....	5
2.2. Saccharomyces	5
2.2.1. Morfologija	5
2.2.2. Razmnožavanje	6
2.3. Primjena kvasaca.....	7
2.3.1. Pekarska industrija	8
2.3.2. Industrija alkoholnih pića	9
2.3.3. Biotehnologija.....	10
2.3.4. Biogorivo	11
2.3.5. Znanstvene svrhe.....	11
2.4. Biofilm.....	13
2.5. Ne toplinski procesi	15
2.5.1. Vrste tehnika	15
2.5.2. Ultrazvuk.....	15
2.5.3. Pulsirajuće električno polje (PEP)	16
2.5.4. Svjetlo jakog intenziteta.....	17
2.5.5. Visoki hidrostatski tlak	18
2.5.6. Plazma	18
3. ZAKLJUČAK	24
4. LITERATURA	25

1. UVOD

Fermentirana hrana je među najstarijom proizvedenom hranom, a uz to je i tradicionalni dio prehrane gotovo u cijelome svijetu. Najraniji spomeni fermentirane hrane, točnije fermentiranih mliječnih i mesnih proizvoda, datiraju još od Babilona 5000 godina prije nove ere, dok priprema kruha potječe iz Egipta prije više od 3500 godina (Herceg, 2011). U našim krajevima proizvodnja domaće fermentirane hrane poput kruha, sira i vina poznato je već tisućama godina. Alkoholna pića proizvode se nekoliko stoljeća fermentacijom sokova voća, bobica ili šećernih nusproizvoda. Razvojem prehrambene industrije pogotovo polovinom prošlog stoljeća dolazi do razvoja raznih fermentacijskih procesa odnosno kontinuiranih anaerobnih fermentacija. Razvoj tih istih procesa doveo je i do mogućnosti zbrinjavanja otpadnih tvari organskog porijekla, pri čemu se navedene otpadne tvari mogu upotrebljavati ponovo kao hranjive podloge za rast i razvoj mikroorganizama zaslužnih za odgovarajuće fermentacijske procese (Herceg, 2011). Vrenje provode raznih mikroorganizmi kao što su bakterije, plijesni, kvasci. No, što je s kvalitetom hrane? Sa sigurnošću iste?

Danas se prehrambena industrija susreće sa čitavim nizom novih zahtjeva od strane potrošača kojima ona nastoji udovoljiti. Traži se da hrana koju konzumiraju bude zdravstveno ispravna, nutritivno vrijedna, ukusna i prikladna za brzu pripremu i konzumaciju. Drugim riječima potrošači traže hranu koja je visoke kakvoće i da su joj izvorne nutritivne značajke što manje promijenjene. Stoga se znanstvena istraživanja na području prehrambene tehnologije sve više bave proučavanjem operacija i procesa kojima je svrha proizvesti prehrambene proizvode što više nutritivne vrijednosti i što boljih organoleptičkih svojstava pri čemu je vrlo važno odabrati odgovarajuće operacije i uređaje te optimizirati procesne parametre kako bi se u što je mogućoj mjeri narušila izvorna kakvoća sirovine, ali isto tako dobio proizvod visoke kvalitete (Giacometti, J. i sur. 2018). Kako bi se takav zahtjev ispunio, procesi proizvodnje hrane se su se morali promijeniti u smjeru primjene tzv. alternativnih postupaka. Ti novi postupci mogli bi zamijeniti standardne metode koje su trenutačno u primjeni jer osim što se dobije proizvod bolje kakvoće, omogućuje se brža i ekonomičnija obrada sirovina, odnosno štedi se energija i resursi potrebni za provođenje procesa što u konačnici rezultira i kraćim trajanjem procesa. Jedan od novijih postupaka obrade hrane je hladna plazma.

Cilj ovog rada je pojasniti kvasce i njihovu ulogu tijekom fermentacije u prehrambenoj industriji te po bližnje pojasniti osnove dobivanja i uporabe hladne plazme kao novog ne termalnog postupka pri obradi hrane.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Definicija kvasaca

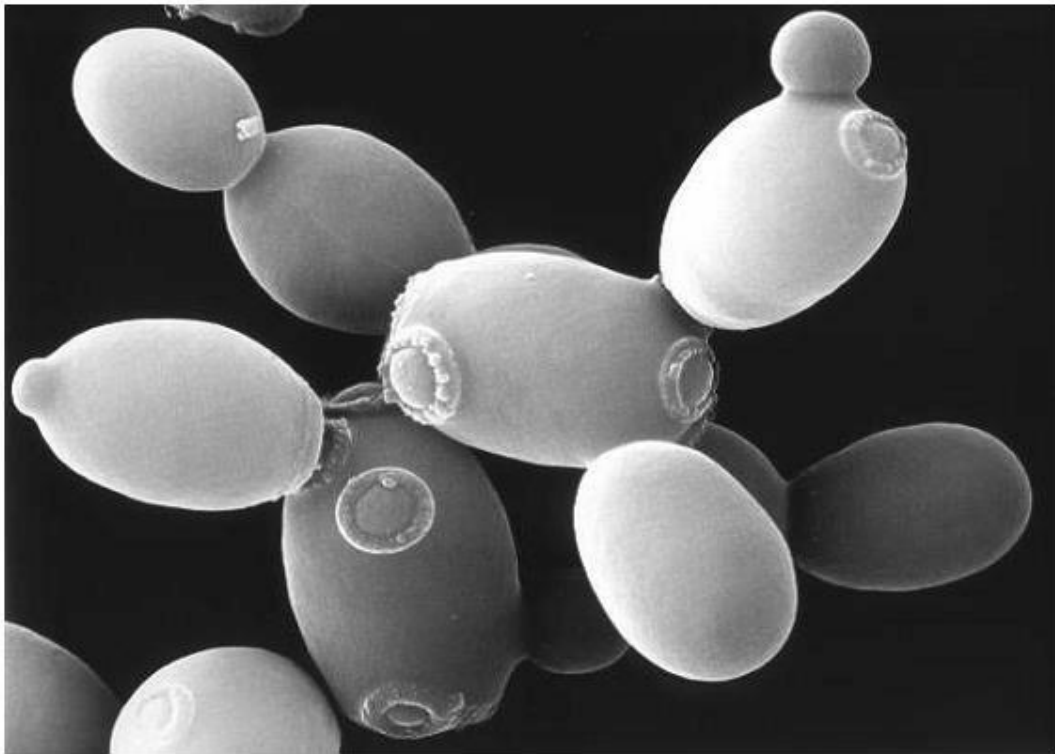
Kvasci su eukariotski, jednostanični mikroorganizmi klasificirani kao članovi kraljevstva gljiva. Prvi kvasac nastao je prije stotina milijuna godina, a trenutno je identificirano 1500 vrsta. Procjenjuje se da čine 1% svih opisanih vrsta gljiva (Kurtzman, Fell 2006). Kvasci su jednostanični organizmi koji su se razvili iz višestaničnih pretka, pri čemu neke vrste imaju sposobnost razvijanja višestaničnih karakteristika formiranjem žica povezanih stanica poznatih kao pseudohife ili lažne hife. Veličina kvasca razlikuje se, ovisno o vrsti i okolišu, ali obično su promjera 3-4 μm , iako neki kvasci mogu rasti do veličine 40 μm . Većina kvasaca se reproduciraju aseksualno tj. mitozom, a mnogi to čine pomoću postupka asimetrične podjele poznatog kao pupanje (Kurtzman, Fell 2005).

2.2. Saccharomyces

Saccharomyces je rod gljiva koja uključuje mnoge vrste kvasaca poput *arboricolus*, *bayanus*, *boulardii*, *bulderi*, *cariocanus*, *cariocus*, *cerevisiae*, *chevalieri*, *dairenensis*, *ellipsoideus*, *eubayanus*, *exiguus*, *florentinus*, *fragilis*, *kluysteri*, *kudriavzevii*, *martinae*, *mikatae*, *monacensis*, *norbensis*, *paradoxus*, *pastorianus*, *spencerorum*, *turicensis*, *unisporus*, *uvarum*, *zonatus* te još mnoge druge. Mnogi članovi ovog roda smatraju se vrlo važnima u proizvodnji hrane. Jedan primjer je *Saccharomyces cerevisiae*, koji se koristi za proizvodnju vina, kruha i piva. Poznat je još kao pivski kvasac ili pekarski kvasac. Dok s druge strane, na primjer, *Saccharomyces boulardii* se koristi u medicini kao preventiva za proljev povezan s antibioticima.

2.2.1. Morfologija

Kolonije *Saccharomyces* rastu brzo i zrele su u tri dana. Ravne su, glatke, vlažne, sjajne ili nejasne, i boje vrhnja. Nemogućnost upotrebe nitrata i sposobnost fermentacije raznih ugljikohidrata su tipične karakteristike roda *Saccharomyces*. Općenito, oni imaju promjer od 2-8 μm i duljina od 3-25 μm . Tipično je multipolarno pupanje. *Saccharomyces* proizvodi askospore, a one su okrugle i nalaze se u askusu. Svaka aska sadrži 1-4 askospora te ona ne puca do zrelosti. Prilikom bojanja po Gramu, askospore se pojavljuju kao Gram - negativne, dok se vegetativne stanice pojavljuju kao Gram - pozitivne.



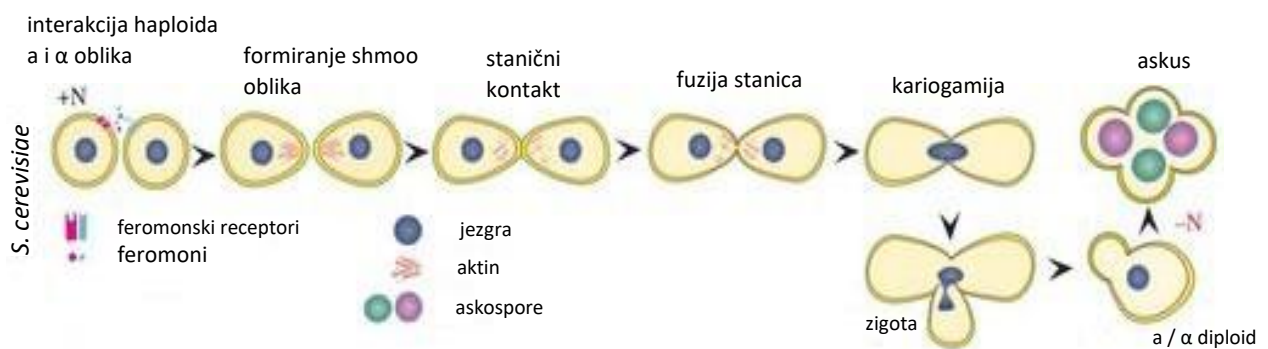
Slika 1. Morfologija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Anonymus 1, 2019).

2.2.2. Razmnožavanje

Kao što je prikazano na slici 2, može postojati u haploidnom i diploidnom obliku. Uz dane adekvatne hranjive tvari, haploidi i diploidi mogu proći kroz brojne ponovljene krugove vegetativnog rasta i mitoze. Haploidi postoje u dva tipa parenja zvane „a” i „α” (č: a i alfa). Haploidi tipa parenja „a” proizvode feromon „a faktor” i haploidi tipa parenja „α” proizvode feromon „α faktor”. Svaka vrsta stanica ima stanični površinski receptor za feromon koji proizvode stanice suprotnog tipa parenja. Tako a faktor uzrokuje u α haploidima zaustavljanje u G1 fazi staničnog ciklusa, a α faktor ima isti učinak na a stanice. Posljedično, kada su prisutni jedni i drugi, haploidi suprotnog tipa parenja prekidaju proliferaciju i započinju razvoj međusobnih izbočina.

Dobiveni oblik naziva se „shmoo” (Dickinson i Schweizer 2004). Na kraju, dolazi do staničnog kontakta i kasnije fuzije, koja kulminira formiranjem diploida. Kad hranjive tvari postanu iscrpljene, oba haploida i diploida zaustavljaju se kao stacionarna faza stanice. Oni su morfološki i biokemijski različiti od proliferirajućih stanica kvasca. U usporedbi s proliferacijom stanice, stacionarne faze stanice također imaju povećanu otpornost na veliki broj naprezanja i nepovoljne uvjete okoline (Werner-Washburne 1993). Diploidne stanice izgladnjene dušikom i u prisutnosti siromašnog izvora ugljika kao što je acetat će proći mejozu i stvaranje spora.

Formiraju se četiri haploidne spore koje su sadržane unutar askusa. Spore imaju još veću otpornost na okolišne ekstreme od stanica u stacionarnoj fazi. Ako se spore vraćaju u bogate hranjive uvjete one će klijati i započet će rast kao haploidi. Budući da formiranje spora uključuje mejozu, neki haploidni potomci imaju različite kombinacije gena i mutacija od onih prisutnih u izvornim roditeljima. Zid askusa se probavlja pomoću glukanaze i tada se četiri pojedinačne spore iz svakog askusa prenose na medij kako bi rasle kao haploidni klonovi. Precizna kombinacija gena i mutacije u svakom klonu spora može se odrediti analizom njegovog fenotipa genetskim putem. Lažne hife i haploidne niti lako se prepoznaju po tome što su stanice dulje. Oni su oboje različiti razvojni oblici i nisu samo "grube" ili ljepljive stanice. Općenito se vjeruje da ova filamentacija omogućuje konzumaciju hrane daleko od mjesta na kojem je nastala kolonija. Vegetativna proliferacija kvasca preko pupanja jedna je od najpoznatijih značajki u biologiji (Dickinson i Schweizer 2004).



Slika 2. Prikaz životnog ciklusa kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Anonymus 2, 2019).

2.3. Primjena kvasaca

Fermentirana hrana je među najstarijom proizvedenom hranom, a uz to je i tradicionalni dio prehrane gotovo u cijelome svijetu. U našim krajevima proizvodnja domaće fermentirane hrane poput kruha, sira i vina poznato je već tisućama godina. Alkoholna pića proizvode se nekoliko stoljeća fermentacijom sokova voća, bobica ili šećernih nusproizvoda. Razvojem prehrambene industrije pogotovo polovinom prošlog stoljeća dovodi do razvoja raznih fermentacijskih procesa odnosno kontinuiranih anaerobnih fermentacija. Razvoj tih procesa doveo je i do mogućnosti zbrinjavanja otpadnih tvari organskog porijekla, pri čemu se navedene otpadne tvari mogu upotrebljavati ponovo kao hranjive podloge za rast i razvoj mikroorganizama zaslužnih za odgovarajuće fermentacijske procese (Herceg, 2011).

Mnoge prehrambene industrije danas upotrebljavaju fermentacijske procese pri procesiranju hrane. Na primjer, pekarska industrija, industrija alkoholnih pića, mesna industrija, mliječna industrija itd. Odnosno drugim riječima mliječno – kisela fermentacija i alkoholna fermentacija su među najvažnijim komercijalnim fermentacijama u prehrambenoj industriji. Tijekom procesa fermentacije koristi se kontrolirano djelovanje odabranih mikroorganizama za promjenu teksturalnih svojstava namirnica, za konzerviranje hrane proizvodnjom kiselina ili alkohola, ili za proizvodnju specifičnih okusa i aroma što povećava kvalitetu, a samim time povećava i vrijednost proizvoda kao na primjer sirevi s plemenitim plijesnima.

Osim toga, fermentacija hrane (danas) se provodi zbog pet glavnih razloga: kako bi se obogatila prehrana ljudi raznolikošću okusa, aroma i tekstura, kako bi se održala znatna količina hrane preko produkata vrenja (laktata, alkohola, octene kiseline itd), kako bi se sirovina obogatila proteinima, esencijalnim kiselinama i vitaminima zatim kako bi se uklonili antinutrijenti koji sprječavaju apsorpciju nutrijenata te kako bi se smanjilo vrijeme potrebno za pripremu hrane, a samim time i količina energije potrebna za provođenje pripreme.

Prema Hercegu (2011) glavne prednosti fermentacije kao metode za proizvodnje hrane su:

- upotreba blagih procesnih uvjeta (pH i temperatura) čime dolazi do minimalne promjene nutritivne vrijednosti i senzorskih karakteristika hrane
- proizvodnja hrane koja ima okus i teksturu koja se ne može proizvesti drugim metodama (sirevi s plijesni)
- mala potrošnja energije tijekom fermentacijskih procesa
- relativno mali troškovi proizvodnje
- relativno jednostavna tehnologija

2.3.1. Pekarska industrija

U pekarskoj industriji kvasac koji se koristi za pečenje kruhova, peciva te ostalih pekarskih proizvoda jest *Saccharomyces cerevisiae* ili kolokvijalno još zvan pekarski kvasac. *Saccharomyces cerevisiae* još je poznat i pod nazivom pivski kvasac jer mu je prva primjena zapravo bila vezana za proizvodnju piva, a ne kruha. Kasnije se tek saznalo da se može primijeniti i za proizvodnju kruha. Enzimi tokom pečenja provode reakciju vrenja čiji jedan od produkata je ugljikov dioksid (CO₂). Nastali ugljikov dioksid se koristi kao sredstvo za podizanje stvarajući brojne mjehuriće tj. džepove ispunjene plinom. To se u konačnici očituje podizanjem tijesta i dobivanjem porozne strukture kruha što kruh čini mekšim te lakšim za konzumaciju.

2.3.2. Industrija alkoholnih pića

U industriji alkoholnih pića idealna sirovina za proizvodnju alkohola jest melasa. Melasa predstavlja posljednji matični sirup koji nastaje kod kristalizacije šećera. To je vrlo viskozna tekućina tamnosmeđe boje, makar može biti i crne, koja u svom sastavu sadrži i do 50% šećera saharoze. Osim saharoze u sastavu melase nalazi se još oko 30% ne šećera, do 20% vode te brojni drugi sastojci. U početku procesa potrebno je melasu razrijediti vodom do udjela suhe tvari između 20 i 25%. Nakon toga dobivena suspenzija se zakiseli dodatkom sumporne kiseline na pH od 4,8 do 5,4. Tek kod ovog pH i udjela suhe tvari od 20 do 25% su stvoreni uvjeti za vrenje. No, prije dodavanja kvasca, odnosno enzima, suspenzija se sterilizira toplinom, grijanjem do 80 °C. Takvoj steriliziranoj otopini dodaju se minerali amonijevog sulfata i super fosfata za poboljšani rast kvasca te se na posljetku dodaje i sami kvasac radi fermentacije. Djelovanje enzima kvasca invertaze dolazi do inverzije molekula saharoze tj. do hidrolitičkog cijepanja saharoze na glukozu i fruktozu koji djelovanjem čitavog niza drugih enzima prelaze u etilni alkohol i ugljikov dioksid. Prosječni volumen alkohola koji se dobije ovim vrenjem u proizvodnim uvjetima iznosi 58 do 60 litara na 100 kila melasa. Prilikom proizvodnje piva nastupaju četiri promjene koje definiraju ovu transformaciju; općenito to su uklanjanje slatkoće djelovanjem kvasca i njegovom zamjenom alkoholom, stvaranje kiselina djelovanjem kvasca i uklanjanje pufera, a time i snižavanje pH, karbonizacija uzrokovana formiranjem CO₂ zbog djelovanja kvasca i stvaranje i oslobađanje mnoštva metaboličkih otpadaka, svaki u niskoj koncentraciji. Na taj način kvasac veličanstveno poboljšava i otkriva temeljni okus piva dobivenih prvenstveno od slada i hmelja (Lewis i Bamforth, 2006). Nadalje, da bi dobiveni alkohol bio u potpunosti spreman za konzumaciju, odnosno da bi piće sazrijelo potrebno je provesti takozvanu sekundarnu fermentaciju.

Ona se provodi na različite načine ovisno o vrsti pića koja se proizvodi. Naime, kod piva se sekundarno vrenje provodi kako bi se zadržao CO₂ u pivu i dao mu svježinu, dok se kod vina točnije crnog vina, provodi malatno – mliječna fermentacija kojom se malatna kiselina prevodi u mliječnu kiselinu čime se smanjuje kiselost i poboljšava okus i aroma. *Saccharomyces cerevisiae* nije jedini kvasac iz roda *Saccharomyces* koji se koristi u proizvodnji piva. Tako se na primjer za proizvodnju engleskog piva koristi *Saccharomyces cerevisiae*, dok se za proizvodnju lager piva koristi *Saccharomyces carlsbergensis*. Međutim *Saccharomyces cerevisiae* se koristi i za proizvodnju vina pri čemu šećeri prisutni u grožđanom soku vrenjem daju 7 – 14% alkohola. Ni to nije jedini kvasac koji se koristi u proizvodnji vina, makar se pokazao kao najbolji jer generalno gledano daje pouzdane i pozitivne attribute vinu koje se proizvodi.

Vrste kvasaca koji se mogu koristiti za proizvodnju vina, a da su iz roda *Saccharomyces* su *bayanus*, *beticus*, *fermentati*, *paradoxus*, *pastorianus*, i *uvarum*, dok se u svrhe dobivanja korisnih atributa ili kao defekt u vinu mogu još pronaći sljedeći kvasci: *Brettanomyces*, *Saccharomycodes*, *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces* koji je jedini vinski kvasac koji se razmnožava diobom, a ne pupanjem te *Kloeckera* koji se još naziva i „ubojicom kvasaca“ jer proizvodi etil acetat i octenu kiselinu u tolikoj mjeri da inhibiraju i „ubijaju“ *Saccharomyces cerevisiae*.



Slika 3. Svakidašnji proizvodi pripremljeni uz pomoć kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.

2.3.3. Biotehnologija

U posljednje vrijeme krenula su istraživanja u svrhu dokazivanja bi li se mogli kvasci koristiti kao probiotik. Jedno takvo istraživanje se provelo i ono tvrdi da jedino probiotik koji je sadržavao kvasce *Saccharomyces boulardii* je zaista imao pozitivan učinak ili kao preventiva ili kao terapijsko sredstvo za dijareju i druge gastrointestinalne poremećaje uzrokovane zbog prevelike doze antimikrobnih sredstava. Ono što ga čini dobrim probiotskim sredstvom je to što se ne razgrađuje prilikom prolaska kroz probavni trakt, što mu je optimalna temperatura 37 °C i što inhibira rast mikrobnih patogena (Czerucka i sur., 2007).

Isprva je klasificiran kao različita vrsta od *Saccharomyces cerevisiae* 1994. godine, no razvojem tehnologije i metoda te daljnjim istraživanjima dokazano je da su *S. cerevisiae* i *S. boulardii* zapravo pripadnici iste vrste makar se genetski, metabolički i fiziološki značajno razlikuju. Hennequin i sur., kako navodi Czerucka, identificirao je specifični mikro satelitski alel *S. boulardii* koji ga bitno razlikuje od *S. cerevisiae*. U provedenim kliničkim istraživanjima pokazalo se da *S. boulardii* pomaže kod dijareje uzrokovane od antibiotika, putničke dijareje, akutne dijareje u djece, kod dijareje u pacijenata koji primaju hranu putem hranidbenih sondi, kod pacijenata koji pate od upalnih bolesti crijeva, sindroma razdražljivih crijeva pa čak i kod pacijenata kojima je dijareja povezana sa AIDS-om, makar ne postoji još dovoljno znanstvenih podataka da se te tvrdnje pokažu zaista istinite, navodi Czerucka i sur. (2007).

2.3.4. Biogorivo

Posljednjih godina, biodizel je dobio sve veći interes zbog energetske krize diljem svijeta, uz iscrpljujuće rezerve i nedostatka opskrbe naftom. Glavni problem korištenja biljnog ulja za proizvodnju biodizela je održivost jer se izravno natječe s ljudskom hranom. Za borbu protiv ovog problema razvijeni su i drugi obnovljivi izvori, jer su mikrobna ulja slična biljnim uljima i intenzivno se koriste za proizvodnju biodizela. Nedavno su predloženi uljni kvasci kao mikroskopske bio tvornice i alternativni proizvođači lipida u biljno ulje za održivu biodizelsku industriju. Riječ je o potencijalno novoj tehnologiji u kojoj se nejestive lignocelulozne biomase iskorištavaju kao sirovine za proizvodnju biodizela od uljnih kvasaca koji spuštaju emisije stakleničkih plinova zamjenom fosilnih goriva. Ne-jestiva lignocelulozna biomasa, sastoji se od tri različite vrste prirodnih polimera, naime celuloze, hemiceluloze i lignina. Tri najbrojnija obnovljiva resursa u biosferi (Patel i sur., 2016).

2.3.5. Znanstvene svrhe

Kada istraživači traže organizam koji će koristiti u svojim istraživanjima, traže nekoliko osobina. Među njima su veličina, vrijeme generiranja, dostupnost, manipulacija, genetika, očuvanje mehanizama i potencijalna ekonomska korist. *S. cerevisiae* se razvio kao model organizma jer odgovara broju zadanih kriterija. Kao jednostanični organizam, *S. cerevisiae* je malen organizam s kratkim vremenom generacije (vrijeme udvostručenja od 1,25-2 sata na 30 ° C) i lako se može uzgajati.

To su pozitivne karakteristike jer omogućuju brzu proizvodnju i održavanje višestrukih uzoraka po niskoj cijeni. Dijeli se s mejozom, dopuštajući time da se koristi kao kandidat za istraživanje seksualne genetike. Kvasac se može transformirati dopuštajući ili dodavanje novih gena ili deleciju putem homologne rekombinacije. Ima sposobnost da se uzgaja kao haploid što pojednostavljuje stvaranje sojeva. Kao eukariot, *S. cerevisiae* dijeli složenu unutrašnju strukturu stanica biljaka i životinja bez visokog postotka nekodirajuće DNA koja može zbuniti u istraživanjima u višim eukariotima.

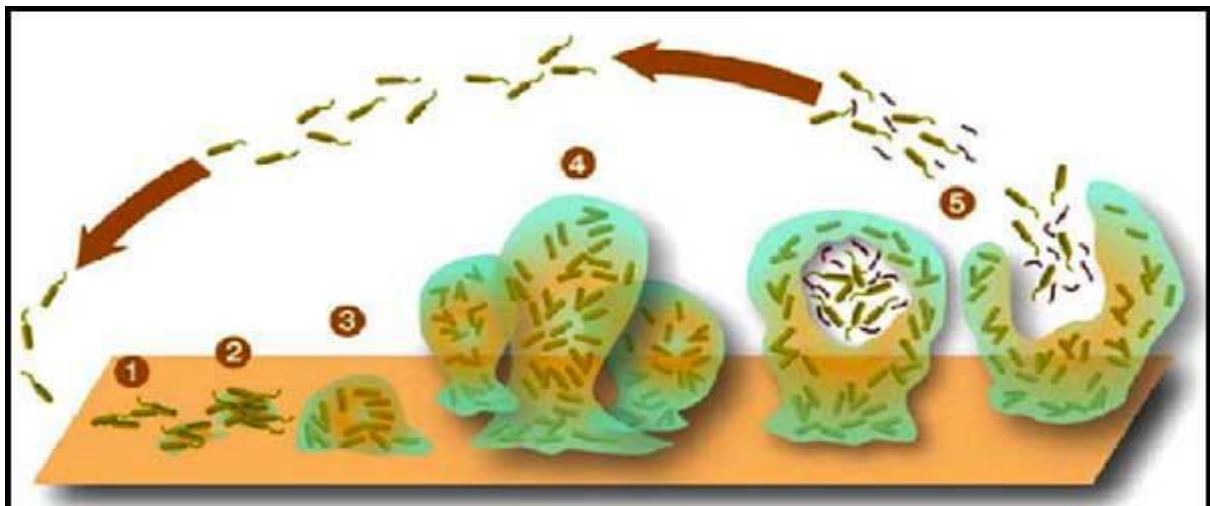
Nadalje, *S. cerevisiae* se koristi u istraživanjima starenja. Proučavan je preko pet desetljeća kao model kako bi se bolje razumjelo starenje. Pridonio je identifikaciji više gena u sisavaca koji utječu na starenje od bilo kojeg drugog modela organizma (He i sur., 2018). Neke od tema koje se proučavaju pomoću kvasca su ograničavanje kalorija, kao i geni i stanični putevi koji su uključeni u starenje. Dvije najčešće metode mjerenja starenja u kvascu su replikativni životni interval koji mjeri koliko puta se stanica podijeli i kronološki životni vijek koji mjeri koliko stanica može preživjeti u stanju kada se ne dijeli. Upravo *S. cerevisiae* je idealni model preko kojeg se može holistički pristupiti kako bi se u potpunosti razumjelo starenje (He i sur., 2018). Majke stanice izazivaju potomstvo pupoljaka mitotičkim podjelama, ali prolaze kroz replicirano starenje preko uzastopnih generacija i na kraju umiru. Međutim, kada majka stanica prolazi kroz mejozu i gametogenezu, životni vijek se resetira (Unal i sur., 2011). Replikativni potencijal gameta odnosno spora formiranih od starijih stanica je isti kao gamete koje formiraju mlade stanice, što ukazuje na to da je oštećenje povezano sa starošću uklonjeno mejozom iz starih majčinih stanica. Ova promatranja upućuju na to da tijekom uklanjanja oštećenja povezanih sa starošću mejoza dovodi do pomlađivanja (He i sur., 2018). Ipak, priroda tih oštećenja ostaje na utvrđivanju. *S. cerevisiae* bio je prvi eukariot kojem je genom potpuno sekvencioniran (Goffeau i sur., 1996). Genomska sekvenca puštena je u javnu domenu 24. travnja 1996. Od tada se redovito ažuriranje održava na bazama podataka *Saccharomyces* genoma. Genom se sastoji od oko 12,156,677 parova baza i 6,275 gena, kompaktno organiziranih na 16 kromosoma (Goffeau i sur., 1996). Vjeruje se da je samo oko 5.800 tih gena funkcionalno. Procjenjuje se da najmanje 31% gena tog kvasca ima homologe u ljudskom genomu (Botstein i sur., 1997). Cilj je formirati funkcionalnu mapu procesa stanica. Od 2010. godine model genetskih interakcija je najcjelovitiji, ali nije još konstruiran, no sadrži profile interakcija za oko 75% svih gena u kvascu, navode Constanzo i sur., (2010). Zahvaljujući tom projektu pronađeno je 170.000 interakcija gena, a geni sa sličnim uzorcima interakcije grupirani su zajedno. Ove su informacije korištene za izgradnju globalne mreže interakcija gena organiziranih po funkciji.

2.4. Biofilm

Danas je poznato da bakterije mogu opstati u slobodnom, odnosno planktonskom obliku ili u obliku biofilma u kojem formiraju kolonije. Biofilm se može definirati kao sesilna organizacija bakterija u prirodnim ekosistemima. Nazivamo ih još „sluzavi gradovi". Prema Milanov i sur. (2008) teoriju biofilma postavili su Costerton i sur. 1978. godine i definirali su ga kao strukturnu zajednicu bakterijskih stanica koje su vezane za nežive ili žive površine i uklopljene u polimerni matriks koji same stvaraju. Donlan i Costerton su 2002. godine postavili novu, dopunjenu definiciju po kojoj je biofilm zajednica mikroorganizama koji su ireverzibilno vezani za površinu, međufazu ili nešto drugo, koji su uklopljeni u matriks ekstracelularne polimerne supstance i koji pokazuju izmijenjeni fenotip u odnosu na brzinu rasta i transkripciju gena (Milanov i sur., 2008). Stvaranje biofilma započinje kada se slobodne bakterije iz zraka u prvoj fazi privremeno pričvršćuju za podlogu pomoću bičeva i fila. Prianjanje i posljedično vezanje bakterija za površinu može biti aktivno ili pasivno, ovisno o staničnoj pokretljivosti (Milanov i sur., 2008). Pasivno vezanje je uvjetovano gravitacijskom silom i difuzijom, dok na aktivno utječu osobine stanične površine bakterija, tj. flagele, pili, proteini, kapsule i površinski naboj (Milanov i sur., 2008). Već nakon nekoliko minuta od prvotnog vezanja, neke bakterije proizvode takozvani EPS ili ekstracelularne polimerne supstance kojima se dodatno pričvršćuju za površinu. Na početku, biofilm eksponencijalno raste sve dok debljina biofilma ne počne utjecati na difuziju nutrijenata potrebnih za rast mikroorganizama ili dok se zbog prevelikog protoka vode dijelovi biofilma ne prestanu otkidati s površine. Ako su okolnosti povoljne za uspješan rast i aglomeraciju, biofilm se razvija u organiziranu strukturu i taj proces se naziva sazrijevanje biofilma, navode Milanov i sur. (2008). Biofilm raste u nekoliko faza i njegove se karakteristike mogu s vremenom mijenjati. Tijekom ranih faza razvoja najprije se tragovi organskih tvari adsorbiraju na površinu i tvore primarni sloj, nakon čega se bakterije istovremeno adsorbiraju i desorbiraju s njega. Prvotno vezanje bakterija je najvažniji korak u razvoju biofilma jer one stvaraju temelje za daljnje razvijanje biofilma.

Tu primarnu fazu adhezije Dunne (2002) još naziva i fazom spajanja (eng. *docking stage*). U funkciji vremena veza između bakterija i supstrata jača, čineći vezivanje ireverzibilnim procesom. Ta druga faza, koju Dunne (2002) naziva fazom zaključavanja (eng. *locking stage*), rezultat je produkcije ekstracelularne polimerne supstance (EPS), glikokaliksa ili matriksa biofilma. Razvoj biofilma je najbrži kada ga sačinjava populacija mikroorganizama koji jedni od drugih imaju izravne koristi. Stanice u biofilmu međusobno komuniciraju putem produkata koji mogu difundirati iz jedne u drugu stanicu (Milanov i sur., 2008). Biofilmovi štite mikroorganizme od isušivanja. Biofilm se prvenstveno sastoji od mikrobnih stanica i EPS.

EPS može iznositi 50% do 90% ukupnog organskog ugljika biofilmova i može se smatrati primarnim matričnim materijalom biofilma. EPS se može razlikovati u kemijskim i fizičkim svojstvima, ali se prvenstveno sastoji od polisaharida (Donlan, 2002). EPS je također vrlo hidratiziran jer može inkorporirati velike količine vode u svoju strukturu vezanjem vodika. EPS može biti hidrofoban, iako je većina tipova i hidrofилna i hidrofobna. On se također može razlikovati u topljivosti. Stoga udio vode varira, a može činiti i do 94 % ukupne mase biofilma kada je matriks u potpunosti hidriran, navodi Milanov i sur. (2008). U biofilmu se fiksiraju pojedine hranjive tvari i enzimi (spojevi za razgradnju tvari) što omogućuje međusobnu prehranu različitih vrsta bakterija – što jedne vrste izlučuju druge koriste za svoj rast. Površina biofilma je vrlo aktivna. Na njoj dolazi do istovremenog pričvršćivanja i otpuštanja bakterija. Kako se debljina biofilma povećava, difuzija otopljenih plinova i nutrijenata iz okolne vode postaje otežana. Biofilm dobiva svoju ravnotežnu debljinu od oko 500 - 1000 μm .



Slika 4. Stadiji formiranja biofilma: 1. Stadij reverzibilnog vezivanja; 2. Stadij ireverzibilnog vezivanja (produkcija EPS); 3. Razmnožavanje bakterija; 4. Sazrijevanje biofilma; 5. Odvajanje dijelova biofilma (Anonymus 3, 2019).

2.5. Ne toplinski procesi

2.5.1. Vrste tehnika

Najveći problem kod procesiranja hrane tradicionalnim (toplinskim) tehnikama je upravo toplina tj. to što dolazi do termičke obrade procesiranog materijala, a samim time do promjene ili gubitka nutritivnih svojstava. Zajedničko svim ne toplinskim tehnikama je to što se tretiranje materijala provodi pri sobnoj temperaturi, odnosno da ne dolazi do znatnog povišenja temperature materijala kao posljedice procesiranja te da sami proces tretiranja traje kratko, između jedne i deset minuta. U neke od tih tehnika ubrajamo:

- procesiranje ultrazvukom
- procesiranje pulsirajućim električnim poljem (PEP)
- procesiranje svjetlom jakog intenziteta
- procesiranje visokim (hidrostatskim) tlakom
- procesiranje hladnom atmosferskom plazmom

Kao rezultat povećane potražnje potrošača za minimalno obrađenim svježim prehrambenim proizvodima s visokim senzorskim i prehrambenim svojstvima, raste zanimanje za ne termalne procese za preradu i konzerviranje hrane. Primjenjuju se navedene tehnologije kako bi se razvili blagi ali ciljani procesi za daljnje poboljšanje kvalitete i sigurnosti procesirane hrane. Te tehnologije također nude potencijal za poboljšanje postojećih procesa, kao i za razvoj novih procesa.

2.5.2. Ultrazvuk

Ultrazvuk se definira kao zvučni val s frekvencijama od 20 kHz ili više, a karakteriziraju ga amplituda (A), frekvencija (f), valna duljina (λ) i koeficijent atenuacije (α) (Jeličić i sur., 2010). Najvažniji kriterij koji se koristi za podjelu ultrazvučnih valova je količina energije koju generira zvučno polje pri čemu se razlikuje ultrazvuk niskog i visokog intenziteta (Fellows, 2000; McClements, 1995). Ultrazvuk niskog intenziteta odnosi se na intenzitete manje od 1 W/cm^2 i frekvencije više od 100 kHz. Uslijed malih razina snage ultrazvučni valovi niskog intenziteta ne uzrokuju fizičke i kemijske promjene u svojstvima materijala kroz koji val prolazi.

Stoga se ultrazvuk niskog intenziteta koristi kao analitička metoda primjerice za mjerenja teksture, određivanje sastava namirnice, viskoznosti i brzine protjecanja, te za kontrolu pakiranja (Knorr i sur., 2004).

Ultrazvuk visokog intenziteta odnosi se na intenzitete više od 1 W/cm^2 (obično u rasponu od $10\text{-}1000 \text{ W/cm}^2$) i frekvencije između 18 i 100 kHz. Obzirom da tada nastaju valovi velike snage i niske frekvencije (20-100 kHz), njihova uporaba se preporučuje u svrhu inaktivacije i redukcije broja mikroorganizama (Knorr i sur., 2004.). Djelovanjem ultrazvučnih valova visokog intenziteta u tekućem mediju stvaraju se longitudinalni valovi i područja promjenjivih kompresija i ekspanzija tlaka (Jeličić i sur., 2010). Naizmjenično izmjenjivanje tlaka izaziva kavitaciju pri čemu nastaju mjehurići plina u materijalu. U mljekarskoj industriji dosad je istraživana primjena ultrazvuka visokog intenziteta u svrhu inaktivacije nepoželjnih mikroorganizama i enzima, za homogenizaciju mlijeka te za poboljšanje fermentacije (Brnčić i sur., 2009).

2.5.3. Pulsirajuće električno polje (PEP)

Procesiranje hrane pulsirajućim električnim poljem (PEP) sastoji se od propuštanja vrlo kratkih i brzih električnih impulsa (obično $1\text{-}100 \mu\text{S}$) u električnom polju visokog intenziteta ($10\text{-}80 \text{ kV/cm}$) kroz tekuću namirnicu koja se nalazi u komori između dvije elektrode, obično pri sobnoj temperaturi (Bendicho i sur., 2002.; Lelas, 2006.). Mehanizam kojim PEP metoda inaktivira mikroorganizme nije potpuno razjašnjen, no pretpostavlja se kako električno polje visokog intenziteta uzrokuje promjenu propusnosti staničnih membrana. Nakon što se u dovoljno dugom vremenskom intervalu djeluje električnim poljem čija jakost premašuje kritični transmembranski napon, dolazi do ireverzibilnog formiranja velike pukotine na membrani što rezultira staničnom smrću (Shamsi i sur., 2008.). Učinkovitost PEP metode ovisi o brojnim čimbenicima među kojima su najznačajniji intenzitet električnog polja, trajanje tretmana, temperatura namirnice te vrsta mikroorganizama odnosno enzima na koji se u njoj nalaze (Bendicho i sur., 2002.). Još davnih 1960 – ih pokazan je smrtonosni učinak kod visokih električnih polja na brojne vrste vegetativnih bakterija i kvasaca. Polja do 25 kV / cm^2 primijenjena su kao niz impulsa istosmjernih struja na suspenzije organizama. Različite su se vrste razlikovale po svojoj osjetljivosti na električno polje, a kvasci su se pokazali osjetljiviji od vegetativnih bakterija, navode Sale i Hamilton, (1967). Malo pomalo, prehrambena industrija pokazuje sve veći interes za ovu obećavajuću novu tehnologiju. Nadalje, očekivalo se da će ta tehnika uskoro biti usvojena za obradu nekoliko tekućih prehrambenih proizvoda, navode Vega – Mercado i sur. (1997), što se u konačnici pokazalo istinitim jer se danas najčešće koristi za procesiranje mlijeka u kombinaciji s drugim metodama.

2.5.4. Svjetlo jakog intenziteta

Obrada hrane svjetlom jakog intenziteta zasniva se na primjeni elektromagnetskog zračenja valnih duljina vidljivog dijela i UV – dijela spektra. Raspon valnih duljina za UV svjetlo za preradu hrane varira od 100 do 400 nm.

Ovaj raspon može biti dalje podijeljen na:

- UV-A (315 do 400 nm) koji je normalno odgovoran za pocrnjenje ljudske kože
- UV-B (280 do 315 nm) koji uzrokuje pečenje kože i može dovesti do karcinoma kože
- UV-C (200 do 280 nm) koji se naziva germicidnim jer učinkovito inaktivira bakterije i viruse
- Vakuumski UV raspon (100 do 200 nm) koji može apsorbirati gotovo sve tvari i time se može prenositi samo u vakuumu

Zračenje UV svjetla i susjednog vidljivih dijela spektra, kao i manje energetske tipovi nazivaju se ne ionizirajuće zračenje. Nasuprot tome, ionizirajuće zračenje koje uključuje rendgenske zrake, gama – zrake i ionizirajuće čestice (beta – zrake, alfa – zrake, protoni) može ionizirati mnoge atome i molekule. Apsorpcija ne ionizirajućeg zračenja, međutim, dovodi do elektronske ekscitacije atoma i molekula. Svjetlost se emitira iz ispuha plina u valne duljine koje ovise o njegovom elementarnom sastavu i uzbuđenju, ionizaciji i kinetičkoj energiji tih elementa. Ispušni plinovi su odgovorni za emitirano svjetlo iz UV svjetiljki (Koutchma, 2009.)

Za mikroorganizme je najpogubnije zračenje valnih duljina od 228 nm do 290 nm, s izrazitim maksimumom pri valnoj duljini od 265 nm, budući da zrake te valne duljine apsorbiraju nukleinske kiseline pri čemu dolazi do formiranja kovalentnih veza između pirimidinskih baza, što ima za posljedicu sprječavanje razmnožavanja mikroorganizama. Stoga se u svrhu inaktivacije mikroorganizama primjenjuju valne duljine UV-B i UV-C spektralnog područja.

Učinkovitost UV zračenja ovisi o broju i vrsti mikroorganizama te o intenzitetu zračenja. Najmanju otpornost na djelovanje UV zračenje pokazuju Gram - negativne bakterije, zatim Gram - pozitivne bakterije, kvasci, bakterijske spore, plijesni i virusi koji su najotporniji (Jeličić i sur., 2010). Da bi se postigla inaktivacija mikroorganizama u rangu redukcije oko 4 log, UV doza zračenja mora biti minimalno 400 J/m² pri valnoj duljini 254 nm u svim dijelovima proizvoda.

2.5.5. Visoki hidrostatski tlak

U jednoj provedenoj studiji istraživana su strukturna oštećenja i propuštanje unutarstaničnih tvari iz stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* stanica tretiranih hidrostatskim tlakom. Skenirajući elektronskom mikroskopijom, stanice kvasca tretirane na sobnoj temperaturi tlakom manjim od 400 MPa tijekom 10 minuta pokazale su neznatnu promjenu u vanjskom obliku. Međutim, elektronska mikroskopija pokazala je da je na unutarnju strukturu došlo do promjene, naročito na nuklearnoj membrani, kada se tretira hidrostatskim tlakom oko 100 MPa na sobnoj temperaturi 10 minuta. Na višim tlakovima, od 400-600 MPa, pojavile su se daljnje promjene u mitohondrijima i citoplazmi. Nadalje, kada se vrši tretman pod visokim tlakom pri temperaturi od -20 °C, unutrašnja struktura stanica je ozbiljno oštećena čak i pri 200 MPa, a skoro sve nuklearne membrane nestaju (Shimada i sur., 1993).

2.5.6. Plazma

Milošević (2008) navodi da sredinom 19. stoljeća češki fiziolog Jan Evangelista Purkinje je prvi upotrijebio grčku riječ „plazma“ kako bi opisao prozirnu tekućinu koja preostane nakon što se iz krvi uklone čestice. Nadalje, pedesetak godina kasnije, američki znanstvenik Irving Langmuir je predložio da se elektroni, ioni i neutralne čestice u ioniziranom plinu mogu smatrati u principu krvnim česticama u tekućem mediju. Prvi je plazmu opisao na znanstveni način Sir William Crookes, nazvavši je, „materijom koja zrači“ (Milošević, 2008).

Danas se plazma definira kao ionizirani plin koji se sastoji od velikog broja različitih vrsta čestica poput elektrona, pozitivnih i negativnih iona, slobodnih radikala, atoma plina i molekula ili druge različite vrste koje se mogu generirati u pobuđenom ili nepobuđenom stanju (Roya i sur., 2014.) Također smatra se da je četvrto stanje stvar u svijetu.

2.5.6.1. Nastajanje plazme

Povećanje energije u sustavu dovodi do promjena agregatnog stanja tvari iz krutog u tekuće do plinovitog. Pri većim termalnim energijama atomi se sudaraju te rastavljaju na pozitivno i negativno nabijene čestice. Kako plazma sadrži jednak broj pozitivno i negativno nabijenih čestica rekli bismo da je električki neutralna, no plazma sadrži slobodne nosioce naboja i električki je vodljiva. Kada je energija elektrona dovoljno velika, u sudaru s neutralnom česticom dolazi do promjene elektronske strukture.

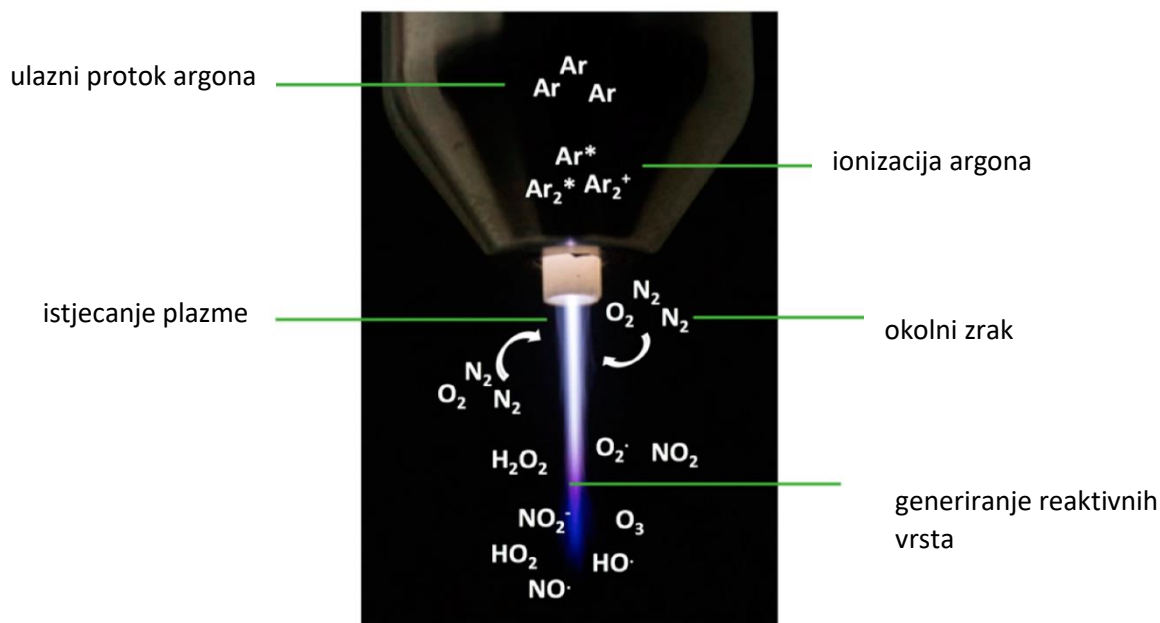
Što je energija sudara veća vjerojatnija je pobuda atoma odnosno molekule čime dolazi do prijelaza vezanog elektrona atoma u višu atomsku orbitalu, a samim time do disocijacije atoma koji čine molekulu ili ionizacije odnosno do izbacivanja elektrona iz atoma tj. molekule. Pobuđeni atomi odnosno molekule u pravilu kratko žive u takvom stanju, svega nekoliko nanosekundi, nakon kojih se atom vraća u nepobuđeno stanje uz emisiju fotona. Jedan od osnovnih načina stvaranja plazme je pomoću električnih izboja (Scholz i sur., 2015). Prilikom generiranja plazme dolazi do stvaranja različitih reaktivnih vrsta kao što su:

- reaktivne vrste molekula i atoma kisika (eng. *ROS*), kao što je atomski kisik, superoksidni anion, ozon
- reaktivne dušikove vrste (eng. *RNS*), kao što je atomski dušik, pobuđeni dušik i nitratni oksid
- hidroksidni anion, hidroksidni radikal ili vodikov peroksid.

2.5.6.2. Načini generiranja i pražnjenja plazme

Princip dobivanja plazme je zasnovan na električnom pražnjenju koje nastaje između dvije elektrode priključene na izvor električne energije. Električni potencijal i odgovarajuće električno polje koje nastaje uzrokuju privlačenje elektrona prema anodi, dok jezgru atoma privlači katoda. Kako napon raste povećava se naprezanje u atomima, sve do dielektrične granice, kada se pojavljuje iskra te dolazi do ionizacije (Bogaerts i sur., 2001). Najčešći način na koji se plazma može generirati je pomoću istosmjerne struje, kako je prikazano na slici 5, no postoji širok spektar načina koji se također koriste. Tako se plazma može generirati radiofrekvencijom pri čemu nastaje visoka frekvencija izmjenične struje koju stvara generator, za takvu plazmu tj. za plazmu generiranu na taj način potrebne su frekvencije i do 500 kHz. Generirati se plazma može i pulsiranjem gdje se napon primjenjuje u obliku pulseva. Zbog mogućnosti korištenja znatno viših napona pri kojima se stvaraju pulsevi za očekivati je i veću učinkovitost tako generirane plazme.

Nadalje, plazme mogu biti stvorene i mikrovalovima odnosno elektromagnetnim zračenjem u rasponu frekvencija 300 MHz do 10 GHz kako navodi Bogaerts i sur. (2001). Kako postoje različiti načini generiranja plazme tako postoje i različiti načini pražnjenja iste. Naime, pražnjenje plazme se može provoditi u plinskoj i u tekućoj fazi. Razvojem različitih vrsta reaktora za električnog pražnjenja postoje i različite konfiguracije elektroda. Jedna od najčešćih konfiguracija elektroda postavljena je u obliku točka - ploča.



Slika 5. Generiranje plazme (Anonymus 4, 2019).

2.5.6.3. Vrste plazme, njene prednosti i nedostaci

Plazmu je moguće opisati pomoću tri osnovna parametra: temperature čestica, gustoće čestica te jačine stacionarnog magnetskog polja. S obzirom na temperaturu plazme ona se dijele na visoko temperaturnu i nisko temperaturnu plazmu. Kod visoko temperaturnih plazmi elektroni, ioni i neutralne vrste su u ravnotežnom stanju gdje je temperatura svih čestica jednaka (eng. *local thermodynamic equilibrium*) (Nehra i sur., 2006). Toplinska plazma ima brojne prednosti uključujući: visoku temperaturu, visoki intenzitet, neionizirajuću radijaciju i visokoenergetsku gustoću. Uporaba toplinske plazme je široko rasprostranjena i uključuje korištenje u tehnici premazivanja, sintezi ultra glatkih i ultra čistih pudera, sintezi keramičkih materijala, metalurgiji te u uništavanju i tretiranju opasnih otpadnih materijala. Međutim jedna od negativnih strana upotrebe toplinske plazme je ta što su investicijski i operacijski troškovi veliki te potrebna su česta održavanja opreme. Plazme niske temperature su podijeljene na toplinsku plazmu koja se još naziva termodinamička ravnotežna plazma te na ne toplinsku ili hladnu plazmu. Kod hladne plazme temperatura elektrona je viša od temperature iona i neutralnih čestica pa se naziva ne termalna ili neravnotežna plazma (eng. *non-local thermodynamic equilibrium plasma*), navode Nehra i sur., (2006). Karakteristične značajke hladne plazme su jaka termodinamička, neravnotežna priroda, niska temperature plina, prisutnost reaktivnih kemijskih vrsta i visoka selektivnost što joj omogućuje široku primjenu (Nehra i sur., 2006).

Navedene značajke hladne plazme čine ju pogodnom za korištenje u procesima u kojima primjena visoke temperature nije poželjna, kao što je na primjer obrada hrane jer omogućuje procesiranje iste s minimalnim utjecajem na nutritivne vrijednosti i sensoriku (Niemira, 2011) pri niskoj potrošnji energije i pri čemu dolazi do učinkovite inaktivacije patogenih mikroorganizama i mikroorganizama koji mogu prouzročiti kvarenje proizvoda ili bombažu. Hladna plazma je ekološki prihvatljiva metoda procesiranja hrane (Barbosa – Cánovas i sur., 2016).

2.5.6.4. Mehanizam inaktivacije mikroorganizama hladnom plazmom

Plazma kao sterilizacijska metoda prvi put je upotrijebljena 1968.godine. Poslije toga, prilično mnogo istraživanja je napravljeno kako bi se ustanovio mehanizam mikrobiološke inaktivacije plazmom. Tretiranje plazmom može učinkovito inaktivirati širok raspon mikroorganizama uključujući spore i viruse (Roya i sur., 2014). Učinak plazme na različite mikroorganizme može biti potpuno selektivan, što znači da može uništiti patogene mikroorganizme bez da uništi stanicu. Usprkos oksidaciji lipida, aminokiselina i stanica nukleinskih kiselina dolazi i do oksidacije spora koje su osjetljive na djelovanje ovih reaktivnih vrsta. Pritom dolazi do promjena koje dovode do oštećenja ili potpune inaktivacije. Prilikom generiranja plazme u tekućinama (vodenim otopinama) dolazi do stvaranja hidroksidnih radikala koji se smatraju najodgovornijim za inaktivaciju mikroorganizama (Roya i sur., 2014). Hidroksidni radikali reagiraju s obližnjim organskim molekulama vodeći do lančane oksidacije i razaranja DNA molekule, stanične membrane, ostalih komponenti stanice te do istjecanja sadržaja stanica. Lipidni dvostruki sloj mikrobne stanice je osjetljiviji na atomski kisik koji može degradirati lipide, proteine i samu DNA molekulu. Peroksidacija stanične membrane lipida hladnom plazmom dovodi do bakterijske inaktivacije. Tijekom obrade plazmom, mikroorganizmi su izloženi intenzivnom bombardiranju radikalima. Nagomilavanje nabijenih čestica dovodi do elektrostatske sile na vanjskoj površini stanične membrane što može izazvati puknuće stanične stijenke (Roya i sur., 2014).

2.5.6.5. Primjena u prehrambenoj industriji

Tehnologija plazme je jedna od obećavajućih ne toplinskih tehnika koja se koristi u industriji žitarica. Pri tretmanu smeđe riže plazmom mijenjaju se njena svojstva. Smanjeno je vrijeme kuhanja, teksturalna svojstva su poboljšana te je smanjena tvrdoća i ljepljivost. Mir i sur., (2016). proveli su studiju u kojem su niskim razinama hladne plazme i u kratkim intervalima tretirali pšenično brašno u cilju poboljšanja teksturalnih svojstava. Naime, rezultat koji su dobili nije bio onaj koji su očekivali. Tretman nije utjecao na koncentraciju ukupnih ne-škrobnih lipida i glikolipida. Međutim, tretman je smanjio ukupne slobodne masne kiseline i fosfolipide. Ukupni proteini nisu bili značajno promijenjeni tretmanom, iako je postojao trend prema frakcijama veće molekulske mase, što ukazuje na oksidaciju bjelanjčevina, a tretirano brašno dalo je jače tijesto. Time su zapravo pokazali da hladna plazma ima potencijal kao alat za modificiranje brašna. Dosadašnje metode toplinske dekontaminacije izazivaju promjene u kemijskom sastavu mlijeka dok tehnologija plazme kao jedna od novih tehnologija koja ima potencijalnu primjenu u mljekarskoj industriji zbog sposobnosti za rad pri niskim temperaturama, bez povećanja radne temperature, a pritom dolazi do znatnog smanjenja patogenih vrsta (Mir i sur., 2016). Hladna plazma se uspješno primjenjuje za selektivnu modifikaciju strukture proteina i stoga poboljšava funkcionalnost izolata proteina sirutke. Sveukupne promjene nastaju u samo nekoliko minuta tretmana plazmom te pritom dolazi i do blage oksidacije proteina. Mesna industrija je glavna u razvoju i primjeni novih načina obrade. Obrada plazmom može produljiti vijek trajanja mesa s obzirom na mikrobiološku kontaminaciju, posebno kod pilećeg mesa (Mir i sur., 2016).

2.5.6.6. Drugi učinci i primjene hladne plazme

Plazma može biti primijenjena i na druge biološke molekule kao što su enzimi. Enzimi, poput polifenoloksidaze i peroksidaze su glavni uzrok enzimskog posmeđivanja kod voća i povrća, zbog čega se uglavnom i kvare (Thirumdas i sur., 2014). Enzimi se inaktiviraju kroz oksidacijske reakcije posredovane slobodnim radikalima i kisikom. Hladna plazma koristi se za dekontaminaciju ambalaže te pritom ne mijenja niti stvara promjene na površini. Omogućuje brzu i sigurnu sterilizaciju ambalaže bez štetnog utjecaja na svojstva materijala (Thirumdas i sur., 2014). Svrhu je pronašla i u modifikaciji površine organskih polimera. Među brojnim modifikacijama površine koje su dostupne, modifikacija površine plazmom donosi fleksibilan i okolišno prihvatljiv proces, a glavna uloga je izobličjenje površine kao i promjene kemijske strukture kako bi se spriječila adhezija patogenih bakterija na površini odnosno kako bi se

sprječilo stvaranje biofilma. U biomedicini hladna plazma se koristi za sterilizaciju uređaja. Zadnjih 10 godina upotreba netoplinske plazme se proširila na nova područja primjene kao na primjer u liječenju gdje će biti važno za tretiranje stanica raka, inaktivacije priona, prevenciju bolničke infekcije ili u terapiji infektivnih rana (Thirumdas i sur., 2014).



Slika 6. Hladna plazma – sastav i primjena.

3. ZAKLJUČAK

1. Život bez proizvoda dobivenih fermentacijskim procesima bio bi ne zamisliv. Fermentacija, kao proces, moglo bi se reći da je dio identiteta ljudi. Ne postoji strana svijeta, nacija, narod koji nema tradicionalni ili autohtoni proizvod koji nije povezan s fermentacijom. Od pekarskih proizvoda do alkoholnih pića preko mliječnih i mesnih delicija.
2. Primjena *Saccharomyces cerevisiae* nije više limitirana samo na prehrambenu industriju, već on pokazuje velika obećanja u istraživanjima. Zahvaljujući mapiranju njegova genoma i brojnim drugim istraživanjima u raznim područjima, znanstvenici su svakim danom sve bliže otkrivanju brojnih bioloških mehanizama poput starenja, otkivanju funkcija nekarakterističnih gena itd. *S. cerevisiae* pokazuje veliki potencijal kao probiotik, no kao i obnovljiv resurs za proizvodnju biogoriva.
3. Netoplinke metode pokazuju se kao vrlo isplative tehnike procesiranja hrane u kojima dolazi do minimalnih promjena senzoričkih i nutritivnih vrijednosti uz inaktivaciju mikroorganizama što omogućuje sigurnu konzumaciju hrane uz istovremeno očuvanje visoke kvalitete. Netoplinke tehnike daleko su od savršenih, no povezane s drugim tehnikama, bilo toplinskim ili ne toplinskim, daju odlične rezultate što se tiče kvalitete i sigurnosti hrane. Neke od tehnika, poput hladne atmosferske plazme, sve se više prilagođavaju na sterilizaciju ambalaže i pakiranja, a ne samo proizvoda koji se u njima nalazi.
4. Hladna plazma je ne toplinska metoda procesiranja hrane u usponu koja bi mogla u potpunosti promijeniti prehrambenu industriju na način da se stare metoda u potpunosti izbace iz prakse. No, kao i sa *S. cerevisiae*, nije prehrambena industrija jedino područje primjene hladne plazme niti jedino područje gdje ta metoda zaista daje obećavajuće rezultate. Uz daljnja istraživanja hladna plazma bi se mogla uskoro koristiti i u medicini kao metoda koja će svakodnevno spašavati živote ljudi oboljelih što od lakših bolesti što od težih bolesti poput karcinoma.

4. LITERATURA

- Anonymus 1 (2019). SEM of *S. cerevisiae*.
<<https://www.researchgate.net/figure/Scanning-electron-microscopy->>.
Pristupljeno 01. rujna 2019.
- Anonymus 2 (2019). Yeast. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3718343/>>.
Pristupljeno 01. rujna 2019.
- Anonymus 3 (2019). <<http://www.advancedhealing.com/biofilm-protocol-for-lyme-and-gut-pathogens/>>. Pristupljeno 01. rujna 2019.
- Anonymus 4 (2019). <<http://www.mdpi.com/1422-0067/18/9/2004/htm>>. Pristupljeno 01. rujna 2019.
- Barbosa – Cánovas G.V., Donsi F., Pokhrel P.R., Candoğan K., Guadarrama – Lezam A.Y. (2016). Nonthermal Stabilization Processes. *Engineering Foods for Bioactives Stability and Delivery*. Springer, str. 341 – 360
- Bogaerts A., Neyts E., Gijbels R. (2001). Gas discharge plasmas and their applications. *Spectrochimica Acta Part. 57*, str. 609 – 658
- Costanzo M., Baryshnikova A., Bellay J., Kim Y., Spear E.D., Sevier C.S., Ding H, Koh J.L., Toufighi K., Mostafavi S., Prinz J., St Onge R.P., VanderSluis B., Makhnevych T., Vizeacoumar F.J., Alizadeh S., Bahr S., Brost R.L., Chen Y., Cokol M., Deshpande R., Li Z., Lin Z.Y., Liang W., Marback M., Paw J., San Luis B.J., Shuteriqi E., Tong A.H., van Dyk N., Wallace I.M., Whitney J.A., Weirauch M.T., Zhong G., Zhu H., Houry W.A., Brudno M., Ragibzadeh S., Papp B., Pál C., Roth F.P., Giaever G., Nislow C., Troyanskaya O.G., Bussey H., Bader G.D., Gingras A.C., Morris Q.D., Kim P.M., Kaiser C.A., Myers C.L., Andrews B.J., Boone C. (2010). The genetic landscape of a cell. *Science*. **327**, str. 425 – 431
- Bendicho, S., Barbosa-Canovas, G.V., Martiny, O. (2002). Milk processing by high intensity pulsed electric fields, *Trends in Food Science and Technology*. **13**, str. 195 – 204
- Botstein D., Chervitz S.A., Cherry J.M. (1997). Yeast as a model organism. *Science*. **277**, str. 1259 – 1260
- Brnčić, M., Tripalo, B., Penava, A., Karlović, D., Ježek, D., Vikić Topić, D., Karlović, S., Bosiljkov, T. (2009). Primjena ultrazvuka visokog intenziteta pri obradi hrane. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*. **4**, str. 32 – 37
- Czerucka D., Piche T., Rampal P. (2007). Yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, Wiley Online Library. **26**, str. 767 – 778

- Davidson G.S., Joe R., Roy S., Werner – Washburne M. (2011). The proteomics of quiescent and nonquiescent cell differentiation in yeast stationary-phase cultures. *Molecular biology of the cell*, ResearchGate
- Dickinson J.R., Schweizer M. (2004). The Metabolism and Molecular Physiology of *Saccharomyces cerevisiae*, ResearchGate
- Dunne Jr. W.M. (2002). Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? *Clinical Microbiology Reviews*. **2**, str. 155 – 166
- Donlan R.M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. **9**, str. 881 – 890
- Fellows, P.J. (2000). Food processing technology: principles and practice. Woodhead Publishing
- Giacometti, J., Bursać Kovačević, D., Putnik, P., Gabrić, D., Bilušić, T., Krešić, G., Stulić, V., Barba, F.J., Chemat, F., Barbosa-Cánovas, G., Režek Jambrak, A. (2018). Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review. *Food Research International*. **113**, str. 245 – 262
- Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., Louis E.J., Mewes H.W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S.G. (1996). Life with 6000 genes. *Science*. **274**, str. 546, 563 – 567
- He C., Zhou C. Kennedy B.K., (2018). The yeast replicative aging model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*. **9**, str. 2690 – 2696
- Herceg Z. (2011). Procesi u prehrambenoj industriji. Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Zagreb. str. 143
- Herceg Z. (2009). Procesi konzerviranja hrane. Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Zagreb. str. 51 – 53
- Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., Lee, D-U. (2004). Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science and Technology*. **15**, 261 – 266
- Koutchma T. (2009). Advances in Ultraviolet Light Technology for Non-thermal Processing of Liquid Foods. *Food Bioprocessing Technology*. **2**, str. 138 – 155
- Kurtzman C.P., Fell J.W. (2005). *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, *The Yeast Handbook*, Springer. str. 11 – 30
- Lelas, V. (2006). Nove tehnike procesiranja hrane, *Mljekarstvo*. **56**, str. 311 – 330
- Lewis M.J., Bamforth C.W., Yeast. *Esseys in Brewing Science*, Springer. str. 114 – 130
- McClements, D.J. (1995): Advances in applications of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science and Technology*. **6**, str. 293 – 299

- Milanov D., Ašanin R., Vidić B., Krnjajić D., Petrović J. (2008) Biofilm- organizacija života bakterija u prirodnim ekosistemima. Naučni institut za veterinarstvo, Fakultet veterinarske medicine, Beograd. **2**, str. 1 – 9
- Milošević S. (2008). Plazma, svjetlost i spektroskopija. Institut za fiziku, Zagreb
- Mir S.H., Shah A.M., Mir M.M. (2016). Understanding the Role of Plasma Technology in Food Industry. *Food and Bioprocess Technology*. **9**, str. 734 – 750
- Nehra V., Kumar A., Dwivedi H.K. (2006). Atmospheric Non-Thermal Plasma Sources. University of Science & Technology, India. **2**, str. 53 – 68
- Niemira B.A. (2011). Cold Plasma Decontamination of Foods. *Annual Review of Food Science and Technology*. **3**, str. 125 – 142
- Patel A., Arora N., Sartaj K., Pruthi V., Pruthi P.A. (2016) Sustainable biodiesel production from oleaginous yeasts utilizing hydrolysates of various non – edible lignocellulosic biomasses. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **62**, str. 836 – 855
- Reynolds T.B., Fink G.R. (2001). Baker's yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* **291**, str. 878 – 881
- Roya A., Hosseini H. (2014). Non-thermal plasma as a new food preservation method, its present and future prospect. *Journal of Paramedical Sciences*. **5**, 2008 – 4978
- Sale A.J.H., Hamilton W.A., (1967). Effects of high electric fields on microorganisms: I. Killing of bacteria and yeasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*. **3**, str. 781 – 788
- Shamsi, K., Versteeg, C., Sherkat, F., Wan, J. (2008). Alkaline phosphatase and microbial inactivation by pulsed electric field in bovine milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **9**, str. 217 – 223
- Scholtz V., Pazlarová J., Soušková H., Khun J., Julák J. (2015). Nonthermal plasma – the tool for decontamination and disinfection. *Biotechnology Advances*. **33**, str. 112 – 118
- Shimada S., Andou M., Naito N., Yamada N., Osumi M., Hayashi R. (1993). Effects of hydrostatic pressure on the ultrastructure and leakage of internal substances in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer. **1**, str. 123 – 131
- Thirumdas R., Annapure U.S., Sarangapani C. (2014). Cold plasma: A novel Non-Thermal Technology for Food Processing. *Food Biophysics*. **9**, str. 193 – 300
- Unal E., Kinde B., Amon A. (2011). Gametogenesis eliminates age – induced cellular damage and resets life span in yeast. *Science*. **332**, str. 1554 – 1557

- Vega – Mercado H., Martin – Beloso O., Lin Qin B., Jung Chang F., Gongora – Nieto M.M., Barbosa – Cánovas G.V., Swanson B.G. (1997). Non – thermal food preservation: Pulsed electric fields. *Trends in Food Science & Technology*. **5**, str. 151 – 157

Izjava o izvornosti

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

Tvrtko Karlo Kovačević _____