

# Antimikrobna aktivnost sintetiziranih ferocenskih kurkuminoid-pirazola

---

Šimić, Marko Adrian

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:446888>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-21**



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Marko -Adrian Šimić**

7332/PT

**Antimikrobna aktivnost sintetiziranih ferocenskih kurkuminoid-  
pirazola**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Prehrambeno-procesno inženjerstvo 1

**Mentor:** doc.dr.sc. Tomislava Vukušić

**Zagreb, 2019.**

**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**

**Antimikrobna aktivnost sintetiziranih ferocenskih kurkuminoid-pirazola**

**Marko-Adrian Šimić, 00582093776**

**Sažetak:** Industrija stalno traži nove metode koje će biti učinkovite i zadovoljavati zahtjeve potrošača te omogućiti ekonomski i ekološki prihvatljivu proizvodnju. Jedna od novih nekonvencionalnih tehnologija je hladna plazma. Prednosti hladne plazme nad termalnim procesima su i niska odnosno sobna temperatura procesa, kratko vrijeme obrade te manji utjecaj na senzorska svojstva hrane. Cilj ovog rada bio je istražiti na koji način ferocenski analozi kurkumina utječu na inaktivaciju gram-negativne bakterije *Escherichia coli* MG1655-K12 u kombinaciji s netermalnom tehnologijom-hladna plazma. Proučavan je utjecaj četiri različita ferocenska analoga kurkumina na inaktivaciju bakterije *Escherichia coli* te kombinirajući učinak hladne plazme pri vremenu tretiranja od 3 i 6 min i kurkuminu sličnih spojeva na inaktivaciju iste. Rezultatima je utvrđeno da se sinergističkim tretmanom kurkumina i hladne plazme postiže veći inhibitorski učinak na *E. coli*.

**Ključne riječi:** ferocenski analozi kurkumina, hladna plazma, *Escherichia coli*

**Rad sadrži:** 31 stranica, 11 slika, 6 tablica, 45 literaturnih navoda i 0 priloga

**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 :** doc.dr.sc. Tomislava Vukušić

**Pomoć pri izradi:** dr.sc. Višnja Stulić;

**Datum obrane:** rujan, 2019

**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**

**Antimicrobial activity of synthesized ferrocene curcuminoid-pyrazole**

**Marko-Adrian Šimić, 00582093776**

**Abstract:** The industry is constantly looking for new methods that will be effective, meet consumer demands and to enable economically and environmentally friendly production. One of the new unconventional technologies is cold plasma. The advantages of cold plasma over thermal processes are the low or room temperature of the process, short processing time and less influence on the sensory properties of food. The aim of this paper was to investigate how the ferrocene analogues of curcumin influence inactivation of gram-negative bacterium *Escherichia coli* MG1655-K12 in combination with non-thermal technology-cold plasma. The effect of four different ferrocene analogues of curcumin on the inactivation of *Escherichia coli* was studied and the combining effect of cold plasma at treatment times of 3 and 6 min and curcumin-like compounds on the inactivation of the same. The results show that synergistic treatment of curcumin and cold plasma achieves a greater inhibitory effect on *E. coli*.

**Key words:** ferrocene analogues of curcumin, cold plasma, *Escherichia coli*

**Thesis contains:** 31 pages, 11 figures, 6 tables, 45 references and 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor: Ph.D.** Tomislava Vukušić, Assistant professor

**Technical support and assistance:** Ph.D. Višnja Stulić

**Defence date:** September, 2019

## Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1 Definicija plazme .....	2
2.1.1. Podjela i nastanak plazme.....	2
2.1.2. Generiranje plazme .....	3
2.1.3. Primjena hladne plazme .....	4
2.1.4. Primjena hladne plazme u prehrambenoj industriji.....	5
2.2. <i>Escherichia coli</i> .....	7
2.3. Kurkumin .....	9
2.3.1. Primjena kurkumina i njegovih derivata.....	10
3. MATERIJAL I METODE RADA.....	12
3.1. MATERIJAL.....	12
3.1.1. Kemikalije za uzgoj stanica .....	12
3.1.2. Laboratorijska oprema .....	12
3.1.3. Radni mikroorganizam .....	13
3.1.4. Hranjiva podloga za uzgoj bakterijskih stanica .....	13
3.1.5. Fosfatni pufer (engl. <i>Phosphate Buffer Saline</i> , PBS).....	13
3.2. METODE RADA .....	14
3.2.1. Čuvanje i održavanje bakterijskih kultura .....	14
3.2.2. Priprema uzorka <i>E. coli</i> .....	14
3.2.3. Priprema uzorka za tretiranje hladnom plazmom.....	14
3.2.4. Tretman kurkuminom.....	14
3.2.5. Generiranje hladne plazme .....	15
3.2.6. Određivanje temperature i provodljivosti.....	17
3.2.7. Određivanje broja stanica prije i nakon tretmana .....	17
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	18

4.1 Tretman kurkuminom – praćenje kinetike rasta <i>E.coli</i> .....	18
4.1.1. Tretman kurkuminom – određivanje zone inhibicije na podlogama.....	20
5. ZAKLJUČCI.....	27
6. POPIS LITERATURE.....	28

## 1. UVOD

Zadatak prehrambenog tehnologa je dobiti senzorski kvalitetan i mikrobiološki siguran proizvod. Povećanjem proizvodnih kapaciteta, danas je neophodan strogi nadzor svih operacija proizvodnje u prehrambenoj industriji s ciljem dobivanja zdravstveno ispravnog i kvalitetnog prehrambenog proizvoda. Iz tog razloga prehrambena industrija se fokusira na optimiranje procesa konzerviranja hrane. Tradicionalnim metodama konzerviranja zbog primjene ekstremnih temperatura narušavaju se često senzorska svojstva proizvoda i dolazi do gubitka nutritivno vrijednih spojeva. Industrija stalno traži nove metode koje će biti učinkovite, zadovoljavati zahtjeve potrošača te omogućiti ekološki i ekonomski prihvatljivu proizvodnju. Jedna od novih nekonvencionalnih tehnologija je hladna plazma. To je alternativna netermalna metoda konzerviranja kojom se postiže isti ili čak bolji konzervirajući učinak od metoda koji se zasnivaju najčešće na termičkoj obradi proizvoda. Njene prednosti nad termalnim procesima su i niska odnosno sobna temperatura procesa, kratko vrijeme obrade te manji utjecaj na senzorska svojstva hrane. Hladna plazma već neko vrijeme ima primjenu u sterilizaciji instrumenata i materijala u polju medicine, dok je u novije vrijeme našla primjenu i u prehrambenoj industriji, najčešće za inaktivaciju mikroorganizama u voću, povrću, mesnim i mliječnim proizvodima (Song i sur., 2009). Tretman hladnom plazmom je jedna od obećavajućih metoda za očuvanje hrane radi učinkovite inaktivacije različitih tipova mikroorganizama.

U današnje vrijeme sve je veći znanstveno istraživački interes na koji način bioaktivne komponente različitih biljaka utječu na inaktivaciju patogenih mikroorganizama u kombinaciji sa novim netermalnim tehnologijama kao što je hladna plazma.

Kurkuma je začim koji se dobiva iz podzemnog stabla istoimene biljke koji žutu boju duguje polifenolu kurkuminu, aktivnom sastojku iz skupine kurkuminoida. Osim kao bojilo za razne vrste prehrambenih proizvoda, kurkumin je istražen i u svrhu preventivnog učinka na zdravlje ljudi. Znanstvena istraživanja pokazala su kako kurkumin ima antibakterijska, antivirusna i antifungalna svojstva te usprkos problemu bioraspložitosti moguća je njegova primjena za inaktivaciju mikroorganizama.

*Escherichia coli* kao gram-negativna bakterija jedna je od najistraživanijih mikroorganizama. Redovni je stanovnik ljudskog probavnog sustava, ali također i jedna od najučestalijih uzročnika infekcija. Zbog toga je važno poznavanje biokemijskih karakteristika, uvjeta rasta te ponašanja navedene bakterije kako bi se odabrali optimalni procesni parametri za njenu inaktivaciju.

U ovom radu proučavan je utjecaj četiri različita ferocenska analoga kurkumina na inaktivaciju bakterije *Escherichia coli* MG1655-K12 te kombinirajući učinak hladne plazme pri vremenu tretiranja od 3 i 6 min i kurkuminu sličnih spojeva na inaktivaciju iste.

## **2. TEORIJSKI DIO**

### **2.1 Definicija plazme**

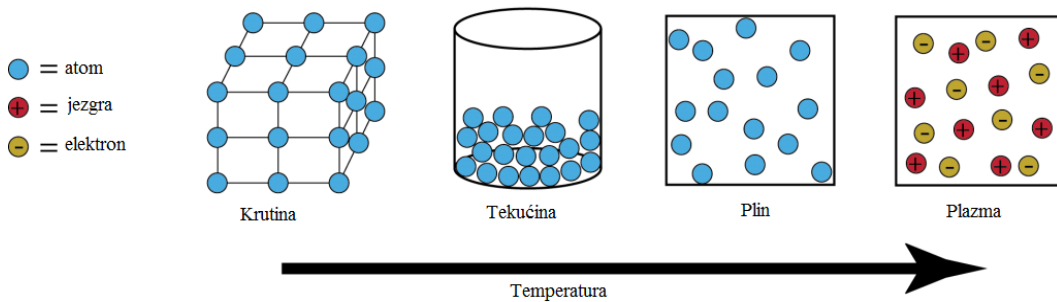
U fizici plazma je ioniziran, kvazineutralan plin te jedno od četiri osnovna stanja tvari uz tekućine, krutine i plinove (Langmuir, 1928). U prirodi je plazma najzastupljenije stanje u kojem se nalazi čak 99 % vidljive materije. Sama riječ plazma znači oblikovanje, a pojam plazma prvi put je upotrijebio Irving Langmuir 1928. kao naziv za djelomični ili potpuno ionizirani plin. Sastoji se od elektrona, iona, neutralnih atoma i molekula. S mikroskopskog stajališta plazma je električki neutralna. Međutim ipak sadrži slobodne nosioce naboja i provodi elektricitet (Tendero i sur., 2006). Nema određeni oblik niti volumen, baš kao i plin. Plazma može biti generirana primjenom električnog i magnetskog polja, mikro i radio valovima i toplinskom energijom.

#### **2.1.1. Podjela i nastanak plazme**

Kako tvari dobivaju energiju (npr. grijanjem) tako mijenjaju svoje agregatno stanje (Slika 1). Iz čvrstog (najniže energije) do tekućeg i naposljetku do plinovitog. Točke tališta i vrelišta za različite tvari široko variraju. Ipak, za sve tvari vrijedi da u svakom prijelaznom stanju interakcije i djelovanja između molekula postaju sve slabija. Zagrijavanjem molekule postaju slobodnije, dolazi do razdvajanja na atome i međusobnih sudara te prijelaza u plinovito stanje. Daljnjim povišenjem energije, međumolekularne i međuatomske strukture nestaju oslobađajući slobodne elektrone i ione. Te električki nabijene čestice svojim gibanjem stvaraju električna i magnetska polja. Nastalo stanje je potpuno ionizirana tvar koja se naziva plazma.



## Agregatna stanja



**Slika 1.** Prikaz 4 agregatna stanja (Anonymous, 2016)

U odnosu na način na koji su aktivirane, plazma može generirati vrlo visoke ili niske temperature te je tako i podijeljena na netermalnu i termalnu plazmu. Taj širok temperaturni raspon omogućuje njenu primjenu u raznim tehnologijama: površinsko tretiranje, pročišćavanje plinova, kemijska sinteza itd. (Tendero i sur., 2006) Termalne plazme su visoko ionizirane te zadovoljavaju uvjete lokalne termodinamičke ravnoteže. Temperature elektrona, neutrona i iona su im jednake zbog njihove česte kolizije u visoko temperaturnoj i visoko tlačnoj plazmi. Primjer takve plazme je Sunce i magnetsko polje. Kod netermalne ili hladne plazme temperatura elektrona je puno veća od temperature iona i neutrona pa se takva plazma naziva još i neravnotežna plazma (Schluter i sur., 2013) Netermalna plazma može biti visokotemperaturna i niskotemperaturna odnosno hladna plazma. Primjena ne-termalne ravnotežne plazme se proširila te pokriva okolišno i svemirsko inženjerstvo, aeronautiku, biomedicinu, analitičku kemiju i ostala područja. Ovisno o gustoći plazma se dijeli na visokotlačnu tj. visoke gustoće i niskotlačnu odnosno plazmu male gustoće. Visoki broj iona i radikala visokotlačne plazme povećava ionizacijsku moć te koliziju čestica. Stoga se ovaj tip plazme koristi u graviranju u mikroelektronici i proizvodnji nanomaterijala. Niskotlačna plazma ima znatno manju razinu kolizije čestica.

### 2.1.2. Generiranje plazme

Pražnjenje odnosno nastajanje plazme može se dogoditi na različite načine od kojih su neki istraživani zbog najranijih interesa za elektricitet i njegov fenomen. Plazma se može proizvesti ionizacijom plina. Izvori energije poput termalne, električnih i magnetskih polja te radio i mikrovalne frekvencije mogu se koristiti za ionizaciju. Povećanjem energije i kinetičke energije dolazi do povećanog broja sudara između elektrona i drugih atoma. Nastaju novi ioni, elektroni,

radikali i zračenja različitih valnih duljina (Thirumdas i sur., 2014). Najčešći način generiranja plazme je pomoću istosmjerne struje. Zbog velike razlike potencijala između dvije elektrode priključene na izvor električne energije postiže se električno pražnjenje. Katoda emitira elektrone koji u sudaru neutralnim česticama plina uzrokuju njihovo raspadanje na pozitivno nabijene elektrone i ione. Potom katoda privlači ione koji pritom otpuštaju elektrone koji ponovo izazivaju sudare s neutralnim česticama. U tom kružnom procesu stvaraju se novi ioni i elektroni te dolazi do generiranja plazme. Plazma se može generirati i radiofrekvencijama primjenom izmjeničnog napona između dvije elektrode.

Mikrovalno inducirane plazme su stvorene injektiranjem mikrovalne snage tj. elektromagnetske radijacije u rasponu frekvencije od 300 MHz do 10 GHz. Takva plazma može raditi pri širokom rasponu uvjeta tj. tlaku od manje od 0,1 Pa do čak nekoliko atmosfera (Bogaerts i sur., 2002). Plazma se može generirati i u različitim plinovima. Operativni plinovi mogu biti zrak, argon ili helij te ostali plemeniti plinovi zbog svoje kemijske inertnosti.

Hladnu plazmu možemo podijeliti i prema izvoru generiranja kao što su: atmosferski plazmeni mlaz (APPJ, engl. *atmospheric pressure plasma jet*), izboji s dielektričnom barijerom (DBD, engl. *dielectric barrier discharge*), korona izboji (engl. *corona discharge*), i mikrovalni izboji (engl. *microwave discharge*) (Mance, 2017).

### **2.1.3. Primjena hladne plazme**

Tretman hladnom plazmom našao je primjenu u različitim industrijama. Koristi se u električnoj industriji i industriji polimera za površinsku modifikaciju i unaprjeđenje funkcija određenog materijala. Također je našla primjenu u industriji papira, naočala i tekstila te kao sredstvo za čišćenje i sterilizaciju površina. Zadnjih godina, njena primjena proširuju se na tretiranje biomedicinskih uređaja, hrane i bioloških materijala (Pankaj i Keener, 2017).

Temperatura hladne plazme je znatno niža u odnosu na termalnu zato što u netermalnoj odnosno hladnoj plazmi samo elektroni postižu visoku temperaturu (Niemira, 2012). U prehrambenoj tehnologiji pojam hladne plazme znači da takva plazma ne koristi visoke temperature za svoje antimikrobno djelovanje već ima minimalan termalni učinak na sami proizvod. Tretman hladnom plazmom može inaktivirati spore i viruse. Prema Klämpfl i sur. (2012) sterilizacija plazmom je pokazala obećavajuća svojstva u medicini te bi mogla postati alternativa dosadašnjim metodama sterilizacije. Plazma predstavlja jedinstven tretman jer je primjenjiva na niskim temperaturama te ne zahtjeva uporabu kemikalija (Dhayal i sur., 2006).

Učinkovita je u primjeni površinske sterilizacije i dezinfekcije djelujući na vegetativne stanice i spore. Načini inaktivacije su različiti, a najčešće se inaktivacija postiže reaktivnim vrstama kisika koje stvaraju oksidacijski stres stanici, uzrokuju peroksidaciju lipida, inaktivaciju enzima i oštećenje DNA i RNA. Rezultatima u svom radu Wiseman i Halliwell (1996) opisuju mehanizam djelovanja plazme pomoću stvaranja ROS-a (reaktivni kisikovi oblici) koji djeluju na okruženje DNA u samoj jezgri. Novonastale reaktivne čestice u stanicama vežu vodu tvoreći sve više hidroksilnih i peroksidnih radikala koji su najštetniji za stanicu. U reakcijama sa nukleinskim bazama u lancima DNA dovode do njihove oksidacije što vodi do uništenja membrana i drugih komponenata stanice (Thirumdas i sur., 2014). Reaktivnost produkata plazme ovisi o plinu koji se koristi za dobivanje plazme. Koriste se dušik, kisik, zrak, plemeniti plinovi itd. Trenutno se smatra da su najefikasniji kisikovi radikali (Volkov i sur., 2019). Pri korištenju slobodni radikali direktnim kontaktom sa stanicama mikroorganizama stvaraju površinske lezije na stanicama, što ubrzo uzrokuje elektropermeabilizaciju – propusnost membrana izazvanih električnim impulsima (Toepfl i sur., 2006). Procesom difuzije reaktivne vrste prolaze kroz membranu i izravno sudjeluju u reakcijama s molekulama u staničnom sadržaju. Te reakcije mogu ugroziti cijelu stanicu, vodeći do njene smrti ili onemogućiti stanicu u daljnjem rastu (Laroussi i sur., 2003).

Dokazano je kako hladna plazma ima različit utjecaj na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije. Gram-pozitivne bakterije imaju staničnu stjenku od debljeg sloja peptidoglikana ili mureina u koju je ugrađena teikoična kiselina. Slojevi su naslagani te čine egzoskelet i definiraju oblik stanice. Stanična stjenka gram-negativnih bakterija je kompleksnija te se kemijski razlikuje od stjenke gram pozitivnih bakterija. Sadrži manje mureina, ali je kemijski otporna jer je sačinjena od lipopolisaharida, lipoproteina i fosfolipida (Lovit i Wright, 2014). Prema radu Ziuzine i sur. (2014) prikazana je veća osjetljivost gram negativnih bakterija (*E. coli* i *Salmonella*) na atmosfersku hladnu plazmu. Neka druga istraživanja pokazuju veću osjetljivost gram-pozitivnih bakterija na hladnu plazmu, te su potrebna daljnja istraživanja da bi se točnije utvrdila povezanost inaktivacije plazmom i tipa bakterijske stanice.

#### **2.1.4. Primjena hladne plazme u prehrambenoj industriji**

Primjena hladne plazme kao inovativne metode je sve češća u prehrambenoj industriji, pri inaktivaciji mikroorganizama, endogenih enzima odgovornih za posmeđivanje poput polifenol oksidaze i peroksidaze (Thirumdas, 2014). Hladna plazma se koristi za inaktivaciju mikroorganizama u mesu, voću i povrću, siru itd. Ekološki je prihvatljiva metoda za

konzerviranje pri čemu ostaju sačuvana kvaliteta i svježina proizvoda. U radu Fernandez i Thompsona (2012) pokazana je uspješna primjena hladne atmosferske plazme u inaktivaciji *Salmonella* stanica. Također primjenu pokazuje i za površinsku sterilizaciju ambalažnih materijala te za njihovu funkcionalnu modifikaciju kako bi imala željena svojstva. Kroz zadnjih nekoliko godina potvrđen je utjecaj ne termalne plazme na inaktivaciju mikroorganizama na površinama abiotskih materijala poput stakla i sintetskih membrana (Pankaj i sur., 2014). Neke od važniji primjena su u: tretmanu sirovih i sušenih proizvoda, kontroli biofilmova, dekontaminaciji procesiranih površina, površinskoj dekontaminaciji jaja i tretmanu otpadnih voda (Misra i sur., 2011).

Hladna plazma se dugo istražuje kao metoda za inaktivaciju mikroorganizama s površine voća i povrća. Učinkovitost metode je proučena na povrću (krastavci, rajčica) inokuliranom s *E. coli* gdje je nakon tretmana od 1 min došlo do značajne redukcije (Baier i sur., 2014). Povrće i voće poput krumpira i jagoda treba više vremena za potpuno uništenje bakterija zbog postojanja neravnih površina. Plazmom je moguće tretirati i meso pri čemu se postiže smanjenje psihotropnih bakterija za 3 log i ukupnih mikroorganizama za 2 log (Ulbin-Figlewicz i sur., 2013). Međutim tretman plazmom ima samo površinski učinak na tretiranu hranu. Rezultati nekoliko autora sugeriraju da učinkovitost plazme ovisi o tretiranoj površini. Tako je inaktivacija *Listeria monocytogenes* prilično izraženija u rezanom siru u odnosu na rezanu šunku, (8 log redukcije pri 150 W i 120s kod sira, a kod šunke 0,25 do 1,73 pri istim uvjetima. Utjecaj plazme na sastojke hrane nije još dovoljno istražen. Uočen je njen utjecaj na strukture proteina i smanjenje enzimske aktivnosti (Knorr i sur.,2011). Kako ne postoji standardizirana metoda za tretiranje plazmom njen utjecaj na hranu i ostale materijale ovisi o mnogim faktorima: veličina i oblik reaktora, procesni uvjeti, radni plin, volumen itd. (Vukušić, 2016). Kod tekućih uzoraka svojstva otapala mogu pridonijeti inaktivaciji. Hladna plazma se može primijeniti i na enzime. Ponekad djelovanje enzima ima negativan učinak poput enzimskog posmeđivanja koje se odvija u voću i povrću te uzrokuje njihovo kvarenje što je čest slučaj u poljoprivredi. Da se smanje gubici jedna od metoda za sprječavanje enzimskog posmeđivanja je i hladna plazma. Oksidacijske reakcije uzrokovane slobodnim radikalima i atomskim kisikom dovode do inaktivacije enzima.

Tretman hladnom plazmom našao je primjenu u degradaciji toksina i razgradnji pesticida. Najčešći toksini koji mogu biti u hrani su pesticidi i mikotoksini te je većina istraživanja usmjerena na njihovu degradaciju. Zbog njihovog kancerogenog i mutagenog djelovanja te neučinkovitosti potpune inaktivacije konvencionalnim toplinskim tretmanima u novije vrijeme istražuju se ostale metode inaktivacije. Tretman hladnom plazmom pokazao se učinkovitim za razgradnju pesticida zbog stvaranja različitih reaktivnih vrsta poput iona, molekula i slobodnih

radikala. No potrebna je daljnja optimizacija parametara procesa kako bi efikasnost tretmana plazmom bila uočeniya kod degradacije toksina te kako bi se proširila njena primjena.

## **2.2. *Escherichia coli***

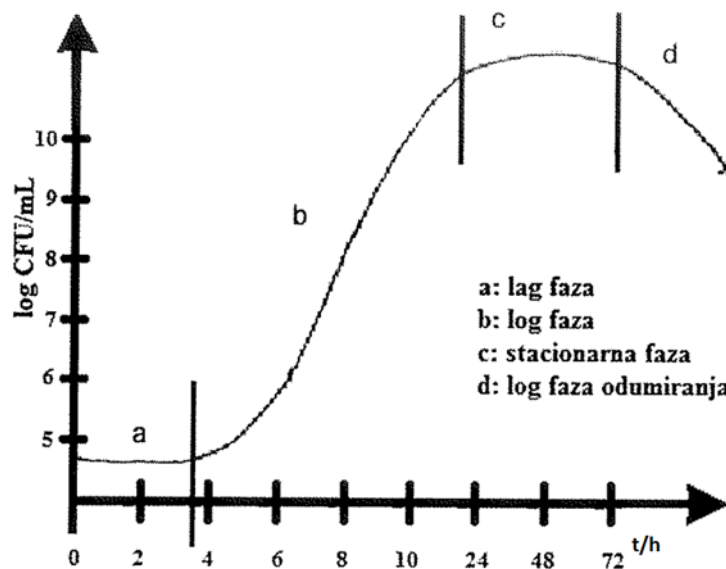
Bakterije su izrazito raznolika grupa mikroorganizama te ih je moguće naći u bilo kojem dijelu ekosustava gdje je prisutna tekuća voda. Poznato je oko 5000 priznatih vrsta bakterija, koje na temelju morfoloških i fizioloških osobina i biokemijskih karakteristika možemo podijeliti u nekoliko porodica. Jedna od važnijih porodica je i porodica *Enterobacteriaceae* ili crijevne bakterije koje se nalaze u probavnom sustavu ljudi i životinja. Među važnim rodovima enterobakterija nalaze se *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella* i dr. *Escherichia coli* je povijesno bila fokus opsežnih biokemijskih, genetskih i fizioloških ispitivanja. Svejedno podaci o njenom genomu još su uvijek predmet istraživanja (Gerdes i sur., 2003).

*Escherichia coli* je gram-negativna bakterija, redoviti stanovnik probavnog trakta sisavaca te dio obitelji *Enterobacteriaceae* i roda *Escherichia*. Fakultativni je anaerob tj. ne koristi kisik, ali u njegovoj prisutnosti bolje raste. Stanice *E. coli* su štapičaste i pokretne te nemaju mogućnost tvorbe spora. Optimalna temperatura za rast joj je 37 °C, a dobro raste u mediju s gotovo neutralnim pH vrijednostima i aktivitetom vode 0,95. Za neke sojeve poput *Escherichie coli* 0157: H7 optimum pH vrijednosti je 4,5 (Duraković i sur., 2002). *E. coli* posjeduje veliku fermentativnu i oksidacijsku sposobnost. Produkti metabolizma su joj laktati, etanol, ugljikov dioksid, acetat i sukcinat. Termičkim tretmanima namirnice iznad 70 °C kroz 15 minuta inaktiviraju se sve stanice *E. coli*. Osjetljiva je na klor i njegove spojeve kao i na ozon (Wickramanayake i Weavers, 2001). Izvan domaćina može preživjeti od 1,5 do 16 mjeseci na suhim površinama (Kramer i sur., 2006), a razdoblje od trenutka zaraze do pojave prvih simptoma bolesti (vrijeme inkubacije) je od 6 do 48 sati (Chao i Chen, 2006).

*Escherichia coli* dio je normalne crijevne flore čovjeka, neophodna za probavu i sintezu tvari za normalno funkcioniranje organizma kao što je vitamin K. Iako se najčešće ne smatra patogenim mikroorganizmom, određeni sojevi su izrazito opasni po čovjeka. Mogu uzrokovati urinarne infekcije, trovanja hranom, a neki sojevi proizvode enterotoksine koji uzrokuju dijareju (Duraković, 1996). Prisustvo enterobakterija pa tako i *E. coli* u namirnicama indikator je fekalnog zagađenja te nedovoljne higijene tijekom proizvodnje i čuvanja hrane.

Brojni laboratoriji su pokrenuli istraživanja o ekspresiji vrste *Escherichia coli* MG1655. Cijeli njen genom je poznat te su na njemu vršeni brojni eksperimenti. Na primjer navedeni soj *E.*

*coli* je sekvencioniran usprkos tomu što soj ima defekte rasta jer par mutacija koje sadržava su smatrane bezopasnim. U radu Suopene i sur. (2003) potvrđeno je da drugi sojevi *E. coli* čiji je DNA baziran na soju tipa MG1655 se mogu koristiti za izučavanje i mapiranje DNA fragmenata i proteina te se tako omogućuje proučavanje većine sojeva *E. coli*.



**Slika 2.** Prikaz faza rasta bakterija ( Anonymous 2, 2017)

Bakterijski životni ciklus je podijeljen u 4 faze prikazane grafički na slici 2. iznad. Na svaku od navedenih faza utječe niz faktora kao što su: temperatura, pH, aktivitet vode, prisutnost plinova, osmotski tlak, prisutnost drugih mikroorganizama.

1. lag faza – prvu fazu karakterizira prilagodba bakterija na medij; dolazi do rasta stanica i sinteze proteina i enzima; očituje se blago smanjenje njihovog broja zbog nastalog stresa, ali broj stanica uglavnom ostaje nepromjenjiv.
2. log faza – dolazi do eksponencijalnog rasta broja stanica, stanice se binarno dijele, troše hranjive tvari, a stvaraju otpadne tvari. Odvija se ubrzan, geometrijski rast broja stanica dok ga dostupnost nutrijenata ne ograniči.
3. stacionarna faza – označava usporavanje faze rasta odnosno ravnotežu faze rasta i ugibanja stanica. Dolazi do akumulacije otpadnih tvari, a faktori okruženja stanice

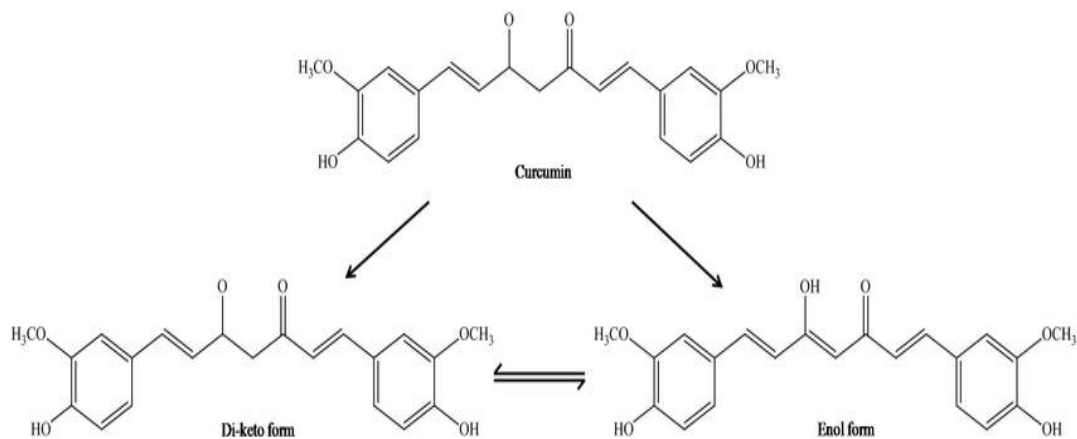
poput temperature, aktiviteta vode, pH i dostupnosti nutrijenata ograničavaju rast broja bakterija. Dužina ove faze može biti do preko 30 dana ovisno o okruženju stanice.

4. faza odumiranja – karakterizira ju eksponencijalno smanjenje broja stanica. Mrtve stanice lizirane su autolitičkim enzimima, a hranjive tvari i sadržaj stanice se oslobađa u medij (Parker i sur., 2016). Uzrok smanjenju količine bakterija su: nedostatak nutrijenata, nepovoljni energetske uvjeti i nagomilavanje metaboličkih nusprodukata.

### 2.3. Kurkumin

Kurkuma, lat. *Curcuma longa* je korjenasta biljka iz porodice đumbirovki (*Zingiberaceae*). Porijeklom je iz toplih i vlažnih tropskih područja jugoistočne Azije. Stabljika je uspravna visine do 1 m, a listovi eliptičnog oblika sa suženjem pri vrhu. Cijela je biljka iskoristiva premda se najviše koristi rizom kojim se biljka vegetativno razmnožava. Rizom je cilindričan s priraslim segmentima, aromatičan, iznutra je intenzivne žutonarančaste boje. Smatra se moćnim prirodnim lijekom koji pomaže u očuvanju zdravlja i stoljećima se koristi kao prirodni konzervans u proizvodnji hrane (Peter, 2006).

Kurkumin izoliran iz biljke kurkuma, je zlatnožute boje često korišten u Indiji ne samo za zdravstvenu zaštitu nego i za očuvanje hrane te kao boja u tekstilnoj industriji. Kurkumin koji daje žutu boju kurkumi je prvi put izoliran prije dvjestotinjak godina, a njegova struktura kao diferuloilmetana određena je 1910. Kurkumin je hidrofobni polifenol izveden iz podzemnog stabla (rizoma) biljke kurkuma, koji ima širok spektar bioloških i farmakoloških djelovanja. Može se dobiti ekstrakcijom iz začina, ali se uglavnom proizvodi kemijskom sintezom. Kemijski gledano kurkumin je bis- $\alpha,\beta$  nezasićeni  $\beta$ -diketon (1,7-diaril-hepta-1,6-dien-3,5-dion) koji pokazuje keto – enolnu tautomeriju prikazanu na slici 3. U kiselom i neutralnom mediju je u keto dominantnom obliku, a u lužnatom mediju u stabilnom enolonom obliku. Topljiv je u dimetil sulfoksidu (DMSO), acetonu i uljima. Kurkumin na tržištu sadrži približno 77 % diferuloilmetana, 17 % demetoksikurkumina i 6 % bisdemetoksikurkumina. Tradicionalno, kurkuma je korištena za pomoć u liječenju mnogih bolesti, posebno kao protuupalni agens te je kurkumin identificiran kao najvažniji aktivni sastojak kurkume (Anand i sur., 2007a). Iscrpnim znanstvenim istraživanjima utvrđena su njegova antioksidativna, protuupalna, antimikrobna i antikancerogena svojstva.



**Slika 3.** Kemijska struktura kurkumina u keto i enolnoj formi (Lee i sur., 2013).

### 2.3.1. Primjena kurkumina i njegovih derivata

Kurkumin je prirodno bojilo koje se kao prehrambeni aditiv označava brojem E100 (Peter, 2006). Daje jarku žutu boju i pri vrlo malim dozama koje se obično kreću u rasponu 5-200 ppm. Sladoled okusa vanilije sadržava mješavinu kurkumina (200ppm) i norbiksina (12ppm) te su stoga na tržištu dostupne mješavine kurkumina da proizvod bude odgovarajuće boje. Kurkumin se upotrebljava i kao zamjena za šafran iako postoji velika razlika u aromi. Kurkumin izdvojen iz učestalog začina kurkume je stoljećima korišten kao lijek za mnoge bolesti. Opsežna znanstvena istraživanja u zadnjem desetljeću pokazala su mogućnost kurkumina da regulira stanične procese i tako posjeduje preventivnu i terapijsku vrijednost u liječenju različitih bolesti. Kurkumin ima raznolik raspon ciljnih molekula na koje djeluje poput transkripcijskih faktora, faktora rasta i njihovih receptora, citokina, enzima i gena koji reguliraju apoptozu stanice.

Prema radu Jin i sur. (2014) kurkumin se pokazao prilično siguran i pri većim dozama pri njegovoj primjeni na životinjama poput štakora. Primjenom kurkumina znatno se smanjila sekundarna šteta u već ozlijeđenoj leđnoj moždini štakora te je spriječena pojava edema i apoptoze. Slično tomu efikasnost kurkumina u tretiranju različitih bolesti je također dokumentirana. Njegova farmakološka sigurnost i efikasnost čini ga snažnim spojem u tretiranju i prevenciji širokog spektra ljudskih bolesti. U svom radu Tyagi i sur. (2015) proučavali su utjecaj kurkumina na četiri bakterije koje kod ljudi uzrokuju bolesti (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*). Istraživanje je pokazalo kako kurkumin bakterijama oštećuje njihov zaštitni vanjski omotač, čineći ga propusnim. Time štetne tvari iz okoliša lakše prodiru u stanicu te one postaju



oslabljenje i umiru. Kali i sur. (2016) istraživanjem na biofilmovima pokazuju kako je odgovarajući antibiotik s kurkuminom imao jača antibakterijska svojstva od samog antibiotika. Zaključili su da kurkumin djeluje sinergijski te se preporučuje kao potporna terapija uz terapiju antibioticima.

Usprkos tomu kurkumin još nije odobren kao terapijski lijek ponajviše zbog problema njegove biodostupnosti. Razlozi smanjene biodostupnosti bilo koje tvari u tijelu najčešće su niska aktivnost te tvari u tijelu, njena slaba apsorpcija i velika brzina metabolizma. Radovi u zadnjih trideset godina o apsorpciji, distribuciji, metabolizmu i izlučivanju kurkumina otkrivaju da brz metabolizam i slaba apsorpcija kurkumina ozbiljno umanjuju njegovu biodostupnost. Smanjena biodostupnost se očituje i u niskim razinama u serumu, ograničenoj distribuciji tkivom te kratkom poluživotu eliminacije (Anand i sur., 2007b).

Razvojem analoga kurkumina, ferocenskih analoga s različitim aktivnim skupinama cilj je utvrditi postoje li slični učinci koji se pripisuju i originalnom spoju kurkumina. Jedan od spojeva koji se koristio za sintezu analoga kurkumina u ovom radu je ferocenski spoj, točnije ferocenilacetone, ranije poznat u literaturi (Fuentealba i sur., 2007). Ferocen karakterizira „sendvič struktura“ sa atomom željeza u sredini povezanog sa svih deset atoma ugljika. Zbog svojih karakterističnih svojstava (stabilnost na zraku, topljivost u organskim otapalima, netoksičnost, reverzibilne redoks karakteristike), ferocen je jedan od najvažnijih organometalnih spojeva koji je našao primjenu u raznim područjima. Ferocen i njegovi derivati pokazuju antimalarijsku i antitumorsku aktivnost te se korištenje ferocena smatra alternativnim pristupom smanjenja citotoksičnosti organskih farmakofora (Singg i sur., 2019; Snegur i sur., 2014; Astruc 2017; Patra & Gasser, 2017). Ferocenski asimetrični kurkuminoid-pirazoli sintetizirani su u Laboratoriju za organsku kemiju; Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Struktura pripremljenih spojeva potvrđena je IR- i NMR-spektroskopijom.

U našem su istraživanju korištena 4 ferocenska analoga:

- ferocenski analog kurkumina: (E)-5-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1-ferocenilpent-4-en-1,3-dion (501)
- ferocenski kurkuminoid pirazol: (E)- 3(5)- [3- (4- hidroksi-3- metoksifenil)- etenil]-5(3)- ferocenil- 1H- pirazol (502)
- ferocenski kurkuminoid pirazol: (E)- 3(5)- [β- (4- hidroksi- 3- metoksifenil)- etenil]-5(3)- ferocenil 1H- pirazol-1-il-(fenil)metanon (503)

- ferocenski kurkuminoid pirazol: (E)- 3(5)- [ $\beta$ - (4- hidroksi- 3- metoksifenil)- etenil]- 5(3)- ferocetil- 1H- pirazol-1- il- (fenil) metanon (504).

Cilj rada bio je ispitati njihovo antimikrobno djelovanje u kombinaciji s tretmanom hladnom plazmom.

### 3. MATERIJAL I METODE RADA

#### 3.1. MATERIJAL

##### 3.1.1. Kemikalije za uzgoj stanica

- Agar, *Biolife*, Italija
- Hranjivi bujon, *Biolife*, Italija
- Kalijev dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), p.a., *Kemika*, Hrvatska
- Kalijev klorid (KCl) p.a., *Kemika*, Hrvatska
- Analози kurkuminu:
  - ferocenski analog kurkumina: (E)-5-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1-ferocetilpent-4-en-1,3-dion (501)
  - ferocenski kurkuminoid pirazol: (E)- 3(5)- [ $\beta$ ,3- (4- hidroksi-3- metoksifenil)- etenil]- 5(3)- ferocetil- 1H- pirazol (502)
  - ferocenski kurkuminoid pirazol: (E)- 3(5)- [ $\beta$ - (4- hidroksi- 3- metoksifenil)- etenil]- 5(3)- ferocetil 1H- pirazol-1-il-(fenil)metanon (503)
  - ferocenski kurkuminoid pirazol: (E)- 3(5)- [ $\beta$ - (4- hidroksi- 3- metoksifenil)- etenil]- 5(3)- ferocetil- 1H- pirazol-1- il- (fenil) metanon (504)
- Natrijev hidrogenfosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) p.a., *Kemika*, Hrvatska
- Natrijev klorid (NaCl) p.a., *Kemika*, Hrvatska
- 0,01 M otopina  $\text{NaNO}_3$

##### 3.1.2. Laboratorijska oprema

- Autoklav, *INKO lab d.o.o.*, Hrvatska
- Centrifuga Centric 150, *Tehnica*, Slovenija
- Infracrveni termometar PCE-777, *PCE Instruments*, Velika Britanija
- Laminar s UV lampom (30 W), *Klimaoprema*, Hrvatska

- Mjerač protoka, *Messer*, Hrvatska
- Mjerač frekvencija, *Eaton electric*, Kanada
- Motor za plazma uređaj, *Techtop*, SAD
- pH metar i konduktometar HI2020, *Hanna Instruments*, Rumunjska
- Stolna miješalica SA8, *Stuart*, SAD
- Plazma jet, *Institut za fiziku*, Hrvatska
- 30 kV visokonaponski pulsni generator, *Spellman*, Velika Britanija
- Tehnička vaga, *Sartorius*, Velika Britanija
- Termostat, *Instrumentaria*, Hrvatska

### **3.1.3. Radni mikroorganizam**

U ovom radu kao radni mikroorganizam korištena je gram negativna bakterijska kultura *Escherichia coli* MG1655-K12. Bakterijska kultura uzeta je iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za biologiju i genetiku mikroorganizama, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu te je čuvana u zbirci mikroorganizama Laboratorija za procesno-prehrambeno inženjerstvo.

### **3.1.4. Hranjiva podloga za uzgoj bakterijskih stanica**

Za uzgoj bakterijskih stanica korišten je neselektivni hranjivi bujon.

***Priprema:*** Nakon otapanja 8 g praha u 1000 mL destilirane vode, podloga je sterilizirana 15 min pri temperaturi 121 °C i tlaku  $1,01 \times 10^5$  Pa. Konačni pH otopine je iznosio  $7 \pm 0,2$ .

Za pripravu čvrste hranjive podloge u 8 g praha na 1000 mL destilirane vode dodano je 20 g agar. Otopina je sterilizirana 15 min pri temperaturi 121 °C i tlaku  $1,01 \times 10^5$  Pa te joj je konačni pH iznosio također  $7 \pm 0,2$ .

### **3.1.5. Fosfatni pufer (engl. *Phosphate Buffer Saline, PBS*)**

Otopina fosfatnog pufera pripravljena je otapanjem 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,62 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  u 1 L destilirane vode. Vrijednost pH korigirana je sa 6 mol  $\text{L}^{-1}$  HCl na 7,00. Otopina je sterilizirana 15 min pri temperaturi 121 °C i tlaku  $1,01 \times 10^5$  Pa.

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Čuvanje i održavanje bakterijskih kultura

Kultura bakterije *E. coli* čuvana je u 50% glicerolu u Eppendorf epruvetama na -20 °C, te je precjepljivana svakih mjesec dana.

### 3.2.2. Priprema uzorka *E. coli*

Kultura je nacijepljena u sterilne plastične epruvete u sterilnim uvjetima u laminaru na način da je 20 µL čiste kulture iz 50% glicerola pipetirano u 10 mL neselektivnog hranjivog bujona. Nacijepljeni uzorci inkubirali su se 18 h pri 37 °C. Nakon toga provedeno je centrifugiranje pri 4000 okretaja u minuti ( $o\ min^{-1}$ ) kroz 10 minuta, nakon čega se odlio supernatant te se u uzorak pipetiralo 10 mL sterilne otopine PBS-a. Uzorak se vorteksirao te ponovno centrifugirao. Navedeni postupak se ponovio 3 puta gdje se pri zadnjem centrifugiranju i odlijevanju supernatanta odpipetiralo 10 mL sterilne destilirane vode.

### 3.2.3. Priprema uzorka za tretiranje hladnom plazmom

Pripremljen uzorak čiste kulture *E. coli* (10 mL) pomiješan je sa 90 mL 0,01 M otopine natrijevog nitrata električne provodljivosti  $100\ \mu S\ cm^{-1}$ . U navedeni uzorak dodano je 100 µL zadane otopine kurkumina koncentracije  $30\ \mu mol\ mL^{-1}$  te je takav tretiran hladnom plazmom.

### 3.2.4. Tretman kurkuminom

U pripremljeni uzorak pipetirane su otopine kurkumina koncentracije  $30\ \mu mol\ mL^{-1}$  te je praćena zona inhibicije i kinetika rasta.

**Zona inhibicije:** Na petrijevu zdjelicu nacijepio se 100 µL mikroorganizma *E. coli* te se sterilno raspršio po podlozi. Filtar papir veličine  $1 \times 1\ cm^2$  uronio se u zadanu otopinu kurkumina (pripremljenu u acetonu), posušio se kako bi ishlapio aceton te se postavio na prethodno

nacijepljenu petrijevu zdjelicu. Filtar papir postavljen je u triplikatu. Petrijeva zdjelica se inkubirala pri zadanim uvjetima te se očitala zona inhibicije nakon 24 sata.

***Kinetika rasta:*** U 4,9 mL neselektivnog bujona nacijepio se 0,1 mL pripremljene otopine kurkumina koncentracije  $30 \mu\text{mol mL}^{-1}$  i 0,1 mL *E. coli*. Pratila se kinetika rasta nacijepljivanjem na podloge nakon 1, 3 i 24 sata.

### 3.2.5. Generiranje hladne plazme

U eksperimentu su korištena dva tipa hladne plazme: visokonaponsko električno pražnjenje – HVED plazma i plazma JET.

***HVED plazma*** - definirani parametri su frekvencija (90Hz) i vrijeme tretiranja (3 i 6 min). Prije tretiranja hladnom plazmom mjerena je pH vrijednost, a temperatura i broj poraslih stanica mjerena je prije i poslije tretmana. Za generiranje plazme korišten je 30 kV pulsni visokonaponski generator izlazne snage 1200 W i izlazne struje 40 mA. Generator je spojen na kondenzator kapaciteta 0,75 nF, te serijski spojene otpornike ukupnog otpora 9,5 M $\Omega$ . Frekvencija od 90 Hz namještena je preko mjerača frekvencija i rotirajuće sklopke. Reaktor je bio volumena 500 mL, s gumenim čepom s otvorima za elektrode. Konfiguracija elektroda u reaktoru bila je postavljena u obliku točka-ploča konfiguracije, odnosno s igličnom visokonaponskom elektrodom te elektrodom uzemljenja od nehrđajućeg čelika.

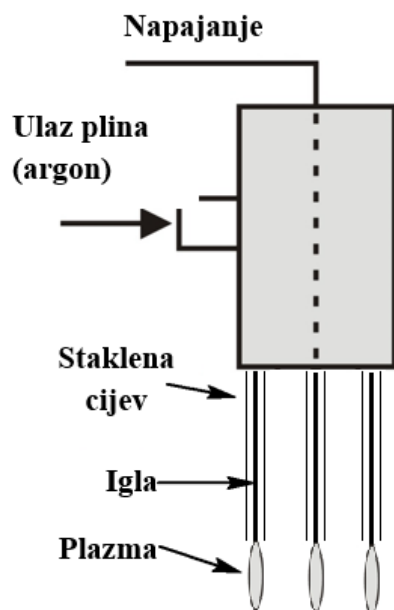
Plazma je generirana uz hibridnom tipu reaktora (slici 4.) gdje se visokonaponska elektroda od nehrđajućeg čelika (medicinska igla Microlance TM 3,81 cm) nalazi u tekućoj fazi kroz koju je upuhivan plemeniti plin argon čistoće 99,99% protoka 5 L h<sup>-1</sup>. Elektroda uzemljenja nalazila se u plinskoj fazi iznad razine tekućine. Takav tip reaktora omogućio je bolje miješanje uzorka te generiranje plazme u mjehurićima u tekućini i u plinskoj fazi.



**Slika 4.** Prikaz hibridnog reaktora HVED plazme (vlastita fotografija)

**Plazma jet** - drugi dio eksperimenta proveden je pomoću plazma jet konfiguracije koju možemo vidjeti na slici 5. Kao izvor plazme korišten je atmosferski mlaz sa tri elektrode, end-field mlazni tip, a operativni plin bio je argon čistoće 99,99%. Uređaj je sastavljen od teflonskog kućišta na koji su pričvršćene 3 staklene kapilarne cjevčice dužine 7,5 cm, unutarnjeg promjera 0,1 cm i vanjskog promjera 0,15 cm. Unutar cjevčica su smještene bakrene elektrode promjera 100  $\mu\text{m}$  te su pričvršćene na izvor visokog napona preko vakuum čvrste spojnice. Izvor napona od 6 W daje 2,5 kV pri frekvenciji od 25 kHz-a. Realna struja iznosi 3 mA, a realna snaga plazme iznosi 4 W. Na cjevčice je također spojen izvor argona čiji se protok regulira rotametrom. Namješteni protok bio je  $1 \text{ L h}^{-1}$

Uzorci za oba tipa plazme izuzeli su se prije početka tretiranja te nakon tretmana od 3 i 6 minuta.



**Slika 5.** Shematski prikaz konfiguracije plazme jet

### 3.2.6. Određivanje temperature i provodljivosti

Mjerenje provodljivosti provodilo se na digitalnom pH metru i konduktometru (HI2020, *Hanna Instruments*, Rumunjska) pri čemu su se elektrode uranjale u uzorak te se nakon stabilizacije očitala izmjerena vrijednost. Mjerena je vrijednost provodljivosti uzorka prije dodatka otopine kurkumina i tretmana hladnom plazmom te je iznosila  $100 \mu\text{S cm}^{-1}$  za tretmane HVED plazmom i plazmom jet. Temperatura je mjerena pomoću laserske sonde (Infracrveni termometar PCE-777, *PCE Instruments*, Velika Britanija) kojom je određena početna temperatura te temperatura nakon 3 i 6 minuta svih uzoraka tokom oba tretmana plazmom.

### 3.2.7. Određivanje broja stanica prije i nakon tretmana

Ukupan broj stanica određen je prije i nakon oba tretmana (kurkuminom i hladnom plazmom) kako bi se odredila redukcija u broju stanica. Broj živih stanica bazira se na porastu pojedinačnih kolonija iz svake žive stanice, u ovom slučaju porast kulture *E. coli*. Bakterijske stanice naciepljene su na neselektivni hranjivi agar. Pripremljena su decimalna razrjeđenja na način da je za prvo decimalno razrjeđenje otpipetiran volumen od  $10 \mu\text{L}$  početnog uzorka u  $90 \mu\text{L}$  sterilne otopine PBS-a. Postupak decimalnih razrjeđenja je ponavljan do sedmog razrjeđenja. Uzorci su naciepljeni u triplicatu na način da se otpipetiralo  $10 \mu\text{L}$  uzorka na

hranjivu podlogu bez razmazivanja. Tako nacijepljene ploče inkubirale su se pri 37 °C kroz 24 h. Za svako razrjeđenje odredila se srednja vrijednost, a ukupni broj izražava se kao logaritam broja stanica u mililitru suspenzije ( $\log_{10}$  broj stanica mL<sup>-1</sup>).

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

##### 4.1 Tretman kurkuminom – praćenje kinetike rasta *E.coli*

U ovom radu cilj eksperimentalnog dijela bio je odrediti utjecaj hladne plazme i analoga kurkumina na inaktivaciju gram-negativne bakterije *Escherichia coli* MG1655 – K12. Prvi dio eksperimenta je tretman uzorka bakterije s četiri različita ferocenska analoga kurkumina koncentracije 30  $\mu\text{mol mL}^{-1}$ . Drugi dio eksperimenta uključuje utjecaj četiri različita ferocenska analoga kurkumina koncentracije 30  $\mu\text{mol mL}^{-1}$  i hladne plazme na inaktivaciju bakterije *Escherichia coli* MG1655 – K12.

Tablice 1-4. Rezultati praćenja kinetike rasta bakterije *E. coli* nakon tretmana sa analozima kurkumina (501;502;503;504.)

**Tablica 1.** Utjecaj ferocenskog alaloga kurkumina (501) na inaktivaciju bakterije *E. coli* tijekom 1, 3 i 24 h.

Uzorak 501	Broj stanica	Log <sub>10</sub> CFU broj stanica mL <sup>-1</sup>
<i>E. coli</i> (početni broj bez kurkumina)	4,8x10 <sup>7</sup>	7,68
<i>E. coli</i> nakon 1h	9,3x10 <sup>7</sup>	7,97
<i>E. coli</i> nakon 3h	nebrojivo	/
<i>E. coli</i> nakon 24h	3,5x10 <sup>9</sup>	9,54



**Tablica 2.** Utjecaj ferocenskog kurkuminoid pirazola (502) na inaktivaciju bakterije *E. coli*

Uzorak 502	Broj stanica	Log <sub>10</sub> CFU broj stanica mL <sup>-1</sup>
<i>E. coli</i> (početni broj bez kurkumina)	1x10 <sup>6</sup>	6,00
<i>E. coli</i> nakon 1h	1x10 <sup>5</sup>	5
<i>E. coli</i> nakon 3h	3,167x10 <sup>7</sup>	7,5
<i>E. coli</i> nakon 24 h	1x10 <sup>7</sup>	7,00

**Tablica 3.** Utjecaj ferocenskog kurkuminoid pirazola (503) na inaktivaciju bakterije *E. coli*

Uzorak 503	Broj stanica	Log <sub>10</sub> CFU broj stanica mL <sup>-1</sup>
<i>E. coli</i> (poč.broj bez kurkumina)	5,785x10 <sup>7</sup>	7,76
<i>E. coli</i> nakon 1h	2,82x10 <sup>6</sup>	6,45
<i>E. coli</i> nakon 3h	1,067x10 <sup>7</sup>	7,03
<i>E. coli</i> nakon 24 h	1,05x10 <sup>8</sup>	8,02

**Tablica 4.** Utjecaj ferocenskog kurkuminoid pirazola (504) na inaktivaciju bakterije *E. coli*

Uzorak 504	Broj stanica	Log <sub>10</sub> CFU broj stanica mL <sup>-1</sup>
<i>E. coli</i> (poč.broj bez kurkumina)	6,13x10 <sup>5</sup>	5,79
<i>E. coli</i> nakon 1h	1,51x10 <sup>6</sup>	6,18
<i>E. coli</i> nakon 3h	7,53x10 <sup>6</sup>	6,88
<i>E. coli</i> nakon 24 h	1,27x10 <sup>9</sup>	9,10

Tijekom tretmana sva četiri uzorka su naciepljena na hranjive podloge i inkubirana kako bi se detektirao mogući porast kolonija bakterija. Inkubacija je provedena pri 37°C budući da tada *Escherichia coli* odnosno njen enzimski sustav ima optimalnu aktivnost (Duraković, 1996). Inkubiranim uzorcima nakon 1, 3 i 24 h izračunata je srednja vrijednost broja poraslih kolonija. Iz priloženih tablica (Tablica 1-4) u svim uzorcima je primijećen porast broja poraslih kolonija *E. coli* nakon inkubacije od 24 h. Uzorci 501 i 504 imaju najveći porast pri čemu uzorak 4 ima 3,31 log<sub>10</sub> broj stanica mL<sup>-1</sup> veći broj kolonija od početnog uzorka koji nije tretiran otopinom kurkumina. U svim uzorcima nakon vremena inkubacije od 3 h broj poraslih kolonija je u prosjeku iznosio 7,14 log<sub>10</sub> broj stanica mL<sup>-1</sup> što je približno u odnosu na njihov prosječan početni broj od 6,81 log<sub>10</sub> broj stanica mL<sup>-1</sup>. Međutim u uzorcima 502 i 503 vidljiv je pad broja kolonija na podlogama koje su inkubirane jedan sat. Blago smanjenje nakon prvog sata posljedica je toga da se stanice *E. coli* prilagođavaju na nove uvjete u lag fazi rasta.

#### **4.1.1. Tretman kurkuminom – određivanje zone inhibicije na podlogama**

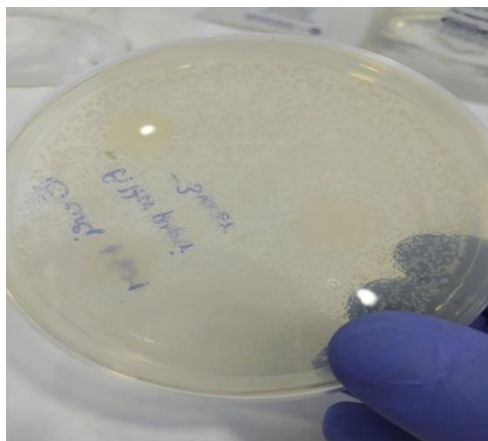
Drugi dio tretmana kurkuminom je očitavanje zone inhibicije naciepljene podloge nakon 24 sata inkubacije. U svakom uzorku je korištena čista kultura *E. coli* raspršena po podlozi i u njoj postavljen filter papirić natopljen pripremljenim otopinama ferocenskih analoga kurkumina.

**501.** (E)-5-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1-ferocenilpent-4-en-1,3-dion

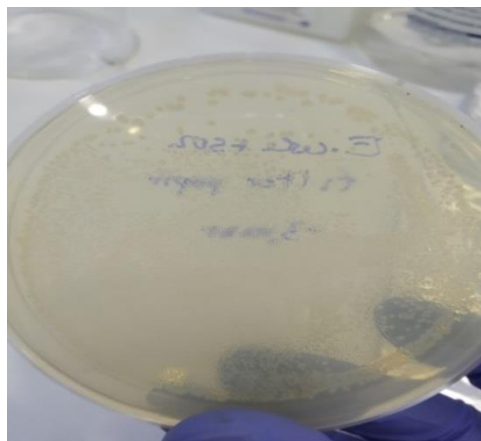
**502.** (E)- 3(5)- [3- (4- hidroksi-3- metoskifenil)- etenil]- 5(3)- ferocenil- 1H- pirazol

**503.** (E)- 3(5)- β- (4- hidroksi- 3- metoksifenil)- etenil]- 5(3)- ferocenil 1H- pirazol-1-il- (fenil)metanon

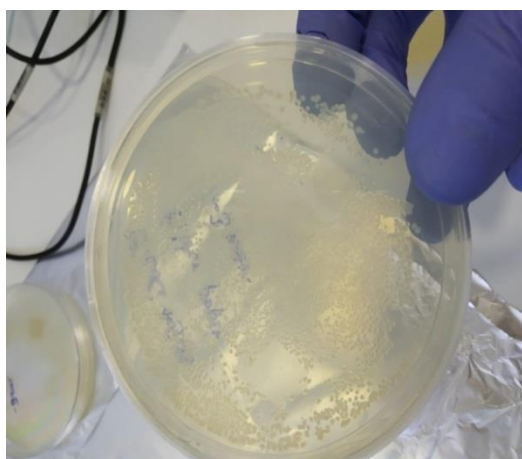
**504.** (E)-3(5)- [β- (4- hidroksi- 3- metoksifenil)- etenil]- 5(3)- feroceniil- 1H- pirazol-1- il- (fenil) metanon



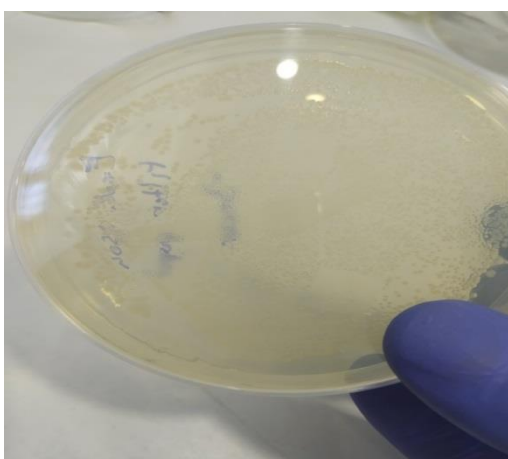
**Slika 6.** *E. coli* + otopina kurkumina br.501  
br.502



**Slika 7.** *E. coli* + otopina kurkumina



**Slika 8.** *E. coli* + otopina kurkumina br.503  
br.504



**Slika 9.** *E. coli* + otopina kurkumina

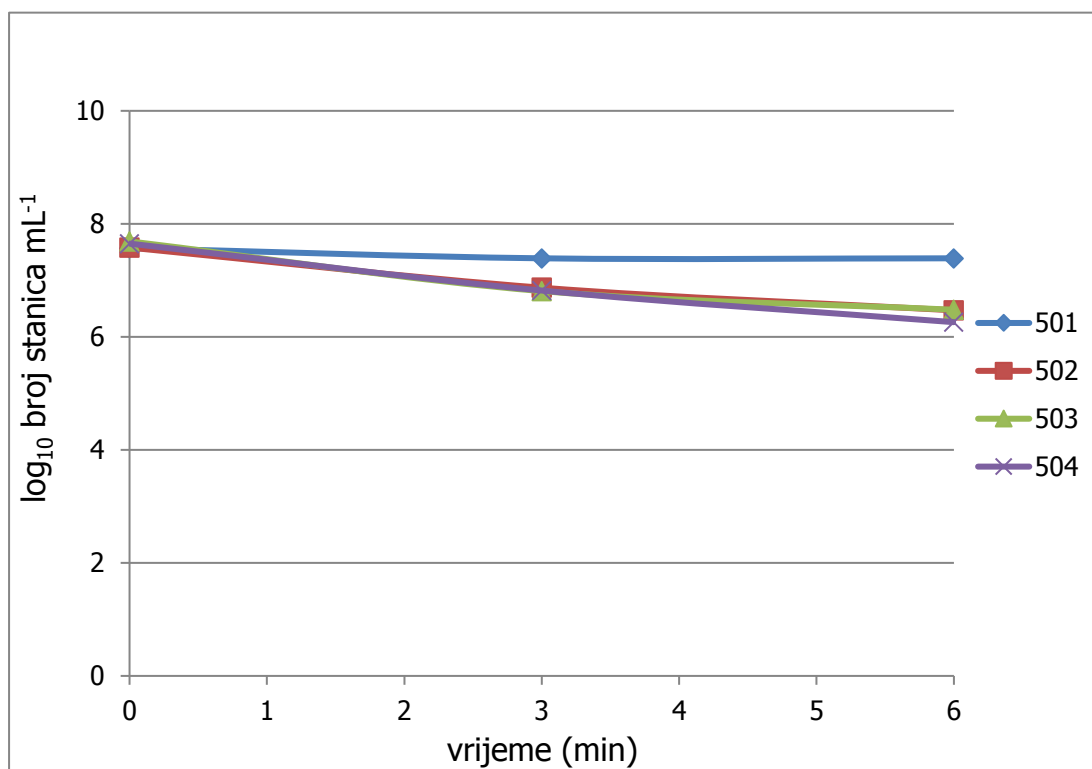
Rezultati određivanja zona inhibicije *E. coli* prikazani su na slikama 7-10. Zona inhibicije površine 1 cm<sup>2</sup> primijećena je kod uzoraka 501 i 503 na sva tri mjesta prethodno postavljeneog filter papira. Uzorak 504 zonu inhibicije ima vidljivu samo na jednom mjestu (donji desni dio slike 9). Zona inhibicije nije vidljiva na uzorku 502. Na osnovu rezultata može se pretpostaviti da uzorak 501 odnosno ferocenski analog kurkumina pokazuje inhibitorni učinak. Od tri ferocenska kurkuminoid pirazola uzorak 503 jedini inhibira porast kolonija *E. coli*.

## 4.2. Tretman hladnom plazmom

U drugom dijelu eksperimenta proveden je tretman uzorka *Escherichia coli* MG1655 – K12 sa hladnom plazmom. Uzorak smo tretirali sa plazmom jet i HVED plazmom. Praćeno je djelovanje hladne plazme u kombinaciji sa prethodno navedenim spojevima sličnim kurkuminu pri vremenu tretiranja 3 i 6 minuta. Proces se odvijao u atmosferskim uvjetima u reaktoru od 500 mL, sa argonom kao radnim plinom. Prije oba tretmana (HVED i jet plazma) u reaktor je dodana jedna od četiri otopina kurkumina. Za svaku otopinu ferocenskog analoga kurkumina uzet je uzorak prije tretmana hladnom plazmom te nakon vremena od 3 i 6 minuta. Rezultati mjerene temperature prikazani su tablično, dok su rezultati broja stanica prikazani grafički na slikama 11 i 12.

**Tablica 5.** Izmjerene vrijednosti temperature nakon tretmana jet plazmom

	<b>501</b>		
vrijeme/min	0	3	6
temp./ °C	19,6	19,6	19,6
	<b>502</b>		
vrijeme/min	0	3	6
temp./ °C	19,3	21,7	21,9
	<b>503</b>		
vrijeme/min	0	3	6
temp./ °C	19,4	19,6	21,0
	<b>504</b>		
vrijeme/min	0	3	6
temp./ °C	19,1	20,8	21,5



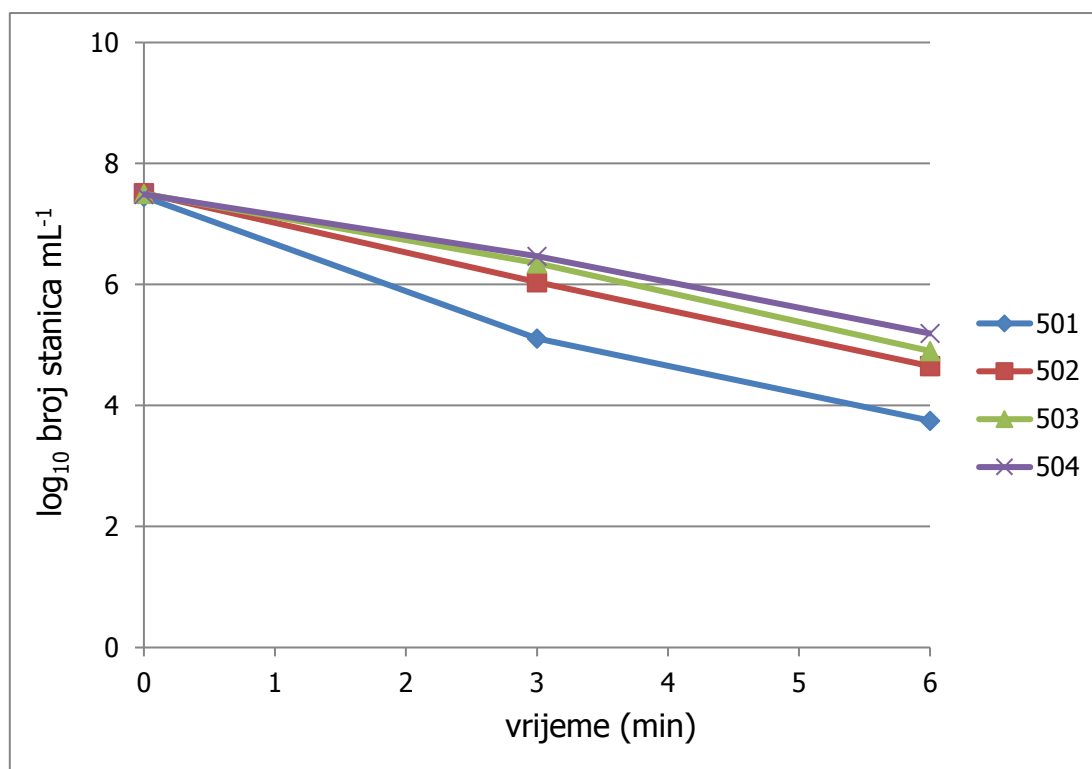
**Slika 10.** Utjecaj plazme jet i četiri različita ferocenska analoga kurkumina na inaktivaciju ( $\log_{10}$  broj stanica  $\text{mL}^{-1}$ ) stanica *E. coli* u ovisnosti o vremenu tretiranja (min)

Iz rezultata na slici 11 je vidljivo da je jet plazma u kombinaciji sa otopinama ferocenskih analoga kurkumina minimalno reducirala kolonije *E. coli*. Otopina kurkumina 501 tijekom tretmana od 3 i 6 minuta pokazala je najmanji pad broja poraslih kolonija od samo 0,18  $\log_{10}$  broj stanica  $\text{mL}^{-1}$ . U ostalim uzorcima (502, 503 i 504) primijećena je redukcija broja kolonija približno za 1  $\log_{10}$  broj stanica  $\text{mL}^{-1}$ . Uzorak 504 je pokazao najveći inhibitorski učinak te je nakon tretmana od 6 minuta došlo do 1,39  $\log_{10}$  broj stanica  $\text{mL}^{-1}$  redukcije od odnosu na isti uzorak ne tretiran hladnom plazmom.

Prema radu Homma i sur. (2013) kraće udaljenosti poput par milimetara od igle koja raspršuje plazmu pokazale su se učinkovitije u baktericidnom efektu prema *E. coli*. Temperatura u reaktoru se povećavala sa trajanjem tretmana te je nakon šest minuta tretmana bila 1,6 do 2,6 °C viša u odnosu na temperaturu prije tretmana plazmom. U uzorku 501 zabilježen je najmanji porast temperature od 1 °C. Takva promjena temperature je očekivana za plazmu jet.

**Tablica 6.** Rezultati nakon tretmana HVED plazmom

	<b>501</b>		
vrijeme/min	0	3	6
temp./ °C	19,6	27,7	34,1
	<b>502</b>		
vrijeme/min	0	3	6
temp./ °C	19,6	26,8	31,4
	<b>503</b>		
vrijeme/min	0	3	6
temp./ °C	19,6	27,5	32,6
	<b>504</b>		
vrijeme/min	0	3	6
temp./ °C	19,6	28,5	35,0



**Slika 11.** Utjecaj visokonaponskog električnog pražnjenja i četiri različita ferrocenska analoga kurkumina na inaktivaciju ( $\log_{10}$  broj stanica  $\text{mL}^{-1}$ ) stanica *E. coli* u ovisnosti o vremenu tretiranja (min)

Nakon tretmana HVED plazmom sva četiri uzorka su naciyepljena na hranjive podloge i inkubirana pri 37 °C u uvjetima rasta kako bi se detektirao mogući porast kolonija bakterija i analizirala učinkovitost primijenjene tehnologije. Na slici 12. prikazan je broj log-ova redukcije poraslih kolonija bakterije u ovisnosti vremena tretiranja uzorka (prije tretiranja, nakon 3 i 6 min tretmana). Iz grafa se može uočiti da je u sva četiri uzorka broj logova redukcije poraslih bakterija proporcionalan duljini tretiranja uzorka. Nakon 3 minute tretmana redukcija kolonija *E. coli* redom se povećava od 1,02  $\log_{10}$  broj stanica  $\text{mL}^{-1}$  kod uzorka 504 do redukcije od 2,34  $\log_{10}$  broj stanica  $\text{mL}^{-1}$  kod uzorka 501. Isti princip povećanja redukcije od 504 prema 501 uočen je nakon tretmana od 6 min. Tako da 501 nakon cijelog tretmana pokazuje najveću redukciju od 3,7  $\log_{10}$  broj stanica  $\text{mL}^{-1}$ .

Početna temperatura u reaktoru kod svih uzoraka od 19,6 °C je nakon tretmana iznosila iznad 30 °C. Konačne temperature nakon primjene HVED plazme znatno su više nego one nakon tretmana jet plazmom. Konkretno uzorku 501 razlika temperatura nakon i prije tretmana iznosi 14,5 °C, dok za isti uzorak tretiran jet plazmom  $\Delta T$  iznosi 0 °C. Prosječan  $\Delta T$  svih uzoraka

tretiranih HVED plazmom iznosi 13,67 °C, a za tretman jet plazmom iznosi 1,65 °C. Razlog veće promjene temperature je u izvedbi samog reaktora pri čemu je za HVED plazmu korišten pulsni visokonaponski generator. Tijekom stvaranja plazme električno polje prenosi energiju na elektrone, a oni svoju energiju prenose na neutralne čestice putem sudara. Elastični sudari ne dovode do promjene unutarnje energije, ali imaju ulogu u električnoj vodljivosti plazme kao i u apsorpciji elektromagnetskog zračenja (Braithwaite, 2000). Kod neelastičnih sudara dolazi do prijelaza kinetičke energije sudarajućih čestica u unutrašnju energiju te kinetička energija elektrona dovodi do promjene unutrašnjih stupnjeva slobode. Pretpostavlja se da su izraženiji porasti temperature pri tretmanu HVED plazmom rezultat neelastičnih sudara. Najviša temperatura nakon 6 minuta tretmana primijećena je u uzorku 504 i iznosila je 35,0 °C.

Prisutnost radikala kao stresnih parametara je glavni razlog redukcije broja kolonija *E. coli*. Cho i sur. (2003) su u svojoj studiji pokazali izravnu korelaciju između OH iona i brzine inaktivacije *Escherichie coli*, što pokazuje da je OH radikal primarna oksidirajuća vrsta odgovorna za inaktivaciju *E. coli*. OH radikali formiraju se u hidratacijskom sloju oko DNA molekule te izazivaju do 90 % oštećenja DNA (Thirumdas i sur., 2014).

Analozi kurkumina sa ferocenijskom skupinom pokazuju veću aktivnost u suzbijanju radikala i zaštiti DNA od radikalima inducirane oksidacije. Pokazuju veću antioksidativnu aktivnost nego tradicionalni analozi koji u svojoj strukturi sadrže hidroksilne grupe (Amalraj i sur., 2017). Također kurkumin u istraživanjima pokazuje izrazito sinergističko djelovanje (Jin i sur., 2014; Lee i sur., 2013; Anand i sur., 2007). Usporedbom slike 11 i slike 12 primijećeno je da tretman kurkumina u sinergiji sa hladnom plazmom pokazuje veću učinkovitost u redukciji broja stanica *E. coli*.



## 5. ZAKLJUČCI

Iz dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Tretman kurkuminom nije se pokazao učinkovitim u redukciji broja kolonija *E. coli*.
2. Zone inhibicije nakon tretmana kurkuminom primijećene su samo kod otopina kurkumina br. 501 i 503. U ostala dva uzorka inhibicije nije bilo.
3. Tretman hladnom plazmom u kombinaciji sa kurkuminom je u odnosu na tretman kurkuminom pokazao puno veću učinkovitost u redukciji *Escherichie coli* MG1655 – K12.
4. Vrijeme tretiranja uzorka je očekivano važan čimbenik u tretmanu hladnom plazmom te je s duljim trajanjem tretmana redukcija bila veća.
5. HVED plazma pokazala je veću učinkovitost pri inaktivaciji stanica *E. coli* naspram tretmana sa plazmom jet. Tretmanom stanica *E. coli* sa ferocenskim analogom kurkumina (501) u kombinaciji sa HVED plazmom postignuta je najveća redukcija od  $3,7 \log_{10}$  broj stanica  $\text{mL}^{-1}$ .
6. Više temperature svih uzoraka ( $13,67^\circ\text{C}$  u prosjeku za HVED u odnosu  $1,65^\circ\text{C}$  za jet plazmu) očitane nakon tretmana hladnom plazmom objašnjavaju se kao posljedica neelastičnih sudara elektrona i neutralnih čestica tijekom stvaranja plazme
7. Sinergističkim djelovanjem kurkumina i hladne plazme ostvaren je veći inhibitorni učinak na bakteriju *E. coli* nego tretmanima samo kurkuminom.

## 6. POPIS LITERATURE

Amalraj A., Pius A., Gopi S., Gopi S. (2017) Biological activities of curcuminoids, other biomolecules from turmeric and their derivatives – A Review. *J Tradit. Complement Med.* **7**, 205-233.

Anand P., Kunnumakkara A.B., Newman R.A., Aggarwal B.B. (2007) Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. *Mol. Pharm.*, **4**, 807-818.

Anonymus 2016. < States of Matter, <<http://mrdclassified.weebly.com/states-of-matter.html>>. Pristupljeno 23.srpnja 2019

Astruc D. (2017) Why is Ferrocene so Exceptional? *European Journal of Inorganic Chemistry*: 6-29.

Baier M., Görgen M., Ehlbeck J., Knorr D. (2014) Non thermal atmospheric pressure plasma: Screening for gentle process conditions and antibacterial efficiency on perishable fresh produce. *Innovative Food Sci. and Emerging Technol.* Volume **22**, 147-157.

Bogaerts A., Neyts E., Gijbels R., Mullen J. (2002) Gas discharge plasmas and their applications. *Spectrochimica Acta Part B*, **85**, 105.

Braithwaite, N. S. J. (2000). Introduction to gas discharges. *Plasma sources Sci. and technol.* **9(4)**, 517-527.

Cho M., Chung H., Choi W., Yoon J. (2003), Linear correlation between inactivation of *E. coli* and OH radical concentration in TiO<sub>2</sub> photocatalytic disinfection. *Water Res.* **38**, 1069-1077.

Cho M., Chung H., Yoon J., Choi W. (2004) Linear Correlation Between Inactivation of *E.coli* and OH Radical Concentration in TiO<sub>2</sub> Photocatalytic Disinfection. *Water Res.* **38**, 1069-1077.

Dhayal M., Lee S-Y., Park S.U. (2006) Using low-pressure plasma for *Carthamus tinctorium* L. seed surface modification. *Vac.* **80**, 499-506.

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

Fernandez E., Noriega B., Thompson A. (2012) *Food Microbiol*, **33**, 24.

Fuentealba M., Hamon J.-R., Carrillo D., Manzur C. (2007) Trinuclear  $\pi$ -conjugated chromophores formed by a neutral ferrocenyl group and a cationic mixed ruthenium sandwich linked through an unsymmetrical Schiff-base complex spacer. *New Journal of Chemistry* 31: 1815-1825.

Homma T., Furuta M., Takemura Y. (2013) Inactivation of *Escherichia coli* Using the Atmospheric Pressure Plasma Jet of Ar gas. *The Japan Soci. of Appl. Physics* **52** 6201.

Jin W., Wang J., Zhu T., Yuan B., Ni H., Jiang J., Wang H., Liang W. (2014) Anti-inflammatory effects of curcumin in experimental spinal cord injury in rats. *Inflamm. Res.* **63** 381-387.

Kali A., Bhuvaneshwar D., Charles P.M.V., Seetha K.S. (2016) Antibacterial synergy of curcumin with antibiotics against biofilm producing clinical bacterial isolates. *J. List., J Basic Clin. Pharm.* 7,93-96.

Klämpfl G.T., Isbary G., Shimizu T., Li Y-F., Zimmermann J.L., Stolz W., Schlegel J., Morfill G.E., Schmidt H-U. (2012) Cold Atmospheric Air Plasma Sterilization against Spores and Other Microorganisms of Clinical Interest. *Appl. Environ. Microbiol.* **78** 5077-5082

Knorr D., Fröhling A., Jaeger H., Reineke K. (2011) Emerging Technologies in Food Processing. *Annu. Rev. of Food Sci. and Technol.* **2**, 203.

Kramer A., Schwebke I., Kampf G. (2006) How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect.Dis.* **16**, 130.

Langmuir (1928) *Proceedings of the national Academy of Sciences of the U.S.A*, **14**,627

Laroussi M., Mendis D. A., Rosenberg M. (2003) Plasma Interaction with Microbes. *New J. of Phys.* **5**, 41.

Lee W.H., Loo C.Y. Bebawy M., Luk F., Mason.R.S., Rohanizadeh R. (2013) Curcumin and its derivatives: their application in neuropharmacology and neuroscience in the 21st century. *Curr. Neuropharmacol.* **11**, 338.

Lovitt R. W., Wright C.J., (2014) The bacterial cell. U: *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2.izd. (Batt C.A. i Tortorello M., ured.), Elsevier Ltd., London/Burlington/San Diego, str.151-160

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

- Mance D. (2017) Primjena plazme u medicini i stomatologiji. *Med. Fluminensis* **53** (2): 179-190.
- Misra N.N., Tiwari B.K., Raghavarao K.S.M.S., Cullen P.J. (2011) Nonthermal Plasma Inactivation of Food-Borne Pathogens. *Food Eng. Rev.*, **3**, 159-170.
- Niemira, B. A. (2012). Cold Plasma Reduction of Salmonella and Escherichia coli O157:H7 on Almonds Using Ambient Pressure Gases. *J. of Food Sci.*, **77**, 171–175.
- Pankaj S. K., Keener K. M. (2017) Cold plasma: background, applications and current trends. *Curr. Opin. in Food Sci.* **16**, 49-52.
- Pankaj S.K., Bueno-Ferrer C., Misra N.N., Milosavljević V., O Donnel C.P., Bourke P., Keener K.M., Cullen P.J. (2014) Applications of cold plasma technology in food packaging. *Trends in Food Sci. & Technol.* **35**,5-17.
- Patra M., Gasser G. (2017) The medicinal chemistry of ferrocene and its derivatives. *Nature Reviews, Chemistry* 1: 1-12.
- Peter K. V. (2006) *Handbook of Herbs and Spices*. 1st Ed., str.297-311.
- Schlüter, O., Ehlbeck, J., Hertel, C., Habermeyer, M., Roth, A., Engel, K.-H., Eisenbrand, G. (2013) Opinion on the use of plasma processes for treatment of foods\*. *Molecular Nutrition & Food Res.* **57**, 920–927.
- Singh A., Lumb I., Mehra V., Kumar V. (2019) Ferrocene-Appended Pharmacophores: An exciting approach for modulating biological potential of organic scaffolds. *Dalton Transactions*: 1-22.
- Snegur L.V., Simenel A.A., Rodionov A.N., Boev V.I. (2014) Ferrocene modification of organic compounds for medicinal applications. *Russian Chemical Bulletin, International Edition* 63(1): 26-36.
- Song, H.P., Kim, B., Choe, Ho J., Jung, S., Moon, Se Y., Choe, W., Jo, C. (2009) Evaluation of atmospheric pressure plasma to improve the safety of sliced cheese and ham inoculated by 3-strain cocktail *Listeria monocytogenes*. *Food microbiol* **26**, 432-436..
- Soupene E., Wally C., van Heeswijk C., Plumbridge J., Stewart V., Bertenthal D., Lee H., Prasad G., Paliy O., Charernnoppakul P., Kustu S., (2003) Physiological Studies of Escherichia coli

- Strain MG1655: Growth Defects and Apparent Cross-Regulation of Gene Expression. *J. of Bacteriol.* **185**, 5611-5626.
- Tendero, C., Tixier, C., Tristant, P., Desmaison, J., & Leprince, P. (2006) Atmospheric pressure plasmas: A review. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **61**, 2 -30.
- Thirumdas R., Sarangapani., Annapure S.U. (2014) Cold Plasma: A novel Non-Thermal Technology for Food Processing. *Food Biophys.* Springer, 10(1), 1-11.
- Toepfl S., A. Mathys, Heinz V., Knorr D. (2006) Potential of high hydrostatic pressure and pulsed electric fields for energy efficient and environmentally. *Food Rev. Int.* **22**, 405.
- Tyagi P., Singh M., Kumari H., Kumari A., Mukhopadhyay K. (2015) Bactericidal activity of curcumin I is associated with damaging of bacterial membrane. *PLoS One* **10**, 121-131.
- Ulbin-Figlewicz, N., Jarmoluk, A. (2015) Antimicrobial activity of low-pressure plasma treatment against selected foodborne bacteria and meat microbiota. *Ann. Microbiol.* **65**, 1537-1546.
- Volkov G.A., Kunning G., Xu., Kolobov I.V. (2019) Plasma generated reactive oxygen and nitrogen species can lead to closure, locking and constriction of the *Dionaea muscipula* Ellis trap. *J.R. Soc. Interface*, **7**, 7-13.
- Vukušić T. (2016) Primjena hladne plazme pri obradi voćnih sokova. Doktorski rad. 2016. Zagreb Prehrambeno-biotehnološki fakultet
- Wiseman H., Halliwell B. (1996) Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* **313**, 17-29.
- Ziuzina D., Patil S., Cullen P.J., Keener K.M., Bourke P. (2014) Atmospheric cold plasma inactivation of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes* inoculated on fresh produce. *Food Microbiol.* **42**, 109.

---

Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

## 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.*

Marko-Adrian Šimić

ime i prezime studenta