

Utjecaj pulsirajućeg električnog polja na inaktivaciju mikroorganizama

Kalčić, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:159:941729>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Petra Kalčić

0058216053

**UTJECAJ PULSIRAJUĆEG ELEKTRIČNOG POLJA
NA INAKTIVACIJU MIKROORGANIZAMA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Procesi konzerviranja hrane

Mentor: dr. sc. Višnja Stulić

Zagreb, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

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

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Utjecaj pulsirajućeg električnog polja na inaktivaciju mikroorganizama

Petra Kalčić, 0058216053

Sažetak: Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj pulsirajućeg električnog polja na inaktivaciju kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 204508 i gram pozitivne bakterije *Lactobacillus plantarum* 74. Uzorci su tretirani pri naponima od 30, 40 i 50 kV cm⁻¹, frekvencijama od 100 i 200 Hz, trajanju pulsa od 0,5 i 1 μs te vremenu tretiranja od 60 i 300 s. Najviša inaktivacija (1,8 log₁₀ broj stanica mL⁻¹) za kvasac *S. cerevisiae* očitana je pri naponu od 50 kV cm⁻¹, frekvenciji od 200 Hz, vremenu trajanja pulsa od 0,5 μs te nakon 60 s trajanja procesa. Potpuna inaktivacija (7,69 log₁₀ broj stanica mL⁻¹) bakterije *L. plantarum* postignuta je pri naponu od 50 kV cm⁻¹, frekvenciji od 200 Hz, vremenu trajanja pulsa od 0,5 μs te nakon 300 s trajanja procesa. Maksimalan utrošak energije za kvasac *S. cerevisiae* iznosio je 834 kJ L⁻¹, a za bakteriju *L. plantarum* 894 kJ L⁻¹.

Ključne riječi: pulsirajuće električno polje, inaktivacija, *S. cerevisiae*, *L. plantarum*

Rad sadrži: 31 stranica, 12 slika, 2 tablice, 32 literaturna navoda, / 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: dr. sc. Višnja Stulić

Datum obrane: 14. lipnja 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Food Engineering
Laboratory for Food Processes Engineering

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Influence of pulsed electric field on inactivation of microorganisms

Petra Kalčić, 0058216053

Abstract: This study aimed to investigate the effect of pulsed electric field on the inactivation of yeast *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 204508 and gram-positive bacteria *Lactobacillus plantarum* 74. Samples were treated at voltages of 30, 40, and 50 kV cm⁻¹, frequencies of 100 and 200 Hz, pulse duration of 0,5 and 1 µs, and treatment times of 60 and 300 s. The highest inactivation (1,8 log₁₀ CFU mL⁻¹) for yeast *S. cerevisiae* was obtained at a voltage of 50 kV cm⁻¹, frequency of 200 Hz, pulse duration of 0,5 µs, and after 60 s of treatment time. Complete inactivation (7,69 log₁₀ CFU mL⁻¹) of bacteria *L. plantarum* was achieved at a voltage of 50 kV cm⁻¹, frequency of 200 Hz, pulse duration of 0,5 µs, and after 300 s of the treatment process. The maximum energy consumption for the yeast *S. cerevisiae* was 834 kJ L⁻¹ and for the bacteria, *L. plantarum* was 894 kJ L⁻¹.

Keywords: pulsed electric field, inactivation, *S. cerevisiae*, *L. plantarum*

Thesis contains: 31 pages, 12 figures, 2 tables, 32 references, / supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Ph.D. Višnja Stulić

Thesis defended: 14 June 2022

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. PULSIRAJUĆE ELEKTRIČNO POLJE	2
2.2. KVASCI	5
2.2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
2.3. BAKTERIJE	6
2.3.1. <i>Lactobacillus plantarum</i>	7
2.4. FAZE RASTA MIKROORGANIZAMA	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO	9
3.1. MATERIJALI	9
3.1.1. Kemikalije za uzgoj stanica	9
3.1.2. Laboratorijska oprema	9
3.2. METODE RADA	10
3.2.1. Radni mikroorganizmi	10
3.2.2. Priprema hranjive podloge za uzgoj kvasca <i>S. cerevisiae</i>	10
3.2.3. Priprema hranjive podloge za uzgoj bakterijske vrste <i>L. plantarum</i> 74	10
3.2.4. Fosfatni pufer	10
3.2.5. Otopina $100 \mu\text{S cm}^{-1}$	11
3.2.6. Priprema uzoraka mikroorganizama	11
3.2.7. Provedba eksperimenta	11
3.2.8. Određivanje temperature	12
3.2.9. Određivanje broja stanica	12
4. REZULTATI I RASPRAVA	14
4.1. UTJECAJ PULSIRAJUĆEG ELEKTRIČNOG POLJA NA INAKTIVACIJU KVASCA <i>S. CEREVISIAE</i>	14
4.2. UTJECAJ PULSIRAJUĆEG ELEKTRIČNOG POLJA NA INAKTIVACIJU BAKTERIJE <i>L. PLANTARUM</i>	20
5. ZAKLJUČCI	27
6. LITERATURA	28

1. UVOD

Pri tradicionalnoj proizvodnji hrane, toplinska sterilizacija je ključan proces. Međutim, u današnje vrijeme vrlo čestu upotrebu ima netermalna sterilizacija hrane zbog zadržavanja senzorskih i organoleptičkih karakteristika proizvoda (Tao i sur., 2016). Minimalno procesirani prehrambeni proizvodi postali su sve zastupljeniji u konzumaciji, ali je moguća kontaminacija mikroorganizmima pa se prednost daje netermalnim metodama sterilizacije hrane (Liao i sur., 2016). Netermalni procesi koriste niske temperature čime se minimiziraju negativni toplinski učinci na karakteristike proizvoda. Danas su najzastupljeniji procesi: gama zračenje, beta zračenje, ultrazvuk, visok hidrostatski tlak te pulsirajuće električno polje (Misra i sur., 2011). Ovi procesi ne uključuju primjenu opasnih kemikalija te su sigurni za korištenje, ali zahtijevaju složenu i skupu opremu (Misra i sur., 2011).

Pulsirajuće električno polje je proces kojim se inaktiviraju mikroorganizmi u uzorku koji je smješten između dvije elektrode pri čemu se stvara električno polje (Garner, 2019). Najčešće se primjenjuje za obradu namirnica u tekućem agregatnom stanju (Garner, 2019).

Stupanj inaktivacije mikroorganizama tretiranih pulsirajućim električnim poljem ovisi o brojnim čimbenicima i karakteristikama mikroorganizma koji se želi inaktivirati (Tao i sur., 2016). Istraživanja su pokazala da tretman pulsirajućim električnim poljem uzrokuje inaktivaciju vegetativnih stanica kvasaca i bakterija u različitim namirnicama (Syed i sur., 2017).

Pulsirajuće električno polje ima široku primjenu u prehrambenoj industriji, a najčešću upotrebu ima kod proizvodnje mlijeka i mliječnih proizvoda, sokova i jaja (Syed i sur., 2017). Međutim, većina znanstvenika fokusirana je na istraživanje konzerviranja hrane s mikrobiološkog stajališta, odnosno primarno su fokusirani na patogene vrste (Syed i sur., 2017).

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj pulsirajućeg električnog polja na inaktivaciju kvasca *S. cerevisiae* ATCC 204508 te bakterije *L. plantarum* 74 pri određenom naponu (30, 40 i 50 kV cm⁻¹), frekvenciji (100 i 200 Hz), trajanju pulsa (0,5 i 1 μs) te vremenu trajanja procesa (60 i 300 s).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PULSIRAJUĆE ELEKTRIČNO POLJE

Pulsirajuće električno polje (PEF) je netermalna metoda koja se koristi za inaktivaciju mikroorganizama. Mehanizam inaktivacije očituje se u stvaranju nanometarskih membranskih pora na mikroorganizmu kojeg je potrebno inaktivirati (Garner, 2019). Ovim procesom dolazi do strukturnih promjena stanične membrane mikroorganizma i povećanja propusnosti, odnosno dolazi do pojave elektroporacije (Ou i sur., 2016). Elektroporacijom stanične membrane dolazi do nemogućnosti zatvaranja pora što posljedično dovodi do smrti stanice (Garner, 2019). Elektroporacija uzrokuje stvaranje pora u citoplazmatskoj membrani stanica koje povećavaju njenu propusnost i uzrokuju nekontrolirani transport molekula kroz membranu (Martinez i sur., 2016). Na mikrobne stanice na koje djeluje vanjsko električno polje za svega nekoliko mikrosekundi dolazi do rasapda i strukturnih promjena stanične membrane. Mehanizam inaktivacije pulsirajućim električnim poljem temelji se na elektroporaciji stanične membrane zbog primjene kratkih impulsa (od nekoliko mikrosekundi do milisekundi) visokog intenziteta polja $15\text{--}40\text{ kV cm}^{-1}$ (Seratlić i sur., 2013). Kadlec i sur. (2011) proveli su istraživanje u kojem su tretirali bakterijsku vrstu *Bacillus subtilis* pri naponu 60 kV cm^{-1} . Nakon tretmana dobiveno je smanjenje broja bakterija, odnosno došlo je do inaktivacije od $3\log_{10}$ broj stanica mL^{-1} .

Ako su signali električnog polja niski i kratki, oštećenja koja su nastala na staničnoj membrani su lako obnovljiva. Ukoliko se radi o višim vrijednostima električnog polja gdje je viši napon koji djeluje na staničnu membranu, bit će i veća propusnost membrane (Seratlić i sur., 2013). Kako dolazi do veće propusnosti membrane potrebno je nekoliko sekundi do nekoliko sati za oporavak. Nemogućnost pravilnog funkcioniranja stanične membrane onemogućuje transport elektrona koji onda rezultira pojavom mikrobne inaktivacije (Seratlić i sur., 2013).

Wouters i sur. (1999) izvijestili su da je pulsirajuće električno polje jedan od najpovoljnijih netermalnih procesa za mikrobnu dekontaminaciju hrane. Sterilizacija toplinom ima negativan učinak na boju, miris, okus te nutrijente hrane zbog čega netermalni procesi obrade hrane imaju sve češću primjenu. U današnje vrijeme održiva opskrba hranom primarna je briga prehrambene industrije, vlade i međunarodnih organizacija diljem svijeta.

Prehrambena industrija mora razvijati tehnologije prerade hrane koje istovremeno moraju zadovoljiti nutritivnu vrijednost hrane, poboljšati biodostupnost hranjivih tvari te biti ekološki prihvatljive (Arshad i sur., 2021). Pulsirajućim električnim poljem moguće je ukloniti mikroorganizme iz hrane pri sobnoj temperaturi bez uništavanja senzorskih i nutritivnih svojstava hrane (Wouters i sur., 1999). Iako je proces pulsirajućim električnim poljem netermalan proces, može doći do porasta temperature tijekom tretmana ovisno o sastavu uzorka i uvjeta obrade (Wouters i sur., 2001). Temperatura utječe na fluidnost stanične membrane, a cilj tretmana pulsirajućim električnim poljem je utjecati na propusnost tvari kroz staničnu membranu. Kratkoročno izlaganje višoj temperaturi rezultira povećanjem fluidnosti membrane (Vaessen i sur., 2020). Korištenjem novih tehnologija u proizvodnji hrane cilj je poboljšati kvalitetu hrane, smanjiti potrošnju vode i štetnih plinova te povećati energetske učinkovitost (Arshad i sur., 2021). Pulsirajuće električno polje ispunjava potrebe za održivom preradom hrane jer koristi puno manje resursa te je tretirana hrana nutritivno prikladna s dugim rokom trajanja (Arshad i sur., 2021).

Tretman pulsirajućim električnim poljem provodi se pri visokim vrijednostima jakosti polja ($2\text{--}5\text{ V mm}^{-1}$) u kratkom vremenskom intervalu ($2\text{--}4\text{ }\mu\text{s}$), a proizvod koji se tretira smješten je između dvije elektrode koje se nalaze na maloj udaljenosti kako bi učinkovitost procesa bila što bolja (Wouters i sur., 1999). Ovisno o intenzitetu primjenjenog tretmana (jakosti električnog polja, trajanja pulsa i vremena tretmana) te karakteristikama stanice mikroorganizma, elektroporirana stanica može se oporaviti ili dolazi do „smrti“ stanice (Raso i sur., 2016). Veličina pora stanične membrane funkcija je trajanja električnog polja pulsa, a pore koje nastanu su dovoljno velike da kroz njih prođu molekule poput DNA (Frey i sur., 2006).

Sam proces provodi se *in vitro* tako da se tekući uzorak nanese između dvije elektrode. Uz to postoji još i *in vivo* postupak koji se primjenjuje za istraživanje tumora (Garner, 2019). Kako bi došlo do inaktivacije mikroorganizama pulsirajućim električnim poljem treba namijestiti optimalne parametre i to napon, puls i vrijeme tretmana. Zimmerman i Benz (1980) naveli su da pulsirajuće električno polje uključuje korištenje impulsne snage proizvodu koji se nalazi između seta elektroda koje se nalaze na određenom razmaku. Sustav pulsirajućeg električnog polja ima generator impulsa koji proizvodi visokonaponske impulse te reaktor koji sadrži proizvod koji je podvrgnut tretiranju. Tretman pulsirajućim električnim poljem koristi visokonaponske impulse od nano do milisekunde koji dovode do permeabilizacije stanične membrane (Vaessen i sur., 2020). Na proizvod koji se tretira djeluje

sila po jedinici naboja koja onda uzrokuje pucanje membrana stanica mikroorganizama (Syed i sur., 2017). Procesom pulsirajućeg električnog polja stvaraju se električna polja $0-50 \text{ kV cm}^{-1}$, a pulsevi koji se koriste viši su od električnih polja sa intenzitetom $10-80 \text{ kV cm}^{-1}$ (Syed i sur., 2017). Kraće trajanje pulsa stvara mnogo manje pore te omogućuje ionima, ali ne i velikim molekulama da prođu kroz staničnu membranu, dok se kod viših vrijednosti električnog polja pore povećavaju, dolazi do ireverzibilnog istjecanja staničnog sadržaja i u konačnici do smrti stanice (Frey i sur., 2006).

U mikroorganizmu koji se tretira, dolazi do nestabilnosti u membrani koje nastaju elektromehaničkim kompresijama koje su izazvane električnim poljem. Te nestabilnosti nastaju samo kada električno polje inducira određen membranski potencijal koji ovisi o veličini stanice, površinskom naboju membrane, električnoj vodljivosti membrane, citoplazme i tekućeg medija (Wouters i sur., 1999). Tretmanom pulsirajućim električnim poljem dolazi do slabljenja stanice što uzrokuje propusnu strukturu peptidoglikana pri čemu se enzimi oslobađaju u medij (Seratlić i sur., 2013).

Tretman pulsirajućim električnim poljem troši energiju ($100-1000 \text{ kJ kg}^{-1}$) zbog čega dolazi do porasta temperature procesa (Ou i sur., 2016). Energija koja se oslobađa ovim procesom koristi se za zagrijavanje uzoraka (Rodrigo i sur., 2002). Heinz i sur. (2002) navode kako je za jakost polja od 30 kV cm^{-1} i više, ukupna energija potrebna za inaktivaciju od približno $5 \log_{10}$ broj stanica mL^{-1} potrebno 150 kJ kg^{-1} energije (Heinz i sur., 2002).

Brojne studije pokazale su da je mjesto interakcije električnog polja lipidni dio stanične membrane, a istraživanja se temelje na mjerenjima električne struje kroz dvosloj lipidne membrane pod utjecajem visoke vrijednosti električnog polja te na transport molekula u stanicu ili iz stanice (Seratlić i sur., 2013). Kada dolazi do povećanja temperature i kada je povećana fluidnost membrane fosfolipidna dvoslojna struktura stanične membrane prelazi iz gelaste strukture u tekuće stanje te se tako olakšava proces elektroporacije (Jaeger i sur., 2010).

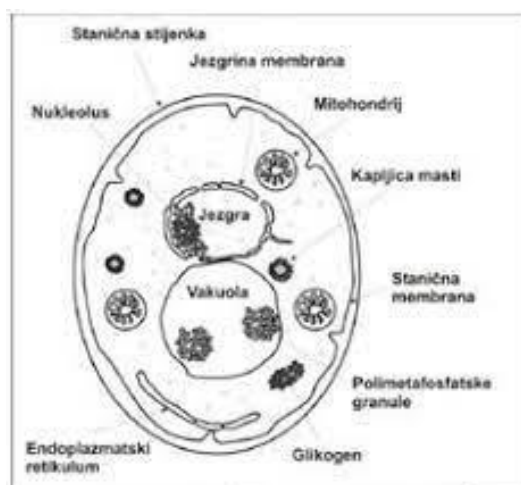
Kada su stanice podvrgnute električnom polju naboji se akumuliraju duž stanične membrane i kao rezultat nastaje razlika u potencijalima. Stanična membrana se ponaša kao propusni dielektrik, a povećanjem napona se stvaraju pore ispunjene vodom koje čine lipidni dvosloj što rezultira pojavom elektroporacije. To dovodi do povećane propusnosti stanične membrane (Frey i sur., 2006).

2.2. KVASCI

Kvasci su jednostanični eukariotski organizmi koji se koriste za proučavanje osnovnih staničnih funkcija (Duraković i Redžepović, 2003; Pollard i sur., 2016). Kvasci se svrstavaju u carstvo *Fungi*, a s obzirom na morfološku, fiziološku i molekularnu građu svrstavaju se u rodove: *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Candida* i *Zygosaccharomyces* (Duraković i Redžepović, 2003). Najčešću upotrebu u prehrambenoj industriji imaju u proizvodnji vina, piva i kruha. Razmnožavaju se pupanjem ili cijepanjem stanica. Optimalna temperatura rasta kvasaca je oko 30 °C. Dijelovi stanica kvasca vidljivi su pod elektronskim mikroskopom (Slika 1.), a to su: stanična stijenka, stanična membrana, mitohondrij, jezgra, ribosomi, vakuola, endoplazmatski retikulum, Golgijev aparat te peroksisomi (Duraković i Redžepović, 2003).

Stanična stijenka kvasca je elastična zbog L-1,3-glukanskih lanaca i kada se stavi u hipertoničnu otopinu počne se sakupljati, a ovisno o osmotskom stresu može izgubiti i do 60% volumena (reverzibilan proces). Kada se prebace u izvornu otopinu može se vratiti na početni volumen (Klis i sur., 2002). Zbog elastičnosti stanične stijenke stanice kvasaca propusnije su od izoliranih staničnih stijenki (Klis i sur., 2002).

Kvasci mogu uzrokovati kvarenje namirnica (kiseli i slatki proizvodi), međutim vrlo su korisni u prehrambenoj industriji (proizvodnja piva, vina, kruha) (Duraković i Redžepović, 2003).



Slika 1. Stanica kvasca (Kostešić, 2017)

2.2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae ili pekarski kvasac je gljiva koju ljudi direktno konzumiraju te može narasti u kiselim uvjetima (Duraković i Redžepović, 2003; Tao i sur., 2016). Ima važnu ulogu u prehrambenoj industriji jer štiti hranu od kvarenja. Općenito, kvasci su odgovorni za kvarenje hrane koja ima nisku pH vrijednost, visoku koncentraciju šećera ili visoku koncentraciju soli (Duraković i Redžepović, 2003; Marx i sur., 2011). *S. cerevisiae* je kvasac čija je veličina stanica 5-10 µm. Stanica kvasca *S. cerevisiae* sastoji se od stanične stijenke, periplazme, stanične membrane, citosola, nukleusa, mitohondrija, endoplazmatskog retikuluma, Golgijevog tijela, vakuole i peroksisoma (Duraković i Redžepović, 2003; Marx i sur., 2011).

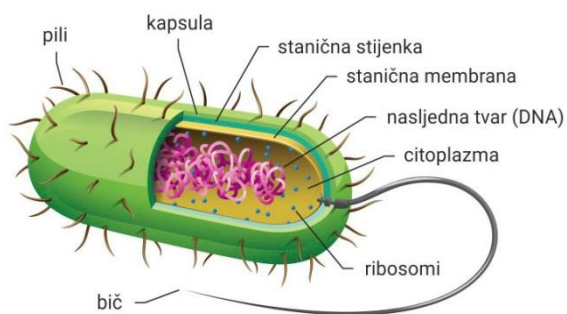
Stanica kvasca *S. cerevisiae* okružena je staničnom ovojnicom koja se sastoji od stanične stijenke, stanične membrane te periplazme. Stanična stijenka je najčvršća struktura koja se nalazi na vanjskom dijelu stanice te ona kontrolira transport u stanicu i iz stanice. Stanična stijenka kvasca *S. cerevisiae* je elastične strukture. To svojstvo stanici pruža osmotsku i fizičku zaštitu te određuje oblik stanice (Duraković i Redžepović, 2003; Klis i sur., 2002). Elastičnost stanične stijenke omogućava veću propusnost tvari kroz stanicu (Duraković i Redžepović, 2003; Klis i sur., 2002). Stanična membrana sastavljena je od proteina i lipida, a glavna uloga joj je zaštita citoplazme od vanjskih utjecaja (Duraković i Redžepović, 2003; Marx i sur., 2017).

2.3. BAKTERIJE

Bakterije su jednostanični prokariotski mikroorganizmi čija je veličina od 0,25 do 1 µm (Tille, 2015). Svrstavaju se u carstvo *Monera* te se smatraju jednim od prvih oblika života na Zemlji (Duraković i Redžepović, 2003). Optimalna temperatura na kojoj mogu rasti je ispod 0 °C pa sve do iznad 100 °C, a za rast im je potrebna voda te fosfat i ugljik (Duraković i Redžepović, 2003). Stanice bakterija razlikuju se po metaboličkim procesima, veličini, morfologiji te strukturi stanične stijenke. S obzirom na strukturu stanične stijenke razlikujemo gram-pozitivne i gram-negativne bakterije (Tille, 2015). Gram-pozitivne bakterije imaju deblji sloj peptidoglikana, dok gram-negativne bakterije imaju tanji sloj peptidoglikana, odnosno deblji sloj lipida (Tripathi i Satra, 2021). Peptidoglikan se naziva murein i građen je od polisaharida i peptida, a takva struktura omogućava čvrstoću stanične stijenke-mureinski

sakulus, koji omogućava održavanje visokog osmotskog tlaka unutar citoplazme (Duraković i Redžepović, 2003).

Bakterije koriste različite procese kako bi dobile hranjive tvari iz vanjskog okruženja te kako bi te tvari transportirale u stanicu. Koriste se procesima aktivnog i pasivnog transporta, a da bi hranjive tvari bile dostupne stanici moraju proći staničnu stijenku i staničnu membranu stanice (Duraković i Redžepović, 2003; Tille, 2015). Neke bakterijske vrste mogu stvarati endospore koje omogućavaju preživljavanje u nepovoljnim uvjetima (gladovanja, temperature) zbog čega bakterije postaju otporne i mogu preživjeti jako dugo. Endospora je obavijena nepropusnim korteksom koji je građen od debelog sloja peptidoglikana, a s vanjske strane endospore nalazi se stanična membrana (Duraković i Redžepović, 2003).



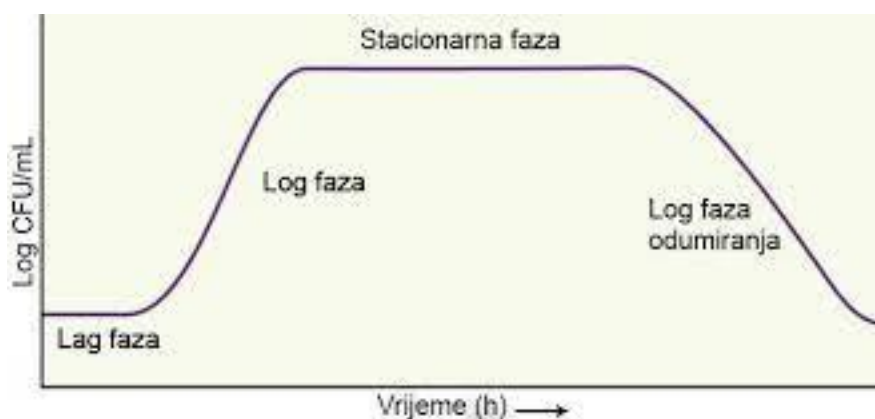
Slika 2. Stanica bakterije (Anonymous 1)

2.3.1. *Lactobacillus plantarum*

L. plantarum je gram-pozitivna bakterija. Stanice bakterije *L. plantarum* otporne su na povećanu koncentraciju mliječne kiseline. Rad stanica postaje inhibiran kada koncentracija mliječne kiseline dostigne kritičnu razinu tijekom fermentacije, a inhibicijski učinak postiže se kada dolazi do difuzije nedisociranih molekula kiselina kroz staničnu membranu koje onda disociraju unutar stanice. Kada mliječna kiselina uđe u stanicu dolazi do inhibicije i stanica više ne radi kako bi trebala (Seratlić i sur., 2013).

2.4. FAZE RASTA MIKROORGANIZAMA

Kada se bakterije nalaze u zatvorenom sustavu, populacija stanica uvijek raste dinamično. Razlikujemo četiri faze rasta mikroorganizama: lag fazu, log fazu, stacionarnu fazu i log fazu odumiranja. U lag fazi bakterije se prilagođavaju novom okruženju pa ne dolazi do rasta i razmnožavanja stanica. Zatim slijedi log faza (eksponencijalna faza rasta) gdje se stanice počinju dijeliti procesom binarnog cijepanja. Dolazi do maksimalne stope rasta mikroorganizama (Duraković i Redžepović, 2003; Wang i sur., 2015). Ova faza može trajati od 2 sata pa sve do nekoliko sati, a na daljnji rast mikroorganizama utječe dostupnost nutrijenata te temperatura (Duraković i Redžepović, 2003). Sljedeća je stacionarna faza u kojoj dolazi do nedostatka nutrijenata pri čemu se zaustavlja rast mikroorganizama (Duraković i Redžepović, 2003; Wang i sur., 2015). U log fazi odumiranja dolazi do gubitka sposobnosti dijeljenja bakterijskih stanica gdje dolazi do povećanog broja mrtvih stanica (Duraković i Redžepović, 2003; Wang i sur., 2015). Uzroci smanjenja mikroorganizama su: nedostatak nutrijenata, nagomilavanje metaboličkih nusprodukata te nepovoljni energetske uvjeti (Duraković i Redžepović, 2003).



Slika 3. Faze rasta mikroorganizama (Šain, 2017)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

U ovom radu ispitivana je inaktivacija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 204508 te bakterije *Lactobacillus plantarum* 74 koja je nabavljena iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikorbiologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, pulsirajućim električnim poljem u fazi rasta (log fazi) pri određenim parametrima (vrijeme, napon, frekvencija i trajanje pulsa).

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije za uzgoj stanica

- agar, *Biolife*, Italija
- glicerol, *Gram-mol*, Hrvatska
- kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4) p.a., *Kemika*, Hrvatska
- kalijev klorid (KCl) p.a, *Kemika*, Hrvatska
- malt ekstrakt bujon, *Biolife*, Italija
- MRSB bujon, *Biolife*, Italija
- natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4) p.a., *Kemika*, Hrvatska
- natrijev klorid (NaCl) p.a., *Kemika*, Hrvatska
- natrijev nitrat (NaNO_3) 0,01 M, *Kemika*, Hrvatska

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
- konduktometar pH 340i/SET, *WTW*, Njemačka
- pipetman Hirschmann (10-100 μL i 1-5 mL), *Merck*, Njemačka
- tehnička vaga, *Sartorius*, Velika Britanija
- termostat, *Instrumentaria*, Hrvatska
- uređaj za pulsirajuće električno polje HVG60/1 PEF, *Intel d.o.o.*, Hrvatska

- vorteks 4 basic, IKA, Velika Britanija

3.2. METODE RADA

3.2.1. Radni mikroorganizmi

U ovom radu kao radni mikroorganizmi korišteni su kvasac *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 204508 i gram pozitivna bakterijska kultura *Lactobacillus plantarum* 74. Bakterijska kultura *L. plantarum* čuvana je u 50% glicerolu na -20 °C, dok je kvasac *S. cerevisiae* čuvan na hranjivoj podlozi na 4 °C.

3.2.2 Priprema hranjive podloge za uzgoj kvasca *S. cerevisiae*

Za pripremu malt ekstrakt bujona otopljeno je 10 g dehidratirane podloge u 500 mL deionizirane vode. Pripremljena otopina sterilizirana je 15 min pri 121 °C i tlaku $1,01 \times 10^5$ Pa. Čvrsta podloga pripremljena je otapanjem 20 g dehidratirane podloge malt ekstrakt bujona u 1 L deionizirane vode uz dodatak 20 g agara. Pripremljena otopina sterilizirana je 15 min pri 121 °C i tlaku $1,01 \times 10^5$ Pa te je sterilno u laminaru razlivena u sterilne petrijeve zdjelice.

3.2.3. Priprema hranjive podloge za uzgoj bakterijske vrste *L. plantarum* 74

Za pripremu selektivnog hranjivog bujona otopljeno je 27,6 g MRSB dehidratirane podloge u 500 mL deionizirane vode. Pripremljena otopina sterilizirana je 15 min pri 121 °C i tlaku $1,01 \times 10^5$ Pa.

Čvrsta podloga pripremljena je otapanjem 55,2 g dehidratirane podloge MRSB-a u 1 L deionizirane vode uz dodatak 20 g agara. Pripremljena otopina sterilizirana je 15 min pri 121 °C i tlaku $1,01 \times 10^5$ Pa te je sterilno u laminaru razlivena u sterilne petrijeve zdjelice.

3.2.4. Fosfatni pufer

Za pripremu fosfatnog pufera (PBS) u 1 L deionizirane vode otopljeno je 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,62 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ te 0,24 g KH_2PO_4 . Pripremljena otopina sterilizirana je 15 min pri 121 °C i tlaku $1,01 \times 10^5$ Pa.

3.2.5. Otopina 100 $\mu\text{S cm}^{-1}$

U sterilnu deioniziranu vodu dodavana je otopina 0,01 M NaNO_3 dok nije izmjerena zadana električna provodljivost od 100 $\mu\text{S cm}^{-1}$. Električna provodljivost mjerena je digitalnim konduktometrom na način da se elektroda uranjala u uzorak te se nakon stabilizacije na zaslonu uređaja očitala električna provodljivost.

3.2.6. Priprema uzoraka mikroorganizama

Kulture mikroorganizama naciepljene su u sterilne plastične epruvete od 15 mL u sterilnim uvjetima tako da je 20 μL čiste kulture kvasaca *S. cerevisiae*, odnosno bakterije *L. plantarum* odpipetirano u 10 mL odgovarajućeg hranjivog bujona. Uzorci kvasaca naciepljeni su u malt ekstrakt bujon, a bakterijske kulture naciepljene su u selektivni MRSB hranjivi bujon. Uzorci kvasaca stavljeni su na inkubaciju na 30 °C, a bakterijski uzorci inkubirani su na 37 °C. Nakon 18 h uzorci su podvrgnuti procesu centrifugiranja. Uzorci su centrifugirani 3 minute na 4000 okretaja u minuti (o min^{-1}). Supernatant se odlio te se u uzorak nadodalo 10 mL sterilne otopine PBS-a. Uzorak se vorteksirao te se ponovno centrifugirao. Postupak je ponovljen 3 puta. Nakon zadnje centrifuge u uzorak je dodano 10 mL sterilne otopine električne provodljivosti 100 $\mu\text{S cm}^{-1}$.

3.2.7. Provedba eksperimenta

Za provedbu eksperimenta korišten je uređaj za pulsirajuće električno polje. Uređaj se sastoji od tri jedinice, magna control jedinica, visokonaponski izvor napajanja i visokonaponski generator impulsa. Magna control jedinica kontrolira ispravnost uređaja. Visokonaponski izvor napajanja zadužen je za pretvorbu ulaznog izmjeničnog napona od 230 V u istosmjerni napon u rasponu od 1 do 60 kV. U reaktor uređaja (slika 4) dodano je 10 mL pripremljenog uzorka kvasca *S. cerevisiae* ili bakterije *L. plantarum* te 50 mL pripremljene otopine od 100 $\mu\text{S cm}^{-1}$. Modelne otopine uzoraka tretirane su pri 100 i 200 Hz, trajanju pulsa od 0,5 i 1 μs te pri naponu od 30, 40 i 50 kV cm^{-1} u vremenu od 60 i 300 sekundi. Udaljenost između elektrode uzemljenja i visokonaponske elektrode iznosila je 1 cm. Obje elektrode izvedene su od nehrđajućeg čelika. Za vrijeme trajanja tretmana očitane su vrijednosti snage (W), dok je prije i nakon tretmana izmjerena temperatura. Prema sljedećem izrazu izračunata je primjenjena energija tijekom pojedinog tretmana:

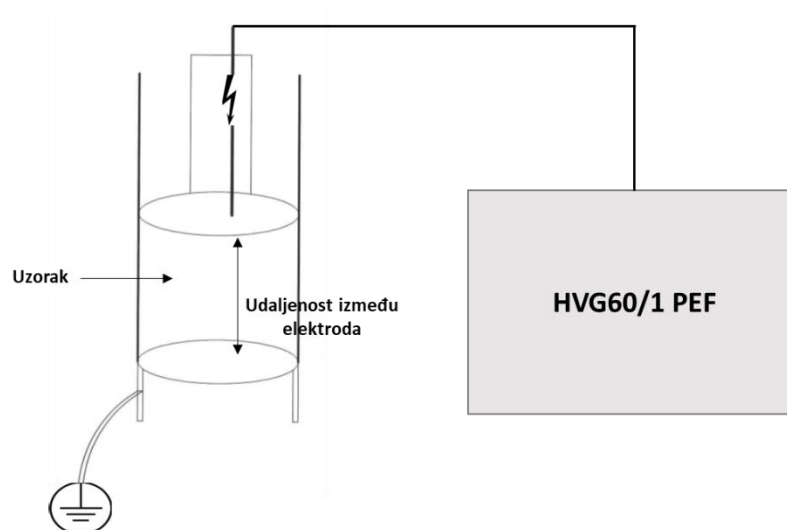
$$E \text{ (kJ L}^{-1}\text{)} = P \text{ (W)} \times t \text{ (s)} \quad (1)$$

gdje je:

E – ukupna energija u (kJ L⁻¹)

P – snaga u vatima (W)

t – vrijeme u sekundama (s); vrijeme tretiranja (s) x trajanje pulsa (μs)



Slika 4. Shematski prikaz reaktora za tretman pulsirajućim električnim poljem

3.2.8. Određivanje temperature

Vrijednosti temperature izmjerene su digitalnim beskontaktnim termometrom. Mjerenje se provodilo usmjeravanjem infracrvenog svjetla u otopinu uzorka prije i nakon provedenog postupka, te se na zaslonu uređaja očitala temperatura.

3.2.9. Određivanje broja stanica

Broj stanica mikroorganizama određen je prije i nakon tretmana. Decimalna razrjeđenja pripremljena su u sterilnim uvjetima u laminaru na način da je u 90 μL sterilne otopine PBS-a dodano 10 μL uzorka. Za pripremu drugog razrjeđenja odpipetiran je volumen od 10 μL prvog razrjeđenja i prenesen je u 90 μL sterilne otopine PBS-a. Postupak je

ponovljen dok se nije došlo do petog razrjeđenja. Kulture mikroorganizama nacijepljene su u triplikatu na način da je otpipetirano po 10 μL uzorka na hranjivu podlogu bez razmazivanja. Uzorci kvasaca inkubirani su na 30 °C, a uzorci bakterijskih kultura inkubirani su na 37 °C. Nakon 24 sata prebrojen je broj mikroorganizama te je izračunata srednja vrijednost. U proračun u obzir ulaze vrijednosti manje od 30 i veće od 10. Ukupni broj stanica izražava se kao logaritam broja stanica u mililitru suspenzije ($\log_{10}$ broj stanica mL^{-1}) prema formuli:

Broj stanica u mL suspenzije =

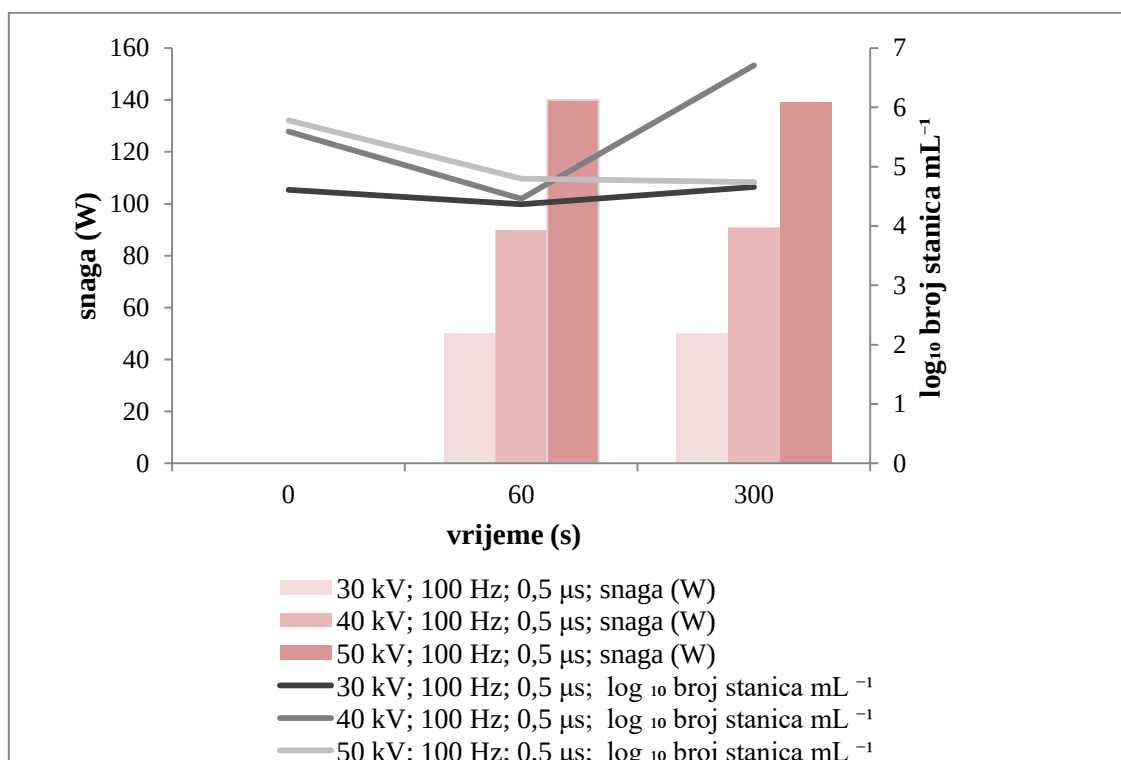
$$\frac{\text{broj poraslih kolonija}}{\text{upotrebljeni volumen uzorka}} \times \text{recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja} \quad (2)$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

Tretmanom pulsirajućim električnim poljem dolazi do inaktivacije mikroorganizama, međutim o uspješnosti same inaktivacije ovisi mnogo čimbenika koji utječu na proces. Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj pulsirajućeg električnog polja (napona, frekvencije, trajanja pulsa te ukupnog vremena tretiranja) na inaktivaciju kvasca *S. cerevisiae* i bakterije *L. plantarum*.

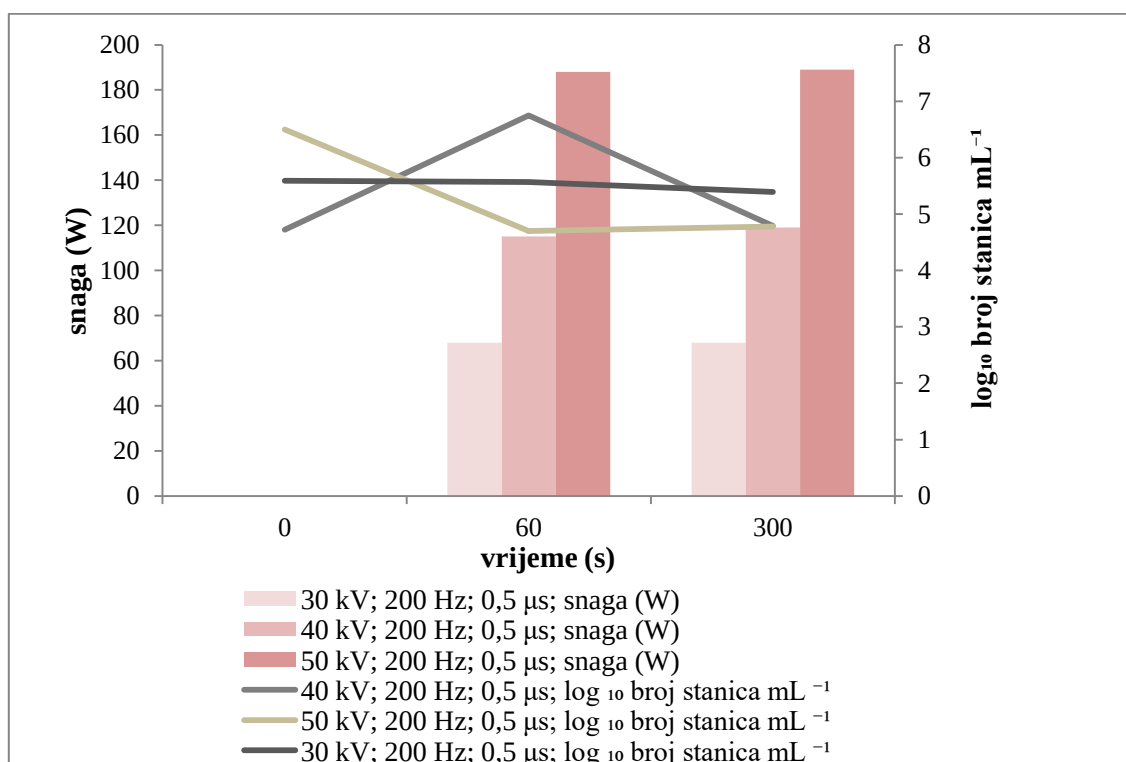
4.1. UTJECAJ PULSIRAJUĆEG ELEKTRIČNOG POLJA NA INAKTIVACIJU KVASCA *S. CEREVISIAE*

Utjecaj pulsirajućeg električnog polja na inaktivaciju kvasca *S. cerevisiae* (slika 5, 6, 7, i 8) istražen je određivanjem broja stanica prije i nakon tretmana te očitanjem primjenjene snage. Na uzorke su primijenjeni naponi od 30, 40 i 50 kV cm⁻¹, frekvencije od 100 i 200 Hz, trajanje pulsa od 0,5 i 1 μs te vrijeme tretiranja od 60 i 300 s.



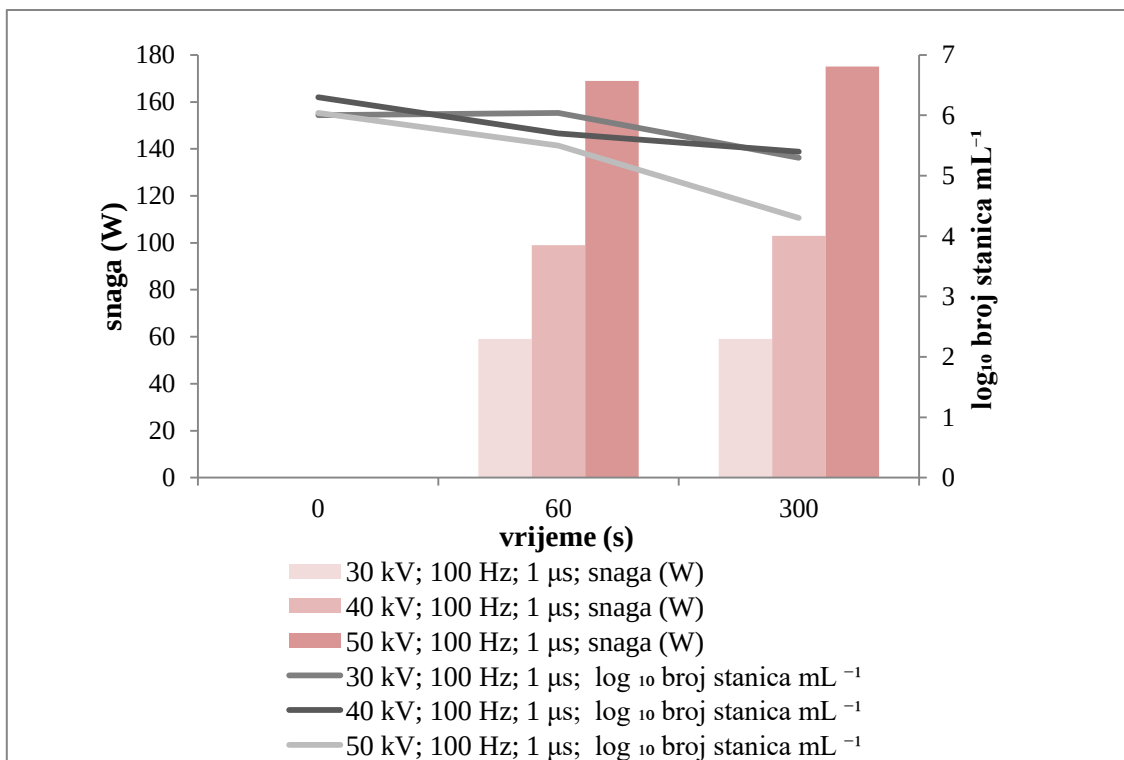
Slika 5. Utjecaj napona, frekvencije (100 Hz), trajanja pulsa (0,5 μs) i snage o vremenu trajanja procesa na inaktivaciju kvasca *S. cerevisiae* nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem.

Nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem pri frekvenciji od 100 Hz, naponu od 30 kV cm⁻¹ te trajanju pulsa od 0,5 μs nakon 60 s trajanja procesa došlo je do inaktivacije (0,24 log₁₀ broj stanica mL⁻¹) kvasca *S. cerevisiae*. Pri naponu 30 kV cm⁻¹ nije zabilježena značajna inaktivacija kvasca *S. cerevisiae* u odnosu na početni broj, dok je kod napona od 50 kV cm⁻¹, trajanju pulsa od 0,5 μs i vremenu tretmana od 300 s zabilježena najviša inaktivacija od 1,04 log₁₀ broj stanica mL⁻¹. Slika 5. prikazuje da porastom vremena trajanja procesa i napona raste snaga (W) procesa.



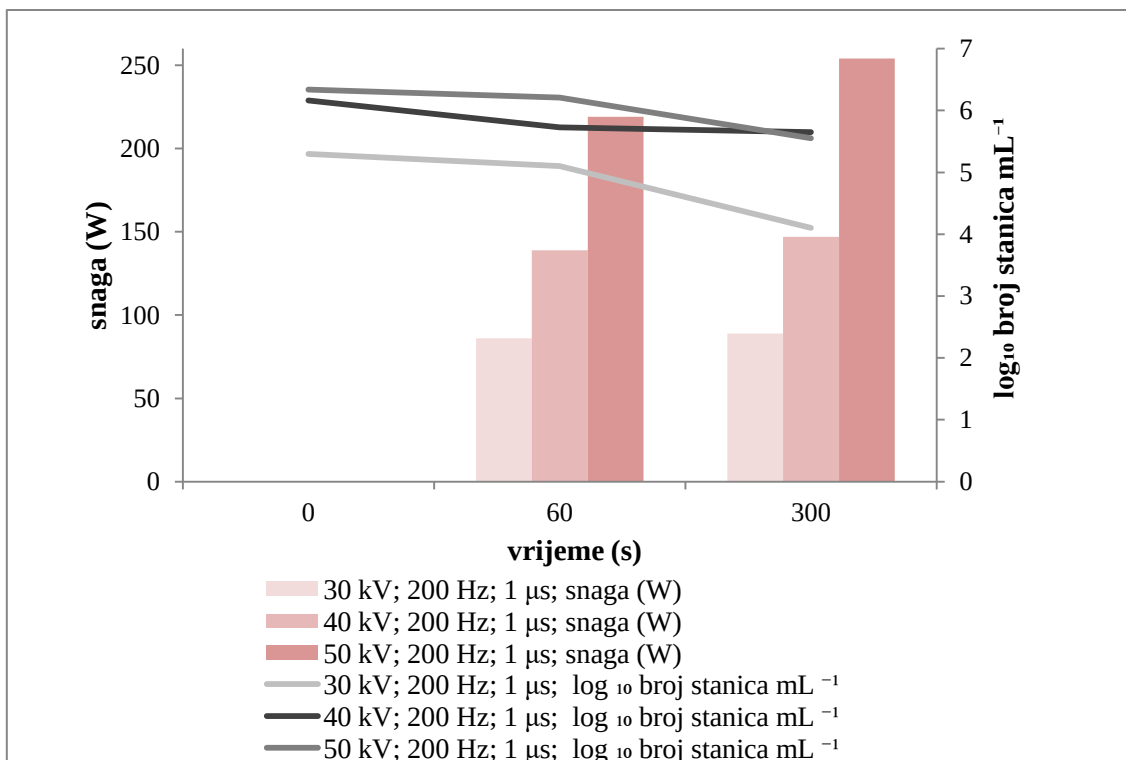
Slika 6. Utjecaj napona, frekvencije (200 Hz), trajanja pulsa (0,5 μs) i snage o vremenu trajanja procesa na inaktivaciju kvasca *S.cerevisiae* nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem

Kod uzoraka na koje je primijenjen najviši napon od 50 kV cm⁻¹ postignuta je najviša vrijednost snage koja je iznosila 189 W (slika 6), dok je najviša inaktivacija kvasca *S. cerevisiae* postignuta pri 50 kV cm⁻¹ i trajanju procesa od 60 s, a ona iznosi 1,8 log₁₀ broj stanica mL⁻¹. Iz slike 6 vidljivo je da vrijednosti inaktivacije ne rastu linearno, već dolazi do razlika u inaktivaciji ovisno o parametrima.



Slika 7. Utjecaj napona, frekvencije (100 Hz), trajanja pulsa (1 μ s) i snage o vremenu trajanja procesa na inaktivaciju kvasca *S.cerevisiae* nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem

Pri trajanju pulsa od 1 μ s, frekvencije 100 Hz, naponu od 50 kV cm^{-1} i vremenu tretmana od 300 s zabilježena je najviša vrijednost inaktivacije od 1,74 $\log_{10}$ broj stanica mL^{-1} (slika 7).



Slika 8. Utjecaj napona, frekvencije (200 Hz), trajanja pulsa (1 μs) i snage o vremenu trajanja procesa na inaktivaciju kvasca *S.cerevisiae* nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem

Slika 8 prikazuje utjecaj pulsirajućeg električnog polja pri 200 Hz i trajanju pulsa od 1 μs . Najviša inaktivacija kvasca postignuta je pri 30 kV cm^{-1} i 300 s, a iznosi 1,2 $\log_{10}$ broj stanica mL^{-1} . Nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem vidljivo je da je pri najduljem trajanju procesa (300 s) vidljiva najviša inaktivacija mikroorganizma. Najviša snaga (254 W) očitana je pri naponu od 50 kV cm^{-1} , nakon 300 s trajanja procesa.

Prije i nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem (tablica 1) izmjerena je temperatura procesa.

Tablica 1. Promjena temperature ΔT ($^{\circ}\text{C}$) i ukupne energije (kJ L^{-1}) tijekom tretmana kvasca *S. cerevisiae* pulsirajućim električnim poljem

Trajanje pulsa (μs)	Frekvencija (Hz)	Napon (kV cm^{-1})	Vrijeme (s)	ΔT ($^{\circ}\text{C}$)	Energija (kJ L^{-1})
0,5	100	30	60	1,7	60
			300	2,5	300
		40	60	2,2	108
			300	5,8	546
		50	60	3,2	168
			300	7,8	834
	200	30	60	2,6	40,8
			300	4,5	204
		40	60	2,8	69
			300	8,2	357
		50	60	5,4	112,8
			300	11,2	567
1	100	30	60	2,8	35,4
			300	1,8	177
		40	60	3,2	59,4
			300	5,5	309
		50	60	4,6	101,4
			300	8,5	525
	200	30	60	2	25,8
			300	1,9	133,5
		40	60	3	41,7
			300	11,5	220,5
		50	60	6,4	65,7
			300	10,2	381

Nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem porastom napona došlo je do porasta temperature, ali i porasta snage procesa. Početna temperatura iznosila je $\sim 18^{\circ}\text{C}$, dok je nakon tretmana temperatura maksimalno porasla za $11,5^{\circ}\text{C}$ pri tretmanu od 40 kV cm^{-1} , 200 Hz , trajanju pulsa od $1\text{ }\mu\text{s}$ i vremenu tretiranja od 300 s . Povećanje temperature tijekom procesa utječe na vodljivost uzorka te na maksimalnu vrijednost napona u komori za obradu (Wouters i sur., 2001). Više povećanje temperature zabilježeno je kod viših frekvencija te viših napona (tablica 1). Wouters u sur. (2001) navode kako temperatura utječe na jakost električnog polja tretmana, a utjecaj temperature na uzorak tretmanom pulsirajućeg električnog polja utječe na brzinu inaktivacije. Dakle, povećanjem temperature za vrijeme trajanja procesa dolazi do više inaktivacije mikroorganizama (Wouters i sur., 2001). Povećanje početne temperature tretmana pulsirajućim električnim poljem rezultiralo je višom inaktivacijom mikroorganizama (tablica 1). Optimalna temperatura rasta kvasca *S. cerevisiae* je $30\text{--}35^{\circ}\text{C}$, dok je maksimalna temperatura na kojoj je zabilježen rast $37,5\text{--}39,8^{\circ}\text{C}$ (Walsh i Martin, 1977). Povećanjem temperature, membrane stanica postaju fluidnije i njihov mehanički otpor se smanjuje s porastom temperature čime stanična membrana postaje sklona elektroporaciji (Raso i sur., 2016).

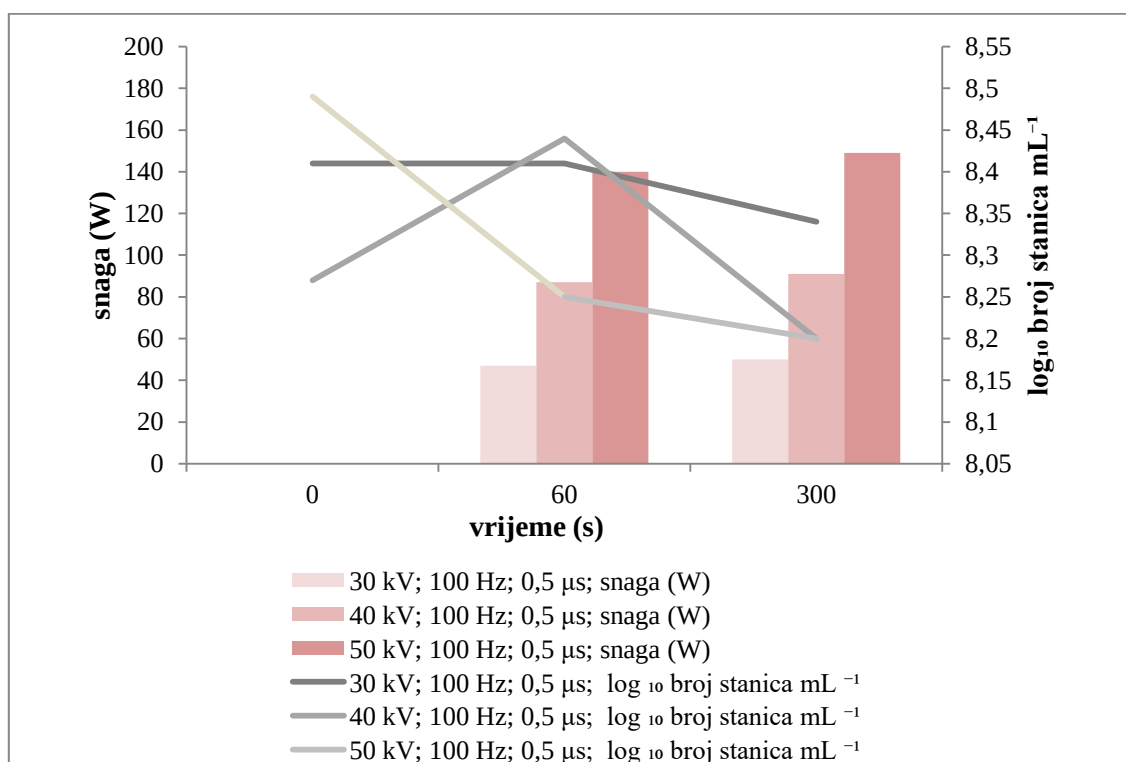
Prilikom svakog tretmana izračunat je utrošak energije izražen u kJ L^{-1} . Najviši utrošak energije primijećen je pri naponu od 50 kV cm^{-1} , frekvenciji od 100 Hz , trajanju pulsa od $0,5\text{ }\mu\text{s}$ te trajanju procesa od 300 s , a iznosio je 834 kJ L^{-1} (tablica 1).

U ovom radu primijenjeni su impulsi od $0,5$ i $1\text{ }\mu\text{s}$. Korištenjem kratkih impulsa smanjen je udio enegrije po pulsu te je povećanje temperature niže. Provedena su brojna istraživanja inaktivacije kvasca *S. cerevisiae* kao modelnog mikroorganizma pulsirajućim električnim poljem kako bi se dobili najbolji uvjeti inaktivacije za određen mikroorganizam. Najviša inaktivacija za kvasac *S. cerevisiae* dobivena je kada se uzorak tretirao na $30,76\text{ kV cm}^{-1}$, pri temperaturi od 40°C te trajanju pulsa od $2\text{ }\mu\text{s}$. Pri ovim parametrima dobivena je inaktivacija od $5,03\text{ log}_{10}$ broj stanica mL^{-1} (Marx i sur., 2011). Qin i sur. (1995) u svom radu navode da je pri naponu od 35 kV i trajanju pulsa od $2,5\text{ }\mu\text{s}$ inaktivacija kvasca 6 log_{10} broj stanica mL^{-1} , a porastom trajanja pulsa na $10\text{ }\mu\text{s}$ pri istim vrijednostima napona očitana je niža inaktivacija koja je iznosila 4 log_{10} broj stanica mL^{-1} .

Jedna od glavnih posljedica elektroporacije je pojava koja se naziva elektropermeabilizacija, odnosno povećanje sposobnosti ili vodljivosti membrane. Taj proces može biti reverzibilan ili ireverzibilan ovisno o stupnju promjene membrane (Wouters i sur.,

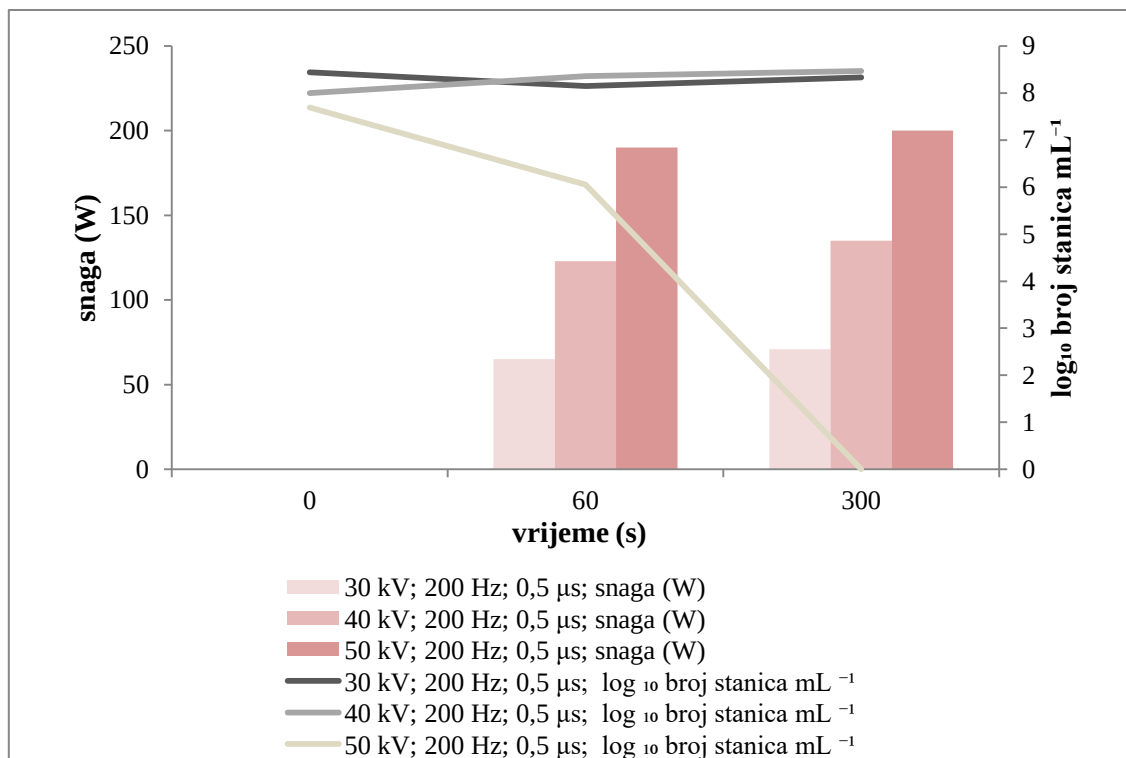
2001). Kako bi se uštedjela energija prilikom tretmana potrebno je koristiti kraće vrijeme tretiranja pri čemu postoji mogućnost povrata električne energije koja je raspršena tijekom tretmana uzorka u obliku toplinske energije za predgrijavanje dolaznog proizvoda (Jaeger i sur., 2010).

4.2. UTJECAJ PULSIRAJUĆEG ELEKTRIČNOG POLJA NA INAKTIVACIJU BAKTERIJE *L. PLANTARUM*



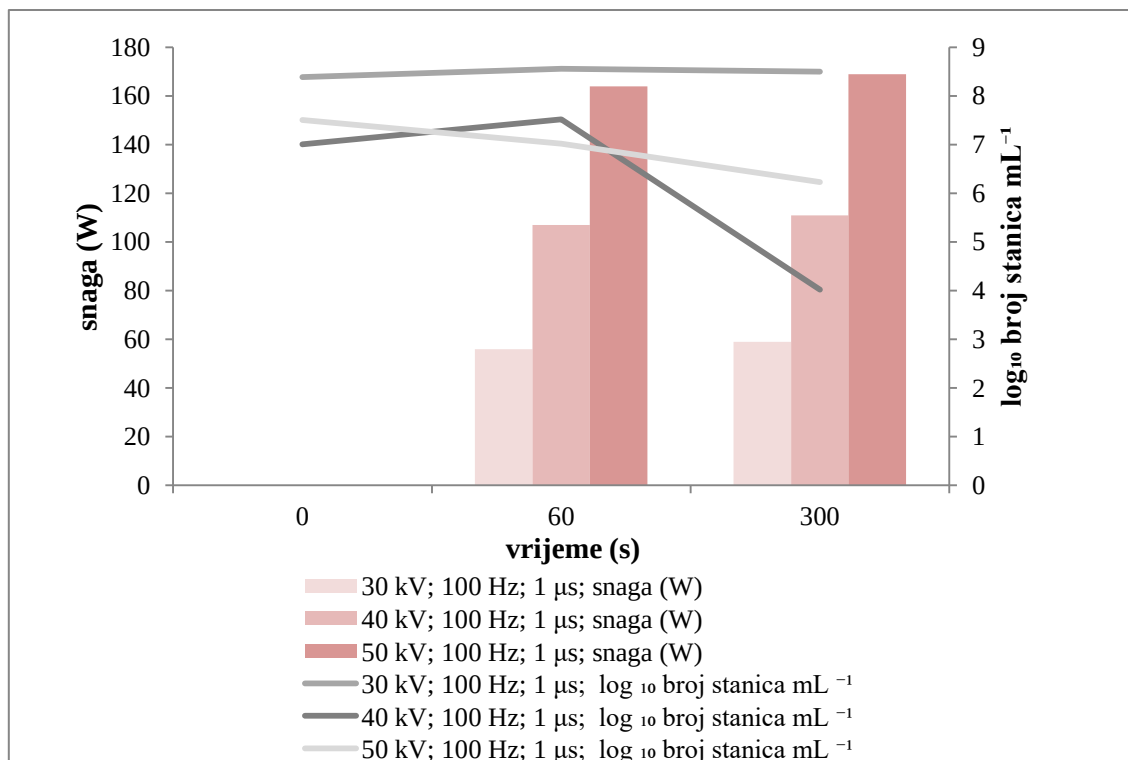
Slika 9. Utjecaj napona, frekvencije (100 Hz), trajanja pulsa (0,5 μs) i snage o vremenu trajanja procesa na inaktivaciju bakterije *L. plantarum* nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem

Nakon tretmana pri 100 Hz te trajanja pulsa od 0,5 μs dobivena je najviša inaktivacija (0,29 $\log_{10}$ broj stanica mL^{-1}) kod napona od 50 kV cm^{-1} i trajanja procesa od 300 s (slika 9). Najmanja inaktivacija (0,07 $\log_{10}$ broj stanica mL^{-1}) zabilježena je kod tretmana od 30 kV cm^{-1} , nakon 300 s trajanja procesa (slika 9).



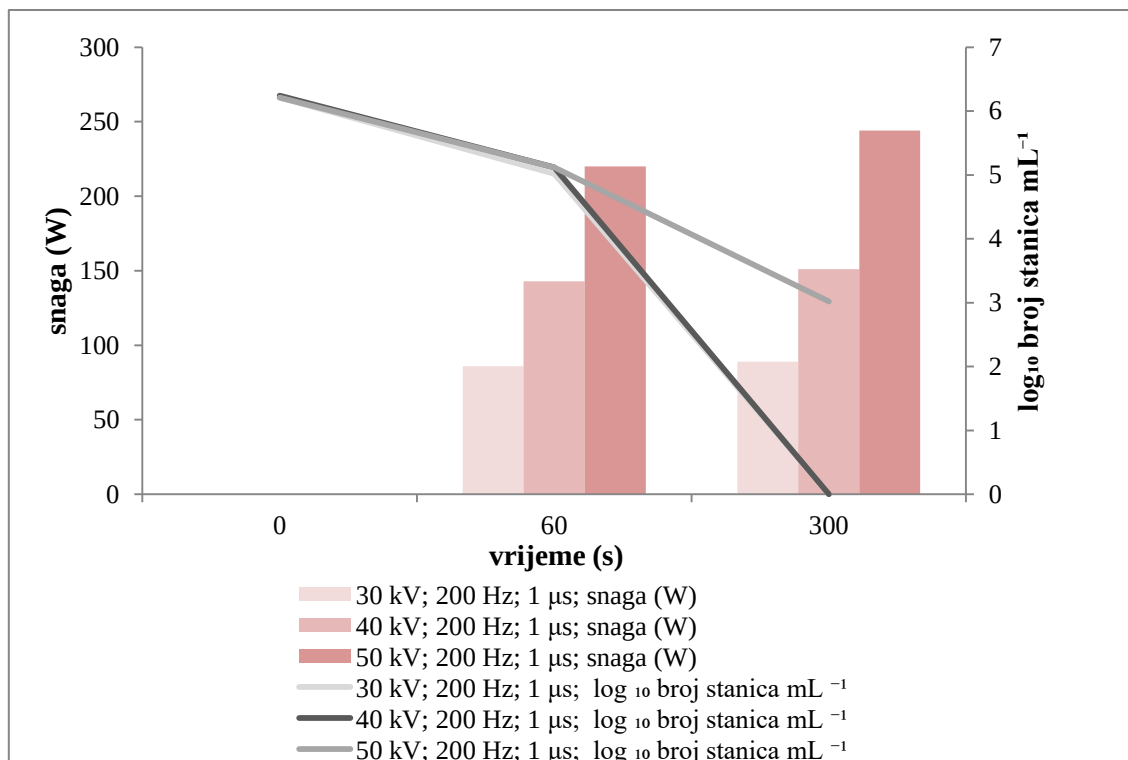
Slika 10. Utjecaj napona, frekvencije (200 Hz), trajanja pulsa (0,5 μs) i snage o vremenu trajanja procesa na inaktivaciju bakterije *L. plantarum* nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem

Na slici 10. vidljivo je da je došlo do potpune inaktivacije bakterije *L. plantarum* pri naponu od 50 kV cm^{-1} , 200 Hz te najduljem vremenu tretiranja uzorka od 300 s i trajanju pulsa od 0,5 μs. U tom uzorku inaktivacija iznosi 7,69 $\log_{10}$ broj stanica mL^{-1} , a ovdje je također zabilježena najviša snaga koja iznosi 200 W te energija procesa od 600 kJ L^{-1} (tablica 2). Iz grafa je također uočeno da je kod nižih vrijednosti napona zabilježena manja snaga procesa te niža inaktivacija mikroorganizma (slika 10).



Slika 11. Utjecaj napona, frekvencije (100 Hz), trajanja pulsa (1 μ s) i snage o vremenu trajanja procesa na inaktivaciju bakterije *L. plantarum* nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem

Iz grafa (slika 11) je vidljivo da je došlo do različitih vrijednosti inaktivacije pa je tako najviša inaktivacija od 2,99 log₁₀ broj stanica mL⁻¹ zabilježena kod napona od 40 kV cm⁻¹, frekvencije od 100 Hz, vremena trajanja pulsa od 1 μ s i vremena trajanja tretmana od 300 s.



Slika 12. Utjecaj napona, frekvencije (200 Hz), trajanja pulsa (1 μs) i snage o vremenu trajanja procesa na inaktivaciju bakterije *L. plantarum* nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem

Pri naponu od 30 kV cm⁻¹ i 40 kV cm⁻¹ zabilježena je potpuna inaktivacija bakterije koja je kod napona od 30 kV cm⁻¹, frekvencije od 200 Hz, vremena trajanja pulsa od 1 μs te nakon 300 s trajanja procesa iznosila 6,21 log₁₀ broj stanica mL⁻¹, a pri naponu od 40 kV cm⁻¹ inaktivacija je iznosila 6,24 log₁₀ broj stanica mL⁻¹ (slika 12).

Tablica 2. Promjena temperature ΔT ($^{\circ}\text{C}$) i ukupne energije (kJ L^{-1}) tijekom tretmana bakterije *L. plantarum* pulsirajućim električnim poljem

Trajanje pulsa (μs)	Frekvencija (Hz)	Napon (kV cm^{-1})	Vrijeme (s)	ΔT ($^{\circ}\text{C}$)	Energija (kJ L^{-1})
0,5	100	30	60	1,3	56,4
			300	2,7	300
		40	60	2,4	104,4
			300	5,1	546
		50	60	3,3	168
			300	7,5	894
	200	30	60	3,4	39
			300	3,7	213
		40	60	3,7	73,8
			300	6,9	405
		50	60	5,5	114
			300	9	600
1	100	30	60	0,6	33,6
			300	3,1	177
		40	60	1,8	64,2
			300	5	333
		50	60	3,6	98,4
			300	8,1	507
	200	30	60	3	25,8
			300	3,8	133,5
		40	60	4,2	42,9
			300	8,6	226,5
		50	60	7,1	66
			300	11,7	366

Za vrijeme trajanja tretmana pulsirajućim električnim poljem mjerena je temperatura procesa prije i nakon tretiranja uzorka (tablica 2). Porastom napona došlo je do porasta temperature za nekoliko stupnjeva. Kod uzorka tretiranog pri naponu od 50 kV cm^{-1} ,

frekvenciji 200 Hz, vremenu trajanja pulsa od 1 μ s te vremenu trajanja procesa od 300 s zabilježeno je najviše povećanje temperature od 11,7 °C, dok je najniže povećanje od 0,6 °C zabilježeno pri naponu od 30 kV cm^{-1} , frekvenciji od 100 Hz, vremenu trajanja pulsa od 1 μ s te nakon 60 s trajanja procesa. Wouters i sur. (1999) zaključili su da je porastom temperature dobivena viša inaktivacija mikroorganizama.

Učinkovitost tretmana pulsirajućim električnim poljem ovisi o vrsti mikroorganizma koji se tretira. Wouters i sur. (1999) istražili su razliku u inaktivaciji gram pozitivnih i gram negativnih mikroorganizama. Razlike u vrstama mikroorganizama, staničnim stijenkama te strukturama stanične membrane utječu na inaktivaciju pa je tako pri istim parametrima dobiveno da su kvasci osjetljiviji na tretman pulsirajućim električnim poljem (Tao i sur., 2015). Veličina i oblik stanice mogu utjecati na kinetiku inaktivacije mikroorganizama. Protočnom citometrijom se pokazalo da su stanice *L. plantarum* različito permeabilizirane. Veće stanice bile su lakše permeabilizirane od manjih (Wouters i sur., 2001).

Jakost električnog polja te duljina pulsa najvažniji su parametri koji utječu na kinetiku inaktivacije mikroorganizama. Veličina električno induciranih pora u staničnoj membrani ovise o primijenjenoj jakosti električnog polja te o broju impulsa (Seratlić i sur., 2013). Male pore mogu se ponovno zatvoriti, ali kada su pore velike dolazi do nepovratne strukturne promjene (Seratlić i sur., 2013). Porastom napona te vremena trajanja procesa dolazi do porasta snage procesa, a samim time i do više inaktivacije mikroorganizama (Tao i sur., 2015).

Tijekom primjene pulsa razlika u transmembranskom potencijalu dovodi do promjene u fosfolipidnom dvosloju stanice membrane pri čemu dolazi do stvaranja pora u membrani. Seratlić i sur. (2013) otkrili su u svome radu da su oštećenja stanične membrane reverzibilna, odnosno da pri optimalnim uvjetima skladištenja nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem dolazi do oporavka stanične membrane (Seratlić i sur., 2013).

Wouters i sur. (2001) u svom radu navode kako postoji veza između permeabilizacije membrane i kinetike inaktivacije različitih vrsta *Lactobacillus* u hrani. Korištenjem većeg broja impulsa s višim električnim poljem dobivena je veća propusnost stanice te je došlo do više inaktivacije (Wouters i sur., 2001).

Slike 9., 10., 11. i 12. prikazuju utjecaj napona, frekvencije i trajanja pulsa o vremenu trajanja procesa na inaktivaciju bakterije *L. plantarum*. Iz grafova je vidljivo da porastom

napona, frekvencije te trajanja pulsa dolazi do više inaktivacije mikroorganizma. Kada je napon iznosio 50 kV cm^{-1} , frekvencija 200 Hz, vrijeme trajanja pulsa $0,5 \text{ }\mu\text{s}$ došlo je do najviše inaktivacije mikroorganizma od $7,69 \log_{10}$ broj stanica mL^{-1} . Pri nižim vrijednostima parametara, napon 30 kV cm^{-1} , frekvencija 100 Hz te vrijeme trajanja pulsa $0,5 \text{ }\mu\text{s}$ inaktivacija bakterije *L. plantarum* je iznosila $0,07 \log_{10}$ broj stanica mL^{-1} . Posljedično možemo zaključiti da će kod viših vrijednosti ulaznih parametara tretmana inaktivacija mikroorgnizma *L. plantarum* biti viša.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu prikazanih rezultata na inaktivaciju kvasca *S. cerevisiae* i gram-pozitivne bakterijske vrste *L. plantarum* pulsirajućim električnim poljem može se zaključiti:

1. Najviša inaktivacija ($1,74 \log_{10}$ broj stanica mL^{-1}) kvasca *S. cerevisiae* postignuta je pri naponu od 50 kV cm^{-1} , frekvenciji od 100 Hz, trajanju pulsa od $1 \mu\text{s}$ te nakon 300 s trajanja procesa.
2. Najviša inaktivacija bakterije *L. plantarum* ($7,69 \log_{10}$ broj stanica mL^{-1}) postignuta je pri naponu od 50 kV cm^{-1} , frekvenciji od 200 Hz, trajanju pulsa od $0,5 \mu\text{s}$ te nakon 300 s trajanja procesa.
3. Najviši porast temperature ($11,5^\circ\text{C}$) zabilježen tijekom tretmana kvasca *S. cerevisiae* bio je pri naponu od 40 kV cm^{-1} , frekvenciji od 200 Hz, vremenu trajanja pulsa od $1 \mu\text{s}$ te nakon 300 s trajanja procesa. Najviše energije (834 kJ L^{-1}) se oslobodilo pri naponu od 50 kV cm^{-1} , frekvenciji od 100 Hz, vremenu trajanja pulsa od $0,5 \mu\text{s}$ te nakon 300 s trajanja procesa.
4. Najviši porast temperature ($11,7^\circ\text{C}$) prilikom tretmana bakterije *L. plantarum* zabilježen je pri naponu od 50 kV cm^{-1} , frekvenciji od 200 Hz, vremenu trajanja pulsa od $1 \mu\text{s}$ te nakon 300 s trajanja procesa. Najviše energije (894 kJ L^{-1}) se oslobodilo pri naponu od 50 kV cm^{-1} , frekvenciji od 100 Hz, vremenu trajanja pulsa od $0,5 \mu\text{s}$ te nakon 300 s trajanja procesa.

6. LITERATURA

Anonymous 1 <<https://edutorij.e-skole.hr/share/proxy/alfresco-noauth/edutorij/api/proxy-guest/bc3d491e-655c-43b5-aa91-5feca3a34c16/biologija-7/m02/kazalo-multimedije/index.html>> Pristupljeno 12.svibnja 2022.

Arshad, R., N., Abdul-Malek, Z., Roobab, U., Munir, M., A., Naderipour, A., Qureshi, M., I., Bekhit, A., E., D., Liu, Z., W., Aadil, R., M. (2021) Pulsed electric field: A potential alternative towards a sustainable food processing. *Trends in Food Science & Technology* **111**, 43-54.

Bamforth, C. W. (2008) Food, fermentation and micro-organisms, 1.izd., John Wiley & Sons, New York.

Duraković, S., & Redžepović, S. (2003) Uvod u opću mikrobiologiju, 1. izd. Kugler, Zagreb.

Frey, W., White, J., A., Price, R., O., Blackmore, P., F., Joshi, R., P., Nuccitelli, R., Beebe, S., J., Schoenbach, K., H., Kolb, J., F. (2006) Plasma Membrane Voltage Changes during Nanosecond Pulsed Electric Field Exposure. *Biophysical Journal* **90**, 3608-3615

Garner, L.A. (2019) Pulsed electric field inactivation of microorganisms: from fundamental biophysics to synergistic treatments. *Applied Microbiology and Biotechnology* **103**, 7917-7929.

Heinz, V., Alvarez, I., Angersbach, A., Knorr, D. (2002) Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields- basic concepts for process design. *Trends in Food Science & Technology* **12**, 103-111.

Jaeger, H., Meneses, N., Moritz, J., Knorr, D. (2010) Model for the differentiation of temperature and electric field effects during thermal assisted PEF processing. *Journal of Food Engineering* **100**, 109-118.

Kadlec, T., Babicky, V., Člupek, M. (2011) Application of Pulsed Electric Field on Bacteria. *Proceedings of Contributed Papers*. 263-266.

Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K., Brul, S. (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 239 – 256.

Kostešić, E., (2017) Imobilizacija pekarskog kvasca u alginatnoj i umreženoj želatinskoj matrici, Završni rad, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet Split, <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:777468>

Liao, X., Liu, D., Xiang, Q., Ahn, J., Chen, S., Ye, X., Ding, T., (2017) Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: A review. *Food control* **75**, 83-91.

Martinez, J., M., Cebrian, G., Alvarez, I., Raso, J. (2016) Release of Mannoproteins during *Saccharomyces cerevisiae* Autolysis Induced by Pulsed Electric Field. *Front. Microbiol* **7**:1435.

Marx, G., Moody, A., Bermudez-Aguirre, D. (2011) A comparative study on the structure of *Saccharomyces cerevisiae* under nonthermal technologies: High hydrostatic pressure, pulsed electric fields and thermo-sonication. *International Journal of Food Microbiology* **151**, 327-337.

Misra, N. N., Tiwari, B. K., Raghavarao, K. S. M. S., Cullen, P. J., (2011) Nonthermal Plasma Inactivation of Food-borne Pathogens. *Food Engineer Review* **3**, 159-170.

NIH (2021) National Library of Medicine. NIH- National Center for Biotechnology Information, < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/> > Pristupljeno 12. svibnja 2022.

Ou,Q.X., Nikolic-Jaric, M., Gänzle, M., (2016) Mechanisms of inactivation of *Candida humilis* and *Saccharomyces cerevisiae* by pulsed electric fields. *Bioelectrochemistry* **115**, 47-55.

Pollard, T. D., Earnshaw, W. C., Lippincott-Schwartz, J., Johnson, G. (2016) Cell Biology EBook, Elsevier Health Sciences.

Qin, B. L., Chang, F. J., Barbosa-Canovas, G. V. (1995) Nonthermal Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in Apple Juice Using Pulsed Electric Fields. *Lebensm.-Wiss. u.-Technology* **28**, 564-568

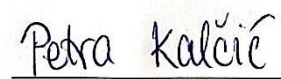
Raso, J., Frey, W., Ferrari, G., Pataro, G., Knorr, D., Teissie, J., Miklavčič, D. (2016) Recommendations guidelines on the key information to be reported in studies of application of PEF technology in food and biotechnological processes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **37**, 312-321.

- Rodrigo, D., Ruiz, P., Barbosa-Canovas, G.V., Martinez, A., Rodrigo, M. (2002) Kinetic model for the inactivation of *Lactobacillus plantarum* by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology* **81**, 223-229.
- Seratić, S., Bugarski, B., Radulović, Z., Dejmek, P., Wadsö, L., Nedović, V. (2013) Electroporation Enhances the Metabolic Activity of *Lactobacillus plantarum* 564. *Food Technology and Biotechnology* **51 (4)**, 446-452.
- Syed, A.Q., Ishaq, A., Rahman, U.U., Aslam, S., Shukat, R. (2017) Pulsed electric field technology in food preservation: A review. *Journal of Nutritional Health & Food Engineering* **6**, 168-172.
- Šain, A., (2017) Promjene morfoloških karakteristika odabranih vinskih kvasaca i bakterija mliječne kiseline u prisustvu okratoksina A, Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno- biotehnološki fakultet, <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:869768>
- Tao, X., Chen, J., Li, L., Zhao, L., Zhang, M., Sun, A. (2015) Influence of Pulsed Electric Field on *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Properties* **18:7**, 1416-1427.
- Tille, P. (2015) Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology-E-Book, Elsevier Health Sciences.
- Vaessen, E., M., J., Kemme, H., A., Timmermans, R., A., H., Schutyser, M., A., I., den Besten, H., M., W. (2020) Temperature and presence of ethanol affect accumulation of intracellular trehalose *Lactobacillus plantarum* WCFS1 upon pulsed electric field treatment. *Bioelectrochemistry* **137**, 107680.
- Walsh, R., M., Martin, P., A. (1977) Growth of *S.cerevisiae* and *S.uvarum* in a temperature gradient incubator. *Journal of the Institute of Brewing* **83**, 169-172.
- Wang, L., Fan, D., Chen, W., Terentjev, M., E., (2015) Bacterial growth, detachment and cell size control on polyethylene terephthalate surfaces. *Scientific reports* **5**:15159.
- Wouters, P. C., Dutreux, N., Smelt, J. P. P. M., Lelieveld, H. I. M. (1999) Effects of Pulsed Electric Fields on Inactivation Kinetics of *Listeria innocua*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 5364-5371.
- Wouters, P., C., Alvarez, I., Raso, J. (2001) Critical factors determining inactivation kinetics by pulsed electric field food processing. *Trends in Food Science and Technology* **12**, 112-121.

Zimmermann, U., Benz, R. (1980) Dependence of the electrical breakdown voltage on the charging time in *Valonia utricularis*. *The Journal of Membrane Biology* **53**, 33-43.

Izjava o izvornosti

Ja Petra Kalčić izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mog rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Petra Kalčić