

Utjecaj ultrazvuka visoke snage na inaktivaciju i revitalizaciju odabranih mikroorganizama

Šušić, Iva

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:575499>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-31**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno - biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Iva Šušić

7030/PT

**UTJECAJ ULTRAZVUKA VISOKE SNAGE NA
INAKTIVACIJU I REVITALIZACIJU ODABRANIH
MIKROORGANIZAMA**

Predmet: Procesi konzerviranja hrane

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

Zagreb, 2017.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno – biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno – tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za procesno - prehrambeno inženjerstvo

UTJECAJ ULTRAZVUKA VISOKE SNAGE NA INAKTIVACIJU I REVITALIZACIJU ODABRANIH MIKROORGANIZAMA

Iva Šušić, 0058206396

Sažetak: Svrha ovog rada je utvrditi utjecaj ultrazvuka visoke snage na inaktivaciju i revitalizaciju bakterijske kulture *Listeria innocua* ATC 33090. Određivan je utjecaj na istjecanje staničnog sadržaja, stupanj redukcije, oporavka te na fizikalne čimbenike (pH, provodnost). Uzorci su ultrazvučno tretirani sondom frekvencije 20 kHz uz tri nezavisne varijable, amplituda (75%, 100%), vrijeme tretmana (5min, 10 min) i temperatura (40°C, 60°C). Rezultati su analizirani metodom odzivne površine (RSM) koristeći program STATGRAPHICS Centurion. Najviša inaktivacija bakterijske kulture od 4,309 log₁₀ CFU/mL postignuta je pri 40°C i 100% amplitudi, no također pri tim uvjetima postignut je i potpuni oporavak. Potpuna inaktivacija bez oporavka postignuta je pri 60°C i 75% amplitudi nakon 10min tretmana te pri 60°C i 100% amplitudi što potvrđuje i istjecanje staničnog sadržaja prema apsorbancijama pri 260nm i 280nm.

Ključne riječi: ultrazvuk visoke snage, inaktivacija, revitalizacija, mikroorganizmi

Rad sadrži: 25.stranica, 6 tablica, 12 slika, 23 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10000 Zagreb

Mentor: izv.prof.dr.sc. Anet Režek Jambrak

Pomoć pri izradi: Višnja Stulić, mag.ing.

Datum obrane: 19. rujna 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Food Technology

Department of Food Engineering

Laboratory for Food Processes Engineering

INFLUENCE OF HIGH INTENSITY ULTRASOUND ON INACTIVATION AND RECOVERY OF SELECTED MICROORGANISMS

Iva Šušić, 0058206396

Abstract: The aim of this final work is to determine the influence of high intensity ultrasound on reduction and recovery of *Listeria innocua* ATCC 33090. The influence of high intensity ultrasound on the leakage of intercellular content, the degree of reduction and recovery as well as physical factors (pH, conductivity) were determined. Samples were treated with the ultrasound probe with a frequency of 20 kHz with three independent variables, amplitude (75 %, 100 %), duration of treatment (5min, 10 min) and temperature (40 °C, 60 °C). The results were analyzed by surface method (RSM) using the STATGRAPHICS Centurion program. The highest reduction of microorganisms (4,309 log₁₀ CFU/mL) was achieved at 40°C and 100% of amplitude, but also at that conditions full recovery was achieved. Full inactivation without recovery was achieved after 10min of treatment at 60°C with 75% amplitude and also at 60°C with 100% amplitude what confirms leaking of intercellular content according to absorbency at 260nm and 280nm.

Key words: high intensity ultrasound, inactivation, recovery, microorganisms

Thesis contains: 25 pages, 6 tables, 12 figures, 23 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. Anet Režek Jambrak, Associate Professor

Technical support and assistance: mag. ing. Višnja Stulić, Scientific Assistant

Defence date: September 19th 2017

Sadržaj:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Podjela i karakteristike ultrazvuka	2
2.2. Kavitacija	2
2.3. Slobodni radikali	3
2.4. Ultrazvučna oprema	3
2.5. Upotreba ultrazvuka u prehrambenoj tehnologiji	5
2.6. <i>Listeria innocua</i>	7
3. MATERIJALI I METODE	8
3.1. Materijali	8
3.1.1. Čuvanje mikrobiološke kulture <i>Listeria innocua</i> 33090	8
3.1.2. Kemikalije za mikrobiološka istraživanja	8
3.1.3. Priprema mikrobiološke kulture	8
3.1.4. Priprema suspenzije bakterija	9
3.1.5. Priprema uzorka za tretiranje ultrazvukom	9
3.2. Metode	9
3.2.1. Provedba eksperimenta	9
3.2.2. Određivanje pH-vrijednosti i provodljivosti	10
3.2.3. Određivanja istjecanja unutarstaničnog sadržaja	10
3.2.4. Određivanje broja stanica	10
3.2.5. Određivanje revitalizacije stanica	11
3.2.6. Obrada podataka	12
4. REZULTATI I RASPRAVA	13
4.1. Utjecaj ultrazvuka na stanično istjecanje	13
4.2. Utjecaj ultrazvuka na inaktivaciju	15
4.3. Utjecaj ultrazvuka na revitalizaciju	16
4.4. Utjecaj ultrazvuka na pH i provodljivost	17
4.5. Statistička obrada podataka	17
4.5.1. Rezultati statističke obrade za inaktivaciju	17
4.5.2. Rezultati statističke obrade za istjecanje staničnog sadržaja (A260nm)	18
4.5.3. Rezultati statističke obrade za istjecanje staničnog sadržaja (A280nm)	19
4.5.4. Rezultati statističke obrade za revitalizaciju stanica	20
4.5.5. Rezultati statističke obrade za pH vrijednost	21

5. ZAKLJUČAK.....	23
6. LITERATURA.....	24

1. UVOD

Dobro je poznato da se ultrazvuk koristi u komunikaciji i orijentaciji životinja, medicini, podvodnoj navigaciji, no nije toliko nepoznanica da se ultrazvuk sve više primjenjuje i na drugim područjima kao što je biokemija i biologija, inženjerstvo, geografija, geologija pa tako i prehrambena industrija. Sve veći zahtjevi za minimalnom obradom hrane, očuvanjem arome, okusa, mirisa, teksture i nutritivnih svojstava dovode do istraživanja i primjene novih netoplinjskih metoda u koje možemo svrstati i ultrazvuk. Ultrazvuk visokog intenziteta izaziva kemijske, mehaničke, biokemijske promjene hrane koje se mogu primijeniti prilikom ekstrakcije, homogenizacije, zamrzavanja, sušenja, inaktivacije mikroorganizama. Korištenje ultrazvuka u prehrambenoj industriji i prehrambenoj tehnologiji predmet je intenzivnog istraživanja i primjene unazad nekoliko desetaka godina, kako kao metode za nerazorna ispitivanja tj. dijagnostičke metode za određivanje različitih svojstava prehrambenih sirovina i proizvoda (ultrazvuk niskog intenziteta), te kao razorne metode gdje se ultrazvuk koristi kao tehnika kojom se prehrambenoj sirovini ili materijalu mijenjaju fizikalno-kemijska svojstva (ultrazvuk visokog intenziteta).

Svrha ovog rada bila je istražiti utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta pri različitim temperaturama, amplitudi i vremenu tretiranja na inaktivaciju i oporavak bakterije *Listeria innocua* ATC 3390 tj. odrediti stopu redukcije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Podjela i karakteristike ultrazvuka

Ultrazvuk je forma energije generirana od strane zvučnih valova frekvencija koje su iznad raspona ljudskog sluha npr. 20 Hz. Gornja granica ultrazvuka nije strogo definirana, ali se obično uzima 5 MHz za plinove te 500 MHz za tekućine i krutine (Mason i Lorimer,2002). Upotreba ultrazvuka u prehrambenoj industriji unutar ovog širokog raspona frekvencija može se podijeliti na dva osnovna područja, ultrazvuk visokih i niskih intenziteta. Ultrazvuk visokih intenziteta (više od 1 W/cm^2) s frekvencijama prostiranja valova od 20 kHz do 2 MHz ima razorna svojstva te može promijeniti svojstva materijala (Mason i Lorimer,2002). Upotrebljava se za unaprjeđivanje ili mijenjanje fizikalnih svojstava hrane. Ultrazvuk niskih intenziteta (niže od 1 W/cm^2) te visokih frekvencija prostiranja valova se zbog svojih nerazornih svojstava primjenjuje za analizu sirovina i prehrambenih proizvoda. Primjenom različitih frekvencija i amplituda zvučnog vala može se promatrati velik broj fizikalnih, kemijskih i biokemijskih učinaka koji nastaju kao posljedica kavitacije.

2.2. Kavitacija

Kavitacija je mehanizam koji omogućava da se postignu željeni utjecaji ultrazvuka na tretirani uzorak. Kavitaciju su prvi put spomenuli Thornycroft i Barnaby 1895. kada su primijetili da je propeler njihove podmornice erodirao nakon kratkog vremena rada. 1917., Lord Rayleigh objavio je prvi matematički model opisujući kavitaciju u nestlačivom fluidu. Kada je Loomis 1927. objavio prve kemijske i biološke utjecaje ultrazvuka prepoznato je da bi kavitacija mogla biti koristan alat u kemijskim reakcijama. Jedna od prvih zabilježenih primjena ultrazvuka bila je u svrhu razgradnje polimera. Od tada se primjena ultrazvučne kavitacije postupno povećavala (Leong i sur. 2011).

Cikluse kontrakcije i ekspanzije te ekspanzivne vrtloge uzrokuju longitudinalni valovi koji nastaju širenjem zvučnog vala kroz tekući medij. Kao rezultat oscilacije tlaka u mediju mjehurići osciliraju te uvijek u fazi ekspanzije malo više narastu nego što se smanje tijekom faze kompresije (Suslick, 1988). Kada mjehurić dosegne određenu kritičnu veličinu ne može više učinkovito apsorbirati energiju, a budući da se bez ulazne energije šupljina ne može samo održavati mjehurić se urušava sam u sebe. Kada osigurana ultrazvučna energija nije dovoljna kako bi se zadržala plinska faza u mjehuriću, on postiže svoju maksimalnu veličinu te dolazi do

brze kondenzacije. Udarni valovi stvaraju se sudarom kondenziranih molekula. Zvučna kavitacija uključuje stvaranje, rast i raspad mjehurića ili praznina u tekućini kao rezultat fluktuacije tlaka (Suslick, 1988). Kolaps mjehurića rezultira stvaranjem intenzivnih valova koji mogu značajno promijeniti fizikalno-kemijska svojstva materijala. Djelovanje kavitacije može uzrokovati brzo i potpuno odzračivanje, dovesti do stvaranja slobodnih radikala, poboljšati stvaranje emulzija, inaktivirati enzime i mikroorganizme itd. Sposobnost ultrazvuka da izazove kavitaciju ovisi o frekvenciji i intenzitetu ultrazvuka, o svojstvima proizvoda poput viskoznosti medija, gustoći, površinskoj napetosti medija, prisutnosti otopljenih plinova itd. Temperatura je obrnuto proporcionalna početku kavitacije. Energija potrebna za formiranje mjehurića u tekućem mediju je razmjerna površinskoj napetosti i tlaku pare (Leighton, 2007) što bi značilo, što je veća površinska napetost tekućine to je veća energija za stvaranje kavitacijskih mjehurića, a posljedica će biti veća energija udarnog vala koji nastaje prilikom implozije mjehurića.

2.3. Slobodni radikali

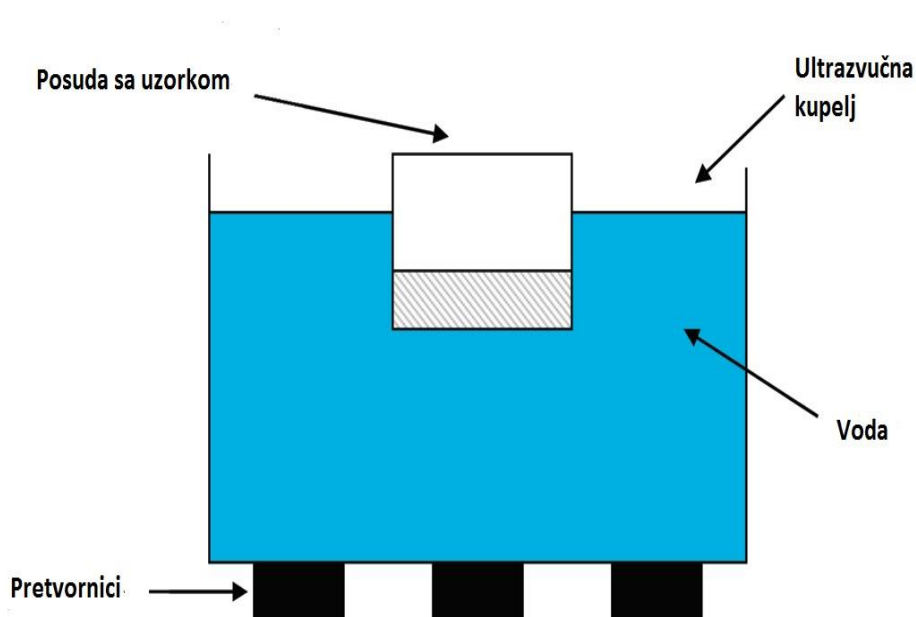
Prilikom kavitacije dolazi do ekstremnih uvjeta koji uzrokuju razlaganje molekula otapala i otopljenih tvari unutar mjehurića te stvaraju visoko reaktivne radikale. Ako se sonifikacija provodi u vodi nastaju $H\cdot$ i $\cdot OH$ radikali (Heglein, 1993): $H_2O \rightarrow H + OH$

Hidroksilni radikali, kao i slobodni radikali, vrlo su reaktivni prirode te budući da s njima nije moguće upravljati ulaze u reakcije s tretiranim uzorcima. Mogu dovesti do pozitivnih ili negativnih efekata, ovisno o tome što želimo postići ultrazvučnim tretiranjem. Uzrokuju lančane reakcije što može dovesti do degradacije polimera, oksidacije lipida itd. Mogu se odrediti pomoću joda te kolorimetrijskim metodama koristeći apsorpciju i koeficijent molarne ekstinkcije. Budući da u našem tijelu imamo različite antioksidanse za „hvatanje“ slobodnih, hidroksilnih i drugih reaktivnih vrsta kisika, antioksidanse možemo upotrijebiti u otopini koju ultrazvučno tretiramo te tako omogućiti korištenje viših ultrazvučnih frekvencija koje prema nekim istraživanjima uzrokuju nepoželjne reakcije između radikala i sastojaka hrane.

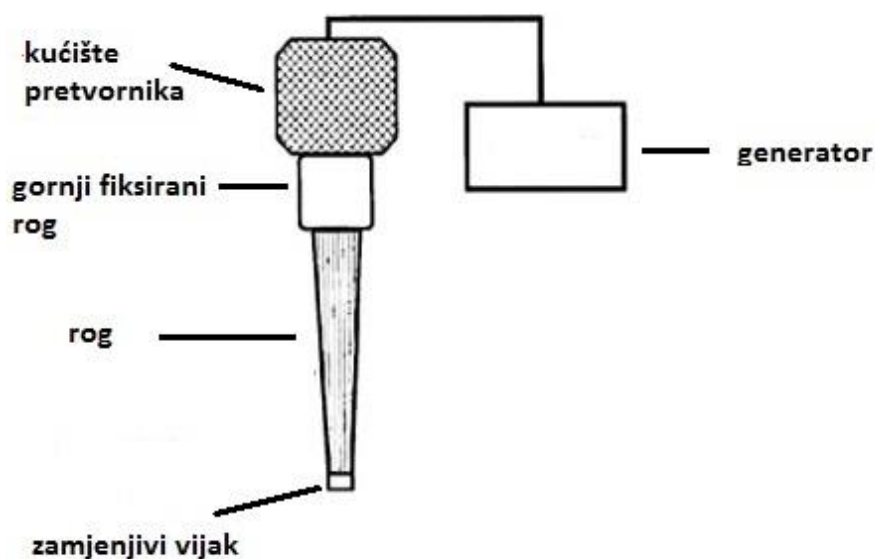
2.4. Ultrazvučna oprema

Osnovni dijelovi ultrazvučne opreme, bez obzira u koju se svrhu koristi sastoji se od generatora koji pretvara napon istosmjerne struje u frekvencije od otprilike 25kHz, pretvornika koji pretvara električnu ili mehaničku energiju u energiju zvuka i odašiljača koji šalje ultrazvučne valove u medij (Povey, Mason, 1998). Vrste ultrazvučnih reaktora koji se koriste u

prehrambenoj industriji su ultrazvučne kupelji i sustavi s direktno uronjenom sondom. Ultrazvučne kupelji tradicionalno se koriste u prehrambenoj industriji zbog ranije lakše dostupnosti (Povey, Mason, 1998). One obično rade pri nižem intenzitetu da bi se izbjeglo oštećenje stijenki spremnika uzrokovano kavitacijom, a i pri manjim akustičkim snagama jer su volumeni tretirane tekućine u spremniku najčešće veliki. No, u novijim istraživanjima sve se više koriste sustavi s direktno uronjenom sondom (Aleixo i sur., 2004; Duckhouse i sur., 2004; Mason i sur., 1996; Neis, Blume, 2003; Patrick i sur., 2004; Tian i sur., 2004). Ultrazvuk s direktno uronjenom sondom koristi se podjednako na svim poljima, od ultrazvučnog procesiranja hrane do čišćenja površina i zavarivanja metala (Bermúdez-Aguirre i sur. 2011).



Slika 1: Ultrazvučna kupelj (prema Harvey i sur., 2014).



Slika 2: Sustav s direktno uronjenom sondom (prema De Castro i Campote, 2007).

2.5. Upotreba ultrazvuka u prehrambenoj tehnologiji

Primjenu ultrazvuka možemo naći na mnogim područjima kao što su biologija i biokemija, medicina, stomatologija, geologija i geografija te općenito industrija (Mason, Lorimer, 2002). Mogućnost korištenja ultrazvuka u prehrambenoj industriji pojavila se prije otprilike 70 godina, no tek kasnije tehnika je potpuno realizirana te se još uvijek smatra novijom metodom u procesiranju hrane (Dolatowski i sur., 2007). Ultrazvuk u prehrambenoj industriji može se primijeniti na više područja. Ultrazvuk visoke snage koristi se za otplinjavanje tekuće hrane, ekstrakciju enzima i proteina, inaktivaciju enzima i mikroorganizama te kristalizaciju dok se ultrazvuk niskih intenziteta koristi za emulgiranje, smrzavanje, filtraciju, sušenje, ekstrakciju aroma. Ultrazvuk kao nedestruktivna tehnika se također može koristiti prilikom lociranja stranih tijela kao što je staklo, organski talog pa i bakterijske infekcije u čvrstoj i tekućoj hrani nakon pakiranja hrane (Bermúdez-Aguirre i sur. 2011).

- Emulgiranje

Jedna od prvih primjena ultrazvuka pri preradi hrane bila je za emulgiranje (Mason, Lorimer, 2002). Praćenjem procesa emulgiranja dokazano je da trenutna kavitacija osigurava ultrazvučno emulgiranje tako da šok val koji nastaje kada mjehurić kolapsira na granici dviju tekućina koje se ne miješaju pospješuje njihovo miješanje (Cucheval i Chow, 2008). Tako dobivene emulzije stabilnije su nego one koje se dobiju konvencionalnim metodama i

zahtijevaju male količine površinski aktivnih tvari (Bermúdez-Aguirre i sur. 2011). Ultrazvučno dobivene emulzije koriste se u farmaciji, tekstilnoj, kozmetičkoj te prehrambenoj industriji

- Ekstrakcija

Upotreba ultrazvuka u procesu ekstrakcije donosi neke prednosti kao što su bolji prolazak otapala u stanicu, poboljšani prijenos mase te lakše otpuštanje staničnih sastojaka zahvaljujući razbijanju staničnih stijenki u biljnom materijalu (Bermúdez-Aguirre i sur. 2011.). Također još jedna prednost primjene ultrazvuka jest niža temperatura te kraće vrijeme tretmana što rezultira čistim ekstraktom.

- Kristalizacija/ Smrzavanje

Ultrazvuk s frekvencijama u rasponu od 20-100kHz pokazao se koristan prilikom formacije kristala leda tijekom smrzavanja vode budući da se smrzavanje ubrzalo, a oštećenje stanica smanjilo (Sun, Li, 2003). Kod nekih kristalizacijskih procesa, u početnoj fazi smrzavanja, ultrazvuk igra važnu ulogu budući da ubrzava proces kristalizacije čime se značajno skraćuje vrijeme zadržavanja. Tako dolazi do nastajanja većeg broja centara kristalizacije pri čemu nastaju manji kristali čime se značajno smanjuje oštećenje stanica (Bermúdez-Aguirre i sur. 2011).

- Inhibicija enzima i inaktivacija mikroorganizama

Jedno od prvih istraživanja pokazalo je da se izolirani pepsin može inaktivirati ultrazvukom, također nešto novija istraživanja dokazala su da se inhibicija inverzije saharoze također može postići kavitacijom. U daljnjim istraživanjima primjena ultrazvuka u kombinaciji s tlakom pokazala se učinkovita pri inaktivaciji enzima. Oksidaze se uspješno inaktiviraju djelovanjem ultrazvuka, no ipak reduktaze i amilaze su visoko otporne na utjecaj ultrazvuka što znači da ne možemo generalizirati utjecaj ultrazvuka na enzime (Bermúdez-Aguirre i sur. 2011.).

Ultrazvuk se može primjenjivati i u inaktivaciji mikroorganizama. Iako su pasterizacija i sterilizacija najčešće korištene metode u inaktivaciji mikroorganizama zbog njihovog negativnog utjecaja na kvalitetu hrane pribjegava se sve većem korištenju netoplinjskih metoda. Vjeruje se da ultrazvuk visokog intenziteta narušava i stanjuje stanične membrane te šteti DNA prilikom stvaranja slobodnih radikala što dovodi do razaranja stanica. To potvrđuje i činjenica da su određene bakterije otpornije na kavitaciju od drugih (Knorr i sur, 2004). Nažalost potrebni su vrlo visoki intenziteti ukoliko se ultrazvuk koristi samostalno u inaktivaciji mikroorganizama, no prema istraživanju Rasoja i Barbosa-Cánovasa iz 2003. godine kombinacije ultrazvuka sa drugim tehnikama kao što su temperatura, tlak te niski aktivitet

vode pokazale su se dobrom metodama za trajnu inaktivaciju mikroorganizama. Utjecaj pH čini se nije toliko značajan kada se kombinira sa ultrazvukom, samo nekoliko istraživanja fokusirano je na njegov utjecaj (Bermúdez-Aguirre i sur. 2011.). Termosonične (kombinacija topline i ultrazvuka), manosonične (kombinacija tlaka i ultrazvuka) te manotermosonične (kombinacija tlaka, topline i ultrazvuka) metode zasad su vodeće u inaktivaciji mikroorganizama. Prednost ultrazvuka ispred drugih tehnika jest manji gubitak okusa, veća homogenost te značajna ušteda na energiji zbog čega se njegova primjena u prehrambenoj industriji sve više povećava (Mason, 2003).

Na ostalim područjima kao što je otplinjavanje, filtracija te sušenje ultrazvuk je također od velike važnosti. Ultrazvuk je koristan ukoliko je potrebno brzo i kontrolirano uklanjanje plinova iz sistema. Kod filtracije ultrazvuk značajno povećava brzinu protjecanja kroz filter, dok je prilikom sušenja ultrazvučnim zračenjem temperatura niža nego kod konvencionalnog sušenja čime se smanjuje oksidacija i propadanje materijala (Bermúdez-Aguirre i sur., 2011).

2.6. *Listeria innocua*

Listeria innocua je gram-pozitivna, nesporigena, fakultativno anaerobna bakterija. Svojom strukturom vrlo sliča *Listeria monocytogenes*, no za razliku od nje je nepatogena te se zbog tog često koristi u istraživanjima. Bakterije roda *Listeria* izrazito su otporne na nepovoljne uvjete okruženja te su kao saprofiti široko rasprostranjeni u okolišu-tlu, površinskim vodama, biljkama. *Listeria monocytogenes* inficira 50-tak različitih životinjskih vrsta. Bakterija se u ljudi najčešće unosi u organizam preko kontaminiranih namirnica. Smatra se da domaće životinje tj. preživači održavaju ciklus kruženja listerije u prirodi fekalno-oralnom kontaminacijom tla. *L. monocytogenes* prepoznata kao važan patogen u ljudi i u životinja, u zadnja dva desetljeća postala je predmetom zanimanja medicinske, veterinarske i prehrambene mikrobiologije (Bubonja i sur. 2007). Obilježja poput razmnožavanja unutar velikoga raspona pH-a (4,3– 9,6) i temperature (1 – 450 °C), te izrazita otpornost prema visokim koncentracijama NaCl-a (do 12%), omogućuju listeriji preživljavanje različitih postupaka koji se koriste tijekom obrade namirnica (Bubonja i sur. 2007). Također, uz sposobnost razmnožavanja na temperaturama skladištenja (+4 °C), uzrokuje velik problem prehrambenoj industriji, te potencijalnu opasnost za ljudsko zdravlje (Gliot i Content, 2002).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Čuvanje mikrobiološke kulture *Listeria innocua* 33090

Bakterijska kultura *Listeria innocua* 33090 čuva se u 50% glicerolu pri temperaturi -20 °C.

3.1.2. Kemikalije za mikrobiološka istraživanja

a.) Natrijev nitrat

Za pripremu otopine natrijevog nitrata 0.01 M NaNO_3 odvaži se 8.4 g NaNO_3 te otopi u 1000 mL destilirane vode. Pripremljena otopina sterilizira se pri 121 °C/15 min.

b.) Fosfatni pufer (PBS)

Za pripremu fosfatnog pufera (PBS) odvaži se 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.62 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ i 0.24 g KH_2PO_4 te otopi u 900 mL destilirane vode. Kako bi se pH vrijednost podesila na 7 dodaje se HCl. Volumen se nadopuni sa destiliranom vodom do 1000 mL. Pripremljena otopina sterilizira se pri 121 °C/15 min

c.) Hranjive podloge za uzgoj mikrobiološke kulture

Nutrijent bujon/ agar (Biolife, Milan, Italija)

Za pripremu 1000 mL nutrijent bujona izvaži se 13 g dehidrirane podloge koja se otopi u 1000 mL destilirane vode.

Za pripremu 1000 mL nutrijent agara izvaži se 13 g dehidrirane podloge te 20g tehničkog agara. Odvagani sastojci otope se u 1000 mL destilirane vode. Agar se sterilizira u autoklavu 15 min pri 121 °C te se u laminaru prelije u petrijeve zdjelice kako bi se spriječila moguća kontaminacija podloge. Podloge se, uz poluotvorene poklopce, suše u struji zraka u laminaru.

3.1.3. Priprema mikrobiološke kulture

Volumen od 10 µL suspenzije bakterijske kulture precijepi se u laminaru u 10 mL hranjivog Nutrijent bujona (Biolife, Italija). Plastična epruveta s naciepljenim bujonom i bakterijskom

kulturom inkubira se 48 h u termostatu ("Bodalec i Bodalec", model EBT) pri temperaturi od 37 °C.

3.1.4. Priprema suspenzije bakterija

Nakon precjepljivanja bakterijske kulture iz 50 % glicerola u Nutrient bujon i inkubiranja (48 h) suspenzija se centrifugira (Hettich, Rotofix 32) pri 4000 RPM/10 min. Nakon centrifugiranja, odlije se supernatant te se na biomasu bakterije dodaje 10 mL fosfatnog pufera. Uzorak u plastičnoj epruveti homogenizira se na vorteksu (IKA, Vortex 4 basic; BV) te se ponovi centrifugiranje pri istim uvjetima 3 puta.

3.1.5. Priprema uzorka za tretiranje ultrazvukom

Volumen od 190 mL 0.01 M NaNO₃ ulije se u laboratorijsku staklenu čašu od 500 mL. Staklena čaša stavlja se u zagrijanu vodenu kupelj, nakon što se postigne odgovarajuća temperatura (40 C ili 60 °C) dodaje se 10 mL uzorka bakterijske kulture.

3.2. Metode

3.2.1. Provedba eksperimenta

Tretiranje ultrazvukom visoke snage provodi se ultrazvučnim procesorom model S-4000 (MisonixSonicators, Newtown, Connecticut, SAD).



Slika 1: Ultrazvučni procesor model S-4000 (MisonixSonicators, Newtown, Connecticut, SAD)

Nakon što se termočlanak i ultrazvučna sonda (model: HI 9063, Hanna Instruments Ltd, Leighton, Buzzard LU7 4AD, UK) steriliziraju alkoholom te isperu destiliranom vodom podese se parametri na uređaju (trajanje tretmana i amplituda). Ultrazvučna sonda, frekvencije 20 kHz i promjera 127 mm, uroni se u staklenu čašu sa uzorkom otprilike do dva promjera sonde od dna čaše. Kako bi se pratila temperatura uzorka, termočlanak priključen na ultrazvučni procesor također se uroni u čašu s uzorkom. Tokom cijelog ultrazvučnog tretmana temperatura uzorka održava se stalnom (dopušteno variranje ± 3 °C) tako što se čaša sa uzorkom uranja u plastičnu posudu s ledom. Po završetku ultrazvučnog tretmana iz čaše se izuzima 3 mL uzorka. Prije svakog slijedećeg ultrazvučnog tretmana potrebno je vršiti sterilizaciju sonde i termočlanka.

3.2.2. Određivanje pH-vrijednosti i provodljivosti

Mjerenje pH-vrijednosti provodi se na digitalnom pH-metru (pH 340i/SET, WTW, Weilheim, Germany) prije (nakon zagrijavanja u kupelji na 40 °C i 60 °C) i poslije tretmana ultrazvukom.

3.2.3. Određivanja istjecanja unutarstaničnog sadržaja

Princip određivanja: Metoda određivanja istjecanja unutarstaničnog sadržaja je spektrofotometrijska, filtracijska metoda gdje na porama filtra ukoliko je došlo do poracije odnosno apoptoze stanica zaostaju stanične makromolekule, nukleinske kiseline i proteini.

Postupak određivanja: Volumen od 3 mL stanične kulture filtrira se kroz CHROMAFIL Xtra PTFE-20/25 filter (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Duren, Germany) sa 0.25 μ m veličinom pora. U dobivenom filtratu određuje se apsorbancija pri 260 nm i 280nm.

3.2.4. Određivanje broja stanica

Ukupni broj stanica određuje se prije i nakon tretmana kako bi se odredio stupanj redukcije. Stupanj redukcije je razlika broja stanica prije i poslije tretmana. Volumen od 10 μ L uzorka nacijepi se u 90 μ L PBS - a i napravi se serija razrjeđenja (do 10^{-7}). Razrjeđenja se nacijepljuju u triplikatu, uzima se po 10 μ L na hranjivu podlogu i štapićem po Drygalskom se razmaže kružnim pokretima po ploči. Nakon 48 h inkubacije, izbroje se narasle kolonije na pločama. U obzir dolaze samo one ploče koje imaju broj poraslih kolonija između 10 i 300. Određuje se srednja vrijednost za svako razrjeđenje, a ukupni broj izražava se kao $\log_{10}$ CFU/mL.

Formula za izračun broja stanica:

$$CFU = \frac{\text{broj poraslih kolonija}}{\text{upotrebljeni volumen uzorka}} \times \text{recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja} \quad /1/$$

3.2.5. Određivanje revitalizacije stanica

Princip određivanja: Revitalizacija stanica dokaz je inaktivacije stanica. Stanica pod stresom može se revitalizirati što je dokaz da prilikom tretmana ne dolazi do istjecanja unutarstaničnog sadržaja, odnosno apoptoze stanica. Metoda se bazira na određivanju broja stanica odnosno postotka revitalizacije u odnosu na broj stanica određen nakon tretmana.

Priprema reagensa: Puferirana peptonska voda (Biolife, Milan, Italija) koristi se kao hranjivi bujon za naciepljivanje stanica nakon tretmana. Za 1 L puferirane peptonske vode na tehničkoj vagi odvaže se 20 g dehidrirane podloge koja se otopi u 1000 mL destilirane vode. Pripremljeni bujon autoklavira se pri 121 °C kroz 15 min te se čuva u hladnjaku na +4 °C kroz 3 mjeseca.

Postupak određivanja: U plastičnu epruvetu pipetira se 9 mL puferirane peptonske vode u koju se naciepljuje 1 mL uzorka izuzetog iz staklene čaše nakon tretmana. Uzorci se naciepljuju u paraleli te se inkubiraju pri 30 °C kroz vremenske periode od 24 h. Određivanje broja revitaliziranih stanica određuje se metodom naciepljivanja serija razrjeđenja na nutrient agar. Iz inkubiranih uzoraka pipetira se 10 µL uzorka u 90 µL PBS-a te se radi serija razrjeđenja (do -7). Priprema i naciepljivanje uzoraka vrši se u laminaru (Klimaoprema). Pripremljena razrjeđenja naciepljuju se u triplikatu na odgovarajuće hranjive podloge na način da se pipetira 10 µL uzorka na hranjivu podlogu te se naciepljeni uzorak štapićem po Drygalskom razmaže kružnim pokretima po ploči. Naciepljene ploče inkubiraju se kroz 24 h. Za svako razrjeđenje određuje se srednja vrijednost naciepljenih ploča u triplikatu, a ukupni broj izražava se kao logaritam broja stanica ($\log_{10}$ CFU/mL). U proračun se uzimaju u obzir naciepljene hranjive ploče koje imaju broj poraslih kolonija između 10 i 300.

Formula za izračun broja stanica:

$$CFU = \frac{\text{broj poraslih kolonija}}{\text{upotrebljeni volumen uzorka}} \times \text{recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja} \quad /2/$$

3.2.6. Obrada podataka

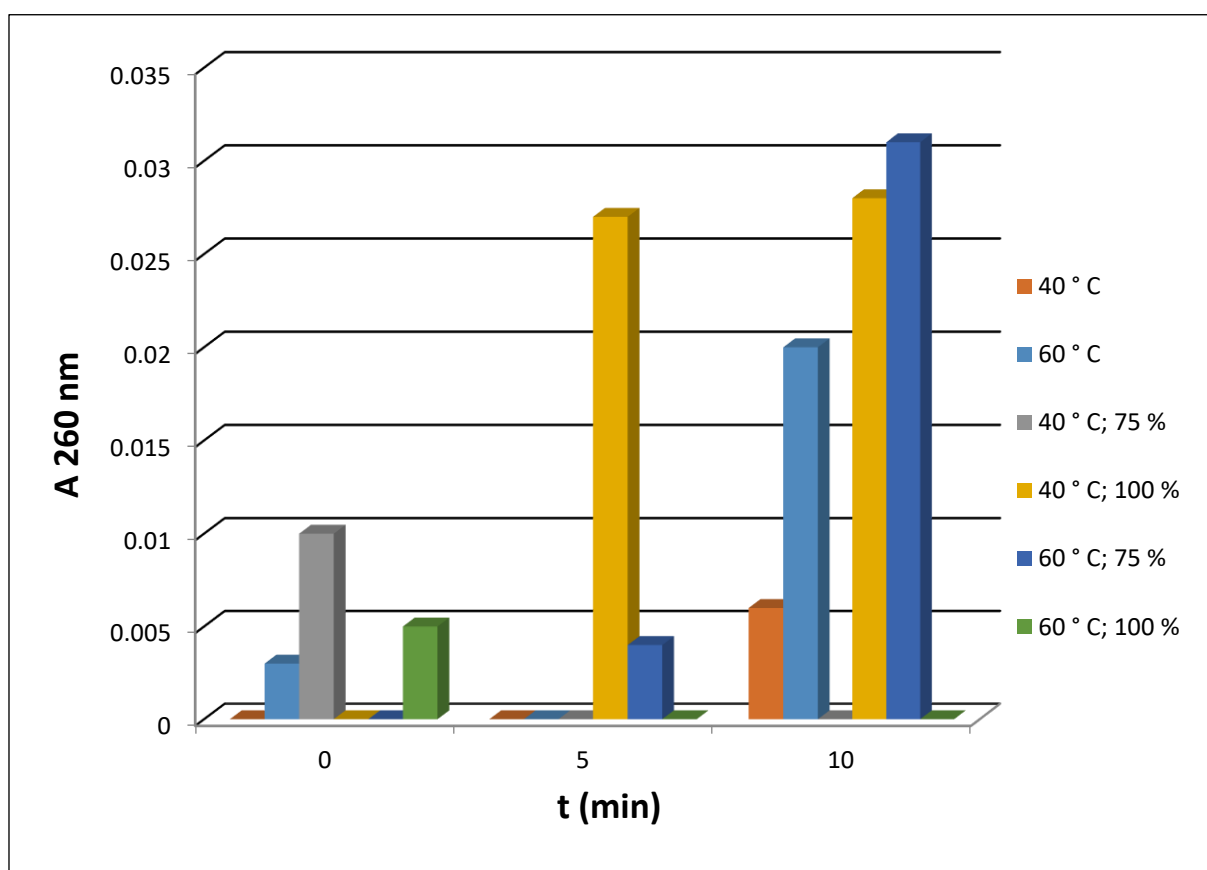
Kako bi se odredio utjecaj raznih parametara na učinkovitost tretmana korišten je centralni složeni dizajn (central composite design, CCD; STATGRAPHICS Centurion, StatPoint 16 Technologies). Kao operativni parametri odabrani su vrijeme tretmana, temperatura uzorka i amplituda. Provedena je analiza varijance (ANOVA) kako bi se mogla utvrditi odstupanja ($p < 0.05$) u provedenim tretmanima. Izlazne vrijednosti su $\log_{10}$ CFU/mL, oporavak stanica ($\log_{10}$ CFU/mL), apsorbancija pri 260nm i 280 nm. Točnost kvadratnog empirijskog modela provjerena je analizom varijance (ANOVA) sa razinom pouzdanosti od 95 %.

4. REZULTATI I RASPRAVA

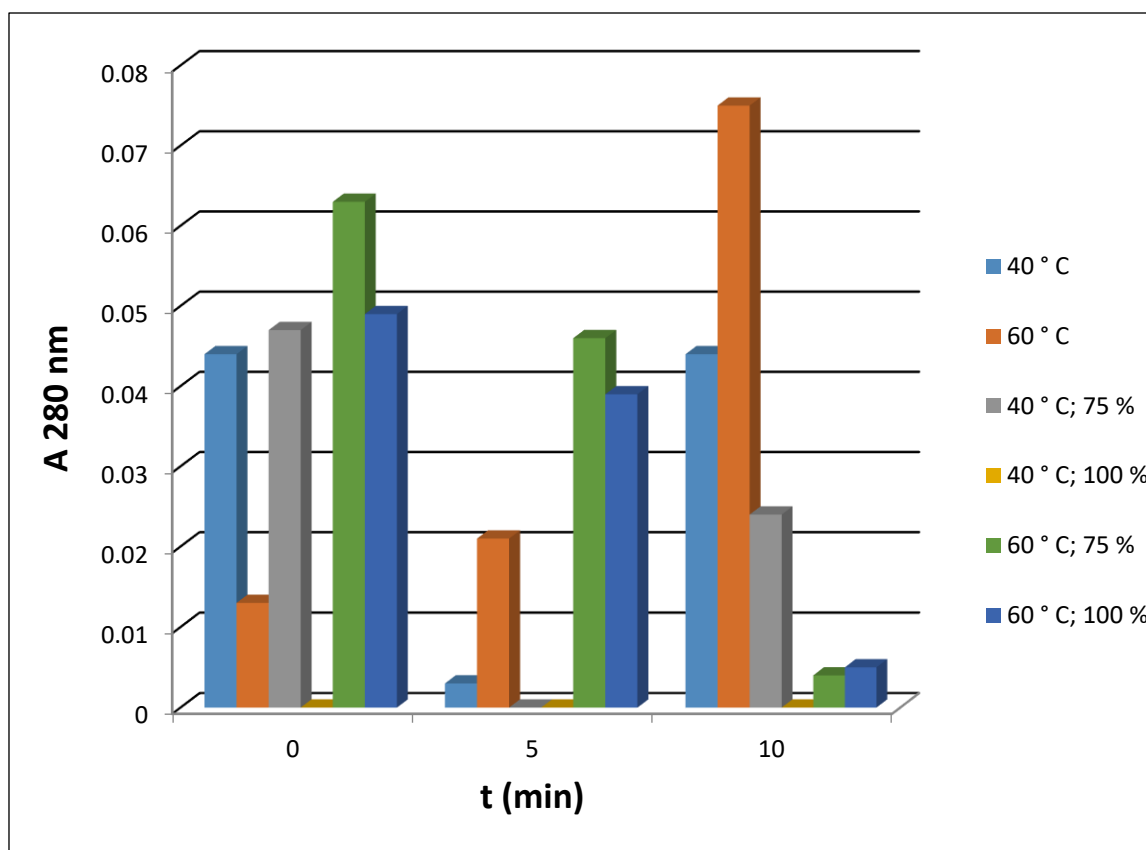
U ovom završnom radu ispitivan je utjecaj ultrazvuka na inaktivaciju i oporavak bakterijske kulture *Listeria innocua*. Uzorci su tretirani pri temperaturama 40°C i 60°C, 75% i 100% amplitudama u vremenu od 5 i 10 min. Utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na bakteriju *L. innocua* određen je preko promjene stresnih parametara. Određivani su stresni parametri: stupanj redukcije i oporavka te istjecanje unutarstaničnog sadržaja (mjerenje apsorbancije pri 260nm (DNA) i 280nm (proteini). Također je određena provodljivost te promjena pH vrijednosti prije i nakon ultrazvučnog tretmana.

4.1. Utjecaj ultrazvuka na stanično istjecanje

Utjecaj ultrazvučnog tretiranja na istjecanje unutarstaničnog sadržaja određivan je spektrofotometrijski pri 260nm (DNA) i 280nm (proteini). Rezultati su prikazani na slikama 4 i 5.



Slika 2: Graf ovisnosti apsorbancije (260 nm) o vremenu tretiranja pri određenoj temperaturi i amplitudi

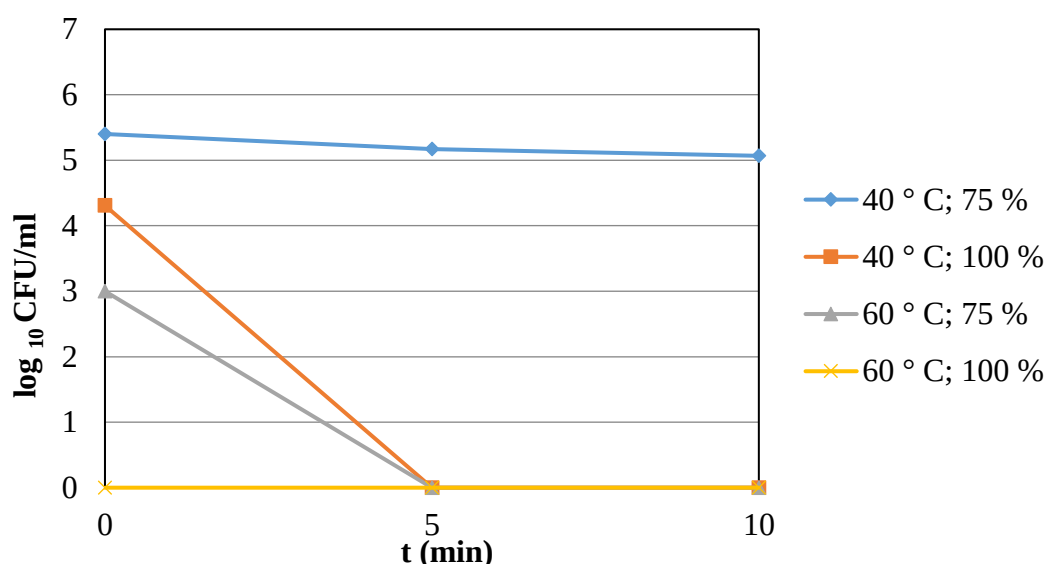


Slika 5: Graf ovisnosti apsorbancije (280 nm) o vremenu tretiranja pri određenoj temperaturi i amplitudi

Iz dobivenih rezultata vidimo da je najveća apsorbancija na 260 nm bila pri 60°C tijekom 10 min tretmana ultrazvukom, 75% amplitudom te iznosi 0.031, dok je pri istim uvjetima, ali tijekom 5 min tretmana apsorbancija manja za 0.027. Također stanično istjecanje pri temperaturi 40°C i 100% amplitudi prilikom 10 min tretmana je za 0.001 veće nego li kod 5 min tretmana. Veće istjecanje postignuto je i prilikom 10 min tretmana na 60°C i 75% amplitudi nego li pri 40°C i 100% amplitudi budući da se apsorbancija razlikuje za 0.003. Što se tiče apsorbancije na 280 nm najviša je pri 60°C te ukoliko usporedimo apsorbacije DNA molekula (260nm) te proteina (260nm) vidimo da je pri 60°C došlo do potpunog narušavanja stanica.

4.2. Utjecaj ultrazvuka na inaktivaciju

Stupanj redukcije bakterijske kulture *L. innocua* prikazan je na slici 6 kao ovisnost $\log_{10}$ CFU/mL o vremenu tretiranja (min).

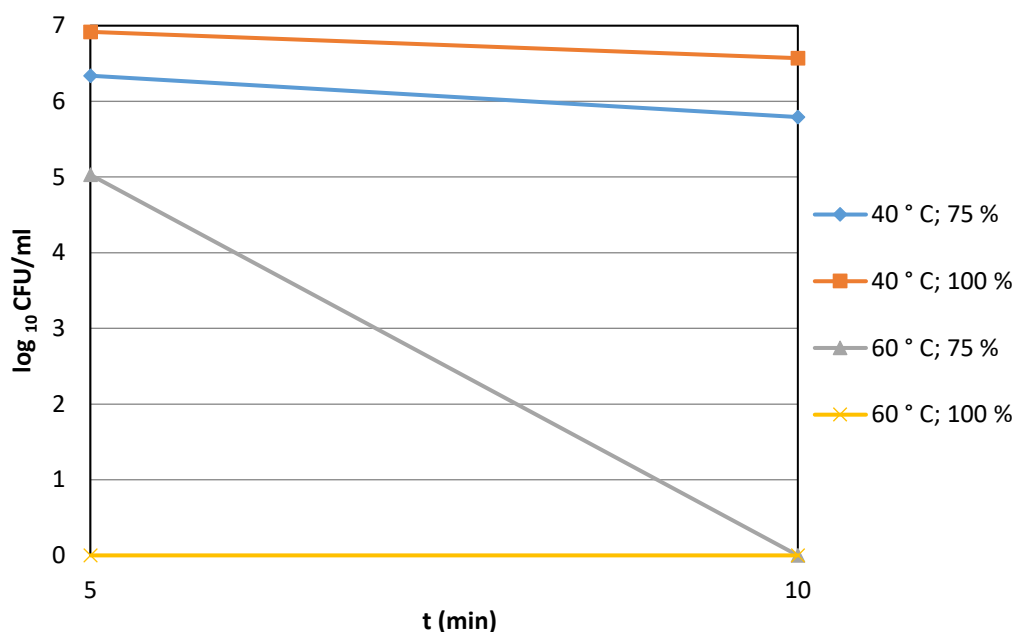


Slika 6: Graf ovisnosti logaritma broja stanica o vremenu tretiranja pri određenoj temperaturi i amplitudi.

Prilikom ultrazvučnog tretmana bakterijske kulture *L. innocua* do najmanje redukcije broja stanica došlo je prilikom tretmana pri 40°C i 75% amplitudi koja je nakon 5 min iznosila 0,23 $\log_{10}$ CFU/mL, a nakon 10 min 0,33 $\log_{10}$ CFU/mL, dok je pri istoj temperaturi, ali 100% amplitudi već nakon 5 minuta došlo do potpune redukcije te je iznosila 4,309 $\log_{10}$ CFU/mL i to je ujedno najviša ultrazvučna inaktivacija mikroorganizama. Dakle, produljenjem vremena tretmana i povišenjem amplitude dolazi do veće stope redukcije bakterijske kulture. Ultrazvučni tretman pri 60°C i 75% amplitudi nakon 5 min rezultirao je potpunom inaktivacijom mikroorganizama, a stopa redukcije je iznosila 3 $\log_{10}$ CFU/mL, dok je kod 100% amplitude pri 60°C na početku došlo do temperaturne inaktivacije bakterijske kulture.

4.3. Utjecaj ultrazvuka na revitalizaciju

Stupanj revitalizacije bakterije *L. innocua* prikazan je na slici 7 kao ovisnost $\log_{10}$ CFU/mL o vremenu tretiranja (min).



Slika 7: Graf ovisnosti logaritma broja stanica o vremenu tretiranja pri određenoj temperaturi i amplitudi

Ukoliko stanice podvrgnemo dovoljno stresnim uvjetima doći će do potpunog istjecanja staničnog sadržaja tj. do apoptoze stanica, one takve uvjete ne mogu preživjeti te možemo reći da je došlo do potpune inaktivacije stanica čiji je dokaz revitalizacija stanica do koje pri potpunoj inaktivaciji ne dolazi. Iz rezultata eksperimentalnog dijela rada vidimo da do oporavka bakterijske kulture *L. innocua* ne dolazi kada ju zagrijemo na 60°C i tretiramo 100% amplitudom. Također do potpune inaktivacije je došlo i pri 60°C nakon 10 min ultrazvučnog tretiranja 75% amplitudom. No, nakon 5 min tretmana 75% amplitudom pri 40°C bakterijska kultura porasla je sa 5,17 $\log_{10}$ CFU/mL na 6,34 $\log_{10}$ CFU/mL. Također pri 40°C i 100% amplitudi nakon 5min tretmana bakterijska kultura porasla je sa 0 $\log_{10}$ CFU/mL na 6,918 $\log_{10}$ CFU/mL, dok je nakon 10min tretmana sa 0 $\log_{10}$ CFU/mL porasla na 6,57 $\log_{10}$ CFU/mL te možemo zaključiti da je u oba slučaja došlo do potpunog oporavka bakterijske kulture.

4.4. Utjecaj ultrazvuka na pH i provodljivost

Tablica 1: Rezultati mjerenja pH i provodnosti prije i nakon tretmana

Vrijeme (min)	Temperatura (°C)	pH	σ ($\mu\text{S/cm}$)
0	40°C	6.90	384
0	60°C	6.79	503
10	40°C	6.64	490
10	60°C	6.70	1000

Iz navedenih rezultata vidimo da je prije ultrazvučnog tretmana pri 40°C vrijednost pH bila 6.90, a provodljivosti 384 $\mu\text{S/cm}$, dok je nakon tretmana pH iznosio 6.64, a provodljivost 490 $\mu\text{S/cm}$. Vrijednosti pH i provodljivosti prije tretmana pri 60°C iznosile su 6.79 te 503 $\mu\text{S/cm}$, a nakon tretmana 6.70 i 1000 $\mu\text{S/cm}$. Dakle, vrijednost pH se nakon ultrazvučnog tretmana smanjuje, a provodljivost povećava. Također povišenjem temperature pH se smanjuje, a provodljivost povećava. Razlog tomu jest povećan broj nabijenih čestica koje se stvaraju prilikom ultrazvučne kavitacije.

4.5. Statistička obrada podataka

4.5.1. Rezultati statističke obrade za inaktivaciju

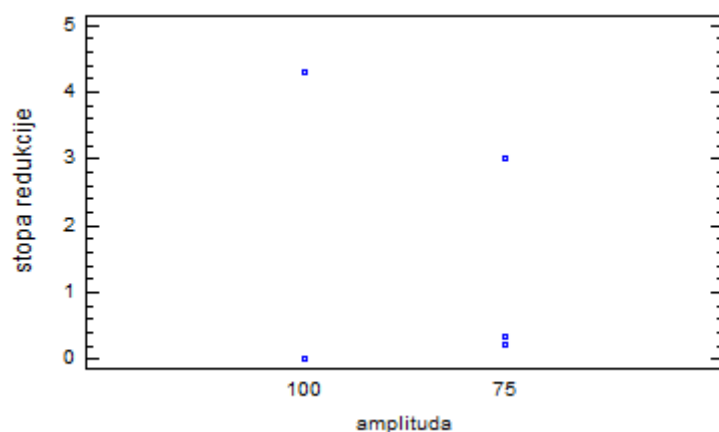
Tablica 2: Statistička značajnost varijabli za inaktivaciju

Izvor	Zbroj kvadrata	Df	Srednja vrijednost kvadrata	F-Omjer	P-Vrijednost
GLAVNI UČINCI					
A:amplituda	0,526736	1	0,526736	404,42	0,0316
B:vrijeme tretmana	0,00130244	1	0,00130244	1,00	0,5000
C:temperatura	1,26523	1	1,26523	971,43	0,0204
INTERAKCIJE					
AB	0,00130244	1	0,00130244	1,00	0,5000
AC	24,6851	1	24,6851	18952,91	0,0046
BC	0,00130244	1	0,00130244	1,00	0,5000
OSTATAK	0,00130244	1	0,00130244		
UKUPNO (ISPRAVLJENO)	26,4822	7			

AB= utjecaj amplitude i vremena tretmana

AC= utjecaj amplitude i temperature

BC= utjecaj vremena tretmana i temperature



Slika 8: Statistička značajnost varijabli za inaktivaciju

Parametri koji imaju p-vrijednost manju od 0.05 imaju značajan statistički utjecaj. Stoga prema tablici 2 vidimo da značajan statistički utjecaj na inaktivaciju ima kombinacija amplitude i temperature.

4.5.2. Rezultati statističke obrade za istjecanje staničnog sadržaja (A260nm)

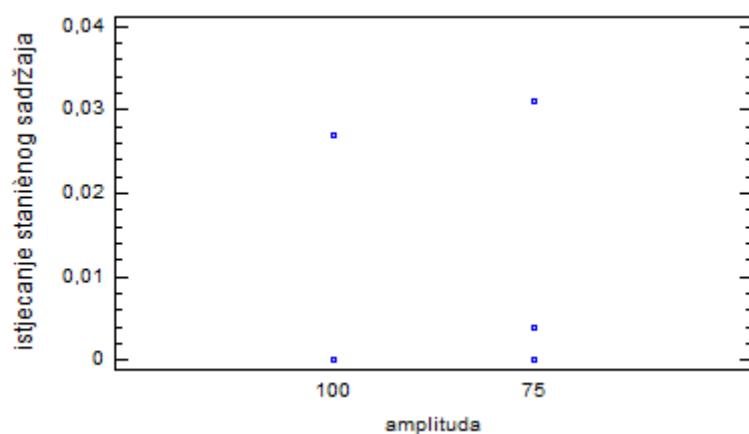
Tablica 3: Statistička značajnost varijabli za istjecanje staničnog sadržaja

Izvor	Zbroj kvadrata	Df	Srednja vrijednost kvadrata	F-Omjer	P-Vrijednost
GLAVNI UČINCI					
A:amplituda	0,000008	1	0,000008	*****	0,0000
B:vrijeme tretmana	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
C:temperatura	0,000008	1	0,000008	*****	0,0000
INTERAKCIJE					
AB	0,0003645	1	0,0003645	*****	0,0000
AC	0,0004805	1	0,0004805	*****	0,0000
BC	0,0003645	1	0,0003645	*****	0,0000
OSTATAK	0,0	1	0,0		
UKUPNO (ISPRAVLJENO)	0,0012255	7			

AB= utjecaj amplitude i vremena tretmana

AC= utjecaj amplitude i temperature

BC= utjecaj vremena tretmana i temperature



Slika 9: Statistička značajnost varijabli za istjecanje staničnog sadržaja

Prema slici 9 i tablici 3 vidimo da statistički značajan utjecaj na istjecanje staničnog sadržaja ima kombinacija amplitude i vremena tretmana, amplitude i temperature te vremena tretmana i temperature.

4.5.3. Rezultati statističke obrade za istjecanje staničnog sadržaja (A280nm)

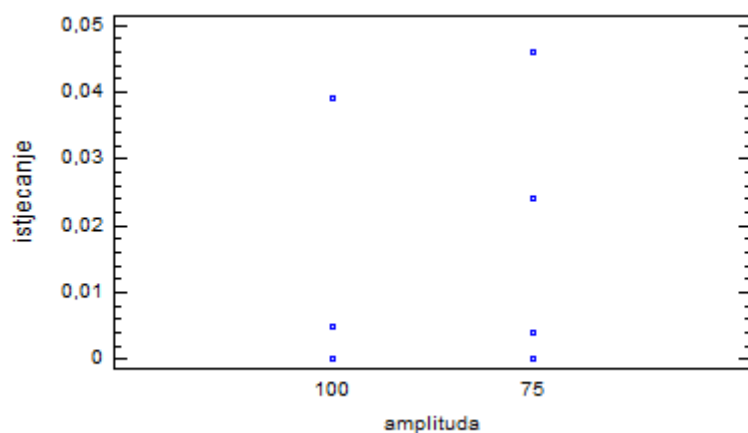
Tablica 4: Statistička značajnost varijabli za istjecanje staničnog sadržaja (A280nm)

Izvor	Zbroj kvadrata	Df	Srednja vrijednost kvadrata	F-Omjer	P-Vrijednost
GLAVNI UČINCI					
A:amplituda	0,0001125	1	0,0001125	0,88	0,5205
B:vrijeme tretmana	0,000338	1	0,000338	2,64	0,3512
C:temperatura	0,0006125	1	0,0006125	4,79	0,2730
INTERAKCIJE					
AB	0,000032	1	0,000032	0,25	0,7048
AC	0,0000405	1	0,0000405	0,32	0,6738
BC	0,00125	1	0,00125	9,77	0,1972
OSTATAK	0,000128	1	0,000128		
UKUPNO (ISPRAVLJENO)	0,0025135	7			

AB= utjecaj amplitude i vremena tretmana

AC= utjecaj amplitude i temperature

BC= utjecaj vremena tretmana i temperature



Slika 10: Statistička značajnost varijabli za istjecanje staničnog sadržaja

Iz navedenih rezultata vidimo da statistički značajan utjecaj na istjecanje staničnog sadržaja nema niti jedna varijabla od gore navedenih.

4.5.4. Rezultati statističke obrade za revitalizaciju stanica

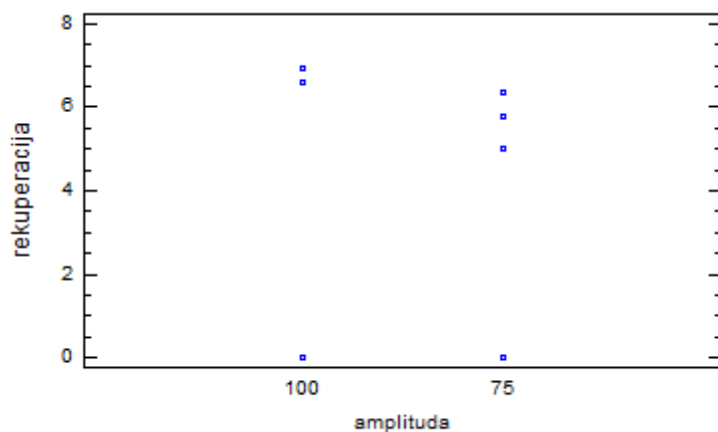
Tablica 5: Statistička značajnost varijabli za revitalizaciju stanica

Izvor	Zbroj kvadrata	Df	Srednja vrijednost kvadrata	F-Omjer	P-Vrijednost
GLAVNI UČINCI					
A:amplituda	1,68501	1	1,68501	0,58	0,5863
B:vrijeme tretmana	4,38534	1	4,38534	1,50	0,4356
C:temperatura	52,9944	1	52,9944	18,17	0,1467
INTERAKCIJE					
AB	3,41628	1	3,41628	1,17	0,4749
AC	5,0996	1	5,0996	1,75	0,4122
BC	2,138	1	2,138	0,73	0,5493
OSTATAK	2,91724	1	2,91724		
UKUPNO (ISPRAVLJENO)	72,6359	7			

AB= utjecaj amplitude i vremena tretmana

AC= utjecaj amplitude i temperature

BC= utjecaj vremena tretmana i temperature



Slika 11: Statistička značajnost varijabli za revitalizaciju stanica

Prema slici 11 i tablici 5 statistički značajan utjecaj na oporavak stanica nema ni jedna od gore navedenih varijabli.

4.5.5. Rezultati statističke obrade za pH vrijednost

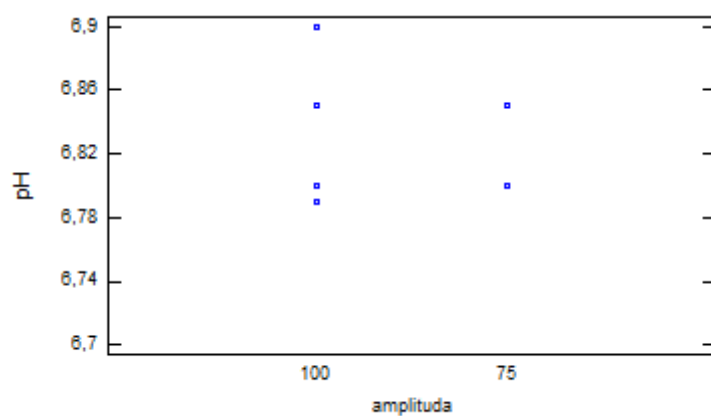
Tablica 6: Statistička značajnost varijabli za pH-vrijednost

Izvor	Zbroj kvadrata	Df	Srednja vrijednost kvadrata	F-Omjer	P-Vrijednost
GLAVNI UČINCI					
A:amplituda	0,0010125	1	0,0010125	81,00	0,0704
B:vrijeme tretmana	0,0000125	1	0,0000125	1,00	0,5000
C:temperatura	0,0015125	1	0,0015125	121,00	0,0577
INTERAKCIJE					
AB	0,0010125	1	0,0010125	81,00	0,0704
AC	0,0055125	1	0,0055125	441,00	0,0303
BC	0,0015125	1	0,0015125	121,00	0,0577
OSTATAK	0,0000125	1	0,0000125		
UKUPNO (ISPRAVLJENO)	0,0105875	7			

AB= utjecaj amplitude i vremena tretmana

AC= utjecaj amplitude i temperature

BC= utjecaj vremena tretmana i temperature



Slika 12: Statistička značajnost varijabli za pH-vrijednost

Prema tablici 6. i slici 12. statistički značajan utjecaj na pH-vrijednost ima kombinacija utjecaja amplitude i temperature. Ostale varijable nemaju značajan statistički utjecaj jer p-vrijednosti nisu manje od 0.05.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Niža redukcija mikroorganizama postiže se pri nižoj temperaturi, amplitudi te kraćem vremenu tretiranja, u našem slučaju najniža redukcija je bila pri 5min tretmanu, 75% amplitudi i 40°C te iznosi $0,23 \log_{10} \text{CFU/mL}$.
2. Najviša redukcija mikroorganizama kod ultrazvučno tretiranih uzoraka bila je pri 40°C, 100% amplitudi te iznosi $4,309 \log_{10} \text{CFU/mL}$.
3. Do oporavka bakterijske kulture došlo je pri 40°C, 75% i 100% amplitudi te pri 5min tretmanu, 75% amplitudom na 60°C.
4. Najbolji uvjeti za potpunu inaktivaciju bakterijske kulture su pri 60°C, 75% amplitudi, 10min tretmanu te pri 60°C i 100% amplitudi budući da pri tim uvjetima nije došlo do oporavka.
5. Vrijednost pH se smanjila nakon ultrazvučnog tretmana, a provodljivost se povećala. Na višoj temperaturi, zapažamo nižu pH vrijednost i veću provodljivost zbog većeg broja nabijenih čestica.

6. LITERATURA

1. Aleixo, P. C., Santos Junior, D., Tomazelli, A. C., Rufini, I. A., Berndt, H., and Krug, F. J. (2004). Cadmium and lead determination in foods by beam injection flame furnace atomic absorption spectrometry after ultrasound-assisted sample preparation. *Analytica Chimica Acta* **512**: 329–337
2. Arnim Henglein (1993). Contributions to various aspects of cavitation chemistry. *Advances in Sonochemistry*, 17-83.
3. Barbosa-Canovas, G.V., Tapia, M.S., Cano, M.P. (2005). *Novel Food Processing Technologies*, CRC Press, Boca Raton.
4. Bermúdez-Aguirre, D., Corradini, M.G., Mawson R., Barbosa-Cánovas, G.V. (2009) Modeling the inactivation of *Listeria innocua* in raw whole milk treated under thermo-sonication. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **10**: 172–178.
5. Bermúdez-Aguirre D., Tamara Mobbs, and Gustavo V. Barbosa-Cánovas (2011). Ultrasound Applications in Food Processing. U *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*. Hao Feng, Gustavo V. Barbosa-Cánovas, Jochen Weiss. Springer, 65-105.
6. Cuheval, A., Chow, R.C.Y. (2008) A study on the emulsification of oil by power ultrasound, *Ultrasonics Sonochemistry* **15**: 916-920.
7. De Castro L.M.D., Capote P.F. (2007) *Analytical applications of ultrasound*. Elsevier Science, Langford Lane, Oxford, Great Britain.
8. Gerald Harvey, Anthony Gachagan, Tapiwa Mutasa (2014). Review of High-Power Ultrasound—Industrial Applications and Measurement Methods. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* **61(3)**: 481-495
9. Gliot P., Content J. (2002) Specific Identification of *Listeria welshimeri* and *Listeria monocytogenes* by PCR Assays Targeting a Gene Encoding a Fibronectin-Binding Protein. *Journal of Clinical Microbiology* **40(2)**: 698-703
10. Kenth S. Suslick i Lawrence A. Crum (1988). Sonochemistry and sonoluminescence. *Handbook of acoustic* **23**: 243-255
11. Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., and Lee, D. (2004). Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science and Technology* **15**: 261–266
12. Lelas, V. (2006). Nove tehnike procesiranja hrane. *Mljekarstvo : časopis unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka* **56(4)**: 311-330. Preuzeto s <http://hrcak.srce.hr/8409>

13. Marina Bubonja, Darinka Vučković, Roberta Rubeša-Mihaljević, Maja Abram (2007). Činitelji bakterije i domaćina u patogenozi. *Medicina* **43**: 15-20
14. Mason, T. J., Paniwnyk, L., and Lorimer, J. P. (1996). The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry* **3**: 253–260.
15. Neis, U., Blume, T. (2003). Ultrasonic disinfection of wastewater effluents for high-quality on the function and structure of trypsin. *Ultrasonics Sonochemistry* **11**: 399–404
16. Povey, M. J. W., Mason, T. J. (1998): Ultrasound in Food Processing, Blackie Academic & Professional, London.
17. Raso, J., and Barbosa-Cánovas, G. V. (2003). Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **43(3)**: 265–285.
18. Sun, D. W., and Li, B. (2003). Microstructural change of potato tissues frozen by ultrasoundassisted immersion freezing. *Journal of Food Engineering* **57**: 337–345.
19. Thomas Leong, Muthupandian Ashokkumar and Sandra Kentish. The fundamentals of power ultrasound-a review (2011). *Acoustics Australia* **2**: 54-63.
20. Tian, Z. M., Wan, M. X., Wang, S. P., and Kang, J. Q. (2004). Effects of ultrasound and additives
21. Timothy Grant Leighton (2007). What is ultrasound?. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **93**: 3–83.
22. Timothy J. Mason, John Philip Lorimer (2002). Applied Sonochemistry: Uses of Power Ultrasound in Chemistry and Processing, Wiley-VCH, str.1-23.
23. Zbigniew J. Dolatowski, Joanna Stadnik, Dariusz Stasiak (2007). Application of ultrasound in food technology. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologies Alimentaire* **6(3)**: 89-99.

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.

Iva Šušić

ime i prezime studenta