



UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Mr Sanja V. Seratlić

UTICAJ PULSIRAJUĆIH ELEKTRIČNIH
POLJA NA RAST I AKTIVNOST
AUTOHTONOG SOJA
***Lactobacillus plantarum* 564**

(Doktorska disertacija)

Beograd, 2013

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Mentor:

Prof. dr Branko Bugarski, redovni profesor
Tehnološko-metalurški fakultet
Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

Prof. dr Zorica Knežević-Jugović, van. prof.
Tehnološko-metalurški fakultet
Univerzitet u Beogradu

Doc. dr Maja Vukašinić, docent
Tehnološko-metalurški fakultet
Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Viktor Nedović, redovni profesor
Poljoprivredni fakultet
Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Zorica Radulović, van. prof.
Poljoprivredni fakultet
Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane doktorske disertacije: _____

Prvenstveno želim da izrazim veliku zahvalnost mentoru prof. dr Branku Bugarskom na velikoj podršci i pomoći oko realizacije, izrade i pisanja doktorske disertacije. Hvala vam puno profesore!

Neizmernu zahvalnost izražavam prof. dr. Zorici Radulović, koja je bila moja zvezda vodilja kroz pripremu i realizaciju istraživanja. Draga, beskrajno hvala! Bez tvoje sversrdne pomoći i podrške ovaj rad ne bi imao pravi tok.

Veliku zahvalnost želim da izrazim prof. dr Viktoru Nedoviću, koji mi je takođe pružio veliku podršku tokom pripreme i realizacije doktorskog rada. Hvala puno Viktoro!

Posebno sam zahvalna prof. dr Petru Dejmecku na originalnim idejama i korisnim savetima prilikom realizacije istraživanja na Univerzitetu u Lundu. Dear professor, thank you very much for all your support and guidance during the investigation!

Takođe se zahvaljujem prof. dr Federiku Gómez-Galindu na instrukcijama i pomoći prilikom izrade eksperimenta. Muchas gracias Federico!

Iskreno se zahvaljujem Peru Henriksson-u na omogućenoj realizaciji jednog dela eksperimenta. Tack så mycket, Pår!

Takođe se zahvaljujem Andersu Bomanu na nesebičnoj pomoći prilikom izrade eksperimenta. Tack så mycket, Anders!

Želim da se zahvalim Inger Lindvall na korisnim savetima tokom izrade eksperimenta. Dear Inger, thank you very much for sharing your impressive knowledge with me. Tack så mycket!

Zahvaljujem se prof. dr Larsu Wadsö na ustupanju svoje laboratorije za realizaciju jednog dela eksperimenta.

Zahvaljujem se članovima Komisije prof. dr Zorici Knežević Jugović i doc. dr Maji Vukašinović na korisnim sugestijama tokom pisanja ove doktorske disertacije.

Takođe se zahvaljujem prof. dr. Ed Van Niel-u na korisnim savetima i idejama tokom izrade eksperimenta. Thank you very much Ed!

Veliku zahvalnost iskazujem gospodinu Hugu Bragioni-u i gospođi Delfien Cloet na nesebičnoj podršci tokom mog boravka na Univerzitetu u Lundu, u Švedskoj. Dear Hugo and Delfien, thank you very much for your support!

Posebnu zahvalnost želim da izrazim Dušanki Paunović, dipl. hem. na moralnoj podršci i pozitivnoj energiji, koja mi je puno značila tokom rada.

U najtežim trenucima izrade ovog rada, reči podrške moje porodice pomogle su mi da istrajem i ovu disertaciju privedem kraju, te stoga neizmernu zahvalnost izražavam mojoj majci Mitri i ocu Vojislavu.

UTICAJ PULSIRAJUĆIH ELEKTRIČNIH POLJA NA RAST I AKTIVNOST AUTOHTONOG SOJA *Lactobacillus plantarum* 564

REZIME

Ponašanje preživjele populacije ćelija soja *Lb. plantarum* 564 zasejane u MRS bujonu nakon dejstva pulsirajućih električnih polja (PEP) različitog intenziteta, praćeno je putem izotermalne kalorimetrije, merenjem optičke gustine i ukupnog broja ćelija. Ćelije bakterija su tretirane monopolarnim pulsevima pravugaonog oblika različite jaćine i broja pulseva, što odgovara primenjenoj energiji od 1.3, 5.5, 12.2, 34.6, 65.8 and 658.1 J/cm³. Nakon PEP tretmana, bakterije su inokulisane u MRS bujon i inkubirane na 37°C u toku 24 sata.

Rezultati istraživanja su pokazali da su PEP tretmani energije ispod 13 J/cm³ imali pozitivan efekat na rast i aktivnost ćelija, naroćito tretmani niže energije (1.3-5.5 J/cm³). Prisustvo intracelulatnih jona i molekula u medijumu, koji pozitivno utiću na rast ćelija, bilo je posebno izraženo u mid-ekspencijalnoj fazi rasta, gde je generaciono vreme ćelija tretiranih pulsevima energije 5.5 J/cm³ bilo trostruko skraćeno. Step en odavanja toplote osloboćene tokom rasta ćelija takoće je bio viši, što ukazuje na porast metabolićke aktivnosti PEP tretiranih ćelija, ćija je acidifikaciona sposobnost takoće bila povećana. Pretpostavlja se da PEP tretmani niže intenziteta dovode do reverzibilne elektroporermeabilizacije ćelija, ćija je vijabilnost ostala nepromenjena nakon izlaganja pulsevima energije 12.2 J/cm³, što znaći da se ovi procesni parametri nalaze ispod kritiće vrednosti potrebne za inaktivaciju ispitivanih laktobacila.

Primena jaćih PEP tretmana energije 34.6, 65.1 and 658.1 J/cm³ je dovela do inaktivacije ćelija za oko 1, 2 i 3 log redukcije, respektivno. U zavisnosti od jaćine primenjenog tretmana, preživeli deo populacije *Lb. plantarum* 564 je nastavio da raste sa odrećenim zakašnjem, pri ćemu je nova populacija formirala istu gustinu u MRS bujonu kao i populacija netretiranih ćelija. Tretirane ćelije su pokazale brži step en rasta u kasnoj log-fazi, mada je trend rasta bio slićan kao kod netretiranih. Preživela subpopulacija ukazuje na prisustvo perzistera otpornih na dejstvo PEP tretmana. Takoće je ustanovljena i veća otpornost ćelija izloćenih pulsirajućim elektrićnim poljima energije iznad 30 J/cm³ na ponovno dejstvo istih PEP tretmana, nakon kojih

su ćelije uspostavile ponovan rast i razvoj. Osim toga, preživele ćelije su pokazale brži rast u kasnoj log-fazi, naročito nakon dejstva jačih PEP tretmana.

Ispitivanjem potencijalnih probiotskih osobina ćelija *Lb. plantarum* 564 ustanovljeno je da je nakon primenjenih PEP tretmana nova populacija pokazala veću otpornost na simulirane gastrointestinalne uslove, dok je rezistentnost na antibiotike bila selektivna, kao i antimikrobna aktivnost, u poređenju sa netretiranom populacijom.

Ključne reči: laktobacili, pulsirajuća električna polja, izotermalna kalorimetrija, perzisteri, oporavak od stresa, probiotska sposobnost

THE EFFECT OF PULSED ELECTRIC FIELDS ON GROWTH AND ACTIVITY OF AUTOCHTHONOUS STRAIN *Lactobacillus plantarum* 564

SUMMARY

The behaviour of a surviving population of lactic acid bacteria strain *Lactobacillus plantarum* 564 growing in MRS broth after pulsed electric field (PEF) treatments of different intensities was monitored by isothermal calorimetry, optical density and plate counts. Bacterial cells were treated with monopolar square pulses at varying nominal electric field strengths and number of pulses, corresponding to applied energies of 1.33, 5.5, 12.2, 34.6, 65.8 and 658.1 J/cm³. After PEF treatments, samples were inoculated into MRS broth and incubated at 37°C for 24 hours.

The presented results show that the PEF treatments with energy input below 13 J/cm³ had a positive effect on bacterial growth and cell activity, especially the treatments with the lower field intensities (1.3 – 5.5 J/cm³). The presence of intracellular ions and molecules in media that facilitates the growth of electroporated lactobacilli was particularly evident in mid-exponential growth phase, where the doubling time was reduced for more than 3 times after the exposure to electric pulses of 5.5 J/cm³. The heat production rate released during the growth of electroporated cells was also higher, indicating the enhanced metabolic activity of PEF treated cells. Also, the electroporated cells had better acidification ability than the untreated cells. It is assumed that the applied PEF treatments with an energy input of below 13 J/cm³ potentially induce reversible electroporation of the cell membrane, which has a positive impact on the cell growth. The viability of cells remained unaffected by pulse energy of 12.2 J/cm³, which means that such treatment conditions remained below the critical field strength for the inactivation of treated lactobacilli.

The PEF treatments with higher energy of 34.6, 65.1 and 658.1 J/cm³ induced cell inactivation of approx. 1, 2 and 3 log reduction, respectively. After the application of pulses to a population of *Lb. plantarum* 564, the survived bacterial cells resume growth after a treatment-dependent delay. A new population density is obtained at the same final level as the original culture. Both the untreated and treated culture had similar growth rates, but the latter showed a higher growth rate during the late-growth phase. Evidence of bacterial persistence is shown on the survived population of bacteria subjected to PEF treatment. The treated bacterial cells were less sensitive to

further PEF application, showing that this subpopulation was less sensitive to PEF treatment and could grow again. Moreover, the surviving population showed a higher growth rate during the late-growth phase, especially when the intensity of the applied electric field was increased.

The investigation of potential probiotic ability of PEF treated *Lb. plantarum* 564 cells indicates that the new population also showed higher resistance to simulated gastrointestinal conditions, while the resistance to antibiotics was selective, as well as the antimicrobial activity, comparing to the untreated population.

Key words: lactobacilli, pulsed electric fields, isothermal calorimetry, persists, stress recovery, probiotic ability

SADRŽAJ

REZIME.....	3
SUMMARY.....	5
1. UVOD.....	10
2. PREGLED LITERATURE.....	13
2.1. Bakterije mlečne kiseline.....	13
2.1.1. Rast mikroorganizama.....	14
2.1.2. Enzimska aktivnost bakterija mlečne kiseline.....	17
2.1.2.1. Metabolizam ugljenih hidrata.....	18
2.1.2.2. Proteolitički enzimi BMK.....	21
2.1.2.3. Lipolitički enzimi BMK.....	24
2.1.3. Autoliza ćelija BMK.....	25
2.1.3.1. Faktori koji utiču na autolizu ćelija BMK.....	32
2.1.4. Atenuacija ćelija BMK.....	34
2.2. Rezistentnost mikroorganizama na indukovani stres.....	37
2.2.1. Perzisteri kao odgovor ćelije na stres.....	38
2.3. Probiotska svojstva BMK.....	40
2.4. Pulsirajuća električna polja (PEP) kao tehnika atenuacije BMK.....	43
2.4.1. Faktori koji utiču na inaktivaciju mikroorganizama primenom PEP.....	45
2.4.1.1. Procesni faktori.....	45
2.4.1.1.1. Intenzitet (jačina) električnog polja.....	45
2.4.1.1.2. Vreme tretmana i frekvencija.....	46
2.4.1.1.3. Temperatura.....	48
2.4.1.1.4. Polaritet pulsa.....	50
2.4.1.1.5. Oblik pulseva.....	50
2.4.1.2. Faktori medijuma.....	53
2.4.1.2.1. pH i jonska snaga.....	54
2.4.1.2.2. Električna provodljivost.....	55
2.4.1.3. Mikrobiološki faktori.....	56
2.4.1.3.1. Tip mikroorganizama.....	56
2.4.1.3.2. Stadijum rasta mikroorganizama.....	56
2.4.1.3.3. Broj mikroorganizama.....	57
2.4.2. Permeabilizacija ćelijske membrane pod dejstvom PEP.....	57
2.4.2.1. Formiranje pora.....	65
3. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	69
4. MATERIJAL I METODE RADA.....	71
4.1. Priprema kulture BMK.....	71
4.2. Određivanje ukupnog broja ćelija laktobacila.....	71
4.3. Određivanje optičke gustine.....	72
4.4. Merenje pH i titracione kiselosti.....	72

4.5. Acidogena aktivnost.....	72
4.6. Sposobnost rasta nakon tretiranja povišenim temperaturama.....	73
4.7. Tretman pulsirajućim električnim poljima.....	73
4.8. Analize primenom izotermalne kalorimetrije.....	75
4.9. Određivanje stepena preživljavanja u gastrointestinalnim uslovima.....	76
4.9.1. Preživljavanje u uslovima želuca (<i>Gastro test</i>)	76
4.9.2. Preživljavanje u duodenalnim uslovima.....	76
4.10. Ispitivanje tolerantnosti na antibiotike.....	77
4.11. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti.....	77
4.12. Statistička obrada podataka.....	77
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	79
5.1. Dinamika rasta soja <i>Lb. plantarum</i> 564.....	79
5.2. Acidogena aktivnost soja <i>Lb. plantarum</i> 564.....	80
5.3. Sposobnost rasta nakon tretiranja povišenim temperaturama.....	82
5.4. Tretiranje ćelija <i>Lb. plantarum</i> 564 različitim PEP tretmanima.....	85
5.4.1. <i>Primena PEP tretmana energije < 13 J/cm³</i>	85
5.4.2. <i>Primena PEP tretmana energije > 30 J/cm³</i>	87
5.5. Metabolička aktivnost PEP tretiranih ćelija <i>Lb. plantarum</i> 564.....	91
5.6. Acidifikaciona sposobnost PEP tretiranih ćelija <i>Lb. plantarum</i> 564.....	94
5.7. Ispitivanje potencijalnih probiotskih kriterijuma PEP tretiranih ćelija <i>Lb. plantarum</i> 564.....	97
5.7.1. <i>Preživljavanje PEP tretiranih i re-tretiranih ćelija u GI uslovima</i>	97
5.7.2. <i>Rezistentnost na antibiotike</i>	98
5.7.3. <i>Antimikrobna aktivnost</i>	99
6. DISKUSIJA.....	100
6.1. Rast soja <i>Lb. plantarum</i> 564.....	100
6.2. Acidogena aktivnost soja <i>Lb. plantarum</i> 564.....	102
6.3. Rast ćelija nakon tretiranja povišenim temperaturama.....	104
6.4. Tretman pulsirajućim električnim poljima.....	106
6.4.1. <i>Efekat PEP tretmana energije < 13 J/cm³</i>	107
6.4.2. <i>Efekat PEP tretmana energije > 30 J/cm³</i>	111
6.4.2.1. <i>Preživjele ćelije nastavljaju sa rastom nakon PEP tretmana</i>	111
6.4.2.2. <i>Preživjela populacija PEP tretiranih laktobacila pokazuje veću otpornost na ponovne PEP tretmane</i>	118
6.5. Acidifikaciona sposobnost PEP tretiranih ćelija.....	120
6.6. Potencijalna probiotska sposobnost PEP tretiranih ćelija.....	123
6.6.1. <i>Sposobnost preživljavanja u GI uslovima</i>	123
6.6.2. <i>Rezistentnost na antibiotike</i>	125
6.6.3. <i>Antimikrobna aktivnost</i>	126

7. ZPAŽANJA I ZAKLJUČCI.....	128
8. LITERATURA.....	133
PRILOG.....	148
BIOGRAFIJA AUTORA.....	150
IZJAVA O AUTORSTVU.....	151
IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I GOTOVE VERZIJE RADA.....	152
IZJAVA O KORIŠĆENJU.....	153

1. UVOD

Mnoge tehnike su korišćene za stresiranje ćelija bakterija u cilju izmene strukture ćelijske membrane i formiranja permeabilne strukture peptidoglukana, čime će se s jedne strane usporiti rast ćelija i produkcija mlečne kiseline, a s druge strane povećati stepen oslobađanja enzima u medij. Time se ubrzava proces zrenja sireva i fermentisanih prehrambenih proizvoda, a utiče se i na teksturu i aromu gotovog proizvoda. S obzirom na to da ćelija može biti oslabljena primenom fizičkih ili hemijskih agenasa, najčešće primenjivane tehnike su termički tretmani, tretiranje niskim temperaturama, lizozimom, tretiranje raznim rastvaračima, kao i atenuacija ćelija putem elektroporacije, koja nastaje primenom pulsirajućih električnih polja.

Pulsirajuća električna polja (PEP) predstavljaju intenzivne električne pulseve, koji se mogu primeniti u cilju inaktivacije mikroorganizama u tečnim prehrambenim proizvodima, koji su tretirani u kontinualnom protoku. Dosadašnja saznanja ukazuju da procesuiranjem hrane pulsirajućim električnim poljima dolazi do netermičke elektroplazmolize ćelijskog materijala, što rezultira povećanoj permeabilnosti ćelijske membrane. Međutim, u zavisnosti od primenjenog PEP tretmana, taj proces može biti reverzibilan i ireverzibilan. Ukoliko se primeni takav PEP tretman koji izaziva reverzibilnu permeabilizaciju ćelijske membrane, tada ćelije bakterija bivaju samo stresirane, dok ireverzibilan proces dovodi do liziranja i izumiranja ćelija. U dosadašnjim istraživanjima, upotreba PEP tretmana se bazirala na inaktivaciji patogenih mikroorganizama u cilju konzervisanja hrane, dok je svetska literatura vrlo ograničena podacima na temu primene pulsirajućih električnih polja radi stresiranja bakterija mlečne kiseline.

Pulsirajuća električna polja visokog intenziteta upotrebljena sa ciljem inaktivacije mikroorganizama putem ireverzibilne elektroporacije, našla su primenu u proizvodnji različitih tečnih prehrambenih proizvoda, kao što su mleko i voćni sokovi, čiji je rok trajanja drastično povećan u poređenju sa netretiranim proizvodima (Heinz i sar., 2002; Pagan i sar., 2005; Wan i sar., 2009).

U poslednjih deset godina, veliki broj istraživanja je vođen radi razvoja efikasnosti PEP tretmana u cilju inaktivacije mikroorganizama. Tako je postignut visok stepen inaktivacije određenih sojeva *Escherichia coli* (od 2 do 5- \log_{10} jedinica) i *Lactobacillus plantarum* (od 2 do 4 \log_{10} jedinice), čiji intenzitet se razlikovao u

zavisnosti od soja, medijuma i primenjenog PEP tretmana (Ulmer i sar., 2002; Gurtler i sar., 2010; Cortese i sar., 2011). Ipak, vrlo malo se zna o sposobnosti rasta i razvoja populacije koja je preživela date tretmane.

Naime, kada su ćelije bakterija izložene PEP tretmanu dovoljne jačine, veći deo populacije biva inaktivisan. Ipak, nakon prestanka dejstva tretmana, mali deo preživela populacije može da nastavi da raste i formira nove kolonije. Stoga, u cilju obezbeđenja zdravstveno bezbedne hrane, potrebno je poznavati mehanizme dejstva inaktivacije mikroorganizama, kao i ponašanje preživela populacije, koja može da se oporavi nakon sub-letalne povrede, kao što je stres indukovano dejstvom PEP tretmana.

Postoji veliki stepen variranja u odgovoru bakterija na stres, čak i kada je u pitanju genetički identična populacija koja raste u homogenoj sredini (Booth i sar., 2002). Postojanje heterogenosti bakterija u odgovoru na stres od velikog je značaja u primeni tretmana čiji je cilj inaktivacija mikroorganizama i predstavlja značajan kriterijum određivanja najoptimalnijih uslova svakog tretmana (Ingham i sar., 2008). Stoga, identifikacija subpopulacije kao što su „perzisteri”, koji ne poseduju genetski stečenu otpornost na određeni tretman (Balaban i sar., 2004; Ingham i sar., 2008) i poznavanje njihove senzitivnosti na stres su veoma važni parametri za procenu efekta određenog PEP tretmana.

U ovom radu biće ispitivan efekat različitih PEP tretmana na rast i aktivnost soja *Lb. plantarum* 564, izolovanog iz autohtonog Sjeničkog sira. Ponašanje preživela populacije nakon primene PEP tretmana različitog intenziteta električnog polja biće praćeno putem izotermalne kalorimetrije, koja se kao metoda koristi za merenje odavanja toplote prilikom rasta mikroorganizama u toku fermentacije određenih prehrambenih proizvoda, sa ciljem određivanja efekta određenih tretmana (npr. termičkog tretmana) i antimikrobnih agenasa (Selma i sar., 2007; Wadsö i Gómez Galindo, 2009). Stepenu odavanja toplote meren na kalorimetru predstavlja kriterijum stepena metaboličkih funkcija i direktno zavisi od metaboličkog odgovora ćelije (Criddle i sar., 1991).

Kombinovanje kalorimetrijskog merenja stepena odavanja toplote tokom rasta i razmnožavanja bakterija sa određivanjem ukupnog broja kolonija, kao i praćenje acidogene aktivnosti u toku inkubacije inokulisanog bujona, predstavlja jedan od

načina ispitivanja ponašanja populacije autohtonog soja *Lb. plantarum* 564 nakon primene različitih PEP tretmana.

Kako u savremenom društvu postoji sve veće interesovanje za primenu probiotika u prehrambenim proizvodima, mnoga istraživanja su pokazala da se među autohtonim sojevima *Lactobacillus plantarum* nalaze i oni sa probiotskim karakteristikama (Radulović i sar., 2011). Stoga će u ovom radu biti ispitani i probiotski kriterijumi soja *Lb. plantarum* 564, kako bi se odredilo da li ispitivani soj spada u potencijalne probiotike. PEP tretirane bakterije će takođe biti testirane na osnovna probiotska svojstva, sa ciljem ispitivanja dejstva određenih tretmana na otpornost i mogućnost poboljšanja određenih probiotskih karakteristika tretiranih ćelija.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Bakterije mlečne kiseline

Bakterije mliječne kiseline (BMK) obuhvataju heterogenu grupu asporogenih gram-pozitivnih koka i bacila, koje vrše fermentaciju šećera formirajući mlečnu kiselinu. Ove fakultativno anaerobne ili mikroaerofilne bakterije su široko rasprostranjene u prirodi, nalaze se u namirnicama (mlečnim proizvodima, mesnim prerađevinama, povrću, žitaricama), a prisutne su i u ustima i intestinalnom traktu čoveka i životinja. Široko se primenjuju u prehrambenoj industriji kao starter kulture, a pojedini sojevi, koji poseduju probiotske sposobnosti, koriste se kao živi mikroorganizmi u prehrambenim proizvodima. BMK poseduju jaku antimikrobnu aktivnost, a sposobnost pojedinih sojeva da proizvode bakteriocine svrstava ove bakterije u jedan od najperspektivnijih prirodnih prehrambenih konzervanasa. Primena ovih bakterija može biti od značaja i u biomedicini zbog inhibitornog dejstva na širok spektar mikroorganizama koji učestvuju u kvarenju namirnica, kao i patogenih mikroorganizama (Atanassova i sar., 2001).

U proizvodnji sireva, BMK imaju važnu ulogu u biohemijskim procesima koji se odvijaju tokom izrade i zrenja sireva, a često su odgovorne za karakteristike ukusa, mirisa, izgleda i teksture, jedinstvene za određenu vrstu sira (Beresford, 2003).

U zrenju sireva učestvuje veliki broj različitih bakterijskih vrsta, a dominantnu mikrofloru čine laktokoke kao starter kulture, čiji ukupan broj u prvom danu proizvodnje dostiže 10^9 cfu/ml. U toku perioda zrenja, broj startera se vremenom smanjuje, usled uticaja fizičko-hemijskih karakteristika medijuma (pH, aw, redoks potencijal, visoka koncentracija soli) i okoline (temperatura, vlažnost vazduha, itd.) (Choisy i sar., 1987). Stepen izumiranja ćelija startera zavisi od same vrste bakterija, ali tipičan broj živih ćelija startera opada za prosečno 1% od ukupnog broja u prvih mesec dana zrenja (McSweeney i sar., 1994). Autolizom i opadanjem broja startera, dolazi do porasta broja nestarterske mikroflora (Wilkinson i sar., 1994).

Nestarterske bakterije mlečne kiseline (NSBMK) predstavljaju mikrofloru sirovog mleka. Ovi termorezistentni mikroorganizmi, nakon što prežive pasterizaciju, učestvuju kao prateća mikroflora u zrenju sireva. Najveći broj studija je usmeren na mezofilne laktobacile, iako se među NSBMK mogu naći i pediokoke, enterokoke i

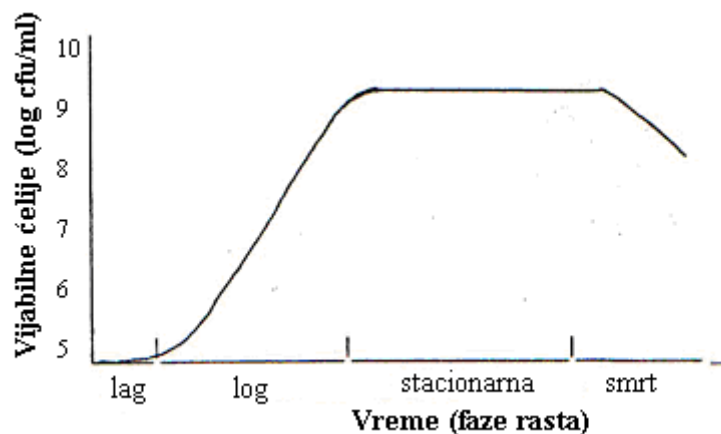
pripadnici leukonostok vrste, mada one ne proizvode značajne količine mlečne kiseline u prehrambenim proizvodima.

Iako proces pasterizacije značajno redukuje ukupan broj mikroorganizama u mleku, određeni broj mezofilnih laktobacila preživljava i nastavlja razvoj u sirevima, dostižući 10^6 – 10^8 cfu/ml u toku prvih 10 do 20 nedelja zrenja, pri čemu ostaju na nivou visoke koncentracije do kraja zrenja (Beresford, 2003; Casey i sar, 2006). U evropskim tradicionalnim sirevima, *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus* i *Lb. rhamnosus* su dominantne vrste mezofilne *Lactobacillus* flore, ali su i druge vrste prisutne u manjem broju (Beresford i sar., 2006; Crow i sar, 2001; Gobbetti i sar., 1999; Mannu i sar, 2000; Williams i Banks, 1997).

Tradicionalna proizvodnja belih sireva u salamuri rasprostranjena je u Srbiji i čini gotovo 70 posto ukupne potrošnje sira. Dominantna mikroflora u ovim sirevima sastoji se od mezofilnih laktokoka i laktobacila i uglavnom potiče iz sirovog mleka i okoline u regionu gde se proizvodnja sireva odvija. Sastav i metabolička aktivnost mikroflora autohtonih sireva su jedan od najznačajnijih faktora koji određuju kvalitet i senzorne karakteristike proizvoda. Nativni enzimi ove mikroflora igraju značajnu ulogu u brojnim procesima tokom zrenja sireva u salamuri, ubrzavajući sam proces zrenja i dajući ovim sirevima posebne senzorne karakteristike. Autohtona mikroflora u tradicionalnim sirevima se sastoji uglavnom od različitih vrsta bakterija mlečne kiseline, čiji biodiverzitet predstavlja vrlo značajan izvor autentičnih starter kultura, čijom izolacijom i standardizacijom se može izvršiti zaštita oznake porekla određenih tradicionalnih sireva (Radulović, 2010). Autohtone BMK izolovane iz tradicionalnih proizvoda u Srbiji predstavljaju izvor ogromnog potencijala u biotehnologiji. Raznolikost i veliki broj sojeva BMK i njihovih različitih metaboličkih aktivnosti pružaju priliku za identifikaciju novih sojeva, ispitivanje njihovih potencijalnih probiotskih karakteristika i mogućnost njihovog korištenja u razvoju novih funkcionalnih prehrambenih tehnologija.

2.1.1. Rast mikroorganizama

Rast mikroorganizama u bujonu kao mediju karakterističan je po broju uzastopnih faza kroz koje populacija ćelija prolazi i može se prikazati kao kriva rasta. Kriva rasta se može podeliti u sledeće faze: lag, log, stacionarna faza i faza izumiranja (Breidt i sar., 1994; Boyd, 1988), što je prikazano na slici 1.



Slika 1. Bakterijska kriva rasta

Lag faza počinje nakon inokulacije ćelija u medijum i odnosi se samo na period deobe ćelija, a ne na druge aspekte razvoja. Nakon inokulacije, bakterije zahtevaju određeno vreme kako bi se prilagodile novoj sredini. U tom periodu ćelija se uvećava i povećana je sinteza enzima kako bi se hranjive materije u medijumu lakše usvojile. Takođe je povećana sinteza makromolekula kao što su RNK i proteini, dok sinteza DNK ostaje konstantna. Dužina lag faze zavisi od fiziološkog i genetskog stanja bakterije. Ako su ćelije nutricionistički gladovale pre inokulacije u medijum, onda lag faza traje duže. Međutim, ukoliko medijum sadrži veliki broj enzima od prethodnog rasta bakterija, tada će lag faza biti kratka (Boyd, 1988).

Faza ubrzanja - Na kraju lag faze dolazi do vrlo kratkog ubrzanja rasta, gde određeni broj ćelija ulazi u fazu deobe, koja se još uvek ne odvija konstantnom brzinom (Monod, 1949; Boyd, 1988).

Log faza (logaritamska ili eksponencijalna faza) je vremensko razdoblje u kojem se ćelijska deoba odvija konstantnom i maksimalnom brzinom. U ovoj fazi bakterije se nalaze u uravnoteženoj stopi rasta, gde se veličina ćelije udvostručava, zajedno sa ostalim ćelijskim komponentama, kao što su DNK, RNK i proteini (Boyd, 1988).

Faza usporavanja – Tokom rasta u zatvorenom sistemu, bakterije dostižu stepen usporavanja rasta usled ograničenja nutritijenata u medijumu, kao i sniženja pH sredine usled nakupljanja kiseline koja se tokom rasta ćelija formira. Ovo

usporavanje rasta nastaje neposredno pre sledeće faze zvane stacionarna faza (Monod, 1949; Boyd, 1988).

Stacionarna faza je period neuravnoteženog rasta, u kojem se ćelijske komponente i makromolekuli sintetišu različitom dinamikom. Veliki broj ćelija je još uvek u fazi deobe, ali i veliki broj izumire, tako da broj mikroorganizama ostaje konstantan. Ćelije u toku razvoja produkuju veću količinu kiseline i otpadnih materija koje dodatno inhibiraju deobu. Prilikom izumiranja, neke ćelije liziraju, pri čemu se u spoljnu okolinu oslobađaju autolitički enzimi, kao što su proteaze, lipaze i nukleaze, koje vrše razgradnju makromolekula, neophodnih za rast živih ćelija. U zavisnosti od vrste bakterija, stacionarna faza može trajati jako dugo ili kratko (Boyd, 1988). Važno je istaći da je stopa rasta u stacionarnoj fazi jednaka nuli, kao i u lag fazi (Monod, 1949).

Faza izumiranja (opadajuća faza) karakteriše pad broja ćelija, a stepen izumiranja zavisi od vrste mikroorganizma. Brz stepen liziranja ćelija kod nekih vrsta se odvija u prisustvu autolitičkih enzima koji vrše razgradnju ćelijskog zida. Ovi autolitički enzimi su isti oni enzimi neophodni za rast ćelija, jer omogućavaju ubacivanje novonastalog peptidoglikana u ćelijski zid (detaljniji opis o strukturi ćelijskog zida dat je u poglavlju 2.1.3.).

Navedeni opis predstavlja generalni opis rasta ćelija bakterija, međutim jedna ili više faza mogu izostati. Kada su uslovi povoljni, lag faza i faza ubrzanja često mogu biti potisnute, a faza usporavanja je često prekratka, pa biva neprimetna, što se takođe može dogoditi i sa stacionarnom fazom (Monod, 1949).

Bakterijske ćelije se dele geometrijskom progresijom ili na eksponencijalni način, gde iz jedne ćelije nastaje 2-4-8-32, itd. Broj generacija [n] se može odrediti prema sledećoj formuli (Boyd, 1988):

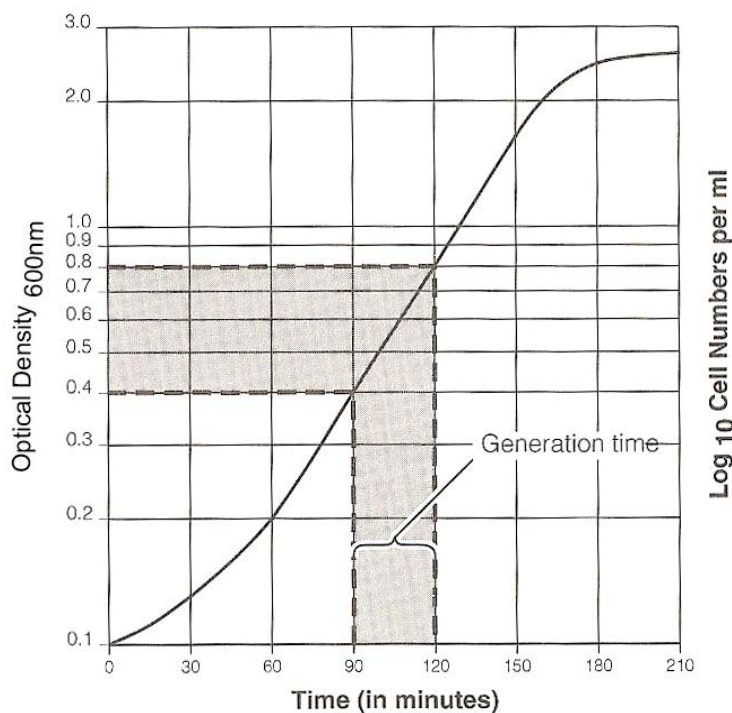
$$n = \frac{\log_{10}N_2 - \log_{10}N_1}{\log_{10}2} \quad (1)$$

gde je: [N₁] i [N₂] - broj ćelija u vremenskim intervalima [T₁] i [T₂].

Vreme potrebno da se jedna populacija mikroorganizama udvostruči je poznato kao generaciono vreme [Gt]. To vreme je jednako vremenskom intervalu između T₁ i T₂ podeljeno brojem generacija (Boyd, 1988):

$$Gt = \frac{T_2 - T_1}{N} \quad (2)$$

Generaciono vreme varira u zavisnosti od vrste mikroorganizma i spoljašnjih uslova. Grafičko određivanje udvostručavanja vremena može se izvršiti pomoću ekstrapolacije prikazane na slici 2.



Slika 2. Određivanje generacionog vremena

2.1.2. Enzimska aktivnost bakterija mlečne kiseline

Razgradnja nutritijenata u hrani (ugljenih hidrata, proteina, lipida i drugih organskih materija) do komponenata male molekulske mase odvija se od strane mikroorganizama preko kompleksnih, međusobno povezanih metaboličkih puteva, od kojih se svaki sastoji od velikog broja reakcija uključujući veliki broj različitih enzimskih sistema. Nivo sinteze i aktivnosti ovih enzima proizvode i kontrilišu specifične bakterije i to u odsustvu kiseonika, a uz oslobađanje energije. To znači da se sve fermentacije odvijaju u anaerobnim uslovima, unutar same ćelije bakterija. Centralni metabolit svih bioloških oksidacija (fermentacija) je pirogroždana kiselina

(PGA), a u zavisnosti od toga koje su BMK prisutne, zavisiće i pravac daljih transformacija (Tamime i Robinson, 1985; Alm, L., 1982).

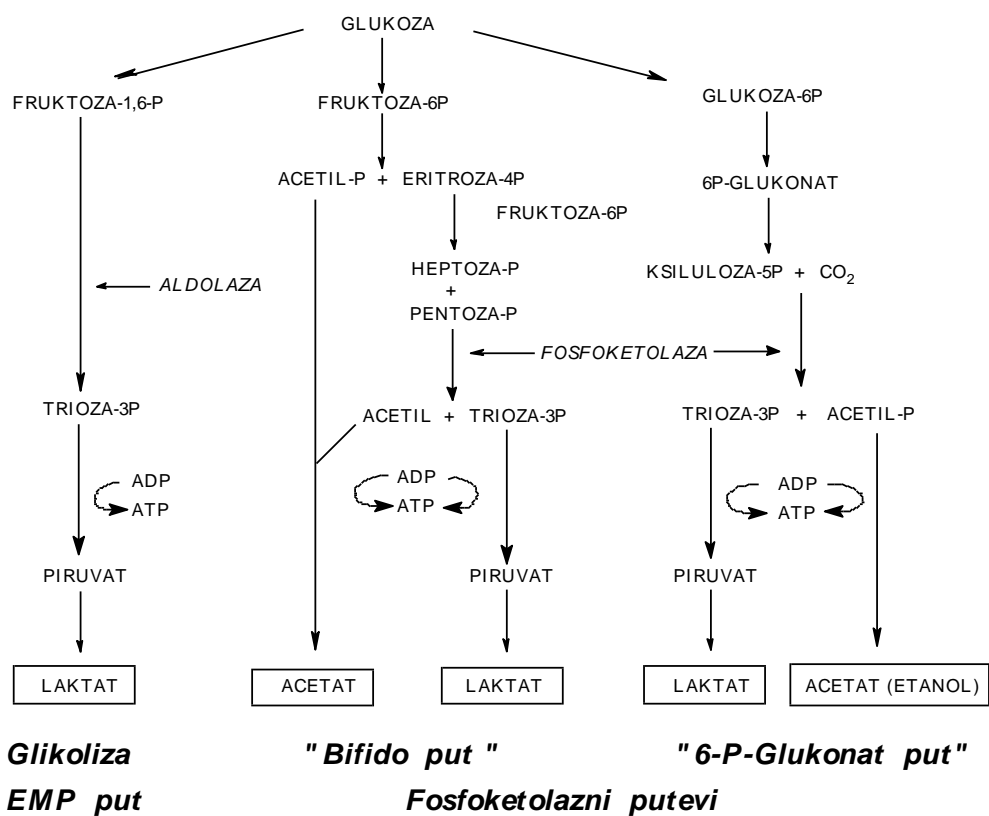
2.1.2.1. Metabolizam ugljenih hidrata

U mleku se najčešće odvija mlečna fermentacija, koja predstavlja dalji tip anaerobnih transformacija ugljenih hidrata, gde se centralni metabolit PGA u prisustvu enzima laktat-dehidrogenaze redukuje do mlečne kiseline, pod dejstvom BMK.

BMK u anaerobnim uslovima transformišu mlečni šećer laktozu, preko niza međuprodukata, u mlečnu kiselinu koja predstavlja krajnji proizvod kada je u pitanju homofermentativni tip fermentacije, dok se kod heterofermentativnog tipa, pored mlečne kiseline, javljaju i drugi proizvodi kao CH_2OH , CO_2 , CH_3COOH , H_2 itd. Stoga razlikujemo 2 tipa BMK, homofermentativni i heterofermentativni tip. Homofermentativne BMK vrše transformaciju glukoze po EMP putu (Embden-Meyerhof-Parnasov put, odnosno reakcioni tok glikolize), gde redukciju PGA, odnosno piruvata potpomaže enzim laktat-dehidrogenaza, a NADH_2 se oksiduje do NAD, koji ponovo ulazi u proces transformacije. BMK, koje podležu homofermentativnom tipu razgradnje ugljenih hidrata, su bakterije koje sadrže aldolazu (enzim koji katališe transformaciju fruktoza-6-fosfata na 2 molekula fosfo-trioza), a to su laktokoke, pediokoke i striktni homofermentativni i fakultativno heterofermentativni laktobacili (Dellaglio, 1988).

BMK, koje sadrže enzim fosfoketolazu, podležu heterofermentativnom tipu razgradnje ugljenih hidrata i dele se u 2 grupe. U prvu grupu spadaju vrste roda *Leuconostoc* i striktni heterofermentativni laktobacili, kod kojih se transformacija glukoze vrši po "6-fosfo-glukonat putu" uz nastanak ekvimolarnih količina laktata, acetata i CO_2 .

Glavni putevi fermentacije heksoza od strane BMK prikazani su na slici 3 (Dellaglio, 1988).



HOMOFERMENTACIJA

HETEROFERMENTACIJA

Slika 3. Glavni putevi fermentacije heksoza kod BMK (preuzeto od Kandler, 1983).

Jedan od najvažnijih problema za BMK u mleku je kako da usvoje laktozu. Naime, enzim laktaza je endoenzim, pa molekul laktoze mora da penetrira i da se hidrolizuje u samoj ćeliji. Stoga BMK ne mogu direktno da koriste laktozu, već je moraju razgraditi pomoću svojih enzima unutar ćelije na glukozu i galaktozu. U zavisnosti od toga o kojim je bakterijama reč, postoji više načina usvajanja laktoze.

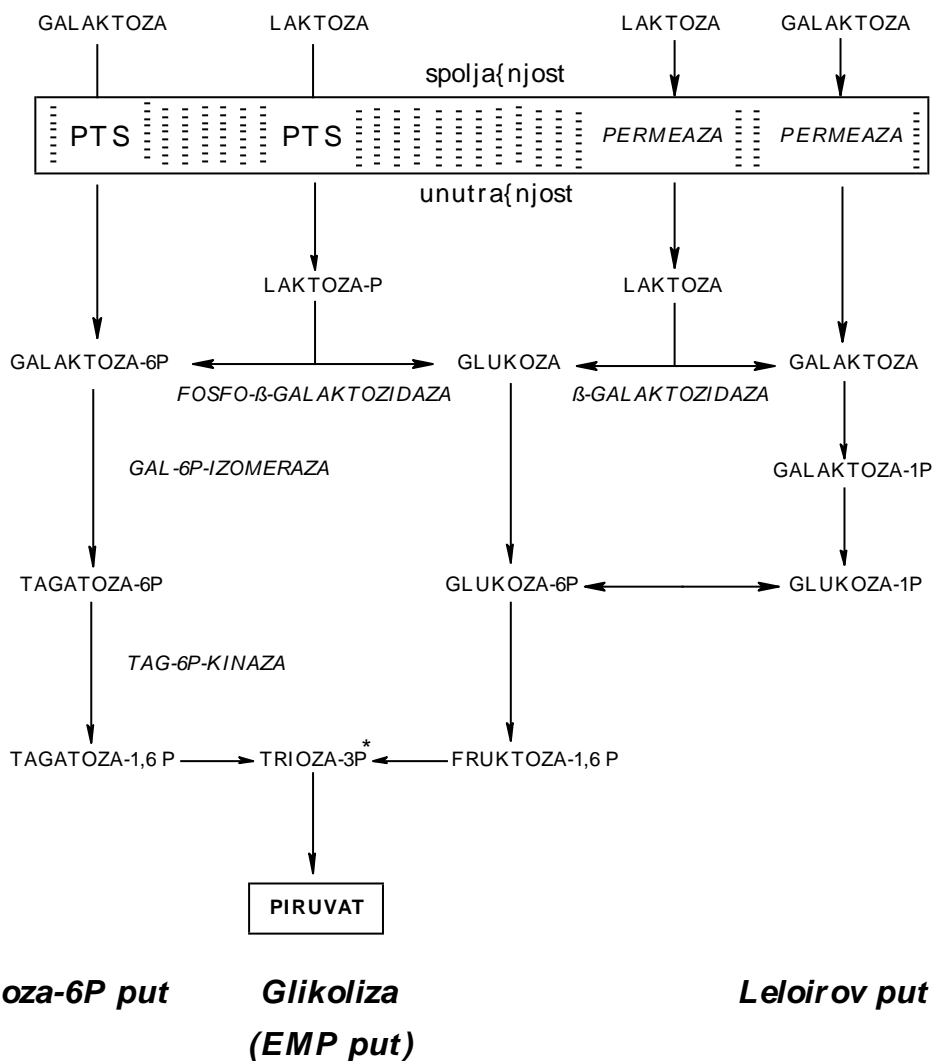
Homofermentativne bakterije (većina laktokoka i pojedini laktobacili, kao što je *Lb. casei*) usvajaju laktozu sistemom **translokacije grupa** (PEP/PTS sistem), odnosno laktoza ulazi u ćeliju kao laktoza-fosfat, jer se fosforilizuje uz pomoć fosfo-enol-piruvat (PEP) / fosfo-transportnog sistema (PTS), koji se nalazi u ćelijskoj membrani. Dalju hidrolizu laktoze, odnosno laktoza-fosfata na glukozu i galaktozu-6P katališe enzim fosfo-β-galaktozidaza. Glukoza se dalje transformiše po EMP putu u piruvat, koji kasnije u prisustvu enzima laktat-dehidrogenaze prelazi u laktat, odnosno mlečnu kiselinu.

Metabolizam galaktoza-6P je nešto drugačiji od usvajanja laktoze i teče tako što se ona transformiše po tagatoznom putu (tagatoza je stereoizomer galaktoze) prvo do gliceraldehid-3P, koji se kasnije katabolizuje u piruvat, pa u mlečnu kiselinu preko ciklusa glikolize (EMP put) (Tamime i Robinson, 1985; Dellaglio, 1988).

Većina laktobacila usvaja laktozu uz pomoć specifičnog proteina permeaze. Ovde je u pitanju aktivni transport, gde laktoza ulazi u ćeliju nepromenjena, a potom se pomoću enzima β -galaktozidaza hidrolizuje na glukozu i galaktozu. Glukoza se preko EMP puta, u prisustvu laktat-dehidrogenaze prevodi u mlečnu kiselinu, a galaktoza se jedino kod sojeva *Lb. helveticus* konvertuje u glukozu-6P po "Leloirovom putu" i nastavlja sa glukozom transformaciju do laktata. Pošto u većini slučajeva galaktoza ostaje u nepromenjenom stanju, laktobacili se smatraju galaktoza(-) i izlučuju galaktozu iz ćelije (Dellaglio, 1988).

Šematski prikaz usvajanja laktoze i galaktoze od strane laktobacila i laktokoka prikazan je na slici 4.

Važno je istaći da kada BMK rastu u uslovima gde je sadržaj glukoze i laktoze ograničen, tada se pored mlečne kiseline produkuju i drugi produkti metabolizma piruvata, kao npr. format, acetat i etanol. U tim slučajevima, homofermentativan tip razgradnje ugljenih hidrata može preći u heterofermentativan tip, uz produkciju pomenutih jedinjenja (Dellaglio, 1988).



* Trioza-3P = gliceraldehyd-3P ↔ dihidroaceton-P, gde iz gliceraldehyd-3P, preko niza međuproizvoda (1,3-difosfo-glicerat, 2-fosfo-glicerat, fosfo-enol-piruvat) nastaje piruvat.

Slika 4. Način usvajanja laktoze i galaktoze kod laktobacila i streptokoka (preuzeto od Kandler, 1983).

2.1.2.2. Proteolitički enzimi BMK

Uravnotežen ukus fermentisanih prehrambenih proizvoda kao što su sirevi, kobasice i vina, posledica je prisustva različitih aromatičnih komponenti koje nastaju katabolizmom aminokiselina. Razvoj bakterija mlečne kiseline moguć je samo u prisustvu aminokiselina esencijalnih za njihov rast, pa stoga potpuna hidroliza proteina ili oligopeptida do slobodnih aminokiselina zahteva niz specifičnih i nespecifičnih proteaza. BMK imaju relativno mali, ali vrlo složen sistem

intracelularnih proteolitičkih enzima koji oslobađaju aminokiseline neophodne za njihov razvoj.

Proteinaze i peptidaze BMK bile su predmet istraživanja mnogih naučnika (Ardö, 2006; McSweeney i Sousa, 2000; McSweeney, 2004; Stepaniak, 2004; Upadhyay i sar., 2004). U toku zrenja sireva, peptidaze su odgovorne za sekundarnu proteolizu, odnosno dalju razgradnju peptida nastalih pod dejstvom plazmina i himozina (Stepaniak, 2004). Naime, Desmazeaud i sar. (1976) su ustanovili da je u sirevima, koji su sadržali samo himozin, detektovano prisustvo samo pH 4.6-rastvorljivog azota, dok peptidne i aminokiselinske azotne materije nisu detektovane. S druge strane u sirevima, u čijoj su izradi i zrenju, pored himozina, učestvovala i BMK, detektovane su velike količine slobodnih aminokiselina. Stoga se može zaključiti da je najznačajnija uloga proteinaza i peptidaza startera da izvrše degradaciju velikih peptida nastalih pod dejstvom sirila na male peptide i aminokiseline (Law, 1984), a nastankom slobodnih aminokiselina uklanjaju se i peptidi koji su nosioci gorkog ukusa (Stepaniak, 2004).

U najvećoj meri je proučavan proteolitički sistem laktokoka, mada je generalno sličan proteolitičkom sistemu ostalih BMK. Naime, ustanovljeno je da laktokoke i laktobacili sadrže isti tip aminopeptidaza i oligopeptidaza, mada se veruje da laktobacili poseduju jači proteolitički sistem od laktokoka (Sousa i sar., 2001; Stepaniak, 2004).

Proteolitički sistem laktokoka se sastoji iz proteinaza vezanih za ćelijski zid bakterija zvanih "laktocepini" ili CEP (*eng.* "Cell envelope-associated proteinases"), kao i niza intracelularnih proteinaza i peptidaza, koje imaju ključnu ulogu u procesima zrenja sira.

Naime, laktocepini u siru prvenstveno deluju na peptide srednjih veličina, koji su nastali pod dejstvom himozina ili plazmina. Laktokoke takođe poseduju i izvestan broj intracelularnih proteinaza, čija uloga u zrenju sireva nije u potpunosti ispitana, jer verovatno nemaju toliki značaj kao ekstracelularna proteinaza laktocepin (McSweeney, 2004). I laktobacili produkuju raznovrsne laktocepine, koji imaju različito specifično dejstvo na α_{s1} -kazeinske frakcije 1-23, nastale pod dejstvom himozina (Stepaniak, 2004).

BMK sadrže i intracelularne peptidaze, čija je uloga od velikog značaja pri kraju zrenja sireva, a koja se pak ogleda u oslobađanju aminokiselina, kao supstrata za dalje kataboličke reakcije.

Intracelularni proteolitički sistem BMK se sastoji iz (Stepaniak, 2004):

- Aminopeptidaza, koje u velikom stepenu oslobađaju aminokiseline i dipeptide iz N-terminalnog dela peptida, koji ne sadrže više od 5-7 aminokiselinskih ostataka (veći peptidi se vrlo sporo hidrolizuju, dok se proteini ne hidrolizuju od strane aminopeptidaza);
- Karboksilaza, koje oslobađaju aminokiseline sa C-terminalnog dela peptida;
- Dipeptidaza i tripeptidaza, koje vrše hidrolizu di-, odnosno tripeptida;
- Oligopeptidaza, koje nemaju afinitet prema kazeinu, već vrše hidrolizu peptida dužine lanaca od 5-30 aminokiselina;
- Proteinaza, koje vrše hidrolizu kazeina, a takođe su intracelularni enzimi BMK, a čija uloga u zrenju sireva, kao što je pomenuto, nema toliki značaj kao uloga peptidaza.

Ove bakterije, zapravo, produkuju 3 tipa oligopeptidaza: PepO i PepF (metalo-endopeptidaze) i PepE (tiol-zavisnu endopeptidazu), zatim tripeptidaze i niz aminopeptidaza. S druge strane, ustanovljeno je da BMK ne produkuju karboksipeptidaze (McSweeney, 2004). Zapravo, Deutsch i sar. (2000) su ustanovili da neke termofilne BMK u vrlo retkim slučajevima poseduju karboksipeptidaze, čija je aktivnost registrovana kod bakterija *S. thermophilus* i *Lb. helveticus* u prisustvu hidrolizata β -kazeina, gde je ustanovljena hidroliza na dve peptidne sekvence, koje su se međusobno razlikovale po jednoj aminokiselini na C-terminalnoj poziciji.

Specifičnost svih enzima se ogleda u njihovom dejstvu na pojedine aminokiseline i/ili njihove pozicije u peptidima. Elektroforetske komponente kazeina imaju visok sadržaj prolina, čija složena ciklična struktura zahteva specifične peptidaze za hidrolizu peptida koji sadrže ovu aminokiselinu. BMK poseduju veliki broj prolin-specifičnih peptidaza, kako bi se nesmetano razvijale u siru kao supstratu. Tako peptidaza PepX oslobađa X-Pro dipeptide sa N-terminalnog ostatka peptida. PepI peptidaza katališe oslobađanje N-terminalnog ostatka prolina iz peptida. (McSweeney, 2004; Stepaniak, 2004; Upadhyay i sar., 2004). BMK sadrže i dve specifične dipeptidaze, koje takođe vrše hidrolizu dipeptida koji sadrže prolin:

prolinaza (PepR) hidrolizuje Pro-X dipeptide, a prolidaza (PepQ) vrši hidrolizu X-Pro dipeptida.

Aminotransferaze BMK vrše transaminaciju arginina (Arg), zatim izoleucina (Ile), leucina (Leu) i valina (Val), kao i metionina (Met) i aromatičnih aminokiselina (fenilalanina (Phe), tirozina (Tyr) i triptofana (Trp)). Kao rezultat njihovog delovanja nastaju razna aromogena jedinjenja, kao što su: fenil-acetaldehid, benzaldehid, krezol, fenol i indol (iz aromatičnih Phe, Tyr i Trp), dok izovalerijanska i izobuterna kiselina, 2- i 3-metilbutan i 2-etilpropan nastaju iz Ile, Leu i Val i formiraju voćnu aromu. Bitno je istaći da aminotransferaze BMK uglavnom kao akceptor koriste α -keto-glutarat, koji se tom prilikom transformiše u glutaminsku kiselinu (Stepaniak, 2004). Naime, aktivnost ovih enzima je limitirajući faktor kada je u pitanju formiranje komponenata arome u procesu zrenja sira (Curtin i McSweeney, 2004). Stoga su vršena mnoga istraživanja vezana za dodavanje α -keto-glutarata prilikom proizvodnje sireva, sa ciljem povećanja aktivnosti aminotransferaza, a time i poboljšanja arome pojedinih sireva (McSweeney, 2004).

2.1.2.3. Lipolitički enzimi BMK

Enzimski sistemi lipaza i esteraza bakterija mlečne kiseline su u manjem stepenu proučavani od proteolitičkih enzima. Odgovor se može tražiti u tome što su laktokoke vrlo slabi lipoliti, ukoliko ih poredimo sa rodovima bakterija, kao što su *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Flavobacterium* i *Micrococcus* (Kalogridou-Vassiliadou, 1984; Bhowmik i Marth, 1990). Ipak, one mogu biti odgovorne za oslobađanje veće koncentracije slobodnih masnih kiselina u pojedinim sirevima tokom zrenja i to ukoliko su prisutne u visokom broju ili ukoliko je period zrenja sireva izrazito dug (kao kod tvrdih italijanskih varijeteta kao što su Parmezan, Pekomino Romano i Provolone).

Pojedini autori su ispitivali enzimske sisteme lipaza/esteraza određenih pripadnika *Lactococcus* vrste, i to uglavnom intracelularne esteraze koje sintetiše *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Casey i Dobb, 1992; Holland i Coolbear, 1996; Fox i Wallace, 1997), a ispitivane su i esteraze laktobacila i to homofermentativnih vrsta *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus* i *Lactobacillus delbruecki* subsp. *lactis* (El Soda i sar., 1986; Khalid i Marth, 1990; Khalid i sar., 1990; Lee i Lee, 1990; Gobbetti i sar., 1996) i ustanovljen je njihov uticaj na

oslobađanje slobodnih masnih kiselina tokom zrenja sireva. Collins i sar. (2003) su ispitali lipolizu u siru Čedar tokom zrenja i detektovali povećan nivo kaprinske, miristinske, palmitinske i stearinske kiseline, koje su produkti intracelularnih esteraza liziranih ćelija laktokoka. Holland i Collbear (1996) su ustanovili da glavne esteraze, koje proizvode laktokoke i laktobacili, pripadaju tributirin esterazama (jer među trigliceridima hidrolizuju jedino tributirin (Gobbetti i sar., 1997), mada lipolitički enzimi ovih bakterija pokazuju aktivnost i nad digliceridima, a naročito monogliceridima i masnim kiselinama sa kratkim lancima (Gobbetti i sar., 1997; Holland i sar., 2002). Ipak, samo je mali broj autora (Anderson i sar., 1995; Gobbetti i sar., 1996, 1997) izvršio izolaciju i karakterizaciju ovih enzima. Gobbetti i sar. (1997) su izvršili izolaciju i karakterizaciju esteraza vezanih za ćelijski zid laktobacila i to vrste *Lb. fermentum*, koja se koristi kao starter u proizvodnji sira Parmezan. Autori su ustanovili da esteraza pomenute bakterije igra pozitivnu ulogu u razvoju arome tokom zrenja ovog italijanskog varijeteta.

Fakultativno heterofermentativni laktobacili (*Lb. casei*, *Lb. paracasei* i *Lb. plantarum*), koji su dominantni pripadnici nestarterske mikroflore u mnogim sirevima, spadaju u slabe lipolite, kao i pripadnici vrsta *Micrococcus* i *Pediococcus* (Bhowmik i Marth, 1990). Jedino psihrotrofne bakterije (npr. pseudomonade), koje se mogu naći apsorbivane u masnim kapljicama, proizvode termostabilne lipaze, jer preživljavaju pasterizaciju mleka. Na taj način, ove bakterije mogu da utiču na lipolizu u sirevima proizvedenim od mleka, koje je sadržalo veliki broj njihovih ćelija pre samog termičkog tretmana (Cousins i sar., 1977).

Generalno se smatra da su BMK izrazito slabi lipoliti u poređenju sa psihrotrofnim bakterijama, mikrokokama ili brevibakterijama (Kalogridou-Vassiliadou 1984; Bhowmik i Marth 1990) i vrlo malo se zna o njihovom uticaju na lipolizu koja se u siru odvija tokom zrenja, kao i na razvijanje arome finalnog proizvoda (Fox i Stepaniak, 1993; Castillo i sar, 1999).

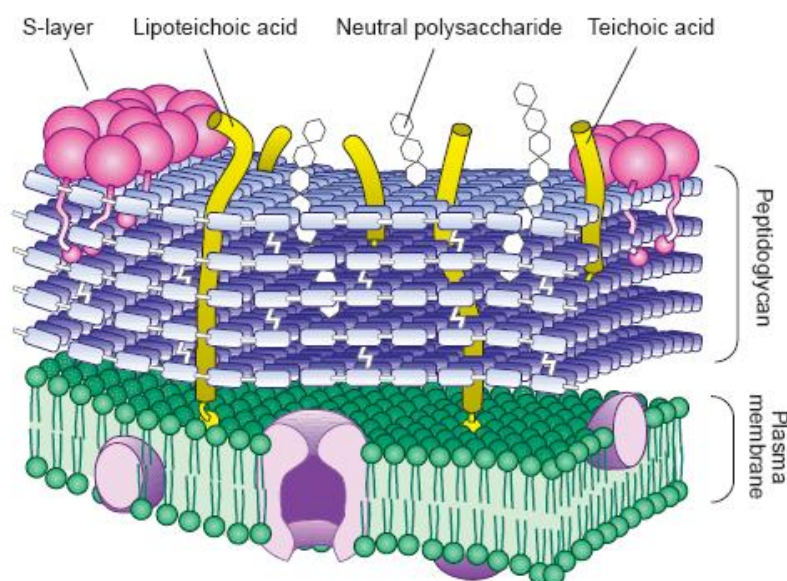
2.1.3. Autoliza ćelija BMK

Autoliza je proces koji se odvija u ćelijama većine bakterijskih vrsta, a sastoji se od sloma ćelijskog zida, što za posledicu ima oslobađanje ćelijskih komponenti u spoljašnju sredinu. Kada su BMK u pitanju, ovaj fenomen igra važnu ulogu prilikom proizvodnje fermentisanih mlečnih proizvoda (Gilliland, 1985). U sirarstvu, autoliza

ćelija BMK rezultuje oslobađanju intracelularnih proteolitičkih enzima neophodnih za ubrzanje procesa zrenja sira, čime se postiže znatna ekonomska ušteda u proizvodnji (Chapot-Chartier i sar., 1994; Fernández Murga i sar., 1995). S druge strane, autoliza ima nepoželjan efekat na fermentisane mlečne napitke, jer se u toku liziranja ćelija startera oslobađa sadržaj iz ćelijske citoplazme, koji može dovesti do promene reoloških i organoleptičkih svojstava gotovog proizvoda (Fernández Murga i sar., 1995).

Usled fermentacije laktoze i smanjenja njene koncentracije u toku prva 24 sata prilikom izrade sireva dolazi do prestanka aktivnog transporta oligopeptida u unutrašnjost ćelija BMK. Stoga je neophodno da dođe do liziranja ćelija, kako bi došlo do stimulisanja rasta bakterija. Mnogi istraživači su ustanovili da se usled liziranja ćelija BMK oslobađaju intracelularni enzimi peptidaze u unutrašnjost proteinskog matriksa sira (Wilkinson i sar., 1994, Crow i sar., 1995, O'Donovan i sar., 1996, Chapot-Chartier, 1996). Oslobađanje intracelularnih enzima je proporcionalno stepenu liziranja ćelija, što zavisi od vrste bakterija (Hannon i sar., 2006).

Autoliza ćelija se može definisati kao rezultat enzimske degradacije peptidoglukana ćelijskog zida bakterije pod dejstvom endogenih peptidoglukan-hidrolaza (PGH) zvanih „autolizini“ (Smith i sar., 2000). Naime, autolizini su enzimi koji vrše hidrolizu kovalentnih veza peptidoglukana ćelijskog zida. Peptidoglukan (mukopeptid) je glavni konstituent ćelijskog zida bakterija i ovaj sloj pokriva 15-50% površine ćelije G(+) bakterija, odnosno manje od 5% površine ćelije G(-) bakterija (Boyd, 1988). To je polimer amino-šećera (polisaharidi koji sadrže *N*-acetyl-muraminsku kiselinu i *N*-acetyl-glukozamin) unakrsno vezanih pomoću kratkih peptida, formirajući kovalentni matriks koji okružuje citoplazmatičnu membranu i kao takav čini glavni konstituent ćelijskog zida bakterije, što je kod G(+) bakterija prikazano na *slici 5* (Delcour i sar., 1999).



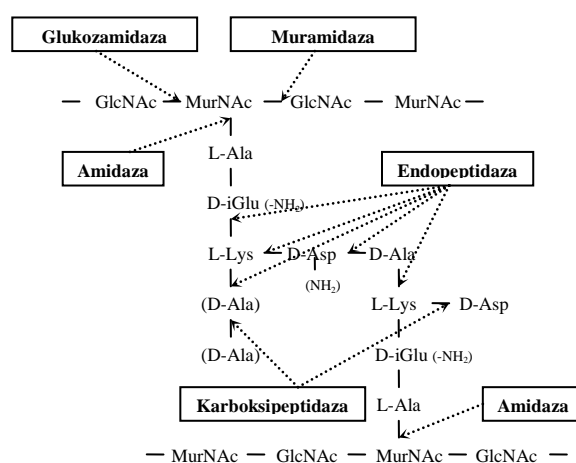
Slika 5. Prikaz strukture ćelijskog zida G(+) bakterija. Bilipidna plazmatska membrana sa uklopljenim proteinima okružena je višeslojnim peptidoglukanom, koji je prožet polisaharidima, tejhojnom i lipotejhojnom kiselinom, a koji je okružen S-slojem kao spoljašnjom opnom (Delcour i sar., 1999)

Tejhoina kiselina se sastoji od kiselih polisaharida sačinjenih od ponovljenih jedinica glicerola ili robitola povezanih fosfatnim estrima i njihova veza za sloj peptidoglukana nije u potpunosti jasna kod mnogih G(+) bakterija. U ćelijskom zidu pojedinih laktobacila može se naći i lipotejhoina kiselina, koja obezbeđuje fizički most između ćelijskog zida i ćelijske membrane (Boyd, 1988).

Peptidoglukan ima veoma važnu funkciju u održavanju oblika ćelije, vršeci prevenciju od osmotskog liziranja ćelije u hipotoničnim uslovima. Kad ćelija raste, struktura peptidoglukana se širi, a menja oblik prilikom deobe ćelije (Foster, 1994; Blackman i sar., 1998). Tejhoina i tejhorunska kiselina učestvuju u stvaranju negativnog naelektrisanja površine ćelijskog zida G(+) bakterija, vezujući dvovalentne katjone, kao što je magnezijum, čime ćelijski zid biva više kompaktan (manje elektronegativan), a da istovremeno ne utiče na poroznost samog ćelijskog zida. Oba polimera vrše strukturnu potporu peptidoglukana, a takođe i učestvuju u kontroli autolizina. Autolizini mogu biti potpuno destruktivni po ćeliju, naročito tokom starenja, gde stari ćelijski zid mora da se rascepi kako bi se dozvolilo unošenje

novih komponenata koje učestvuju u građi ćelijskog zida. Destruktivnan efekat se takođe može detektovati nakon centrifugiranja ćelija G(+) bakterija u bujonu na sobnoj temperaturi, gde se liziranje ćelija rapidno odvija. S druge strane, autolitička aktivnost se može držati pod kontrolom na nižim temperaturama (0-5°C) (Boyd, 1988).

Autolizini se mogu definisati kao endogeni enzimi koji hidrolizuju specifične veze u ćelijskom zidu bakterija koje poseduju peptidoglukan, rezultujući narušavanju integriteta i zaštitnih osobina dvo- i trodimenzionalne strukture peptidoglukana (Shockman i Höltje, 1994). U zavisnosti od načina hidrolize kovalentnih veza peptidoglukana ćelijskog zida, što je prikazano na *slici 6* (Lortal i Chapot-Chartier, 2005), ovi enzimi se klasifikuju kao *N*-acetil-muramidaze, *N*-acetil-glukozamidaze, *N*-acetilmuramil-*L*-alanin-amidaze i endopeptidaze (Ward i Williamson, 1984; Ostlie i sar., 2007). Neke bakterije poseduju autolizine sa različitim specifičnostima, a neke poseduju različite autolizine sa istom specifičnošću, što otežava određivanje egzaktnih funkcija pojedinih autolizina (Shockman i Höltje, 1994).



Slika 6. Struktura peptidoglukana ćelija laktokoka i načini hidrolize autolizinima.

Peptidoglukan je heteropolimer, sastavljen iz linearnih lanaca polisaharida, koji sadrže *N*-acetil-muraminsku kiselinu (MurNAc) i *N*-acetilglukozamin (GlcNAc) (Crow i sar., 1995, Lortal i Chapot-Chartier, 2005)

Mnogim istraživanjima je utvrđeno da je AcmA glavni autolizin bakterija *Lactococcus lactis*, čiji se proteinski deo sastoji iz N-terminalnog aktivnog dela i C-terminalnog dela vezanog za peptidoglukan. Ovaj autolizin (hidrolaza) je *N*-acetil-

glukozaminidaza, koji dovodi do razaranja peptidoglukanske strukture ćelijskog zida (Buist i sar., 1995; Steen i sar., 2005).

Procesi autolize karakterišu mnoge G(+) i G(-) bakterije (Shockman i Hölftje, 1994). Aktivnost autolitičkih enzima su istraživali pojedini autori (Bie i Sjöström, 1975a, 1975b; Kang i sar., 1998), pri čemu je ustanovljeno da se autolitička aktivnost javlja tokom eksponencijalne faze rasta ćelije, dok se teško uočava u toku stacionarne faze. Visok stepen autolize tokom log faze je detektovan kod *Lactobacillus buglaricus* i *Lb. casei* (Kang i sar., 1998), *Lb. helveticus* (Neujahr i Logardt, 1973) i *Lb. acidophilus* (Higgins i sar., 1973). Autoliza ćelija uglavnom nastaje zbog prekida sinteze peptidoglukana, usled nedostatka hranljivih materija (laktoze) ili dejstva nepovoljnih spoljnih uticaja (temperaturnog šoka zagrevanjem ili hlađenjem, povećanja koncentracije soli, itd.) (Lortal i Chapot-Chartier, 2005). Naučnici su ustanovili da liziranje ćelija *L. lactis* nastaje prilikom minimalne promene temperature sa 38 na 40°C, pri čemu su u eksperimentu simulirali uslove proizvodnje sira Čedar (Feirtag i McKay, 1987; Wiederholt i Steele, 1993; Wilkinson i sar., 1995). Takođe je ustanovljeno da bakterije lizogenog soja *L. lactis* subsp. *cremoris* SK110 liziraju usled temperaturnog šoka koji nastaje tokom proizvodnje sireva, što na kraju rezultuje povećanom stepenu nastanka slobodnih aminokiselina (Meijer i sar., 1998).

Takođe je ustanovljeno da liziranje ćelija pojedinih BMK ne nastaje isključivo pod dejstvom autolizina, već usled prisutstva profaga u uslovima prestanka rasta ćelija. Tačnije, u pitanju su endolizini faga, ali vrlo limitiran broj vrsta BMK poseduje aktivne ili profage u tragovima, mada to ne podrazumeva automatski da će isti uzrokovati autolizu (Lortal i Chapot-Chartier, 2005). Tako su Pillidge i sar. (2002) detektovali prisustvo istog profaga i u ćelijama sklonim autolizi i u neautolizirajućim ćelijama vrste *Lactococcus lactis*.

Ustanovljeno je da opseg liziranja ćelija *Lactococcus lactis* u sirevima Čedar i St. Paulin u visokom stepenu zavisi od soja startera (Chapot-Chartier i sar., 1994; O'Donovan i sar., 1996; Wilkinson i sar., 1994). Iste zaključke su doneli istraživači koji su ispitali liziranje ćelija *Lactobacillus helveticus* u švajcarskom siru i Čedru, čiji stepen liziranja takođe zavisi od soja bakterija (Hannon i sar., 2003; Madkor i sar., 1999, 2000; Valence i sar., 1998). Sposobnost liziranja je ustanovljena i kod vrsta *Lactobacillus delbrueckii* prisutnih u švajcarskom siru (Meyer i Spahni, 1998) i *Streptococcus thermophilus* u siru Ementaler (Deutsch i sar., 2002).

Mnoge studije su pokazale korelaciju između liziranja startera i porasta stepena proteolize u mnogim sirevima izrađenim tradicionalnom tehnologijom (Chapot-Chartieri sar., 1994; Crow i sar., 1995; Deutsch i sar., 2002; Hannon i sar., 2003; Meyer i Spahni, 1998; Morgan i sar., 1997; O'Donovan i sar., 1996; Valence i sar., 1998; Wilkinson i sar., 1994). Istraživanja su pokazala da se frakcije u vodi rastvorljivih azotnih materija sastoje iz peptida i aminokiselina, koji su glavni učesnici u formiranju arome sireva. Ove u vodi rastvorljive frakcije se sastoje i iz enzima, koji su oslobođeni od strane starter bakterija, koje umiru u prvih nekoliko nedelja prilikom proizvodnje većine sireva (Kuchroo i Fox, 1983; Aston i Creamer, 1986; Visser, 1993; Engels i Viseer, 1994). Aktivnost endo- i egzopeptidaza laktokoka i laktobacila dovodi do formiranja oligopeptida i slobodnih aminokiselina (koji predstavljaju prekursore ukusa i mirisa sira), zatim do poboljšanja teksture usled hidrolize kazeinskog matriksa, kao i smanjenja gorčine i poboljšanja arome finalnog proizvoda (Lortal i sar., 1997). Stoga liziranje ćelija predstavlja neophodan korak u oslobađanju citoplazmatičnih peptidaza u siru grudu i njihovog direktnog kontakta sa supstratom. Prema Law-u (2001), stepen liziranja startera u mladom siru direktno je proporcionalan formiranju komponenti arome, kao i ukupnom kvalitetu finalnog proizvoda.

Međutim, povećana koncentracija slobodnih aminokiselina, koja nakon liziranja bakterija nastaje u siru, nije dovoljna da se proces zrenja ubrza, naročito kada je formiranje arome u pitanju. Naime, tokom zrenja sireva koncentracija slobodnih aminokiselina se povećava, a smatra se da nivo azotnih materija (peptida i slobodnih aminokiselina) rastvorljivih u 5% fosfovolframskoj kiselini (PTA) predstavlja pouzdan indikator razvoja arome u siru (Ardo i Petterson, 1988; Aston i Douglas, 1983; Urbach, 1995). Ipak, činjenica da različiti sirevi mogu imati približno istu koncentraciju slobodnih aminokiselina, a da im je aroma različita, nalaže da povećano stvaranje slobodnih aminokiselina tokom zrenja nije limitirajući faktor za stvaranje arome, već je to njihova enzimska ili hemijska modifikacija (Fox i McSweenay, 1996; Fox i Wallace, 1997). S tim u vezi, sledeći korak koji je potreban da bi došlo do formiranja finalnih komponenti arome podrazumeva prisustvo katabolizma aminokiselina, kao i metabolizma slobodnih masnih kiselina. Kada je u pitanju *L. lactis*, kao starter koji se najčešće koristi prilikom proizvodnje polutvrdih sireva, prvi korak ka konverziji aminokiselina u komponente arome predstavlja transaminacija

(Yvon i Rijnen, 2001). Za formiranje finalne arome sira, transaminacija predstavlja limitirajući korak, koji može da se preskoči dodavanjem α -ketoglutarata (Yvon i sar., 1998). Tako su pojedini istraživači ustanovili da u odsutstvu potrebne koncentracije α -ketoglutarata, lizirane ćelije startera *L. lactis* stimulišu transaminaciju aminokiselina (Bourdat-Deschamps i sar., 2004). S obzirom na to da α -ketokiseline nisu nosioci aromatičnih svojstava sira, potrebno je da dođe do njihove dalje degradacije kako bi se formirale isparljive aromatične komponente. Hemijskom oksidacijom α -ketokiselina nastaju aldehidi (čiji je broj C-atoma manji za dva od početnih aminokiselina), a enzimskom dekarboksilacijom, koju favorizuju lizirane ćelije, takođe dolazi do nastanka aldehida (sa jednim C-atomom manje od polaznih aminokiselina). Osim toga, ćelijski sadržaj koji liziranjem ćelija bakterija dospeva u sir, pored enzima sadrži nukleinske kiseline, vitamine, minerale, itd. Prisustvo ovih molekula može da stimuliše rast i razvoj drugih bakterija u siru i na taj način ove intracelularne komponente mogu direktno ili indirektno da utiču na formiranje arome u finalnom proizvodu (Lortal i Chapot-Chartier, 2005).

Postoji više načina da se odredi broj liziranih ćelija bakterija u proteinskom matriksu. Najčešće se koristi klasično brojanje živih ćelija, odnosno ćelija sposobnih za razvoj u selekcionisanom medijumu, ali se ovim načinom ne može precizno odrediti broj liziranih ćelija, jer smanjenje broja živih ćelija ne znači to da su sve umrle ćelije lizirale. Naime, ćelije koje nisu sposobne za razvoj, mogu biti metabolički aktivne, a mogu biti i permeabilne usled oštećenja membrane, što dovodi do smrti, ali ne uvek i do liziranja (Bunthoff i sar., 2001). Stoga je oslobađanje intracelularnih komponenti u sirni matriks glavni pokazatelj liziranja ćelija. DNK i RNK, kao intracelularni materijal specifičan za svaku vrstu bakterija, bili bi odlični markeri ćelijske autolize, ali njihova detekcija je nemoguća usled rapidne degradacije ovih komponenti u sirevima tokom zrenja (Bie i Sjöström, 1975a). Stoga, detektovanje citoplazmatičnih enzima, kao što su laktat-dehidrogenaza (LDH), glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (G_6PDH), X-prolil-dipeptidil-aminopeptidaza (Pep-X) i lizil-aminopeptidaza, koji takođe predstavljaju markere autolize, je nepogrešiv pokazatelj liziranja ćelija (Crow i sar., 1995; Hannon i sar., 2003; Kiernan i sar., 2000; Wilkinson i sar., 1994; Valence i sar., 1998). Određivanje ovih slobodnih enzima u siru može da se vrši imunološkim, a u novije vreme i proteomičkim analizama vodenog sirnog ekstrakta (Deutsch i sar., 2002; Gagnaire i sar., 2004;

Saboya i sar., 2001; Valence i sar., 1998; 2000). Pri tom, imunološka detekcija, u kojoj se koriste markeri specifični za svaki soj bakterija, ima sledeće prednosti: 1) ne podleže varijacijama aktivnosti enzima koje mogu da nastanu usled nestabilnosti enzima; 2) upotrebom specifičnih antitela za svaki soj može se odrediti liziranje svake bakterije u kompleksnom ekosistemu (Lortal i Chapot-Chartier, 2005).

2.1.3.1. Faktori koji utiču na autolizu ćelija BMK

Autoloza je spontani raspad bakterijske ćelije nastao kao rezultat starenja ili dejstva nepovoljnih fizioloških uslova, a sam proces se aktivira pomoću endogenih autolizina koji hidrolizuju kovalentne veze peptidoglikana (Lemeé i sar., 1994). Iako su fiziološke funkcije autolitičkih enzima nedovoljno jasne, pretpostavlja se da ovi enzimi imaju ulogu u toku ćelijske deobe, rasta ćelijskog zida i prometa materija kroz ćelijski zid (Rogers, 1970). Stepenn autolize ćelija BMK zavisi od temperature i pH sredine (Bie i Sjöström, 1975a), mada je sprovedeno nekoliko studija kako bi se okarakterisali faktori koji utiču na autolizu laktobacila i laktokoka (Hannon i sar. 2003; Kang i sar. 1998; Wilkinson i sar. 1994). Kang i sar. (1998) su ustanovili da stepenn autolize ćelija laktobacila zavisi od koncentracije soli i koncentracije upotrebljenog pufernog rastvora. Tako pri koncentraciji soli od 2% (w/v) nastaje autoliza ćelija pojedinih sojeva *Lb. bulgaricus* i *Lb. casei*, dok se pri povećanim koncentracijama soli od 3.5% ili 5% (w/v) stepenn autolize značajno smanjuje. Isti autori su takođe primetili da ispiranje bakterijskih ćelija fiziološkim rastvorom (0.85%) pre inkubacije u 0.2M NaCl rezultuje manjoj autolitičkoj aktivnosti nego ispiranje hladnom destilovanom vodom. Međutim, ispitivane ćelije laktobacila su, nakon ispiranja hladnom destilovanom vodom, pokazivale manju autolitičku aktivnost prilikom inkubacije u istoj. Objašnjenje ovih rezultata može se naći u postavci sledeće dve hipoteze: 1) tokom ispiranja ćelija hladnom destilovanom vodom može doći do disocijacije enzima iz ćelijskog zida, koji su odgovorni za osmoregulaciju; 2) izloženost bakterijskih ćelija rastvorima različitih osmotskih pritisaka može dovesti do povećanja autolitičke aktivnosti, što se dešava prilikom inkubacije istih u 0.2M rastvoru NaCl.

Takođe je ustanovljeno da pH sredine u rasponu od 5.0 do 5.5 utiče na povećanje autolize ćelija laktobacila (Kang i sar., 1998), dok se optimalna pH

vrednost za autolizu laktokoka u fazi eksponencijalnog rasta kretala u opsegu pH 6.0 do 7.5, a pri temperaturi od 30°C (Ostlie i sar., 1995).

Stepen autolize takođe varira u zavisnosti od starosti ćelije (Kang i sar, 1998; Ostlie i sar, 1995). Poznato je da prelazni period tokom rane eksponencijalne faze rasta uključuje stadijum neuravnoteženog rasta, gde se hemijski sastav ćelija razlikuje tokom svih stadijuma rasta. Ćelije u ranoj i mideksponencionalnoj fazi rasta imaju veću autilitičku aktivnost od onih u stacionarnoj fazi (Kang i sar., 1998). Stoga se može zaključiti da su autolizini važni za rast bakterija i ćelijsku deobu. Chapot-Chartier i sar. (1994) su ispitivali autolizu dva soja *Lactococcus lactis* i otkrili prisustvo malih neliziranih ćelija s normalnom spoljnom membranom i gustom citoplazmom, što ukazuje na to da su te stabilne ćelije verovatno mlade ćerke ćelije za koje formiranje nove pregrade još nije počelo. Ovaj rezultat potvrđuje da je autoliza ćelija BMK povezana sa deobom ćelije.

Autoliza ćelija starter bakterija uglavnom je proučavana u tečnim sistemima (medijumi ili pufer sistemi). U takvim uslovima, stepen autolize zavisi od vrste bakterije i faze rasta ćelije, kao i od izvora ugljenika, temperature i prisustva/dodatka soli i drugih kationa (Bie i Sjöström, 1975a, 1975b; Langsrud i sar., 1987). Razlika između samih podvrsta starter bakterija je takođe prisutna. Crow i sar. (1993) su objavili da su sojevi vrste *L. lactis* subsp. *lactis* otporniji na liziranje od sojeva *L. lactis* subsp. *cremoris* u siru kao medijumu. Međutim, obrnut zaključak je uočen u istraživanjima u kojima su korišćeni puferni bujoni, gde su sojevi *L. lactis* subsp. *lactis* pokazali veći stepen autolize od ćelija *L. lactis* subsp. *cremoris* (Langsrud i sar., 1987).

Autoliza starter kultura u siru tokom zrenja se može pratiti ispitivanjem intracelularnih marker enzima, kao što su laktat dehidrogenaza (LDH), glukoza-6-fosfat dehidrogenaza, post-prolin dipeptidil aminopeptidaza, lizilaminopeptidaza, itd., koje su oslobođene u sirnu grudu (Crow i sar., 1995; Hannon i sar., 2003; Wilkinson i sar., 1994). I laktobacili i laktokoke sadrže LDH, s tim što LDH kod laktokoka zahteva prisustvo fruktoze-1.6-bisfosfata (FBP) kao ko-faktora za aktivaciju. Stoga je moguće razlikovati koja grupa bakterija je lizirala (Hannon i sar., 2003). Marker enzimi za procenu autolize trebalo bi da se u visokoj koncentraciji nalaze u ćelijama startera, a takođe bi trebalo da pokazuju stabilnost u sirevima i pufernim ekstraktima (Crow i sar., 1995). Prisustvo ispuštene DNK iz ćelija startera se takođe može

upotrebiti za procenu autolize, mada prilikom ispitivanja treba uzeti u obzir razgradnju DNK, što može uticati na krajnji rezultat (Bie i Sjöström, 1975a, 1975b).

2.1.4. Atenuacija ćelija BMK

„Oslabljeni”, odnosno atenuirani starteri su bakterije mlečne kiseline koje ne mogu da rastu i proizvode značajne količine mlečne kiseline, ali su još uvek sposobni da sintetišu aktivne enzime. Atenuacija se može izvršiti metodama kao što je zagrevanje, zamrzavanje i odmrzavanje, sprej-sušenje, tretiranje lizozimom ili pojedinim rastvaračima, a postoji i selekcija laktoza negativnih mutanata, kao idejno rešenje čija primena u praksi još nije zaživela, s obzirom na postojanje zabrane genetskog inženjeringa u prehrambenoj industriji. Svi ovi tretmani atenuacije imaju za cilj smanjenje acidifikujućih osobina BMK uz istovremeno očuvanje aktivnosti proteolitičkih enzima (Klein i Lortal, 1999; Wilkinson i Kilcawley, 2005).

Kada je primena atenuacije zagrevanjem u pitanju, potrebno je definisati odgovarajući odnos temperatura/vreme za svaku grupu mikroorganizama. Još 1975. godine švedski naučnici su izvršili prva istraživanja na temu primene termičkog tretmana na starter kulture, sa ciljem povećanja nivoa proteolitičkih enzima u švedskom polutvrdom siru. Pri tom su definisali sledeće termičke režime atenuacije: za mezofilne startere primenili su režim inaktivacije na 59°C u trajanju od 15 sek, a za termofilne startere (kao što je *Lb. helveticus*) 69°C, 15 sek. Rezultati istraživanja su pokazali odlaganje produkcije mlečne kiseline za 5 do 10 sati, a vreme zrenja ogleđnih sireva je skraćeno za mesec dana. Senzorna analiza sireva je takođe bila zadovoljavajuća, gde ni jedan uzorak nije posedovao aromu gorčine (Pettersson i Sjöström, 1975).

Daljim istraživanjima ustanovljeno je da od visine primenjenog termičkog tretmana u mnogome zavisi stepen proteolitičke aktivnosti atenuiranih startera. Castañeda i sar. (1990) su uočili da termički tretman od 64°C u trajanju od 18 s redukuje aktivnost fermentacije laktoze i formiranja mlečne kiseline za 90% kod bakterija *Lb. helveticus*, dok se aktivnost proteinaza ćelijskog zida ovih bakterija smanjuje za 60%, a aktivnost aminopeptidaza za 10%. Međutim, povećanjem temperature za samo 2°C (sa 64 na 66°C) drastično redukuje aktivnost i proteinaza i peptidaza. Asensio i sar. (1995) su došli do sličnih zaključaka upoređujući termičke

tretmane nad *Lb. casei* i *Lb. plantarum*, čiji su režimi iznosili 50 i 54°C u trajanju od 15 sek. Stoga je od izrazitog značaja odrediti pravi temperaturni režim potreban za termičku atenuaciju svake vrste bakterija.

Termički tretman odlaže produkciju kiseline, a Exterkate i sar. (1987) su zaključili da je poželjno da se 1 sat pre zagrevanja izvrši hlađenje suspenzije ćelija bakterija na 5-8°C, kako bi proces odlaganja produkcije kiseline bio što efikasniji. Petterson i Sjöström (1975) su ustanovili da je smanjenje produkcije kiseline u najvećem broju slučajeva povezan sa prestankom sposobnosti rasta atenuiranih startera. Međutim, mehanizmi toplotne redukcije acidifikacione sposobnosti BMK nisu u potpunosti razjašnjeni (Klein i Lortal, 1999). Autolizini bakterija su termostabilni i preživljavaju temperature ključanja (Valance i Lortal, 1995), a takođe proces atenuacije može da se odvija na različitim nivoima, kao što je denaturacija enzima koji učestvuju u transportu materija kroz ćelijski zid i membranu, ili fizičko oštećenje same membrane, ili denaturacija β -galaktozidaze (Klein i Lortal, 1999). Bie i Sjöström (1975a) su ustanovili da sa povećanjem temperature dolazi do isticanja DNK, denaturacije proteolitičkih enzima i produženja lag faze. Liziranje atenuiranih ćelija se takođe može pratiti kvantifikacijom oslobođene leucin-aminopeptidaze (Asensio i sar., 1996).

Atenuacija ćelija BMK zagrevanjem se pokazala kao vrlo efikasan metod ubrzanja zrenja sireva. Naime, glavna uloga atenuiranih startera u zrenju sireva je hidroliza peptida srednjih lanaca, a poznato je da su peptidaze intracelularni enzimi BMK (Kunji i sar. 1996). Stoga njihovo prisustvo u siru može biti indikator liziranja ćelija (Lortal i sar., 1997). Tako su Asensio i sar. (1996) izvršili kvantifikaciju aminopeptidaza leucina u kozjem siru, što predstavlja dokaz da je došlo do liziranja atenuiranih ćelija startera. To dokazuje i povećanje stepena hidrolize masti i oslobađanje veće količine slobodnih masnih kiselina u sirevima, kojima su u toku izrade dodati atenuirani starteri (Klein i Lortal, 1999). Prisustvo intracelularnih lipaza/esteraza dovodi do stvaranja komponenti arome, što svakako utiče na aromu finalnog proizvoda.

Ipak, u poređenju sa zagrevanjem, tretman zamrzavanjem i naglim odmrzavanjem dovodi do većeg oslobađanja enzima i formiranja većih količina slobodnih masnih kiselina (El Soda i sar., 1991, 1999). Ipak, destruktivan efekat zagrevanjem je znatno veći, što je dokazano u mnogim istraživanjima (El Soda i sar,

1999; Thiboutout i sar., 1995). Tako je grupa istraživača izvršila proces atenuacije ćelija *Lb. helveticus* i *Lb. casei* zamrzavanjem na -20°C u toku 24h, a potom naglim odmrzavanjem na 40°C , dok su paralelna ispitivanja vršena zagrevanjem na 65°C u toku 15 sekundi. Ustanovljeno je da je vijabilnost ćelija nakon termičkog tretmana opala za 3 log ciklusa, dok je nakon zamrzavanja i odmrzavanja smanjenje vijabilnosti ćelija iznosilo od 1 do 2 log ciklusa (El Soda i sar., 1999).

Fizičko-hemijski efekti zamrzavanja i odmrzavanja su višestruki i kompleksni. Atenuacija zamrzavanjem, pa zatim odmrzavanjem dovodi do oslabljenja strukture peptidoglukana usled formiranja kristala leda unutar ćelije, koji oštećuju membranu i čine je poroznom, što rezultuje autolizi ćelije. Proces zamrzavanja takođe može da rezultuje dehidraciji ćelije, s obzirom na to da se zamrzavanjem sadržaj vode smanjuje kako u medijumu, tako i u unutrašnjosti ćelije, pri čemu koncentracija rastvora unutar ćelije raste, što dovodi do oštećenja ćelijskog zida (Ray i Speck, 1973; Klein i Lortal, 1999).

Zamrznute pa naglo odmrznute ćelije bakterija *Lb. helveticus*, dodate kao dopunska kultura u mleko prilikom proizvodnje sira, pokazale su znatno veći stepen proteolize i formiranja komponenti arome u poređenju sa atenuiranim ćelijama *Lb. casei* (Aly, 1990) ili *Lb. bulgaricus* i *S. thermophilus* (Aly, 1996). U takvim sirevima je detektovan znatno veći sadržaj azotnih materija rastvorljivih u 5% PTA, što se pripisuje povećanoj koncentraciji intracelularnih enzima BMK dospelih nakon liziranja njihovih ćelija (Bie i Sjöström, 1975). Bartels i sar. (1987) su detektovali povećanje koncentracije azotnih materija rastvorljivih u 12% TCA za 50-60%, a azotnih materija rastvorljivih u 5% PTA za 80-100% u odnosu na kontrolni uzorak. Senzorna analiza oglednih sireva tokom zrenja je pokazala znatno poboljšanje arome uz odsustvo gorkih komponenti, što se takođe pripisuje dejstvu intracelularnih enzima atenuiranih startera.

Inaktivacija mikroorganizama se takođe može postići primenom pulsirajućih električnih polja - PEP (*eng. Pulsed electric fields* - PEF), koja je bazirana na indukciji električnog potencijala kroz ćelijsku membranu bakterija, čija se suspenzija nalazi u električnom polju. Letalni efekat PEP na ćelije bakterija nastaje u momentu kad transmembranski električni potencijal pređe kritičnu vrednost u širokom opsegu (Zhang i sar., 1995). Stoga se ovaj proces uglavnom koristi u obradi tečnih namirnica kao jedan vid netermičke tehnologije. Iako je PEP metod uveden još 1960-ih godina,

nedavni tehnološki razvoj ukazuje na ponovni interes za primenom ove tehnologije (Wouters i sar., 2001a). Potreba za novim metodama konzervisanja hrane, uključujući i PEP tretman, bilo kao zasebnu tehniku ili u kombinaciji sa drugim postupcima, nastala je još u 90-im godinama prošlog veka zbog povećane potrebe potrošača za minimalno prerađenim i visoko kvalitetnim prehrambenim proizvodima. Pulsirajuća električna polja, pulsevi oscilirajućih magnetnih polja, elektromagnetna polja indukovana mikrotalasima, elektron jonizirajuće zračenje, intenzivni svetlosni pulsevi i tretmani visokim pritiscima predstavljaju nove tehnike ne-termičke pasterizacije, koje se mogu kombinovati kako bi se ukupan broj mikroorganizama smanjio na željeni nivo (Mertens i Knorr, 1992).

2.2. Rezistentnost mikroorganizama na indukovani stres

Prema definiciji, stres predstavlja promenu u genomu, proteomu ili okolnim uslovima, koja dovodi do smanjenog rasta ili redukcije potencijala preživljavanja ćelije mikroorganizama. Postoji veliki broj različitih vrsta stresa kojima bakterije mogu biti izložene, a da li će preživeti zavisi od toga da li su oštećene vitalne komponente ćelije, kao što je ćelijska membrana, struktura proteina i integritet DNK. Zapravo, dve komponente od čijeg oštećenja prilikom izlaganja stresu zavisi da li će ćelija preživeti ili ne su citoplazma i ćelijska membrana (kod G(-) bakterija to su periplazma i spoljašnja membrana) (Booth i sar, 2002). Neznatno alkalni pH sredine citoplazme, niska jonska jačina i niska koncentracija Na⁺ jona su samo jedni od pokazatelja održivosti integriteta citoplazmatične membrane (Booth, 2002).

Generalno je prihvaćeno da usporavanje ili prestanak rasta ćelije, kao i ulazak u stacionarnu fazu rasta predstavlja dodatnu otpornost ćelije na stres. Stoga se može uočiti da ćelije, koje ulaze u fazu usporenog rasta, pokazuju veću otpornost na uslove povećane kiselosti, promene temperature, prisustva alkalnih jedinjenja, vodonik peroksida, superoksida, kao i povećane koncentracije soli, itd. (Booth, 2002).

Literaturni podaci ukazuju na postojanje heterogenosti unutar iste populacije bakterija, a značaj postojanja heterogenosti se ogleda u sposobnosti male frakcije ćelija bilo koje populacije da preživi izlaganje uslovima stresa, koji vrše inaktivaciju većeg dela populacije (Booth, 2002). Smrt ćelije je ekponencijalno zavisna od dužine

trajanja indukovanoog stresa (Withel, 1942). Međutim, važno je istaći da ćelija može podneti značajna smanjenja aktivnosti bilo kog enzima bez da nužno pretrpi bilo zastoje u rastu ili smanjenje potencijala preživljavanja. Ipak, modulacija svakog proteina neophodnog za rast i razvoj ćelije u kritičnom opsegu, utiče na ćelijske performanse (Booth, 2002). S druge strane, ćelije sa različitim koncentracijama istog enzima mogu imati isti stepen rasta (Varma i Palsson, 1994). Postoji fundamentalna pretpostavka da je eksponencijalni rast ćelija jedne kulture uniforman, odnosno da udvostručavanje mase ćelija nastaje istom brzinom kao i njihova deoba. Shodno tome, ukoliko postoje varijacije unutar same populacije, one su maskirane prosečnim stepenom rasta, odnosno teško ih je detektovati na ćelijskom nivou. Međutim, kada su te iste ćelije izložene nekom stresu, često se uočavaju varijacije u osetljivosti ćelija u okviru iste populacije bakterija.

Iako neke preživjele ćelije, nastale nakon produžene ili više puta ponovljene inkubacije, predstavljaju mutante, većina preživjelih ćelija su fiziološki varijeteti, koji nakon ponovne inokulacije poseduju iste osobine kao originalna populacija iz koje su potekle. Stoga su ove preživjele ćelije dokaz postojanja heterogenosti unutar određene populacije mikroorganizama, koje poseduju sposobnost preživljavanja u ekstremnim spoljašnjim uslovima (Booth, 2002).

Fenotipska heterogenost se može definisati kao metastabilno variranje ćelijskih parametara, generisano epigenetskim mehanizmima. Diverzitet unutar jedne populacije omogućava preživljavanje određenog broja ćelija nakon dejstva letalnog stresa, koji bi inače uništio celu populaciju (Dhar i McKinney, 2007). Fenotipska heterogenost ne podrazumeva promenu u genomu ćelije (Avery, 2006). U pitanju su nestabilne ili metastabilne promene unutar jedne populacije, koje nisu nasledne niti se prenose na ćerke-ćelije. Ipak, varijacije od ćelije do ćelije su maskirane u tradicionalnoj bujonskoj kulturi (Dhar i McKinney, 2007).

2.2.1. Perzisteri kao odgovor ćelije na stres

Još četrdesetih godina prošlog veka, irski doktor Bigger (1944) je uočio da je nemoguće izvršiti potpunu inaktivaciju kulture bakterija *Staphylococcus* dejstvom penicilina, pa je preživelim ćelijama dao naziv "perzisteri". Ove ćelije nisu rezistentni mutanti, već ćelije koje ne rastu, ali ni ne umiru u prisustvu antibiotika i o njima se

vrlo malo zna, s obzirom na činjenicu da se radi o malobrojnoj frakciji u okviru iste populacije. Nedavno je otkriveno da patogene bakterije formiraju biofilm, koji im omogućava da budu rezistentne na antibiotike. Biofilm zapravo ne sprečava penetraciju antibiotika, ali predstavlja barijeru za komponente imunog sistema. Biofilm takođe predstavlja zaštitnu sredinu za perzister ćelije, koje nastavljaju da rastu nakon prestanka tretmana antibioticima (Lewis, 2010).

Ustanovljeno je da se perzister ćelije formiraju u toku mid-ekspencijalne faze rasta, gde im broj naglo raste, dok formiranje istih izostaje u početnom stadijumu ekspencijalne faze. Prisustvo malog broja perzistera na početku logaritamske faze rasta predstavlja ćelije koje su preostale iz stacionarne faze prethodno propagiranih ćelija. Stoga, održavanje populacije u početnom stadijumu ekspencijalne faze serijom reinokulacije može biti efikasan način istrebljenja perzister ćelija (Keren i sar., 2004).

Broj perzister ćelija nastavlja da raste nakon mid-ekspencijalne faze i dostiže maksimum u stacionarnoj fazi rasta (Keren i sar., 2004; Spoering i Lewis, 2001). Mehanizmi pripreme ćelije za gladovanje u surovim uslovima su verovatno razlog zbog kojeg broj ovih ćelija naglo raste u stacionarnoj fazi rasta.

Postoji više pretpostavki o nastanku perzister ćelija. Pojedini autori pretpostavljaju da se ove ćelije nalaze u zaštićenoj zoni ćelijskog ciklusa u trenutku dejstva antibiotika ili da su u pitanju ćelije koje imaju sposobnost rapidne adaptacije na stres dejstvom antibiotika (Massey i sar., 2001). Takođe se veruje da otpornost perzistera nastaje usled toga što se ove ćelije nalaze u nedeljivoj tzv. "dormant" fazi, sličnoj kao lag faza rasta, a antibiotici uništavaju samo ćelije u fazi deobe ili pre samog početka deobe (Bigger, 1944).

U cilju razjašnjenja prirode perzister ćelija, neophodno je ustanoviti da li se ove ćelije razlikuju od ostalih pre samog izlaganja stresu. Balaban i sar. (2004) su ustanovili da, za razliku od ostalih ćelija, perzister ćelije se odlikuju usporenim stepenom rasta. Takođe je ustanovljeno da ove ćelije mogu da iz usporene faze rasta spontano pređu u normalnu fazu rasta, generišući populaciju koja postaje senzitivna na antibiotike. Stoga, pomenuti autori su zaključili da otpornost određene populacije potiče od svojstvene heterogenosti unutar samih faza rasta ćelija bakterija.

Kao široko rasprostranjene u prirodi, BMK se takođe odlikuju postojanjem fenotipske heterogenosti, koja im omogućava preživljavanje u ekstremnim uslovima. Sposobnost laktobacila da održavaju umeren intracelularni pH sredine u uslovima povećane kiselosti je samo jedan od pokazatelja preživljavanja ovih bakterija na niskim pH sredine. Adaptacija laktobacila niskim pH sredine je osobina koja ih štiti od različitih tipova stresa (de Angelis i Gobbetti, 2004).

Uobičajeni odgovor ćelije na stres se ogleda u promeni ćelijske morfologije, pre svega filamentaciji, u kojoj se ćelijski rast nastavlja, a izostaje deoba ćelije. Filamentacija nastaje kao odgovor ćelije na dejstvo antibiotcima, desikacije, visoke slanosti, zračenja i drugih formi oštećenja DNK, indukcije profaga, temperaturnih ili pH ekstrema, organskih rastvora, kao i u biofilmovima (Friedberg i sar., 1995; Mattick i sar., 2000; Mellefont i sar., 2005).

Ingham i sar. (2008) su ispitivali rast ćelija *Lactobacillus plantarum* pri niskim pH sredine (pH 3) i detektovali subpopulaciju koja uspeva da raste pri navedenim uslovima. Autori su zaključili da, unutar genetski homogene populacije soja *Lb. plantarum* WCFS1, postoji subpopulacija otporna na niske pH sredine, a koja se sastoji od 1-2% kulture u mid-log fazi. Filamentozne ćelije se potom dalje razvijaju kroz nesimetričnu ćelijsku deobu, koja je karakteristična za heterogenu subpopulaciju ćelija. Međutim, kada dejstvo stresa prestane, ćelije *Lb. plantarum* prelaze u normalnu fazu rasta, gde se uočava opadanje stepena heterogenosti (Avery, 2006; Booth, 2002).

2.3. Probiotska svojstva BMK

Proizvodnja prehrambenih proizvoda "treće generacije" sa sojevima laktobacila i bifidobakterija, koji čine sastavni deo crevne mikroflore, predstavlja značajnu oblast u prehrambenoj industriji zbog niza benefitnih efekata, koje ovi proizvodi ispoljavaju. Naime, veruje se da ovi proizvodi poseduju niz terapijskih svojstava kao što su: jačanje imunog sistema, smanjenje sadržaja serumskog holesterola u krvi, razgradnja toksičnih materija, sprečavanje raznih oblika dijareje, antimikrobna aktivnost i sprečavanje sinteze prekancerogenih enzima, koja se javlja kao potencijalna mogućnost, uspostavljanje balansa intestinalne mikroflore, itd (Sanders, 2000). Pored terapijskog, ove bakterije deluju benefitno i sa nutritivnog aspekta, što se ogleda kroz uticaj na povećanu dostupnost određenih minerala za

ljudski organizam, kao što su kalcijum, cink, gvožđe, mangan, bakar i fosfor (Annuk i sar., 1999), a takođe i kroz poboljšanu probavu i sintezu vitamina (Mombelli i Gismondo., 2000).

Naime, bakterije intestinalnog porekla se nazivaju još i "probiotici", što u prevodu znači "za život", jer povoljno utiču na organizam korisnika (FAO/WHO, 2002). Vrste intestinalnih bakterija koje se najčešće koriste u prehrambenoj industriji su vrste roda *Lactobacillus* (*Lb. acidophilus*, *Lb. casei* i *Lb. rhamnosus*), *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum* i *B. breve*), *Streptococcus* (*S. faecum*) i *Propionibacterium* (*P. freundenreichii* ssp. *shermanii*) (Kurmman, 1988; Perea Vélez i sar., 2007). Poslednjih godina je ustanovljeno da neki sojevi *Lb. plantarum* takođe poseduju probiotska svojstva, pa su i ove bakterije našle primenu u prehrambenoj industriji kao probiotici.

Probiotici se uglavnom koriste kao dopunske, tzv. adjunct kulture, a da bi ispoljili navedena benefitna svojstva, moraju da poseduju sposobnost prolaska kroz gastrointestinalni trakt, što predstavlja sposobnost preživljavanja uslova u prisustvu želudačnog soka (koji iznosi oko pH 2.0) i toleranciju na žučne soli (Gibson i sar., 2000). Nakon prolaska i preživljavanja ovih surovih uslova, ćelije se razmnožavaju i u donjem delu digestivnog trakta formiraju kolonije, koje tada počinju da ispoljavaju benefitna svojstva za organizam domaćina. Berrada i sar. (1991) su ustanovili da je potrebno da prođe 90 min od momenta unosa probiotika putem hrane do njihovog prolaska kroz želudac. Ipak, digestivni proces traje duže, pa je vrlo značajno da bakterije poseduju otpornost na uslove u želucu i dvanaestopalačnom crevu (Nousiainen i sar., 2004). Vrlo mali broj bakterija podnosi niske pH sredine želuca, koji može da ide i do pH 1.5 (Lankaputhra i Shah, 1995). S obzirom na to da veliki broj bakterija biva inhibiran tokom fermentacionih procesa u hrani kada pH dostigne 4.0, tolerantnost na izrazito kiselu sredinu predstavlja jednu od karakteristika koje probiotske bakterije poseduju. Lorca i sar. (1998) su ustanovili da sposobnost preživljavanja ćelija *Lb. acidophilus* CRL 639 pri niskim pH sredine zavisi od faze rasta, gde su ćelije u stacionarnoj fazi bile znatno otpornije od ćelija u ekspanzionalnoj fazi rasta, kojima je bilo potrebno da prođe određeno vreme adaptacije da bi se prilagodile i ispoljile tolerantnost na kiselu sredinu.

Nakon prolaska kroz želudac, probiotske bakterije prolaze kroz duodenum, u kojem se vrši sekrecija žučnih soli, koje redukuju sposobnost preživljavanja mnogih

bakterija. Objašnjenje se može naći u tome što u sastav ćelijske membrane ulaze lipidi i masne kiseline, koje se razgrađuju u prisustvu žučnih soli (Jin i sar., 1998). Pošto su prošle kroz surove uslove gornjeg crevog trakta, bakterije se kolonizuju na epitelnom delu donjeg digestivnog trakta (Conway i sar., 1987). Stoga, probiotske osobine mogu da imaju one bakterije koje su u stanju da prežive u kiseljoj sredini (pH 2.0-2.5) najmanje 90 minuta, tolerišu prisustvo žučnih soli, poseduju sposobnost vezivanja za epitelium creva i mogućnost kolonizacije u donjem intestinalnom traktu, pre nego počnu da ispoljavaju terapeutska svojstva.

Probiotska svojstva određenih bakterija se definišu primenom raznih testova *in vitro*, koji se odnose na mehanizme probiotskih efekata. Ipak, ustanovljeno je da trenutno dostupni testovi nisu u potpunosti adekvatni za proveru funkcionalnih efekata potencijalnih probiotskih bakterija u ljudskom organizmu, s obzirom na to da je za adekvatan rezultat potrebno izvršiti test *in vivo* na ljudima (FAO/WHO, 2002). Na primer, otpornost na žučne soli ispitivana *in vitro* trebalo bi da bude u korelaciji sa preživljavanjem bakterija u gastro uslovima *in vivo* (Conway i sar., 1987).

In vitro testovi, koji se u današnje vreme koriste za određivanje probiotskih sposobnosti bakterija su sledeći (FAO/WHO, 2002):

- Otpornost na želudačnu kiselinu;
- Otpornost na žučne soli;
- Sposobnost vezivanja za mukožu i/ili epitelne ćelije donjeg digestivnog trakta;
- Antimikrobna aktivnost na potencijalne patogene bakterije;
- Sposobnost redukovanja adhezije patogenih mikroorganizama na površini creva;
- Otpornost na spermicide (primenjuje se kod probiotika koji se koriste za vaginalnu upotrebu u farmaceutskoj industriji).

In vitro testovi su od vitalnog značaja za procenu probiotskih sposobnosti mikroorganizama, gde se podrazumeva upotreba savremenih i validnih metoda za specifikaciju bakterija. Pored ovih testova, takođe se preporučuje kombinovanje fenotipskih i genetskih testova (FAO/WHO, 2002).

2.4. Pulsirajuća električna polja (PEP) kao tehnika atenuacije BMK

Metode termičke obrade se koriste u prehrambenoj industriji u cilju obezbeđenja sigurnosti hrane. Termičkim tretmanom se vrši inaktivacija patogenih mikroorganizama, kao i nepoželjnih enzima, a takođe se smanjuje i ukupan broj mikroorganizama, čime se povećava trajnost gotovog proizvoda. Međutim, iako se termičkom obradom postiže bezbednost hrane, različiti režimi termičke obrade mogu nepovoljno da utiču na senzorna i nutritivna svojstva prehrambenih proizvoda (Qin i sar., 1995b).

Prvi koncept primene pulsirajućih električnih polja bio je postavljen krajem 60-ih godina prošlog veka. Hamilton i Sale (1967) su vršili ispitivanja metode netermičke sterilizacije prehrambenih proizvoda primenom pulsirajućih električnih polja, sa ciljem inaktivacije mikroorganizama. Pri tom su ustanovili da ova tehnika poseduje letalne efekte na vegetativne forme mikroorganizama, dovodeći do njihove inaktivacije, a da pri tom ne menja fizička i senzorna svojstva prehrambenih proizvoda, te se kao takva može koristiti u svrhu produženja roka trajanja istih. Tehnološki razvoj ove metode nastao je 90-ih, kada se pokazala spremnost za primenu ovog tretmana u industrijske svrhe. Reina i sar. (1998) su detektovali smanjenje broja ćelija *L. monocytogenes* do 3 log₁₀ jedinice u mleku tretiranom pulsirajućim električnim poljima, dok su Raso i sar. (1999) detektovali inaktivaciju *Staphylococcus aureus* i koagulaza negativnih *Staphylococcus* vrsta za 4, odnosno 2 log ciklusa nakon primenjenog PEP tretmana.

Stoga pulsirajuća električna polja (PEP), kao netermička tehnologija, predstavljaju alternativu tradicionalnoj pasterizaciji tečnih namirnica. Mehanizam inaktivacije mikroorganizama se temelji na electroporaciji ćelijske membrane, koja nastaje primenom ponovljenih kratkih pulseva (dužine 1-10 μs) visokog intenziteta električnog polja (15-40 kV/cm) (Jaeger i sar., 2009). Efekat inaktivacije većine truležnih i patogenih mikroorganizama je postignut tretiranjem sokova raznog voća i povrća (Heinz i sar., 2003; Nguyen i Mittal, 2007), mleka (Fernandez-Molina i sar., 2005; Sampedro i sar., 2005; Sepúlveda-Ahumada i sar., 2000; Sepulveda i sar., 2005; 2009) ili model sistema (Gómez i sar., 2005; Pothakamury i sar., 1995; Ulmer i sar., 2002), pri čemu tretman nije uticao na nutritivna i senzorna svojstva hrane (Elez-Martínez i Martin-Belloso, 2007; Jia i sar., 1999).

PEP procesi su uglavnom izvode na sobnoj ili temperaturi frižidera u trajanju od nekoliko mikro- do nekoliko milisekundi, kako bi efekat zagrevanja hrane bio minimalan. Stoga se ova tehnologija smatra vrhunskom u odnosu na tradicionalnu termičku obradu hrane, jer dovodi do očuvanja fizičkih (viskozitet i tekstura), senzornih (aroma i boja) i nutritivnih svojstava hrane, odnosno ne uzrokuje značajne hemijske promene sastojaka hrane (Fernandez-Molina i sar., 2005).

Značajan aspekt u PEP tehnologiji svakako predstavlja generisanje visokog električnog napona, zatim dizajn komore koja održava ujednačen tretman sa minimalnim porastom temperature, kao i dizajn elektroda koje omogućavaju minimalan efekat elektrolize. Pulsirajuće električno polje postiže se sistemom modulacije pulsa pomoću kojeg se pretvara jednosmetna struja niskog napona u pulsirajuće električno polje visokog intenziteta i to pomoću više kondenzatora povezanih serijski ili paralelno, iz kojih se naknadno energija oslobađa u obliku pulseva visokog napona (Zhang i sar., 1995). Za tretman hrane uobičajeno se koriste naponi u rasponu od 20-80 kV/cm, koji se primjenjuju na tečnim proizvodima smeštenim između dve elektrode (Barbosa-Cánovas i sar., 1999). Ali primena ove tehnologije je ograničena na prehrambene proizvode koji mogu izdržati visoke napone električnih polja, odnosno koji imaju nisku električnu provodljivost (konduktivitet) i koji ne sadrže ili ne formiraju mehure (Calderon-Miranda i sar., 1999). Tečni prehrambeni proizvodi predstavljaju zapravo elektro-provodljive materijale zbog prisustva visokih koncentracija jona kao nosioca naelektrisanja. Da bi se generisao visok napon pulsirajućeg električnog polja unutar hrane, potrebno je da veliki tok električne struje prostruji kroz deo hrane u komori u toku vrlo kratkog vremenskog perioda (nekoliko mikrosekundi). Takođe, vreme između dva pulsa je znatno duže od širine (dužine) samog pulsa. Stoga, generisanje pulsa podrazumeva sporo punjenje i brzo pražnjenje električne energije u uređaju kao što je kondenzator (Zhang i sar., 1995).

2.4.1. Faktori koji utiču na inaktivaciju mikroorganizama primenom PEP

Inaktivacija mikroorganizama putem pulsirajućih električnih polja zavisi od nekoliko faktora koji se mogu podeliti u tri grupe (Saulis, 2010):

- 1) Procesni faktori, kao što su jačina polja, širina (dužina) pulsa, vreme i temperatura tretmana, polarnost pulsa i oblik talasa;
- 2) Tretirani medijum (pH, konduktivitet (provodljivost), prisustvo jonskih i antimikrobnih jedinjenja);
- 3) Entitet mikroorganizama (tip i faza rasta).

2.4.1.1. Procesni faktori

2.4.1.1.1. Intenzitet (jačina) električnog polja

Intenzitet (jačina) električnog polja [E] je jedan od glavnih faktora koji utiču na inaktivaciju mikroorganizama (Hülshager i Niemann, 1980), a definiše se kao razlika električnog potencijala [U] između dve zadate tačke u prostoru, podeljena sa njihovom međusobnom razdaljinom [d] (Zhang i sar, 1995):

$$E = \frac{U}{d} \quad (\text{kV/cm}) \quad (3)$$

Dakle, ukoliko se poveća udaljenost između elektroda [d], tada će biti potreban veći napon kako bi se postigla željena jačina električnog polja. PEP komore sa smanjenom udaljenošću elektroda, tj. većim intenzitetom električnog polja, omogućavaju značajno veći stepen inaktivacije u poređenju sa komorama sa smanjenim elektrodnim područjem i većom dužinom pulsa (Hülshager i sar., 1981). Mikrobna inaktivacija se povećava kada jačina električnog polja dostigne nivo iznad kritične vrednosti transmembranskog potencijala (Qin i sar., 1998). U ćelijama mikroorganizama, strukturne promene usled razlike potencijala od oko 1V dovode do nepovratnog gubitka funkcije membrane (Sale i Hamilton, 1967, 1968). To je u skladu sa teorijom electroporacije, gde je uzrokovana razlika potencijala kroz ćelijsku membranu proporcionalna primenjenoj jačini električnog polja. Kritična jačina električnog polja [E_c] ispod koje ne dolazi do inaktivacije, povećava se s povećanjem

transmembranskog potencijala svake ćelije. Ukoliko je ćelija veća, veći će transmembranski potencijal biti generisan kroz ćelijsku membranu, a time je i E_c veće (Jeyamokondan i sar., 1999; Saulis, 2010).

Širina (dužina) pulsa takođe utiče na kritičnu jačinu električnog polja. U slučaju pražnjenja punog kondenzatora [C] kroz otpornik [R], napon u komori eksponencijalno opada sa dužinom (trajanjem) pulsa (τ):

$$\tau = R \cdot C \quad (4)$$

2.4.1.1.2. Vreme tretmana i frekvencija

Vreme tretmana [T] se definiše kao proizvod konstante vremena i broja pulseva:

$$T = n \cdot \tau = n \cdot R \cdot C \quad (5)$$

gde je: [T] – vreme tretmana (μ s); [n] - broj pulseva, [τ] - širina pulsa;
[R] - otpor u polju tretmana (Ω); [C] - kapacitet kondenzatora (μ F).

Tečni prehrambeni proizvodi se sastoje od vode i hranjivih materija kao što su proteini, vitamini, trigliceridi i minerali. Kada su podvrgnuti pulsirajućim električnim poljima, polarizacija dipolnih molekula i grupno kretanje nosilaca naboja (jona) indukuje kapacitivnu struju i rezistentnu struju (Braithwaite i Weaver, 1990). Snaga otpora se može predstaviti jednačinom:

$$r = \frac{1}{\sigma} = \frac{R \cdot A}{d}; \Rightarrow R = \frac{d}{\sigma \cdot A} = \frac{r \cdot d}{A} \quad (6)$$

gde je: [r] - otpor hrane (Ω m); [σ] – provodljivost (konduktivitet) hrane (S/m); [A] – površina elektroda (m^2); [d] - razmak između dve paralelne elektrode (m); [R] - otpornost u polju tretmana (Ω).

Pojam koji je suprotan od otpornosti je provodnost [G] i predstavlja sposobnost materijala da propusti elektrone. Faktori koji utiču na intenzitet otpornosti su isti i za provodnost, samo se njihov uticaj odvija u suprotnom smeru. Stoga, provodnost je obrnuto proporcionalna otpornosti, odnosno srazmerno je proporcionalna provodljivosti [σ] u području [A], a obrnuto proporcionalna udaljenosti materijala [d], što se može predstaviti formulom:

$$G = \frac{1}{R} = \frac{\sigma \cdot A}{d} \quad (7)$$

Kapacitet za akumuliranje energije u kondenzatoru [C] može se izračunati uz pomoć provodljivosti tečne hrane [σ], razmaka između elektroda [d] i površine elektroda [A] prema sledećoj jednačini:

$$C = \frac{\tau}{R} = \frac{\tau \cdot \sigma \cdot A}{d} \quad (8)$$

Stepen preživljavanja mikroorganizama se može opisati kao zajednička funkcija jačine električnog polja i vremena tretmana. Hülsheger i sar. (1981) su pronašli matematički izraz za preživelu frakciju mikroorganizama, koji se može izraziti kao broj vijabilnih ćelija nakon tretmana [s] u odnosu na broj vijabilnih ćelija pre tretmana u smislu primenjene jačine električnog polja [E] i vremena tretmana [T]:

$$s = \left(\frac{T}{T_c} \right)^{-\frac{(E-E_c)}{k}} \quad (9)$$

gde je: [s] - stepen preživljavanja (%); [T_c] – kritično vreme tretmana (μ s); [E_c] - kritična vrednost E za 100% opstanak; [k] - nezavisan konstantan faktor. Parametri E_c, T_c i k se određuju ponaosob za svaki izabrani mikroorganizam.

Jednačina za stepen preživele frakcije ćelija bazirana je na temelju rezultata dobijenih u šaržnim testovima. Međutim, Qin i sar. (1995a) su ispitivali uticaj kontinuiranog PEP tretmana i dobili sasvim drugačije rezultate, koji se ne uklapaju u Hülsheger-ov model. Dobijeni rezultati ukazuju na logarotamsku zavisnost stepena preživele frakcije i vremena tretmana. Prema autorima, logaritamski opstanak frakcije mikroorganizama zavisi linearno od vremena, ukazujući na to da je inaktivacija mikroorganizama efikasnija primenom kontinuiranog PEP tretmana.

Hülsheger i sar. (1981) su ispitivali ubijanje bakterija različitim intenzitom električnog polja i različitim vremenima PEP tretmana i utvrdili da pri $E \geq 8$ kV/cm i vremenu > 50 μ s stepen opstanaka iznosio $\leq 50\%$, dok je pri kraćim tretmanima od 20 μ s potrebno povećati E na 20 kV/cm. Da bi se definisao efekat inaktivacije za svaki mikroorganizam, amplitude pulsa se mogu menjati u relativno širokom rasponu, pod uslovom da se smanjenje amplitude kompenzuje povećanjem dužine pulsa i obrnuto

(Gášková i sar., 1996). Međutim, veći intenzitet električnog polja (> 20 kV/cm) može dovesti do neželjenog pražnjenja u suspenziji, dok povećanje vremena delovanja dovodi do zagrevanja uzorka. Takođe, povećanje vremena dejstva (T) ima manji efekat od povećanja jačine polja (E) zbog dvostruke logaritamske zavisnosti između stepena preživljavanja i vremena tretmana (Hülsheger i sar., 1981). Ipak, Shoenbach i sar. (1997) su otkrili da, ukoliko je dužina pulsa manja od $5 \mu\text{s}$, tendencija je obrnuta: energija potrebna za inaktivaciju mikroorganizama ponovo se povećava.

Gášková i sar. (1996) su proučavali efekat visokonaponskih PEP tretmana na ćelije kvasaca i primetili da se određeni stepen inaktivacije može postići smanjenjem amplitude pulsa, a povećanjem dužine pulsa, gde je odnos amplituda-dužina pulsa bio vrlo strm kod kratkih pulseva ($1-10 \mu\text{s}$). Autori su otkrili da je stepen umiranja ćelija bio gotovo zanemarljiv prilikom dejstva najkraćih pulseva ($1 \mu\text{s}$), čak i kada su amplitude električnog polja bile najveće (tj. 28 kV/cm). Takođe, granica napona ispod koje se ne postiže dejstvo inaktivacije su amplitude niže od 2 kV/cm, gde čak i primena pulseva od $300 \mu\text{s}$ nije dovoljna da izazove znatan stepen inaktivacije ćelija kvasaca.

Osim jačine električnog polja i trajanja, frekvencija pulsa je takođe važan faktor. Elez-Martinez i Martin-Belloso (2007) su otkrili zadržavanje veće količine vitamina C u soku od narandže i gaspaćo supi prilikom primene PEP tretmana sa nižim frekvencijama pulsa.

Frekvencija, odnosno broj ponavljanja pulseva [f] se može definisati na sledeći način:

$$f = \frac{n \cdot F}{V} \text{ (Hz)} \quad (10)$$

gde je: [n] - broj pulseva; [F] - maseni protok fluida / hrane;
 [V] - zapremina komore.

Snaga [P] za kontinuirane pulseve pravougaonog oblika se definiše kao:

$$P = \frac{f \cdot \tau \cdot V^2}{R} \quad (11)$$

Da bi se postigao ne-termički tretman, energija koju hrana prima prilikom tretmana mora biti ograničena. Količina energije [Q] za pulseve pravougaonog oblika se određuje kao:

$$Q = \frac{E}{V} = \frac{U \cdot I \cdot \tau \cdot n}{V} = \frac{U^2 \cdot T}{R \cdot V} \quad (12)$$

gde je: [Q] – količina energije (kJ/L); [U] - napon (kV); [I] - struja (A); [T] - vreme tretmana (μ s); [V] - zapremina komore za PEP tretman (L).

2.4.1.1.3. Temperatura

Prema jednačini (12), električni naboj pulsa se oslabi u tečnu hranu u obliku Džulovog zagrevanja (Zhang i sar., 1995). Maksimalno povećanje temperature [Δt] se može izračunati pomoću osnovne termodinamičke jednačine:

$$\Delta t = \frac{Q}{\rho \cdot c} \quad (^\circ\text{C}) \quad (13)$$

gde je: [ρ] - gustina hrane (kg/dm^3); [c] - specifična toplota hrane ($\text{kJ}/\text{kg}^\circ\text{C}$).

Hülshager i sar. (1981) navode da je, nakon primene visokog napona pulsirajućeg električnog polja (*eng. High Voltage PEF – HVPEF*), porast temperature uzoraka bio uvek manji od 10°C , ukoliko se merenje izvrši odmah nakon tretmana. Međutim, isti autori su detektovali da se temperatura tretirane suspenzije postupno povećava tokom primene pulseva, mada je porast temperature uzoraka bio relativno nizak usled gubitka prenosa temperature od strane metalnih elektroda. Marquez i sar. (1997) su ispitivali efekat HVPEF tretmana na spore bakterija i ustanovili da je HVPEF tretman praktično izoterman (tj. $\Delta t = 0$), tako da nije bilo potrebe za hlađenjem uzoraka tokom tretmana. To je bilo moguće samo ukoliko je energija primenjenog pulsa bila niska. Kada se temperatura uzoraka kontinuirano povećava sa 5°C na 25°C u vodenom kupatilu, stepen preživljavanja spora je niži pri svim kombinacijama jačine i dužine pulseva, u odnosu na primenjeni PEP tretman na nižim temperaturama od 5 - 10°C . Veći letalni efekat na povećanim temperaturama se može objasniti povećanom električnom provodljivošću rastvora na višim temperaturama. Uticaj temperature može biti sličan efektu provodljivosti elektrolita. U slučaju neobloženih spora, s povećanjem temperature se povećava i kinetička energija jona u jezgru, pa je i njihovo isticanje brže. S povećanjem temperature takođe se može

povećati i kretanje molekula rastvora, koji se mogu kretati iz pravca jedne elektrode ka drugoj (Marquez i sar., 1997).

2.4.1.1.4. Polaritet pulsa

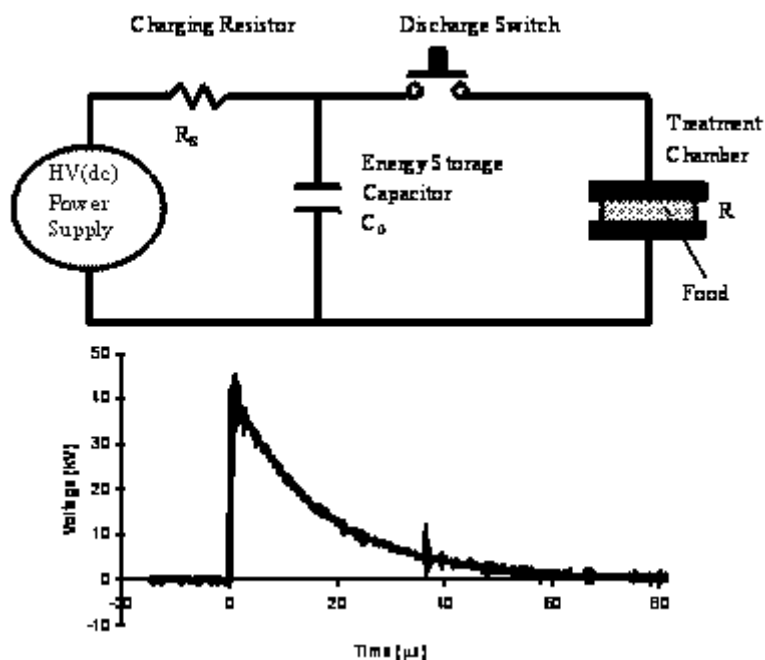
Kada je u pitanju polarizacija pulsa, bipolarni pulsevi imaju veći letalan efekat na ćelije mikroorganizama od monopolarnih, jer bipolarni pulsevi proizvode naizmenične promene u kretanju molekula, što uzrokuje stres u ćelijama i dovodi do električnog raspada ćelijske membrane. Štaviše, bipolarni pulsevi smanjuju taloženje čvrstih materija na površini elektroda, smanjuju elektrolizu hrane i imaju veći energetski efekat (Barbosa-Cánovas i sar., 1999). Takođe, prilikom primene bipolarnih pulseva ne dolazi do formiranja zaštitnih slojeva, što čini pulsirajuće električno polje uniformnim u toku tretmana. Stoga, bipolarni pulsevi su potencijalno efikasniji u odnosu na monopolarne u postizanju inaktivacije mikroorganizama (Zhang i sar 1995).

Marquez i sar. (1997) su proučavali vremenski razmak između pulseva i otkrili da je PEP tretman efikasniji kada je vreme između pulseva duže. Objašnjenje ovih rezultata moglo bi se naći u polaritetu pulsa. Žive ćelije pokazuju naboj i mogu migrirati na površinu elektrode formirajući zaštitni sloj prilikom uzastopne primene monopolarnih pulseva (Pethig, 1979). Spore bakterija imaju imobilizovane jone u jezgri što ih čini manje provodljivim, dok joni unutar korteksa mogu prodreti u jezgro i tako povećati provodljivost. Sa polaritetom pulsa, ovi joni mogu postati zaštitni sloj umesto da prodru u jezgro, pa je tako električni puls u kratkom vremenskom intervalu manje efikasan.

2.4.1.1.5. Oblik pulseva

Oblici pulseva električnog polja su takođe od značaja za primenu PEP tehnologije. Biološke ćelije drugačije reaguju na različite oblike pulsa električnog polja. Različiti tipovi pulseva koriste se za elektroporaciju i raspad bioloških ćelija. Oni uključuju jednosmernu i naizmeničnu struju, kao i pulseve različitih oblika talasa - eksponencijalno opadajući, pravougaono-talasasti, bipolarni ili oscilatorni, gde su eksponencijalno-opadajući i pravougaono-talasasti najzastupljeniji oblici pulseva u ovoj tehnologiji (Zhang i sar., 1995).

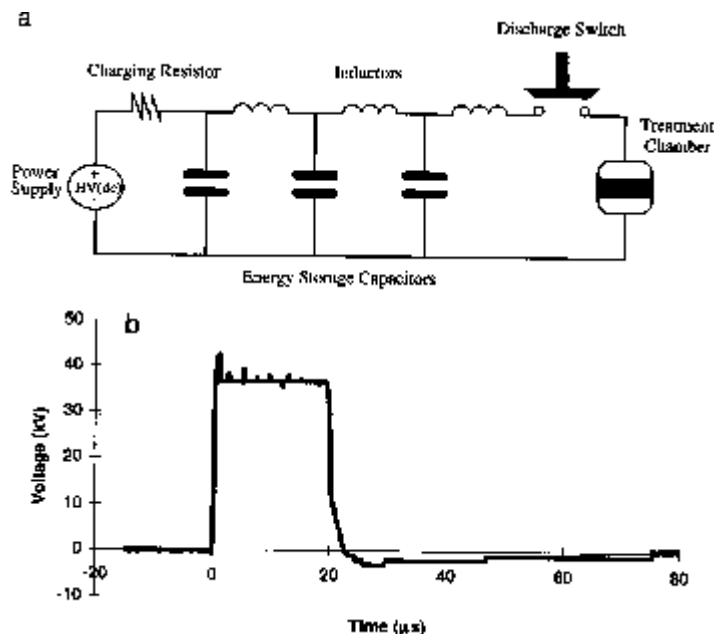
Eksponecijalan pad napona podrazumeva jednosmerni talas čiji napon naglo raste do maksimalne vrednosti, a zatim polako opada do nulte vrednosti. Strujno kolo na slici 7 predstavlja generisanje eksponencijalno-opadajućeg oblika pulsa.



Slika 7. Pojednostavljen prikaz strujnog kola za generisanje eksponencijalno-opadajućeg pulsa, gde je: (R) – efektivna otpornost hrane u tretiranoj komori; (R_s) – otpornik za ograničenje strujnog punjenja; (C_o) – kondenzator za skladištenje energije (prilagođeno iz Zhang i sar., 1995)

Snaga jednosmerne struje napaja kondenzator spojen u kolo sa otpornikom za ograničenje strujnog punjenja (R_s). Kad se aktivacioni signal uključi, tada električna energija iz kondenzatora dospeva u hranu koja se nalazi u tretiranoj komori.

Pravougaono-talasasti pulsevi održavaju maksimalan napon u dužem vremenskom intervalu, te su energetski efikasniji i uzrokuju letalniji efekat u odnosu na eksponencijalno-opadajuće pulseve, koji zahtevaju više napora prilikom hlađenja. S druge strane, eksponencijalno-opadajuće pulseve je lakše proizvesti i primeniti. Generisanje pravougaonih pulseva je složeno i uglavnom zahteva formiranje mreže pulseva, kao što je prikazano na slici 8.



Slika 8. Shema generatora pravougaonog pulsa pomoću pulsno-formirajuće mreže sastavljene od 3 kondenzator-induktor jedinice (prilagođeno iz Zhang i sar., 1995)

Pravougaoni oblik pulsa nastaje kada i komora i mreža za formiranje pulsa odgovaraju električnom induktivnom otporu, što je teško ostvariti u praksi. Maksimalni napon koji dospeva u komoru upola je manji od napona koji se skladišti u kondenzatorima (Zhang i sar., 1995).

Oscilatorni pulsevi su najmanje efikasni za inaktivaciju mikroorganizama, jer onemogućavaju da ćelija bude stalno izložena visokom intenzitetu električnog polja u toku dužeg vremenskog intervala (Jeyamkodan i sar., 1999).

Komora za tretiranje, u kojoj je hrana izložena pulsevima električnog polja, sastoji se od najmanje 2 elektrode, razdvojene izolacionim materijalom u različitim geometrijskim konfiguracijama (paralelne ploče, koaksijalni ili kolinearni cilindri, paralelne žice, štap-ploče, itd.). Obično se koriste paralelne ploče, koaksijalni ili kolinearni cilindri, gde paralelne ploče osiguravaju najujednačenije električno polje u velikom području između ploča, pa se i najčešće koriste, dok koaksijalni cilindri osiguravaju lak i jednoobrazan protok proizvoda što ih čini praktičnim u industrijskoj primeni (Zhang i sar., 1995).

Različite komore su dizajnirane za različite primene PEP tretmana hrane, a mogu se podeliti u dve grupe: statičke (diskontinualne) i kontinualne komore.

Diskontinuirane komore osiguravaju mnoge prednosti za laboratorijsku upotrebu, s obzirom na to da su potrebne male zapremine medijuma koji se tretira, a temperaturu tretmana je lako održavati hlađenjem elektroda ili malim brzinama ponavljanja. Međutim, u diskontinuiranim komorama bez mešanja ili menjanja smera strujanja proizvoda, veliki deo zapremine može ostati nedovoljno tretiran, što se u kontinuiranim komorama može izbeći dodavanjem višestrukih zona tretiranja u liniju. Stoga stacionarne komore nisu praktične za industrijsku primenu.

Međutim, da bi se osigurao veliki protok, koji je potreban za industrijsku primenu, moraju se primeniti pulsevi sa velikom brzinom ponavljanja, što uzrokuje povećanje temperature medijuma. Održavanje konstantne temperature sprovodi se hlađenjem kroz uvođenje rashladnih kanala unutar elektrode ili hlađenjem između višestrukih zona tretmana.

Takođe, materijal od kojeg su sačinjene elektrode i izolatori mora biti postojan za autoklaviranje i mora biti visokog kvaliteta, s obzirom da se tretira hrana. Bushnell i sar. (1993) su predložili upotrebu elektro-hemijski inertnih materijala, kao što su zlato, platina i oksidi metala (npr. iridium dioksid IrO_2 , titanium dioksid TiO_2 , rutenium dioksid RuO_2) za izgradnju elektroda ili elektrodne površine.

Komore moraju biti tako dizajnirane kako bi se osiguralo jednostavno punjenje i uklanjanje proizvoda. S obzirom na to da gasni mehurići predstavljaju potencijalnu opasnost za aktiviranje dielektričnog kvara (varničenja), punjenje mora da se odvija u takvim uslovima da se onemogućí ulaz vazduha u komoru. Međutim, potpuno zatvaranje komora je takođe opasno, jer u slučaju varničenja tretiranog proizvoda dolazi do rapidnog rasta visokog pritiska, što može dovesti do raspada komore. Stoga, uređaj za oslobađanje pritiska mora biti sastavni deo komore, kako bi se obezbedila sigurnost prilikom rada (Zhang i sar., 1995).

2.4.1.2. Faktori medijuma

Otpornost mikroorganizama na fizičko-hemijske agense zavisi od mnogih faktora (Tomlins i Ordal, 1976). Ti faktori uključuju odgovarajuću otpornost mikroorganizama, fiziološko stanje mikroorganizama i karakteristike tretmanskog medijuma. Uticaj ovih faktora na mikrobiološku inaktivaciju PEP tretmanom nije u potpunosti poznat. Projektovanje efikasnog PEP tretmana koji osigurava bezbednost i stabilnost hrane zahteva identifikaciju kritičnih parametara procesa, kao i poznavanje

faktora koji utiču na razvoj rezistencije mikroorganizama na PEP (Álvarez i sar., 2000). Provodljivost, jonska snaga, pH, antimikrobne supstance, prisustvo čestica i gasnih mehurića, kao i dielektrična svojstva medijuma su važne karakteristike koje utiču na biološke promene nastale tokom PEP tretmana. Provodljivost i jonska snaga su usko povezani, jer sa povećanjem jonske snage raste i provodljivost. Dodatni faktori koji povećavaju efekat PEP tretmana su pH i prisustvo antimikrobnih supstanci. Svi ovi faktori doprinose dodatnom stresu ćelija mikroorganizama i utiču na povećanje njihove inaktivacije. Čestice i gasni mehurići rastvoreni u prehrambenim tečnim ili polučvrstim proizvodima predstavljaju dodatni izazov za PEP tehnologiju, s obzirom na to da čestice sprečavaju ravnomernu distribuciju primenjenog električnog polja, dok mehurići uzrokuju dielektričko pražnjenje i varničenje (Barbosa-Cánovas i sar., 1999).

Procesni faktori kao što su pH, temperatura i jonska snaga trebaju se uzeti u obzir prilikom definisanja procesnih uslova netermalnih procesa. Električno polje i jonska snaga se uglavnom odnose na stepen elektroporacije i fizičkog oštećenja ćelijske membrane, dok je pH verovatno povezan sa promenama uslova u citoplazmi zbog disbalansa osmotskog pritiska nastalog usled elektroporacije (Vega-Mercado, 1996).

2.4.1.2.1. pH i jonska snaga

Utvrđeno je da većina mikroorganizama najbolje raste pri neutralnim pH vrednostima sredine (tj. između pH 6.6 i 7.5), dok neke vrste rastu i ispod pH 4.0 (kvasci i plesni). Takođe je dokazano da se lag faza povećava kada mikroorganizmi rastu u medijumima gde je pH van optimalne vrednosti njihovog rasta (Jay, 1991). Uloga pH u opstanku mikroorganizama se odnosi na sposobnost organizma za održavanje pH citoplazme blizu neutralne sredine (Corlett i Brown, 1980). Promene pH će izazvati promene u protoniranju biološki aktivnih molekula na površini mikroorganizama (tj. esencijalnih enzima), kao i promene u provodljivosti ćelijske membrane, što naknadno doprinosi promenama u osetljivosti organizama na uslove spoljne sredine ili procesne uslove (Vega-Mercado i sar., 1996). Tokom PEP tretmana propustljivost ćelijske membrane se povećava usled formiranja pora u ćelijskom zidu, a takođe raste i stepen transporta H^+ jona zbog osmotskog disbalansa oko ćelije. Stoga

treba razmotriti i snižavanje pH citoplazme, s obzirom na činjenicu da je veći broj H⁺ jona dostupan u poređenju s neutralnom pH sredine. Promena pH unutar ćelije može izazvati hemijske promene fundamentalnih jedinjenja kao što su DNK i ATP. PEP tretman može takođe uzrokovati nastanak oksido-redukcionih reakcija unutar ćelije (Vega-Mercado i sar., 1996).

Jonska snaga rastvora takođe igra važnu ulogu u inaktivaciji mikroorganizama i to tako što se inaktivacija izazvana dejstvom PEP tretmana povećava smanjenjem jonske snage hrane (Barbosa-Cánovas i sar., 1999). Povećanje jonske snage povećava pokretljivost elektrona kroz rastvor, što rezultuje smanjenom stepenu inaktivacije. Smanjen stepen inaktivacije u rastvoru visoke jonske snage može se objasniti stabilnošću ćelijske membrane kada je izložena medijumu s različitim jonima (Tsong, 1990).

2.4.1.2.2. Električna provodljivost

Električna provodljivost (konduktivitet) medijuma [σ], koja se definiše kao sposobnost za provođenje električne struje, važan je činilac u PEP tehnologiji, a izračunava se kao:

$$\sigma = \frac{d}{R \cdot A} = \frac{1}{\rho} \quad (\text{S/m}) \quad (14)$$

gde je: [σ] - električna provodljivost medijuma (S/m); [d] - udaljenost između elektroda (m); [R] - otpor medijuma (Ω); [A] - elektrodna površina (m²); [ρ] - otpornost (Ωm).

Električna provodljivost medijuma zavisi od temperature tretmana kao što je definisano u jednačini:

$$\sigma = \alpha \cdot t + \beta \quad (15)$$

gde je: [α] i [β] - konstante, zavisno od sastava i koncentracije medijuma.

Pri konstantnim temperaturnim uslovima, hrana s visokom električnom provodljivošću (tj. niskom otpornošću) generiše manje pikove električnog polja kroz komoru i stoga ju je teško tretirati PEP postupkom (Barbosa-Cánovas i sar., 1999). Povećanje električne provodljivosti rezultat je povećanja jonske jačine polja u medijumu, što rezultira smanjenju inaktivacije mikroorganizama. Osim toga,

povećanje razlike između električne provodljivosti sredine i ćelijske citoplazme mikroorganizama slabi strukturu membrane zbog povećanog protoka jonskih materija kroz membranu. Stoga, stepen inaktivacije mikroorganizama se povećava sa smanjenjem provodljivosti čak i ukoliko se primeni ista energija (Jayaram i sar., 1992). Ipak, Álvarez i sar. (2000) su utvrdili da pri istoj jačini električnog polja, provodljivost ne utiče na inaktivaciju ćelija *Salmonella senftenberg*, čak iako je postignut intenzitet električnog polja zavisio od provodljivosti medijuma pri konstantnom ulaznom naponu.

2.4.1.3. Mikrobiološki faktori

2.4.1.3.1. Tip mikroorganizama

Mikroorganizmi se razlikuju međusobno prema stepenu osetljivosti na PEP tretmane. Kada su u pitanju bakterije, G (-) su osetljivije na PEP tretman od G (+) (Hülshager i sar., 1983), dok su kvasci više osetljivi na primenu pulsirajućih električnih polja od vegetativnih formi bakterija zbog krupnijih ćelija (Sale i Hamilton, 1967; Qin i sar., 1995a). Gášková i sar. (1996) su ispitivali efekat veličine ćelija kvasaca i otkrili da je za *Kluyveromyces lactis*, čije su ćelije manje veličine, potrebno primeniti gotovo dvostruko veće amplitude kako bi se postigao isti efekat inaktivacije kao za soj sa većim ćelijama *Saccharomyces cerevisiae*, što znači da su veće ćelije kvasaca osetljivije na PEP tretmane. Na osnovu ovoga bi se moglo reći da je pulsevima-indukovani transmembranski napon obrnuto proporcionalan veličini ćelija kvasca.

2.4.1.3.2. Stadijum rasta mikroorganizama

Ćelijska svojstva, kao i osobine membrane se razlikuju u toku različitih faza rasta mikroorganizama. U toku logaritamske faze rasta, veliki broj ćelija je u deobi, pa su ćelije osetljivije na stres u toj fazi, nego u lag i stacionarnoj fazi. Tokom log faze, ćelijska membrana je osetljivija na primenu električnog polja (Barbosa-Cánovas i sar., 1999; Hülshager i sar., 1983). U stacionarnoj fazi osetljivost ćelije na električne impulse naglo opada. Gášková i sar. (1996) su otkrili da stepen ubijenih ćelija kvasaca u stacionarnoj fazi nije veći od 30%, čak i pri najvećim amplitudama (~30 kV/cm) i velikoj dužini pulseva (200 μ s).

2.4.1.3.3. Broj mikroorganizama

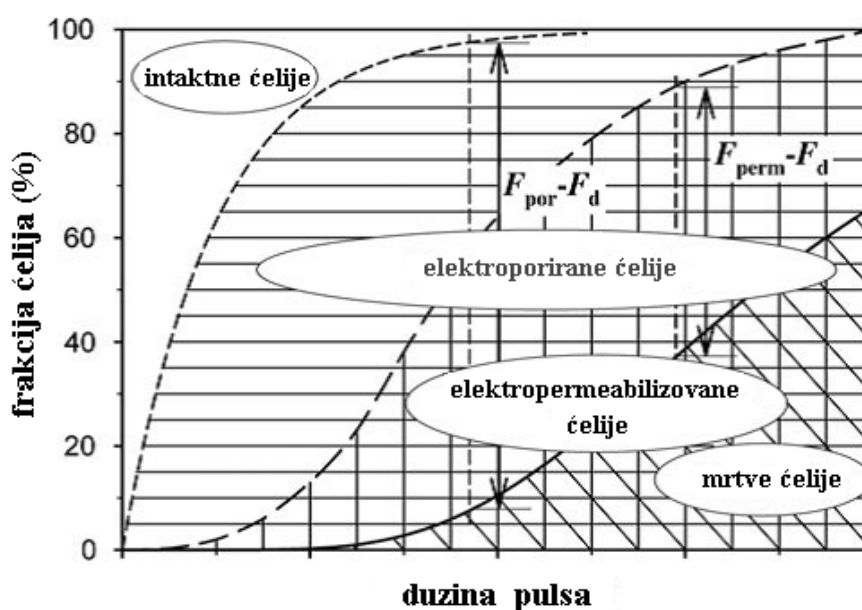
Broj mikroorganizama u hrani može imati uticaj na stepen njihove inaktivacije primenom električnog polja (Barbosa-Cánovas i sar., 1999). Hülsheger i Niemann (1980) su utvrdili da relativna stopa preživljavanja bakterija zavisi od koncentracije ćelija tokom PEP tretmana, gde je pri većoj koncentraciji ćelija veći i relativan stepen ubijenih bakterija, dok se blaga redukcija inaktivacije javlja pri smanjenoj koncentraciji ćelija bakterija. Ipak, Zhang i sar. (1995) su ispitivali dejstvo PEP tretmana na ćelije *E. coli* čija se koncentracija kretala u rasponu od 10^3 do 10^8 cfu/ml i ustanovili isti stepen inaktivacije *E. coli* u model sistemu mlečnog ultra-filtrata nakon primene PEP tretmana od 70 kV/cm i 16 pulseva dužine 2 μ s, bez obzira na broj ćelija.

2.4.2. Permeabilizacija ćelijske membrane pod dejstvom PEP

Uticaj električnog polja na ćelijsku membranu mikroorganizama ispitivan je još 60-ih i 70-ih godina prošlog veka, a utvrđeno je da primena električnog polja može da dovede do razbijanja ćelijske membrane *in vitro*, koje može biti reverzibilno ili ireverzibilno, u zavisnosti o različitim fizičko-hemijskih i bioloških faktora, kao i uslova PEP tretmana (Sale i Hamilton, 1967, 1968; Zimmermann i sar, 1973, 1974). Naknadne studije su pokazale da je mesto interakcije ćelije na primenjeno električno polje zapravo lipidni deo membrane i sve studije se baziraju na merenju električne struje kroz planarni dvoslojni lipidni sloj membrane (*eng. Bilayer lipid membrane - BLM*) pod uticajem visokih intenziteta električnog polja, kao i na molekularnom transportu kroz ćeliju (unutar ili izvan nje) izloženu pulsevima električnog polja (Weaver i Chizmadzev, 1996).

Prema Danielli-Davson modelu, BLM se sastoji od bimolekularnog sloja lipida, koji predstavljaju jezgro, i proteina deponovanih na svakoj strani, koji su elektrostatičkim silama povezani s lipidima (Sale i Hamilton, 1968). To predstavlja dobru barijeru za jone i hidrofobne molekule (Tsong, 1991). Plazma membrana može postati propusna za male jone (npr. K^+ , Na^+ , Rb^+), ali je nepropustljiva za veće molekule kao što su manitol, saharoza, esencijalni proteini i enzimi unutar ćelije (Saulis, 1999; Saulis i sar., 2007). Kada se suspenzija ćelija izloži pulsevima

električnog polja, tada dolazi do formiranja tzv. trenutnih vodenih pora i pri tome protok K^+ i Na^+ jona kroz kanale dovodi do promene jonske koncentracije u blizini membrane, što uzrokuje stres ćelije. Ako stres traje kratko i signali električnog polja su niski i dovoljno kratki (tj. nekoliko mikro- do nekoliko milisekundi), tada je oštećenje reverzibilno. Pri većim električnim poljima, gde je napon preko ćelijske membrane znatno veći, propustljivost membrane se povećava do tog stepena da su potrebni ili sekundi do sati da se ćelija oporavi (reverzibilan prekid) ili nastupa smrt ćelije (nepovratan prekid) (Schoenbach i sar., 1997). To se može šematski prikazati na grafikonu koji opisuje udeo frakcije elektroporiranih ćelija u zavisnosti od trajanja pulsa (slika 9) (Saulis, 2010).



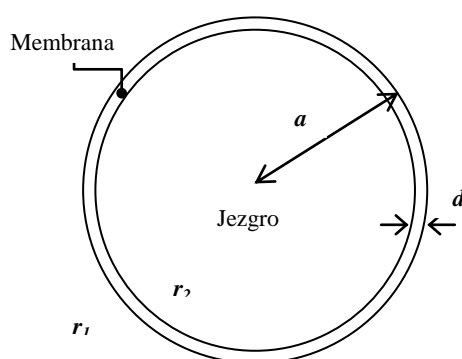
Slika 9. Shematski prikaz zavisnosti udela elektroporiranih, elektropermeabilizovanih i mrtvih (inaktivisanih) ćelija od dužine trajanja pulsa

Electroporacija je brz proces koji se odvija u vremenskom rasponu merenom mikro- i submikrosekundama (Kinosita i Tsong, 1977). Pod normalnim fiziološkim uslovima, specifična provodljivost ćelijske membrane [G_{mem}] prema K^+ i Na^+ jonima, iznosi $>10^{-3}$ S/cm (Tien, 1974). Međutim, kada primenjeno intenzivno električno polje pređe dielektričnu snagu ćelijske membrane, tada njena specifična provodljivost dostiže visok stepen reda 1 S/cm^2 u toku $2 \mu\text{s}$ (Hibino i sar., 1991). Dielektrična snaga ćelijske membrane zavisi od intenziteta i trajanja primenjenog električnog polja (Neumann i sar, 1989; Tsong, 1991). Većina bioloških membrana *in vivo* izdržava razliku potencijala membrane u rasponu od oko -30 mV do -180 mV . Primenjeno električno polje uzrokuje indukovan potencijal membrane. S obzirom na to da je

dvoslojni lipidni sloj membrane za nekoliko redova veličine manje provodljiv od vodenog medijuma, joni suprotnog naelektrisanja počinju da se akumuliraju na unutrašnjim i spoljašnjim površinama. Stoga se jačina primenjenog polja uvećava unutar membrane, a uvećanje je proporcionalno radijusu ćelije.

Ako ukupni potencijal membrane (tj. zbir potencijala membrane u mirovanju i potencijala izazvnog primenom električnog polja) dosegne neku kritičnu vrednost, tada nastaje električni slom i membrana postaje propustljiva za druge, u normalnim uslovima nepropusne, jone i molekule (Tekle i sar., 1990). Publikovani podaci ukazuju da membrana postaje propustljiva kada transmembranski potencijal dostigne oko 200 mV (Tessié i Rols, 1993). Prema nekim autorima, električni slom BLM nastaje kada transmembranski potencijal iznosi između 100-300 mV (Sale i Hamilton, 1968; Benz i Zimmermann, 1980). Sale i Hamilton (1968) su utvrdili da nepovratan gubitak funkcije membrane i liziranje ćelija bakterija nastaje kada razlika potencijala preko membrane dostigne 1V (vrednosti variraju u rasponu od 0.7 do 1.15 V, u zavisnosti od vrste mikroorganizma). Ova vrednost takođe može varirati zavisno od širine pulsa, sastava membrane, itd. (Chang i sar., 1992).

Prema električnoj teoriji usvojen je model ćelije, gde se smatra da jezgro okruženo membranom predstavlja protoplast ćelije (slika 10). Zapravo, prema biološkoj teoriji, protoplast predstavlja ćeliju kojoj je u potpunosti uklonjen ćelijski zid, dok sferoplast sadrži delimično uklonjen ćelijski zid.



Slika 10. Model ćelije prema električnoj teoriji (usvojeno od Sale i Hamilton, 1968)

Ako je debljina membrane $[d]$ znatno manja u odnosu na radijus ćelije $[a]$, tada dvoslojna sfera može biti zamenjena homogenom sfernom oblasti otpora $[r_0]$:

$$r_0 = r_2 + \frac{R}{a} \quad (16)$$

gde je: $[r_0]$ - otpornost homogene sfere (Ωcm); $[r_2]$ - otpor jezgra (Ωcm);
 $[R]$ - otpor membrane (Ωcm^2); $[a]$ - prečnik ćelije (cm).

Pretpostavlja se da unutrašnja otpornost ćelije iznosi oko 100 Ωcm , pa ako otpornost membrane iznosi između 10-1000 Ωcm^2 , tada je membrana vrlo otporna, čak i ako je jezgro provodljivo. U tom slučaju $r_0 \gg r_1$ i homogena sfera je praktično neprovodljiva. Pod tim uslovima, razlika potencijala u celoj sferi je maksimalna u smeru električnog polja i iznosi $3aE$. Kako je membrana vrlo otporna, jezgro se nalazi na izjednačenom potencijalu (tj. svaka tačka u jezgru je na jednakom potencijalu), tako da je maksimalna razlika potencijala podeljena na dva suprotna pola membrane. Stoga se razlika potencijala $[\Delta\phi_{\text{mem}}]$ na ova dva mesta duž membrane može prikazati jednačinom (Sale i Hamilton, 1968):

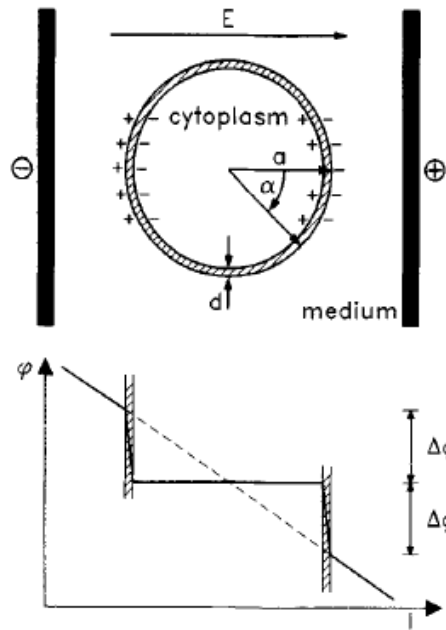
$$\Delta\phi_{\text{mem}} = \frac{3}{2} a \cdot E \quad (17a)$$

Prema Neumann-u (1992), za sferne ćelije prečnika $a \gg d$, vrednost za indukovanu razliku transmembranskog potencijala je data u jednačini:

$$\Delta\phi_{\text{mem}} = -\frac{3}{2} f(\lambda) \cdot a \cdot E \cdot \cos \alpha \quad (17b)$$

gde je: $[\Delta\phi_{\text{mem}}]$ – razlika transmembranskog potencijala (V);
 $[f(\lambda)]$ - faktor provodljivosti; $[\alpha]$ - ugao između posmatranog mesta ćelijske membrane i smera vektora E .

Indukovani transmembranski napon je maksimalan na polovima ćelije, gde se vektor poklapa s pravcem polja električne energije, odnosno gde je $\alpha = 0^\circ$ ili $\alpha = 180^\circ$ (tj. $\cos \alpha = \pm 1$). Faktor $f(\lambda)$ je eksplicitna funkcija električnog konduktiviteta suspenzije medijuma, plazme i ćelijske membrane $[\lambda_M]$. Međutim, ako se λ_M nalazi u rasponu od nekoliko nS/m kod netaknute membrane, tada dostiže vrednost 1, nezavisno od električne provodljivosti suspenzije medijuma (Heinz i sar., 2002; Neumann, 1992). Takođe, važno je istaći da, prema definiciji Maxwell-a ($E = -\Delta\phi$), električni potencijal za pozitivne jone opada u smeru vektora spoljnog polja (slika 11), čime se objašnjava negativan predznak u jednačini 17b (Neumann, 1992).



Slika 11. Indukcija transmembranskog potencijala [$\Delta\phi$] u ćeliji izloženoj spoljnom električnom polju (Grahl i Märkl, 1996)

Sale i Hamilton (1968) su ispitivali uticaj visokih amplituda električnog polja na mikroorganizme i ustanovili obrnut odnos između veličine ćelije i jačine električnog polja, što znači da je jačina polja potrebna za oštećenje određene ćelije obrnuto proporcionalna prečniku te ćelije. Efikasnost PEP tretmana takođe zavisi od roda, vrste, pa čak i soja mikroorganizma (MacGregor i sar., 2000).

Zapravo, mehanizam inaktivacije mikroorganizama PEP tretmanom nije u potpunosti razjašnjen (Weaver i Chizmadzev, 1996; Wouters i sar., 2001b). Veruje se da je u pitanju fizički odgovor ćelije na izloženost visokom električnom naponu (Calderon-Miranda i sar., 1999). Jedno od objašnjenja za baktericidan efekat pulsirajućih električnih polja je teorija dielektričnog sloma (Zimmermann i sar., 1976). Kada se ćelija tretira pulsevima električnog polja, dovoljno visokog napona da bi izazvali transmembranski potencijal kroz ćelijsku membranu u kratkom vremenu, tada nastaje "dielektrični slom" u membrani i dolazi do stvaranja pora (Qin i sar., 1995a). Ako je BLM, izložena električnim pulsevima visokog intenziteta, privremeno destabilizovana u određenim delovima ćelije, tada se ovaj fenomen naziva *elektroporacija*. Tokom perioda destabilizacije, ćelijska membrana je vrlo propustljiva za spoljne molekule prisutne u medijumu (Chang i sar., 1992). Jedna od osnovnih posledica elektroporacije je drastično povećanje propustljivosti, koje se

naziva *elektropermeabilizacija*, koja u nekim slučajevima može dovesti do mehaničkog pucanja ćelijske membrane (Weaver i Chizmadzev, 1996). Elektropermeabilizacija može biti reverzibilna ili ireverzibilna, u zavisnosti od stadijuma promena membrane (Wouters i sar., 2001b). Veličina električno izazvanih pora u ćelijskoj membrani zavisi od jačine primijenjenog električnog polja i broja pulseva. Male pore se oporavljaju nakon uklanjanja električnog polja, ali kada je veličina pora ili njihov broj znatno veći u odnosu na celu površinu membrane, tada dolazi do pucanja i razaranja membrane, što predstavlja nepovratnu strukturnu promenu (Qin i sar., 1995a). Nesposobnost ćelijske membrane da funkcioniše pravilno i reguliše prenos elektrona, koji kontroliše ulaz i izlaz malih molekula, može dovesti do inaktivacije mikroorganizma (Hamilton i Sale, 1967). Oštećena ćelijska membrana omogućava isticanje intracelularnog sadržaja, što dovodi do gubitka metaboličke aktivnosti ćelije. Mikrobne ćelije koje su izgubile sposobnost rasta i deobe u hranjivoj podlozi, smatraju se inaktivisanim (Jeyamkondan i sar., 1999). Međutim, još uvek nije utvrđeno da li smrt ćelije nastupa usled brzog pucanja ćelijske membrane ili zbog hemijskog stresa povezanog s transportom molekula (Wouters i sar., 2001b).

Mnogi autori su proučavali inaktivaciju truležnih i patogenih bakterija, kvasaca i plesni primenom PEP tehnologije (Hülshager i sar., 1981; Pothakamury i sar., 1995; Zhang i sar., 1995; Alvarez i sar., 2000; MacGregor i sar., 2000; Gómez i sar., 2005; Ngyuen i Mittal, 2007). Zaključeno je da najvažnije faktore inaktivacije predstavljaju jačina električnog polja i količina ulazne energije (broj pulseva), mada su bitni faktori i dužina pulsa i temperatura (Wouters i sar., 1999).

Električno polje, koje se primenjuje za inaktivaciju mikroorganizama, može biti mono- i bipolarno, intenziteta u rasponu od 20-90 kV/cm. Oblik električnih pulseva pokriva vreme porasta pulsa (u rasponu od 10-100 ns) i vreme dužine pulsa (u rasponu od 100 ns do 2 s) (MacGregor i sar., 2000).

Hülshager i sar. (1981) su otkrili da elektroliti sa dvovalentnim katjonima (Ca^{2+} i Mg^{2+}) mogu redukovati smrtonosni uticaj električnog polja smanjujući osetljivost tretiranih ćelija. Dvovalentni kationi igraju određenu ulogu u integritetu bakterijske ćelijske membrane (Asbell i Eagon, 1966), što može biti jedan od razloga njihovog zaštitnog mehanizma protiv PEP tretmana. Takođe je pokazano da PEP tretman suspenzije ćelija koja sadrži jedinjenja hlorida (kao što je NaCl) dovodi do

neželjenog elektrolitnog izdvajanja hlora, koji toksično deluje na bakterije (Hülshager i Niemann, 1980). Stoga, pri korišćenju rastvora elektrolita, treba izbegavati upotrebu jedinjenja koja sadrže hlor. S druge strane, ustanovljeno je da se otrovne hemikalije ne stvaraju u elektrolitima koji sadrže jedinjenja fosfata i sulfata (Hülshager i sar., 1981).

Mali broj autora su ispitivali uticaj PEP tretmana na ćelije BMK. Jayaram i sar. (1993) su proučavali preživljavanje vrste *Lb. brevis* u suspenziji fosfatnog pufera različitih konduktiviteta nakon primene PEP tretmana i otkrili da je maksimalan stepen inaktivacije ostvaren u puferu s najnižom prvodljivošću (170 $\mu\text{S}/\text{cm}$), pri dejstvu električnog polja amplitude od 25kV/cm i 150 pulseva dužine 160 μs . Naime, niska provodljivost medijuma utiče na povećan unos energije, jer omogućava primenu većeg broja pulseva, čime se povećava permeabilizacija membrane i potencijalno ubrzava inaktivacija ćelije.

Wouters i sar. (2001b) su posmatrali efekat električnog polja jačine 25 kV/cm i dužine 2.3 μs na permeabilizaciju i inaktivaciju ćelija laktobacila i otkrili da su ćelije *Lb. fermentum* bile otpornije od ćelija *Lb. plantarum* (smanjenje za 0.3- \log_{10} u odnosu na 3.4- \log_{10} jedinice), što ukazuje na to da različite bakterije imaju različitu reakciju na PEP tretman. Autori su takođe zaključili da faza rasta i kiselost medijuma takođe imaju uticaj na stepen inaktivacije bakterija. Ćelije koje su bile u niskom pH okruženju (tj. fosfatnom puferu pH 4.3) brzo su inaktivisane u odnosu na one u pH 6.8 medijumu, jer priliv H^+ protona izaziva permeabilizaciju ćelijske membrane. Pored toga, pri istim uslovima PEP tretmana, veći stepen inaktivacije nastaje kod ćelija u eksponencijalnoj nego onih u stacionarnoj fazi rasta.

Ulmer i sar. (2002) su proučavali mehanizme inaktivacije *Lb. plantarum* u model sistemu piva, i to primenom PEP tretmana u kontinuiranom protočnom sistemu i utvrdili da je vijabilnost ćelija ostala nepromenjena pri dejstvu pulseva amplitude u rasponu od 10-19 kV/cm i energetsom inputu od 17 kJ/kg, ali kada je primenjen veći unos energije (98 kJ/kg) povećanjem broja pulseva, broj živih ćelija se smanjio za 1 \log_{10} jedinicu nakon dejstva polja jačine 13.8 kV/cm. Pri ovom inputu energije, metabolička aktivnost i integritet membrane ćelija smanjeni su otprilike za isti stepen kao prilikom primene termičkog tretmana (odnosno za 95%). Slično smanjenje je postignuto nakon PEP tretmana od 28.8 kV/cm i inputu energije >30 kJ/kg.

Cueva i sar. (2009) su ispitivali uticaj PEP tretmana na *Lb. acidophilus* i otkrili povećanje permeabilizacije ćelija s povećanjem unosa energije, odnosno povećanjem broja pulseva pri jačini polja od 25 kV/cm. Ipak, duže vreme tretmana ima slabije dejstvo u odnosu na intenzitet električnog polja zbog duple logaritamske zavisnosti između stepena preživljavanja mikroorganizama i vremena tretmana (jednačina 9) (Hülshager i sar., 1981).

Većina autora se bavila istraživanjem inaktivacije ćelija pod dejstvom pulsirajućih električnih polja i vrlo je malo dostupnih informacija o reverzibilnim strukturnim promenama ćelija, koje nastaju u toku i posle PEP tretmana. U zavisnosti od primenjene jačine električnog polja i broja pulseva, veličina nastalih membranskih pora bi mogla biti značajno veća u odnosu na celu površinu membrane, što dovodi do pucanja membrane i inaktivacije mikroorganizama. S druge strane, male pore se brzo oporavljaju nakon uklanjanja električnog polja (Qin i sar., 1995a).

Pretpostavlja se da električni pulsevi, koji uzrokuju transmembranski napon BLM od najmanje 0.2V (ali najčešće u rasponu 0.5-1V), mogu stvoriti "primarne membranske pore" s minimalnim radijusom od ~ 1 nm (Weaver, 2000). Za većinu ćelija i tkiva, vreme punjenja je reda veličine $\tau_{\text{punjenja}} \sim 10^{-6}$ s, tako da ako je puls znatno kraći od τ_{punjenja} , tada se moraju primeniti mnogo veći pulsevi da bi se prekoračio transmembranski napon od 0.5-1V (Weaver, 2000).

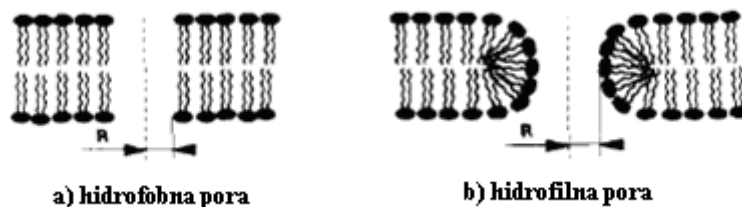
Mehanizam electroporacije se može koristiti za hibridizaciju ćelija i elektrofuziju u genetskom inženjerstvu i biotehnologiji (Chang i sar., 1992). Električno polje niske jačine i niskog energetskog inputa omogućava infuziju spoljnih materija, kao što su DNK i razni molekuli, u elektroporiranu ćeliju čija se membrana oporavlja nakon prestanka dejstva električnog polja. Ova tehnika je osamdesetih godina prošlog veka pronašla primenu u unošenju DNK u eukariotske i prokariotske ćelije (Chassy i Flickinger, 1987). Visoki napon električnog pražnjenja kroz suspenziju ćelija uzrokuje prolazne pore na ćelijskoj membrani kroz koju DNK lako prolazi. Chassy i Flickinger (1987) su uspešno izvršili direktan unos (tzv. transfekciju) plazmida DNK izolovanog iz sojeva *E. coli* u elektroporirane ćelije *Lb. casei*, tretirane jednim pulsom jačine 5 kV/cm i kapaciteta kondenzatora od 25 μ F. Utvrđeno je da su dati uslovi optimalni za proces transfekcije, čak iako je stepen preživljavanja ćelija bio svega oko 50%. Pri naponu od 6.75 kV/cm, stepen preživljavanja je bio veći, ali transfekcija nije uočena. Ubacivanje plazmida DNK u ćelije *Lb. casei*, koje su β -

galaktozidaza-negativne, vršeno je kako bi se izvršila njihova transformacija u β -galaktozidaza-pozitivne ćelije, pri čemu je efekat bio 10^4 transformanata/ μg DNK (Chassy, 1987; Chassy i Flickinger, 1987). Međutim, efikasnost transformacije laktobacila varira u širokom rasponu od 10^2 - 10^7 transformanata/ μg DNK, usled velikog diverziteta unutar samog roda, koji obuhvata više od 60 vrlo različitih vrsta (Aukrust i sar., 1995).

Tekle i sar. (1990) su otkrili da efekat električnog polja na strukturu membrane je poziciono-zavisan u odnosu na površinu ćelije, gde simetrična permeabilizacija ćelijske membrane nastaje jedino pod dejstvom bipolarnе naizmenične struje. Ćelijska membrana postaje permeabilna jedino na onoj strani hemisfere koja je okrenuta prema dejstvu električnog polja, bilo da se radi o primeni unipolarne naizmenične struje ili pravougaonih pulseva jednosmerne struje. To je zato što potencijal mirovanja $[\Delta\phi_0]$ ima obično negativnu vrednost, pa je transmembranski potencijal i stepen formiranja pora veći na hemisferi okrenutoj ka anodi (Saulis, 1993). Transmembranski potencijal može se posmatrati bojenjem ćelijske membrane tzv. napon-senzitivnim bojama, pa kad se primeni električno polje, intenzitet fluorescencije se povećava na strani pozitivne elektrode, dok se na strani negativne elektrode smanjuje (Chang i sar., 1992).

2.4.2.1. Formiranje pora

Hipotetički, prva faza electroporacije je formiranje malih hidrofobnih pora u lipidnom matriksu koje kratko traju (slika 12a). Postojanje hidrofobnih pora zavisi od njihove energije i prečnika. Kada pore dostignu kritičnu veličinu, tada nastaje preusmeravanje lipida tako što formiraju zid i pore postaju hidrofilne (slika 12b) (Glaser i sar, 1988; Weaver, 2000).

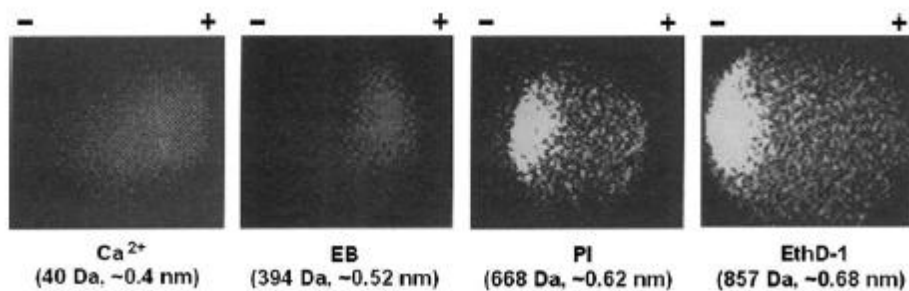


Slika 12. Hipotetički prikaz strukturne promene dvoslojne lipidne membrane (Glaser i sar., 1988)

Formiranje hidrofилnih pora bazira se na promenama kroz koje mnogobrojne hidrofobne pore prolaze (Weaver, 2000). Proces nastanka hidrofилnih pora u BLM se može odvijati vrlo brzo, a smatra se da je ekspanzija ovih pora uzrok elektroporacije (Saulis, 2010). Hidrofobne pore su metastabilne i nestaju u mnogo dužem vremenskom intervalu (često >1 s) od vremena svog nastanka ($\sim 10^{-6}$ s), dok hidrofилne pore mogu trajati nekoliko minuta do nekoliko sati (Weaver, 2000; Saulis, 2010).

Chang i sar. (1992) su utvrdili da veličina otvora pora membrane varira od 20 do 120 nm. Razvoj elektro-pora je dinamičan proces i može se podeliti u tri faze. Prva faza nastaje u prvih nekoliko milisekundi nakon primene pulsa, gde se formiraju vrlo male početne pore (<2 nm), ali one se u nekoliko milisekundi brzo šire na 20-40 nm. U drugoj fazi, koja traje od nekoliko milisekundi do nekoliko sekundi, pore se uvećavaju dostižući 20-100 nm, a struktura im postaje relativno stabilna. Treća faza obuhvata proces rekuperacije pora i njihov prečnik se vremenom smanjuje (u trajanju od jedne sekunde do nekoliko minuta). S obzirom na to da su prolazne elektropore dovoljno velike (20-120 nm), to omogućava prolazak većih molekula kroz ćelijsku membranu. Time se može objasniti i prolaz molekula DNK, čija dužina može biti nekoliko mikrometara, a širina više od 6 nm. Stoga se stepen elektroporacije ćelijske membrane može pratiti uz pomoć test molekula koji su manji od najmanjih pora, kao što su joni K^+ , Na^+ , Rb^+ i Tl^+ (prečnika u rasponu od 0.16-0.33 nm) ili nešto veći molekuli prečnika u rasponu od 0.40-0.60 nm, kao što su manitol (molekulska težina $M_w = 182.17$ Da), saharoza ($M_w = 342.3$ Da), kalcein ($M_w = 623$ Da), propidium jodid ($M_w = 660$ Da) (Saulis, 2010; Saulis i sar., 2007) ili čak i veći molekuli kao tripan-plavo ($M_w = 960.8$ Da) (Escande-Géraud i sar., 1988; Wang i Lu, 2006), otvoreno-plavo ($M_w = 992.8$ Da) (Gabriel i Teissié, 1995) i bleomicin ($M_w = 1450$ Da) prečnika od oko 0.8 nm (Saulis i sar., 2007).

Dokazano je da tokom primene električnih pulseva, ćelije teže ka stabilnom stanju, pa se na jednoj hemisferi formira manji broj većih pora, dok na drugoj hemisferi nastaje veći broj manjih pora (Saulis, 1993). Stoga manji joni i molekuli, kao što su joni kalcijuma i molekul etidium bromida ($M_w = 394.3$ Da) pretežno mogu ući kroz anodnu hemisferu, dok veći molekuli kao propidium jodid i etidium homodimer-1 ($M_w = 856.77$ Da) mogu ući kroz katodni deo hemisfere, što je prikazano na slici 13 (Tekle i sar., 1994)



Slika 13. Prikaz transporta molekula različite veličine kroz plazma membranu *electropermeabilizovanih* ćelija jajnika kineskog hrčka (Tekle i sar., 1994)

Iako prenos nekih molekula i jona unutar ili izvan ćelije tokom dejstva električnog pulsa postoji, veći deo transporta se ipak javlja nakon PEP tretmana (Saulis i Pranevičiutė, 2005, Saulis, 2010). Ćelije mogu ostati vijabilne nakon elektroporacije, zbog sposobnosti pora da se oporave (Saulis, 2010). Međutim, u odnosu na formiranje pora, oporavak membrane (odn. ponovno zatvaranje pora) je spor proces i u mnogome zavisi od temperature sredine (Weaver, 2000). Neke pore ostaju otvorene u dužem vremenskom periodu, pri čemu joni i molekuli nastavljaju da prolaze kroz ćelijsku membranu (Weaver i Barnett, 1992). Dakle, biohemijski disbalans zapravo utiče na to da li će ćelija preživeti ili biti ireverzibilno stresirana i inaktivisana, što dovodi do smrti (Weaver, 2000). Pokazano je da umereno povećanje temperature sa 30°C na 37° C olakšava oporavak pora i sprečava smrt ćelije, dok inkubacija pri niskim temperaturama (4 - 10°C) stabilizuje pore, čime se povećava mogućnost smrti ćelije (Saulis i Wouters, 2007).

U poređenju sa Na⁺ jonima, bakterijske ćelije aktivno akumuliraju K⁺ jone, tako da ćelija obiluje ovim kationima. To je zato što su joni kalijuma važni za sintezu proteina, što je moguće samo u medijumu u kojem preovladavaju K⁺ i Mg²⁺, ali ne i Na⁺ joni. S obzirom na to da je određivanje koncentracije jona unutar ćelije komplikovano, to je lakše meriti oslobađanje jona iz ćelije (Saulis i sar., 2007). Zbog visoke koncentracije kalijumovih jona, njihov gubitak se najčešće određuje. Jedna grupa autora je uspešno determinisala elektroporaciju ćelijske membrane pomoću mini kalijum-selektivne elektrode, pogodne za male količine uzorka (50-100μl) (Saulis i Pranevičiutė, 2005; Saulis i sar., 2007). Osim potenciometrijskog merenja pomoću jon-selektivnih elektroda, nekoliko različitih tehnika se može koristiti za određivanje K⁺ jona u suspenziji ćelija, kao što su emisija plamena fotometrija, upotreba fluorescentnih indikatora i radioizotopskih markera (Saulis i sar., 2007).

Permeabilizacija membrane se takođe može proučavati pomoću protočne citometrije (*eng. Flow Cytometric measurement* FCM) merenjem unosa fluorescentnih DNK-vezujućih boja kao što je propidium jodid (PI), koji ne mogu proći kroz netaknutu membranu. PI je mali hidrofilni molekul koji može biti dobar pokazatelj integriteta ćelijske membrane, te se upotrebljava za detekciju mrtvih ćelija. Nakon prodiranja kroz oštećenu membranu mrtve ćelije, PI se vezuje za DNK i povećava fluorescenciju, koja se može pratiti pomoću FCM tehnike (Wouters i sar., 2001b).

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Sveobuhvatan cilj istraživanja je da se odredi u kom stepenu pulsirajuća električna polja utiču na rast i aktivnost ćelija autohtonog soja *Lactobacillus plantarum* 564. Osnovni cilj je da se ispituju procesni parametri PEP tretmana koji će potencijalno dovesti do reverzibilne elektroporacije ćelijske membrane, uz pretpostavku da će ovakvi tretmani pozitivno uticati na rast i razvoj ispitivanih ćelija *Lactobacillus plantarum* 564. U te svrhe primenjivaće se PEP tretmani sa inputom energije ispod 13 J/cm^3 . S druge strane je neophodno odrediti procesne parametre koji dovode do stresa ćelija sa ciljem postizanja što većeg stepena inaktivacije, pri čemu će energija primenjenih pulseva iznositi iznad 30 J/cm^3 .

Sledeći stepen istraživanja je da se ispita efekat primenjenih PEP tretmana na rast preživelih ćelija laktobacila, kroz praćenje ukupnog broja ćelija i njihove acidifikacione sposobnosti, kao i kalorimetrijskim merenjem njihove metaboličke aktivnosti tokom inkubacije u MRS bujonu na 37°C . Time bi se dokazalo prisustvo sub-populacije perzistera u okviru iste populacije, koja pokazuje otpornost na stres izazvan dejstvom pulsirajućih električnih polja.

Nakon ustanovljenog prisustva perzistera, potrebno je ispitati ponašanje preživle populacije nakon ponovne primene istih procesnih parametara, kako bi se ispitala otpornost preživle populacije na dodatne PEP tretmane. Ispitivanje stepena otpornosti preživle populacije vršiće se praćenjem odavanja toplote tokom rasta putem izotermalne kalorimetrije, kao i određivanjem ukupnog broja kolonija i njihove acidifikacione aktivnosti u toku 24 sata inkubacije na 37°C .

Ova istraživanja takođe imaju za cilj da se ispita uticaj pulsirajućih električnih polja na potencijalne probiotske osobine ispitivanih laktobacila. S tim u vezi izvršiće se testiranje na određene probiotske kriterijume, kao što je sposobnost rasta laktobacila u gastrointestinalnim uslovima, koja će se pratiti kroz ispitivanje tolerantnosti na niske pH sredine (pH 2.0) uz prisustvo pepsina, a potom i otpornosti tretiranih ćelija na prisustvo žučnih soli i pankreatina, uz pretpostavku da povećana otpornost na stres može dovesti do poboljšanja potencijalnih probiotskih karakteristika ispitivanog soja *Lb. plantarum* 564. Takođe će se pratiti rezistentnost

netretiranih i PEP tretiranih ćelija na širok spektrar raznih antibiotika, kao i antimikrobna aktivnost ispitivanih laktobacila.

Na kraju istraživanja očekuje se da će dobijeni rezultati dovesti do boljeg razumevanja efekta PEP tretmana na ćelije ispitivanih laktobacila, kao i primene istog u prehrambenoj industriji. Ukoliko se primenjeni tretmani pokažu kao uspešni u procesnim tehnologijama baziranim na upotrebi bakterija mlečne kiseline, metabolički efekti nastali primenom PEP tretmana mogu biti primenjivani u prehrambenoj industriji kao što je industrija mleka, kroz način ubrzanja procesa zrenja sireva upotrebom tretiranih laktobacila kao dopunskih kultura.

4. MATERIJAL I METODE RADA

4.1. Priprema kulture BMK

Eksperimenti su vršeni na soju *Lactobacillus plantarum* 564, izolovanom iz autohtonog Sjeničkog belog sira u salamuri (Radulović, 2007). Ovaj selekcionisani autohtoni soj karakteriše dobra proteolitička sposobnost, a pokazao je i najbolja senzorna svojstva u proizvodnji fermentisanih kobasica i belih sireva u salamuri, te kao takav poseduje veliki potencijal, što mu omogućava upotrebu kao starter ili dopunske tzv. „adjunct“ kulture u prehrambenoj industriji (neobjavljeni podaci).

Polazna kultura je čuvana na -80°C u De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) bujonu (Oxoid Ltd, Basingstoke, Engleska) sa 20% (v/v) glicerola, prethodno sterilisanom u autoklavu na 121°C , 15 min. Od polazne kulture su pravljene radne tzv. „stok“ kulture. Priprema radne kulture podrazumeva aktivaciju polazne kulture prethodnim otapanjem na sobnoj temperaturi i inokulacijom 50 μl inokuluma u 10 ml MRS bujona (što odgovara ukupnom broju ćelija od 10^7 cfu/ml). Kultura je inkubirana na 37°C preko noći, a potom ponovo inokulisana u MRS bujon. Nakon trodnevne propagacije, 1 ml aktivirane kulture je inokulisan u 9 ml MRS bujona sa 15% (v/v) glicerola i skladišten u sterilnim kivetama (1.5 ml) na -20°C .

Aktivacija radne kulture je vršena na isti način kao i aktivacija polazne kulture. Nakon trodnevne propagacije, kultura je inkubirana 18 h na 37°C pre svakog oglada.

4.2. Određivanje ukupnog broja ćelija laktobacila

Ukupan broj ćelija bakterija *Lb. plantarum* 564 određivan je indirektnom metodom po Kohu (Radulović i Petrušić, 2011). Kontrolni i PEP tretirani uzorci su inokulisani u MRS bujon (do finalne koncentracije od 0.5% (v/v), što odgovara ukupnom broju ćelija od 10^7 cfu/ml) i inkubirani na 37°C . Nakon 2h, kao i u ostalim vremenskim intervalima, bujonska kultura je podvrgnuta serijom razblaženja u 0.1% (w/v) pepton-fiziološkom rastvoru (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK), a potom je 1 ml suspenzije ćelija iz odgovarajućeg razblaženja prenet u Petri posudu i preleven i pomešan sa 10 ml MRS agara. Nakon inkubacije u trajanju od 48 h na 37°C u anaerobnim uslovima (gas-pak sistem Oxoid Ltd., Kembridž, UK) izvršeno je

brojanje kolonija (*eng. Colony forming units – cfu*). Pretpostavlja se da je svaka kolonija nastala umnožavanjem jedne ćelije, a dati broj kolonija predstavlja srednju vrednost dobijenu brojanjem različitih razblaženja iz tri Petri posude.

Sastav MRS podloge dat je u tabeli P1 u prilogu.

4.3. Određivanje optičke gustine

Merenje optičke gustine (*eng. Optical Density – OD*) inokulisanog MRS bujona vršeno je na talasnoj dužini od 600 nm (OD_{600}) uz pomoć spektrofotometra Hitachi U-1500 (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) aktiviranjem Vis (tungsten-iodide) lampe za vidno područje. Vrednost OD_{600} čistog MRS bujona je korišćena kao blank.

4.4. Merenje pH i titracione kiselosti

Merenje pH inokulisanog medijuma vršeno je direktnim merenjem uz pomoć pH-metra (PHM 210, Meter Lab).

Titraciona kiselost je određivana titracijom uzoraka sa 0.1M NaOH do pH 8.3, pri kojoj indikator fenolftalein menja boju iz bezbojne u svetlo roze. S obzirom na to da je 1 ml utrošene baze jednak 0.1% mlečne kiseline, rezultati su izraženi u vidu % mlečne kiseline, koji je dobijen množenjem broja mililitara utrošene baze sa 0.1 (Olson, 1990).

4.5. Acidogena aktivnost

Sposobnost produkcije mlečne kiseline ispitivanog soja praćena je zasejavanjem 1 ml bujonske kulture u 100 ml 10% rekonstituisanog obranog mleka (ROM), prethodno sterilisanog na 105°C, 7 min. Inkubacija je vršena na 37°C u toku 24 sata, a pH je praćen uz pomoć pH-metra (PHM 210, Meter Lab) u sledećim vremenskim intervalima: nakon 2, 4, 6, 8 i 24h.

Utvrđivanje stepena postacidifikacije je izvršeno merenjem pH vrednosti nakon 48h i 72h inkubacije na 37°C.

Ispitivanje acidifikacione sposobnosti soja *Lb. plantarum* 564 u 10% rekonstituisanom obranom mleku tokom inkubacije na 37°C takođe je vršeno

titracijom 20 ml inokulisanog ROM sa 0.1M NaOH do pH 8.3. Acidifikaciona sposobnost pomenutog soja u MRS bujonu inkubiranom na istoj temperaturi određena je titracijom 10 ml inokulisanog MRS bujona (modifikovana metoda AOAC, 1995) sa 0.1M NaOH do pH 8.3. Rezultati su izraženi u % mlečne kiseline u datoj zapremini uzorka.

4.6. Sposobnost rasta nakon tretiranja povišenim temperaturama

Bujonska kultura *Lb. plantarum* 564 je nakon 4 h inkubacije na 37°C prenetu u uske staklene epruvete (zapremine 5 ml) i tretirana sledećim termičkim tretmanima: 45°C, 30s; 60°C, 90s i 80°C, 270s. Epruvete su potom momentalno prenete u hladnu vodu, a nakon hlađenja, kultura je inokulisana u MRS bujon i inkubirana na 37°C u toku 24h. Rast preživelih ćelija je praćen merenjem OD i pH vrednosti nakon 2h, 4h, 6h i 24h inkubacije.

Takođe je vršeno proučavanje permeabilizacije termički tretiranih ćelija i to tako što je u bujonsku kulturu dodato 0.5 µg/ml fluorescentne DNK-vezujuće boje propidijum jodid (PI), a nakon izvršenog tretmana vršeno je posmatranje unosa PI pomoću mikroskopa Olympus BX50, Japan pri uvećanju 1000x. Za eksperiment je korišćen prethodno pripremljen rastvor PI u koncentraciji 20 µg/ml, koji je čuvan na 4°C.

4.7. Tretman pulsirajućim električnim poljima

Ćelije soja *Lb. plantarum* 564 su tretirane pulsirajućim električnim poljima (PEP) u mid-eksponencijalnoj fazi rasta, odnosno 4h nakon inokulacije i inkubacije u MRS bujonu na 37°C. Suspenzija ćelija je razređena sa sterilnom destilovanom vodom u odnosu 1:10 na sobnoj temperaturi, s ciljem da se smanji konduktivitet medijuma, kako bi se postigao veći intenzitet električnog polja kroz kivetu. Potom je 148 µl preneto u sterilne kivete za elektroporaciju (tzv. EP kivete), čiji je otvor promera 1 mm (EP-104, Cell Projects, Harrietcham Kent, UK), tako da suspenzija popuni ceo otvor unutar kivete. Koncentracija ćelija u razblaženoj suspenziji je iznosila ~8.6 E6 cfu/ml, a konduktivitet je iznosio ~1.3 mS/cm.

Električni pulsevi su generisani u CEPT puls generatoru (Arc Aroma Pure, Lund, Švedska), a primena PEP tretmana je praćena na digitalnom osciloskopu (Fluke

123, Vašington, SAD), koji je povezan za sistem i detektuje primenu pulsa kroz uzorak. Suspenzija ćelija je tretirana monopolarnim pravougaonim pulsevima različite jačine električnog polja i različitog broja pulseva. Primenjeni PEP tretmani su prikazani u Tabeli 1.

Tabela 1. PEP tretmani suspenzije bakterija *Lb. plantarum* 564

Tretman	E (kV/cm)*	n	T (μs)	Q (J/cm ³)
A ₁	4.5	10	50	1.33
A ₂	9.1	10	50	5.5
A ₃	13.6	10	50	12.2
B ₁	22.9	10	50	34.6
C ₁	31.6	10	50	65.8
D ₁	31.6	100	500	658.1

* [E] – jačina električnog polja; [n] – broj pulseva; [T] – vreme tretmana; [Q] – specifična energija, izračunata prema formuli (Dejmek i Trägårdh, 1994):

$$Q = E^2 \sigma T \quad (18)$$

gde je: [Q] – input energije po zapremini materijala (J/cm³); [σ] – konduktivitet materijala (S/m).

Dužina svakog pulsa iznosila je 5 μs, a vremenski interval između svakog pulsa je bio 10 ms, što odgovara frekvenciji od 100 Hz.

Pored standardnih PEP tretmana, na tretiranim uzorcima B₁, C₁ i D₁ izvršeni su ponovni PEP tretmani, tako što je suspenzija tretiranih ćelija nakon prvog tretmana inkubirana u MRS bujonu preko noći na 37°C, a potom je inokulisana u MRS bujon sa 15% glicerola (1 ml kulture u 9 ml MRS) i zamrznuta na -20°C do daljeg tretiranja. Nakon otapanja kulture na sobnoj temperaturi, izvršena je aktivacija na način opisan u poglavlju 4.1. Aktivirana kultura je u mid-eksponencijalnoj fazi tretirana istim PEP uslovima, čineći tretmane B₂, C₂ i D₂ (Tabela 2).

Tabela 2. PEP re-tretmani suspenzije bakterija *Lb. plantarum* 564

Re-tretman	Prethodni tretman*	E (kV/cm)	n	T (μs)	Q (J/cm ³)
B ₂	B ₁	22.9	10	50	34.6
C ₂	C ₁	31.6	10	50	65.8
D ₂	D ₁	31.6	100	500	658.1

* PEP re-tretirani uzorci; E – jačina električnog polja; n – broj pulseva; T – vreme trajanja pulsa; Q – količina energije.

Kontrolni uzorci (O) predstavljaju suspenziju ćelija smeštenu u sterilne EP kivete i tretiranu sa 0 kV/cm.

Nakon PEP tretmana, tretirane ćelije su inokulisane u MRS bujon do finalne koncentracije 0.5% (v/v) (po 100 μ l u epruvete sa 3 ml MRS bujona) i inkubirane na 37°C u toku 24 sata.

4.8. Analize primenom izotermalne kalorimetrije

Stepen oslobađanja toplote tokom razvoja bakterija, prethodno tretiranih različitim PEP tretmanima, kontinuirano je praćen putem TAM Air izotermalnog kalorimetra (Thermometric AB, Jäfrälla, Švedska), kao što su opisali Rocculi i sar. (2007). Osetljivost (preciznost) kalorimetra iznosila je $\pm 10 \mu$ W (Wadsö, 2005). Toplotna energija, koju uzorak emituje, detektovana je putem senzora za protok toplote, koji su locirani ispod svakog ležišta za ampule.

Nakon primenjenog PEP tretmana, uzorci su preneti u ampule sa 10 ml MRS bujona do finalne koncentracije 0.5% (v/v), hermetički zaptiveni i inkubirani 30 min u termostatu na 37°C. Potom su preneti u kalorimetar, koji sadrži 8 mesta, od kojih su prva dva mesta rezervisana za kontrolnu probu (ampule sa MRS bujonom), a ostala mesta su popunjena netretiranim (kontrolni uzorci „O“) i PEP tretiranim bakterijskim uzorcima. U naredna 24 sata praćen je stepen odavanja toplote tokom razvoja bakterija na 37°C u svakoj ampuli, gde su za svaki tretman postavljeni uzorci u dva paralelna ponavljanja. Etalon za svako mesto u kalorimetru bile su ampule napunjene destilovanom vodom i termostatirane na 37°C u toku 24 h pre i posle ispitivanja. Termalna snaga u funkciji vremena registrovana je u vidu grafikona, gde su u toku svakog merenja očitavane termalne krive za etalon, obeležene kao „bazične linije (BL)“, kao i termalne krive za uzorke u MRS bujonu.

Izotermalna merenja protoka toplote su kompjuterski registrovana u vidu voltažnog signala, emitovanog od strane toplotnog senzora, a odgovarajuće vrednosti termalne snage se mogu izračunati pomoću formule (19).

$$P = \varepsilon \frac{(U_S - U_{BL})}{M} \quad (19)$$

gde je: [P] – specifična termalna snaga po masi uzorka (mW/g); [ε] – koeficijent kalibracije kalorimetra; [U_S] – voltažni signal uzorka u kalorimetru (mV); [U_{BL}] – voltažni signal koji odgovara detektovanim BL u kalorimetru (mV); [M] – masa uzorka (g).

Koeficijenti kalibracije [ε] su izračunati pomoću električnih kalibracija, koje su vršene na temperaturi od 37°C pomoću grejača (100.0 Ω preciznost rezistora) smeštenih u svako ležište u kalorimetru.

4.9. Određivanje stepena preživljavanja u gastrointestinalnim uslovima

Sposobnost preživljavanja PEP tretiranih bakterija praćena je primenom modifikovane verzije gastro testa i testa preživljavanja u duodenalnim uslovima (Doleyeres i sar, 2004).

4.9.1. Preživljavanje u uslovima želuca (Gastro test)

Za simuliranje želudačnih sokova pripremljen je rastvor pepsina i to 0.3% pepsina sa 0.5% NaCl, čiji je pH 2.0 podešen uz pomoć 1M HCl i rastvor je filtriran kroz sterilan mikrofilter (prečnik pora 0.1 μm). Prekonoćne bujonske kulture kontrolnih i PEP tretiranih bakterija su zasejane u peptonske rastvore pepsina (u odnosu 1:10) i inkubirane 90 min u anaerobnim uslovima na 37°C. Potom je izvršena serija razblaženja u 0.1% (w/v) pepton-fiziološkom rastvoru i zasejavanje na MRS agaru, a nakon inkubacije u toku 48h na 37°C u anaerobnim uslovima, određen je broj viabilnih ćelija primenom „spot metode“. Eksperiment je vršen u tri ponavljanja.

4.9.2. Preživljavanje u duodenalnim uslovima

Uslovi u dvanaestopalačnom crevu simulirani su putem rastvora sa 0.4% žučnih soli i 0.2% pankreatina. Prekonoćna bujonska kultura netretiranih, kao i PEP tretiranih bakterija je zasejana u rastvor žučnih soli i pankreatina (u odnosu 1:10) i inkubirana u anaerobnim uslovima na 37°C u toku 60 min. Potom je izvršena serija razblaženja u 0.1% (w/v) pepton-fiziološkom rastvoru i zasejavanje na MRS agaru, a

nakon inkubacije u toku 48h na 37°C u anaerobnim uslovima određen je broj viabilnih ćelija „spot metodom“. Eksperiment je izvršen u tri ponavljanja.

4.10. Ispitivanje tolerantnosti na antibiotike

Rezistentnost bakterija na antibiotike je ispitivana na MRS agaru upotrebom diskova sa 8 različitih antibiotika (Institut za virusologiju, vakcine i serume Torlak, Beograd, Srbija). U petri šolje je sipano ~10 ml MRS agara, koji je nakon očvršćavanja preliven sa 6 ml TOP MRS agara (koji sadrži 0.6% agara i u koji je prethodno zasejano 0.2 ml PEP tretirane bakterijske kulture). Diskovi sa antibioticima su postavljeni na vrh očvrstlog agara i nakon inkubacije na 37°C u toku 24 h, meren je prečnik (mm) zona inhibicije. Eksperiment je ponovljen i sa netretiranim (kontrolnim) uzorcima, a sva ispitivanja su vršena u dva ponavljanja.

4.11. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti

Antimikrobna aktivnost netretiranih i PEP tretiranih bakterija *Lb. plantarum* 564 ispitivana je na patogenim sojevima sledećih mikroorganizama iz laboratorije Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu: *Listeria monocytogenes* IM2000, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Escherichia coli* ATCC25922, *Salmonella enteritidis* ATCC31806, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC5999 i *Candida albicans* ATCC10259.

Za određivanje antimikrobne aktivnosti primenjen je tzv. „SPOT test“ sa bikarbonatom (Bernet i sar., 1993), koji ukazuje na inhibitornu sposobnost određenih bakterija, koja se ogleda u sposobnosti kompeticije sa patogenim mikroorganizmima, pri čemu prisutni bikarbonat eliminiše dejstvo kiseline kao mogućeg agensa inhibicije.

4.12. Statistička obrada podataka

Rezultati dobijeni tokom istraživanja statistički su obrađeni, a osnovne karakteristike serija dobijenih podataka za ispitivana obeležja prikazane su preko aritmetičke sredine (\bar{X}), kao merila centralne tendencije osnovnog skupa. U ogleđima izvedenim u tri ili četiri ponavljanja, odstupanja pojedinih podataka u serijama od

aritmetičke sredine, kao i jačina njihove grupisanosti oko srednje vrednosti, prikazana su preko mera varijacije: standardne devijacije (Sd) i koeficijenta varijacije (Cv).

Statistička značajnost je testirana analizom ANOVA upotrebom softvera Statistica 6.0 PL za Windows (StatSoft Inc., Tulsa, USA), gde je primenjen Fišerov LSD test.

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

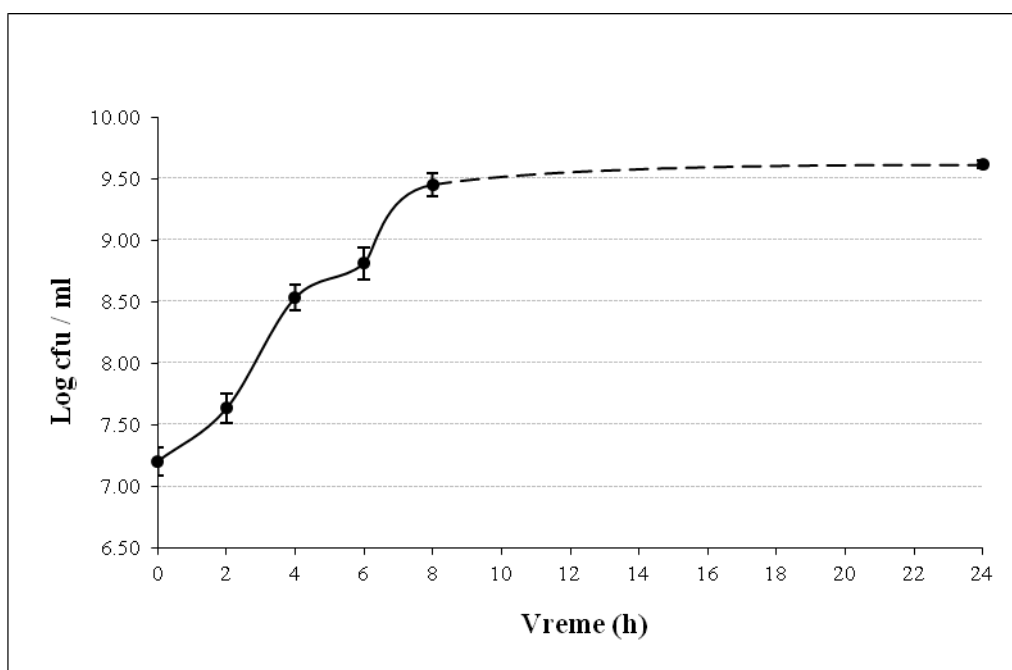
5.1. Dinamika rasta soja *Lb. plantarum* 564

Bujonska kultura soja *Lb. plantarum* 564 je inkubirana na 37°C, a uzorkovanje je vršeno u sledećim vremenskim intervalima: 0, 2, 4, 6, 8, 24, 48, 72 i 120h. Rast ovih laktobacila praćen je određivanjem ukupnog broja ćelija, što je prikazano u tabeli 3, a kriva rasta prikazuje prosečnu logaritamsku vrednost ukupnog broja kolonija (cfu) po mililitru u zavisnosti od vremena (grafik 1).

Tabela 3. Rast ćelija soja *Lb. plantarum* 564 u toku inkubacije na 37°C u MRS bujonu

Vreme (h)	Broj cfu / ml		Xsr _(n=3) *	Cv
	X _{min}	X _{max}		
0	1.24E+07	2.10E+07	(1.64 ± 0.43) E+07 ^a	26.51
2	3.20E+07	5.60E+07	(4.38 ± 1.20) E+07 ^a	27.43
4	1.66E+08	4.18E+08	(3.17 ± 1.33) E+08 ^b	42.03
6	7.00E+08	9.27E+08	(8.17 ± 1.44) E+08 ^c	13.91
8	2.46E+09	3.62E+09	(2.89 ± 0.64) E+09 ^d	22.10
24	4.20E+09	4.40E+09	(4.32 ± 0.10) E+09 ^d	2.41
48	2.20E+09	3.10E+09	(2.67 ± 0.45) E+09 ^d	16.90
72	1.65E+09	2.07E+09	(1.85 ± 0.21) E+09 ^d	11.35
120	3.40E+07	4.50E+07	(3.93 ± 0.55) E+07 ^a	14.00

* Xsr – prosečna vrednost ± standardna devijacija; n - broj uzoraka; Cv - koeficijent varijacije; statistička značajnost uzoraka (p<0.05) prikazana je malim slovima u indeksu (a, b, c, d)



Grafik 1. Kriva rasta *Lb. plantarum* 564 u toku inkubacije na 37°C u MRS bujonu

Rast pomenutog soja je takođe praćen merenjem OD vrednosti u datim vremenskim odrednicama, što je prikazano u Tabeli 4.

Tabela 4. Promene optičke gustine tokom inkubacije *Lb. plantarum* 564 u MRS bujonu na 37°C

Vreme (h)	OD _{600nm}		Xsr _(n=3) *	Cv
	X _{min}	X _{max}		
0	0.023	0.038	0.029 ± 0.008 ^a	26.48
2	0.057	0.086	0.073 ± 0.015 ^a	20.15
4	0.578	0.686	0.615 ± 0.061 ^b	9.95
6	1.558	1.623	1.601 ± 0.037 ^c	2.33
8	2.399	2.732	2.558 ± 0.167 ^d	6.53
24	4.935	5.528	5.183 ± 0.308 ^e	5.95

* Xsr – prosečna vrednost ± standardna devijacija; n - broj uzoraka; Cv - koeficijent varijacije; statistička značajnost uzoraka (p<0.05) prikazana je malim slovima u indeksu (a, b, c, d, e)

5.2. Acidogena aktivnost soja *Lb. plantarum* 564

Acidogena sposobnost datog soja, inokulisanog u prethodno sterilisano 10% rekonstituisano obrano mleko (ROM) u koncentraciji od 1%, i inkubiranog na 37°C u toku 72h, vršena je merenjem pH nakon 0, 2, 4, 6, 24, 48 i 72h, što je prikazano u tabeli 5.

Tabela 5. Promene pH tokom inkubacije soja *Lb. plantarum* 564 u ROM na 37°C

Vreme (h)	pH _{ROM} *		Xsr _(n=3)	Cv
	X _{min}	X _{max}		
0	6.42	6.57	6.50 ± 0.08 ^a	1.16
2	6.31	6.41	6.35 ± 0.06 ^b	0.87
4	6.21	6.29	6.26 ± 0.04 ^{b, c}	0.67
6	6.15	6.25	6.21 ± 0.05 ^{c, d}	0.85
24	6.04	6.19	6.12 ± 0.08 ^d	1.23
48	5.94	6.01	5.98 ± 0.05 ^e	0.83
72	4.06	4.22	4.14 ± 0.11 ^f	2.73

* pH_{ROM} – pH rekonstituisanog obranog mleka; Xsr – prosečna vrednost ± standardna devijacija; n - broj uzoraka; Cv - koeficijent varijacije; statistička značajnost uzoraka (p<0.05) prikazana je malim slovima u indeksu (a, b, c, d, e, f)

Titraciona kiselost u toku 48h inkubacije ispitivanog soja u ROM je takođe praćena, a broj utrošenih mililitara 0.1N NaOH za titraciju uzorka do pH 8.3, izražen preko % mlečne kiseline, prikazan je u tabeli 6.

Tabela 6. Promene titracione kiselosti rekonstituisanog obranog mleka tokom inkubacije soja *Lb. plantarum* 564 na 37°C

Vreme (h)	TK _{ROM} (% mlečne kiseline / 20 ml) *		Xsr _(n=3)	Cv
	X _{min}	X _{max}		
0	0.25	0.27	0.26 ± 0.01 ^a	2.92
2	0.27	0.30	0.28 ± 0.02 ^b	5.47
4	0.28	0.31	0.30 ± 0.01 ^{b, c}	4.55
6	0.29	0.31	0.30 ± 0.01 ^{b, c}	3.37
8	0.30	0.32	0.31 ± 0.01 ^{c, d}	4.64
24	0.30	0.33	0.32 ± 0.02 ^{c, d}	4.70
48	0.32	0.34	0.33 ± 0.01 ^d	3.29

* TK_{ROM} – titraciona kiselost 20 ml rekonstituisanog obranog mleka; Xsr – prosečna vrednost ± standardna devijacija; n - broj uzoraka; Cv - koeficijent varijacije; statistička značajnost uzoraka (p<0.05) prikazana je malim slovima u indeksu (a, b, c, d)

S obzirom na to da je stepen acidifikacije u mleku bio vrlo nizak u toku prvih 48h, praćen je i rast bakterija u ROM na 37°C u toku 72, a broj ćelija nakon 0, 24, 48 i 72h prikazan je u tabeli 7.

Tabela 7. Rast ćelija soja *Lb. plantarum* 564 u toku inkubacije na 37°C u ROM

Vreme (h)	Broj cfu / ml		Xsr _(n=3) *	Cv
	X _{min}	X _{max}		
0	3.04E+07	3.73E+07	(3.39 ± 0.38) E+07 ^a	11.08
24	4.80E+07	5.00E+07	(4.90 ± 0.64) E+07 ^b	13.00
48	3.60E+07	4.60E+07	(4.10 ± 0.62) E+07 ^a	15.00
72	3.33E+07	4.37E+07	(3.85 ± 0.71) E+07 ^a	18.37

* Xsr – prosečna vrednost ± standardna devijacija; n - broj uzoraka; Cv - koeficijent varijacije; statistička značajnost uzoraka (p<0.05) prikazana je malim slovima u indeksu (a, b)

Zbog vrlo niske acidogene aktivnosti soja *Lb. plantarum* 564 u ROM, praćen je i stepen snižavanja pH u MRS bujonu u toku 48h inkubacije na 37°C, a uzorkovanje je vršeno nakon 0, 2, 4, 6, 8, 18, 24 i 48h (tabela 8).

Tabela 8. Promene pH u MRS bujonu tokom inkubacije *Lb. plantarum* 564 na 37°C

Vreme (h)	pH _{MRS} *		Xsr _(n=3)	Cv
	X _{min}	X _{max}		
0	5.92	5.95	5.94 ± 0.02 ^a	0.29
2	5.87	5.89	5.88 ± 0.01 ^b	0.17
4	5.56	5.60	5.58 ± 0.02 ^c	0.36
6	4.91	4.99	4.96 ± 0.04 ^d	0.84
8	4.60	4.66	4.63 ± 0.03 ^e	0.65
18	4.12	4.21	4.16 ± 0.05 ^f	1.10
24	3.98	4.01	3.99 ± 0.02 ^g	0.38
48	3.80	3.88	3.83 ± 0.04 ^h	1.14

* pH_{MRS} – pH vrednost MRS bujona; Xsr – prosečna vrednost ± standardna devijacija; n - broj uzoraka; Cv - koeficijent varijacije; statistička značajnost uzoraka (p<0.05) prikazana je malim slovima u indeksu

U tabeli 9 je prikazana dinamika titracione kisleosti inokulisanog MRS bujona u toku 48h inkubacije na 37°C.

Tabela 9. Promene titracione kiselosti inokulisanog MRS bujona tokom inkubacije soja *Lb. plantarum* 564 na 37°C

Vreme (h)	TK _{MRS} (% mlečne kiseline / 10 ml) *		X _{sr} (n=3)	Cv
	X _{min}	X _{max}		
0	0.42	0.45	0.44 ± 0.011 ^a	2.60
2	0.47	0.49	0.48 ± 0.011 ^a	2.33
4	0.54	0.57	0.55 ± 0.013 ^b	2.29
6	0.77	0.78	0.77 ± 0.005 ^c	0.59
8	0.99	1.04	1.01 ± 0.026 ^d	2.53
24	1.86	1.89	1.88 ± 0.023 ^e	1.21
48	2.43	2.45	2.44 ± 0.018 ^f	0.72

* TK_{MRS} – titraciona kiselost 10 ml MRS bujona; X_{sr} – prosečna vrednost ± standardna devijacija; n - broj uzoraka; Cv - koeficijent varijacije; statistička značajnost uzoraka (p<0.05) prikazana je malim slovima u indeksu

5.3. Sposobnost rasta nakon tretiranja povišenim temperaturama

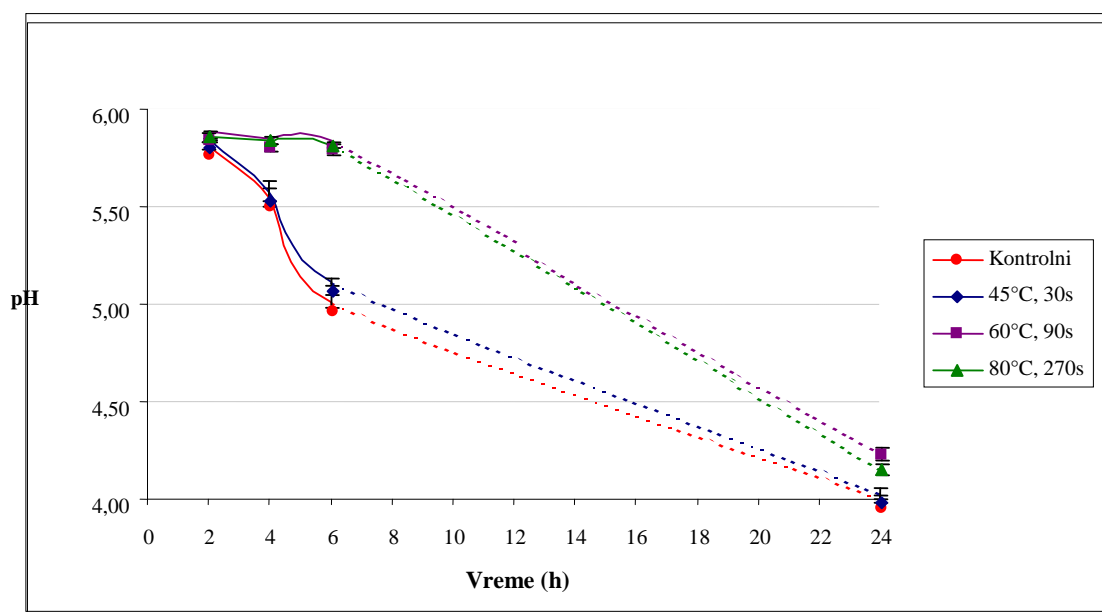
Ispitivanje sposobnosti rasta nakon tretiranja povišenim temperaturama od 45°C, 60°C i 80°C u toku 30s, 90s i 270s respektivno, vršeno je merenjem OD_{600nm} vrednosti inokulisane bujonske kulture 2, 4, 6 i 24h nakon tretmana, što je prikazano u tabeli 10. Praćen je i stepen snižavanja pH vrednosti inokulisanog MRS bujona u datim vremenskim intervalima (grafik 2).

Inaktivacija termički tretiranih ćelija posmatrana je takođe mikroskopskim putem, pri čemu je u inokulisan MRS bujon prethodno dodat propidijum jodid (PI). Bujonska kultura je nakon tretmana mikroskopski posmatrana pri uvećanju 1000x, što je prikazano na slici 14.

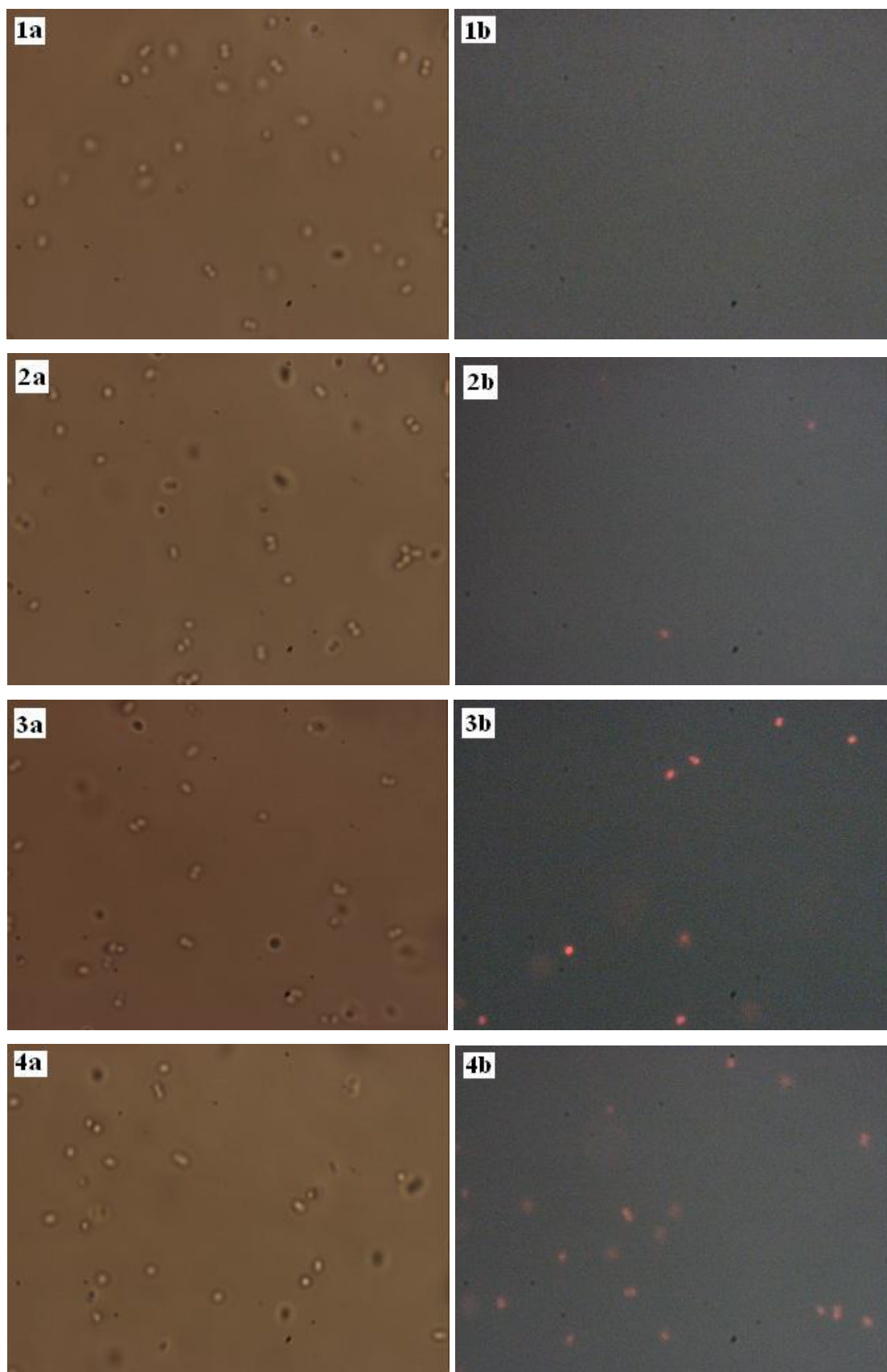
Tabela 10. Promena optičke gustine tretiranih ćelija *Lb. plantarum* 564 povišenim temperaturama u toku inkubacije u MRS bujonu na 37°C

Vreme (h)	Termički tretman	OD _{600nm}		X _{sr} (n=3) *	Cv
		X _{min}	X _{max}		
2	Kontrolni	0.063	0.079	0.069 ± 0.009 ^a	12.27
	45°C, 30s	0.052	0.064	0.058 ± 0.006 ^a	10.33
	60°C, 90s	0.009	0.016	0.013 ± 0.004 ^a	27.73
	80°C, 270s	0.001	0.006	0.003 ± 0.003 ^a	88.19
4	Kontrolni	0.576	0.662	0.624 ± 0.044 ^b	7.03
	45°C, 30s	0.593	0.637	0.618 ± 0.023 ^b	3.68
	60°C, 90s	0.009	0.018	0.014 ± 0.005 ^a	32.73
	80°C, 270s	0.003	0.008	0.005 ± 0.003 ^a	47.19
6	Kontrolni	1.871	1.903	1.883 ± 0.018 ^c	0.94
	45°C, 30s	1.825	1.929	1.874 ± 0.052 ^c	2.79
	60°C, 90s	0.017	0.029	0.022 ± 0.006 ^a	29.67
	80°C, 270s	0.008	0.015	0.012 ± 0.004 ^a	30.10
24	Kontrolni	4.470	4.827	4.646 ± 0.179 ^d	3.84
	45°C, 30s	4.365	5.118	4.667 ± 0.398 ^d	8.53
	60°C, 90s	3.777	4.179	3.993 ± 0.203 ^e	5.08
	80°C, 270s	3.750	4.086	3.914 ± 0.168 ^e	4.30

* X_{sr} – prosečna vrednost ± standardna devijacija; n - broj uzoraka; Cv - koeficijent varijacije; statistička značajnost uzoraka (p<0.05), izračunata putem faktorijalne ANOVA analize primenom Fišerovog testa, prikazana je malim slovima u indeksu



Grafik 2. Acidogena sposobnost *Lb. plantarum* 564 nakon termičkog tretmana



Slika 14. Atenuacija ćelija *Lb. plantarum* 564 termičkim tretmanima: a – normalno osvetljenje; b – fluorescentno osvetljenje; 1 – kontrolni uzorak; 2 – uzorak tretiran na 45°C, 30s; 3 - uzorak tretiran na 60°C, 90s; 4 - uzorak tretiran na 80°C, 270s

5.4. Tretiranje ćelija *Lb. plantarum* 564 različitim PEF tretmanima

Primenjeni PEF tretmani se mogu podeliti u sledeće dve grupe:

- I grupa: Tretmani čija je jačina električnog polja ispod 13 J/cm^3 , a koji su obeleženi sa A_1 , A_2 i A_3 ;
- II grupa: Tretmani čija je jačina električnog polja iznad 30 J/cm^3 , a koji su obeleženi sa B_1 , C_1 i D_1 , kao i ponovni tzv. PEP re-tretmani prethodno tretiranih ćelija tretmanima B_1 , C_1 i D_1 , a koji su obeleženi sa B_2 , C_2 i D_2 .

Netretirani (kontrolni) uzorci su obeleženi sa O.

5.4.1. Primena PEP tretmana energije $< 13 \text{ J/cm}^3$

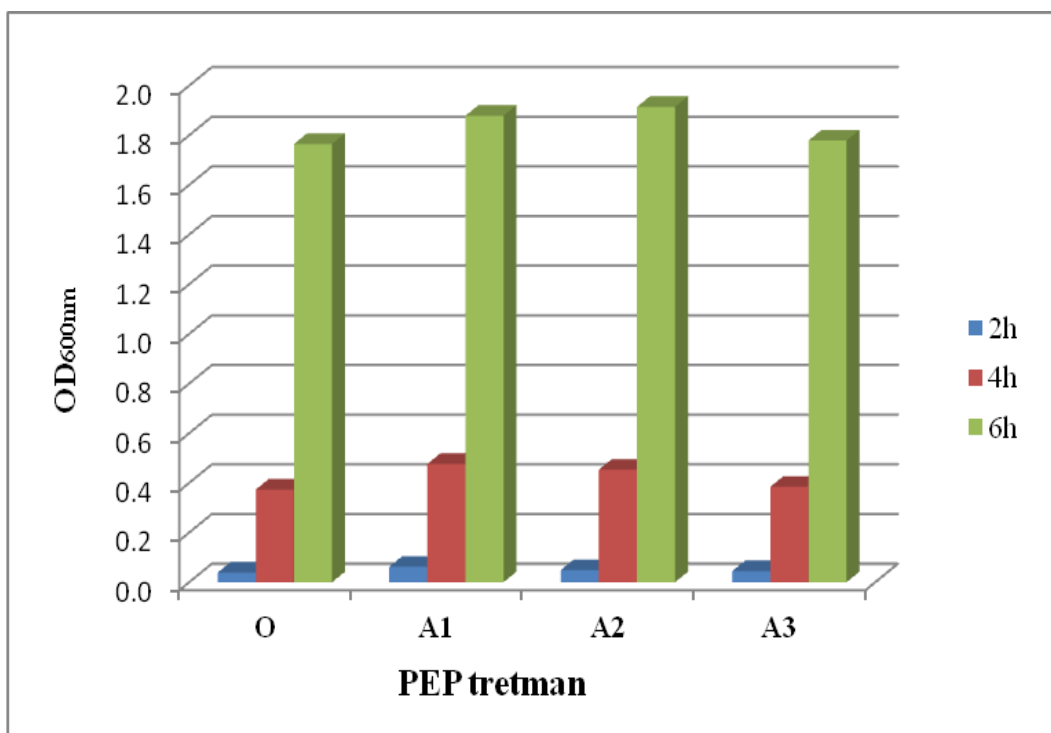
U tabeli 11 je prikazan broj ćelija soja *Lb. plantarum* 564 nakon PEP tretmana čija je jačina električnog polja bila manja od 15 kV/cm , odnosno primenjena energija niža od 15 J/cm^3 . Uzorci su nakon tretmana inokulisani u MRS bujon i nakon 2 sata inkubacije na 37°C određen je broj kolonija. S obzirom na to da je na osnovu prethodnih ispitivanja ustanovljeno da se ćelije nalaze u lag fazi u toku prva 2 sata nakon inokulacije, ova vremenska odrednica je bila najmerodavnija za ispitivanje efekta primenjenih PEP tretmana neposredno nakon tretiranja. Naime, pošlo se od pretpostavke da ćelije nisu ušle u fazu rasta, te da broj kolonija predstavlja finalni efekat datog PEP tretmana.

Tabela 11. Efekat PEP tretmana energije $< 15 \text{ J/cm}^3$ na broj kolonija soja *Lb. plantarum* 564

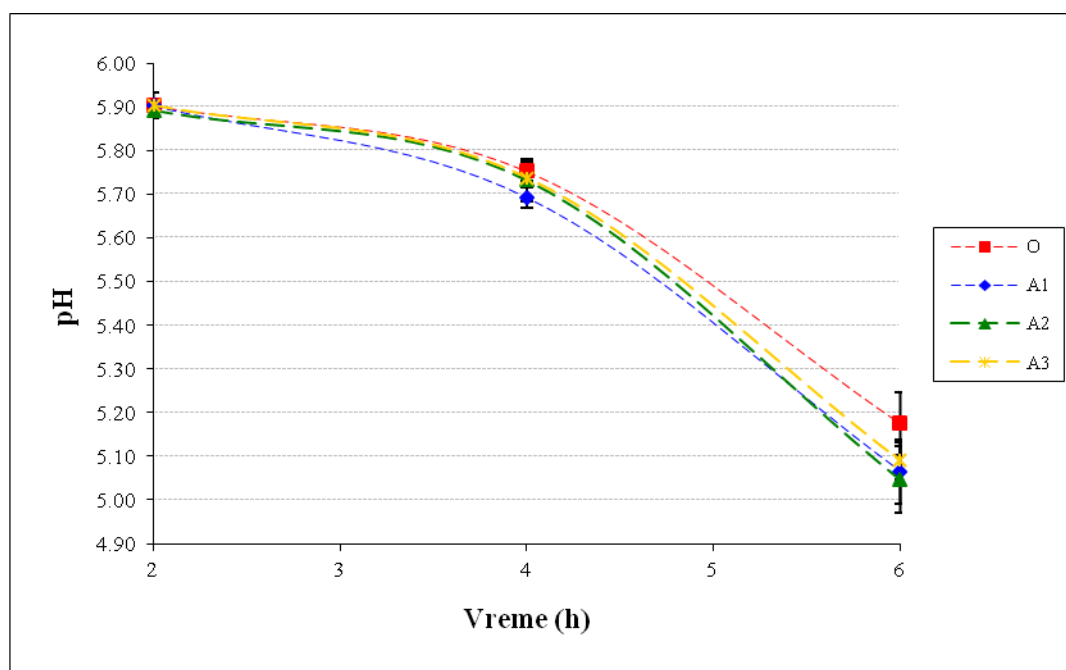
PEF tretman	$\log_{10} \text{ cfu / ml}$		$X_{sr} (n=4)^*$	Cv
	X_{\min}	X_{\max}		
O	7.08	7.24	7.16 ± 0.08^a	1.05
A_1	7.33	7.44	7.38 ± 0.05^b	0.63
A_2	7.24	7.31	$7.28 \pm 0.03^{b,c}$	0.45
A_3	7.17	7.27	$7.22 \pm 0.04^{a,c}$	0.58

* O – kontrolni (netretirani) uzorak; A_1 , A_2 i A_3 – uzorci tretirani PEF tretmanima primenjene energije od 1.3 , 5.5 i 12.2 J/cm^3 respektivno; X_{sr} – prosečna vrednost \pm standardna devijacija; n - broj uzoraka; Cv - koeficijent varijacije; statistička značajnost uzoraka ($p < 0.05$) prikazana je malim slovima u indeksu

U cilju ispitivanja efekta datih PEP tretmana na rast i acidifikacionu sposobnost tretiranih bakterija, merene su OD i pH vrednost nakon 2, 4 i 6 sati inkubacije na 37°C , što je grafički prikazano na grafikonima 3 i 4.



Grafik 3. Promena OD vrednosti u toku 6 sati inkubacije ispitivanih laktobacila na 37°C u MRS bujonu (O – kontrolni (netretirani) uzorak; A₁, A₂ i A₃ – uzorci tretirani PEP tretmanima primenjene energije od 1.3, 5.5 i 12.2 J/cm³ respektivno)



Grafik 4. Acidifikaciona aktivnost PEP tretiranih bakterija u toku inkubacije na 37°C u MRS bujonu (O – kontrolni (netretirani) uzorak; A₁, A₂ i A₃ – uzorci tretirani PEP tretmanima primenjene energije od 1.3, 5.5 i 12.2 J/cm³ respektivno)

5.4.2. Primena PEP tretmana energije > 30 J/cm³

U sledećoj fazi eksperimenta izvršeni su PEP tretmani većeg intenziteta, sa ciljem postizanja veće redukcije ukupnog broja tretiranih ćelija. S obzirom na to da su tretmani energije ispod 15 J/cm³ pokazali pozitivno dejstvo na rast i acidifikacionu sposobnost bakterija, u narednoj fazi su primenjeni tretmani čije su amplitude iznosile 22.9 kV/cm u trajanju od 50 μs, kao i amplitude od 31.6 kV/cm u trajanju od 50 i 500 μs, što odgovara energiji od 34.6, 65.8 i 658.1 J/cm³, respektivno.

Efekat različitih PEP tretmana na sposobnost preživljavanja tretiranih ćelija laktobacila prikazan je u tabeli 12, gde je merenje izvršeno pre, kao i 2h nakon tretmana, a rezultati su predstavljeni u vidu promene logaritamske vrednosti ukupnog broja ćelija po mililitru.

Tabela 12. Efekat PEP tretmana na stepen inaktivacije ćelija *Lb. plantarum* 564

PEF tretman ^a	Energija (J/cm ³) ^b	Log ₁₀ cfu/ml ^c		Log redukcija
		Pre PEP	2 h posle PEP	
O	0	6.94 ± 0.05	7.06 ± 0.06	0
B ₁	34.6	6.94 ± 0.05	6.26 ± 0.05	0.7 ± 0.1
C ₁	65.8	6.94 ± 0.05	5.07 ± 0.06	1.9 ± 0.1
D ₁	658.1	6.94 ± 0.05	4.29 ± 0.02	2.7 ± 0.04
B ₂	34.6	7.01 ± 0.03	6.36 ± 0.05	0.6 ± 0.03
C ₂	65.8	6.97 ± 0.03	5.50 ± 0.05	1.4 ± 0.1
D ₂	658.1	6.98 ± 0.02	4.90 ± 0.04	2.0 ± 0.1

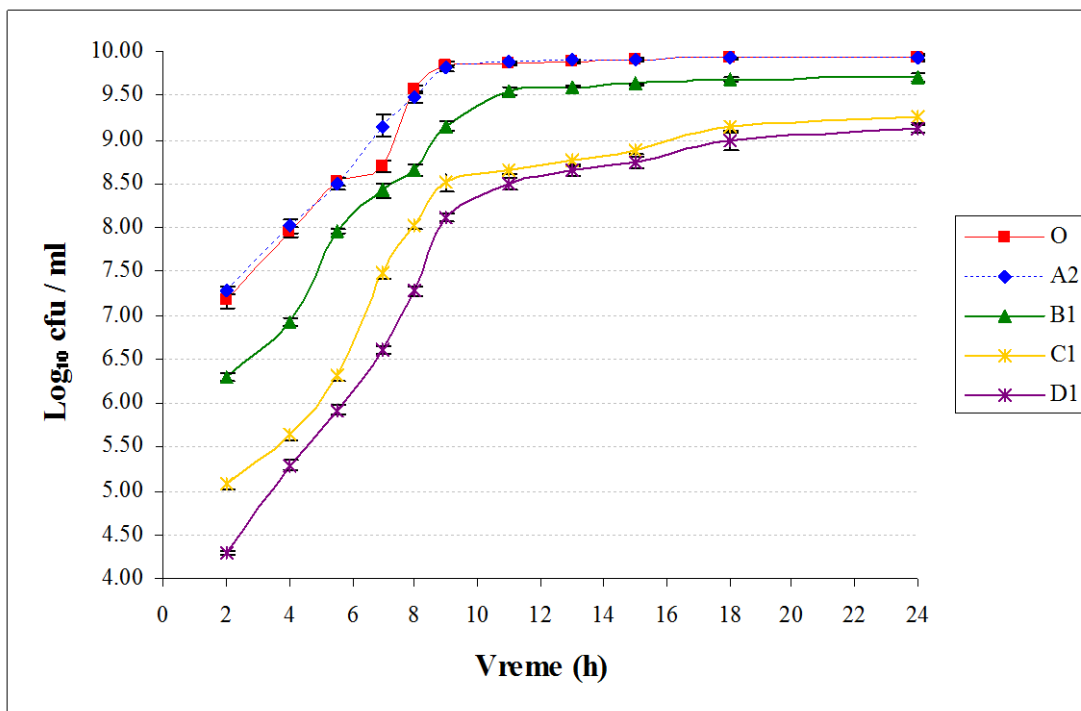
^a O – kontrolni (netretirani) uzorak; A₂, B₁, C₁ i D₁ – uzorci tretirani PEF tretmanima primenjene energije od 5.5, 34.6, 65.8 i 658.1 J/cm³, respektivno; ^b Specifična energija izračunata prema formuli (18); ^c Srednja vrednost ± STD (n=4)

Rast tretiranih ćelija nakon primenjenih PEP tretmana u toku 24 sata inkubacije na 37°C u MRS bujonu prikazan je u tabeli 13, kao i na grafikonima 5 i 6, pri čemu su merenja vršena nakon 2, 4, 5.5, 7, 8, 9, 11, 13, 15, 18 i 24 sata. S obzirom na to da je u toku eksponencijalne faze primećen usporen rast netretiranih ćelija *Lb. plantarum* 564 u periodu od 4 do 6 sati nakon inokulacije, uzorkovanje je umesto nakon 6h vršeno nakon 5.5h. Pored tretmana energije > 30 J/cm³, izvršeno je i praćenje rasta ćelija tretiranih tretmanom od 5.5 J/cm³ (tretman A₂). Grafikon 5 prikazuje rast bakterija u toku 24 sata inkubacije na 37°C, izražen kroz logaritamsku vrednost broja kolonija (cfu) po mililitru, dok je merenje optičke gustine na talasnoj dužini od 600 nm prikazano na grafikonu 6.

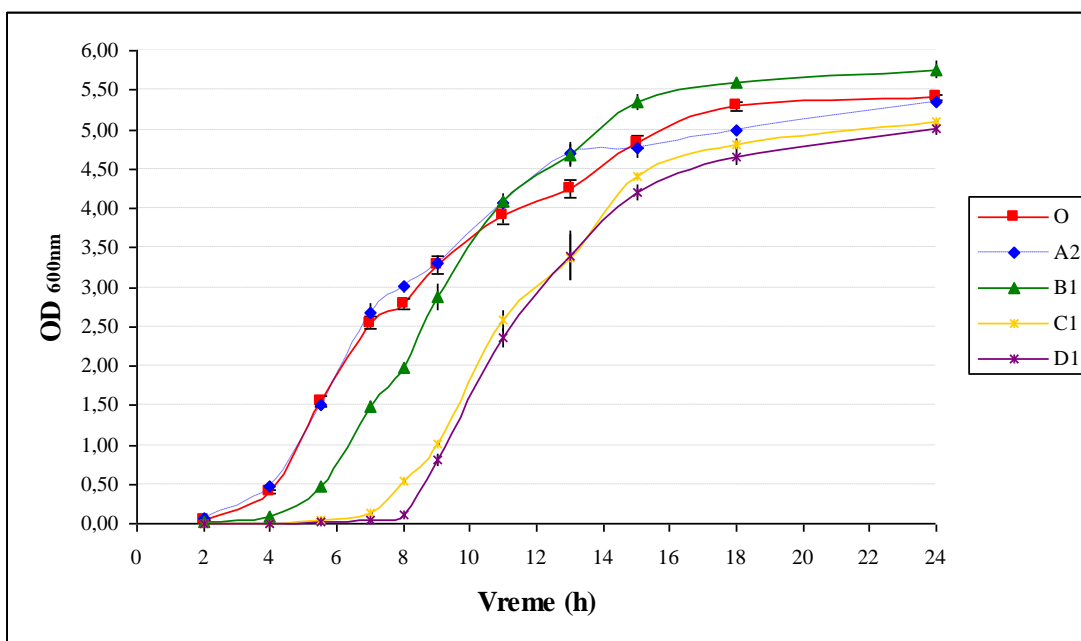
Tabela 13. Rast *Lb. plantarum* 564 u MRS bujonu na 37°C nakon PEP tretmana

PEP tretman *	Vreme uzorkovanja (h)	Log ₁₀ cfu / ml			Cv
		Xmin	Xmax	Xsr (n = 4)	
O	2	7.08	7.24	7.16 ± 0.08 ^a	1.16
	4	7.91	8.02	7.95 ± 0.06 ^b	0.76
	5.5	8.46	8.55	8.51 ± 0.05 ^c	0.56
	7	8.73	8.88	8.80 ± 0.08 ^d	0.87
	8	9.53	9.61	9.57 ± 0.04 ^e	0.42
	9	9.81	9.88	9.85 ± 0.04 ^f	0.36
	11	9.84	9.88	9.86 ± 0.02 ^{f, g}	0.21
	13	9.87	9.90	9.89 ± 0.02 ^{f, g}	0.15
	15	9.89	9.93	9.91 ± 0.02 ^{f, g}	0.21
	18	9.92	9.94	9.93 ± 0.01 ^{f, g}	0.10
	24	9.91	9.96	9.94 ± 0.03 ^g	0.27
A ₂	2	7.24	7.31	7.28 ± 0.04 ^v	0.50
	4	7.97	8.11	8.02 ± 0.08 ^b	0.97
	5.5	8.42	8.56	8.49 ± 0.07 ^{c, j}	0.83
	7	9.02	9.24	9.15 ± 0.12 ^k	1.28
	8	9.42	9.54	9.48 ± 0.06 ^e	0.63
	9	9.78	9.84	9.81 ± 0.03 ^f	0.31
	11	9.86	9.89	9.88 ± 0.02 ^{f, g}	0.46
	13	9.89	9.91	9.90 ± 0.01 ^{f, g}	0.16
	15	9.90	9.92	9.91 ± 0.01 ^g	0.21
	18	9.91	9.93	9.92 ± 0.01 ^g	0.27
	24	9.89	9.96	9.93 ± 0.04 ^g	0.36
B ₁	2	6.19	6.30	6.26 ± 0.05 ^h	0.80
	4	6.89	6.98	6.93 ± 0.05 ⁱ	0.68
	5.5	7.92	7.97	7.95 ± 0.02 ^b	0.26
	7	8.34	8.48	8.42 ± 0.07 ^j	0.86
	8	8.59	8.72	8.65 ± 0.07 ^d	0.77
	9	9.10	9.22	9.16 ± 0.06 ^k	0.66
	11	9.51	9.59	9.56 ± 0.04 ^e	0.46
	13	9.59	9.62	9.61 ± 0.02 ^{e, l}	0.16
	15	9.61	9.65	9.63 ± 0.02 ^{e, l}	0.21
	18	9.66	9.71	9.68 ± 0.03 ^l	0.27
	24	9.68	9.75	9.71 ± 0.04 ^l	0.39
C ₁	2	5.01	5.13	5.07 ± 0.06 ^m	1.09
	4	5.56	5.69	5.64 ± 0.07 ⁿ	1.24
	5.5	6.24	6.38	6.32 ± 0.07 ^h	1.14
	7	7.42	7.54	7.48 ± 0.06 ^o	0.80
	8	7.97	8.04	8.01 ± 0.04 ^b	0.47
	9	8.41	8.60	8.51 ± 0.10 ^c	1.13
	11	8.59	8.69	8.65 ± 0.05 ^d	0.59
	13	8.71	8.79	8.76 ± 0.04 ^d	0.50
	15	8.85	8.94	8.88 ± 0.05 ^p	0.56
	18	9.06	9.20	9.14 ± 0.07 ^k	0.79
	24	9.18	9.31	9.26 ± 0.07 ^q	0.70
D ₁	2	4.27	4.31	4.29 ± 0.02 ^r	0.49
	4	5.22	5.33	5.29 ± 0.06 ^s	1.11
	5.5	5.86	5.98	5.92 ± 0.06 ^t	1.02
	7	6.56	6.65	6.60 ± 0.05 ^u	0.68
	8	7.21	7.33	7.27 ± 0.06 ^v	0.83
	9	8.08	8.16	8.12 ± 0.04 ^w	0.50
	11	8.41	8.54	8.49 ± 0.07 ^{c, j}	0.85
	13	8.58	8.69	8.65 ± 0.06 ^d	0.68
	15	8.69	8.78	8.74 ± 0.05 ^d	0.52
	18	8.88	9.09	8.99 ± 0.11 ^x	1.17
	24	9.08	9.17	9.13 ± 0.05 ^k	0.50

* O – kontrolni (netretirani) uzorak; A₂, B₁, C₁ i D₁ – uzorci tretirani PEF tretmanima primenjene energije od 5.5, 34.6, 65.8 i 658.1 J/cm², respektivno; Xsr – prosečna vrednost ± standardna devijacija; n – broj uzoraka; Cv – koeficijent varijacije; statistička značajnost uzoraka (p<0.05) prikazana je malim slovima u indeksu



Grafik 5. Rast PEP tretiranih bakterija u toku inkubacije na 37°C u MRS bujonu, pri čemu je primenjena energija od: O – kontrolni (netretirani) uzorak; A – 5.5 J/cm³; B – 34.6 J/cm³; C – 65.8 J/cm³; D – 658.1 J/cm³



Grafik 6. Rast PEP tretiranih bakterija u toku inkubacije na 37°C u MRS bujonu, praćena merenjem OD vrednosti na 600 nm, pri čemu je primenjena energija od: O – kontrolni (netretirani) uzorak; A – 5.5 J/cm³; B – 34.6 J/cm³; C – 65.8 J/cm³; D – 658.1 J/cm³

Testiranje osetljivosti preživele populacije nakon prvog PEP tretmana vršeno je tako što je 100 μ l suspenzije PEP tretiranih ćelija inokulisano u 3 ml MRS bujona i inkubirano 24h na 37°C, a potom je 1 ml bujonske kulture zasejan u 9 ml MRS bujona sa 15% glicerola (v/v) i zamrznuto na -20°C. Nakon odmrzavanja na sobnoj temperaturi, uzorci su propagirani i tretirani kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode rada, gde je inicijalna populacija od 7 log₁₀ cfu/ml izložena ponovnom PEP tretmanu iste jačine kao prilikom prvobitne primene istih.

Primena ponovnih tretmana, tzv. PEP re-tretmana izvršena je nad tretiranim uzorcima B₁, C₁ i D₁, pri čemu su primenjeni isti uslovi kao i u prethodnom tretmanu, odnosno primenjena energija je iznosila 34.6, 65.8 i 658.1 J/cm³, što predstavlja tretmane B₂, C₂ i D₂, respektivno.

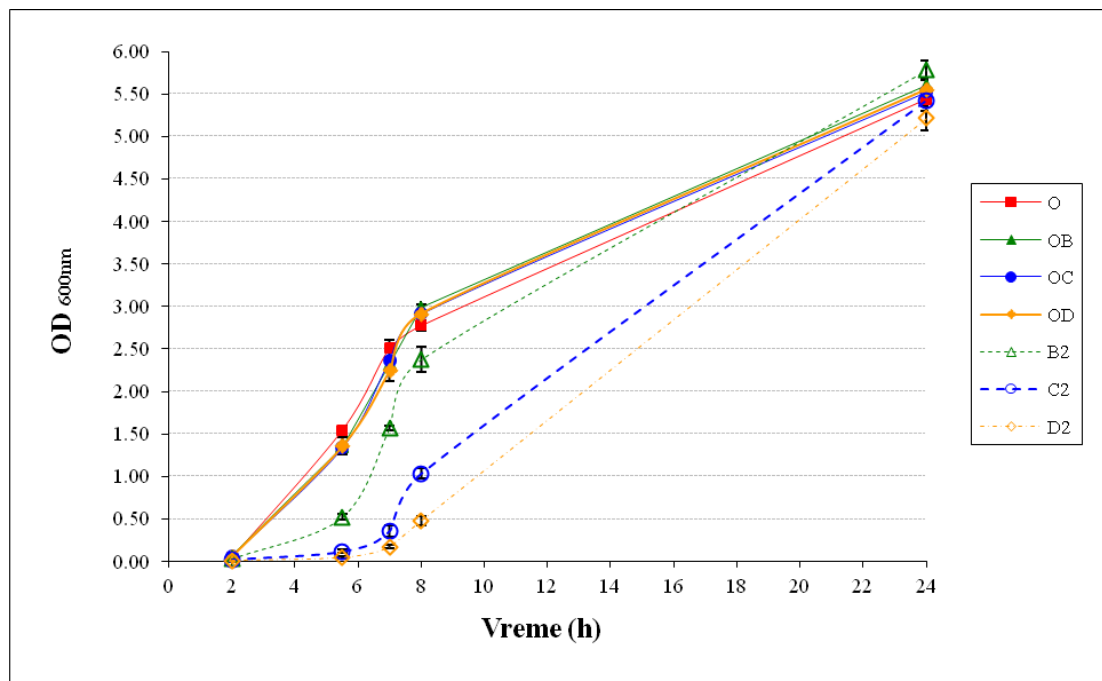
U tabeli 14 je prikazana logaritamska vrednost ukupnog broja kolonija netretiranih i PEP re-tretiranih ćelija, kao i njihovih kontrolnih uzoraka (prethodno tretiranih uzoraka B₁, C₁ i D₁).

Tabela 14. Efekat PEP re-tretmana > 30 J/cm³ na broj kolonija soja *Lb. plantarum* 564

Uzorak	Tretman (J/cm ³)	Vreme (h)	Log ₁₀ cfu / ml			Cv
			Xmin	Xmax	Xsr (n=4) *	
O	0	2	7.08	7.24	7.15 ± 0.07 ^a	0.98
		8	9.34	9.58	9.48 ± 0.10 ^b	1.09
		24	9.64	9.92	9.84 ± 0.13 ^c	1.33
OB	0	2	6.98	7.13	7.07 ± 0.07 ^{a, d}	0.97
		8	8.92	8.99	8.95 ± 0.03 ^e	0.35
		24	9.75	9.89	9.82 ± 0.06 ^c	0.61
OC	0	2	6.96	7.08	7.00 ± 0.06 ^d	0.78
		8	8.91	8.98	8.94 ± 0.04 ^e	0.40
		24	9.81	9.86	9.84 ± 0.02 ^c	0.20
OD	0	2	6.98	7.14	7.06 ± 0.08 ^d	1.16
		8	8.89	8.94	8.91 ± 0.02 ^e	0.28
		24	9.76	9.82	9.79 ± 0.03 ^c	0.31
B ₂	34.6	2	6.30	6.39	6.36 ± 0.05 ^f	0.74
		8	8.64	8.69	8.66 ± 0.02 ^g	0.26
		24	9.71	9.85	9.78 ± 0.06 ^c	0.60
C ₂	65.8	2	5.44	5.56	5.50 ± 0.05 ^h	0.95
		8	8.38	8.44	8.41 ± 0.03 ⁱ	0.36
		24	9.46	9.61	9.54 ± 0.06 ^b	0.65
D ₂	658.1	2	4.85	4.93	4.90 ± 0.04 ^j	0.76
		8	8.08	8.25	8.17 ± 0.10 ^k	1.17
		24	9.39	9.52	9.46 ± 0.05 ^b	0.48

* O – kontrolni (netretirani) uzorak; OB, OC, OD – kontrolni uzorci za tretmane B₂, C₂ i D₂, respektivno; B₂, C₂ i D₂ – uzorci re-tretirani PEF tretmanima primenjene energije od 34.6, 65.8 i 658.1 J/cm³, respektivno; Xsr – prosečna vrednost ± standardna devijacija; n – broj uzoraka; Cv – koeficijent varijacije; statistička značajnost uzoraka (p<0.05) prikazana je malim slovima u indeksu

Promena optičke gustine tokom inkubacije kontrolnih i PEP re-tretiranih uzoraka prikazana je na grafikonu 7.

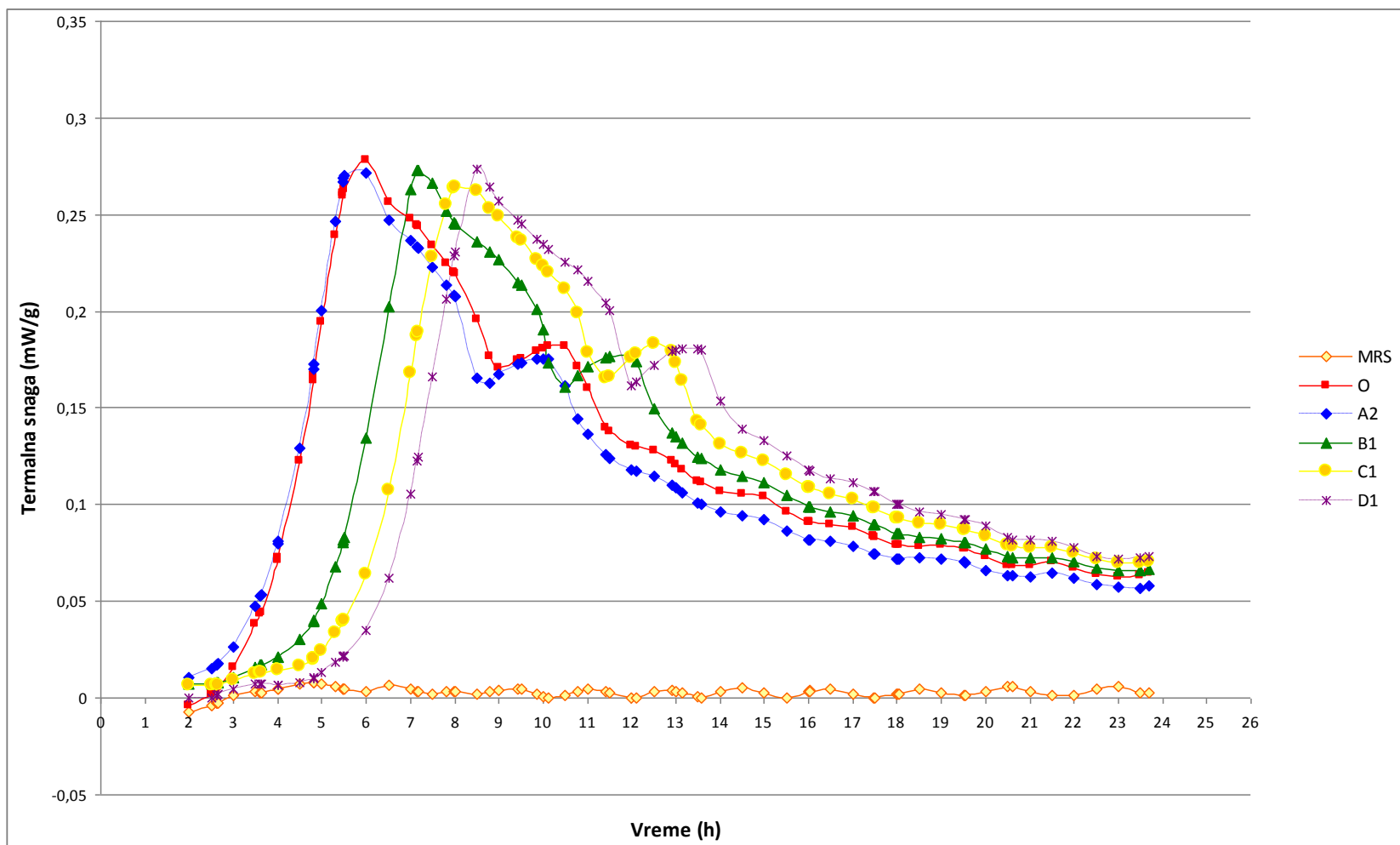


Grafik 7. Rast PEP re-tretiranih bakterija u toku inkubacije na 37°C u MRS bujonu, praćena merenjem OD vrednosti na 600 nm, pri čemu je primenjena energija od: 0 J/cm³ (O, OB, OC, OD – kontrolni uzorci); 34.6 J/cm³ (B₂), 65.8 J/cm³ (C₂) i 658.1 J/cm³ (D₂)

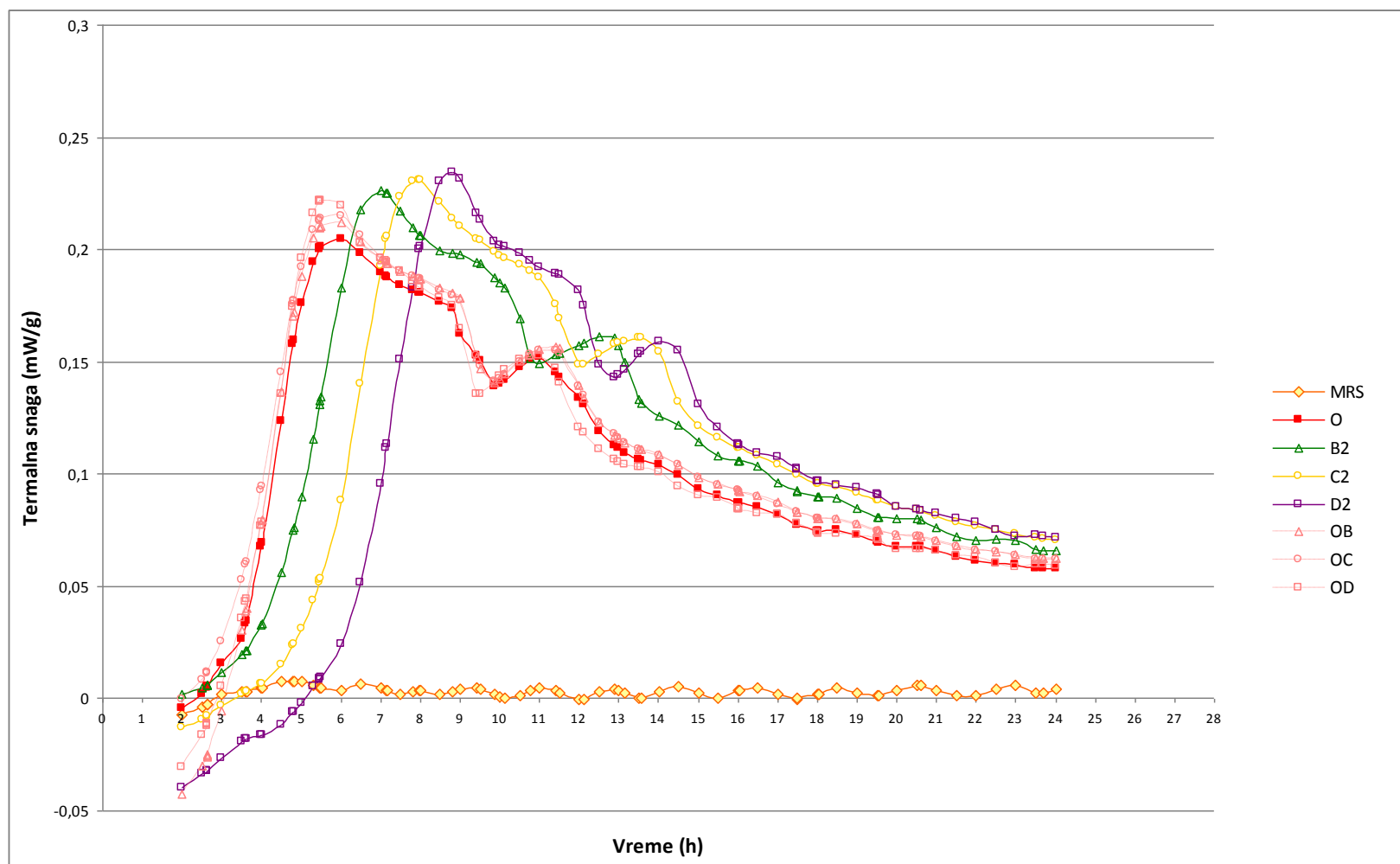
5.5. Metabolička aktivnost PEP tretiranih ćelija

Dejstvo pulsirajućih električnih polja na razvoj i metaboličku aktivnost tretiranih ćelija praćena je konstantno putem izotermalne kalorimetrije. Nakon primenjenih PEP tretmana (A₂, B₁, C₁ i D₁), uzorci su inkubirani u MRS bujonu 24 sata na 37°C, a stepen odavanja toplote tokom razvoja PEP tretiranih bakterija je registrovan u vidu termalne snage u funkciji vremena, što je prikazano na grafikonu 8. S obzirom na to da je, nakon što su ampule smeštene u ležište kalorimetra, primećen poremećaj signala u kalorimetru na početku merenja, na grafikonu 8 su prikazani podaci registrovani nakon drugog sata pa na dalje.

Metabolička aktivnost je takođe praćena i kod PEP re-tretiranih uzoraka (B₂, C₂ i D₂), što je prikazano na grafikonu 9. Pored kontrolnog (netretiranog) uzorka (O), prikazan je i razvoj prethodno tretiranih uzoraka (B₁, C₁ i D₁), koji su poslužili za ponovni PEP tretman primenom istih uslova, a sami su predstavljali kontrolne uzorke (označene kao OB, OC i OD). Prikazane krive na grafikonima 8 i 9 predstavljaju prosečnu vrednost dobijenu iz dva paralelna merenja.



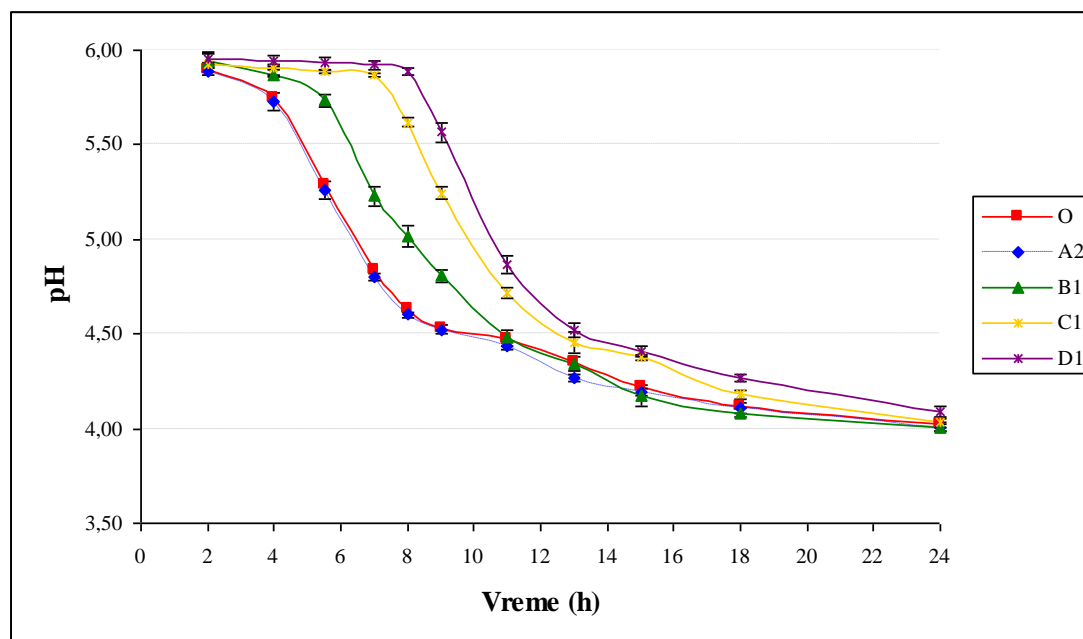
Grafik 8. Efekat PEP tretmana na produkciju termalne snage preživjele populacije, gde je: O – kontrolni (netretirani) uzorak; A₂, B₁, C₁ i D₁ – uzorci tretirani PEP tretmanima primenjene energije od 5.5, 34.6, 65.8 i 658.1 J/cm³ respektivno



Grafik 9. Efekat PEP re-tretmana na produkciju termalne snage preživjele populacije, gde je: O - kontrolni (netretirani) uzorak; OB, OC, OD – kontrolni uzorci za tretmane B₂, C₂ i D₂ respektivno; B₂, C₂ i D₂ – uzorci re-tretirani PEP tretmanima primenjene energije od 34,6, 65,8 i 658,1 J/cm³ respektivno

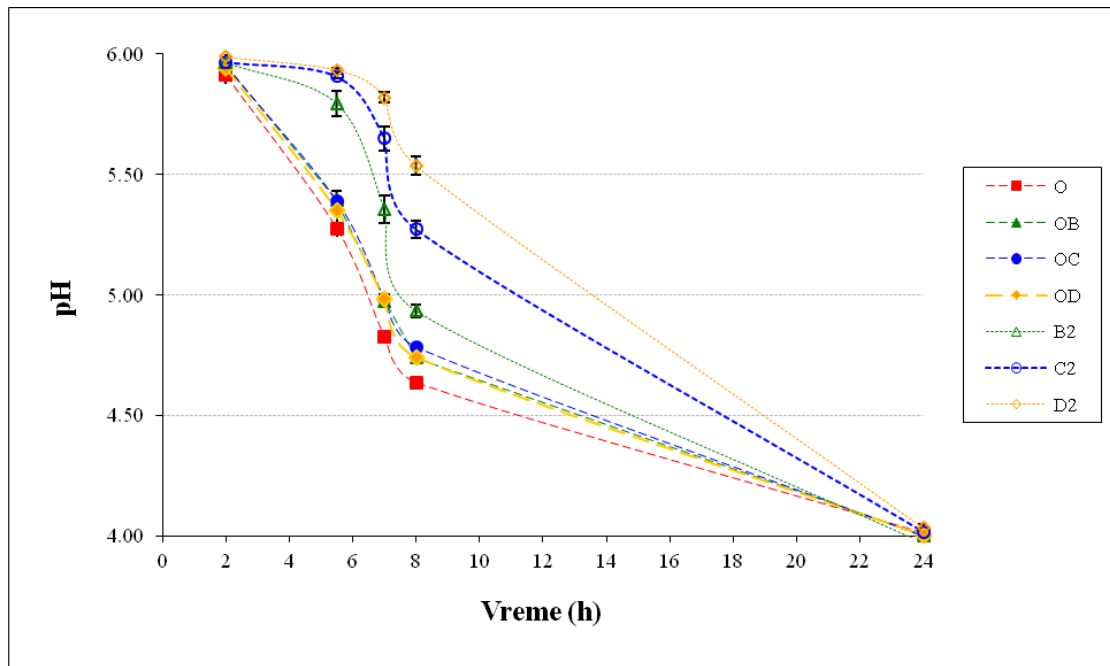
5.6. Acidifikaciona sposobnost PEP tretiranih ćelija *Lb. plantarum* 564

Acidifikaciona aktivnost bakterija tretiranih PEP tretmanima energije iznad 30 J/cm^3 , praćena u toku 24 sata inkubacije ćelija inokulisanih u MRS bujonu na 37°C , prikazana je na grafikonu 10.



Grafik 10. Acidifikaciona aktivnost PEP tretiranih bakterija u toku inkubacije na 37°C u MRS bujonu, praćena merenjem pH vrednosti, pri čemu je primenjena energija od: O – kontrolni (netretirani) uzorak; A₂ – 5.5 J/cm^3 ; B₁ – 34.6 J/cm^3 ; C₁ – 65.8 J/cm^3 ; D₁ – 658.1 J/cm^3

Acidifikaciona aktivnost ćelija izloženih ponovnim PEP tretmanima prikazana je na grafikonu 11.



Grafik 11. Acidifikaciona aktivnost PEP re-tretiranih bakterija u toku inkubacije na 37°C u MRS bujonu, praćena merenjem pH vrednosti, pri čemu je primenjena energija od: 0 J/cm³ (O, OB, OC, OD – kontrolni uzorci); 34.6 J/cm³ (B₂), 65.8 J/cm³ (C₂) i 658.1 J/cm³ (D₂)

Smanjenje, odnosno odlaganje acidifikacione sposobnosti kao rezultat dejstva pulsirajućih električnih polja može se prikazati u vidu tzv. ”stepena odlaganja acidifikacije” i to putem sledeće formule:

$$\text{Stepen odlaganja acidifikacije} = 100 - \left(\frac{T_0}{T_t} \right) \times 100 (\%) \quad (20)$$

gde je: [T₀] – vreme (h) potrebno da se pH snizi na određeni nivo od strane netretiranih ćelija; [T_t] – vreme potrebno da se dostigne ista pH vrednost acidifikacionom sposobnošću PEP tretiranih ćelija

Ukoliko se prati stepen acidifikacije MRS bujona do postizanja pH 5.5, tada se stepen odlaganja acidifikacije PEP tretiranih i re-tretiranih ćelija u odnosu na netretirane ćelije može prikazati u tabeli 15.

Tabela 15. Vreme (h) potrebno da pH dostigne vrednost od pH 5.5 tokom inkubacije PEP tretirane suspenzije ćelija *Lb. plantarum* 564, inkubiranih u MRS bujonu na 37°C

Uzorak	T (h)	Stepen odlaganja acidifikacije (%)
O	4.2	0.0
A ₂	4.2	0.0
B ₁	6.4	34.4
C ₁	8.4	50.0
D ₁	9.3	54.9
B ₂	6.8	38.2
C ₂	7.6	44.7
D ₂	8.2	48.8

* O – kontrolni (netretirani) uzorak; A₂, B₁, C₁ i D₁ – uzorci tretirani PEP tretmanima primenjene energije od 5.5, 34.6, 65.8 i 658.1 J/cm³ respektivno; B₂, C₂ i D₂ – uzorci re-tretirani PEP tretmanima primenjene energije od 34.6, 65.8 i 658.1 J/cm³ respektivno; T – vreme potrebno da pH dostigne nivo od pH 5.5.

5.7. Ispitivanje potencijalnih probiotskih kriterijuma PEP tretiranih ćelija *Lb. plantarum* 564

Ispitivanje ćelija *Lb. plantarum* 564 na potencijalna probiotska svojstva vršeno je pre, kao i nakon primenjenih PEP tretmana i re-tretmana, a ispitivani su sledeći kriterijumi:

- senzitivnost na simulirane gastrointestinalne (GI) uslove,
- rezistentnost na antibiotike i
- antimikrobna aktivnost.

5.7.1. Preživljavanje PEP tretiranih i re-tretiranih ćelija u GI uslovima

Dejstvo PEP tretmana, kao i re-tretmana na sposobnost preživljavanja ćelija soja *Lb. plantarum* 564 u gastrointestinalnim uslovima praćeno je putem simulirnog gastro testa i testa žučnih soli. Ispitivanje preživljavanja ćelija pomoću gastro testa vršeno je određivanjem ukupnog broja ćelija nakon 90 minuta inkubacije u simuliranim uslovima u želucu pri pH 2.0 (rastvoru sa 0.5% NaCl i 0.3% pepsina) na 37°C u anaerobnim uslovima.

Preživljavanje tretiranih ćelija u duodenalnim uslovima ispitivano je putem testa žučnih soli, pri čemu su ćelije inkubirane 60 minuta u rastvoru sa 0.2% pankreatina i 0.4% žučnih soli na 37°C u anaerobnim uslovima. Rezultati ispitivanja prikazani su u tabeli 16, a predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja.

Tabela 16. Sposobnost preživljavanja PEP tretiranih i re-tretiranih ćelija u gastrointestinalnim uslovima

Uzorak*	Početni broj (log ₁₀ cfu / ml)	Pepsin pH 2.0		Pankreatin i žučne soli	
		Broj preživelih (log ₁₀ cfu / ml)	Preživjele ćelije (%)	Broj preživelih (log ₁₀ cfu / ml)	Preživjele ćelije (%)
O	9.67±0.10	8.52±0.11	88.08 ^a	8.54±0.08	88.32 ^a
A ₂	9.49±0.09	8.43±0.09	88.80 ^a	8.57±0.06	90.31 ^b
B ₁	9.42±0.10	8.32±0.11	88.26 ^a	8.49±0.10	90.06 ^b
C ₁	9.50±0.07	8.61±0.08	90.63 ^b	8.60±0.12	90.49 ^b
D ₁	9.37±0.36	8.50±0.07	90.72 ^b	8.56±0.11	91.32 ^{b,c}
B ₂	9.51±0.19	8.68±0.09	91.21 ^b	8.85±0.09	93.03 ^{c,d}
C ₂	9.60±0.19	8.82±0.11	91.81 ^b	8.91±0.04	92.75 ^{c,d}
D ₂	9.69±0.12	8.85±0.09	91.33 ^b	9.04±0.09	93.23 ^d

* O – kontrolni (netretirani) uzorak; A₂, B₁, C₁ i D₁ – uzorci tretirani PEP tretmanima primjenjene energije od 5.5, 34.6, 65.8 i 658.1 J/cm³ respektivno; B₂, C₂ i D₂ – uzorci re-tretirani PEP tretmanima primjenjene energije od 34.6, 65.8 i 658.1 J/cm³ respektivno; statistički značajne razlike (p<0.05) među uzorcima prikazane su malim slovima u indeksu.

5.7.2. Rezistentnost na antibiotike

Rezistentnost PEP tretiranih ćelija na antibiotike je utvrđena difuznom metodom za antibiogram test, a rezultati su prikazani u tabeli 17.

Tabela 17. Rezistentnost na antibiotike

Antibiotik	O	A ₂	B ₁	C ₁	D ₁	B ₂	C ₂	D ₂
	Zona inhibicije (mm)							
Eritromicin (15 mcg)	11 ⁺⁺	9	10 ⁺⁺	10 ⁺⁺	11 ⁺⁺	10 ⁺⁺	9 ⁺	9 ⁺
Hloramfenikol (30 mcg)	9 ⁺	9 ⁺	9 ⁺	7 ⁺	10 ⁺⁺	9 ⁺	9 ⁺	7 ⁺
Kanamicin (40 mcg)	0 ^R	0 ^R	0 ^R	0 ^R	0 ^R	0 ^R	0 ^R	0 ^R
Gentamicin (30 mcg)	2 ^R	2 ^R	2 ^R	3 ^R	5 ⁺	2 ^R	2 ^R	4 ^R
Neomicin (30 mcg)	2 ^R	2 ^R	3 ^R	3 ^R	2 ^R	2 ^R	3 ^R	2 ^R
Streptomycin (30 mcg)	2 ^R	2 ^R	2 ^R	2 ^R	2 ^R	2 ^R	3 ^R	3 ^R
Tetraciklin (30 mcg)	3 ^R	4 ^R	5 ⁺	5 ⁺	5 ⁺	5 ⁺	5 ⁺	5 ⁺
Penicilin (6 mcg)	6 ⁺	6 ⁺	7 ⁺	7 ⁺	7 ⁺	7 ⁺	6 ⁺	6 ⁺

⁺⁺ - Vrlo senzitivnan (zona inhibicije > 10mm); ⁺ - Senzitivnan (zona inhibicije 5 - 10mm); R – rezistentan (zona inhibicije < 5mm)

5.7.3. Antimikrobna aktivnost

Antimikrobna aktivnost PEP tretiranih bakterija ispitivana je na 7 patogenih sojeva, a rezultati su prikazani u tabeli 18.

Tabela 18. Antimikrobna aktivnost

Antibiotik	O	A ₂	B ₁	C ₁	D ₁	B ₂	C ₂	D ₂
	Prečnik zone inhibicije (mm)							
<i>Listeria monocytogenes</i> IM 2000 *	11	10	10	7 (11)	10	10	9	11
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	8	9	10	7	12	11	8	12
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10	9	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 31806 *	8 (16)	8 (16)	8 (16)	8 (16)	8 (17)	7 (15)	8 (16)	7 (14)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	17	15	15	10	8	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 5999	7	8	7	7	8	8	8	8
<i>Candida albicans</i> ATCC 10259	8	9	9	8	7	7	9	8

* Dijametar zone inhibicije van zagrada predstavlja izraženo vidljivu inhibiciju, dok je unutar zagrada inhibicija slabije vidljiva, ali je bila prisutna

6. DISKUSIJA

Laktobacili učestvuju u mnogim fermentacionim procesima u prehrambenim proizvodima, prvenstveno proizvodima od mleka i mesa, a takođe i mnogim proizvodima biljnog porekla, gde su bakterije soja *Lactobacillus plantarum* našle široku primenu (Cohen i sar., 2006; de Vries i sar., 2004). To ukazuje na činjenicu da bakterije ovog soja poseduju sposobnost adaptacije u različitim uslovima spoljašnje sredine. S obzirom na to da mogu da se razvijaju u sredinama visoke gustine ćelija (preko 10^{10} cfu/ml), to predstavlja pozitivnu osobinu u primeni ovih bakterija u prehrambenoj industriji, gde se favorizuje razvoj ovih bakterija u sredini bogatoj supstratima, kao što je gastrointestinalni trakt (de Vries i sar., 2004).

Ispitivani soj *Lb. plantarum* 564, koji je izolovan iz autohtonog sjeničkog belog sira u salamuri, izabran je na osnovu ispitanih tehnoloških karakteristika koje treba da ima soj u starter kulturi, a to je mogućnost preživljavanja pri visokim koncentracijama soli (4-6%), širokom opsegu temperature (15-45°C), kao i izražena proteolitička aktivnost u cilju ubrzanja zrenja i poboljšanja senzornih karakteristika sira (Radulović, 2007).

6.1. Rast soja *Lb. plantarum* 564

Na osnovu krive rasta prikazane na grafikonu 1, može se ustanoviti da je nakon inokulacije suspenzije ćelija u MRS bujon nastupila lag faza, koja je trajala oko 2 sata. Pomenuto vreme predstavlja period prilagođavanja bakterija novoj sredini, pa broj ćelija koje su ušle u fazu deobe u tom periodu nije statistički značajan ($p < 0.05$), što se vidi iz rezultata prikazanih u tabeli 3.

Nakon toga je usledio eksponencijalni rast u narednih 6 sati inkubacije, da bi posle osmog sata ukupan broj ćelija dostigao 9 log jedinica i ostao na približno istom nivou. Tokom rasta i razvoja, bakterije vrše fermentaciju šećera, što dovodi do sniženja pH sredine, a smanjenje nutritijenata u medijumu dodatno dovodi do usporavanja rasta bakterija. Naime, mlečna kiselina, kao i druge organske kiseline koje se stvaraju u toku fermentacionih procesa, inhibitorno utiču na rast bakterija (Shelef, 1994). Iako poseduju veću otpornost prema povećanoj koncentraciji mlečne kiseline, rast ćelija *Lb. plantarum* postaje inhibiran kada koncentracija ove kiseline dostigne kritičan nivo (Giraud i sar., 1991; Russel i Diez-Gonzales, 1998). Inhibitoran

efekat organskih kiselina na ćelije bakterija uglavnom se ogleda u difuziji nedisosovanog molekula kiseline kroz ćelijsku membranu (Axe i Bailey, 1995; Hutkins i Nannen, 1993) Naime, ćelijska membrana je permeabilna samo za nedisosovane molekule kiseline, dok se molekuli jakih kiselina, kao što je hlorovodonična kiselina (HCl), nalaze u disosovanom obliku u vodenim rastvorima, a ćelijska membrana je nepropusna za jone kiselina (Presser i sar., 1997; Russell i Diez-Gonzalez, 1998). Mlečna kiselina, kao slaba kiselina, prodire unutar ćelije i ovaj proces se nastavlja do uspostavljanja ravnoteže između intra- i ekstracelularne koncentracije nedisosovane forme molekula ove kiseline. Unutar ćelije dolazi do disocijacije molekula mlečne kiseline, što ukazuje na to da je inhibitorni efekat veći ukoliko je razlika pH između spoljne i intracelularne sredine veća. Time se objašnjava zašto su pojedini mikroorganizmi, koji imaju sposobnost sniženja intracelularnog pH, otporniji na organske kiseline (Cook i Russel, 1994; Diez-Gonzalez i Russell, 1997), a ova osobina je uočena i kod bakterija *Lb. plantarum* (McDonald i sar., 1990).

Stoga, nakon osmočasovne inkubacije nastupa stacionarna faza, u kojoj veliki broj ćelija izumire, ali je i veliki broj još uvek u fazi deobe, tako da ukupan broj ćelija ostaje konstantan ($p < 0.05$). Nakon 5 dana uočava se značajan pad broja ćelija, koji je dostigao isti nivo kao na početku, predstavljajući fazu izumiranja (tabela 3).

Poznato je da logaritamska faza predstavlja period u kojem se ćelijska deoba odvija maksimalnom, ali konstantnom brzinom, pri čemu se ćelija deli geometrijskom progresijom, odnosno na eksponencijalan način, zbog čega se ova faza takođe naziva eksponencijalna faza. Međutim, u toku eksponencijalne faze rasta soja *Lb. plantarum* 564 primećuje se usporen rast u periodu od 4 do 6 sati nakon inokulacije, a potom bakterije nastavljaju da se razmnožavaju istom brzinom kao i na početku. Ova pojava je bila karakteristična samo za ovaj soj u svim eksperimentima vršenim nad grupom BMK (rezultati ispitivanja krive rasta ostalih ispitivanih laktobacila prikazani su na grafikonu P1 u prilogu). Stoga su naknadne analize uključile uzorkovanje nakon 5.5 i 7 sati. Na osnovu krive rasta kontrolnog uzorka, prikazane na grafikonu 5, može se ustanoviti da je dinamika rasta u periodu od 4 do 5.5 sati bila konstantna, a da usporenje rasta nastaje u periodu inkubacije od 5.5 do 7 sati, odnosno da traje oko 1.5 sat, nakon čega dolazi do poboljšane progresije rasta. Stoga se eksponencijalna faza ispitivanog soja *Lb. plantarum* 564 može podeliti na tri faze: period 2-5.5h, koji uključuje ranu i deo mid-log faze rasta; zatim preostali period mid-log faze (5.5-7h) i

kasnu-log fazu rasta (7-8h). Slična pojava je uočena od strane Cohen i sar. (2006), koji su detektovali usporen rast soja *Lb. plantarum* WCFS1 u periodu kasne-log i rane-stacionarne faze. Takođe je ustanovljeno da pomenuti soj karakterišu dve uzastopne log faze rasta u MRS bujonu, gde se druga faza odlikuje kraćim generacionim vremenom (Gt), a nastaje u periodu između OD₆₀₀ 3.0 i rane stacionarne faze (de Vries i sar., 2004). Rezultati istraživanja u ovom radu su u skladu sa literaturnim podacima, ukazujući na duplo kraće Gt u kasnoj u odnosu na ranu log-fazu rasta (21 min u poređenju sa 47 min), što se jasno uočava u tabeli 13.

Rast soja *Lb. plantarum* 564 je takođe praćen merenjem optičke gustine MRS bujona u toku inkubacije i na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 4, može se zaključiti da je dužina lag faze iznosila 2 sata, da bi potom bio uočen nagli porast optičke gustine, koji je eksponencijalno rastao u narednom periodu predstavljajući log fazu rasta. Porast OD vrednosti tokom inkubacije u trajanju od 24 sata može se videti i na grafikonu 6, gde je pored PEP tretiranih, prikazan i kontrolni (netretirani) uzorak. Ipak, merenjem optičke gustine nije moguće adekvatno prikazati krivu rasta, kao što se to čini merenjem broja ćelija, s obzirom na to da na porast optičke gustine utiču i izumrle ćelije, čiji broj naglo raste u stacionarnoj fazi, a one utiču na finalnu OD vrednost. Stoga je u kasnijem periodu rasta potrebno prethodno razblažiti uzorak sa čistim MRS bujonom, kako bi očitana OD vrednost bila u granicama merenja spektrofotometra (odnosno do 3.000). Time se relevantnost rezultata merenja optičke gustine u razblaženim uzorcima dovodi u pitanje, s obzirom na to da se povećava mogućnost pojave greške pri merenju.

6.2. Acidogena aktivnost soja *Lb. plantarum* 564

Acidogena aktivnost BMK u mleku je posledica brzine rasta ćelija i nastaje kao rezultat fermentacije laktoze. Jedan je od važnih tehnoloških parametara za selekciju bakterija u proizvodnji starter kultura, s obzirom na to da se prilikom izrade raznih proizvoda u prehrambenoj industriji postavljaju različiti zahtevi u pogledu stepena acidifikacije, koje starter kulture treba da ispunjavaju. Kod nekih proizvoda, kao što su fermentisani napici ili beli srevi u salamuri, poželjan je porast kiselosti, odnosno sniženje pH do 4.6-4.8 u kratkom vremenskom periodu. U proizvodnji fermentisanih mlečnih proizvoda dolazi do koagulacije kazeina pri pH 4.6, čime se formira fini gel, a fermentacijom laktoze nastaje mlečna kiselina, koja proizvodu daje

svež i karakterističan nakiseo ukus. Snižanjem pH trajnost proizvoda se produžava, jer se povećanjem kiselosti sprečava razviće patogenih i truležnih mikroorganizama, a među njima i nekih sporogenih formi koje se mogu naći u proizvodu. Kod belih sireva u salamuri, povećana kiselost ne doprinosi samo produženju trajnosti i formiranju karakteristične arome, već utiče i na reološka svojstva proizvoda. Naime, pri niskim pH od oko 4.8 dolazi do skoro potpunog oslobađanja kalcijumovih jona iz kazeinske micelle, što ovim sirevima daje izrazito krto i lomljivu strukturu. S druge strane, kod polutvrdih i tvrdih sireva, poželjan je niži stepen sniženja pH do 5.0-5.2, pri čemu deo kalcijuma ostaje vezan za kazeinsku micelu, pa ti sirevi imaju elastičnu, a kasnije plastičnu strukturu. S tim u vezi se vrši i selekcija određenih sojeva prilikom proizvodnje starter kultura.

Ispitivani soj *Lb. plantarum* 564, inokulisan u 10% rekonstituisano obrano mleko, nije pokazao izrazitu acidifikacionu aktivnost u toku 24 sata inkubacije na 37°C. Na osnovu podataka prikazanih u tabeli 5, može se uočiti neznatno sniženje pH u toku prva 2 sata inkubacije, što odgovara fazi prilagođavanja novom medijumu. Međutim, sniženje pH sredine bilo je neznatno i u toku narednih nekoliko sati, dostižući za 0.4 jedinice nižu pH vrednost nakon 24 sata inkubacije, a svega 0.5 jedinica nižu pH vrednost nakon 48 sati inkubacije na 37°C. Vrednost pH od ~ 4.1 dostignuta je tek nakon 72 sata inkubacije. Slično ponašanje su pokazali i drugi sojevi BMK izolovani iz istog autohtonog Sjeničkog sira, dok su s druge strane, laktobacili izolovani iz drugih namirnica snizili pH ROM sa početnih pH 6.5 na oko pH 4.0 u toku 24 sata inkubacije na 37°C (rezultati ispitivanja prikazani na grafikonu P2 u prilogu).

Praćena je i titraciona kiselost inokulisanog ROM u toku 48 sati inkubacije, gde se jasno uočava neznatan porast kiselosti (tabela 6). Usled prilagođavanja novim uslovima u medijumu, rast ćelija je usporen, mada se u toku prva 2 sata inkubacije uočava statistički značajna razlika ($p < 0.05$), kako u porastu kiselosti, tako i u sniženju pH rekonstituisanog obranog mleka (tabela 5 i 6). Ipak, u narednom periodu (od 2 do 4h inkubacije), sniženje pH, kao i porast kiselosti inokulisanog ROM, nisu bili statistički značajni ($p > 0.05$), kao i u vremenskim intervalima od 4-6h, 6-8h i 8-24h, da bi nakon 48h došlo do statistički značajnog sniženja pH ($p < 0.05$). Ovi rezultati ukazuju na to da je acidogena aktivnost soja *Lb. plantarum* 564 bila vrlo slaba u ROM.

Međutim, sposobnost acidifikacije pomenutog soja u MRS bujonu je bila izrazito dobra, gde je sniženje pH sa početnih ~ 5.9 na ~ 4.6 postignuto nakon 8h inkubacije na 37°C. S obzirom na to da se u sastavu MRS bujona nalazi monosaharid glukoza, slaba fermentacija laktoze u ROM može biti pokazatelj slabe aktivnosti enzima β -D-galaktozidaze, koji vrši hidrolizu disaharida laktoze na glukozu i galaktozu. Stoga, upotreba ovog soja je poželjna u proizvodnji onih sireva gde se zahteva spora acidifikacija u početnoj fazi izrade, a veći intenzitet proteolize u toku zrenja.

6.3. Rast ćelija nakon tretiranja povišenim temperaturama

Atenuacija bakterija povišenim temperaturama u cilju smanjenja produkcije kiseline i povećanja nivoa proteolitičkih enzima u medijumu ispitivana je još 70-ih godina prošlog veka. Naučnici su istraživali najpovoljniji temperaturni režim koji će redukovati ili odložiti proces fermentacije laktoze, a u isto vreme povećati stepen proteolitičke aktivnosti startera, čime se ubrzava proces zrenja sireva. Naime, usled dejstva povišenih temperatura (iznad 50°C) određeni broj ćelija lizira, čime intracelularni enzimi dospevaju u spoljašnju sredinu, a u zavisnosti od primenjenog termičkog tretmana zavisi i stepen atenuacije ćelija. Ipak, cilj ovog rada nije bio da se pronađe temperaturni režim kojim bi se postigao takav stepen atenuacije radi povećanja aktivnosti ćelijskih proteinaza i peptidaza. S obzirom na to da se u ovom radu ispituje uticaj pulsirajućih električnih polja na rast bakterija, primenjeni su tretmani koji bi predstavljali pozitivne kontrolne uzorke inaktivisanih ćelija. Prema literaturnim podacima, temperaturni režim za inaktivaciju mezofilnih startera je tretiranje ćelija na 59°C u trajanju od 15 sek. Stoga su ćelije tretirane na 60°C u trajanju od 1.5 min, a kao jači tretman izabran je temperaturni režim od 80°C u trajanju od 4.5 min.

Pored navedena dva režima, ćelije *Lb. plantarum* 564 su tretirane i nešto nižim temperaturnim režimom od 45°C u trajanju od 30 sek. Naime, u toku primene PEP tretmana dolazi do električnog naboja pulsa, koji se u obliku Džulovog zagrevanja oslobađa u tretirani medij (Zhang i sar., 1995). Zbog toga je neposredno nakon svakog PEP tretmana izvršeno merenje porasta temperature uranjanjem žice termoelementa u uzorak odmah nakon primenjenog tretmana. Pošto je temperatura uzorka nakon

primene najvećeg PEP tretmana od 658.1 J/cm^3 iznosila oko 42°C , izvršeno je ispitivanje sposobnosti rasta ćelija soja *Lb. plantarum* 564 tretiranih 30 sekundi na povišenoj temperaturi od 45°C sa ciljem ispitivanja uticaja pomenute temperature na stepen inaktivacije istih. Rezultati ispitivanja su prikazani u vidu promene optičke gustine termički tretiranih MRS bujona (tabela 10), kao i u vidu promene pH inkubiranih bujona (grafik 2) u toku 24 h inkubacije na 37°C . Ćelije su takođe tretirane u prisustvu propidijum jodida, nakon čega je izvršeno mikroskopiranje pri uvećanju od 1000x, što je prikazano na slici 14.

Na osnovu prikazanih podataka jasno se uočava visok stepen inaktivacije ćelija tretiranih visokim temperaturnim režimima, gde promena optičke gustine inokulisanih MRS bujona ostaje konstantna u toku prvih 6h inkubacije kod oba visoka temperaturna režima. Izrazito malo povećanje OD vrednosti mereno nakon 6h inkubacije rezultat je rasta preživelih bakterija, ali ova promena OD nije statistički značajna ($p < 0.05$), kao ni promena pH vrednosti u datom periodu inkubacije, što se jasno uočava na grafikonu 2. Slika 14 takođe jasno prikazuje visok nivo inaktivacije termički tretiranih ćelija, gde se na slici 14-4b uočava veliki broj liziranih ćelija, koje su obojene fluorescentnim propidijum jodidom usled primene visokog termičkog tretmana od 80°C u trajanju od 4.5 min. Nešto niži stepen inaktivacije se uočava kod ćelija tretiranih na 60°C u trajanju od 1.5 min (slika 14-3b), dok je neznatan broj ćelija tretiran najnižim termičkim tretmanom od 45°C , 30 s, bio obojen ovom DNK-vezujućom bojom (prosečno 1-2 u svakom vidnom polju).

Ipak, rast ćelija tretiranih srednjim termičkim tretmanom, iskazan putem OD vrednosti inkubiranog bujona, nije se statistički razlikovao ($p > 0.05$) od ćelija tretiranih najvišim termičkim tretmanom i to u toku prvih 6h inkubacije na 37°C . Međutim, nakon 24h inkubacije, broj preživelih ćelija kod oba pomenuta termička tretmana dostigao je približno isti nivo kao i kod netretiranih ćelija. Naime, OD vrednost bujona u kojima su inokulisane ćelije tretirane srednjim i visokim termičkim tretmanom iznosila je od ~ 3.9 do ~ 4.0 nakon 24h inkubacije, dok je kod kontrolnog uzorka ova vrednost bila oko 4.6. Iako je bila prisutna statistički značajna razlika OD vrednosti termički tretiranih i netretiranih bujonskih kultura, visoka OD vrednost nakon 24h ukazuje na potpun oporavak preživelih ćelija, koje su pokazale izrazitu acidifikacionu sposobnost, snizivši pH vrednost MRS bujona na oko pH 4.2, što je približno pH vrednosti 24h inkubiranog kontrolnog uzorka (pH 4.0).

Takođe se uočava da temperaturni režim od 45°C u trajanju od 30 sekundi nije imao uticaj na rast i acidifikacionu aktivnost bakterija tokom 24h inkubacije na 37°C, s obzirom na to da razlika OD vrednosti, kao i pH bujonske kulture ovih i kontrolnih uzoraka nije bila statistički značajna ($p > 0.05$). Time se dokazuje da porast temperature uzorka u toku najjačeg PEP tretmana nije imao uticaj na promenu rasta i acidifikacione sposobnosti PEP tretiranih ćelija.

6.4. Tretman pulsirajućim električnim poljima

U cilju postizanja efikasnosti određenog PEP tretmana, amplitude primenjenih pulseva mogu varirati u širokom opsegu, pod uslovom da se smanjenje amplitude kompenzuje povećanjem dužine pulsa i obrnuto (Gášková i sar., 1996; Neumann, 1992). Naime, vreme tretmana, koje predstavlja broj pulseva pomnožen sa dužinom svakog pulsa, značajan je faktor koji utiče na stepen delovanja PEP tretmana na ćelije mikroorganizama. Dokazano je da se stepen permeabilizacije ćelija povećava sa porastom energetskog inputa (Wouters i sar., 2001a). Gášková i sar. (1996) su proučavali efekat pulsirajućih električnih polja visokih amplituda na ćelije kvasaca i ustanovili da se određeni stepen inaktivacije može postići smanjenjem amplitude, a povećanjem trajanja pulsa. Ista grupa autora je ustanovila da pulsevi širine ispod 1 μ s nemaju nikakav efekat na inaktivaciju ćelija, čak iako su amplitude iznosile i do 28 kV/cm. Schoenbach i sar. (1997) su otkrili da, ukoliko je dužina pulsa manja od 5 μ s, potrebno je povećanje energije kako bi se postigao efekat određenih pulseva na ćelije mikroorganizama. S druge strane, povećanje dužine pulsa može da rezultuje povećanju temperature uzorka, što može biti nepovoljno kada se ispituje dejstvo pulsirajućih električnih polja na mikroorganizme. Osim toga, Zhang i sar. (1995) su objavili da primena kraćih pulseva jačeg električnog polja redukuje energiju potrebnu za inaktivaciju mikroorganizama u određenom medijumu. Ista grupa autora je ustanovila da primena pulseva dužine iznad 20 μ s može rezultovati formiranju mehura pri visokim amplitudama od 30-40 kV/cm. S obzirom na činjenicu da su mnogi autori objavili podatak o većoj efikasnosti kraćih pulseva u odnosu na duže (Neumann i sar., 1992; Schoenbach i sar., 1997), dužina pulsa primenjena u ovom radu iznosila je 5 μ s.

Još jedan limit vezan za efekat primenjenog pulsa je i prag napona, ispod kojeg ne dolazi do inaktivacije mikroorganizama. Naime, ukoliko su amplitude niže

od 2 kV/cm, čak i pri dužini pulsa od 300 μ s nije postignut efekat na ćelije kvasaca (Gášková i sar., 1996). Stoga je u ovom radu najniže primenjena amplituda pulsa iznosila 4.5 kV/cm.

Tretman pulsirajućim električnim poljima vršen je nad ćelijama u eksponencijanoj fazi, s obzirom na to da su one tada najosetljivije, jer se nalaze u fazi deobe (Barbosa-Canovas, 2000; Gaskova i sar., 1996; Hulsheger i sar., 1983). Početni broj ćelija bio je 10^8 cfu/ml, tako da je nakon razblaženja sa sterilnom destilovanom vodom tretirano 10^7 cfu/ml.

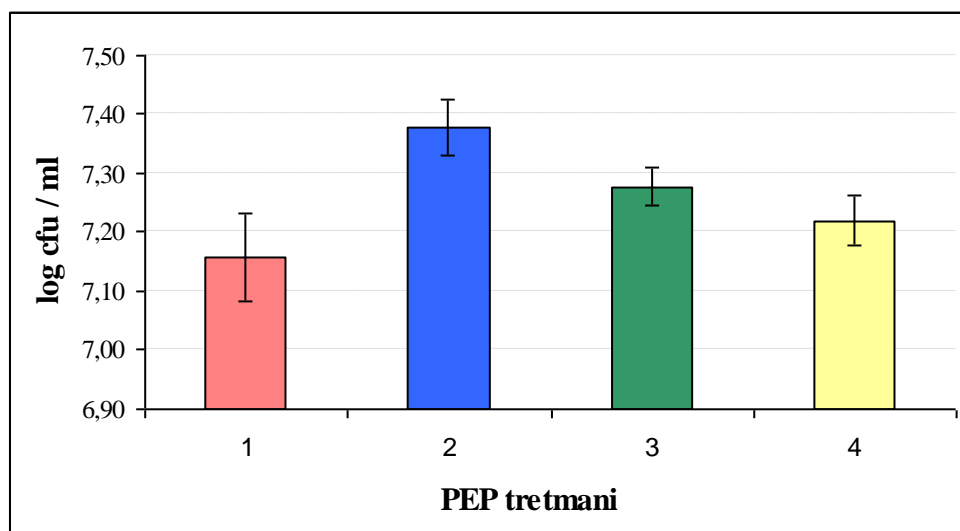
Primenjeni tretmani su, u zavisnosti od jačine električnog polja, podeljeni u dve grupe:

I grupa - tretmani čije su amplitude bile u rangu 4.5 – 13.6 kV/cm i čiji je input energije iznosio ispod 13 J/cm^3 – tzv. „niži PEP tretmani” i

II grupa - tretmani sa amplitudama od 22.9 – 31.6 kV/cm, čiji je input energije bio veći od 30 J/cm^3 – tzv. „visoki PEP tretmani”.

6.4.1. Efekat PEP tretmana energije < 13 J/cm^3

Efekat nižih PEP tretmana energije ispod 15 J/cm^3 prikazan je u tabeli 11, gde se uočava statistički značajan porast broja ćelija nakon primenjenih tretmana od 1.33 i 5.5 J/cm^3 , dok se efekat tretmana energije od 12.2 J/cm^3 na ukupan broj ćelija nije statistički razlikovao od ukupnog broja ćelija u netretiranim (kontrolnim) uzorcima. Ipak, sva tri tretmana su rezultovala povećanom broju ukupnih kolonija nakon primenjenih tretmana, a razlika u broju \log_{10} cfu /ml u uzorcima inkubiranim u MRS bujonu na 37°C , merena 2h nakon tretmana, slikovito se može prikazati pomoću grafikona 12.



Grafik 12. Efekat niskih PEP tretmana na logaritamski broj kolonija ćelija *Lb. plantarum* $564 \pm$ standardna devijacija, gde je: 1 – kontrolni uzorak (0 J/cm^3); 2 –PEP tretman A_1 (1.33 J/cm^3); 3 –PEP tretman A_2 (5.5 J/cm^3); 4 –PEP tretman A_3 (12.2 J/cm^3)

Povećan rast se takođe uočava na grafikonu 3, gde su ćelije izložene pulsirajućim električnim poljima jačine 4.5 i 9.1 kV/cm pokazale veće OD vrednosti tokom 6h inkubacije, u odnosu na netretirane i ćelije tretirane pulsevima amplitude 13.6 kV/cm.

S obzirom na to da usled dejstva pulsirajućih električnih polja dolazi do formiranja pora na ćelijskoj membrani, ovo oštećenje može biti reverzibilno, ukoliko je primenjena energija ispod kritične jačine. Neumann i sar. (1989) su to dokazali ispitivanjem različitih PEP tretmana na elektroporaciju ćelija. Ulmer i sar. (2002) su takođe ustanovili da je nakon primene tzv. nižih PEP tretmana (amplitude visokog intenziteta, ali ispod 13.8 kV/cm i energije do 17 kJ/kg), vijabilnost ćelija ostala nepromenjena, odnosno oštećenje membrane je bilo reverzibilno i ćelije su se nakon prestanka dejstva tretmana oporavile i nastavile da razvijaju normalnim tempom, nakon inkubacije u optimalnim uslovima. Naime, tokom primene pulsa, razlika u transmembranskom potencijalu dovodi do promena u dvoslojnoj ćelijskoj membrani, a indukovani „dielektrični slom“ membrane uzrokuje formiranje pora (Qin i sar., 1995a). Ukoliko je dvoslojni lipidni sloj ćelijske membrane izložen pulsirajućim električnim poljima visokog intenziteta u kratkom vremenskom periodu, nastupa privremena destabilizacija membrane na određenom području i ovaj fenomen se naziva **elektroporacija**. Tokom datog perioda destabilizacije, ćelijska membrana postaje veoma permeabilna za molekule prisutne u okolnoj sredini (Chang i sar.,

1992). Kao posledica elektroporacije nastaje dramatično povećanje permeabilnosti ćelijske membrane, zvano **elektropermeabilizacija**, koja u pojedinim slučajevima može dovesti do mehaničkog oštećenja membrane, a u zavisnosti od stepena nastalih promena, elektropermeabilizacija može biti reverzibilna ili ireverzibilna (Wouters i sar., 2001b). Ukoliko transmembranski napon dostigne kritičan stepen od $\Delta\phi_{\text{mem}} = 1V$, tada primenjeni PEP tretman može uzrokovati gubitak ćelijske vijabilnosti (Zimmermann i sar, 1974). Tako su Ulmer i sar. (2002) ustanovili da kritični stepen povećanja transmembranskog napona ćelijske membrane soja *Lb. plantarum* TMW 1460 nastupa primenom električnog polja jačine 13.8 kV/cm i pri inputu energije od 60 kJ/kg. U našem slučaju, primenjene amplitude od 4.5 do 13.6 kV/cm³, koje su odgovarale inputu energije od 1.33-12.2 kJ/kg, nisu rezultovale kritičnom povećanju $\Delta\phi_{\text{mem}}$, već je nastupilo reverzibilno formiranje membranskih pora, što je dovelo do povećanog rasta ćelija.

Pozitivan efekat tzv. „nižih PEP tretmana” posebno se odrazio na eksponencijalnu fazu rasta ćelija *Lb. plantarum* 564, gde su u periodu inkubacije od 5.5-7h netretirane ćelije pokazale usporen rast, dok su tretirane ćelije nastavile da se razvijaju normalnim eksponencijalnim tempom, što se jasno vidi na grafikonu 5 (kriva A₂ u poređenju sa krivom O), kao i tabeli 13, gde je generaciono vreme (Gt) skraćeno sa 141 min na 41 min u navedenom periodu. S druge strane, ukoliko posmatramo period eksponencijalne faze od 2-5.5h, a zatim od 7-9h, uočićemo da je prosečno generaciono vreme ćelija izloženih pulsirajućim električnim poljima energije 5.5 J/cm³ bilo nešto duže (oko 54 minuta) u poređenju sa Gt kod netretiranih ćelija (oko 45 minuta). Ipak, u periodu od 9-11h, Gt tretiranih ćelija je znatno skraćeno u odnosu na kontrolne (oko 9h u poređenju sa 48h), što ukazuje na to da su tzv. niži PEP tretmani uticali i na manji zastoj u razvoju u toku rane stacionarne faze, a takođe i na to da je početak rane stacionarne faze odložen kod PEP tretiranih ćelija.

U ovom radu nije proučavan razlog zbog kojeg netretirane ćelije ispitivanog soja pokazuju usporen stepen rasta u periodu od 5.5-7h u toku log faze, ali se pretpostavlja da je transport nekih komponenti neophodnih za razvoj ćelije usporen u tom periodu rasta, što je izbegnuto pomoću elektropermeabilizacije indukovane primenom PEP tretmana određene jačine. Zapravo, transport molekula kroz elektropermeabilnu membranu može nastupiti putem tri mehanizma: difuzije, elektroforeze i elektroosmoze. Ovi mehanizmi mogu doprineti povećanom

transmembranskom transportu molekula u toku trajanja pulsa, dok je nakon prestanka dejstva pulsa moguća jedino difuzija malih molekula, i ona traje do momenta potpunog oporavka membrane i kompletnog zatvaranja pora (Puc i sar., 2003). Međutim, u poređenju sa brzinom formiranja pora, oporavak membrane je spor proces i generalno zavisi od temperature (Weaver, 2000). Neke pore ostaju otvorene u toku dužeg vremenskog perioda i tada joni i molekuli nastavljaju da difunduju kroz ćeliju (Weaver i Barnett, 1992). Prema tome, u zavisnosti od stepena biohemijskog disbalansa može da zavisi i to da li će se ćelija oporaviti ili će postati ireverzibilno stresirana i inaktivisana (Weaver, 2000).

Takođe, prisustvo intracelularnih jona i molekula u medijumu olakšava razgradnju i transport ovih komponenti u ćeliju, što može pozitivno da utiče na promet materija u ćeliju. Time se otvara pitanje da li u toku elektroporacije, koja nastaje u toku PEP tretmana, pored oslobođenih jona i molekula dolazi do oslobađanja i jednog dela intracelularnih enzima, koji potom vrše razgradnju određenih komponenti MRS bujona, čime se omogućava nesmetan rast ćelija, ili dolazi isključivo do olakšane difuzije molekula u ćeliju kroz elektroporiranu membranu ili se ove dve pojave dešavaju istovremeno.

Kao što je navedeno u literaturnim podacima, formiranje reverzibilnih pora nastalih prilikom dejstva PEP tretmana određene jačine, dovodi do asimilacije određenih hranljivih sastojaka iz medijuma u ćeliju, što verovatno utiče na bolji rast i razvoj ćelije nakon što se ćelijska membrana oporavila i pore se zatvorile. Takve ćelije pokazuju i bolji stepen acidifikacije, što je prikazano na grafiku 4, gde je sniženje pH inokulisanih MRS bujona nakon 6h inkubacije na 37°C bilo statistički značajno kod svih uzoraka tretiranih niskim PEP tretmanima u odnosu na kontrolne uzorke (tabela P2 u prilogu).

Dobijeni rezultati istraživanja su u skladu sa literaturnim podacima. Naime, Lye i sar. (2011) su takođe detektovali povećan rast ćelija laktobacila tretiranih PEP tretmanima amplitude 7.5 kV/cm u trajanju od 4 ms, gde je nakon 20h inkubacije na 37°C broj laktobacila povećan za 0.89 – 1.96 log cfu/ml. Pored toga, pomenuti autori su ustanovili da tretirane ćelije imaju veću sposobnost asimilacije holesterola, što ukazuje na činjenicu da je u toku elektroporacije došlo do povećanja inkorporacije holesterola u PEP tretirane ćelije. Stoga su ovi autori zaključili da bi proces reverzibilne elektroporacije mogao biti korisna tehnika za povećanje sposobnosti

laktobacila da smanje ili uklone holesterol iz medijuma, čime bi se otvorila mogućnost proizvodnje novog tipa tzv. „adjunct” (dopunskih) starter kultura u prehrambenoj industriji.

U ovom radu nije vršeno ispitivanje asimilacije holesterola i drugih materija, mada bi dobijeni rezultati, koji ukazuju na poboljšan rast tretiranih BMK određenim PEP tretmanima, mogli da posluže kao osnova za dalja istraživanja na ovu temu.

6.4.2. Efekat PEP tretmana energije $> 30 \text{ J/cm}^3$

Na osnovu literaturnih podataka vezanih za mehanizme inaktivacije različitih sojeva laktobacila generalno je ustanovljeno da se maksimalna redukcija vijabilnosti ovih bakterija postiže primenom pulsirajućeg električnog polja jačine 25-30 kV/cm, gde kritična dužina pulsa i broj pulseva variraju u zavisnosti od ispitivanog soja (Jayaram i sar., 1993; Ulmer i sar., 2002; Wouters i sar., 2001b). U ovom radu značajna redukcija ($p < 0.05$) vijabilnosti bakterija *Lb. plantarum* 564 postignuta je primenom pulsirajućih električnih polja jačine 22.9 kV/cm u trajanju of 50 μs , gde je broj ćelija nakon tretmana opao za $\sim 1 \log_{10}$ jedinicu, dok je maksimalan stepen inaktivacije od 2.7 \log_{10} jedinice postignut primenom najjačeg tretmana energije od 658.1 J/cm^3 (tabela 12). S obzirom na to da je temperatura uzorka tokom najjačeg tretmana iznosila oko 42°C, ovo povećanje od oko 20°C nije uticalo na stepen inaktivacije PEP tretiranih ćelija, što pokazuju podaci prikazani u tabeli 10, gde se OD vrednost zagrevanih uzoraka na 45°C u trajanju od 30 sekundi nije statistički značajno razlikovala od kontrolnih (nezagrevanih) uzoraka, a uočen je i neznatan unos propidijum jodida u ćelije izložene najnižim termičkim tretmanom (slika 14-2b). Promena pH vrednosti (grafik 2) takođe nije bila statistički značajna. Ovi podaci su pokazatelj da je inaktivacija ćelija nastupila isključivo pod dejstvom pulsirajućih električnih polja.

6.4.2.1. Preživele ćelije nastavljaju sa rastom nakon PEP tretmana

Prema podacima prikazanim u tabeli 12, može se uočiti da je stepen mikrobiološke inaktivacije proporcionalan jačini primenjenog električnog polja, kao i trajanju PEP tretmana. Ukoliko se uzme u obzir činjenica da faza prilagođavanja traje 2 sata (prikazano u tabeli 3, kao i na grafikonu 1), to se na osnovu rezultata dobijenih

merenjem ukupnog broja ćelija 2h nakon PEP tretmana može zaključiti da su tretmani energije 34.6, 65.8 i 658.1 J/cm³ smanjili početni broj ćelija za oko 1, 2 i 3 log₁₀ jedinice, što predstavlja oko 10, 25 i 38% redukcije, respektivno. Međutim, nakon 24 h inkubacije u MRS bujonu na 37°C, ukupan broj ćelija u svim PEP tretiranim uzorcima je dostigao 9 log₁₀ jedinica (tabela 13), ukazujući na ponovan rast i razvoj preživelih ćelija laktobacila. Ipak, primenjena jačina električnog polja je imala statistički značajan uticaj na dužinu lag faze tretiranih bakterija, što se jasno uočava na grafikonu 6. Tako je lag faza ćelija izloženih pulsirajućim električnim poljima energije 34.6 J/cm³ produžena na oko 4h, nakon čega su bakterije ušle u eksponencijalnu fazu rasta. Pri tom je broj ćelija na početku eksponencijalne faze iznosio oko 10⁷ cfu/ml, što zapravo odgovara ukupnom broju ćelija na početku eksponencijalne faze u kontrolnom uzorku (tabela 13, grafik 5). Povećanje jačine električnog polja sa 22.9 na 31.6 kV/cm, pri istim ostalim uslovima, dovelo je do produžetka lag faze za oko 5h, odnosno eksponencijalna faza uzoraka izloženih PEP tretmanu energije 65.8 J/cm³ je nastupila nakon 7h, pri čemu je broj ćelija takođe dostigao 10⁷ cfu/ml.

Pored jačine električnog polja, na vijabilnost ćelija utiče i vreme trajanja tretmana, gde je pri istoj jačini električnog polja (od 31.6 kV/cm), povećanje broja pulseva sa 10 na 100 uzrokovalo produžetak lag faze sa 7 na 8h, što ukazuje na to da porast primenjene energije električnog pulsa produžava fazu oporavka tretiranih ćelija, koje su doživele jedan vid subletalnog šoka i preživele. Ovo ponašanje evidentno ukazuje na postojanje perzistentnosti ćelija, što je u literaturi opisano kod ćelija otpornih na tretmane antibioticima (Avery, 2006; Dhar i McKinney, 2007). Produžetak lag faze predstavlja jednu od karakteristika perzistera (Balaban i sar., 2004), na čije prisustvo ukazuju rezultati na grafikonu 6. Perzistentnost je osobina svojstvena heterogenosti, koja je prisutna u periodu rasta ćelije, a ova heterogenost u eksponencijalnoj fazi rasta je upravo uočena i kod ispitivanog soja *Lb. plantarum* 564 (grafik 5). Naime, perzistentne ćelije mogu preživeti drastične promene spoljašnjih uslova, kao što je i dejstvo pulsirajućih električnih polja, zato što se nalaze u nedeljivoj, tzv. dormant fazi (Balaban i sar., 2004), dok su ćelije u fazi deobe najosetljivije na PEP tretmane i najveći stepen inaktivacije nastaje tretiranjem ćelija u toku eksponencijalne faze rasta (Hülshager i sar., 1983; Barbosa-Cánovas i sar., 1999).

Rezultati istraživanja takođe ukazuju na uticaj jačine PEP tretmana na brzinu rasta, gde je efekat izraženiji sa povećanjem primenjene energije, što se može objasniti pojavom elektroporacije, koja nastaje usled dejstva pulsirajućih električnih polja, pri čemu jedan deo intracelularnog sadržaja ističe iz ćelije u spoljašnju sredinu (Grahl i Märkl, 1996; Simpson i sar., 1999). Takođe, intracelularni sadržaj ćelija, koje su usled dejstva pulsirajućih električnih polja lizirale, postaje dostupan preživeleoj subpopulaciji. Kako ove komponente utiču na preživljavanje i oporavak ćelija nakon subletalnog šoka nije do sada ispitivano, mada pozitivan efekat PEP tretmana na rast ćelija bakterija je takođe ustanovila grupa autora iz Švedske, Aronsson i sar. (1994), koji su ispitivali uticaj različite jačine električnog polja (od 15, 22.5 i 30 kV/cm) na rast *E. coli* i detektovali da su pulsirajuća električna polja jačeg intenziteta pokazala pozitivan efekat na rast ove bakterije u nutritivnom medijumu. Ipak, nije poznato kako se ovaj efekat odražava u kompleksnim sistemima prehrambenih proizvoda i da li je uopšte primenjiv na iste.

Kada je u pitanju mikrobiološki medij, kao što je MRS bujon, prisutan ćelijski sadržaj vidno utiče na dalji rast i razvoj preživelih ćelija, gde je generaciono vreme PEP tretiranih ćelija znatno skraćeno. Ako posmatramo podatke iz tabele 13, možemo uočiti da se generaciono vreme u toku eksponencijalne faze netretiranih ćelija *Lb. plantarum* 564 kreće od 45-50 minuta (period od 2 do 5.5h inkubacije), zatim nastaje usporenje u rastu od 141 min (u periodu od 5.5-7h), da bi rast ćelija potom opet bio ubrzan do 8h inkubacije, odnosno Gt je iznosilo svega 21 min. Potom se uočava lagano usporenje rasta, da bi nakon 9h inkubacije nastupila stacionarna faza. U toku stacionarne faze, broj ćelija je bio neznatno povećan, a generaciono vreme je u proseku iznosilo oko 35h za period od 9-18h, a zatim je dostiglo maksimalnu vrednost od 722h (period 18-24h), što ukazuje na zastoj ćelija u rastu, kao i to da se u datom periodu dinamika rasta ćelija odvijala istom brzinom kao i njihovo izumiranje. Međutim, kod PEP tretiranih ćelija se primećuje skraćanje generacionog vremena, kako u toku pojedinih perioda eksponencijalne faze, tako i u toku stacionarne faze. Tako je generaciono vreme u toku cele eksponencijalne faze (period od 2-8h) kod netretiranih ćelija iznosilo 45 min, a isto Gt su imali i uzorci izloženi PEP tretmanu energije 34.6 J/cm^3 , dok je Gt ćelija tretiranih pulsevima energije 65.8 i 658.1 J/cm^3 skraćeno na 37, odnosno 36 min. Ubrzani rast, koji je karakterističan za ćelije koje su preživele PEP tretman, nastaje verovatno usled prisustva intracelularnog sadržaja, koji

se oslobađa iz liziranih ćelija, čime se olakšava razgradnja i transport nekih nutritijenata u ćeliju, a takođe i sam intracelularni sadržaj može da predstavlja izvor novih nutritijenata za preživjele ćelije.

U toku rasta i razvoja ćelije uključen je veliki broj proteina, koji pretežno (39.6%) učestvuju u metabolizmu ugljenih hidrata i prometu energije. Ovi proteini se tokom rasta bakterija ne menjaju, s obzirom na to da je neophodan konstantan stepen aktivnosti da bi ćelija preživela. Ipak, koncentracija pojedinih proteina i enzima se u toku rasta menja, pa se neke dehidrogenaze, oksidoreduktaze, cistein sintetaze i cistationin β -liaze nalaze u većoj koncentraciji tokom log faze, a kod nekih sojeva i u ranoj stacionarnoj fazi rasta, da bi došlo do njihovog naglog opadanja u kasnijoj stacionarnoj fazi rasta. Većina ovih proteina učestvuje u metabolizmu ugljenih hidrata, translaciji RNA do proteina, kao i biosintezi proteina, lipida i nukleotida. Tako se u duplo većoj koncentraciji u toku log faze nalaze upravo proteini potrebni za promet energije, kao što su glukokinaze i fosfoglicerat-mutaze (Cohen i sar., 2006). Tokom rasta ćelije u velikoj koncentraciji su prisutni i antimikrobni „plantaricin“ proteini, čija je produkcija kontrolisana od strane membranski vezane histidin-protein-kinaze i peptid feromona (Kleerebezem i Quadri, 2001). Log fazu karakteriše i povećan sadržaj proteina koji učestvuju u metabolizmu aminokiselina i biosintezi gena, a čiji sadržaj počinje da opada tek nakon rane stacionarne faze.

U toku log faze, izvor ugljenika predstavlja glukoza iz MRS bujona, koju glukokinaze konvertuju u glukozu-6-fosfat, a kao proizvod glikolize nastaje fruktoza-6-fosfat. Koncentracija ovih enzima opada u ranoj stacionarnoj fazi, tako da ćelije *Lb. plantarum* umesto glukoze koriste manozu, manitol i glukozamin kao izvor ugljenika. Stoga je period stacionarne faze karakterističan po povećanoj sintezi glukozamin-6-fosfat izomeraza, koje učestvuju u konverziji ugljenih hidrata (manoze, manitola i amino šećera glukozamina) u fruktoza-6-fosfat. Ovi ugljeni hidrati predstavljaju izvor ugljenika neophodan za održavanje fiziologije ćelije, a metabolizam ovih ugljenih hidrata se, umesto putem glikolize, odvija alternativnim putevima, kao što je Leloirov put.

Takođe, period kasne log i rane stacionarne faze karakterišu povećane koncentracije proteina koji učestvuju u deobi ćelije i procesu oporavka DNK, dok se sadržaj proteina koji učestvuju u stvaranju energije u toku rane stacionarne faze znatno smanjuje, što ukazuje na zastoj ćelija u rastu. Period stacionarne faze

karakterističan je po povećanoj sintezi proteina otpornih na male temperaturne šokove, dok je period kasne stacionarne faze vezan za povećan sadržaj proteina vezanih za DNK, a koji su otporni na stres (Cohen i sar., 2006). Ovo ukazuje na činjenicu da se ćelije u stacionarnoj fazi pripremaju za uslove gladovanja, gde smanjena koncentracija nutritijenata, kao i povećana kiselost sredine, utiču na povećanje stresa, protiv kojeg se ćelija bori sintezom pomenutih proteina. Iako vlada mišljenje da su BMK katalaza negativne, Noonpakdee i sar. (2004) su detektovali da *Lactobacillus sakei*, izolovan iz fermentisanih proizvoda od mesa, sadrži dve grupe katalaza, koje povećavaju tolerantnost bakterije na oksidativni stres i utiču na smanjenje oksidacije lipida. Naime, u prisustvu kiseonika, a pri smanjenoj koncentraciji šećera u medijumu, BMK stvaraju vodonik peroksid, koji zajedno sa gvožđem igra glavnu ulogu u oksidaciji lipida (Rhee i sar., 1987; Kanner i sar., 1991). Antioksidanti, kao što je katalaza, vrše razgradnju H_2O_2 i tako sprečavaju pojavu oksidativne užeglosti. Cohen i sar. (2006) su publikovali da je soj *Lb. plantarum* WSCF1 sadržao povećan sadržaj katalaze u stacionarnoj fazi rasta, koja povećava stepen tolerancije ćelija na oksidativan stres.

Navedeni literaturni podaci ukazuju na to da su ćelije bakterija otpornije u stacionarnoj fazi rasta, usled sinteze mnogih tzv. „stres otpornih“ proteina, koji pripremaju ćeliju na nadolazeće nepovoljne uslove, kao što su smanjenje nutritijenata i povećanje kiselosti sredine. U kasnoj stacionarnoj fazi dolazi i do povećanja koncentracije enzima koji učestvuju u izgradnji strukture ćelijskog zida (Cohen i sar., 2006), verovatno radi ojačanja ćelijskog zida i očuvanja ćelijske morfologije. Stoga se usporenje rasta ćelija u periodu stacionarne faze može pripisati povećanoj biosintezi navedenih proteina.

Kada su u pitanju ćelije tretirane pulsirajućim električnim poljima, perzisteri *Lb. plantarum* 564 evidentno nastavljaju da rastu nakon tretmana, pri čemu se skraćeno generaciono vreme u kasnoj log- i ranoj stacionarnoj fazi može pripisati prisustvu intracelularnih komponenti u medijumu, koje su dospele liziranjem ćelija usled PEP tretmana, a koje pozitivno deluju na rast preživelih ćelija u medijumu. Stoga je rast u mid-stacionarnoj fazi (period 18-24h) bio znatno manje usporen kod ćelija izloženih PEP tretmanu amplitude 31.6 kV/cm u odnosu na netretirane ćelije (13-15h kod tretiranih u poređenju sa 722h kod kontrolnih). Iz podataka u tabeli 13 se takođe uočava produžetak log faze PEP tretiranih uzoraka, odnosno rana stacionarna

faza ćelija tretiranih pulsevima energije 34.6 J/cm^3 je počela nakon 11h inkubacije, dok je rast ćelija izloženih PEP tretmanu energije 65.8 i 658.1 J/cm^3 nastavljen sve do 18h inkubacije, kada je ukupan broj ćelija dostigao nivo od 10^9 cfu/ml.

Produžena log faza kod PEP tretiranih ćelija je verovatno posledica produžene lag faze, pa se može zaključiti da se rast PEP tretiranih ćelija odvija istom dinamikom kao i kod netretiranih. Ovu činjenicu dokazuju i rezultati dobijeni upotrebom izotermalne kalorimetrije, prikazani na grafikonu 8. Rezultati prikazuju promenu termalne snage ćelija počev od drugog sata inkubacije, što predstavlja period ulaska netretiranih ćelija u eksponencijalnu fazu rasta. Ovu fazu karakteriše metabolizam ugljenih hidrata radi stvaranja energije neophodne za rast ćelije (Cohen i sar., 2006), pa je u ovom periodu uočena konstantna produkcija toplote tokom rasta bakterija, što se odražava na porast termalne snage tokom logaritamske faze rasta (Riva i sar., 2001; Selma i sar., 2007). Tako se primećuje da je tokom inkubacije uzoraka u hermetički zatvorenim ampulama sa MRS bujonom na 37°C , došlo do porasta termalne snage uzoraka, koja je kod netretiranih ćelija u toku prvih 6h inkubacije dostigla oko 0.28 mW/g . Nakon toga, ćelije su ušle u mid-log fazu (grafik 5), koju karakteriše usporen rast, pa je u naredna 3h usledio postepen pad termalne snage, dostižući nivo od oko 0.16 mW/g (grafik 8). Posledicu ovog usporenja rasta predstavlja verovatno nedostatak utrošenih nutritijenata u medijumu, pa je ćelijama potreban izvesan period adaptacije na druge dostupne komponente u MRS bujonu, koje će zameniti unos potrošenih (Delin i sar., 1969; Kemp, 1975). Komponente u MRS bujonu, čiji nedostatak može da limitira rast ćelije, su uglavnom neki vitamini, aminokiseline i peptidi (Leroy i Vuyst, 2001).

Potom je u narednih sat vremena opet došlo do malog porasta termalne snage (period 9-10h), gde je došlo do povećanja produkcije toplote, ali u manjem stepenu nego na početku inkubacije (do oko 0.18 kW/g). Ovaj porast je verovatno nastao usled povećanog stepena razvoja bakterija, koje karakteriše skraćeno generaciono vreme u periodu kasne log-faze i na početku rane stacionarne faze. Ovo predstavlja izuzetan aspekt u ponašanju PEP tretiranih ćelija, gde je upravo tokom perioda intenzivnog trošenja nutritijenata u kasnoj log-fazi uočen povećan stepen rasta. Takođe se primećuje da je ovo povećanje bilo veće što je primenjeni tretman bio jači. Literaturni podaci ukazuju na to da ovaj period karakteriše povećana sinteza enzima koji

učestvuju u formiranju fosfolipida, neophodnih za jačanje ćelijske membrane, čime se ćelija priprema za opstanak u toku stacionarne faze.

Nakon toga se primećuje postepen pad termalne snage, što odgovara stacionarnoj fazi rasta ćelija. Kod PEP tretiranih ćelija se primećuje odloženo usporenje u porastu termalne snage, koje se može pripisati odloženom početku log faze usled produžetka lag faze. Tako su ćelije izložene tretmanu energije 34.6 J/cm^3 pokazale zastoj u trajanju od oko 3h, pa je maksimum termalne snage (od oko 0.27 kW/g) dostignut nakon 77 min zakašnjenja u poređenju sa netretiranim ćelijama, što odgovara ukupnom broju ćelija od oko $8.5 \pm 0.1 \log_{10} \text{ cfu/ml}$. Što je tretman bio jači, lag faza je bila duža i usporenje u porastu termalne snage je bilo veće, odnosno ćelije tretirane pulsirajućim poljima energije 65.8 i 658.1 J/cm^3 su maksimum termalne snage dostigle nakon 8h, odnosno 8.5h inkubacije, što predstavlja zakašnjenje od 2h, odnosno 2.5h u odnosu na kontrolne uzorke. Ono što je značajno primetiti je da je kod ovih PEP tretiranih ćelija dostignut približno isti maksimalan nivo termalne snage od 0.27 kW/g , što odgovara populaciji od $8.1 \pm 0.1 \log_{10} \text{ cfu/ml}$.

Praćenje rasta ćelija bazirano na merenju optičke gustine MRS bujona, prikazano je na grafikonu 6, gde se kod kontrolnog uzorka mogu uočiti dve uzastopne faze rasta, koje se odvijaju u toku eksponencijalne faze, pri čemu se jasno primećuje zastoj rasta ćelija, koji predstavlja period OD_{600} vrednosti od 2.5 do 2.7. Interesantno je uočiti da usporenje u rastu ćelija nije bilo prisutno kod PEP tretiranih bakterija, a takođe se uočava da je kod uzoraka tretiranih PEP tretmanom srednje jačine (34.6 J/cm^3) OD_{600} vrednost od 1.5, koja odgovara broju populacije od $8.5 \pm 0.1 \log_{10} \text{ cfu/ml}$ dostignuta u trećem satu log faze (period inkubacije od 4 do 7h, gde je početak log faze nastao u četvrtom satu inkubacije), dok je kod kontrolnih uzoraka ovaj period bio 30 minuta duži (period od 2 do 5.5h inkubacije, gde je eksponencijalna faza počela nakon drugog sata inkubacije). Što je tretman bio jači, vreme povećanja broja ćelija je bilo kraće, tako da broj ćelija izloženih visokim PEP tretmanom energije 65.8 J/cm^3 dostigao vrednost od $8.5 \pm 0.1 \log_{10} \text{ cfu/ml}$ nakon 9h sati inkubacije, što odgovara OD_{600} vrednosti od 1.0, a što predstavlja drugi sat log faze, ukoliko se uzme u obzir njen početak nakon produžene lag faze u trajanju od 7h. Sličan tempo je primećen i kod uzoraka izloženih 10 puta dužem tretmanu iste jačine električnog polja, gde je početak eksponencijalne faze uočen nakon 8h inkubacije, a OD_{600} vrednost od 1.0, kojoj odgovara broj populacije od $8.1 \pm 0.1 \log_{10} \text{ cfu/ml}$, izmerena je nakon 9.5h,

odnosno OD₆₀₀ vrednost od 1.5 postignuta je nakon 10h inkubacije. Ovi rezultati ukazuju na to da se rast i razvoj PEP tretiranih ćelija soja *Lb. plantarum* 564 odvijao u istom trendu, ali bržim tempom u odnosu na netretirane ćelije.

6.4.2.2. Preživela populacija PEP tretiranih laktobacila pokazuje veću otpornost na ponovne PEP tretmane

Dosadašnji rezultati ukazuju na to da kada se umeren PEP tretman primeni na populaciju bakterija soja *Lb. plantarum* 564, preživele ćelije nastavljaju sa rastom formirajući novu populaciju. Nakon prestanka PEP tretmana, nova populacija ćelija, inokulisana iz stacionarne faze u svež MRS bujon, pokazala je manji stepen inaktivacije nakon ponovnog dejstva PEP tretmana iste energije.

Efekat različitih PEP tretmana na stepen inaktivacije ćelija *Lb. plantarum* 564 može se izraziti putem brojčane redukcije populacije, koji je u vidu log₁₀ redukcije prikazan u tabeli 12. Na osnovu prikazanih podataka može se ustanoviti da je log₁₀ redukcija PEP re-tretiranih ćelija bila manja, što ukazuje na to da su PEP tretirane ćelije pokazale veću otpornost prema ponovnim PEP tretmanima. Takođe se zapaža i to da, što je primenjeni PEP tretman bio jači, to je i stepen otpornosti PEP tretiranih ćelija bio veći. Tako je ukupan broj ćelija prvobitno izloženih PEP tretmanima energije 34.6, 65.8 i 658.1 J/cm³ redukovan za oko 10%, 27% i 38%, dok su ponovni PEP tretmani iste energije redukovali ukupan broj kolonija za 9%, 21% i 30%. To znači da je log₁₀ redukcija ćelija ponovno izloženih tretmanima energije 34.6 J/cm³ bila za 17% manja od redukcije nakon prvog tretmana, dok su ćelije re-tretirane pulsevima energije 65.8 i 658.1 J/cm³ bile za 24%, odnosno 25% otpornije od ćelija izloženih istim tretmanima po prvi put.

U toku inkubacije PEP re-tretiranih ćelija u MRS bujonu na 37°C ustanovljen je ponovan rast ćelija, gde se broj ćelija izloženih pulsevima jačine 22.9 kV/cm nije statistički razlikovao od netretiranih uzoraka nakon 24h inkubacije (tabela 14). Broj populacije ćelija re-tretiranih pulsevima amplitude 31.6 kV/cm je dostigao nešto niži nivo od ~9.5 log₁₀ cfu/ml, što se statistički razlikovalo od finalnog broja netretiranih ćelija (~9.8 log₁₀ cfu/ml), mada je ovaj broj približan ukupnom broju netretiranih ćelija na kraju eksponencijalne faze i ukazuje na potpun oporavak preživelih ćelija.

Grafikon 9 prikazuje ponašanje preživjele populacije PEP re-tretiranih ćelija soja *Lb. plantarum* 564. Na grafikonu su predstavljene vrednosti generisane termalne snage merene nakon drugog sata inkubacije pa na dalje. Uočava se da su pojedine krive imale endotermne inicijalne vrednosti, što verovatno predstavlja spoljne faktore koji su uticali na merenje, a ne faktore koji su uticali na mikrobiološki rast. Stoga će se istraživanja u ovom radu bazirati na onaj deo krive koji predstavlja rast bakterija tokom inkubacije na 37°C.

Uzorci suspenzije ćelija koje su prethodno tretirane pulsirajućim električnim poljima energije 34.6, 65.8 i 658.1 J/cm³ predstavljali su kontrolne uzorke ćelija re-tretiranih istim PEP tretmanima. Termalna snaga ovih uzoraka je u toku prvih 6h inkubacije porasla na oko 0.22 mW/g, a potom je u naredna 3.5h usledio strm pad do 0.14 mW/g, da bi potom opet došlo do malog porasta termalne snage, dostižući drugi pik od oko 0.16 mW/g. Zatim je usledio postepen pad termalne snage do kraja inkubacije, što odgovara stacionarnoj fazi rasta ćelija.

Populacija, koja je preživela ponovne PEP tretmane energije 34.6, 65.8 i 658.1 J/cm³, pokazala je sličnu dinamiku rasta kao kontrolni uzorci, pri čemu je maksimalna termalna snaga kod svih PEP re-tretiranih uzoraka dostigla približno isti nivo. Kao i kod prvobitno tretiranih uzoraka (grafikon 8), nova populacija je takođe pokazala kašnjenje u postizanju maksimalne termalne snage od 0.23 mW/g (grafikon 9). Takođe se primećuje da je maksimalna termalna snaga kod uzoraka re-tretiranih pulsevima energije 34.6, 65.8 i 658.1 J/cm³ dostignuta nakon 1h, 2h i 3.3h zakašnjenja. Ukoliko se uzme u obzir da su uzorci prvobitno tretirani najjačim PEP tretmanom pokazali zakašnjenje od 2.5h u dostizanju prvog pika termalne snage, primećuje se da su uzorci re-tretirani istim PEP tretmanom imali nešto veće zakašnjenje u postizanju maksimuma termalne snage, uprkos tome što su ponovno tretirane ćelije pokazale veću otpornost na primenjeni tretman.

Kada su PEP tretirane ćelije u pitanju, neophodna su detaljnija istraživanja kako bi se objasnio uticaj PEP tretmana na stadijume razvoja preživelih ćelija. Sinteza proteina koji pomažu ćeliji da bude otpornija na razne spoljne stresove, kao što je temperaturni šok, detektovana je kod ćelija *Lb. plantarum*, čime je izbegnuto smanjenje u stepenu rasta, a takođe je i poboljšana adaptacija na nove nutrijente u medijumu (Mills i sar., 2011). Pored toga, *Lb. plantarum* WCFS1 je u toku kasne log-faze pokazao veću rezistentnost na permeabilizaciju koja nastaje tretiranjem

lizozimom (de Vries i sar., 2004). Ono što je značajno je da i rezultati ovih istraživanja pokazuju veću rezistentnost PEP tretiranih ćelija na permeabilizaciju nastalu ponovnim PEP tretmanima (tabela 14). Stoga se može zaključiti da jači PEP tretmani izazivaju formiranje jače ćelijske membrane kod preživjele subpopulacije, koja postaje otpornija na naredne tretmane, što predstavlja interesantno poglavlje za nova istraživanja na metaboličkom i proteomičkom nivou.

6.5. Acidifikaciona sposobnost PEP tretiranih ćelija

Sposobnost bakterija mlečne kiseline da fermentišu laktozu iz mleka, produkujući mlečnu kiselinu, našla je primenu u proizvodnji fermentisanih mlečnih napitaka i sireva. Mlečna kiselina fermentisanim napicima daje poseban svež i nakiseo ukus, dok kod sireva ova kiselina pokazuje značajnu ulogu tokom koagulacije i formiranja teksture gruš. Bakterije mlečne kiseline (BMK), koje se koriste kao starteri za proizvodnju ovih mlečnih proizvoda, selekcionišu se na bazi fermentacionih karakteristika, kao i senzornih i reoloških osobina.

Osnovna uloga BMK, kao osnovne starter kulture u proizvodnji sireva, je da izvrše acidifikaciju mleka, dok se od atenuiranih bakterija očekuje da pokažu odloženu acidifikacionu sposobnost. Acidifikacija mleka od strane atenuiranih bakterija bi trebalo da počne tek nakon što je 25% ćelija osnovne starter kulture započelo snižavanje pH (Pettersen i Sjöstrom, 1975). U tom trenutku, većina laktoze bi trebalo da je već fermentisana. Pettersen i Sjöstrom (1975) su saopštili da se efikasnost atenuacije bakterija ogleda u tome što je acidifikaciona sposobnost odložena do te mere da ne započinje pre nego je skoro sva laktoza potrošena od strane bakterija osnovne starter kulture. Takođe je ustanovljeno da se fermentacija pod dejstvom mezofilnih starter kultura zaustavlja kada pH sredine dostigne 4.3 - 4.5, a koncentracija vodonikovih jona postaje faktor ograničenja rasta pri pH 5.0 (Pettersen, 1988).

S obzirom na to da su netretirane ćelije *Lb. plantarum* 564 pokazale slabu acidifikacionu sposobnost u ROM, snizivši pH sa ~ 6.5 na ~ 4.1 tek nakon 72h (tabela 5), efekat PEP tretmana je ispitivan praćenjem snižavanja pH MRS bujona, gde su netretirane ćelije snizile početni pH sa ~ 6.0 na ~ 4.6 u toku 8h inkubacije na 37°C (tabela 8), što odgovara broju populacije od oko 9.5 log₁₀ cfu/ml (tabela 13).

Pulsirajuća električna polja energije $< 13 \text{ J/cm}^3$ su imala pozitivan efekat na rast bakterija (tabela 11), tako da ovi tretmani nisu doveli do atenuacije bakterija koja bi uzrokovala odlaganje acidifikacione sposobnosti (grafikon 10). Međutim, jači PEP tretmani su evidentno uticali na stepen acidifikacije atenuiranih ćelija, s obzirom na to da je i eksponencijalna faza rasta bakterija odložena. Produžetak lag faze PEP tretiranih ćelija odgovara vremenskoj distanci odlaganja njihove acidifikacione sposobnosti.

Lag faza ćelija izloženih tretmanima energije 34.6 J/cm^3 bila je odložena za 2h, tako da je sam početak acidifikacije započet tek nakon navedenog proteklog perioda, odnosno statistički značajno sniženje pH je nastalo nakon 4h inkubacije ovih ćelija u MRS bujonu na 37°C . Sniženje pH bujona sa početnih ~ 6.0 na ~ 4.6 je takođe postignuto sa 2h zakašnjenja, odnosno nakon 10h inkubacije, pri čemu je broj populacije iznosio 10^9 cfu/ml, kao i kod netretiranih ćelija. Ovaj podatak ukazuje na to da je za postizanje odgovarajućeg stepena acidifikacije kojim će se pH sredine sniziti na određenu vrednost potrebno da broj ćelija dostigne određeni nivo, odnosno da bi snizile pH MRS bujona sa ~ 6.0 na ~ 4.6 , broj ćelija treba da dostigne oko $9.5 \log_{10}$ cfu po mililitru.

Primena PEP tretmana jače energije od 65.8 i 658.1 J/cm^3 dovela je do produžetka lag faze za oko 5h, odnosno 6h, što zapravo predstavlja period kada su ćelije dostigle 10^7 cfu/ml, nakon čega je detektovan početak snižavanja pH bujona. Ipak, pH bujona je sa početnih ~ 6.0 snižen na ~ 4.6 tek nakon približno 12h inkubacije na 37°C , što predstavlja zakašnjenje od oko 4h, a broj populacije je u tom trenutku dostigao $\sim 8.6 \log_{10}$ cfu/ml. Ovo je vrlo interesantan podatak, s obzirom na to da su netretirane ćelije dostigle isti nivo pH tek nakon što je broj populacije dostigao $\sim 9.6 \log_{10}$ cfu/ml. To ukazuje na činjenicu da PEP tretmani visoke energije nisu uticali samo na odlaganje acidifikacije, već i na samu acidifikacionu aktivnost atenuiranih ćelija. Iako je sposobnost acidifikacije bila odložena, atenuirane ćelije su u deset puta manjem broju snizile pH bujona na isti nivo kao i netretirane ćelije. Prema očekivanom trendu, ćelije izložene tretmanima energije od 65.8 i 658.1 J/cm^3 trebalo bi da snize pH bujona na ~ 4.6 za 5h, odnosno 6h zakašnjenja, koliko je trajao produžetak lag faze. Stoga skraćenje ovog perioda na 4h takođe ukazuje na postojanje poboljšane acidifikacione sposobnosti PEP tretiranih u odnosu na kontrolne ćelije. Postavlja se pitanje da li je primenjeni PEP tretman doveo do promena na nivou ćelije,

pa je acidifikaciona aktivnost tretiranih ćelija porasla ili je intracelularni sadržaj ćelija koje su lizirale tokom tretmana olakšao usvajanje ugljenih hidrata od strane preživjele populacije, pa je manji broj ćelija bio potreban da se pH snizi na određeni nivo.

Kada su primenjeni ponovni PEP tretmani, uočava se još bolja acidifikaciona sposobnost u odnosu na prvobitno tretirane ćelije. Naime, ćelije koje su prvi put tretirane PEP tretmanima energije 34.6, 65.8 i 658.1 J/cm³ su nakon proteklih 8h inkubacije snizile pH bujona na oko pH 5.0, 5.6 i 5.9 (grafikon 10), dok je kod ćelija ponovo izloženih istim PEP tretmanima, pH bujona nakon 8h inkubacije bio nešto niži, odnosno iznosio je oko pH 4.9, 5.3 i 5.5, respektivno (grafikon 11). Primećuje se da je razlika u sniženju pH bujona bila veća što je PEP tretman bio jači, što navodi na zaključak da pored povećane otpornosti ćelija, jači PEP tretmani dovode i do povećane acidifikacione aktivnosti.

Sa povećanjem energije PEP tretmana, stepen odlaganja acidifikacije se povećava. Ukoliko se prati stepen snižavanja pH bujona do 5.5, tada se prema proračunu (formula 20) može zaključiti da je stepen odlaganja acidifikacije kod ćelija tretiranih pulsevima energije 65.8 i 658.1 J/cm³ bio 50%, odnosno oko 55% u odnosu na netretirane ćelije (tabela 15). Međutim, ponovni PEP tretmani su snizili stepen odlaganja acidifikacije za oko 5-6%, što se zapravo može pripisati nešto većem broju populacije, što se jasno uočava poređenjem broja kolonija nakon 24h inkubacije (podaci iz tabele 13 i tabele 14). Razlog za ovu pojavu se može tražiti u povećanoj otpornosti preživjele subpopulacije PEP tretiranih ćelija, kod kojih je verovatno povećana sinteza proteina otpornih na stresove i proteina koji učestvuju u ojačanju strukture ćelijskog zida, što doprinosi povećanoj otpornosti ovih ćelija na ponovne PEP tretmane. Takođe, nakon liziranja jednog dela populacije, porast koncentracije intracelularnog materijala u medijumu predstavlja dodatni stimulans za rast i razvoj preživjele subpopulacije, što verovatno utiče na povećan rast ćelija i njihovu acidifikacionu aktivnost.

6.6. Potencijalna probiotska sposobnost PEP tretiranih ćelija

Probiotici se, zbog benefitnih svojstava na ljudski organizam, koriste kao živi mikroorganizmi u prehambenoj industriji sa ciljem poboljšanja intestinalnog mikrobiološkog balansa (Fuller, 1989). Na tržištu se u poslednje vreme može naći sve veći broj proizvoda koji sadrže probiotske mikroorganizme, kao što su probiotski fermentisani mlečni napici, razni suplemenati hrani i farmaceutski preparati sa probioticima, koji imaju određena nutritivna i terapijska svojstva na ljudski organizam (Tamime i sar., 2003). Prehrambena, kao i farmaceutska industrija, sve više koriste određene BMK koje imaju probiotska svojstva, gde su najčešće u upotrebi određeni sojevi laktobacila i bifidobakterija (McFarland i Elmer, 1997; Kaur i sar., 2002). Stoga su kriterijumi za selekciju autohtonih sojeva BMK, pored tehnoloških i biohemijskih, prošireni i na testiranje potencijalnih probiotskih sposobnosti. Na osnovu istraživanja pojedinih istraživača, neki sojevi *Lb. plantarum* i *Pediococcus acidilactici* su takođe svrstani u potencijalne probiotike (Jakešević, 2011). Radulović i sar. (2010) su ustanovili da određeni sojevi *Lb. paracasei*, izolovani iz autohtonog Sjeničkog sira, takođe poseduju probiotska svojstva. Tako su neki sojevi pokazali dobar rast u simuliranim gastrointestinalnim uslovima, visoku sposobnost autoagregacije i dobru antimikrobnu aktivnost na patogene mikroorganizme.

S ciljem da se utvrdi da li soj *Lb. plantarum* 564 poseduje potencijalna probiotska svojstva, izvršeno je testiranje na određene probiotske kriterijume. Isti testovi su izvršeni i na PEP tretiranim bakterijama sa ciljem da se ustanovi da li je došlo do promena određenih karakteristika i ukoliko jeste, u kom stepenu su one promenjene.

6.6.1. Sposobnost preživljavanja u GI uslovima

Prilikom selekcije potencijalnih probiotskih bakterija najvažniji parametar koji se određuje je njihova stabilnost u gastrointestinalnim uslovima. Stoga se vrši testiranje bakterija na tolerantnost niskih pH i visoke koncentracije žučnih soli. Sposobnost preživljavanja netretiranih i PEP tretiranih ćelija u simuliranim uslovima u želucu, kao i simuliranim duodenalnim uslovima prikazana je u tabeli 16. Iako su uslovi u GI traktu veoma ograničeni za rast BMK, ispitivani soj je u velikom broju preživeo ove uslove, odnosno više od 88% ćelija je preživelo 90 min inkubacije u

prisustvu pepsina pri pH 2.0, kao i 60 min inkubacije u prisustvu pankreatina i žučnih soli. Ipak, značajno je ustanoviti da su PEP tretirane ćelije pokazale veću otpornost u simuliranim GI uslovima u odnosu na netretirane ćelije. Tako su ćelije izložene pulsevima energije 65.8 i 658.1 J/cm³ pokazale veću otpornost na simulirane GI uslove, gde je stepen preživljavanja bio statistički značajno veći u odnosu na netretirane ćelije (oko 91% u poređenju sa 88%). S druge strane, otpornost ćelija izloženih PEP tretmanima energije 5.5 i 34.6 J/cm³ na simulirane uslove u želucu nije se statistički značajno razlikovala od otpornosti netretiranih ćelija. Ipak, bakterije izložene pomenutim PEP tretmanima pokazale su statistički značajan porast preživljavanja (preko 90% tretiranih ćelija) u simuliranim uslovima u duodenumu. Takođe je interesantno ustanoviti da su ćelije tretirane ponovnim PEP tretmanima pokazale veću otpornost, gde je više od 91% re-tretiranih ćelija preživelo simulirane gastro uslove u prisustvu pepsina pri pH 2.0, dok je stepen preživljavanja u duodenalnim uslovima u prisustvu pankreatina i žučnih soli bio još veći (iznad 93%). Ove vrednosti su slične vrednostima koje je pokazao referentni soj *Lb. rhamnosus* GG (Perea Vélez i sar., 2007; Martin i sar., 2005), koji se koristi kao probiotik u prehrambenoj industriji.

Važno je istaći da je broj svih ispitivanih uzoraka u simuliranim GI uslovima bio veći od 10⁸ cfu/ml, što predstavlja vrlo značajnu osobinu soja *Lb. plantarum* 564, s obzirom na to da je visoka brojnost ćelija preduslov za probiotsku sposobnost bakterija. Ćelije ispitivanog soja su u izrazito velikom broju preživele simulirane GI uslove, a nakon primenjenih PEP tretmana pokazale su još veći stepen preživljavanja, što ukazuje na zaključak da su primenjeni PEP tretmani uticali na povećanje otpornosti ispitivanih laktobacila.

Toleratnost na žučne soli se smatra za preduslov da bi se bakterije nastanile u tankom crevu domaćina i ispoljile svoju metaboličku aktivnost (Havenaar i sar., 1992). Klaenhammer (1982) je publikovao da mehanizam tolerantnosti probiotskih bakterija na prisustvo žučnih soli nije u potpunosti razjašnjen i da prag tolerancije još uvek nije poznat, s obzirom na to da različiti probiotski sojevi pokazuju različite nivoe tolerantnosti na žučne soli. Rezistentnost pojedinih bakterija na žučne soli je vezana za specifičnu aktivnost enzima tzv. žučnih hidrolaza (*eng.* bile salt hydrolase - BSH), koji vrše hidrolizu konjugovanih žučnih soli i tako smanjuju njihov toksični efekat na ćelije bakterija (du Toit i sar., 1998). Ove enzime poseduju uglavnom laktobacili

izolovani iz intestinalnog trakta i fecesa životinja, s obzirom na to da ove bakterije žive u sredini bogatoj žučnim solima. Stoga je vrlo interesantno da ispitivani soj *Lb. plantatum* 564, koji je izolovan iz tradicionalnog Sjeničkog sira, poseduje te enzime i pokazuje izrazitu tolerantnost na žučne soli. Prisustvo ovih enzima nije izgubljeno kod PEP tretiranih bakterija, već je naprotiv rezistentnost na žučne soli porasla sa porastom jačine primenjenih tretmana.

Dobijeni rezultati su od velikog značaja, jer ukazuju na to da i kontrolne i PEP tretiranje ćelije soja *Lb. plantatum* 564 zadovoljavaju neke od najvažnijih probiotskih kriterijuma, a to je otpornost na želudačne sokove i žučne soli. Zapravo, povećana otpornost ćelija izloženih najjačim PEP tretmanima od 658.1 J/cm^3 bi mogla da svrsta ove bakterije u potencijalne probiotike sa povećanom otpornošću na GI uslove.

6.6.2. Rezistentnost na antibiotike

Rezistentnost bakterija na antibiotike predstavlja veoma važan faktor za utvrđivanje probiotskih svojstava, s obzirom na to da antibiotik-rezistentni sojevi mogu da poboljšaju stanje pacijenata, čiji je balans intestinalne mikroflore narušen primenom antibiotika (Salminen i sar., 1998).

Rezultati ispitivanja rezistentnosti na antibiotike pokazali su da je ispitivani soj *Lb. plantarum* 564 rezistentan na kanamicin, gentamicin, neomicin, streptomycin i tetraciklin, dok je pokazao senzitivnost na penicilin, a na eritromicin i hloramfenikol je bio vrlo senzitivan (tabela 17). Ovi podaci se ne podudaraju sa literaturnim podacima pojedinih autora, koji su publikovali da su laktobacili uglavnom rezistentni na penicilin, ampicilin i hloramfenikol (Halami i sar., 2000; Coppola i sar., 2005).

Rezistentnost na kanamicin i streptomycin je bila slična kao kod soja *Lb. paracasei* 08, koji je takođe izolovan iz Sjeničkog sira. Prisutna senzitivnost na gore pomenute antibiotike bila je slična senzitivnosti referentnog soja *Lb. rhamnosus* GG, koji je pokazao izrazitu osetljivost na hloramfenikol (zona inhibicije 10 mm) i umerenu osetljivost na penicilin (zona inhibicije 6 mm), dok je bio rezistentan na kanamicin (Radulović i sar., 2008).

Ćelije izložene pulsirajućim električnim poljima pokazale su sličnu rezistentnost na primenjene antibiotike, s tim što su ćelije tretirane PEP tretmanima energije $>30 \text{ J/cm}^3$ izgubile rezistentnost na tetraciklin, pokazujući umerenu

senzitivnost sa zonom inhibicije od 5 mm. Takođe se primećuje da je senzitivnost ćelija tretiranih jačim PEP tretmanima povećana na penicilin, dok su ćelije izložene pulsevima energije 658.1 J/cm^3 postale senzitivne na gentamicin (tabela 17).

Rezistentnost bakterija na antibiotike predstavlja jedan od probiotskih kriterijuma, koje ispitivani soj *Lb. plantarum* 564 selektivno ispunjava. Ipak, senzitivnost na pojedine antibiotike može da se smatra pozitivnom karakteristikom, s obzirom na činjenicu da rezistentnost na antibiotike nekad može da bude i nepovoljna, jer rezistentne probiotske bakterije mogu doprineti transmisiji antibiotik-rezistentnih gena na patogene bakterije prisutne u GI traktu (Morelli i Wright, 1997; Saarelo i sar., 2000). Stoga bi determinacija lokacije gena odgovornih za rezistentnost na antibiotike (plazmidna ili hromozomalna) doprinela bezbednoj primeni antibiotik-rezistentnih sojeva kao probiotik starter kultura.

6.6.3. Antimikrobna aktivnost

Lactobacili pokazuju različite antimikrobne mehanizme u ogledima *in vitro*. Antimikrobna aktivnost u tečnom medijumu je potpomognuta rapidnom difuzijom antimikrobnih komponenti, koje inhibitorno deluju na mnoge patogene (Turi i sar., 1997; Annuk i sar., 1999, 2001). Takođe, ćelije laktobacila proizvode organske kiseline koje snižavaju pH sredine i tako deluju antagonistički na mnoge patogene mikroorganizme (Ouweland i Vesterlund, 2004). Značajno je istaći da laktobacili predstavljaju najčešće prirodnu barijeru protiv infekcije intestinalnog i urogenitalnog trakta. Pored produkcije mlečne kiseline, sposobnost inhibicije pojedinih bakterija se ogleda u sintezi bakteriocina ili produkciji H_2O_2 .

Kod mnogih laktobacila je detektovana ova probiotska sposobnost, pa su mnogi laktobacili našli primenu u farmaceutskoj industriji radi prevencije od raznih infekcija (Bengmark, 1998).

Prema rezultatima prikazanim u tabeli 18, soj *Lb. plantarum* 564 je pokazao inhibitorno dejstvo na sve ispitivane patogene mikroorganizme. Sposobnost inhibicije ćelija tretiranih pulsirajućim električnim poljima energije $<13 \text{ J/cm}^3$ nije se mnogo razlikovala od kontrolnih ćelija, dok su ćelije tretirane pulsevima iznad 30 J/cm^3 izgubile sposobnost inhibicije bakterije *E. coli* ATCC25922. Takođe, ćelije podvrgnute ponovnim PEP tretmanima izgubile su sposobnost inhibicije bakterije *S.*

aureus ATCC25923. S druge strane, primenjeni tretman od 658.1 J/cm^3 uzrokovao je povećanu antimikrobnu aktivnost tretiranih, kao i re-tretiranih ćelija na *B. subtilis* ATCC6633 i *P. aeruginosa* ATCC5999, gde su zone inhibicije bile veće od kontrolnog uzorka za 50% i 14%, respektivno. Ćelije izložene pulsevima energije 34.6 J/cm^3 su takođe pokazale nešto veći antagonizam protiv *B. subtilis* ATCC6633 u odnosu na netretirane ćelije (tabela 18).

Na osnovu dobijenih podataka se može zaključiti da kontrolne ćelije soja *Lb. plantarum* 564 poseduju antimikrobnu aktivnost na ispitivane patogene mikroorganizme, dok je inhibično dejstvo PEP tretiranih ćelija na iste bilo selektivno. S obzirom na to da produkcija organskih kiselina, kao i sinteza bakteriocina predstavljaju limitirajuće faktore za rast patogenih mikroorganizama, postavlja se pitanje koji su to faktori inhibicije kod PEP tretiranih ćelija izostali, pa je izgubljena antimikrobna sposobnost nad pojedinim patogenim bakterijama. Prema podacima de Keersmaecker i sar. (2006), inhibični potencijal referentnog soja *Lb. rhamnosus* GG se javlja kao posledica produkcije mlečne kiseline. Produkcija organskih kiselina karakteriše i soj *Lb. plantarum* 564, koje su pokazale izrazitu acidifikacionu sposobnost u MRS bujonu, koja je sa određenim zakašnjenjem bila prisutna i kod PEP tretiranih ćelija (grafikon 10). U poglavlju 6.5 je istaknuto postojanje poboljšanje acidifikacione sposobnosti PEP tretiranih ćelija, koja je kod primenjenih ponovnih tretmana bila još izraženija (grafikon 11), što je dovelo do zaključka da jači PEP tretmani povećavaju acidifikacionu aktivnost ovih laktobacila. Stoga se može zaključiti da produkcija organskih kiselina ne predstavlja izostali faktor inhibicije PEP tretiranih ćelija na pojedine patogene bakterije, već su u pitanju drugi antimikrobni mehanizmi, koji mogu biti predmet daljih istraživanja.

7. ZAPAŽANJA I ZAKLJUČCI

Ova istraživanja su fokusirana na proučavanje ponašanja preživle subpopulacije soja *Lb. plantarum* 564 nakon primene PEP tretmana različite energije, a na osnovu dobijenih rezultata mogu se izneti određena zapažanja i izvesti vrlo značajni zaključci.

Proučavanjem dinamike rasta ćelija ispitivanih laktobacila može se uočiti da je nakon dvočasovne lag faze nastupila eksponencijalna faza, koja se može podeliti na tri segmenta, a svaki segment karakterisalo je različito generaciono vreme (Gt). Tako je Gt u periodu od 2-5.5h inkubacije iznosilo 47 min, da bi u narednom periodu (5.5-7h) došlo do usporavanja rasta i povećanja Gt na 141 min, a ubrzan rast je primećen u kasnoj log fazi (7-8h), gde je Gt bilo 21 min, što je duplo kraće nego na početku rasta. Nakon osmočasovne inkubacije je nastupila stacionarna faza, a nakon 5 dana inkubacije se može uočiti faza izumiranja, gde sve veći broj ćelija lizira usled povećane kiselosti sredine, kao i smanjenja nutritijenata u medijumu.

Tokom eksponencijalne faze ćelije proizvode veću količinu kiseline, pa je u ovom periodu vrlo izražena acidifikaciona aktivnost i pH MRS bujona je sa početnih pH 5.9 snižen na pH 4.6 nakon 8h inkubacije na 37°C. Za razliku od sposobnosti acidifikacije MRS bujona, acidifikaciona aktivnost ćelija ispitivanih laktobacila je bila vrlo slaba u rekonstituisanom obranom mleku (ROM), snizivši pH sa početnih pH 6.5 na pH 4.1 tek nakon 72h inkubacije. To ukazuje na slabu aktivnost β -D-galaktozidaza, koji vrše hidrolizu mlečnog šećera laktoze na glukozu i galaktozu. Vrlo slaba fermentacija laktoze u ROM navodi na zaključak da su ove bakterije povoljne za izradu startera koji se koriste u proizvodnji onih prehrambenih proizvoda gde je poželjna odložena acidifikacija, kao što je upotreba dopunskih, tzv. „adjunct“ kultura u proizvodnji sireva.

Primena pulsirajućih električnih polja energije niže od 13 J/cm³ imala je pozitivan efekat na rast ćelija, što se naročito odrazilo na eksponencijalnu fazu rasta, gde je izostao usporen rast u periodu od 5.5-7h inkubacije. Acidifikaciona sposobnost tretiranih ćelija je takođe bila nešto bolja, što ukazuje na zaključak da je u toku tretmana došlo do reverzibilne elektropermeabilizacije, gde su se ćelije nakon prestanka dejstva tretmana oporavile. Pretpostavlja se da je difuzija molekula, koja je

nastupila nakon formiranja pora, doprinela boljem prometu materija, što je pozitivno uticalo na rast i acidifikacionu sposobnost ćelija *Lb. plantarum* 564.

Nakon izlaganja nižim PEP tretmanima energije 12.2 J/cm^3 , vijabilnost ćelija je ostala nepromenjena, što ukazuje na to da se ovi procesni parametri nalaze ispod kritične granice potrebne za inaktivaciju tretiranih ćelija. Međutim, jači PEP tretmani energije 34.6 , 65.8 i 658.1 J/cm^3 su uzrokovali značajnu atenuaciju ćelija tretiranog soja *Lb. plantarum* 564, smanjivši ukupan broj ćelija za oko 1, 2 i 3 log jedinice, respektivno. Ovi rezultati ukazuju na zaključak da je stepen mikrobiološke inaktivacije proporcionalan jačini primenjenog električnog polja, kao i trajanju PEP tretmana.

Sa povećanjem energije tretmana raste i stepen inaktivacije, ali preživela populacija nakon prestanka tretmana nastavlja sa rastom, formirajući novu populaciju, koja nakon 24h inkubacije u MRS bujonu na 37°C dostiže broj od 10^9 cfu/ml, kao i netretirane ćelije. Preživela subpopulacija predstavlja perzister ćelije, koje su otporne da dejstvo pulsirajućih električnih polja, pokazujući brži rast u kasnoj log-fazi u odnosu na netretirane ćelije. Objašnjenje za ovu pojavu se može naći u tome što prilikom dejstva pulsirajućih električnih polja jedan deo ćelija lizira, čiji intracelularni sadržaj postaje dostupan preživeloj subpopulaciji, što pozitivno utiče na rast i razvoj novonastalih ćelija. Prisutan intracelularni sadržaj olakšava razgradnju i transport pojedinih nutritijenata u ćeliju, a takođe pojedine komponente tog sadržaja mogu da predstavljaju izvor nutritijenata za preživele ćelije.

Perzistentnost je svojsvena heterogenost unutar iste populacije ćelija, a produžena lag faza je jedna od karakteristika ove subpopulacije ćelija, koje preživljavaju stres zato što se nalaze u nedeljivoj, tzv. dormant fazi. Sa porastom jačine PEP tretmana uočeno je i povećanje trajanja lag faze, koja je kod ćelija izloženih tretmanima energije 34.6 J/cm^3 produžena za oko 2h, dok su tretmani energije 65.8 i 658.1 J/cm^3 produžili lag fazu za oko 5h, odnosno 6h. To ukazuje na zaključak da se porastom primenjene energije električnih pulseva faza oporavka tretiranih ćelija produžava, s obzirom na to da su preživele ćelije doživele jedan vid subletalnog šoka.

Sa produžetkom lag faze nastupilo je odlaganje eksponencijalne faze, pa je i acidifikaciona aktivnost ovih ćelija odložena. Međutim, rast PEP tretiranih ćelija se

odvijao istom dinamikom kao kod netretiranih, pa je porast termalne snage detektovan na kalorimetru pratio krivu rasta kontrolnog uzorka, ali sa zakašnjenjem koje odgovara produžetku lag faze.

Preživela subpopulacija PEP tretiranih laktobacila pokazala je veću otpornost na ponovne PEP tretmane, koja je bila veća sa porastom jačine tretmana. Dinamika rasta ove populacije je bila slična rastu kontrolnih uzoraka, a nova populacija je takođe pokazala kašnjenje u postizanju maksimalne termalne snage. Ovo kašnjenje je kod ponovno tretiranih ćelija bilo duže u odnosu na prvobitno tretirane ćelije, uprkos tome što su re-tretirane ćelije pokazale veću otpornost na primenjeni tretman. Stoga su neophodna detaljnija istraživanja na ćelijskom nivou, kako bi se razjasnio uticaj pulsirajućih električnih polja na stadijume razvoja preživele subpopulacije ćelija.

Značajno je istaći da rezultati istraživanja ukazuju na veću rezistentnost PEP tretiranih ćelija na elektropermeabilizaciju nastalu primenom ponovnih tretmana. Na osnovu toga se može zaključiti da jači PEP tretmani izazivaju formiranje jače ćelijske membrane, kao i sintezu proteina koji pomažu ćeliji da bude otporna na stres, pa preživela subpopulacija postaje otpornija na naredne tretmane. Ovo predstavlja interesantno poglavlje za naredna istraživanja na metaboličkom i proteomičkom nivou.

Jači PEP tretmani su evidentno uticali na odlaganje stepena acidifikacije atenuiranih ćelija, s obzirom na to da je eksponencijalna faza rasta bakterija bila odložena. Međutim, vrlo je interesantan podatak da su ćelije tretirane najjačim tretmanom energije 658.1 J/cm^3 dostigle isti pH kao netretirane, ali u deset puta manjem broju (8.6 log cfu/ml u poređenju sa 9.6 log cfu/ml). To ukazuje na činjenicu da PEP tretmani visoke energije nisu uticali samo na odlaganje acidifikacione aktivnosti, već i na poboljšanje same acidifikacione sposobnosti. Razlog se takođe može tražiti u povećanoj koncentraciji intracelularnog materijala u medijumu, koja predstavlja dodatni stimulans za rast i razvoj preživele subpopulacije. Ipak, uočava se da su ponovni PEP tretmani smanjili stepen odlaganja acidifikacije za oko 5-6%, što se zapravo može pripisati povećanoj otpornosti preživele subpopulacije, koja je nastavila da se razvija u većem broju.

Ćelije izložene pulsevima energije 65.8 i 658.1 J/cm^3 pokazale su veću otpornost na simulirane GI uslove, pokazujući stepen preživljavanja preko 91%, što je

u granicama stepena preživljavanja referentnog soja *Lb. rhamnosus* GG, koji se koristi kao probiotik u prehrambenoj industriji. Važno je istaći da je ukupan broj ćelija bio veći od 10^8 cfu/ml, što ukazuje na činjenicu da kontrolne, kao i PEP tretirane ćelije soja *Lb. plantarum* 564 ispunjavaju jedan od najvažnijih probiotskih kriterijuma, a to je visoka brojnost ćelija nakon prolaska kroz GI trakt. Ove ćelije su pokazale tolerantnost na žučne soli, koje malobrojne bakterije imaju. S obzirom na to da je rezistentnost na žučne soli vezana za aktivnost enzima žučnih hidrolaza, dobijeni rezultati ukazuju na to da ispitivani laktobacili poseduju ove enzime, čije prisustvo nije izgubljeno ni kod PEP tretiranih ćelija, već je naprotiv rezistentnost porasla sa porastom jačine primenjenih tretmana.

Ispitivani soj *Lb. plantarum* 564 je pokazao rezistentnost na određene antibiotike, kao što su kanamicin, gentamicin, neomicin, streptomycin i tetraciklin, dok su ćelije tretirane jačim PEP tretmanima ($>30 \text{ J/cm}^3$) izgubile rezistentnost na tetraciklin. Stoga bi determinacija lokacije gena odgovornih za rezistentnost na antibiotike (plazmidna ili hromozomalna) doprinela boljem razumevanju ovih promena koje nastaju pod uticajem stresa kao što su pulsirajuća električna polja. Time bi i primena antibiotik-rezistentnih sojeva kao probiotskih starter kultura bila bezbednija, s obzirom na to da rezistentne probiotske bakterije mogu doprineti transmisiji antibiotik-rezistentnih gena na patogene bakterije prisutne u GI traktu.

Ispitivanjem antimikrobne aktivnosti može se zaključiti da ćelije soja *Lb. plantarum* 564 poseduju antimikrobnu aktivnost na ispitivane patogene mikroorganizme (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 5999, *Listeria monocytogenes* IM 2000, *Salmonella enteritidis* ATCC 31806 i *Candida albicans* ATCC 10259), dok su PEP tretirane ćelije pokazale selektivno inhibitorno dejstvo. Ćelije izložene nižim PEP tretmanima (energije ispod 13 J/cm^3) pokazale su istu inhibitornu sposobnost na sve navedene mikroorganizme kao i kontrolne ćelije, dok su ćelije tretirane jačim PEP tretmanima izgubile sposobnost inhibicije nad *E. coli* ATCC25922. Interesantno je ustanoviti da su ćelije izložene ponovnim PEP tretmanima (iznad 30 J/cm^3) izgubile sposobnost inhibicije bakterije *S. aureus* ATCC25923. S obzirom na to da produkcija organskih kiselina, kao i sinteza bakteriocina predstavljaju limitirajuće faktore za rast patogenih mikroorganizama, poboljšana acidifikaciona aktivnost PEP tretiranih ćelija ukazuje na zaključak da

produkcija organskih kiselina ne predstavlja izostali faktor inhibicije PEP tretiranih ćelija na pojedine patogene bakterije, već su u pitanju drugi antimikrobni mehanizmi, koji mogu biti predmet daljih istraživanja.

Generalno se može zaključiti da dobijeni rezultati predstavljaju osnovu za dalja istraživanja koja će se bazirati na ispitivanju mogućih mehanizama promene ćelijske membrane tokom rasta, sa posebnim osvrtom na period srednje i kasne ekponencijalne faze rasta, kao i na ispitivanju posledica vezanih za odbrambeni mehanizam ćelije pod uticajem PEP indukovanog stresa.

Rezultati istraživanja takođe predstavljaju bitan pomak napred za industrijsku relevantnost primene pulsirajućih električnih polja u prehrambenoj industriji. U cilju proizvodnje zdravstveno bezbednih namirnica, neophodno je dobro poznavanje ponašanja preživele subpopulacije mikroorganizama tretiranih pulsirajućim električnim poljima. Dobijeni rezultati istraživanja ukazuju ne samo na mogućnost oporavka preživele subpopulacije, već i na povećanu otpornost iste na ponovne tretmane. Dokaz o postojanju perzistera unutar iste populacije mikroorganizama ukazuje na činjenicu da PEP tretman, kao alternativna netermička tehnika za inaktivaciju mikroorganizama, ne može u potpunosti zameniti postupak pasterizacije, već se može primenjivati kao dopunski tretman.

Studije o diverzitetu populacije predstavljaju ključno poglavlje u razumevanju mehanizama preživljavanja ćelija bakterija nakon dejstva raznih stresova. Stoga, dalja karakterizacija PEP preživele subpopulacije ćelija bi doprinela boljem razumevanju samog diverziteta u okviru iste populacije, neophodnog za otpornost i sposobnost prilagođavanja ćelija laktobaila u različitim sredinama. Osim toga, dokazano je da odgovori ćelije na određeni stres mogu dramatično da poboljšaju naknadno ponašanje u određenim sredinama, što može dovesti do poboljšanja tehnoloških karakteristika, kao i gastrointestinalne otpornosti određene bakterijske vrste.

8. LITERATURA

1. Alm, L. (1982): Effects of Fermentation on Curd Size and Digestibility of Milk Proteins in Vitro of Swedish Milk Products. *J. Dairy Sci.* **65** (4), 509-514.
2. Álvarez, I., Raso, J., Palop, A., Sala, F.J. (2000): Influence of different factors on the inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric fields. *Int. J. Food Micr.*, **55**, 143-146.
3. Aly, M.E. (1990): Utilization of freeze-shocked Lactobacilli for enhancing flavour development of Ras cheese. *Egyptian Journal of Dairy Science*, **18**, 143-156.
4. Aly, M.E. (1996): Evaluation of some freeze-shocked lactic starters for accelerated ripening of Domiati cheese made at various salt levels. *Egypt. J. Dairy Sci.* **24**, 47-60.
5. Andersen, H.J., Ostdal, H. and Blom, H. (1995): Partial purification and characterization of a lipase from *Lactobacillus plantarum* MF32. *Food Chem.*, **53**, 369-373.
6. Annuk, H., Hirno, S., Türi, E., Mikelsaar, M., Arak, E., Wadström, T. (1999): Effect on cell surface hydrophobicity and susceptibility of *Helicobacter pylori* to medicinal plant extracts. *FEMS Microbiology Letters*, **172**, 41-45.
7. Annuk, H., Hynes, S.O., Hirno, S., Mikelsaar, M., Wadstrom, T. (2001): Characterization and differentiation of lactobacilli by lectin typing. *Journal of Medical Microbiology*, **50**, 1069-1074.
8. AOAC (1995): *Official Methods of Analysis*. 16th Edn., Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC., USA.
9. Ardö, Y. (2006): Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnology Advances* **24**, 238-242.
10. Ardö, Y., Petterson, H.E. (1988): Accelerated cheese ripening with heat-treated cells of *Lactobacillus helveticus* and a commercial proteolytic enzyme. *J. Dairy Res.* **55**, 239-245.
11. Aronsson, K., Borch, E., Stenlöf, B., Rönner, U. (2004): Growth of pulsed electric field exposed *Escherichia coli* in relation to inactivation and environmental factors. *Int. J. Food Micr.*, **93**, 1-10.
12. Asbell, M.A., Eagon, R.G. (1966): The role of multivalent cations in the organisation and structure of bacterial cell walls. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **22**, 664-671.
13. Asensio, C., Gomez, R., Pelaez, C. (1995): Effect of heat treatment on the proteolytic activity of mesophilic bacteria isolated from goats' milk cheese. *Letters in Applied Microbiology*, **21**, 25-30.
14. Asensio, C., Parra, L., Pelaez, C., Gomez, R. (1996): Use of heat shocked mesophilic lactic acid bacteria in low-fat goat's milk cheesemaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, 2919-2923.
15. Aston, J.W., Creamer, L.K. (1986): Contribution of the components of the water-soluble fraction to the flavor of Cheddar cheese. *New Zealand J. Dairy Sci. Technol.*, **21**, 229-248.
16. Aston, J.W., Douglas, K. (1983): The production of volatile sulphur compounds in Cheddar cheeses during accelerated ripening. *Australian J. Dairy Tech.*, 66-70.
17. Atanassova, M.R., Chipeva, V., Ivanova, I., Haertlé, I. (2001): Determination of the growth stages of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* M3 from Bulgarian yellow cheese by electroconductivity. *J. Microb. Methods* **46**, 227-233.
18. Aukrust, T.W., Bruberg, M.B., Nes, I.F. (1995): Transformation of *Lactobacillus* by electroporation. Chapter 20. In: *Methods in Molecular Biology, Vol 47, Electroporation Protocols for Microorganisms*. Edited by J. A. Nickoloff, Humana Press Inc, Totowa, NJ.
19. Avery, S.V. (2006): Microbial cell individuality and the underlying sources of heterogeneity. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 577-587.

20. Axe, D.D., Bailey, J.E. (1995): Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.*, **47**, 8–19.
21. Balaban, N. Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., Leibler, S. (2004). Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*, **305**, 1622–1625.
22. Barbosa-Cánovas, G. V., Góngora Nieto, M. M., Pothakamury, U. R., Swanson, B. G. (1999): *Preservation of foods with pulsed electric fields*. Academic Press, San Diego, CA.
23. Barbosa-Cánovas, G. V., Pierson, M.D., Zhang, Q.H., Schaffner, D.W. (2000): Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies. *J. Food Sci.* (special suppl. ISSN:0022-1147), 1-100.
24. Bartels, H.J., Johnson, M.E., Olson, N.F. (1987): Accelerated ripening of Gouda cheese. 2. Effect of freeze shocked *Lactobacillus helveticus* on proteolysis and flavour development. *Milchwiissenschaft*, **42** (3), 139-144.
25. Bengmark S. (1998): Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut* **42**, 2-7.
26. Benz, R., Zimmermann, U. (1980): Pulse-length dependence of the electrical breakdown in lipid bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **597**, 637-642.
27. Beresford T.P. (2003): Non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and cheese quality. In: *Dairy processing – Improving quality*, Smit G. (Ed.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, 448–469.
28. Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L., Cogan, T.M. (2001): Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.*, **11**, 259-274.
29. Bernet, M.F., Brassart, D., Neeser, A., Servin, L. (1993): Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 4121-4128.
30. Berrada, N., Lemeland, J. F., Laroch, G., Thouvenot, O., Piaia M. (1991): Bifidobacterium from fermented milks: survival during gastric transit. *J. Dairy Sci.* **74**, 409-413.
31. Bhowmik, T., Marth, E.H. (1990). Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* species in cheese ripening: a review. *J. Dairy Sci.*, **73**, 859-866.
32. Bie, R., Sjöström, G. (1975a): Autolytic properties of some lactic acid bacteria used in cheese production. Part I: Materials and methods. *Milchwissenschaft*, **30**, 653–657.
33. Bie, R., Sjöström, G. (1975b): Autolytic properties of some lactic acid bacteria used in cheese production. Part II: Experiments with fluid substrates and cheese. *Milchwissenschaft*, **30**, 739-747.
34. Bigger, J. (1944): Treatment of Staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *Lancet* **244**, 497-500.
35. Blackman, S. A., Smith, T. J. & Foster, S. J. (1998): The role of autolysins during vegetative growth of *Bacillus subtilis* 168. *Microbiology* **144**, 73-82.
36. Booth, I.R., Cash, O., O'Byrne, C. (2002): Sensing and adapting to acid stress. *Ant. Von. Leuwenhoek*. **81** (1-4):33-42.
37. Bourdat-Deschamps, M., Le Barse, D., Yvon, M., Chapot-Chartier, M.P. (2004): Autolysis of *Lactococcus lactis* AM2 stimulates the formation of certain aroma compounds from amino acids in a cheese model. *Int. Dairy J.*, **14**, 791-800.
38. Boyd, R.F. (1988): *General microbiology*. 2nd Ed., Times Mirror/ Mosby College Pub., St. Louis, MO.
39. Braithwaite, N., Weaver, G. (1990): *Electronic Materials*. Butterworth Scientific Ltd, London.
40. Breidt, F., Romick, T.L., Fleming, H.P. (1994): A rapid method for the determination of bacterial growth kinetics. *J. Rapid Methods & Automation in Microbiology*, **3**, 59-68.
41. Buist, G., Kok, J., Leenhouts, J., J., Dabrowska, M., Venema, G., Haandrikman, A. (1995): Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the major peptidoglycan

- hydrolase of *Lactococcus lactis*, a muramidase needed for cell separation. *Journal of Bacteriology*, **177**, 1554-1563.
42. Bunthoff, C. J., van Schalkwijk, S., Meijer, W., Abee, T., Hugenholtz, J. (2001): Fluorescent method for monitoring cheese starter permeabilization and lysis. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 4264-4271.
 43. Bushnell, A. H., Dunn, J. E., Clark, R. W., Pearlman, J. S. (1993): High Pulsed Voltage Systems for Extending the Shelf Life of Pumpable Food Products. US Patent 5,235,905.
 44. Calderon-Miranda, M.L., Barbosa-Canovas, G.V., Swanson, B.G. (1999): Transmission electron microscopy of *Listeria innocua* treated by pulsed electric fields and nisin in skimmed milk. *Int. J. Food Microbiol.* **51**, 31-38.
 45. Casey J., Dobb R. (1992): Microbial routes to aromatic aldehydes. *Enzyme Microbiol. Technol.* **14**, 739-747.
 46. Casey, M.G., Häni, J.P., Gruskovnjak, J., Schaeren, W., Wechsler, D. (2006): Characterisation of the non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) of Gruyère PDO. *Lait*, **86**, 407-414.
 47. Castañeda, R., Vassal, L., Gripon, J.C., Rousseau, M. (1990): Accelerated ripening of a Saint-Paulin cheese variant by addition of a heat-shocked *Lactobacillus* suspension. *Netherland Milk and Dairy Journal*, **44**, 49-62.
 48. Castillo, I., Requena, T., Fernández de Palencia, P., Fontecha, J., Gobetti, M. (1999): Isolation and characterization of an intracellular esterase from *Lactobacillus casei* subsp. *casei* IFPL731. *J. App. Micro.* **86**, 653-659.
 49. Chang, D. C., Chassy, B. M., Saunders, J. A., Sowers, A. E. (1992): *Guide to electroporation and electrofusion*. Academic Press, San Diego, CA.
 50. Chapot-Chatier, M.P. (1996): Les autolysins des bacteries lactiques. *Le Lait*, **76**, 91-109.
 51. Chapot-Chartier, M. P., Deniel, C., Rousseau, M., Vassal, L., Gripon, J. C. (1994): Autolysis of two strains of *Lactococcus lactis* during cheese ripening. *International Dairy Journal*, **4**, 251-269.
 52. Chassy, B. M. (1987): Prospects for the genetic manipulation of lactobacilli. *FEMS Microbiol. Lett.*, **46**, 297-312.
 53. Chassy, B. M., Flickinger, J. L. (1987): Transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.*, **44**, 173-177.
 54. Choisy, C., Micheline Gueguen, Lenoir, J., Schmidt, J.L., Tourneur, C. (1987): Microbiological aspects. In: *Cheesemaking, Science and Technology*, Lavoisier Publishing Inc., New York, 259-292.
 55. Cohen, D.P.A., Renes, J., Bouwman, F.G., Zoetendal, E.G., Mariman, E., de Vos, W.M., Vaughan, E.E. (2006): Proteomic analysis of log to stationary growth phase *Lactobacillus plantarum* cells and a 2-DE database. *Proteomics*, **6**, 6485-6493.
 56. Collins, Y.F., McSweeney P.L.H, Wilkinson, M.G. (2003): Evidence of a relationship between autolysis of starter bacteria and lipolysis in Cheddar cheese during ripening. *Journal of Dairy Research* **70**, 105-113.
 57. Conway, P. L., Gorbach, S. L., Golden, B. R. (1987): Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci.* **70**, 1-12.
 58. Cook, G.M., Russell, J.B. (1994): The effect of extracellular pH and lactic acid on pH homeostasis in *Lactococcus lactis* and *Streptococcus bovis*. *Curr. Microbiol.*, **28**, 165-168.
 59. Coppola, R., Succi, M. Tremonte, P., Reale, A., Salzano, G., Sorrentino, E. (2005): Antibiotic susceptibility of *L. rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Lait*, **85**, 193-204.
 60. Corlett, D. A., Brown, M. H. (1980): pH and acidity. In *Microbial Ecology of Foods. Volume 1. Factors Affecting the Life and Death of Microorganisms*, ed. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Academic Press, New York.

61. Cortese, P., Dellacasa, G., Gemme, R., Bonetta, S., Benetta, S., Carraro, E. (2011). A pulsed electric field (PEF) bench static system to study bacteria inactivation. *Nuclear Physics B (Proc. Suppl.)* **215**, 162–164.
62. Cousins C.M., Sharpe M.E., Law B.A. (1977): The bacteriological quality of milk for Cheddar cheesemaking. *Dairy Ind. Int.* **42**, 12–13.
63. Criddle, R. S., Breindenbach, R. W., Hansen, L. D. (1991). Plant calorimetry: How to quantitatively compare apples and oranges. *Thermochemica Acta*, **193**, 67–90.
64. Crow, V.L., Coolbear, T., Holland, R., Pritchard, C.G., Martley, F.G. (1993): Starters as finishers: starter properties relevant to cheese ripening. *Int. Dairy J.*, **3**, 423-460.
65. Crow, V.L., Coolbear, T., Gopal, P.K., Martley, F.G., McKay, L.L., Riepe, H. (1995): The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *Int. Dairy J.* **5**, 855-875.
66. Crow V., Curry B., Hayes M. (2001): The ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar. *Int. Dairy J.* **11**, 275–283.
67. Cueva, O.A. (2009): Pulsed electric field influences on acid tolerance, bile tolerance, protease activity and growth characteristics of *Lactobacillus acidophilus* LA-K A Thesis, Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College.
68. Curtin, A.C, McSweeney, P.L.H. (2004): Catabolism of aminoacids in cheese during ripening. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol 1: *General Aspects*, 3rd edition. Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), Elsevier, London, 435-454.
69. de Angelis, M., Gobbetti, M. (2004): Environmentl stress responses in *Lactobacillus*: a review. *Proteomics* **4**, 106-122.
70. de Keersmaecker, C.J.S. Verhoeven, L.A.T., Marchal, K.J.D., Vanderleyden, J., Nagy, I. (2006): Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* due to accumulation of lactic acid. *FEMS Microbiol Lett.*, **259**, 89–96.
71. de Vries, M.C., Vaughan, E.E., Kleerebezem, M., de Vos, W.M. (2004): Optimising single cell activity assessment of *Lactobacillus plantarum* by fluorescence in situ hybridization as affected by growth. *Journal of Microbiological Methods*, **59**, 109-115.
72. Dejmek, P., Trägårdh, C. (1994): Energy cost of high electric field pulse treatment. *Trends in Food Science and Technology*, **5**, 265.
73. Delin, S., Monk, P., Wadsö, I. (1969): Flow micro-calorimetry as an analytical tool in microbiology. *Science Tools*, **16**, 22-24
74. Dellaglio, F. (1988): Starters for fermented milks. Section 1: Taxonomy and metabolism. Bulletin of IDF, No 227.
75. Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E., Hols, P. (1999): The biosynthesis and functionality of the cell wall of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **76**, 159–184.
76. Desmazeaud, M.J., Gripon, J.C., Le Bars, D., Bergère, J.L. (1976): Étude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. *Le Lait*, **56**, 379-396.
77. Deutsch, S.M., Molle, D., Gagniare, V., Piot, M., Atlan, D, Lortal, S. (2000): Hydrolysis of sequenced β -casein peptides provides new insight into peptidase activity from thermophilic lactic acid bacteria and highlights intrinsic resistance of phosphopeptides. *Applied Environ. Microbiology*, **66**, 5360-5367.
78. Deutsch, S.M., Ferain, T., Delcour, J., Lortal, S. (2002): Lysis of lysogenic strains of *Lactobacillus helveticus* in Swiss cheeses and first evidence of concomitant *Streptococcus thermophilus* lysis. *International Dairy Journal*, **12**, 591–600.
79. Dhar, N., McKinney, J.D. (2007): Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. *Int. Dairy J.*, **15**, 817-830.
80. Diez-Gonzalez, F., Russell, J. B. (1997): The effects of carbonylcyanide-m-chlorophenylhydrazone (CCCP) and acetate on *Escherichia coli* O157, H7 and K-12, uncoupling versus anion accumulation. *FEMS Microbiol. Lett.*, **151**, 71–76.

81. Doleyres, Y., Fliss, I., Lacroix, C. (2004): Increased stress tolerance of *Bifidobacterium longum* and *Lactococcus lactis* produced during continuous mixed-strain immobilized-cell fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, **97**, 527-546.
82. Du Toit, M., Franz, C., Schillinger, U., Warles, B., Holzappel, W. (1998): Characterization and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig-feeding trial and their effect on serum cholesterol level, faece moisture contents. *International Journal of Food Microbiology*, **40**, 93-104.
83. Elez-Martínez, P., Martín-Belloso, O. (2007): Effects of high intensity pulsed electric field processing conditions on vitamin C and antioxidant capacity of orange juice and gazpacho, a cold vegetable soup. *Food Chemistry*, **102**, 201-209.
84. El Soda, M., Fathallah, S., Ezzat, N., Desmazeaud, M.J. and Abou Donia, S. (1986). The esterolytic and lipolytic activities of lactobacilli. Detection of the esterase systems of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus fermentum*. *Sci. Aliments*, **6**, 545-547.
85. El Soda, M., Chen, C., Riesterer, B., Olson, N. (1991): Acceleration of low-fat cheese ripening using lyophilized extracts or freeze-shocked cells of some cheese related microorganisms. *Milchwissenschaft*, **46**, 358-360.
86. El Soda, M., Madkor, M., Tong, P.S. (1999): Evaluation of commercial adjuncts for use in cheese ripening: 3. Properties of heat-shocked adjuncts in buffer and cheese slurry systems. *Milchwissenschaft*, **54** (5), 262-264.
87. Engles, W.J.M., Visser, S. (1994): Isolation and comparative characterization of compounds that contribute to the flavor of different cheese types. *Neth Milk Dairy J.*, **48**, 127-140.
88. Escande-Géraud, M.L., Rols, M.P., Dupont, M.A., Gas, N., Teissié, J. (1988): Reversible plasma membrane ultra structural changes correlated with electroporabilization in Chinese ovary cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, **939**, 247-259.
89. Exterkate, F. A., De Veer, G. J. C. M., Stadhouders, J. (1987): Acceleration of the ripening process of Gouda cheese by using heat-treated mixed-strain starter cells. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **41**, 307-320.
90. FAO/WHO (2002): Guidelines for the evaluation of probiotics in food. FAO/WHO joint report. Available on: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf> (pristup decembar 2012).
91. Feirtag, J. M., McKay, L. L. (1987): Isolation of *Streptococcus lactis* C2 mutants selected for temperature sensitivity and potential use in cheese manufacture. *J. Dairy Sci.*, **70**, 1773-1778.
92. Fernandez-Molina, J.J., Barbosa-Canovas, G.V., Swanson, B.G. (2005): Skim milk processing by combining PEF and thermal treatments. *J. Food Process. Preserv.*, **29**, 291-306.
93. Fernández Murga, M. L., Pesce de Ruiz Holgado, A., de Valdez, G. F. (1995): Influence of the incubation temperature on the autolytic activity of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Bacteriol.* **78**, 426-429.
94. Foster, S. J. (1994): The role and regulation of cell wall structural dynamics during differentiation of endospore-forming bacteria. *J Appl Bacteriol* **76**, 25-39.
95. Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (1996): Proteolysis in cheese during ripening. *Food Reviews International*, **12**, 457-509.
96. Fox, P.F., Stepaniak, L. (1993): Enzymes in cheese technology. *Int. Dairy J.*, **3**, 509-530.
97. Fox P.F., Wallace J.M. (1997): Formation of flavour compounds, *Adv. Appl. Microbiol.* **45**, 17-85.
98. Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W. (1995): SOS responses and DNA damage tolerance in prokaryotes. In: *DNA repair and mutagenesis*, Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W. (Eds.), ASM Press, Washington, DC, 407-464.
99. Gabriel, B., Teissié, J. (1995): Control by electrical parameters of short- and long-term cell death resulting from electroporabilization of Chinese hamster ovary cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1266**, 171-178.

100. Gagnaire, V., Piot, M., Camier, B., Vissers, J. P. C., Jan, G., Léonil, J. (2004): Survey of bacterial proteins released in cheese: A proteomic approach. *International Journal of Food Microbiology*, **94**, 185–201.
101. Gášková, D., Sigler, K., Janderová, B., Plášek, J. (1996): Effect of high-voltage electric pulses on yeast cells: Factors influencing the killing efficiency. *Bioelectrochem. Bioenergetics*, **39**, 195–202.
102. Gibson, G. R., Otaway, P. W., Robert, A. R. (2000): Prebiotics: New development in functional foods. Chandos Publishing (Oxford) Limited, London, UK.
103. Gilliland, S.E. (1985): Influence of bacterial starter cultures on nutritional value of foods: Improvement of lactose digestion by consuming foods containing lactobacilli. *Cultured Dairy Products Journal* **20** (2), 28–33.
104. Giraud, E., Lelong, B., Raimbault, M. (1991): Influence of pH and initial lactate concentration on the growth of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 96–99.
105. Glaser, R.W., Leikin, L.V., Chernomordik, L.V., Pastushenko, V.F., Sokirko, A.I. (1988): Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores. *Biochimica et Biophysica Acta*, **940**, 275–287.
106. Gobbetti, M., Burzigotti, R., Smacchi, E., Corsetti, A., De Angelis, M. (1997): Microbiology and biochemistry of Gorgonzola cheese during ripening. *Int. Dairy J.*, **7**, 519–529.
107. Gobbetti, M., Fox, P. F., Stepaniak, L. (1996). The esterolytic and lipolytic activities of mesophilic and thermophilic lactobacilli. *Ital. J. Food Sci.*, **2**, 127–135.
108. Gobbetti M., Folkertsma B., Fox P.F., Corsetti A., Smacchi E., De Angelis M., Rossi J., Kilcawley K., Cortini M. (1999): Microbiology and biochemistry of Fossa (pit) cheese. *Int. Dairy J.* **9**, 763–773.
109. Gómez, N., García, D., Álvarez, I., Raso, J., Condón, S. (2005): A model describing the kinetics of inactivation of *Lactobacillus plantarum* in a buffer system of different pH and in orange and apple juice. *Journal of Food Engineering* **70**, 7–14.
110. Grahl, T., Markl, H. (1996): Killing of microorganisms by pulsed electric fields. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **45** (1/2), 148–157.
111. Gurtler, J. B., Rivera, R. B., Zhang, H. Q., Geveke, D. J. (2010). Selection of surrogate bacteria in place of *E. Coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium for pulsed electric field treatment of orange juice. *International Journal of Food Microbiology* **139**, 1–8.
112. Halami, P.M., Chandrashekar, A., Nand, K. (2000): *Lactobacillus farciminis* MD, a newer strain with potential for bacteriocin and antibiotic assay. *Letters in Applied Microbiology*, **30**, 197–202.
113. Hamilton, W.A., Sale, A.J.H. (1967): Effects of high electric fields on microorganisms II. Mechanism of action of the lethal effect, *Biochim. Biophys. Acta* **48**, 789–800.
114. Hannon, J.A., Deutsch, S.M., Madec, M.N., Gassi, J.Y., Chapot-Chartier, M.P., Lortal, S. (2006): Lysis of starters in UF cheeses; Behaviour of mesophilic lactococci and thermophilic lactobacilli. *Int. Dairy J.*, **16**, 324–334.
115. Hannon, J. A., Wilkinson, M. G., Delahunty, C. M., Wallace, J. M., Morrissey, P. A., Beresford, T. P. (2003). Use of autolytic starter systems to accelerate the ripening of Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, **13**, 313–323.
116. Havenaar, R., Ten Brink, B., Huis in't Veld, J.H.J. (1992): Selection of strains for probiotic use. In: *Probiotics. The Scientific Basis*, Ed: Fuller, R. Chapman & Hall, London, 209–221.
117. 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.
118. Heinz, V., Toepfl, S., Knorr, D. (2003): Impact of temperature on lethality and energy efficiency of apple juice pasteurization by pulsed electric fields treatment, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **4** (2), 167–175.

119. Hibino, M., Shigemori, M., Itoh, H., Nagayama, K., Kinoshita, K. Jr. (1991): Membrane conductance of an electroporated cell analyzed by submicrosecond imaging of transmembrane potential. *Biophys. J.*, **59**, 209-220.
120. Higgins, M. L., Coyette, J., Shockman, G. D. (1973): Site of cellular autolysis in *Lactobacillus acidophilus*. *J. Bacteriol.*, **116**, 1054-1065.
121. Holland R., Coolbear T. (1996): Purification of tributyrin esterase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* E8. *J. Dairy Res.* **63**, 131-140.
122. Holland R, Liu S Q, Wang T, Bennett M, Norris G, Delabre M L, Lubbers M W, Dekker J W, Crow V L (2002): Esterases of lactic acid bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology*, **57**, 116-116.
123. Hutkins, R.W., Nannen, N.L. (1993): pH homeostasis in lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.*, **76**, 2354-2365.
124. Hülshager, H., Niemann, E.G. (1980): Lethal effect of high-voltage pulses on *E. coli* K12. *Radiat. Environ. Biophys.* **18**, 281-288.
125. Hülshager, H., Pottel, J., Niemann, E. G. (1981): Killing of bacteria with electric pulses of high field strength. *Radiat Environ Biophys.*, **20**, 53-65.
126. Hülshager, H., Pottel, J., Niemann, E. G. (1983): Electric field effects on bacteria and yeast cells. *Radiat. Environ. Biophys.* **22**, 149-162.
127. Ingham, C. J., Beerthuyzen, M., Vlieg van Hylckama, J. (2008). Population heterogeneity of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 microcolonies in response to and recovery from acid stress. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**, 7750-7758.
128. Jaeger, H., Schulz, A., Karapetkov, N., Knorr, D. (2009): Protective effect of milk constituents and sublethal injuries limiting process effectiveness during PEF inactivation of *Lb. rhamnosus*. *Int. J. Food Micr.*, **134**, 154-161.
129. Jakešević, M. (2011): *Probiotics and berry-associated polyphenols: catabolism and antioxidative effects*. Doktorska disertacija, Lund University, Sweden.
130. Jay, J.M. (1991): Intrinsic and extrinsic parameters of foods that affect microbial growth. In: *Modern Food Microbiology*, Chapman & Hall, New York, 38-59.
131. Jayaram, S., Castle, G. S. P. Margaritis, A. (1992): Kinetics of sterilization of *Lactobacillus brevis* cells by the application of high voltage pulses. *Biotechnol. Bioeng.*, **40** (11), 1412-1420.
132. Jayaram, S., Castle, G. S. P. Margaritis, A. (1993): The effects of high field DC pulse and liquid medium conductivity on survivability of *Lactobacillus brevis*. *Appl. Micr. Biotech.*, **40**, 117-122.
133. Jeyamkondan, S., Jayas, D. S., Holley, R. A. (1999): Pulsed electric field processing of foods: a review. *Journal of Food Protection*, **62** (9), 1088-1096.
134. Jia, M., Zhang, Q.H., Min, D.B. (1999): Pulsed electric field processing effects on flavor compounds and microorganisms of orange juice. *Food Chemistry*, **65**, 445-451.
135. Jin, L. Z., Ho, Y. W., Abdullah, N., Jalaudin, S. (1998): Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. *Letters in Applied Microbiology*. **27**, 183-185.
136. Kalogridou-Vassiliadou, D. (1984): Lipolytic activity and heat resistance of extracellular lipases of some Gram-negative bacteria. *Milchwissenschaft*, **39**, 601-603.
137. Kandler, O. (1983): Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **49** (3), 209-224.
138. Kang, O.J., Vézinz, L.P., Laberge, S., Simard, R.E. (1998): Some factors influencing the autolysis of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei*. *J. Dairy Sci.* **81**, 639-646.
139. Kanner, J., Harel, S., Jaffe, R. (1991): Lipid peroxidation of muscle food as affected by NaCl. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1017-1021.
140. Kaur, I.P, Chopra, K., Saini, A. (2002): Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **15**, 1-9.

141. Kemp, R.B. (1975): Microcalorimetric studies of tissue cells and bacteria. *Pest Management Science*, **6**, 311-325.
142. Keren, I., Kaldalu, N., Spoering, A., Wang, Y., Lewis, K. (2004): Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiology Letters*, **230**, 13-18.
143. Khalid, N.M., Marth, E.H. (1990): Lactobacilli - Their Enzymes and Role in Ripening and Spoilage of Cheese: A Review. *J. Dairy Sci.* **73** (10), 2669-2684.
144. Khalid, N.M., El Soda, M., Marth, E.H. (1990): Esterases of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *J. Dairy Sci.* **73**, 2711-2719.
145. Kiernan, R.C., Beresford, T., O'Cuinn, G. Jordan, K.N. (2000): Autolysis of lactobacilli during Cheddar cheese ripening. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, **39**, 95-106.
146. Kinoshita, K.Jr, Tsong, T. Y. (1977): Voltage-induced pore formation and hemolysis of human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **471**, 227-242.
147. Klaenhammer, T.R. (1982): Microbiological considerations in selection and preparation of *Lactobacillus* strains for use as dietary adjuncts. *Journal of Dairy Science* **65**, 1339-1345.
148. Klaenhammer, T., Altermann, E., Arigoni, F., Bolotin, A., Breidt, F., Broadbent, J., Cano, R., Chaillou, S., Deutscher, J., Gasson, M., van de Guchte, M., Guzzo, J., Hartke, A., Hawkins, T., Hols, P., Hutkins, R., Kleerebezem, M., Kok, J., Kuipers, O., Lubbers, M., Maguin, E., McKay, L., Mills, D., Nauta, A., Overbeek, R., Pel, H., Pridmore, D., Saier, M., van Sinderen, D., Sorokin, A., Steele, J., O'Sullivan, D., de Vos, W., Weimer, B., Zagorec, M., Siezen, R. (2002): Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie van Leeuwenhoek*, **82**, 29-58.
149. Klein, N., Lortal, S. (1999): Attenuated starters: an efficient means to influence cheese ripening - a review. *Int. Dairy J.*, **9**, 751-762.
150. Kleerebezem, M., Quadri, L. E. (2001): Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. *Peptides*, **22**, 1579-1596.
151. Kuchroo, C.N., Fox, P.F. (1983): Fractionation of the water soluble nitrogen from Cheddar cheese: chromatographic methods. *Milchwissenschaft* **38**, 76-79.
152. Kunji, E.R.S., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., Konings, W.N. (1996): The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **70**, 187-221.
153. Kurmann, J.A. (1988): Starters for fermented milks. Section 5: Starters with selected intestinal bacteria. *Bulletin of IDF*, No 227.
154. Langsrud, T., Landaas, A. Castberg, H. B. (1987): Autolytic properties of different strains of group N streptococci. *Milchwissenschaft*, **42**, 556-560.
155. Lankaputhra, W. E. V., Shah, N. P. (1995): Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp in the presence of acid and bile salts. *Cult. Dairy Prod. J.* 30:2-7.
156. Law, B.A. (1984): Microorganisms and their enzymes in the maturation of cheeses. In: *Progress in industrial microbiology, Vol. 19: Modern applications of traditional biotechnologies*, Ed. Bushell, M.E., Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York.
157. Law, B. A. (2001): Controlled and accelerated cheese ripening: The research base for new technologies. *International Dairy Journal*, **11**(4-7), 383-398.
158. Lee, S.Y., Lee, B.H. (1990): Esterolytic and lipolytic activities of *Lactobacillus casei*-subsp.-*casei* LLG. *J. Food Sci.*, **55**, 119-126.
159. Lemeé, R., Rouault, A., Guezenc, S., Lortal S. (1994): Autolysis of 57 strains of dairy propionibacteria. *Lait* **76**, 241-251.
160. Leroy, F., Vuyst, L. (2001): Growth of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* strain CTC 494 in MRS broth is strongly reduced due to nutrient exhaustion: a nutrient depletion model for the growth of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 4407-4413.
161. Lewis, K. (2010): Persister cells. *Annu. Rev. Microbiol.*, **64**, 357-372.

162. Lorca, G. L., Raya, R. R., Taranto, M. P., Valdez, G. F. (1998): Adaptive acid tolerant response in *Lactobacillus acidophilus*. *Biotechnol Lett* **20**, 239-241.
163. Lortal, S., Chapot-Chartier, M.P. (2005): Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *Int. Dairy J.* **15**, 857-871.
164. Lortal, S., Lemée, R., Valence, F. (1997): Autolysis of thermophilic lactobacilli and dairy propionibacteria: A review. *Lait*, **77**, 133-150.
165. Lye, H.S., Karim, A.A., Rusul, G., Liong, M.T. (2011): Electroporation enhances the ability of lactobacilli to remove cholesterol. *J. Dairy Sci.*, **94**, 4820-4830.
166. MacGregor, S., Farish, O., Fouracre, R., Rowan, N.J., Anderson, J.G. (2000): Inactivation of pathogenic and spoilage microorganisms. *IEEE Transactions on Plasma Sci.*, **28**, 144-149.
167. Madkor, S. A., El Soda, M., Tong, P. S. (1999): Evaluation of commercial adjuncts for use in cheese ripening: 2. Ripening aspects and flavour development in cheese slurries prepared with adjunct lactobacilli. *Milchwissenschaft*, **54**, 133-137.
168. Madkor, S. A., El Soda, M., Tong, P. S. (2000): Ripening of Cheddar cheese with added attenuated adjunct cultures of lactobacilli. *Journal of Dairy Science*, **83**, 1684-1691.
169. Mannu, L., Comunian, R., Scintu, M-F. (2000): Mesophilic lactobacilli in Fiore Sardo cheese - PCR-identification and evolution during cheese ripening. *I. Dairy J.*, **10** (5-6), 383-389.
170. Marquez, V. O., Mittal, G. S. Griffiths, M. W. (1997): Destruction and inhibition of bacterial spores by high voltage pulsed electric field. *J. Food Sci.* **62** (2), 399-401,409.
171. Martín, R., Olivares, M., Marín, M.L., Fernández, L., Xaus, J., Rodríguez, J.M. (2005): Probiotic potential of 3 Lactobacilli strains isolated from breast milk. *J. Hum. Lact.* **21** (1), 8-17.
172. Massey, R.C., Buckling, A., Paacock, S.J. (2001): Phenotypic switching of antibiotic resistance circumvents permanent costs in *Staphylococcus aureus*. *Curr. Biol.*, **11**, 1810-1814.
173. Mattick, K.M., Jorgensen, F., Legan, J.D., Cole, M.B., Porter, J., Lappin-Scott, H.M., Humphrey, T.J. (2000): Survival and filamentation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT4 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 at low water activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1274-1279.
174. McDonald, M.C., Flemming, H.P., Hassan, H.M. (1990): Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2120-2124.
175. McFarland, L.V., Elmer, G.W. (1997): Pharmaceutical probiotics for the treatment of anaerobic and other infections, *Anaerobe* **3**, 73-78.
176. McSweeney, P. (2004): Biochemistry of cheese ripening. *Int. J. of Dairy Tech.*, **57** (2/3), 127-143.
177. McSweeney, P.L.H., Olson, N.F., Fox, P.F., Healy, A., (1994): Proteolysis of bovine α_{s2} -casein by chymosin. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, **119**, 429-432.
178. McSweeney, P., Sousa, M.J. (2000): Biochemical pathways during cheese ripening. Review. *Le Lait*, **80**, 293-324.
179. Meijer, W., Dobbelaar, C., Hugenholtz, J. (1998): Thermoinducible lysis in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK110: implications for cheese ripening. *International Dairy Journal*, **8**, 275-280.
180. Mellefont, L.A., McMeekin, T.A., Ross, T. (2005): Viable count estimates of lag time responses for *Salmonella typhimurium* M48 subjected to abrupt osmotic shifts. *Int. J. food. Microbiol.* **105**, 399-410.
181. Mertens, B. Knorr, D. (1992): Developments of nonthermal processes for food preservation *Food Technol.*, **46** (5), 124-133.
182. Meyer, J., Spahni, A. (1998): Influence of X-prolyl-dip eptidylaminopeptidase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* on proteolysis and taste of Swiss Gruyère cheese. *Milchwissenschaft*, **53**, 153-449.

183. Mills, S., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P. (2011): Enhancing the stress responses of probiotics for a lifestyle from gut to product and back again. *Microbial Cell Factories*, **10** (Suppl 1), 19-24.
184. Mombelli, B., Gismondo, M.R. (2000): The use of probiotics in medical practice. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **16**, 531-536.
185. Monod, J. (1949) - The Growth of Bacterial Cultures. *Annu. Rev. Microbiol.*, **3**, 371–394.
186. Morgan, S., Ross, R. P., Hill, C. (1997): Increasing starter cell lysis in Cheddar cheese using a bacteriocin-producing adjunct. *Journal of Dairy Science*, **80**, 1–10.
187. Neujahr, H. Y., Logardt, I. M. (1973): Autolytic enzyme system from *Lactobacillus fermenti*. *Biochemistry* **12**, 2578–2583.
188. Neumann, E. (1992): Membrane electroporation and direct gene transfer. *Bioelec. Bioeng.*, **28**, 247-267.
189. Neumann, E., Sowers, A.E. Jordan, C.A. (1989): *Electroporation and Electrofusion in Cell Biology*. Plenum Press, New York., 436.
190. Noonpakdee, W., Sitthimonchai, S., Panyim, S., Lertsiri, S. (2004): Expression of the catalase gene *kataA* in starter culture *Lactobacillus plantarum* TISTR850 tolerates oxidative stress and reduces lipid oxidation in fermented meat product. *International Journal of Food Microbiology*, **95**, 127–135.
191. Nousiainen, J., Javanainen, P., Setälä, J. (2004): Lactic acid bacteria as animal probiotics. *Lactic Acid Bacteria: microbiological and functional aspects*. 3rd ed. Marcel Dekker, Inc. New York, NY., 547-480.
192. Nguyen, P., Mittal, G.S. (2007): Inactivation of naturally occurring microorganisms in tomato juice using pulsed electric field (PEF) with and without antimicrobials. *Chemical Engineering and Processing* **46**, 360-365.
193. O'Donovan, C. M., Wilkinson, M. G., Guinee, T. P., Fox, P. F. (1996): An investigation of the autolytic properties of three lactococcal strains during cheese ripening. *Int. Dairy J.*, **6**, 1149–1165.
194. Olson, N.F. (1990): Measuring cheese acidity - The relationship of titratable acidity and pH in cheesemaking. *University of Wisconsin Dairy Pipeline*, **2**(3), 1-8.
195. Ostlie, H.M., Vegarud, G., Langsrud, T. (1995): Autolysis of Lactococci: Detection of Lytic Enzymes by Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Characterization in Buffer Systems. *App. Env. Micr.*, **61** (10), 3598–3603.
196. Ostlie, H.M., Vegarud, G., Langsrud, T. (2007): Autolysis of propionibacteria: Detection of autolytic enzymes by renaturing SDS-PAGE and additional buffer studies. *Int. J. Food Micr.* **117**, 167-174.
197. Ouwehand, A.C., Vesterlund, S. (2004): Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, Ed. Salminen, S.A., von Wright, A., Ouwehand, A.C. Marcel Dekker, New York, 375-395.
198. Pagan, R., Condon, S., Raso, J. (2005): Microbial inactivation by pulsed electric fields. In *Novel Food Processing Technologies*. Eds. Barbosa-Canovas, G.V., Tapia, M.S., Cano, M.P. pp. 45-68. CRC Press, Lincoln.
199. Perea Vélez M, Hermans K, Verhoeven TL, Lebeer SE, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC. (2007): Identification and characterization of starter lactic acid bacteria and probiotics from Columbian dairy products. *J Appl Microbiol.*, **103** (3), 666-674.
200. Pethig, R. (1979): *Dielectric and electronic properties of biological materials*. John Wiley & Sons, Chichester and New York.
201. Petterson, H-E. (1988): Starters for fermented milks. Section 2: Mesophilic starter cultures. *Bulletin of IDF*, No 227.

202. Petterson, H.E., Sjöström, G. (1975): Accelerated cheese ripening: a method for increasing the number of lactic acid bacteria in cheese without detrimental effect to the cheese-making process, and its effect on the cheese ripening. *J. Dairy Res.*, **42**, 313-326.
203. Pillidge, C. J., Rallabhandi, P. S. V. S., Tong, X. Z., Gopal, P. K., Farley, P. C., Sullivan, P. A. (2002): Autolysis of *Lactococcus lactis*. *International Dairy Journal*, **12**, 133-140.
204. Pothakamury, U.R., Monsalve-González, A., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. (1995): Inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in model foods by pulsed electric field technology. *Food Research International*, **28**, 167-171.
205. Presser K.A., Ratkowsky D.A., Ross T. (1997): Modeling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 2355-2360.
206. Puc, M., Kotnik, T., Mir, L.M., Miklavčič, D. (2003): Quantitative model of small molecules uptake after in vitro cell electroporation, *Bioelectrochemistry* **60**, 1- 10.
207. Qin, B. L., Barbosa-Cánovas, G. V., Swanson, B. G., Pedrow, P. D., Olsen, R. G. (1995a): A continuous treatment system for inactivating microorganisms with pulsed electric field. *IEEE Ind. Appl. Soc. Annu. Meet. IEEE*, Piscataway, N.J. 1345-1352.
208. Qin, B. L., Pothakamury, U. R., Vega, H., Martin, O., Barbosa-Cánovas, G. V., Swanson, B. G. (1995b): Food pasteurization using high intensity pulsed electric fields. *Food Technology*, **49** (12), 55-60.
209. Qin, B. L., Barbosa-Cánovas, G. V., Swanson, B. G., Pedrow, P. D., Olsen, R. G. (1998): Inactivating Microorganisms Using a Pulsed Electric Field Continuous Treatment System. *IEEE Transactions on Industry Applications*, **34**, 43-50.
210. Radulović, Z. (2007): Izolacija i selekcija autohtonih bakterija mlečne kiseline i njihova primena u standardizaciji sireva u tipu sjeničkog. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu.
211. Radulović, Z. (2010): Autohtone bakterije mlečne kiseline kao starter kulture. Monografija, Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd.
212. Radulović, Z., Miočinović, J., Puđa, P., Barać, M., Miloradović, Z., Paunović, D. (2011). The application of autochthonous lactic acid bacteria in white brined production. *Mljekarstvo*, **61** (1), 15-25.
213. Radulović, Z., Petrović, T., Paunović, D., Mirković, N., Obradović, D. (2008): Karakterizacija autohtonog soja *Lactobacillus paracasei* 08 na potencijalne probiotske sposobnosti. *Preh. ind.* **19**, 23-27.
214. Radulović, Z., Petrović, T., Nedović, V., Dimitrijević, S., Mirković, N., Petrušić, D., Paunović, D. (2010). Characterization of autochthonous *Lactobacillus paracasei* strains on potential probiotic ability. *Mljekarstvo*, **60** (2), 86-93.
215. Radulović, Z., Petrušić, M. (2011): *Mikrobiološke metode analiza hrane*. Praktikum. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu.
216. Raso, J., Gongora, M. M., Calderon, M. L., Barbosa-Cánovas, G. V., Swanson, B. G. (1999): Resistant micro-organisms to high intensity pulsed electric field pasteurization of raw skim milk. *IFT annual meeting technical program*. Chicago, Illinois: Institute of Food Technologists.
217. Ray, B., Speck, M. L. (1973): Freeze injury in bacteria. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, **4**, 161-213.
218. Reina, L. D., Jin, Z. T., Zhang, Q. H., Yousef, A. E. (1998): Inactivation of *Listeria monocytogenes* in milk by pulsed electric field. *J. Food Protect.*, **61**, 1203-1206.
219. Rhee, K.S., Ziprin, Y.A., Ordonez, G. (1987): Catalysis of lipid oxidation in raw and cooked beef by metmyoglobin-hydrogen peroxide, non heme iron and enzyme system. *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 1013.
220. Riva, M., Fessas, D., Schiraldi, A. (2001): Isothermal calorimetry approach to evaluate shelf life of foods. *Thermochimica Acta*, **370**, 73-81.

221. Rocculi, P., Gómez Galindo, F., Mendoza, F., Wadsö, L., Romani, S., Dalla Rosa, M., Sjöholm, I. (2007). Effects of the application of anti-browning substances on the metabolic activity and sugar composition of fresh-cut potatoes. *Postharvest Biology and Technology*, **43**, 151-157.
222. Rogers, H. J. (1970): Bacterial growth and the cell envelope. *Bacteriol. Rev.* **34**, 194–201.
223. Russell, J.B., Diez-Gonzalez, F. (1998): The effects of fermentation acids on bacterial growth. *Adv. Microbial. Physiol.*, **39**, 205–234.
224. Saboya, V. L., Goudédranche, H., Maubois, J.L., Lerayer, A. L. S., Lortal, S. (2001): Impact of broken cells of lactococci or propionibacteria on the ripening of Saint-Paulin UF-cheeses: extent of proteolysis and GC-MS profiles. *Le lait*, **81**, 699–713.
225. Sale, A.J.H., Hamilton, W.A. (1967): Effects of high electric fields on microorganisms. I. Killing of bacteria and yeasts, *Biochimica et Biophysica Acta* **148**, 781–788.
226. Sale, A.J.H., Hamilton, W.A. (1968): Effects of high electric fields on micro-organisms. III. Lysis of erythrocytes and protoplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* **163**, 37–43.
227. Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., Vos de, W.M., Fonde'n, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E., Sandholm, T.M. (1998): Demonstration of safety of probiotics – a review. *International Journal of Food Microbiology*, **44**, 93-106.
228. Sampedro, F., Rodrigo, M., Martinez, A., Rodrigo, D., Barbosa-Canovas, G.V. (2005): Quality and Safety Aspects of PEF Application in Milk and Milk Products. *Critical Reviews in Food Sci. & Nutr.*, **45**, 25-47.
229. Sanders, M.E. (2000): Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *J. Nutri.* **130**, 384S-390S.
230. Saulis, G. (1993): Cell electroporation. Part 3. Theoretical investigation of the appearance of assymetric distribution of pores. *Biochem. Bioenerg.*, **32**, 249-265.
231. Saulis, G. (1999): Cell electroporation: estimation of the number of pores and their sizes, *Biomed. Sci. Instrum.* **35**, 291–296.
232. Saulis, G. (2010): Electroporation of cell membranes: The fundamental effects of pulsed electric fields in food processing. *Food Eng. Rev.*, **2**, 52-73.
233. Saulis, G., Pranevičiūtė, R. (2005): Determination of cell electroporation in small-volume samples by using a mini potassium-selective electrode. *Anal. Biochem.*, **345**, 340-342.
234. Saulis G, Wouters PC (2007): Probable mechanism of microorganism inactivation by pulsed electric fields. In: *Food preservation by pulsed electric fields: from research to application*. Eds: Lelieveld HLM, Notermans S, De Haan SWH, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 138–155.
235. Saulis, G., Šatkauskas, S., Pranevičiūtė, R. (2007): Determination of cell electroporation from the release of intracellular potassium ions. *Analytical Biochem.*, **360**, 273-281.
236. Schoenbach, K.H., Peterkin, F.E., Alden, R.W., Beebe, S.J. (1997): The Effect of Pulsed Electric Fields on Biological Cells: Experiments and Applications. *IEEE Transactions on Plasma Sci.*, **25** (2), 284-292.
237. Selma, M. V., MacNaughtan, W., Mitchell, J., Waites, W. (2007): Optimisation of production and storage stability of the starter bacteria *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus plantarum*. *J. Sci. Food Agric.*, **87**, 765–772.
238. Sepulveda, D.D., Góngora-Nieto, M.M., Guerrero, J.A., Barbosa-Cánovas, G.V. (2005): Production of extended shelf-life milk by processing pasteurized milk with pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, **67**, 81-86.
239. Sepulveda, D.R., Gongora-Nieto, M.M., Guerrero, J.A., Barbosa-Canovas, G.V. (2009): Shelf life of whole milk processed by pulsed electric fields in combination with PEF-generated heat. *LWT-Food Sci. & Tech.*, **42**, 735-739.

240. Sepúlveda-Ahumada, D.R., Ortega-Rivas, E., Barbosa-Cánovas, G.V. (2000): Quality Aspects of Cheddar Cheese Obtained with Milk Pasteurized by Pulsed Electric Fields. *Institution of Chem. Engineers*, **78**, part C: 65-71.
241. Shelef, L. A. (1994): Antimicrobial effects of lactates, a review. *J. Food Protection*, **57**, 445–450.
242. Shockman, G. D., Höltje, J.V. (1994): Microbial peptidoglycan (murein) hydrolases. In *Bacterial Cell Wall*, pp. 131-166. Edited by J.M. Ghuyssen & R. Hakenbeck. Amsterdam: Elsevier.
243. Simpson, R.K., Whittington, R., Earnshaw, R.G., Russel, N.J. (1999): Pulsed high electric field causes 'all or nothing' membrane damage in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*, but membrane H⁺-ATPase is not a primary target. *International Journal of Food Microbiology*, **48**, 1 – 10.
244. Smith, T. J., Blackman, S. A., Foster, S. J. (2000). Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiology*, **146**, 249–262.
245. Sousa, M. J., Ardö, Y., McSweeney, P. L. H. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, **11** (4–7), 327–345.
246. Spoering, A.L., Lewis, K. (2001): Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J. Bacteriol.* **183**, 6746-6751.
247. Steen, A., Buist, G., Horsburgh, G.J., Venema, G., Kuipers, O.P., Foster, S.J., Kok, J. (2005): AcmA of *Lactococcus lactis* is an N-acetylglucosamidase with an optimal. *FEBS J.* **272**, 2854-2868.
248. Stepaniak, L. (2004): Dairy enzymology. *Int. J. Dairy Tech.*, **57** (2/3), 153-171.
249. Tamime, A., Božanić, R., Rogelj, I. (2003): Probiotic fermented dairy products. *Mljekarstvo* **53** (2), 111-134.
250. Tamime, A. Y., Robinson, R.K. (1985): "Yoghurt, science and technology." Pergamon Press, Oxford, UK.
251. Teissié, J., Rols, M-P. (1993): An Experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electroporation. *Biophys. J.*, **65**, 409-413.
252. Tekle, E., Astumian, R.D., Chock, P.B. (1990): Electroporation of cell membranes: Effect of the resting membrane potential. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **172** (1), 282-287.
253. Tekle, E., Astumian, R.D., Chock, P.B. (1994): Selective and asymmetric molecular transport across electroporated cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**, 11512-11516.
254. Thiboutot, H., Dako, E., El Soda, M., Vuilleumard, J. C., Power, N., Simard, R. E. (1995): Influence of heat- and freeze-shocking on the autolysis and peptidase activities of *Lactobacillus casei*. *Milchwissenschaft*, **50**, 448-452.
255. Tien, H. T. (1974): *Bilayer Lipid Membranes (BLM): Theory and Practice*. Marcel Dekker, Inc., New York., 655.
256. Tomlins, R.I., Ordal, Z.J. (1976): Thermal injury and inactivation in vegetative bacteria. In: Skinner, F.A., Hugo, W.B. (Eds.), *Inhibition and Inactivation of Vegetative Microbes*, Academic Press, London, 153–191.
257. Tsong, T. Y. (1990): Review on electroporation of cell membranes and some related phenomena. *Biochem. Bioenerg.*, **24**, 271.
258. Tsong, T.Y. (1991): Minireview: Electroporation of cell membranes. *Biophys. J.*, **60**, 297-306.
259. Turi, M., Turi, E., Koljalg, S., Mikelsaar, M. (1997): Influence of aqueous extracts of medicinal plants on surface hydrophobicity of *Escherichia coli* strains of different origin. *APMIS*, **105**, 956-962.
260. Ulmer, H.M., Heinz, V., Gänzle, M.G., Knorr, D., Vogel, R.F. (2002): Effects of pulsed electric fields on inactivation and metabolic activity of *Lactobacillus plantarum* in model beer. *J. App. Micr.* **93**, 326-335.

261. Upadhyay, V.K., McSweeney, P.L.H., Magboul, A.A.A., Fox, P.F. (2004): Proteolysis in cheese during ripening. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1: General Aspects, 3rd edition*, Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), Elsevier, London, 391-434.
262. Urbach, G. (1995): Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. *Int. Dairy J.*, **5**, 877-903.
263. Valence, F., Deutsch, S.-M., Richoux, R., Gagnaire, V., Lortal, S. (2000): Autolysis and related proteolysis in Swiss cheese for two *Lactobacillus helveticus* strains. *Journal of Dairy Research*, **67**, 261-271.
264. Valence, F., Lortal, S. (1995): Zymogram and preliminary characterization of *Lactobacillus helveticus* autolysins. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 3391-3399.
265. Valence, F., Richoux, R., Thierry, A., Palva, A., Lortal, S. (1998): Autolysis of *Lactobacillus helveticus* and *Propionibacterium freundenreichii* in Swiss cheese: First evidence by using species specific markers. *Journal of Dairy Research*, **65**, 609-620.
266. Varma, A., Palsson, B.O. (1994): Metabolic flux balancing: basic concepts, scientific and practical use. *Biotechnology* **12**, 994-998.
267. Vega-Mercado, H. (1996): Inactivation of *Escherichia coli* by combining pH, ionic strength and pulsed electric fields. *Food Res. Intl.*, **29** (2), 117.
268. Visser, S. (1993): Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview. *Journal of Dairy Science*, **76**, 329-350.
269. Wadsö, L. (2005). Applications of an eight-channel isothermal conduction calorimeter for cement hydration studies. *Cement International*, **5**, 94-101.
270. Wadsö, L., Gómez Galindo, F. (2009). Isothermal calorimetry for biological applications in food science and technology. *Food Control*, **20**, 956-961.
271. Wan, J., Coventry, J., Swiergon, P., Sanguansri, P., Versteeg, C (2009): Advances in innovative processing technologies for microbial inactivation and enhancement of food safety - pulsed electric field and low-temperature plasma. *Trends in Food Sci. & Tech.* **20**, 414-424.
272. Wang, H-Y., Lu, C. (2006): Electroporation of mammalian cells in a microfluidic channel with geometric variation. *Anal. Chem.*, **78**, 5158-5164.
273. Ward, J.B., Williamson, R. (1984): Bacterial autolysins: specificity and function. In: *Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis*, Nombela, C. (Ed.), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Netherlands, 159-166.
274. Waeber, J.C. (2000): Electroporation of cells and tissues. *IEEE Transactions on Plasma Sci.*, **28** (1), 24-33.
275. Weaver, J. C., Barnett, A. (1992): Progress Toward a Theoretical Model of Electroporation Mechanism: Membrane Electrical Behavior and Molecular Transport. In "Guide to electroporation and electrofusion," New York: Academic Press, 91-117.
276. Weaver, J.C., Chizmadzhev, Y.A. (1996): Theory of electroporation: a review, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **41** (1), 135-160.
277. Wiederholt, K. M., Steele, J. L. (1993): Prophage curing and partial characterization of temperate bacteriophages from thermolytic strains of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *J. Dairy Sci.* **76**, 921-930.
278. Williams A.G., Banks J.M. (1997): Proteolytic and other hydrolytic enzyme activities in nonstarter lactic acid bacteria (NSLAB) isolated from Cheddar cheese manufactured in the United Kingdom. *Int. Dairy J.* **7**, 763-774.
279. Wilkinson, M. G., Guinee, T. P., O'Callaghan, D. M., Fox, P. F. (1994): Autolysis and proteolysis in different strains of starter bacteria during Cheddar cheese ripening. *Journal of Dairy Research*, **61**, 249-262.

280. Wilkinson, M. G., Guinee, T. P., O' Callaghan, D. M., Fox, P. F. (1995). Effect of cooking temperature on the autolysis of starter, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2, and the maturation of Cheddar cheese. *Milchwissenschaft*, **50**, 376–380.
281. Wilkinson, M. G., Kicawley, K.N. (2005): Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. *International Dairy Journal*, **15**, 817–830.
282. Withell, E.R. (1942): The significance of variation in the shape of time-survivor curves. *J. Hyg.* **42**, 124-132.
283. Wouters, P.C., Alvarez, I., Raso, J. (2001a). Critical factors determining inactivation kinetics by pulsed electric field food processing, *Trends in Food Science & Technology* **12** (3), 112–121.
284. Wouters, P. C., Bos, A. P., Ueckert, J. (2001b): Membrane permeabilization in relation to inactivation kinetics of *Lactobacillus* species due to pulsed electric fields. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67** (7), 3092-3101.
285. Yvon, M., Berthelot, S., Gripon, J. C. (1998): Adding α -ketoglutarate to semi-hard cheese curd highly enhances the conversion of amino acids to aroma compounds. *International Dairy Journal*, **8**, 889–898.
286. Yvon, M., Rijnen, L. (2001): Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal*, **11**, 185–201.
287. Zhang, Q., Qin, B. L., Barbosa-Cfmozas, G. V., Swanson, B. G. (1995): Inactivation of *E. coli* for food pasteurization by high-strength pulsed electric fields. *J. Food Proc. Pres.* **19**, 103-118.
288. Zimmermann, U., Schulz, J., Pilwat, G. (1973): Transcellular ion in *Escherichia coli* B and electrical sizing of bacteria. *Biophys. J.* **13**, 1005-1013.
289. Zimmermann, U., Pilwat, G., Riemann, F. (1974): Dielectric breakdown of cell membranes. *Biophysical Journal*, **14**, 881-899.
290. Zimmermann, U., Pilwat, G., Beckers, F., Riemann, F. (1976): Effect of external electrical fields on cell membranes. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **3**, 58-83.

PRILOG

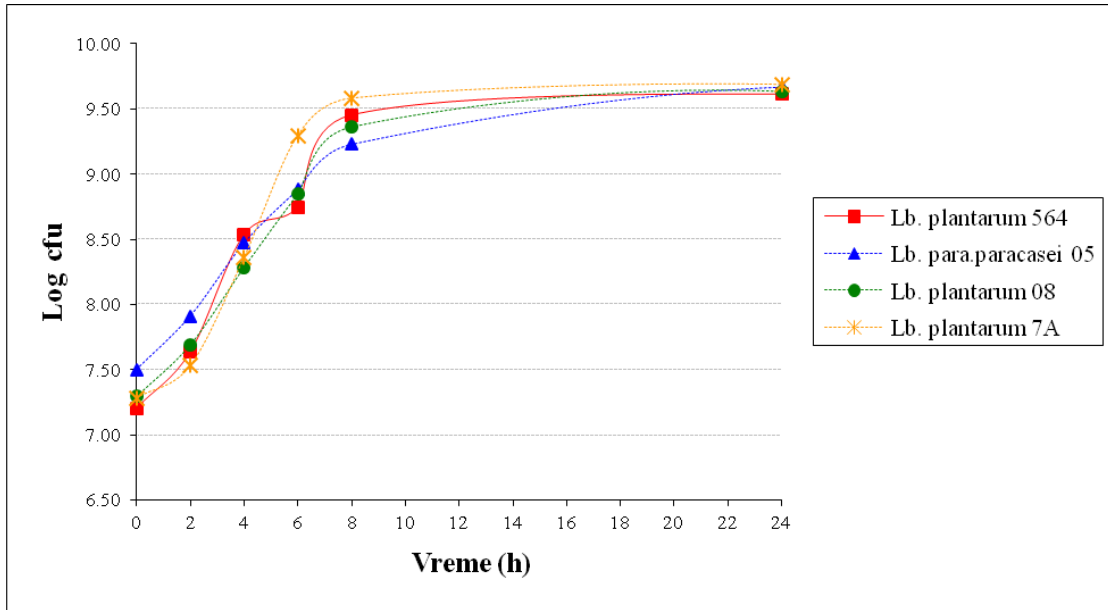
Tabela P1. Sastav MRS podloge

Supstanca	Količina
pepton	10 g
mesni ekstrakt (‘Lab-Lemco’ prah)	8 g
kvašćev ekstrakt	4 g
glukoza	20 g
sorbitan mono-oleat	1 ml
dikalijum hidrofosfat (K ₂ HPO ₄)	2 g
natrijum acetat-trihidrat	5 g
tri-amonijumcitrat	2 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	200 mg
MnSO ₄ x 4H ₂ O	5 mg
agar	10 g
destilovana voda	do 1000 ml

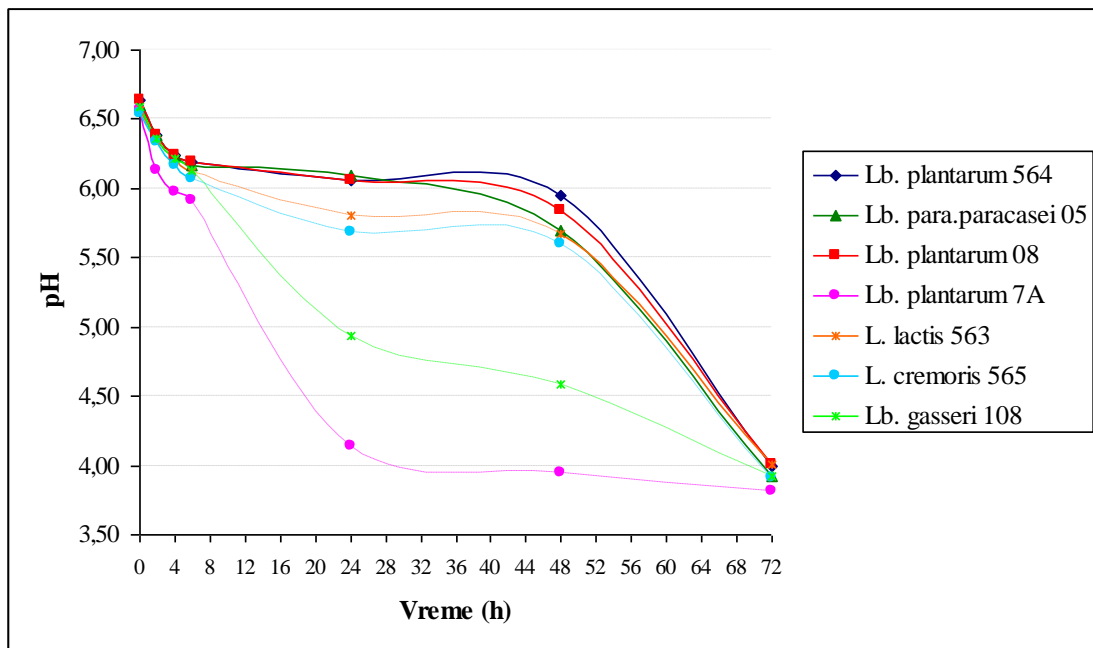
Tabela P2. Acidifikaciona aktivnost PEP tretiranih bakterija u toku inkubacije na 37°C u MRS bujonu

PEP tretman *	pH MRS bujona u toku inkubacije (n =4)		
	2h	4h	6h
O	5.90 ± 0.03 ^a	5.75 ± 0.02 ^b	5.18 ± 0.07 ^c
A ₁	5.90 ± 0.01 ^a	5.69 ± 0.02 ^b	5.07 ± 0.08 ^d
A ₂	5.89 ± 0.02 ^a	5.73 ± 0.05 ^b	5.05 ± 0.07 ^d
A ₃	5.90 ± 0.01 ^a	5.74 ± 0.02 ^b	5.09 ± 0.04 ^d

* O – kontrolni (netretirani) uzorak; A₁, A₂ i A₃ – uzorci tretirani PEP tretmanima primenjene energije od 1.3, 5.5 i 12.2 J/cm³ respektivno; ± standardna devijacija; n – broj uzoraka; statistička značajnost uzoraka (p<0.05) prikazana je malim slovima u indeksu



Grafik P1. Kriva rasta laktobacila



Grafik P2 Acidifikaciona sposobnost BMK u ROM

BIOGRAFIJA AUTORA

Mr *Sanja V. Seratlić* rođena je 4.2.1974. u Beogradu. Osnovne studije iz prehrambene tehnologije završila je na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu 1998. godine sa prosečnom ocenom 8.53 i ocenom 10 na diplomskom radu, čime je stekla zvanje diplomiranog inženjera prehrambene tehnologije animalnih proizvoda. Na istom fakultetu je odbranila magistarski rad 2007. godine iz oblasti prehrambeno-tehnoloških nauka i time stekla zvanje magistra biotehničkih nauka.

Mr *Sanja V. Seratlić* je do sada, samostalno i u saradnji sa drugim autorima, objavila i saopštila ukupno 31 naučni rad i jedan novi tehnološki postupak.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Саша Сегачић
број индекса _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај пулсирајућих електричних поља на раст и
дегенерацију аутоклетског система Cochleara glutinosa DE?

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, 9.7.2013.

Потпис докторанда

Sasha Segacic

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Саша Серафим
Број индекса _____
Студијски програм _____

Наслов рада Улога публицитетних медијских порта на раст и перформансе ауторских
Ментор проф. др Бранко Бугарски Саша Серафим

Потписани/а Саша Серафим

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 9.7.2013.

Саша Серафим

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Утицај дигиталних дисертацијских поља на раст и
активност ауторског рада /напомена рачуна 564
која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 7.7. 2013.



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.