

ZAKLJUČNO POROČILO
O REZULTATIH OPRAVLJENEGA RAZISKOVALNEGA DELA
NA PROJEKTU V OKVIRU CILJNEGA RAZISKOVALNEGA
PROGRAMA (CRP) »KONKURENČNOST SLOVENIJE 2006 – 2013«

I. Predstavitev osnovnih podatkov raziskovalnega projekta

1. Naziv težišča v okviru CRP:

5.4.2. - Veterinarske in fito sanitarne raziskave v podporo pridelavi varne hrane

2. Šifra projekta:

V4-0522

3. Naslov projekta:

Protimikrobni nanonanosi pri varni predelavi hrane

3. Naslov projekta

3.1. Naslov projekta v slovenskem jeziku:

Protimikrobni nanonanosi pri varni predelavi hrane

3.2. Naslov projekta v angleškem jeziku:

Antibacterial Nano-coatings for Safe Food Processing

4. Ključne besede projekta

4.1. Ključne besede projekta v slovenskem jeziku:

Listeria monocytogenes, titanatne nanocevke, varna hrana, fotokataliza, EPR spektroskopija, protimikrobne površine, spinski lovilci

4.2. Ključne besede projekta v angleškem jeziku:

Listeria monocytogenes, titanate nanotubes, food safety, photocatalysis, EPR spectroscopy, antimicrobial surfaces, spin traps

5. Naziv nosilne raziskovalne organizacije:

Institut "Jožef Stefan"

5.1. Seznam sodelujočih raziskovalnih organizacij (RO):

Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta

6. Sofinancer/sofinancerji:

MKGP

7. Šifra ter ime in priimek vodje projekta:

18273

Janez Štrancar

Datum: 15.9.2010

Podpis vodje projekta:

doc. dr. Janez Štrancar

Podpis in žig izvajalca:

prof. dr. Jadran Lenarčič, direktor

II. Vsebinska struktura zaključnega poročila o rezultatih raziskovalnega projekta v okviru CRP

1. Cilji projekta:

1.1. Ali so bili cilji projekta doseženi?

- a) v celoti
 b) delno
 c) ne

Če b) in c), je potrebna utemeljitev.

1.2. Ali so se cilji projekta med raziskavo spremenili?

- a) da
 b) ne

Če so se, je potrebna utemeljitev:

2. Vsebinsko poročilo o realizaciji predloženega programa dela¹:

Kontaminacija mesa in mesnih proizvodov je eden izmed najpomembnejših zdravstvenih in ekonomskih problemov mesne industrije. Do kontaminacije lahko pride na različnih mestih klavne linije, skladiščenja v hladilnicah in pri predelavi ter distribuciji mesa. Razlogi so lahko neučinkoviti ali celo nedosledni postopki čiščenja in dezinfekcije ter obstojnost bakterijskega biofilma na površinah. Uporaba premazov z dolgotrajnim biocidnim učinkom oziroma razvoj površin, ki preprečujejo rast in razmnoževanje bakterij že pri nizkih koncentracijah, bi tako predstavljala rešitev problema kontaminacije z bakterijami iz rodu *Listeria* in drugimi mikroorganizmi.

Titanatni nanomateriali v procesih fotokatalize generirajo kratkožive proste radikale, ki vplivajo na bakterijske membrane ali pa direktno na bakterijsko dihalno verigo in zato preprečujejo rast bakterij. Ker so takšni materiali bili prvič sintetizirani šele pred komaj nekaj leti (Kasuga T, Hiramatsu M, Hoson A in Sekino T, Adv. Mat. 11 (1999), 1307), se teh v živilski industriji zaenkrat še ne uporablja. Zaradi velike specifične površine in njihovih fizikalnih lastnosti smo postavili raziskovalno hipotezo, da se enodeimenzionalni titanatni nanodelci (nanocevkke) lahko pod določenimi pogoji močno sprijemajo s površinami, kar je lahko podlaga za zagotavljanje obstojnosti in varne uporabe v procesu vzdrževanja higiensko neoporečnih površin v živilski industriji.

Na podlagi zastavljene raziskovalne hipoteze smo postavili več raziskovalnih ciljev oziroma rezultatov, ki smo jih predstavili na več znanstvenih konferencah oziroma so bili objavljeni v znanstvenih člankih:

R.1) Sintezirali bomo titanatne nanostrukture z dobrimi adhezivnimi lastnostmi in znatnim protimikrobnim delovanjem na osnovi fotokatalitičnega delovanja;

R.2.) Določili bomo protimikrobno delovanje titanatnih nanomaterialov na bakterije iz rodu *Listeria* in na vse prisotne mikroorganizme;

R.3) Na osnovi bioloških testov bodo izbrani titanatni nanomateriali, ki imajo največji možen učinek na zaviranje rasti mikrobov in so primerni za nanos na površine;

R.4) Določili bomo dolgotrajni protimikrobni in samočistilni učinek titanatnih nanomaterialov na površinah ob različnih pogojih pH, temperature, vlažnosti in vsebnosti Na⁺;

R.5) Predlagana bo vsaj ena rešitev nanosa titanatnih nanostruktur na površine za varno uporabo v predelavi hrane;

R.6) Predlagali bomo možnosti za učinkovitejše ukrepe pri predelavi varne hrane brez ali s souporabo klasičnih biocidov in protimikrobnih površin s titanatnimi nanomateriali.

Učinek protimikrobnega delovanja različnih nanomaterialov smo merili v testnih in realnih pogojih na bakterijskih kulturah, na testnih progah v laboratoriju ter v realnih pogojih – v mesno predelovalni industriji. Učinek fotokatalize smo optimizirali z merjenjem kratkoživih radikalov s pomočjo EPR spektroskopije in tehnike spinskega lovljenja v laboratoriju. Za doseganje omenjenih ciljev so preučili mehanizem protimikrobnega delovanja na površinah in njihovih vplivov na zaviranje rasti bakterij in preverili adhezivne lastnosti najučinkovitejših titanatnih nanomaterialov. Sintetizirali smo več titanatnih nanomaterialov z različnimi dopanti (baker, srebro, cink, cerij, natrij). Določili smo optimalne sintezne pogoje za rast titanatnih nanostruktur: Izhodni vzorec je

¹ Potrebno je napisati vsebinsko raziskovalno poročilo, kjer mora biti na kratko predstavljen program dela z raziskovalno hipotezo in metodološko-teoretičen opis raziskovanja pri njenem preverjanju ali zavračanju vključno s pridobljenimi rezultati projekta.

bil pripravljen iz anatazne (325) oblike TiO_2 in 10 M NaOH pri $T = 135\text{ }^\circ\text{C}$, 3 dni pod hidrotermalnimi pogoji. Vzorec je bil enotne morfologije, izkoristek reakcije je bil visok (vizualna ocena). S spiranjem izhodnega vzorca v 0.1 M HCl smo ione Na izmenjali s protoni. V nadaljevanju smo protonirano obliko titanatnih nanocevk (400 mg, HTiNC) dispergirali v 0.0005 M raztopino Cu^{2+} (100 ml, vir Cu^{2+} je $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) s pomočjo ultrazvočne kopeli. Izolirani material smo na koncu žgali na zraku na $400\text{ }^\circ\text{C}$, 10h (dosegli cilj R.1).

Z metodo spinskega lovljenja smo testirali fotokatalitične lastnosti novo sintetiziranih materialov z različno vsebnostjo Na ter različnimi vsebnostmi dopantov. Ugotovili smo, da bolj kot vsebnost Na, vpliva na učinkovitost generiranja hidroksilnih radikalov vsebnost dopantov. V skladu s podatki v literaturi smo ugotovili, da so titanatni nanomateriali z nizko vsebnostjo bakra najobetavnejši. Najučinkovitejše nanomaterialne smo karakterizirali s pomočjo EDS analize ter SEM mikroskopije. Prav tako smo pokazali, da imajo najučinkovitejši titanatni naomateriali z zelo majhnim dodatkom bakra fotokatalitične lastnosti, kadar so osvetljeni z UV svetlobo oziroma z valovnimi dolžinami pod 400 nanometrov, kar pomeni, da delujejo protimikrobno tudi pod navadnimi fluorescentnimi žarnicami. Optimizirali smo sistem za primarno testiranje protimikrobnega efekta v laboratorijskih pogojih preko fotogeneracije prostih radikalov z EPR spektroskopijo in spinskimi lovilci, tako da merimo primarne hidroksilne radikale v prisotnosti 30% etanola.

Protimikrobno učinkovitost nano materialov smo v laboratoriju ugotavljali po nanosu na površine različnih materialov (steklo in polietilen) in ugotavljali redukcijo preživetja bakterij. Kot indikatorski mikroorganizem smo uporabili bakterijo *Listeria innocua*, ki je po osnovnih lastnostih enaka kot *Listeria monocytogenes*, vendar je nepatogena in zato varna za delo v laboratoriju. Kulturo *Listeria innocua* smo pripravljali na tekočem gojišču, kjer po 24 urah inkubacije dosežemo koncentracijo približno 10^9 bakterijskih celic v 1 ml gojišča. Na površino testnih in kontrolnih materialov smo nanašali po 10 μ l suspenzije (10^7 bakterij) in jih izpostavili svetlobnemu sevanju. Poskuse smo ponavljali v različnih svetlobnih pogojih, od popolne teme, fluorescentne svetlobe in uporabe sevanja različnih znanih valovnih dolžin. Preživele celice smo prešteli po postopku ugotavljanja CFU (colony forming unit). Praktični del poskusa je bil opravljen v klavnici. Za testne nosilce smo uporabili polietilen (PET 500) premazan s kulturo *Listeria innocua*. Testne nosilce smo izpostavili različnim pogojem ob klavni liniji in v hladilnici. Ti so se razlikovali v vlažnosti zraka, vsebnosti aerosola v zraku, temperaturi zraka, UV sevanja in jakosti obstoječih neonskih svetilnih teles. Vzorce v horizontalni in vertikalni legi smo izpostavili različnim pogojem na različne nivoje prostorov. Ugotovili smo statistično značilne razlike ($P < 0,05$) med kontrolnimi in testnimi nosilci s stopnjo znižanja *Listeria innocua* do 92,24%. Rezultati nakazujejo na praktično uporabnost PET 500 površin, na katere so nanešeni titanatni nanodelci, v živilsko-predelovalni industriji, saj smo v raziskavi ugotovili vsaj 90% znižanje števila bakterije kot je *Listeria innocua*, kar je praktično v skladu z zahtevanimi standardi za uspešno dezinfekcijo (znižanje CFU pod 10^5). S tem lahko potencialno zagotovimo permanentno biovarnost pri proizvodnji surovega mesa, kar zagotavlja varnost potrošnika in možnost za znižanje obremenjevanja okolja s kemikalijami, ker se s to obliko dezinfekcije ne spira kemičnih dezinficijensov v okolje. Z metodo konfokalne mikrospektroskopije smo pokazali, da titanatni nanomateriali prehajajo preko plasma membrane epitelijskih celičnih kultur Bend3 in MdckII in zmanjšajo preživetje celic po 24 urni inkubaciji celic s titanatnimi nanomateriali, vendar

le kadar je uporabljena koncentracija nanomaterialov precej visoka (12 mikro g/ml). Zato sklepamo, da so ti materiali potencialno uporabni v mesno predelovalni industriji, kadar je dosežen stabilen nanos materialov na površine (dosežena cilja R.2 in R.3).

Pod različnimi pogoji spiranja več različnih površin (steklo, nerjaveče jeklo in polietilen), ki so zanimive za uporabo v mesno predelovalni industriji, smo pokazali, da na polietilenskih površinah ostane po nekajkratnem spiranju dovolj nanomateriala z dodatkom bakra z znatno fotokatalitično in bakteriocidno aktivnostjo (dosežen cilj R.4).

Na podlagi zbranih eksperimentalnih rezultatov smo določili, da so titanatni, enodimenzionalni nanomateriali dopirani z bakrom, nanešeni na polietilenske površine primerni za zagotavljanje dolgotrajnejše protimikrobne zaščite površin, saj majhna količina materiala ostane absorbirana na polietilen tudi po večkratnem agresivnem pranju v bazičnem pH, glede na testiranje na celicah pa je količina material potrebna za citotoksičen učinek precej visoka – nad 10 mikrogramov na mililiter (dosežen cilj R.5).

Predlagali smo možnost za učinkovitejše ukrepe pri predelavi varne hrane s souporabo manjših količin klasičnih biocidov in protimikrobnih polietilenskih površin z nanešenimi titanatnimi nanomateriali dopiranimi z bakrom (dosežen cilj R.6).

3. Izkoriščanje dobljenih rezultatov:

3.1. Kakšen je potencialni pomen² rezultatov vašega raziskovalnega projekta za:

- a) odkritje novih znanstvenih spoznanj;
- b) izpopolnitev oziroma razširitev metodološkega instrumentarija;
- c) razvoj svojega temeljnega raziskovanja;
- d) razvoj drugih temeljnih znanosti;
- e) razvoj novih tehnologij in drugih razvojnih raziskav.

3.2. Označite s katerimi družbeno-ekonomskimi cilji (po metodologiji OECD-ja) sovpadajo rezultati vašega raziskovalnega projekta:

- a) razvoj kmetijstva, gozdarstva in ribolova - Vključuje RR, ki je v osnovi namenjen razvoju in podpori teh dejavnosti;
- b) pospeševanje industrijskega razvoja - vključuje RR, ki v osnovi podpira razvoj industrije, vključno s proizvodnjo, gradbeništvo, prodajo na debelo in drobno, restavracijami in hoteli, bančništvom, zavarovalnicami in drugimi gospodarskimi dejavnostmi;
- c) proizvodnja in racionalna izraba energije - vključuje RR-dejavnosti, ki so v funkciji dobave, proizvodnje, hranjenja in distribucije vseh oblik energije. V to skupino je treba vključiti tudi RR vodnih virov in nuklearne energije;
- d) razvoj infrastrukture - Ta skupina vključuje dve podskupini:
 - transport in telekomunikacije - Vključen je RR, ki je usmerjen v izboljšavo in povečanje varnosti prometnih sistemov, vključno z varnostjo v prometu;
 - prostorsko planiranje mest in podeželja - Vključen je RR, ki se nanaša na skupno načrtovanje mest in podeželja, boljše pogoje bivanja in izboljšave v okolju;
- e) nadzor in skrb za okolje - Vključuje RR, ki je usmerjen v ohranjanje fizičnega okolja. Zajema onesnaževanje zraka, voda, zemlje in spodnjih slojev, onesnaženje zaradi hrupa, odlaganja trdnih odpadkov in sevanja. Razdeljen je v dve skupini:
- f) zdravstveno varstvo (z izjemo onesnaževanja) - Vključuje RR - programe, ki so usmerjeni v varstvo in izboljšanje človekovega zdravja;
- g) družbeni razvoj in storitve - Vključuje RR, ki se nanaša na družbene in kulturne probleme;
- h) splošni napredek znanja - Ta skupina zajema RR, ki prispeva k splošnemu napredku znanja in ga ne moremo pripisati določenim ciljem;
- i) obramba - Vključuje RR, ki se v osnovi izvaja v vojaške namene, ne glede na njegovo vsebino, ali na možnost posredne civilne uporabe. Vključuje tudi varstvo (obrambo) pred naravnimi nesrečami.

² Označite lahko več odgovorov.

3.3. Kateri so **neposredni rezultati** vašega raziskovalnega projekta glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

Določitev primernih površin (polietilen) z učinkovitimi protimikrobnimi nanomateriali ima neposreden vpliv na razvoj uporabe takšnih površin v mesno predelovalnih objektih, kar bi lahko pripeljalo do varnejše predelave hrane animalnega porekla.

3.4. Kakšni so lahko **dolgoročni rezultati** vašega raziskovalnega projekta glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

Z morebitnim kasnejšim razvojem stabilnih protimikrobnih nanosov in preučitvijo vpliva nanomaterialov na zdravje človeka bi lahko zmanjšali uporabo klasičnih biocidov in njihov bremenilni vpliv na okolje. Z nadaljnjim razvojem stabilnih protimikrobnih nanosov tudi na drugih površinah (steklo, nerjaveče jeklo) bi lahko dolgoročno zmanjšali nevarnost okužbe človeka in smrtnost zaradi okužbe z *Listerio monocytogenes*.

3.5. Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- a) v domačih znanstvenih krogih;
- b) v mednarodnih znanstvenih krogih;
- c) pri domačih uporabnikih;
- d) pri mednarodnih uporabnikih.

3.6. Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?

zanimanje so izkazali investitorji tveganega kapitala v Sloveniji, kot tudi iz tujine.

3.7. Število diplomantov, magistrrov in doktorjev, ki so zaključili študij z vključenostjo v raziskovalni projekt?

1 doktor znanosti

4. Sodelovanje z tujimi partnerji:

4.1. Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujimi raziskovalnimi institucijami.

0

4.2. Kakšni so rezultati tovrstnega sodelovanja?

-

5. Bibliografski rezultati³ :

Za vodjo projekta in ostale raziskovalce v projektni skupini priložite bibliografske izpise za obdobje zadnjih treh let iz COBISS-a) oz. za medicinske vede iz Inštituta za biomedicinsko informatiko. Na bibliografskih izpisih označite tista dela, ki so nastala v okviru pričujočega projekta.

6. Druge reference⁴ vodje projekta in ostalih raziskovalcev, ki izhajajo iz raziskovalnega projekta:

Nagrada "Inovativnost za gospodarstvo", podeljena doc. dr. Janezu Štrancarju v okviru druge konference "Technology transfer Conference", v Ljubljani, 1. do 2. oktober, 2009.

³ Bibliografijo raziskovalcev si lahko natisnete sami iz spletne strani:<http://www.izum.si/>

⁴ Navedite tudi druge raziskovalne rezultate iz obdobja financiranja vašega projekta, ki niso zajeti v bibliografske izpise, zlasti pa tiste, ki se nanašajo na prenos znanja in tehnologije.

Navedite tudi podatke o vseh javnih in drugih predstavitev projekta in njegovih rezultatov vključno s predstavitvami, ki so bile organizirane izključno za naročnika/naročnike projekta.