Antifungalni učinak eteričnih ulja Cinnamomum cassia i Litsea cubeba na odabrane plijesni roda Penicillium pri aw 0,98 i 0,93

Kovačević, Jelena

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:835396

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Jelena Kovačević

ANTIFUNGALNI UČINAK ETERIČNIH ULJA *Cinnamomum cassia* I *Litsea cubeba* NA ODABRANE PLIJESNI RODA *Penicillium* PRI a_w 0,98 I 0,93

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za ispitivanje hrane i prehrane
Katedra za biologiju i mikrobiologiju
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Mikrobiologija hrane
Tema rada je prihvaćena na IX. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 28. lipnja 2016.
Mentor: izv. prof. dr. sc. *Hrvoje Pavlović*
Pomoć pri izradi: dipl. ing. *Vedran Gradvol*

ANTIFUNGALNI UČINAK ETERIČNIH ULJA *Cinnamomum cassia* I *Litsea cubeba* NA ODABRANE PLIJESNI RODA *Penicillium* PRI a_w 0,98 I 0,93

Jelena Kovačević, 25/DI

Sažetak:
Većina hrane i stočne hrane podliježe mikrobiološkoj kontaminaciji tijekom pripreme, skladištenja i distribucije. Eterična ulja i njihovi sastojci postaju sve popularniji kao antimikrobna sredstva. Eterična ulja su aromatične uljne tekućine dobivene iz biljaka različitim metodama. Njihov antimikrobni učinak ovisi o sadržaju, koncentraciji i interakcijama među glavnim aktivnim sastojcima, kao i među sastojcima hrane. Zadatak rada bio je istražiti antifungalni učinak eteričnih ulja *Cinnamomum cassia* i *Litsea cubeba* te timola i propil galata na odabrane vrste plijesni: *Penicillium aurantiogriseum, P. brevicompactum* i *P. chrysogenum*. Određena je minimalna inhibitorna (MIK) i minimalna fungicidna (MFK) koncentracija eteričnih ulja. Nadalje, određen je učinak eteričnih ulja u inhibiciji linearnog rasta kolonije plijesni tijekom uzgoja na krumpirovom agaru s glukozom (PDA) pri različitim vrijednostima aktiviteta vode (a_w). Najveći fungicidini učinak pokazalo je ulje *Cinnamomum cassia*, zatim *Litsea cubeba* i timol, dok propil galat nije djelovao inhibitorno na rast plijesni. Veće koncentracije ispitanih eteričnih ulja i sastojaka smanjuju rast svih ispitanih *Penicillium* vrsta. *Cinnamomum cassia* i *Litsea cubeba* produžavaju *lag* fazu pri nižem a_w (0,93), dok timol posjeduje bolji inhibitorni učinak na linearan rast kolonija plijesni kod višeg a_w (0,98).

Ključne riječi: eterična ulja, antifungalni učinak, inhibicija, plijesni, aktivitet vode

Rad sadrži: 72 stranice
43 slike
3 tablice
0 priloga
105 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1.	doc. dr. sc. *Dajana Gašo-Sokač*	predsjednik
2.	izv. prof. dr. sc. *Hrvoje Pavlović*	član-mentor
3.	doc. dr. sc. *Natalija Velić*	član
4.	dr. sc. *Valentina Bušić,* poslijedoktorand	zamjena člana

Datum obrane: 27. rujna 2016.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of food analysis and nutritionist
Subdepartment of biology and microbiology

Scientific area:	Biotechnical sciences
Scientific field:	Food technology
Course title:	Food microbiology
Thesis subject	was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no IXth held on 28th of June 2016.
Mentor:	*Hrvoje Pavlović,* PhD, associate prof.
Technical assistance:	*Vedran Gradvol,* dipl.ing.

ANTIFUNGAL EFFECT OF Cinnamomum cassia AND Litsea cubeba ON SELECTED SPECIES OF Penicillium GENERA AT a_w 0,98 AND 0,93

Jelena Kovačević, 25/DI

Summary:
Most of the food and feed are microbiological contaminated during preparation, storage and distribution. Essential oils and thier components are becoming increasingly popular as naturally occurring antimicrobial agents. Essential oils are aromatic oily liquids obtained from plants by different methods. Their antimicrobial effect depends on composition, concentration and interactions between the main active compounds, as well as food components. The aim of the study was to test the antifungal activity of essential oils of *Cinnamomum cassia* and *Litsea cubeba* and thymol and propyl gallate on selected mold species: *Penicillium aurantiogriseum, P. brevicompactum* and *P. chrysogenum*. Minimal inhibitory (MIC) and minimal fungicidal (MFC) concentrations of essential oils were tested. Furthermore, the effect of essential oils in the inhibition of linear growth of mold colonies during cultivation on potato dextrose agar (PDA) at different values of water activity (a_w) was tested. The most potent antifungal effect showed *Cinnamomum cassia* oil, then *Litsea cubeba* and thymol, while propyl gallate had no antifungal effect on tested species. Higher concentrations of tested essential oils and compounds reduced the growth of all tested *Penicillium* species. *Cinnamomum cassia* and *Litsea cubeba* extend the lag phase at lower a_w value (0,93), while thymol has better inhibitory effect on linear growth of mold colonies at higher a_w value (0,98).

Key words: essential oils, antifungal activity, inhibition, molds, water activity

Thesis contains:
72 pages
43 figures
3 tables
0 supplements
105 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1.	*Dajana Gašo-Sokač*, PhD, assistant prof.	chair person
2.	*Hrvoje Pavlović*, PhD, associate prof.	supervisor
3.	*Natalija Velić*, PhD, assistant prof.	member
4.	*Valentina Bušić*, PhD, postdoctoral researcher	stand-in

Defense date: September 27, 2016.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

SADRŽAJ:

1. UVOD ... 1
2. TEORIJSKI DIO ... 3
2.1. ETERIČNA ULJA ... 4
2.2. MEHANIZAM DJELOVANJA ETERIČNIH ULJA ... 5
2.2.1. Sastojci eteričnih ulja ... 7
2.2.2. Mehanizam djelovanja sastojaka eteričnih ulja ... 8
2.3. SIGURNOST UPORABE ETERIČNIH ULJA I SASTOJAKA ... 12
2.4. PRIMJENA ETERIČNIH ULJA U OBRADI I PROIZVODNJI NAMIRNICA ... 14
2.5. ETERIČNO ULJE *Cinnamomum cassia* ... 17
2.6. ETERIČNO ULJE *Litsea cubeba* ... 19
2.7. TIMOL ... 21
2.8. PROPIL GALAT ... 24
2.9. PLIJESNI ... 25
2.9.1. Značaj plijesni ... 26
2.9.2. Svojstva plijesni ... 27
2.9.3. Opće osobine plijesni *Penicillium aurantiogriseum* ... 31
2.9.4. Opće osobine plijesni *Penicillium brevicompactum* ... 33
2.9.5. Opće osobine plijesni *Penicillium chrysogenum* ... 34
3. EKSPERIMENTALNI DIO ... 37
3.1. ZADATAK ... 38
3.2. MATERIJALI I METODE ... 38
3.2.1. Eterična ulja ... 38
3.2.2. Kulture plijesni ... 38
3.2.3. Određivanje minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne fungicidne (MFK) koncentracije eteričnih ulja i sastojaka ... 39
3.2.4. Inhibicija linearnog rasta kolonije plijesni ... 39
3.3. OBRADA REZULTATA ... 40
4. REZULTATI ... 41
4.1. MINIMALNA INHIBITORNA (MIK) i MINIMALNA FUNGICIDNA (MFK) KONCENTRACIJA ETERIČNIH ULJA, TIMOLA I PROPIL GALATA ... 42
4.2. INHIBICIJA LINEARNOG RASTA KOLONIJA PLIJESNI ETERIČNIM ULJIMA *Cinnamomum cassia* I *Litsea cubeba,* TE TIMOLOM I PROPIL GALATOM ... 43
4.2.1. Inhibicija linearnog rasta kolonija plijesni pri a_w 0,93 ... 43
4.2.2. Inhibicija linearnog rasta kolonija plijesni pri a_w 0,98 ... 49
5. RASPRAVA ... 55
5.1. ANTIFUNGALNI UČINAK ETERIČNIH ULJA TE TIMOLA I PROPIL GALATA ... 56
5.2. UTJECAJ ETERIČNIH ULJA *Cinnamomum cassia* I *Litsea cubeba* TE TIMOLA I PROPIL GALATA NA LINEARAN RAST ODABRANIH VRSTA PLIJESNI PRI DVIJE RAZLIČITE VRIJEDNOSTI a_w (0,93 i 0,98) ... 57
6. ZAKLJUČCI ... 63
7. LITERATURA ... 65

Popis oznaka, kratica i simbola

ADI – Acceptable Daily Intake (Prihvatljivi dnevni unos)

ATP – Adenozin trifosfat

a_w – Aktivitet vode

BHA – Butilirani hidroksianisol

BHT – Butilirani hidroksitoluen

CYA – Czapek Yeast Agar (Czapekov kvaščev agar)

DNK – Deoksiribonukleinska kiselina

FDA – Food and Drug Administration (Agencija za hranu i lijekove)

GRAS – Generally Recognized As Safe (Općenito prepoznato kao sigurno)

MEA – Malt Extract Agar (Maltozni agar)

MFK – Minimalna fungicidna koncentracija

MIK – Minimalna inhibitorna koncentracija

NF-κB – Nuklearni faktor κ B

PDA – Potato Dextrose Agar (Krumpirov agar s glukozom)

RNK – Ribonukleinska kiselina

WHO – World Health Organization (Svjetska zdravstvena organizacija)

YESB – Yeast Extract Sucrose Broth (Bujon s ekstraktom kvasca i saharozom)

1. UVOD

Eterična ulja su sekundarni produkti metabolizma ljekovitih i začinskih biljaka. Nastaju u svim dijelovima biljaka (Bakkali i sur., 2008.). Dobivaju se fermentacijom, ekstrakcijom ili tiještenjem, dok se u komercijalnoj proizvodnji eteričnih ulja, najčešće, koristi destilacija vodenom parom. Poznato je oko 3000 eteričnih ulja od kojih je 300 komercijalno značajno (Burt, 2004.).

Povijest uporabe eteričnih ulja u borbi protiv mikroorganizama seže u najstarije civilizacije stoga što su eterična ulja najstariji oblik lijekova poznatih čovjeku i smatrana su vrjednijim od zlata (Bakkali i sur., 2008.).

Eterična ulja primjenjuju se u medicini, farmaciji, prehrambenoj, kozmetičkoj industriji i industriji parfema te aromaterapiji zahvaljujući antibakterijskim, antivirusnim, antifungalnim, antiseptičkim, antioksidativnim te insekticidnim svojstvima. Posjeduju širok spektar djelovanja zbog toga što sadrže velik broj kemijskih spojeva, no djelovanje eteričnih ulja još uvijek nije u potpunosti razjašnjeno (Burt, 2004.).

Aktivno pakiranje uz dodatak eteričnih ulja pomaže u očuvanju kvalitete, organoleptičkih svojstava namirnica i kontroli mikrobiološkog kvarenja. Razvoj i poboljšanje ove tehnologije u budućnosti važan je i potreban za komercijalnu primjenu (Serrano i sur., 2008.).

Plijesni su mikroskopska skupina gljiva (Čvek i sur., 2010.). Široko su rasprostranjene u prirodi i česti su kontaminanti hrane i krmiva za životinje (Kocić-Tanackov i Dimić, 2013.). Hranu čine nepoželjnom i neprihvatljivom za konzumaciju uslijed promjene organoleptičkih svojstava, a plijesni koje proizvode mikotoksine mogu uzrokovati i bolesti (Doyle, 2007.; Tucker, 2008.).

Rast plijesni u hrani može se kontrolirati sprječavanjem ulaska spora u hranu, prilagođavanjem temperature skladištenja i vlage, promjenom razine kisika te kemijskim i prirodnim konzervansima (Blackburn, 2006.).

Cilj rada bio je istražiti antifungalni učinak eteričnih ulja *Cinnamomum cassia* i *Litsea cubeba* te timola i propil galata na odabrane vrste plijesni: *Penicillium aurantiogriseum, P. brevicompactum* i *P. chrysogenum*. Određena je minimalna inhibitorna (MIK) i minimalna fungicidna (MFK) koncentracija antifungalnih spojeva. Nadalje, određen je učinak antifungalnih spojeva u inhibiciji linearnog rasta kolonije plijesni tijekom uzgoja na krumpirovom agaru s glukozom (PDA) pri dvije različite vrijednosti aktiviteta vode (0,98 i 0,93).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ETERIČNA ULJA

Eterična ulja su prozirne, rijetko obojene, hlapljive tekućine kompleksnog sastava i izraženog mirisa, topljive u lipidima i organskim otapalima. Nastaju u korijenu, kori, stabljikama, listovima, cvjetovima, sjemenkama, plodovima; najčešće u vrlo malim količinama. Uskladišteni su u sekretornim stanicama, šupljinama, kanalima, epidermalnim stanicama i žljezdanim trihomama biljaka, odakle se ekstrahiraju. Biljkama pomažu u privlačenju kukaca koji sudjeluju u oprašivanju, zaštita su od mikroorganizama, bolesti i biljojeda (Bakkali i sur., 2008.; Vučinić i sur., 2012.; Macwan i sur., 2016.).

Iz zapisa i slika drevnih civilizacija Egipta, Kine i Perzije vidljivo je kako su eterična ulja koristili njihovi svećenici, liječnici i iscjelitelji. Prve pisane podatke o uporabi eteričnih ulja za balzamiranje i konzerviranje hrane, a također i kao antimikrobne, analgetičke, sedativne, protuupalne i spazmolitičke lijekove, nalazimo u Egiptu. Uporaba im se nije promijenila do današnjih dana, osim što se više zna o njihovom mehanizmu djelovanja (Bakkali i sur., 2008.). Metoda destilacije vodenom parom, kojom se eterična ulja dobivaju, koristila se još prije 2000 godina u Egiptu, Perziji i Indiji, a u 9. stoljeću usavršavaju je Arapi. Do 13. stoljeća farmakološka djelovanja eteričnih ulja bila su zapisana u farmakopejama, međutim, uporaba u Europi nije bila raširena sve do 16. stoljeća. Prva znanstvena ispitivanja proveo je Koch 1881. godine testirajući djelovanje terpentinskog ulja na bakterijsku vrstu *Bacillus anthracis* (Burt, 2004.). Neki začini, poput cimeta, klinčića, gorušice, češnjaka, đumbira i mente i danas se primjenjuju u alternativnoj medicini u Indiji (Tajkarimi i sur., 2010.). U 19. i 20. stoljeću uporaba eteričnih ulja u medicinske svrhe postaje sekundarna u odnosu na njihovu uporabu kao začina i aroma (Burt, 2004.).

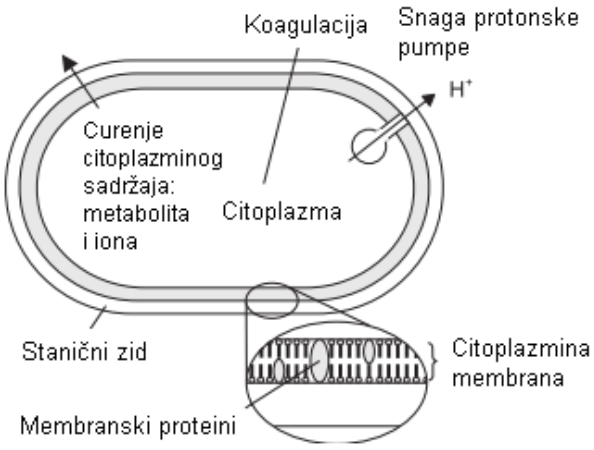
Postoji nekoliko metoda za ekstrakciju eteričnih ulja. Uključuju uporabu tekućeg ugljičnog dioksida (CO_2) ili mikrovalova, a najčešće korištena metoda je destilacija pod visokim ili niskim tlakom korištenjem vrele vode ili vodene pare (Bakkali i sur., 2008.). Ekstrakcija tekućim ugljičnim dioksidom je skuplja, ali eterična ulja dobivena na ovaj način posjeduju jaču antimikrobnu aktivnost i izraženijih su organoleptičkih svojstava (Burt, 2004.). Kako bi se dobila eterična ulja konstantnog sastava, moraju se ekstrahirati pod istim uvjetima, iz istog organa biljaka uzgojenih na istom tlu, u istim klimatskim uvjetima, ubranih u istom godišnjem dobu (Bakkali i sur., 2008.). Eterična ulja su hlapljive prirode, osjetljiva na svijetlo i toplinu i potrebno ih je čuvati u dobro zatvorenim bočicama od tamnog stakla daleko od izvora topline (kako bi se izbjegle njihove kemijske promjene). Citrusna ulja preporučljivo je čuvati u hladnjaku jer izuzetno brzo hlape (Burt, 2004.).

Zbog svojih antimikrobnih svojstava upotrebljavaju se za produljenje trajnosti hrane odnosno za konzerviranje hrane, a komercijalno je dostupno nekoliko konzervanasa koji sadrže

eterična ulja. Kako neki sastojci hrane mogu utjecati na djelotvornost dodanih eteričnih ulja, istraživači se bave potencijalnom interakcijom između sastojaka eteričnih ulja i sastojaka hrane (Gutierrez i sur., 2009.). Eterična ulja počela su gubiti na značaju razvojem industrije i kemijskih preparata, ali to se sve više mijenja i ljudi sve više prepoznaju njihovu vrijednost (Burt, 2004.).

2.2. MEHANIZAM DJELOVANJA ETERIČNIH ULJA

Postoje različiti mehanizmi antimikrobnog djelovanja eteričnih ulja jer obiluju mnoštvom različitih kemijskih spojeva. Najznačajniji sastojci eteričnih ulja odgovorni za njihovu antimikrobnu aktivnost su: karvakrol, timol, eugenol, *p*-cimen, karvon, cinamički aldehid, terpien i kapsaicin (Burt, 2004.). Uzimajući u obzir velik broj različitih grupa kemijskih sastojaka koji su prisutni u eteričnim uljima, vrlo je vjerojatno kako njihova antimikrobna aktivnost nije posljedica samo jednog specifičnog mehanizma, već djeluju na nekoliko ciljnih mjesta u stanicama mikroorganizama (Carson i sur., 2002). Eterična ulja mogu izazvati trajno oštećenje stanične membrane uslijed promjene masnih kiselina, polisaharida i fosfolipida membrane, translokacije njezinih proteina, poremećaja transporta elektrona, što rezultira izlaskom staničnih sastojaka u izvanstanični prostor, nepovratnim oštećenjem i smrću stanice. Eterična ulja mogu izazvati i promjene u sintezi DNK i RNK, koagulaciju staničnog sadržaja ili spriječiti proizvodnju toksina (**Slika 1**) (Burt, 2004.; Bakkali i sur., 2008.).



Slika 1 Mehanizmi djelovanja sastojaka eteričnog ulja na bakterijsku stanicu (Burt, 2004.)

Važno svojstvo eteričnih ulja i njihovih sastojaka je hidrofobnost koja im omogućava nakupljanje među lipidima stanične membrane bakterije čime se narušava njezina struktura i

povećava propusnost, posebno za ione i protone, dolazi do gubitka makromolekula, što za posljedicu ima lizu i smrt stanice (Sikkema i sur., 1995.). Promjena propusnosti stanične membrane obično je praćena gubitkom osmotske kontrole stanice što se smatra osnovnim principom antibakterijskog djelovanja eteričnih ulja. Kemijski spojevi koji su u sastavu eteričnih ulja djeluju i na proteine, poput ATP-aze, kao i na druge enzime uključene u regulaciju energije ili odgovorne za sintezu strukturnih sastojaka stanice (Ultee i sur., 2002.; Burt, 2004.; Bakkali i sur., 2008.; Hyldgaard i sur., 2012).

Eterična ulja koja sadrže visok postotak fenolnih sastojaka (karvakrol, timol, eugenol) djeluju i snažnije antimikrobno na patogene u hrani (Burt, 2004.), među kojima su ulja klinčića, origana, ružmarina, majčine dušice, kadulje i vanilije (Holley i Patel, 2005.). Fenolni sastojci eteričnih ulja oštećuju citoplazmatsku membranu stanice, ometaju kretanje protona i elektrona, ometaju aktivni transport i uzrokuju koagulaciju staničnog sadržaja (Sikkema i sur., 1995.). Prisutnost hidroksilne skupine i sustava delokaliziranih elektrona (dvostruke veze) u fenolnom prstenu utječe na njihovu antimikrobnu aktivnost (Ultee i sur., 2002.). Antibakterijsko djelovanje fenola ovisi o primijenjenoj koncentraciji; pri nižim koncentracijama djeluju na enzime uključene u proizvodnju energije, dok pri višim koncentracijama denaturiraju proteine (Tiwari i sur., 2009.).

Uočena je manja osjetljivost gram-negativnih bakterija na djelovanje eteričnih ulja u odnosu na gram-pozitivne bakterije jer gram-negativne bakterije posjeduju hidrofilni lipopolisaharidni omotač koji ograničava difuziju hidrofobnih spojeva (Burt, 2004.; Hyldgaard i sur., 2012.). Iako ovo vrijedi za mnoga eterična ulja, ulja origana, klinčića i cimeta djelotvorna su protiv obje skupine bakterija (Holley i Patel, 2005.).

Osim antibakterijskog djelovanja eteričnih ulja, što je ujedno njihovo najpoznatije i najčešće korišteno svojstvo, poznato je i njihovo antifungalno djelovanje (Bakkali i sur., 2008.). Kako se mehanizam djelovanja eteričnih ulja temelji, pretežno, na njihovom utjecaju na staničnu membranu, i kod plijesni dolazi do narušavanja njezine strukture, blokiranja izgradnje stanične membrane te inhibiranja klijanja spora, rasta micelija i staničnog disanja, što dovodi do smrti stanice (Harris i sur., 2002.).

Postoje različiti mehanizmi antivirusnog djelovanja eteričnih ulja i njihovih sastojaka. Eterična ulja denaturiraju virusne strukturne proteine ili glikoproteine. Pretpostavlja se kako antivirusni mehanizam uključuje interferenciju s virusnom ovojnicom, inhibiciju specifičnih procesa u ciklusu replikacije ili djelovanje na virusne sastojke potrebne za apsorpciju i ulazak u stanice domaćina i tako sprječavaju difuziju virusa u stanicu (Saddi i sur., 2007.).

U eukariotskim stanicama eterična ulja mogu izazvati depolarizaciju mitohondrijske membrane, uz utjecaj na ionske kanale, te sniziti njezinu pH vrijednost. Vanjska i unutrašnja

mitohondrijska membrana postaju neuobičajeno propusne što rezultira izlaskom radikala, citokroma c, Ca iona i proteina, kao u slučaju oksidativnog stresa, što dovodi do odumiranja stanice apoptozom i nekrozom (Bakkali i sur., 2008.).

Antimikrobna aktivnost eteričnog ulja može se potpuno razlikovati od aktivnosti njegovih pojedinačnih sastojaka, jer ovisi o složenim interakcijama među sastojcima što može imati aditivan, sinergistički ili antagonistički utjecaj (Burt, 2004.; Bakkali i sur., 2008.). Iako se najčešće glavnim sastojcima pripisuje antimikrobno djelovanje, istraživanja provedena na eteričnim uljima kadulje, timijana i origana pokazala su kako manje zastupljeni sastojci eteričnog ulja posjeduju ključnu ulogu u antimikrobnoj aktivnosti, što se pripisuje sinergističkom djelovanju s drugim sastojcima eteričnog ulja. Zbog toga, eterična ulja u punom sastavu posjeduju jače izražena antimikrobna svojstva nego njihovi pojedinačni, glavni sastojci (Burt, 2004.; Bakkali i sur., 2008.; Stojković i sur., 2013.).

Najsnažniji antimikrobni učinak posjeduju fenoli koji su, uglavnom, najzastupljeniji u eteričnom ulju, zatim alkoholi, aldehidi, ketoni, eteri, dok je antimikrobni učinak ugljikovodika vrlo nizak (Dorman i Deans, 2000).

2.2.1. Sastojci eteričnih ulja

Eterična ulja su složene prirodne mješavine koje mogu sadržavati oko 20 – 60 sastojaka različitih koncentracija. Karakteriziraju ih dva ili tri glavna sastojka visoke koncentracije (20 – 70%) u odnosu na ostale sastojke prisutne u tragovima. Na primjer, karvakrol (30%) i timol (27%) glavni su sastojci eteričnog ulja *Origanum compactum* (Bakkali i sur., 2008.). Detaljna analiza sastava eteričnih ulja može se postići plinskom kromatografijom i masenom spektrometrijom (Burt, 2004.). Općenito, glavni sastojci određuju biološka svojstva eteričnih ulja i uključuju dvije glavne skupine različitog biosintetskog porijekla: terpeni i terpenoidi te aromatski i alifatski spojevi (Bakkali i sur., 2008.) koji pripadaju različitim skupinama organskih spojeva (ugljikovodici, alkoholi, fenoli, aldehidi, ketoni, oksidi, itd.) (Noller, 1973.).

Terpeni su vrsta hlapljivih spojeva od kojih uglavnom potječe miris biljaka i cvijeća. Sintetiziraju se u citoplazmi iz acetil-CoA. Strukturna jedinica zajednička svim terpenima je izopren (C_5). Najjednostavniji monoterpeni ($C_{10}H_{16}$) sastoje se od dvije izoprenske jedinice (Pine, 1994.). Najvrjednije su molekule jer čine 90% eteričnih ulja (Bakkali i sur., 2008.), a najpoznatiji su *p*-cimen, limonen, terpinen, sabinen i pinen (Nazzaro i sur., 2013.). Seskviterpeni ($C_{15}H_{24}$) imaju tri izoprenske jedinice (Pine, 1994.). Monoterpeni i seskviterpeni najzastupljeniji su u eteričnim uljima (Bakkali i sur., 2008.). Terpeni koji sadrže kisik nazivaju se terpenoidi, a najpoznatiji su timol, karvakrol, linalol, mentol, geraniol, linalil acetat i

citronelal. Za razliku od terpena, terpenoidi često posjeduju jaka antibakterijska svojstva zahvaljujući funkcionalnim skupinama, hidroksilnoj skupini ili fenolnim sastojcima (Bakkali i sur., 2008.; Tiwari i sur., 2009.; Hyldgaard i sur., 2012.).

Aromatski spojevi izvedeni su od fenilpropana i rjeđe se javljaju od terpena (Bakkali i sur., 2008.). Fenilpropani su aromatski spojevi s postranim propilnim lancem vezanim na benzensku jezgru, sadrže jednu ili više C_6-C_3 jedinica (Noller, 1973.; Pine, 1994.). Eugenol, izoeugenol, vanilin, safrol, kapsaicin i cinamički aldehid najproučavaniji su fenilpropani. Antimikrobno djelovanje ovih spojeva temelji se na njihovoj slobodnoj hidroksilnoj skupini (Lee i sur., 2004.; Nazzaro i sur., 2013.).

Pored spomenutih spojeva, eterična ulja sadrže i dušične i sumporne sastojke, čiji predstavnici alicin i alil-izotiocijanat posjeduju dobru učinkovitost protiv gram-negativnih bakterija (Holley i Patel, 2005.; Bakkali i sur., 2008.; Hyldgaard i sur., 2012.).

Sastav i kvaliteta eteričnih ulja mogu varirati ovisno o podneblju, vrsti tla, genetskim svojstvima biljke, sezoni berbe, zemljopisnom porijeklu i dijelu biljke koji se koristi za njegovo dobivanje. Eterična ulja dobivena iz zelenih biljaka, ubranih tijekom ili neposredno nakon cvjetanja, posjeduju najveću antimikrobnu aktivnost. Isto tako, sastav eteričnog ulja s različitih dijelova iste biljke može se razlikovati (npr. eterično ulje sjemenki korijandera posjeduje drugačiji sastav od ulja dobivenog iz nezrelih listova iste biljke) (Burt, 2004.; Tiwari i sur., 2009.). Način proizvodnje ulja (metoda hladnog prešanja, destilacija parom, ekstrakcija s nevodenim otapalima) mijenjaju aktivne tvari i uz njih vezane sastojke u krajnjem proizvodu (Windisch i sur., 2008.).

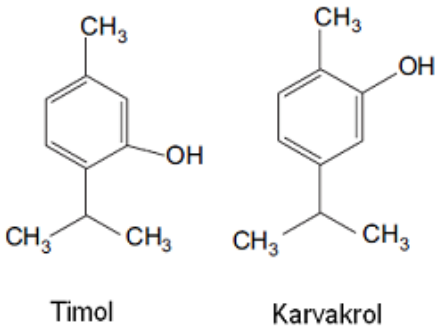
Kako su eterična ulja složene mješavine, njihov kemijski sastav i koncentracija mogu biti prilično različiti. Na primjer, koncentracije timola i karvakrola u eteričnom ulju timijana prisutne su u rasponu od 3 do 60%, a cinamički aldehid čini 60 do 75% ukupnog ulja cimeta (Lee i sur., 2004.).

2.2.2. Mehanizam djelovanja sastojaka eteričnih ulja

Karvakrol i timol

Karvakrol (5-izopropil-2-metilfenol) i timol (2-izopropil-5-metilfenol) su izomeri i predstavljaju monoterpenske fenole s jakim antimikrobnim djelovanjem. Karvakrol je glavni sastojak ulja origana, a timol ulja timijana. Usporedbom antimikrobnog učinka karvakrola i timola nisu utvrđene značajne razlike u njihovoj antimikrobnoj aktivnosti jer oba sastojka posjeduju hidroksilnu skupinu (karvakrol u *orto* položaju, a timol u *meta* položaju) sa sustavom

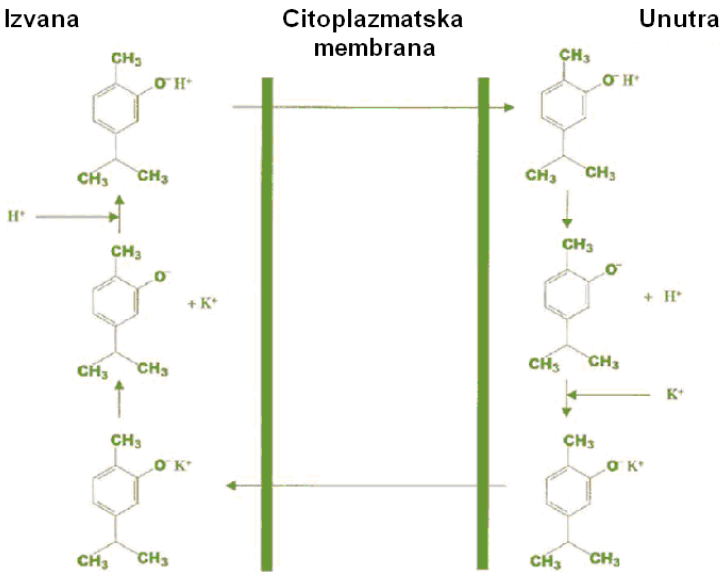
delokaliziranih elektrona (dvostruke veze) (**Slika 2**). Oba sastojka povećavaju propusnost membrane. Karvakrol i timol mogu dovesti do raspada vanjske membrane gram-negativnih bakterija, iz kojih se otpuštaju lipopolisaharidi, i povećati propusnost citoplazmatske membrane za ATP (Ultee i sur., 2002.; Burt, 2004.; Hyldgaard i sur., 2012.; Velebit i sur., 2012.).



Slika 2 Strukturne formule timola i karvakrola
(Serrano i sur., 2008.)

Biokemijski prekursori karvakrola i timola, monoterpeni *p*-cimen i *γ*-terpinen, ne posjeduju antimikrobnu aktivnost već se smatra kako oni pojačavaju njihov antimikrobni učinak. *p*-cimen je hidrofoban i nedostaje mu hidroksilna skupina. Djelotvoran je samo u kombinaciji s karvakrolom, gdje povećava transport karvakrola kroz citoplazmatsku membranu (Ultee i sur., 2000.; Burt, 2004.).

Kod *Bacillus cereus* uočeno je kako karvakrol u koncentraciji većoj od 1 mmol/g uzrokuje povećanje propusnosti membrane i gubitak K^+ iona što dovodi do smanjenja unutarstaničnog pH, pada membranskog potencijala i inhibicije sinteze ATP-a te samim tim do smrti stanice. Na osnovu toga je zaključeno kako karvakrol oblikuje kanale kroz membranu, ulazi u fosfolipidni dvosloj između lanaca masnih kiselina i tako ih razdvaja, omogućavajući ionima da napuštaju membranu. Zbog svog hidrofobnog svojstva karvakrol se dodatno akumulira u staničnoj membrani. Ovaj učinak objašnjava se prisustvom hidroksilne skupine koja djeluje kao trans-membranski nosač monovalentnih kationa prenoseći H^+ ione u citoplazmu i K^+ ione izvan stanice, i sustava delokaliziranih elektrona (**Slika 3**) (Ultee i sur., 2000.; Nazzaro i sur., 2013.).



Slika 3 Shematski prikaz antimikrobnog djelovanja karvakrola (Ultee i sur., 2002.)

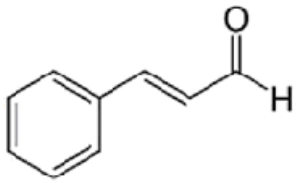
Pored inhibicije rasta vegetativnih bakterijskih stanica, karvakrol može inhibirati proizvodnju toksina *Bacillus cereus* (uzročnika dijareje) u tekućoj podlozi i realnom supstratu – juhi. To se objašnjava na dva načina: ukoliko je proizvodnja toksina aktivan proces vjerojatno nema dovoljno ATP-a za njegovo izlučivanje izvan stanice; niža specifična stopa rasta može značiti kako stanica koristi svu raspoloživu energiju na održavanje života zbog čega je ostaje vrlo malo za proizvodnju toksina (Burt, 2004.).

Antifungalno djelovanje karvakrola i timola obuhvaća remećenje Ca^{2+} i H^{+} homeostaze, kao i narušavanje integriteta membrane i smanjenu biosintezu ergosterola u *Candida* sojevima (ergosterol regulira fluidnost membrane, slično kolesterolu u životinjskim stanicama) (Hyldgaard i sur., 2012.). Dokazana je njihova djelotvornost u inhibiciji plijesni uzročnika kvarenja hrane, uključujući *Aspergillus niger, A. flavus* i *A. parasiticus* (Tajkarimi i sur., 2010.).

Juven i suradnici (1994.) istraživali su djelovanje timola na *Salmonella typhimurium* i *Staphylococcus aureus*. Pretpostavka je kako se timol veže za membranske proteine hidrofobnim dijelom uspostavljajući vodikove veze i mijenja propusnost membrane. Utvrđeno je kako timol posjeduje bolja inhibitorna svojstva pri pH 5,5 nego 6,5 jer pri nižem pH molekule timola neće biti disocirane i stoga će biti hidrofobnije te će se bolje vezati za hidrofobne dijelove proteina i otopiti u lipidnoj fazi (Juven i sur., 1994.; Burt, 2004.).

Cinamički aldehid

Komercijalno se dobiva iz cejlonskog cimeta (*Cinnamomum zeilanicum*) ili iz kineskog cimeta (*Cinnamomum cassia*). Kineski cimet je daleko jeftiniji od cejlonskog, ali, s aspekta toksičnosti, sadrži visoke doze kumarina dok ga cejlonski cimet sadrži u tragovima (Velebit i sur., 2012.). Aldehidna skupina cinamičkog aldehida (**Slika 4**) je reaktivna i posjeduje sposobnost kovalentnog vezanja za DNK i proteine preko amino skupine i stoga remeti njihovu funkciju. Mehanizam djelovanja je nejasan. Pri niskim koncentracijama inhibira enzime uključene u citokinezu ili manje značajne stanične funkcije. Pri subletalnim koncentracijama inhibira ATP-azu, a letalne koncentracije remete staničnu membranu (Hyldgaard i sur., 2012.).



Cinamički aldehid

Slika 4 Strukturna formula cinamičkog aldehida
(Bakkali i sur., 2008.)

Antifungalno djelovanje uključuje inhibiciju stanične diobe kroz reakciju sa sulfhidrilnim skupinama koje su nezamjenjive za rast plijesni te inhibiciju sinteze enzima u staničnim stijenkama plijesni (Lee i sur., 2004.).

Inhibira rast *Escherichia coli* O157:H7 i *Salmonella typhimurium* pri sličnim koncentracijama kao karvakrol i timol, ali ne tako što oštećuje vanjsku membranu ili troši unutarstanični ATP, već se preko aldehidne skupine veže za proteine u citoplazmi i sprječava djelovanje kisele dekarboksilaze u *Enterobacter aerogenes* (Burt, 2004.). U istraživanju koje su proveli Velebit i suradnici (2012.) ustanovljeno je kako cinamički aldehid posjeduje jaču antibakterijsku aktivnost prema patogenim mikroorganizmima u hrani nego karvakrol jer ireverzibilno, u vrlo kratkom roku, inhibira stanične enzime dok karvakrol parcijalno dezintegrira citoplazmatsku membranu i stvara pore u membrani što dovodi do konstantnog istjecanja iona iz citoplazme u izvanstanični prostor. Bakterije se tome opiru dok se ne dostigne maksimum ionskih pumpi. Dakle, oštećenja stanica nastala djelovanjem karvakrola su reverzibilna, do određene granice, pa je i rezistentnost stanica duža (Velebit i sur., 2012.).

Eugenol

Eugenol je glavni sastojak ulja klinčića (čak do 85%). Na *Bacillus cereus* djeluje tako što inhibira proizvodnju amilaze i proteaze i oštećuje staničnu stijenku pa dolazi do razgradnje stanice, a na *Enterobacter aerogenes* inhibicijom djelovanja proteina uslijed vezivanja na iste hidroksilnom skupinom (Burt, 2004.).

Antifungalno djelovanje eugenola treba dodatno istražiti, ali je poznato kako ovisi o staničnoj proliferaciji. Tretman eugenolom mijenja staničnu membranu i strukturu stanične stijenke stanica *Saccharomyces cerevisiae* tijekom proliferacije što rezultira gubljenjem staničnog sadržaja (Hyldgaard i sur., 2012.). Inhibira proizvodnju mikotoksina plijesni roda *Aspergillus* i *Penicillium* u koncentraciji od 300 µg/ml (Tajkarimi i sur., 2010.).

2.3. SIGURNOST UPORABE ETERIČNIH ULJA I SASTOJAKA

Sigurnost hrane je sve važniji javno-zdravstveni problem, te postoji potreba za razvojem novih metoda za smanjenje ili uklanjanje patogena iz hrane. Zbog održavanja sigurnosti prehrambenih proizvoda, uslijed smanjenja uporabe soli i šećera, kao i trenda smanjenja uporabe sintetskih prehrambenih aditiva, javlja se potreba za prirodnim aditivima. Jedna od mogućnosti je uporaba eteričnih ulja kao prirodne alternative u zaštiti hrane koja je uvjetovana zahtjevom suvremenih potrošača za konzumiranjem minimalno procesirane hrane (Burt, 2004.; Gutierrez i sur., 2009.; Velebit i sur., 2012.; Moračanin i sur., 2015).

Na ambalaži i/ili pratećoj dokumentaciji čistih eteričnih ulja moraju se naći podaci važni svim potrošačima jer je specifičnost djelovanja eteričnih ulja u izravnoj vezi s njihovim specifičnim kemijskim sastavom. Oznake moraju sadržavati informacije koje zadovoljavaju i najstrože zahtjeve primjene, uzimajući pri tome mogućnosti njihove uporabe u farmaciji, aromatiziranju hrane, proizvodnji stočne hrane, kozmetičkim i drugim proizvodima široke potrošnje, te u aromaterapiji (MZSS, 2009; MPRR, 2011.).

Prehrambena industrija eterična ulja primarno koristi za promjenu ili poboljšanje okusa proizvoda, a njihova primjena kao prirodnih antimikrobnih prehrambenih aditiva zahtijeva detaljno istraživanje i spoznaje o njihovim svojstvima (minimalna inhibitorna koncentracija, ciljni organizmi, način djelovanja i djelovanje sastojaka hrane na njihova antimikrobna svojstva) (Hyldgaard i sur., 2012.).

Primjena eteričnih ulja ili njihovih sastojaka kao aditiva u prehrambenim proizvodima je ograničena jer su potrebne velike koncentracije kako bi se osigurao antimikrobni učinak (Hyldgaard i sur., 2012.). Antimikrobnu aktivnost eteričnog ulja ili njegovih sastojaka može

smanjiti interakcija sa sastojcima hrane (masti, škrob, proteini, sadržaj vode), a također ovisi i o čimbenicima poput pH, temperature te razini mikrobne kontaminacije (Burt, 2004.; Gutierrez i sur., 2009.; Hyldgaard i sur., 2012.).

Europska Komisija registrirala je brojne sastojke eteričnih ulja kao arome u prehrambenim proizvodima koji ne predstavljaju rizik za zdravlje potrošača i oni uključuju karvakrol, karvon, linalol, cinamički aldehid, vanilin, citral, *p*-cimen, eugenol, limonen, mentol i timol. Estragol i metil eugenol 2001. godine uklonjeni su s liste zbog genotoksičnosti. Agencija za hranu i lijekove (FDA) arome je kategorizirala kao uglavnom prepoznate kao sigurne (GRAS) ili kao odobrene prehrambene aditive (Burt, 2004.). Sirova eterična ulja koje je FDA klasificirala kao GRAS su, između ostalih, ulja klinčića, origana, majčine dušice, muškatnog oraščića, bosiljka, gorušice i cimeta (Hyldgaard i sur., 2012.).

Prije bilo kakve široke i komercijalne primjene, prirodni aditivi i arome moraju proći predviđene laboratorijske, industrijske, medicinske provjere i moraju biti odobreni u zakonodavstvu. Prije dodavanja eteričnog ulja ili sastojaka eteričnog ulja u prehrambene proizvode, potrebno je provesti ispitivanje njihove interakcije u *in vitro* uvjetima (mjerenjem porasta kulture mikroorganizama od interesa u podlozi koja sadrži različite koncentracije masti, proteina i škroba). Potrebno je ispitati i prihvatljivi dnevni unos eteričnog ulja ili sastojaka eteričnog ulja (Burt, 2004.; Gutierrez i sur., 2009.; Hyldgaard i sur., 2012.; Moračanin i sur., 2015).

Eterična ulja treba pažljivo koristiti jer neka istraživanja ukazuju na osjetljivost, iritaciju i toksičnost njihove uporabe, uključujući alergijske reakcije i anafilaktički šok, pri čemu veća koncentracija ulja posjeduje i veći alergijski potencijal (Dreger i Wielgus, 2013.). Eugenol, mentol i timol mogu uzrokovati iritaciju usne šupljine i sluznice (ovisno o koncentracijama) što može biti posljedica lize membrane i površinske aktivnosti (Burt, 2004.; Bakkali i sur., 2008.). Cinamički aldehid, karvakrol, karvon i timol ne posjeduju značajan toksikološki utjecaj *in vivo* dok u *in vitro* uvjetima uzrokuju blage do umjerene toksične učinke na staničnoj razini (Burt, 2004.; Macwan i sur., 2016.). Neka eterična ulja (limun, bergamot, naranča, celer, peršin, mrkva) sadrže fotoaktivne molekule, poput furokumarina, koji uzrokuju fototoksične reakcije, dok u nekim slučajevima mogu formirati kovalentne adukte na DNK što za posljedicu može imati smrt stanice i mutagenezu (Burt, 2004.; Bakkali i sur., 2008.; Dreger i Wielgus, 2013.). Neka se eterična ulja, ili prije neki njihovi sastojci, nakon metaboličke aktivacije mogu smatrati sekundarnim karcinogenima (npr. mogu izazvati ekskreciju estrogena što može izazvati karcinom ovisan o estrogenu). Citotoksičnost eteričnih ulja u stanicama sisavaca uzrokovana je indukcijom nekroze i apoptoze (Bakkali i sur., 2008.).

Interakcije između eteričnih ulja i njihovih sastojaka te sastojaka hrane i prehrambenih aditiva potrebno je ispitati. Na primjer, ulja origana i klinčića mogu uzrokovati tamnu pigmentaciju u dodiru sa željezom što može ograničiti njihovu primjenu. Područje istraživanja također treba biti i stabilnost eteričnih ulja prilikom procesiranja hrane. Utvrđeno je kako se cinamički aldehid razgrađuje na benzaldehid pri temperaturi od 60 °C kada se zagrijava samostalno, a stabilan je 30 minuta nakon izlaganja temperaturi od 200 °C u kombinaciji s eugenolom (Burt, 2004.).

Preporučuje se provesti više sigurnosnih istraživanja prije nego se eterična ulja počnu više upotrebljavati i u većim koncentracijama u hrani, nego što je to danas (Burt, 2004.).

2.4. PRIMJENA ETERIČNIH ULJA U OBRADI I PROIZVODNJI NAMIRNICA

Prehrambeni proizvodi su, često, lako pokvarljivi i zahtijevaju zaštitu od kvarenja tijekom pripreme, skladištenja i distribucije (Holley i Patel, 2005.; Macwan i sur., 2016.). Eterična ulja inhibiraju rast patogenih mikroorganizama i, na taj način, sprječavaju bolesti koje se prenose hranom, poboljšavaju kvalitetu hrane i produžuju trajnost namirnica (Burt, 2004.; Fisher i Phillips, 2006.; Bakkali i sur., 2008.; Tajkarimi i sur., 2010.; Vučinić i sur., 2012.).

Bakterijska osjetljivost na eterična ulja povećava se smanjenjem pH vrijednosti hrane, temperature skladištenja i količine kisika unutar pakiranja, dok hrana bogata mastima i/ili proteinima, te niži aktivitet vode (a_w) povećavaju otpornost bakterija (Burt, 2004.; Holley i Patel, 2005.; Bošković i sur., 2013.; Macwan i sur., 2016.).

U antibakterijskim testovima *in vitro* uočeni su dobri rezultati inhibicije eteričnim uljima. Međutim, potrebno je povećati koncentraciju kako bi se isti učinak postigao u hrani i to dva puta u polumasnom mlijeku, deset puta u kobasicama od svinjske jetre, 50 puta u juhi, a čak 25 do 100 puta u mekom sirom. Veća dostupnost nutrijenata u hrani omogućava bakterijama brži popravak oštećenih stanica (Burt, 2004.; Fisher i Phillips, 2006.).

Kako bi se spriječio negativan učinak na organoleptička svojstva namirnica povećanjem koncentracije eteričnih ulja i njihovih sastojaka moguće je eterična ulja koristiti u tehnologiji bioaktivnog pakiranja hrane, umjesto njihovog dodavanja u sam proizvod. Eterična ulja mogu se dodati u ambalažu kao sadržaj vrećice, kao premaz po površini ambalažnog materijala ili u obliku jestivog filma, što osigurava postepeno otpuštanje hlapljivih eteričnih ulja i njihovih sastojaka na površinu hrane ili u gornji dio ambalaže. Time se povećava koncentracija antimikrobnih sastojaka na površini proizvoda (gdje rastu štetni mikroorganizmi) i sprječava se interakcija sa sastojcima hrane (Holley i Patel, 2005.; Tiwari i sur., 2009.; Emiroğlu i sur.,

2010.; Hyldgaard i sur., 2012.). Primjena eteričnih ulja u obliku filma koristi se za pakiranje mesa, ribe, peradi, voća, povrća, sira i kruha (Tiwari i sur., 2009.; Emiroğlu i sur., 2010.). Primjena konzerviranja preprekama omogućava korištenje niske razine eteričnih ulja u kombinaciji s drugim tehnikama čuvanja hrane (hlađenje, pH, a_w, modificirana atmosfera) (Fisher i Phillips, 2006.; Macwan i sur., 2016.). Kako bi se koncentracija potrebna za postizanje određenog antimikrobnog učinka svela na minimum mogu se iskoristiti i sinergistički učinci eteričnih ulja i njihovih sastojaka (Burt, 2004.; Gutierrez i sur., 2009.; Hyldgaard i sur., 2012.). Antagonizam između eteričnih ulja i hrane je neželjen i neophodna su istraživanja kako bi se u praktičnoj primjeni on izbjegao (Burt, 2004.).

Meso i mesni proizvodi

Ulja klinčića, timijana i origana učinkovito inhibiraju *Listeria monocytogenes, Aeromonas hydrophila* i prirodnu mikrofloru u mesu u koncentraciji od 5 – 20 µl/g. Visok udio masti značajno smanjuje djelovanje eteričnih ulja u mesnim proizvodima (otapanjem eteričnih ulja u lipidnoj fazi manje ulja ostaje dostupno za djelovanje na bakteriju u vodenoj fazi), npr. ulja metvice i korijandera nisu učinkovita u mesnim proizvodima s visokim sadržajem masti poput pâté (sadrži 30 – 45% masti). Zbog toga su potrebne veće koncentracije eteričnih ulja, a izuzetak je *Aeromonas hydrophila* za čiju inhibiciju u kuhanoj svinjetini nije bilo potrebno dodati veće koncentracije od utvrđenih *in vitro* testovima (Burt, 2004.; Tajkarimi, 2010.). Pandit i Shelef (1994.) uočili su kako je inkapsulirano ulje ružmarina učinkovitije nego standardno ulje ružmarina protiv *Listeria monocytogenes* u kobasicama od svinjske jetre (Pandit i Shelef, 1994.; Burt, 2004.). Ismaiel i Pierson (1990.) istražili su djelovanje ulja origana u pasteriziranom mljevenom mesu i ustanovili kako učinkovito usporava rast spora *Clostridium botulinum* u koncentraciji od 0,4 µl/g uz dodatak male koncentracije natrijevog nitrita (Ismaiel i Pierson, 1990.; Burt, 2004.). Vodeni ekstrakt ružmarina, kadulje i majčine dušice uspješno inhibira užeglost toplinski obrađenog purećeg mesa dok je mažuran djelotvoran protiv nekoliko bakterijskih vrsta u svježim kobasicama (Tajkarimi i sur., 2010.).

Riba i jela od ribe

Visok sadržaj masti u ribi smanjuje antimikrobnu aktivnost eteričnih ulja (npr. ulje origana u koncentraciji od 0,5 µl/g učinkovitije inhibira *Photobacterium phosphoreum* u filetima bakalara nego u masnoj ribi lososu). Uporaba eteričnih ulja po cijeloj površini ribe ili kao premaz za škampe djelotvorna je u inhibiciji *Salmonella enteritidis, Listeria monocytogenes* i prirodne mikroflore koji uzrokuju kvarenje ribe (Burt, 2004.; Tajkarimi i sur., 2010.).

Kombinacija karvakrola i timola produžava vijek trajanja fileta od šarana za 4 puta. Ulje origana djelotvornije je od ulja metvice, bez obzira na sadržaj masti u ribi. Majčina dušica povećava rok trajanja slatkovodne ribe za 15 do 20 dana (Tajkarimi i sur., 2010.).

Mliječni proizvodi

Ulje metvice u koncentraciji od 5 – 20 µl/g djelotvorno je u inhibiciji *Salmonella enteritidis* u jogurtu niskog sadržaja masti. Od ulja metvice učinkovitija su ulja cimeta, kardamoma i klinčića (Burt, 2004.). Ulja majčine dušice, kadulje, mirte, lovora i naranče posjeduju potencijal inhibicije i inaktivacije *Escherichia coli, Staphyloccocus aureus, Listeria monocytogenes* i *Candida albicans* u mlijeku pri različitim koncentracijama. Inhibitorni učinak eteričnih ulja povećava se povećanjem koncentracije (Celikel i Kavas, 2008.). Visok a_w pozitivno djeluje na primjenu eteričnih ulja u mlijeku ubrzavanjem prijenosa eteričnih ulja do ciljnih mikroorganizama (Tajkarimi i sur., 2010.).

Povrće

Eterična ulja i njihovi sastojci učinkovito inhibiraju prirodnu mikrofloru kao i patogene mikroorganizme uzročnike kvarenja u koncentraciji od 0,1 – 10 µl/g. Ulje origana učinkovito inhibira *Escherichia coli* O157:H7 u koncentraciji od 7 – 21 µl/g i smanjuje ukupnu populaciju u salati od patlidžana, u odnosu na netretiranu kontrolu. Timol učinkovito inhibira *Escherichia coli* O157:H7 u zelenoj salati i mrkvama (Burt, 2004.). Utvrđeno je kako karvon inhibira klijanje krumpira tijekom skladištenja, te djeluje fungicidno u zaštiti gomolja krumpira od truljenja, bez utjecaja na njegov okus (Macwan i sur., 2016.).

Voće

Glavni uzroci kvarenja voća su dehidratacija, gubitak boje, omekšavanje, gubitak kiselosti, posmeđivanje i mikrobiološko kvarenje, koje uglavnom uzrokuju vrste rodova *Penicillium, Botrytis* i *Monilia* (Serrano i sur., 2008.). Karvakrol i cinamički aldehid učinkovito smanjuju broj prirodne mikroflore kivija u koncentraciji od 0,15 µl/g, ali manju učinkovitost posjeduju kod dinje medljike uslijed više pH vrijednosti dinje (Burt, 2004.; Serrano i sur., 2008.). Martínez-Romero i suradnici uočili su djelotvornost karvakrola u kontroli *Botrytis cinerea*, plijesni koja uzrokuje truljenje grožđa (Martínez-Romero i sur., 2007.; Serrano i sur., 2008.). Primjena 40 ppm cinamičkog aldehida s 40 ppm eugenola u soku od jabuke rezultirala je

njegovim očuvanjem u trajanju od 7 dana (Tajrakimi i sur., 2010.). Tretman jagoda eteričnim uljem eukaliptusa odgodio je truljenje jagoda tijekom skladištenja (Serrano i sur., 2008.).

2.5. ETERIČNO ULJE *Cinnamomum cassia*

Cinnamomum cassia (*Cinnamomum aromaticum*, kineski cimet ili kineska kasija) pripada porodici lovora (*Lauraceae*). Dobiva se iz kore drveta i koristi se kao sredstvo za poboljšanje okusa u azijskoj kuhinji. Posjeduje aromatičan, sladak okus s primjesom gorčine (Zaidi i sur., 2015.). Uzgaja se u Kini, Vijetnamu, Bangladešu, Indiji, Pakistanu, Šri Lanki i Ugandi. Zimzeleno stablo naraste 18 – 20 m visine, promjera 40 – 60 cm, kora je sivo-smeđe boje, listovi duguljasti, crvene boje kada su mladi (**Slika 5**). Cvijetovi su bijele boje i cvjetaju u rano proljeće. Drveće se uglavnom uzgaja za komercijalnu proizvodnju cimeta i obično se obrezuje u obliku grmova, kako ne bi prešlo određenu visinu (Coppen, 1995.; Papić, 2009.; Khan i Abourashed, 2010.).



Slika 5 Drvo (lijevo) i mladi listovi (desno) *Cinnamomum cassia*
(Slika lijevo: http://www.henriettes-herb.com, 2016.; slika desno: http://www.growsonyou.com, 2016.)

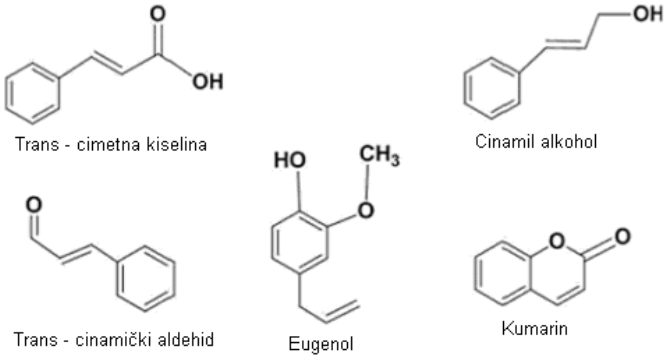
Stabljike se režu kada je kora zrela, u vrijeme kišne sezone. Komadi kore drveta dužine oko 30 cm skupljaju se kako bi se sačuvali aromatični spojevi i eterična ulja i tako se suše. Vanjski dio kore se odvaja, a unutarnji dio kore kod sušenja se uvija prema unutra s obiju strana u štapiće promjera oko 2,5 cm (**Slika 6**). Crvene su do tamno-smeđe boje, posjeduju grubu teksturu, okus više gorak, a miris oštar (Coppen, 1995.; Kolovrat, 2007.; Papić, 2009.).

Eterično ulje smeđe-žute boje (**Slika 6**) dobiva se destilacijom vodenom parom iz lišća, kore i grančica (Coppen, 1995.; Papić, 2009.; Khan i Abourashed, 2010.).



Slika 6 Štapići i prah (lijevo) i eterično ulje (desno) *Cinnamomum cassia*
(Slika lijevo: http://www.organiclifestylemagazine.com, 2016.; slika desno: https://en.wikipedia.org, 2016.)

Glavni aktivni sastojci eteričnog ulja *Cinnamomum cassia* su cinamički aldehid (75 – 90%) i kumarin (7%), a ostali sastojci prisutni su u tragovima i uključuju eugenol, benzojevu kiselinu, cimetnu kiselinu, salicilnu kiselinu, cinamil alkohol, benzaldehid i druge (**Slika 7**) (Coppen, 1995.; Papić, 2009.; Khan i Abourashed, 2010.; Zaidi i sur., 2015.). Aktivnim sastojcima eteričnog ulja *Cinnamomum cassia* pripisuju se protuupalna, antioksidativna, antikancerogena, antimikrobna i larvicidna svojstva (Zaidi i sur., 2015.).



Slika 7 Strukturne formule različitih sastojaka *Cinnamomum cassia*
(Zaidi i sur., 2015.)

Cinnamomum cassia posjeduje snažna antibakterijska svojstva protiv velikog broja patogena. Uočena je snažna učinkovitost etanolnog ekstrakta *Cinnamomum cassia* protiv *Pseudomonas aeruginosa* (López-Malo i sur., 2007.; Zaidi i sur., 2015.).

Cinnamomum cassia djeluje antifungalno protiv rodova *Aspergillus, Penicillium* i *Fusarium*, te četiri vrste roda *Candida* (*C. albicans, C. tropicalis, C. glabrata* i *C. krusei*) (López-Malo i sur., 2007.; Zaidi i sur., 2015.). Posjeduje bolja inhibitorna svojstva prema *Aspergillus flavus* od natrijevog benzoata, a čini se kako joj je djelovanje više fungistatično nego fungicidno. Eterično ulje *Cinnamomum cassia* u niskoj koncentraciji od 25 ppm može inhibirati klijanje

spora plijesni rodova *Mucor* i *Aspegillus* nakon 6 – 8 sati, što ga čini pogodnim za uporabu kao antifungalno sredstvo u pekarskim proizvodima gdje su gljive najčešći uzročnici kvarenja (López-Malo i sur., 2007.). Primjer učinkovitosti eteričnog ulja *Cinnamomum cassia* u očuvanju namirnica dokazali su Feng i Zheng (2007.). Ispitivali su učinak pet eteričnih ulja na inhibiciju *Alternaria alternata*, saprofitne patogene gljive koja uzrokuje truljenje rajčice, u *in vitro* i *in vivo* uvjetima. Najaktivnije eterično ulje bilo je *Cinnamomum cassia* koje je inhibiralo klijanje 95,1% spora u koncentraciji od 500 pmm, a slijedilo ga je ulje timijana (Feng i Zheng, 2007.).

Protuupalno djelovanje eteričnog ulja *Cinnamomum cassia* temelji se na blokiranju proizvodnje ciklooksigenaze i NO uslijed inaktivacije NF-κB (Zaidi i sur., 2015.). Antioksidativno djelovanje temelji se na povećanju aktivnosti antoksidativnih enzima (superoksid dismutaze, katalaze i glutation peroksidaze) (Liao i sur., 2012.).

Utvrđeno je kako cimet povećava osjetljivost na inzulin kod osoba oboljelih od dijabetesa tipa II. Pretpostavlja se, kako u vodi topljivi polifenolni polimeri (tzv. A-polimeri), aktiviraju inzulinske receptore što utječe na održavanje željene razine glukoze u krvi. Razine ukupnog i LDL kolesterola također su smanjene (Papić, 2009.; Zaidi i sur., 2015.).

Cinamički aldehid može uzrokovati dermatitis kod ljudi i alergijske reakcije, kao i iritaciju sluznice (Khan i Abourashed, 2010.; Zaidi i sur., 2015.). Istraživanjima je ustanovljeno hepatotoksično i hemoragijsko djelovanje kumarina. Već i male doze kod osjetljivih ljudi mogu oštetiti jetru i bubrege, a prekomjerno konzumiranje može se manifestirati vrtoglavicom, mučninom, slabosti, unutarnjim krvarenjem, dok unos ekstremnih količina može imati letalne posljedice (Papić, 2009.).

Cinnamomum cassia upotrebljava se kao začin i aroma u domaćinstvu i prehrambenoj industriji, a nedavna istraživanja su pokazala kako se *Cinnamomum cassia* može koristiti kao alternativa za tradicionalne konzervanse. U raznim oblicima (ekstrakt, prah, eterično ulje) koristi se u proizvodnji alkoholnih i bezalkoholnih pića (sličnih coli), likera, slastica, čokolada, guma za žvakanje, smrznutih mliječnih deserata, pekarskih proizvoda, mesnih proizvoda, umaka, začinskih i čajnih mješavina (Coppen, 1995.; Papić, 2009.; Khan i Abourashed, 2010.).

2.6. ETERIČNO ULJE *Litsea cubeba*

Litsea cubeba (May Chang ili planinski papar) je malo zimzeleno drvo ili grm (**Slika 8**), visine 5 – 12 m, promjera debla 6 – 20 cm. Pripada porodici *Lauraceae*, a uzgaja se u Kini, Indoneziji, Japanu, Tajvanu i drugim dijelovima jugoistočne Azije, uglavnom u planinskim

područjima. Cvijetovi su bijelo-žute boje, a plod zelene boje koja sazrijevanjem prelazi u crvenu i crnu (**Slika 8**). Kora i plod obično se koriste u tradicionalnoj kineskoj biljnoj medicini za liječenje raznih bolesti (Coppen, 1995.; Si i sur., 2012.; Han i sur., 2013.; Hu i sur., 2014.).



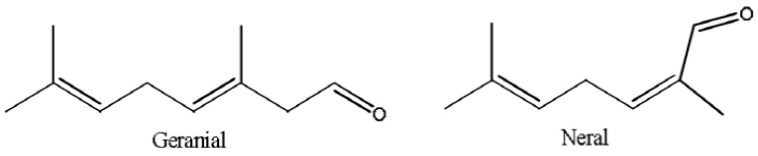
Slika 8 Drvo (lijevo) i cvijet i plod (desno) *Litsea cubeba*
(Slika lijevo: Hu i sur., 2014.; slika desno: http://www.lgbotanicals.com, 2016.)

Eterično ulje dobiva se iz svježih plodova destilacijom vodenom parom, posjeduje karakterističan svježi slatko-kiseli miris (poput limuna), svijetlo-žute do žute boje (**Slika 9**) (Coppen, 1995.; Si i sur., 2012.; Han i sur., 2013.; Hu i sur., 2014.). Osim za proizvodnju eteričnog ulja, stablo *Litsea cubeba* ponekad se koristi za izradu namještaja i rukotvorina (Coppen, 1995.). Eterično ulje odlikuju antimikrobna, antioksidativna, insekticidna, repelentna, citotoksična, antikancerogena i neurofarmakološka svojstva. Široko se primjenjuje u prehrambenoj, kemijskoj i medicinskoj industriji, kao i u duhanskoj industriji (Si i sur., 2012.; Han i sur., 2013.; Yang i sur., 2014.).



Slika 9 Eterično ulje *Litsea cubeba* (lijevo i desno)
(Slika lijevo: https://www.mountainroseherbs.com, 2016; slika desno: http://www.chinaplantoil.com, 2016.)

Glavni aktivni sastojci eteričnog ulja su neral i geranial (78 – 88 %), monoterpeni koji su cis-trans izomeri citrala (**Slika 10**). U manjim količinama sadrži pinen, limonen, linalol, metilheptonen, mircen, verbenol, cineol, sabinen, citronelal, *o*-cimen, *p*-cimen i druge (Si i sur., 2012.; Han i sur., 2013.; Hu i sur., 2014.).



Slika 10 Strukturne formule dva izomera citrala
(Hu i sur., 2014.)

Eterično ulje *Litsea cubeba*, zajedno s limunskom travom, obogaćuje miris u osvježivačima i sprejevima za domaćinstvo. Sirovina je za izolaciju citrala koji se zbog svojih svojstava koristi za poboljšanje okusa i mirisa proizvoda, ali i u kemijskoj indistriji za dobivanje važnih derivata poput jonona, metil jonona, pseudojonona, geranil nitrila, vitamina A, E i K, te u proizvodnji parfema (Coppen, 1995.; Si i sur., 2012.; Hu i sur., 2014.). Geranil nitril svježeg limunastog mirisa (sličan citralu) posebno je cijenjen zbog svoje stabilnosti u blago lužnatim uvjetima, a sintetizira se iz citrala uz amonijak kao katalizator. Koristi se kao mirisni sastojak u proizvodnji sapuna, šampona, kozmetike, parfema, deterdženata i repelenata. Pseudojonon koristi se u prehrambenoj industriji kao prehrambeni aditiv, te u proizvodnji parfema. Dobiva se reakcijom citrala i acetona u prisutnosti katalizatora (Hu i sur., 2014.).

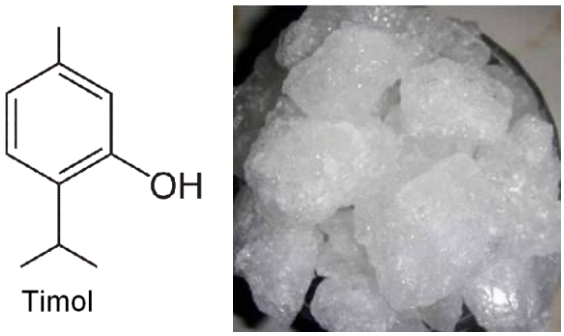
Yang i suradnici (2014.) utvrdili su repelentno i insekticidno djelovanje eteričnog ulja *Litsea cubeba* protiv duhanara *Lasioderma serricorne* i uši *Liposcelis bostrychophila,* primarnih štetnika na uskladištenim žitaricama, duhanu, uljaricama, sušenom voću i tradicionalnim kineskim medicinskim materijalima (Yang i sur., 2014.).

Kako je eterično ulje bogato aldehidima moguća je iritacija kože kod osjetljivih osoba, a može se javiti i fotoosjetljivost. Kontakt eteričnog ulja s očima može uzrokovati iritaciju i pečenje, a udisanje visokih koncentracija može iritirati grlo i uzrokovati kašalj (http://plushfolly.com, 2016.).

2.7. TIMOL

Timol (2-izopropil-5-metilfenol) je monoterpenski fenol (**Slika 11**) prisutan u eteričnim uljima mnogih biljaka iz porodice *Lamiaceae: Thymus vulgaris* (timijan), *Thymus serphyllum*

(majčina dušica), *Origanum vulgare* (origano) i mnoge druge. Eterično ulje timijana dobiva se ekstrakcijom iz biljaka (destilacijom vodenom parom) nakon čega se timol iskristalizira, dok karvakrol ostaje u tekućem stanju. Za ekstrakciju timola sve se više upotrebljava tekuća ekstrakcija pod tlakom, čime se skraćuje vrijeme ekstrakcije uz veći prinos timola i uporabu manjih količina organskih otapala. Etilni laktat, etanol i limonen učinkovita su otapala pri dobivanju timola iz eteričnog ulja timijana. Može se dobiti i sintetskim putem. U obliku je velikih bezbojnih kristala (**Slika 11**), mirisa na timijan, aromatičnog i ljutog okusa. Nije topljiv u vodi, ali je topljiv u etanolu, kloroformu i uljima (Angelov i sur., 2013.; Čančarević i sur., 2013.; http://research.omicsgroup.org, 2016.).



Slika 11 Strukturna formula (lijevo) i kristali timola (desno)
(Slika lijevo: Hyldgaard i sur., 2012.; slika desno: http://www.indianexoticoils.com/, 2016.)

Timijan je višegodišnja, žbunasta, zeljasta biljka. Donji dijelovi stabljike su drvenasti, visina stabljike je 25 – 50 cm. Listovi su sitni, tamno-zelene boje, a cvijetovi na vrhu izdanka su bijele do bijelo-ružičaste boje, također sitni. Eterično ulje timijana dobiva se iz svježih listova i cvijeta, žuto-crvene je boje, ljutog okusa i aromatičnog mirisa (**Slika 12**) (Čančarević i sur., 2013.).



Slika 12 Timijan (lijevo) i eterično ulje timijana (desno)
(Slika lijevo i slika desno: https://en.wikipedia.org, 2016.)

Glavni sastojci ulja su timol (30 – 70%) i karvakrol (3 – 15%), a ostali sastojci su *p*-cimen, *γ*-terpinen, limonen i drugi. U ulju je do 50% ukupnih fenola računato kao timol. Timol se može dobiti i iz majčine dušice te origana, ali eterično ulje tih biljaka sadrži veću količinu karvakrola u odnosu na timol (Čančarević i sur., 2013.).

Timol posjeduje antioksidativna, protuupalna, antimikrobna, imunomodulatorska, antiseptična svojstva (25 puta je jači od fenola i manje je toksičan) (Angelov i sur., 2013.; Čančarević i sur., 2013.; Castro i sur., 2015.). Kao aromatični sastojak timol se koristi u prehrambenim proizvodima, pićima, konditorskim proizvodima, ali i u proizvodnji sapuna i losiona, vodica za ispiranje usta (Listerine), pasta za zube, sirupa protiv kašlja (Cosentino i sur., 1999.). Eterična ulja koja sadrže timol široko se primjenjuju u medicini zbog antimikrobnih i dezinfekcijskih svojstava, te u proizvodnji hrane i stočne hrane (Guo i sur., 2009.). U eteričnom ulju timijana, timol i karvakrol posjeduju najsnažniju antimikrobnu aktivnost, a postotak inhibicije rasta mikroorganizama izazvan timolom je sljedeći: *Salmonella choleraesuis* 56%, *Aspergillus flavus* 67%, *Listeria monocytogenes* 80% i *Candida albicans* 100% (Guo i sur., 2009.; Čančarević i sur., 2013.).

Antibakterijsko djelovanje timol zahvaljuje hidrofobnim interakcijama s fosfolipidima membrane i hidroksilnoj skupini koja uspostavlja vodikove veze s bakterijskim stanicama i, u njima, onemogućava dinamičke procese. Hidrofobni timol oštećuje membranu gram-negativnih bakterija bogatu lipopolisaharidima, ugrađuje se u citoplazmatsku membranu i ometa njezino funkcioniranje (López-Malo i sur., 2005.; Hyldgaard i sur., 2012.; Čančarević i sur., 2013.).

Antifungalno djelovanje uključuje interakciju sa staničnom stijenkom i unutarstaničnim molekulama. Timol ometa vezikule i staničnu membranu, kao i biosintezu ergosterola čime utječe na integritet stanične membrane te povećava propusnost iona. Inhibira enzime uključene u proizvodnju energije i strukturnih staničnih sastojaka. Inhibira germinaciju spora, proliferaciju i staničnu respiraciju (López-Malo i sur., 2005.; Hyldgaard i sur., 2012.; Castro i sur., 2015.). Šegvić-Klarić i suradnici (2006.) ispitivali su antifungalnu aktivnost eteričnog ulja timijana i čistog timola na odabrane vrste plijesni. Uočeno je kako timol posjeduje tri puta veću antifungalnu aktivnost na osnovu čega se zaključuje kako se snažno antifungalno djelovanje eteričnog ulja timijana može pripisati upravo timolu, kao glavnom sastojku (Šegvić Klarić i sur., 2006.).

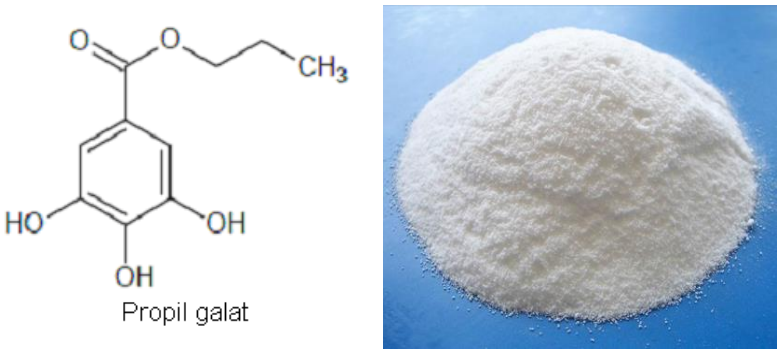
Kako je hidrofoban, otapa se u lipidnoj fazi namirnica i, na taj način, odvaja od vodene faze zbog čega se produljuje njegov kontakt s bakterijskom stanicom. Otapanje u etanolu, prije uporabe, povećava antibakterijsko djelovanje, čak i više od uporabe stabilizatora, jer se na taj način može bolje povezati s bakterijskom stanicom u vodenoj fazi hrane. Timol se može

upotrebljavati kao prehrambeni aditiv, a dodatak stabilizatora (povećava viskoznost vodene faze i usporava razdvajanje timola i vodene faze) može poboljšati njegovo djelovanje u tekućoj hrani, kao i u namirnicama s visokim sadržajem vode kada uporaba etanola kao otapala nije pogodna te u prehrambenim proizvodima u kojima su niže koncentracije poželjne iz organoleptičkih razloga (Burt i sur., 2005.).

Utvrđeno je kako timol posjeduje minimalnu potencijalnu toksičnost i predstavlja minimalnu opasnost. Kod ljudi može uzrokovati kožnu osjetljivost i iritaciju (https://www.bgrci.de, 2016.).

2.8. PROPIL GALAT

Propil galat ($C_{10}H_{12}O_5$) je propil ester 3,4,5-trihidroksibenzojeve kiseline, bijeli kristalični prah (**Slika 13**) bez mirisa, pomalo gorkog okusa (Becker, 2007.; EFSA, 2014.).



Slika 13 Strukturna formula (lijevo) i kristalični prah propil galata (desno)
(Slika lijevo: EFSA, 2014.; slika desno: http://www.powderpackchem.com, 2016.)

Slabo je topljiv u vodi, topljiv je u etanolu, etil eteru, propan-1,2-diolu, mastima i uljima. Stabilan je u neutralnoj i blago kiseloj sredini, a nestabilan je u blago lužnatoj sredini i pri zagrijavanju. Proizvodi se esterifikacijom galne kiseline i propanola na temperaturi 100 – 180 °C. Višak alkohola se uklanja destilacijom, a produkt se izolira i pročišćava kristalizacijom. Konačni proizvod se suši, prosijava i pakira (Becker, 2007.; EFSA, 2014.).

Propil galat djeluje kao hvatač slobodnih radikala čime se sprječava stvaranje i nakupljanje slobodnih radikala u kemijskim i biološkim sustavima (Becker, 2007.).

Antibakterijska aktivnost temelji se na inhibiciji respiracije i aktivnosti malat dehidrogenaze, remećenju sustava citokroma tretiranih bakterijskih stanica, inhibiciji sinteze staničnih polimera, DNK, RNK i proteina. Međutim, u koncentracijama koje se koriste u hrani, propil galat posjeduje nisku antibakterijsku aktivnost (Becker, 2007.).

Pretpostavlja se kako se antifungalna aktivnost zasniva na interakciji s membranskim fosfolipidima čime utječe na molekularnu organizaciju. Nadalje, njegova lipofilnost posjeduje važnu ulogu u njegovoj djelotvornosti. Međutim, u istraživanju koje su proveli Kubo i suradnici (2002.) propil galat nije pokazao antifungalno djelovanje prema *Saccharomyces cerevisiae, Zygosaccharomyces bailii, Candida albicans* i *Aspergillus niger* (Kubo i sur., 2001.; Leal i sur., 2009.).

U EU odobren je kao prehrambeni aditiv (E310), zahvaljujući svojim antioksidativnim svojstvima (Leal i sur., 2009.; EFSA, 2014.). Netoksičan je spoj koji posjeduje ograničeno antimikrobno djelovanje. Kako bi mu se poboljšala učinkovitost često se kombinira s drugim antioksidansima, poput BHA (butil hidroksianisol, E320) i BHT (butil hidroksitoluen, E321) (Strippoli i sur., 2000.). Najčešće se koristi za stabilizaciju biljnih i životinjskih masti jer sprječava njihovu oksidaciju, užeglost i kvarenje kao posljedicu nastanka peroksida (Van der Heijden i sur., 1986.; Becker, 2007.). Osim u prehrambenoj industriji, koristi se i u kozmetičkoj, farmaceutskoj industriji te u proizvodima za osobnu higijenu (EFSA, 2014.).

Procijenjeni prihvatljivi unos propil galata iznosi 0,5 mg/kg tjelesne težine dnevno (EFSA, 2014.). Lako se apsorbira u gastrointestinalnom traktu i hidrolizira na galnu kiselinu i propilni alkohol i dalje metilira te se biotransformacijski produkt izlučuje urinom (Van der Heijden i sur., 1986.).

Prženjem hrane na temperaturi većoj od 190 °C veže ione željeza. Kod djece, zbog mogućnosti vezanja iona željeza, može uzrokovati cijanozu (plavkasto obojenje kože uslijed snižene koncentracije kisika u krvi) te se stoga ne smije dodavati u hranu za djecu i dojenčad (Pavlinić, 2005.). Akutna toksičnost je niska, ali u većim količinama može uzrokovati iritaciju kože i želuca. Može uzrokovati kontaktni dermatitis kod pekara i drugih osoba koje su u kontaktu s propil galatom (Van der Heijden i sur., 1986.). Nije uočena genotoksičnost propil galata *in vivo* i nije kancerogen. Uočeno je vezanje za receptore estrogena u *in vitro* uvjetima, stoga se potencijalni štetni učinci *in vivo* moraju dodatno istražiti (Pavlinić, 2005.; EFSA, 2014.).

2.9. PLIJESNI

Plijesni su nitaste gljive, višestanične, heterotrofne i, gotovo isključivo, aerobni organizmi. Ne sadrže klorofil zbog čega ne mogu sami stvarati hranu pomoću sunčeve svjetlosti. Žive kao saprofiti i hrane se živom ili mrtvom organskom tvari (Tucker, 2008.; Čvek i sur., 2010.).

Nitaste, končaste stanice koje izgrađuju plijesni nazivaju se hife. Kolonija plijesni sastoji se od povezanih, umreženih hifa koje tvore micelij. Micelij se dijeli na supstratni i zračni.

Supstratni micelij predstavlja splet hifa koje prodiru duboko u organske tvari iz koje plijesan iscrpljuje hranjive sastojke. Zračni micelij se diže i raste iznad hrane i sadrži organe za razmnožavanje – sporangiofore sa sporama ili konidiofore s konidijama, koje sudjeluju u tvorbi paučinastog oblika kolonije plijesni (Škrinjar i Tešanović, 2007; Tucker, 2008.; Čvek i sur., 2010.; USDA, 2012.). Spore su malene i lagane te se lako prenose zrakom i stvaraju nove kolonije, u čemu im pomažu vlaga, temperatura i hranjiva podloga (Tucker, 2008.; Čvek i sur., 2010.).

Plijesni mogu izgledati pahuljasto ili kompaktno. Neke su baršunastog izgleda, neke djeluju suho i puderasto, a neke vlažno i želatinozno. Pigmenti u miceliju mogu biti crveni, ljubičasti, zeleni, sivi, crni, itd. (Lasztity, 2009.).

2.9.1. Značaj plijesni

Plijesni su ekonomski iznimno značajne jer se, zbog svojih korisnih metabolita, upotrebljavaju u prehrambenoj industriji za proizvodnju fermentiranih proizvoda, u farmaceutskoj industriji za proizvodnju antibiotika i drugih lijekova, te u poljoprivredi. Uporaba plijesni za dobrobit ljudi dio je biotehnologije (Carlile i sur., 2001.).

Mnoge plijesni proizvode izvanstanične enzime koji im razgrađuju polisaharide i proteine na šećere i aminokiseline, i od velikog su industrijskog značaja. Tako su zamijenili kiselinsku hidrolizu škroba u šećer jer, za razliku od kiseline, enzimi ne uzrokuju neželjene reakcije. Visokoglukozni sirup dobiva se pomoću glukoamilaza koje proizvodi *Aspergillus niger*. Glukoza oksidaza koju proizvode *Aspergillus niger* ili *Penicillium chrysogenum* dodaje se voćnim sokovima u bocama kako bi se uklonili tragovi kisika te djeluju i kao konzervans, itd. Takvi enzimatski pripravci relativno su jeftini za proizvodnju i široko su primjenjivi (Carlile i sur., 2001.). *Aspergillus niger* najčešće se koristi za industrijsku proizvodnju limunske kiseline aerobnom fermentacijom iz šećera (16 – 20 %), pri pH 5,5 – 6,5, uz amonijev nitrat kao izvor dušika i uz dodatak fosfata (Lisztity, 2009.).

Plijesni tradicionalno zauzimaju značajno mjesto u fermentaciji kobasica i zrenju šunki. Svojom aktivnošću tj. stvaranjem primarnih i sekundarnih metabolita dovode do razvoja karakterističnog okusa i izgleda ovih proizvoda. Plijesni roda *Penicillium* (*Penicillium nalgiovense*) najčešće se koriste u komercijalnim starter kulturama, a pridonose i zdravstvenoj sigurnosti proizvoda jer inhibiraju rast bakterija (*Listeria monocytogenes*) (Martinović i Moračanin, 2006.). U Aziji se plijesni roda *Aspergillus* koriste za fermentaciju soje i pšenice u proizvodnji sojinog umaka (Carlile i sur., 2001.).

Plijesni roda *Penicillium* proizvode lipaze i proteaze koje se koriste u sazrijevanju plavih sireva Roquerfort, Danablu, Gorgonzola (*Penicillium roqueforti*) te sireva Camembert i Brié (*Penicillium camemberti*) (Lisztity, 2009.). Plavi micelij *Penicillium roqueforti* te bijeli micelij *Penicillium camemberti* daju karakterističan izgled i aromu sirevima (Carlile i sur., 2001.).

Plijesni se koriste i u proizvodnji alkoholnih pića. U proizvodnji desertnih vina značajna je vrsta *Botrytis cinerea* koja uzrokuje gubitak vode u bobama grožđa, ostavljajući iza sebe povećanu količinu šećera, voćnih kiselina i minerala koji vinu daju sladak okus. Plijesni, koje se nalaze na površini žitarica enzimima razgrađuju škrob prisutan u riži, ječmu, slatkom krumpiru i koriste se za proizvodnju tradicionalnog pića sake (vina od riže) i drugih alkoholnih pića. U Japanu se za saharifikaciju u proizvodnji vina od riže koristi *Aspergillus oryzae*, dok se u Kini koristi *Rhizopus oryzae* (Carlile i sur., 2001.).

Jedan od najvažnijih lijekova za liječenje bakterijskih infekcija – penicilin – dobiva se iz zelene plijesni *Penicillium notatum* (drugi naziv je *Penicillium chrysogenum*) (Jay i sur., 2005.; Tucker, 2008.; Lisztity, 2009.).

Osim uporabe u biotehnologiji, plijesni utječu i na kvarenje hrane te ju čine nepoželjnom i neprihvatljivom za konzumaciju (Doyle, 2007.; Tucker, 2008.).

2.9.2. Svojstva plijesni

Rast plijesni

Plijesan može preživjeti pri nižim razinama dostupne vode, za razliku od bakterija. Optimalan a_w za rast je 0,80 – 0,90 (Tucker, 2008.). Međutim, neke vrste plijesni (poput plijesni roda *Eurotium*) sposobne su rasti i pri nižim vrijednostima a_w (0,65 – 0,70) (Jay i sur., 2005.), što je vidljivo u **Tablici 1**. Na raspon a_w pri kojem plijesni mogu rasti utječu temperatura i sastav hrane (Jay i sur., 2005.). Hrana koja ne sadrži puno vode (sirevi, orasi, tijesto) podložnija je kvarenju plijesnima (Marriott i Gravani, 2006.). Toleriraju nisku kiselost i mogu rasti pri rasponu pH od 2 do 8,5 dok je optimalan pH za rast od 4,5 do 5. Temperature potrebne za optimalan rast kreću se između 20 i 30 °C, što je glavni uzrok povećanog kvarenja hrane tijekom ljetnih mjeseci (Tucker, 2008.). Međutim, neke plijesni mogu rasti i pri temperaturi od 4 °C ili tek nešto iznad, a neke mogu rasti čak i pri temperaturama ispod ništice. Plijesni za rast trebaju kisik i to je razlog zašto, gotovo uvijek, rastu na površini kontaminirane hrane (Lisztity, 2009.).

Tablica 1 Rast plijesni u hrani pri različitim vrijednostima a_w

(Labuza, 1975.)

a_w	Plijesan	Prehrambeni proizvodi
0,94	*Stachybotrys atra*	Neki sirevi, suhomesnati proizvodi (šunka), pekarski proizvodi, mlijeko u prahu
0,93	*Rhizopus nigricans*	
0,90	*Trichothecium roseum*	
0,85	*Aspergillus clavatus*	Zaslađeno kondenzirano mlijeko, sirevi (čedar), fermentirane kobasice (salame), suho meso, slanina, koncentrati voćnih sokova, čokoladni sirup, voćna torta
0,84	*Byssochlamys nivea*	
0,83	*Penicillium expansum* *Penicillium islandicum* *Penicillium viridicatum*	
0,82	*Aspergillus parasiticus* *Aspergillus fumigatus*	
0,81	*Penicillium cyclopium* *Penicillium patulum*	
0,79	*Penicillium martensii*	Marcipan, melasa, suhe smokve, jako slana riba, džem, marmelada
0,78	*Aspergillus flavus*	
0,77	*Aspergillus ochraceus* *Aspergillus niger*	
0,75	*Aspergillus restrictus Aspergillus candidus*	
0,71	*Eurotium chevalieri*	
0,70	*Eurotium amstelodami*	Suho voće, kukuruzni sirup, žvakaće gume
0,61	*Monascus bisporus*	
0,60	Nema rasta	

Kvarenje namirnica

Kvarenje hrane može se definirati kao proces ili skup promjena koje proizvod čine nepoželjnim ili neprihvatljivim za ljudsku uporabu. To je neželjena promjena okusa, mirisa, boje i teksture hrane izazvana razvojem mikroorganizama i djelovanjem njihovih enzima (Moračanin i sur., 2015.).

Zygomycetes se smatraju primitivnim gljivama i široko su rasprostranjene u prirodi. Obično zahtijevaju viši a_w za rast i uzrokuju truljenje uskladištenog voća i povrća, uključujući jagode i

slatki krumpir (kvarenje najčešće uzrokuju vrste rodova *Mucor* i *Rhizopus*). Plijesni roda *Penicillium* uzrokuju kvarenje hrane i proizvode mikotoksine. Mogu uzrokovati truljenje jabuka, krušaka, agruma, kvarenje ostalog voća, žitarica, te ohlađenih i procesiranih namirnica, poput džemova i margarina. Plijesni roda *Aspergillus* rastu brže, otpornije su na visoke temperature i niži a_w od *Penicillium* vrsta. Proizvode mikotoksine, najpoznatiji su uzročnici kvarenja žitarica, graha, kikirikija, orašastih proizvoda i začina. Kontaminanti su sirovih i barenih kobasica, kuhanih šunki i pakiranog mesa (Doyle, 2007.).

Uvjeti za uništavanje rasta plijesni

Dobra proizvođačka praksa, sanitacija i higijena mogu spriječiti kontaminaciju hrane mikroorganizmima. Plijesni zahtijevaju određene uvjete za rast i, stoga, mijenjanjem vanjskih čimbenika i okoline hrane moguće je odgoditi kvarenje (Doyle, 2007.). Glavni čimbenici o kojima ovisi rast plijesni na prehrambenim proizvodima su a_w, pH, kisik, temperatura i prisutnost drugih mikroorganizama. Pokazalo se da temperatura, pH i a_w zajedno djeluju na rast plijesni, te ako jedan ili više čimbenika postane ograničavajući, razvoj plijesni se, u velikoj mjeri, smanjuje ili čak zaustavlja (Dijksterhuis i Samson, 2007.).

Voda dostupna za metaboličku aktivnost određuje opseg rasta mikroorganizama i obično se izražava kao aktivitet vode (a_w) (Carlile i sur., 2001.; Jay i sur., 2005.). Za kontrolu kontaminacije plijesnima i sprječavanje njihovog rasta na prehrambenim proizvodima važno je smanjiti dostupnost vode što se može postići dodavanjem soli, šećera i aditiva (vežu jedan dio vode), podvrgavanjem namirnice niskim temperaturama (hlađenje ili zamrzavanje) ili kontrolom vlažnosti prostora za skladištenje (Duraković i sur., 2002.; Adams i Moss, 2008.; Pitt i Hocking, 2009.). Kada se plijesni nalaze u okruženju u kojem je nizak a_w i, posljedično, visok osmotski tlak, stanice osmozom gube vodu što utječe na apsorpciju nutrijenata, biosintezu proteina i enzimsku aktivnost stanica (Jay i sur., 2005.; Pitt i Hocking, 2009.). Snižavanje a_w ispod optimalne razine inhibira početak aktivnog rasta plijesni, smanjuje rast i opseg kolonizacije čime se smanjuje kontaminacija u prehrambenim proizvodima (Carlile i sur., 2001.; Duraković i sur., 2002.; Adams i Moss, 2008.; Pitt i Hocking, 2009.).

Većinu plijesni uništava zagrijavanje pri 60 °C tijekom 5 – 10 minuta. Međutim, askospore koje nastaju spolnim razmnožavanjem otpornije su na nepovoljne uvjete. Dospijevaju u ambalažu nakon procesiranja hrane i izvor su kontaminacije, a uništavaju se produženim zagrijavanjem na temperaturama iznad 90 °C (Jay i sur., 2005.; Tucker, 2008.). Mnoge plijesni rastu sporo ili nikako pri niskim temperaturama pa čuvanje hrane u hladnjaku može smanjiti njihovu brzinu rasta. Nedostatak kisika, npr. pakiranjem u modificiranoj atmosferi, može usporiti ili spriječiti rast plijesni (Doyle, 2007). Plijesni ne mogu rasti ako je prisustvo

CO_2 veliko (5 – 8%), međutim, neke rastu pri niskim koncentracijama kisika, čak i u pakiranjima u vakuumu (Marriott i Gravani, 2006.). U hranu (pekarski proizvodi, meso, sokovi) ili u pakiranje za sprječavanje rasta plijesni mogu se dodati antimikrobni spojevi, poput organskih kiselina, začina i eteričnih ulja (origano, timijan, cimet, vanilija) (Doyle, 2007.).

Mikotoksini

Svojim metabolizmom plijesni proizvode različite kemijske spojeve, a jedna od važnijih skupina metabolita su mikotoksini koji uzrokuju mnoge bolesti nazvane mikotoksikoze. Mikotoksini su toksični sekundarni metaboliti plijesni, a nalaze se u hrani biljnog i životinjskog porijekla (Peraica i Rašić, 2012.). Biosinteza mikotoksina nastaje kao odgovor na okolišne uvjete (a_w, temperatura, koncentracija kisika, pH supstrata) (Čvek i sur., 2010.). Vrste plijesni rodova *Aspergillus, Penicillium, Fusarium* i *Alternaria* najčešće se navode kao potencijalni proizvođači mikotoksina (Kocić-Tanackov i Dimić, 2013.).

Mikotoksini djeluju na energetski metabolizam, na strukture i funkcije bioloških membrana, reagiraju s nukleinskim kiselinama i inhibiraju biosintezu DNK, RNK ili proteina. Do nastanka mikotoksikoze dolazi izravnim ili neizravnim stalnim unosom manjih koncentracija putem kontaminirane hrane (Delaš i sur., 2010.). Danas je poznato više od 400 vrsta mikotoksina, međutim, svega nekoliko mikotoksina je dobro opisano u toksikologiji (Peraica i Rašić, 2012.; Kocić-Tanackov i Dimić, 2013.). Većina mikotoksina je termostabilna te se tijekom termičke obrade hrane njihova koncentracija samo neznatno smanjuje. Ne postoji jedinstvena metoda za uklanjanje plijesni stoga je važna prevencija nastanka mikotoksina (Peraica i Rašić, 2012.).

Aflatoksini su sekundarni metaboliti *Aspergillus flavus* i *A. parasiticus*, ali i drugih rodova i vrsta plijesni. Najvažniji aflatoksini su B_1, B_2, G_1, G_2, M_1, M_2. Mogu nastati na žitaricama prije žetve, tijekom skladištenja i za vrijeme prerade. Aflatoksin B_1 najjači je hepatokancerogen (Peraica i Rašić, 2012.), a nalazi se u poljoprivrednim proizvodima, žitaricama, uljaricama, kavi, riži, kikirikiju, pistacijama. Aflatoksin M_1 hepatokancerogeni je spoj koji se može naći u mlijeku i mliječnim proizvodima (Delaš i sur., 2010.). Aflatoksini posjeduju imunosupresivno, mutageno, teratogeno i kancerogeno djelovanje (Domaćinović i sur., 2012.). Otporni su na utjecaj visokih temperatura i razgrađuju se tek na temperaturama višim od 250 °C (Kocić-Tanackov i Dimić, 2013.).

Okratoksini su sekundarni metaboliti *Aspergillus ochraceus* i *Penicillium verrucosum.* Najvažniji okratoksini su OTA, OTB, OTC i OTα. Okratoksin A je najrasprostranjeniji i

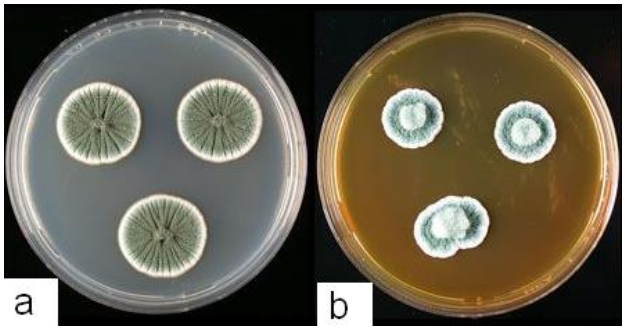
najtoksičniji, posjeduje hepatotoksično, nefrotoksično, genotoksično, kancerogeno i imunosupresivno djelovanje. Pretpostavlja se da bi mogao biti uključen u etiologiju balkanske endemske nefropatije (teška kronična bolest bubrega) (Delaš, 2010.; Peraica i Rašić, 2012.).

Fuzariotoksini su sekundarni metaboliti plijesni roda *Fusarium*. Najčešće kontaminiraju žitarice i proizvode na bazi žitarica. Najučestaliji i najtoksičniji fuzariotoksini su iz grupe fumonizina, trihotecena i zearalenona. Fumonizini kod ljudi i životinja mogu djelovati hepatotoksično, nefrotoksično, neurotoksično, uzrokovati degeneraciju koštane srži i neuromišićnih veza (Delaš, 2010.; Peraica i Rašić, 2012.; Kocić-Tanackov i Dimić, 2013.). Najčešći trihoteceni u hrani su T-2 toksin, HT-2 toksin, deoksinivalenol ili vomitoksin (DON) (Delaš, 2010). Izazivaju gastrointestinalne, dermatološke, neurološke simptome kod životinja, dok se kod ljudi trovanje, najčešće, povezuje s probavnim i imunotoksičnim posljedicama (Domaćinović i sur., 2012.). Zearalenon posjeduje estrogensko djelovanje i dovodi se u vezu s preuranjenim pubertetom, uzrokuje poremećaje u reproduktivnom i endokrinom sustavu (Pepeljnjak i sur., 2008.).

2.9.3. Opće osobine plijesni *Penicillium aurantiogriseum*

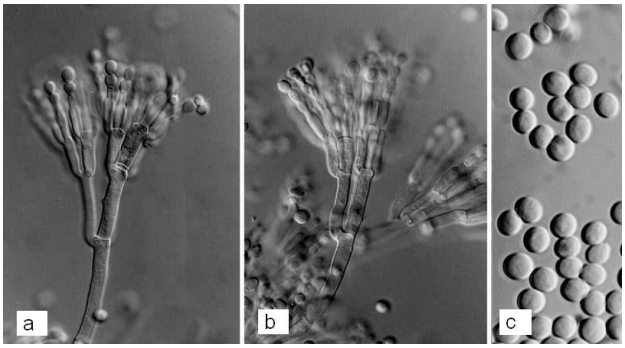
Kolonije na CYA (Czapekovom kvaščevom agaru) (**Slika 14**) promjera su 30 – 37 mm, radijalno naborane, umjereno guste, glatke do zrnate strukture, relativno sporo rastu; micelij je bijele boje, uglavnom neprimjetan; proizvodnja konidija umjerena do jaka, sivkasto-tirkizne do zelene boje; eksudat obično upadljiv, svijetle do smeđe boje; ponekad se izlučuje crvenkasto-smeđi topljivi pigment; boja donje površine kolonije je svijetla, narančasta ili crvenkasta do ljubičasto-smeđa (Pitt i Hocking, 2009.)

Kolonije na MEA (maltoznom agaru) (**Slika 14**) promjera su 24 – 35 mm, ravne ili rijetko radijalno naborane, niske i relativno raštrkane, površinska tekstura je fino granulirana; micelij je obično ispod površine, povremeno primjetan i tada je svjetlo-žute boje; proizvodnja konidija umjerena do jaka, sivkasto-tirkizne do zelene boje; ponekad se izlučuje žuto-smeđi do crvenkasto-smeđi topljivi pigment; boja donje površine kolonije je blijeda, narančasta ili crvenkasto-smeđa (Pitt i Hocking, 2009.)



Slika 14 Kolonije *P. aurantiogriseum* na CYA (a) i MEA (b), 7 dana, 25 °C (Frisvad i Samson, 2004.)

Konidiofore se granaju od subpovršinskih hifa, duge su 200 – 400 µm, stijenke glatke do fino hrapave. Fijalide vitke, duge 7 – 10 µm. Konidije su okruglastog oblika, rjeđe elipsoidnog, dužine 3 – 4 µm, s glatkim stijenkama (**Slika 15**) (Pitt i Hocking, 2009.).



Slika 15 Konidiofore (a, b) i konidije (c) *P. aurantiogriseum* (Pitt i Hocking, 2009.)

Optimalna temperatura za rast *P. aurantiogriseum* je 23 °C, dok je minimalna temperatura za rast –2 °C, a maksimalna 30 °C. Minimalan a_w potreban za rast je 0,81 (Pitt i Hocking, 2009.).

Proizvodi sekundarne metabolite među kojima su mikotoksini: penicilinska kiselina, verukozidin, rokefortin C i nefrotoksični glikopeptidi, obično manjeg značaja. Verukozidin uzrokuje mikotoksikoze kod životinja. Nefrotoksini koje luči *P. aurantiogriseum* često se dovode u vezu s balkanskom endemskom nefropatijom (Samson i sur., 2004.; Blackburn, 2006.). Na uskladištenim žitaricama proizvodi hlapljive spojeve: 1-propanol, 3-heptanon, 1,3-oktadien, 3-oktanon i druge (Dijksterhuis i Samson, 2007.; Pitt i Hocking, 2009.).

P. aurantiogriseum jedna je od najčešćih plijesni na svijetu, sveprisutna je u sazrijevanju ili sušenju usjeva, posebno žitarica i proizvoda od žitarica. Često se može izolirati i iz orašastih

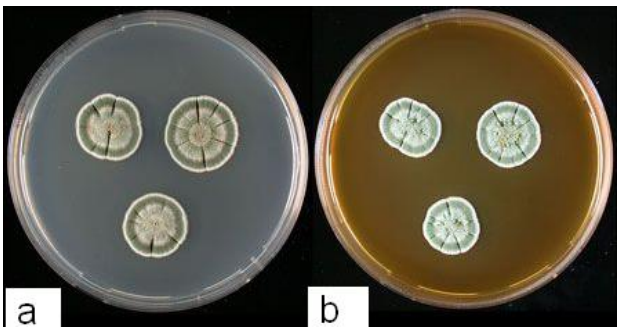
plodova. Uzrokuje kvarenje uskladištenog voća i povrća, uključujući jabuke, kruške, jagode, grožđe, lubenice, rajčice, krumpir (Pitt i Hocking, 2009.). U SAD-u uzrokuje bolest koja se naziva "plavo oko" i dovodi do kvarenja kukuruza nakon žetve u vlažnim i hladnim skladištima (Balckburn, 2006.).

Lipaze koje izlučuje *P. aurantiogriseum* našle su primjenu u industriji u proizvodnji monoglicerida, a koriste se i za određivanje koncentracije triglicerida u krvi (Lima i sur., 2003.).

2.9.4. Opće osobine plijesni *Penicillium brevicompactum*

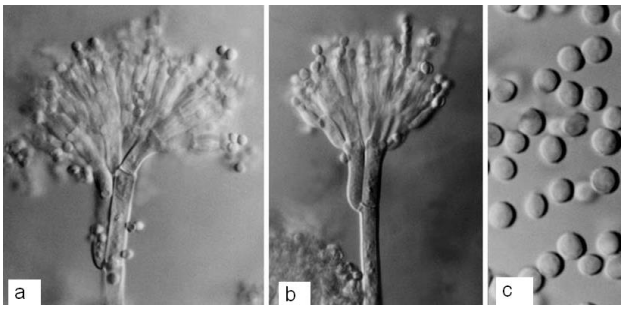
Kolonije na CYA (**Slika 16**) promjera su 20 – 30 mm, radijalno naborane, umjereno duboke i guste; micelij je bijele boje; proizvodnja konidija slaba do umjerena, zelene boje; eksudat obično prisutan u malim kapljicama, ponekad obilan, svijetlo do tamno crvenkasto-smeđe boje; izlučuje se crvenkasto-smeđi topljivi pigment; boja donje površine kolonije je žućkasta do crvenkasta.

Kolonije na MEA (**Slika 16**) promjera su 12 – 22 mm, ravne ili rijetko radijalno naborane; micelij je bijele boje; proizvodnja konidija umjerena do jaka, zelene do tamnozelene boje, rijetko svjetlija ili više plavkasta; ponekad je prisutan eksudat crvenkasto-smeđe boje; boja donje površine kolonije je blijeda ili smeđa (Pitt i Hocking, 2009.)



Slika 16 Kolonije *P. brevicompactum* na CYA (a) i MEA (b), 7 dana, 25 °C (Frisvad i Samson, 2004.)

Konidiofore kompaktne, granaju se od površine micelija, obično su široke, duge 500 – 800 µm, s glatkim stijenkama. Metule su kratke i široke. Fijalide duge 6 – 9 µm. Konidije su elipsoidnog oblika, dužine 2,5 – 3,5 µm, s glatkim do vrlo fino hrapavim stijenkama (**Slika 17**) (Pitt i Hocking, 2009.).



Slika 17 Konidiofore (a, b) i konidije (c) *P. brevicompactum* (Pitt i Hocking, 2009.)

Optimalna temperatura za rast *P. brevicompactum* je 23 °C, dok je minimalna temperatura za rast –2 °C, a maksimalna 30 °C. Minimalan a_w potreban za germinaciju i rast je 0,78 pri 25 °C (Pitt i Hocking, 2009.).

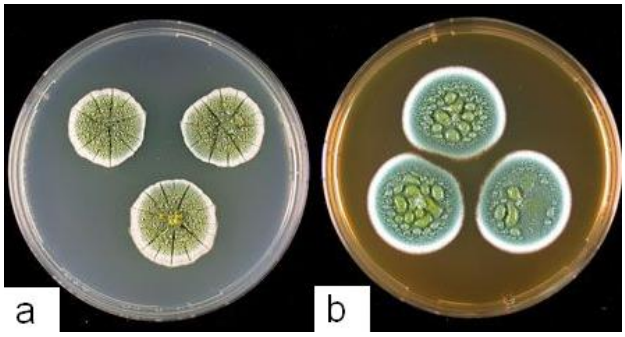
Proizvodi sekundarne metabolite među kojima je mikotoksin mikofenolna kiselina, slabo toksičan spoj. Zbog snažnog imunosupresivnog djelovanja primjenjuje se kod pacijenata prilikom transplantacije srca i bubrega kako bi se izbjeglo odbacivanje. Iako mikofenolna kiselina posjeduje nisku akutnu toksičnost, zbog imunosupresivnog djelovanja može biti veoma važan indirektan mikotoksin koji svojim djelovanjem olakšava bakterijsku i gljivičnu infekciju. Mikofenolna kiselina prilično se često javlja u hrani (Dijksterhuis i Samson, 2007.).

P. brevicompactum može se izolirati iz suhe hrane: graha, soje, pistacija, kikirikija, zrna papra, brazilskog i indijskog oraščića. U Europi se, često, može naći u mesnim proizvodima, salami te šunki. Također, uzrokuje kvarenje namirnica u hladnjaku, poput sira i drugih mliječnih proizvoda te margarina. Pronađena je i u flaširanoj vodi i pekarskim proizvodima. Slabi je patogen koji uzrokuje kvarenje uskladištenih jabuka, gljiva, krumpira, bundeva, grožđa, soje, kukuruza, kikirikija, đumbira (Pitt i Hocking, 2009.). Uzrokuje truljenje drveta, a pronađena je i u kućnoj prašini (Scott i sur., 2008.).

2.9.5. Opće osobine plijesni *Penicillium chrysogenum*

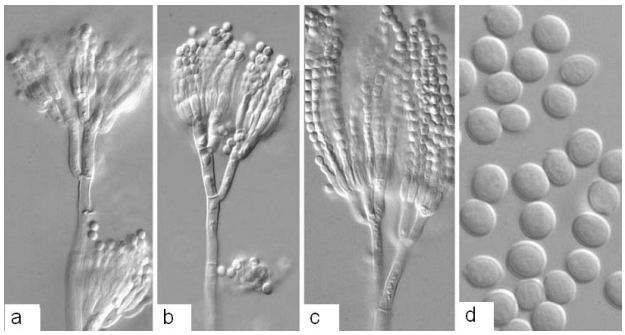
Kolonije na CYA (**Slika 18**) promjera su 35 – 45 mm, ponekad manje, radijalno naborane, obično niske; micelij je bijele do žućkaste boje; proizvodnja konidija slaba do umjerena, sivkasto-tirkizne do zelene boje, u nekim se sojevima javlja više žuto-zelena boja zbog prisutnosti eksudata; eksudat blijedo do sjajno žute ili žuto-smeđe boje; obično se izlučuje svijetlo žuti topljivi pigment; boja donje površine kolonije je sjajno žuta do žuto-smeđa, u prisutnosti topljivog pigmenta blijeda ili crveno-smeđa.

Kolonije na MEA (**Slika 18**) promjera su 25 – 40 mm, obično ravne i niske, ponekad vunaste ili zrnaste u sredini; micelij neprimjetan; proizvodnja konidija umjerena do jaka, sivkasto-tirkizne do zelene boje; boja donje površine kolonije je blijeda, žućkasta, žućkasto-smeđa ili crvenkasto-smeđa (Pitt i Hocking, 2009.)



Slika 18 Kolonije *P. chrysogenum* na CYA (a) i MEA (b), 7 dana, 25 °C
(Frisvad i Samson, 2004.)

Konidiofore se granaju od površinskih hifa, duge su 200 – 300 µm, stijenke glatke. Fijalide duge 7 – 8 µm. Konidije elipsoidne do loptaste, dužine 2,5 – 4 µm, s glatkim stijenkama (**Slika 19**) (Pitt i Hocking, 2009.).



Slika 19 Konidiofore (a, b, c) i konidije (d) *P. chrysogenum*
(Pitt i Hocking, 2009.)

Optimalna temperatura za rast *P. chrysogenum* je 23 °C, dok je minimalna temperatura za rast 4 °C, a maksimalna 37 °C. Minimalan a_w potreban za germinaciju i rast je 0,78. Minimalna inhibitorna koncentracija sorbinske kiseline je 1 – 2 mmol/l u rasponu pH 4 – 6 (Pitt i Hocking, 2009.).

Proizvodi sekundarne metabolite među kojima su mikotoksini: rokefortin C, PR toksin i penicilin. *P. chrysogenum* ne predstavlja ozbiljan izvor mikotoksina u hrani (Pitt i Hocking,

2009.). Penicilini G i V, koje proizvodi, izravno se koriste ili služe za proizvodnju prekursora penicilina 6-APA, sintezu polusintetskih penicilina, penicilina širokog spektra djelovanja (ampicilin, amoksicilin), poboljšanih penicilina produženog farmakokinetičkog djelovanja i drugih vrsta penicilina, zbog jednostavnosti i sigurnosti primjene (FDA i WHO certificirali su *P. chrysogenum* kao GRAS). Proizvodi hlapljive spojeve: 1-hepten, 1,3-oktadien, 3-heptanon, 1-nonen, i druge (Dijksterhuis i Samson, 2007.)

P. chrysogenum sveprisutna je plijesan s vrlo širokim spektrom staništa. Češće kontaminira hranu nego *P. aurantiogriseum*. Soj *P. chrysogenum* koji proizvodi visoke količine penicilina izoliran je iz pljesnivih dinja, povremeno uzrokuje kvarenje uskladištenog grožđa (Blackburn, 2006). Često se može naći na žitaricama (riža, pšenica, ječam, kukuruz, brašno), u grickalicama na bazi krumpira, mesu, pršutu, siru, sušenoj ribi, orašastim plodovima, začinima. Moguće ga je naći u aromatiziranim mliječnim proizvodima, pekarskim proizvodima, margarinu. U Europi se koristi kao starter kultura za proizvodnju fermentiranih mesnih proizvoda (netoksikogeni soj koristi se kao starter kultura u zrenju pršuta) (Pitt i Hocking, 2009.). Međutim, prisutnost penicilina u hrani je moguća, ali i nepoželjna, jer može uzrokovati alergijske reakcije (Dijksterhuis i Samson, 2007.). Uobičajeno se javlja u zatvorenim prostorima kao dio kućne prašine, vlažnih građevinskih materijala i unutrašnjeg zraka (Houbraken i sur., 2011.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Cilj rada bio je istražiti antifungalni učinak eteričnih ulja *Cinnamomum cassia* i *Litsea cubeba* te timola i propil galata na odabrane vrste plijesni: *Penicillium aurantiogriseum, P. brevicompactum* i *P. chrysogenum*. Određena je minimalna inhibitorna (MIK) i minimalna fungicidna (MFK) koncentracija eteričnih ulja. Nadalje, zadatak je bio istražiti učinak eteričnih ulja u inhibiciji linearnog rasta kolonije plijesni tijekom uzgoja na krumpirovom agaru s glukozom (PDA) pri dvije različite vrijednosti a_w (0,98 i 0,93).

3.2. MATERIJALI I METODE

3.2.1. Eterična ulja

U radu su upotrijebljena eterična ulja *Cinnamomum cassia* i *Litsea cubeba,* nabavljena od China Aroma Chemical Co., Ltd (Hangzhou, Narodna Republika Kina) te timol (Sigma-Aldrich, SAD; 99,5%) i propil galat (Fluka – Sigma-Aldrich, SAD; > 98%).

3.2.2. Kulture plijesni

Vrste plijesni roda *Penicillium* upotrijebljene u radu su: *P. aurantiogriseum, P. brevicompactum* i *P. chrysogenum.* Plijesni su nabavljene iz kolekcije kultura mikroorganizama iz Republike Češke (Czech culture collection of Fungi; Prirodoslovni fakultet, Prag, Republika Češka). Plijesni su čuvane u sterilnoj demineraliziranoj vodi pri +4 °C, a nacijepljene su na kosi agar s ekstraktom slada (MEA) prije analize i inkubirane 5 dana pri 25 °C.

Nakon inkubacije, pripremljena je suspenzija spora plijesni u otopini agara s Tweenom 80 (Tween 80; Biolife, Italija; Agar tehnički, Biolife, Italija) ATw80 (0,1% agar s 0,05% Tween 80) i prebrojavanjem stanica u Bürker-Türkovoj komorici određen je broj spora u 1 ml suspenzije spora. Za određivanje antifungalnog učinka eteričnih ulja i sastojaka pripremljena je suspenzija spora plijesni koncentracije 10^5/ml, dok je za određivanje inhibicije linearnog rasta kolonije plijesni pripremljena suspenzija spora plijesni koncentracije 10^6/ml.

3.2.3. Određivanje minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne fungicidne (MFK) koncentracije eteričnih ulja i sastojaka

Antifungalni učinak eteričnih ulja i sastojaka (timola i propil galata) (MIK i MFK) ispitan je macrobroth metodom u tekućoj podlozi – bujonu s ekstraktom kvasca i saharozom (YESB) čiji je a_w prilagođen zamjenom demineralizirane vode glicerolom na 0,93 i 0,98.

Tvari su otopljene u otopini sterilne demineralizirane vode, Tweena 80 i 96% etanola u koncentraciji koja ne inhibira rast plijesni. U 5 ml sterilnog bujona preneseno je po 100 µl suspenzije spora plijesni koncentracije 10^5/ml. U epruvetu je preneseno po 50 µl otopine istraživane tvari željene koncentracije i inkubirano u tresilici uz 200 rpm pri 25 °C tijekom 48 sati. Nakon inkubacije, iz epruvete u kojoj nije ustanovljen porast plijesni, preneseno je 100 µl tekućeg uzgoja u sterilnu podlogu (YESB) bez inhibirajućeg sastojka i inkubirano 48 sati pri 25 °C. Ukoliko i nakon inkubacije plijesan nije porasla u podlozi, pripadajuća koncentracija eteričnog ulja je minimalna fungicidna koncentracija (MFK). U epruveti u kojoj je, nakon inkubacije, primijećen porast plijesni, pripadajuća koncentracija je minimalna inhibitorna koncentracija (MIK). Sve koncentracije su ispitane u paralelama.

3.2.4. Inhibicija linearnog rasta kolonije plijesni

Inhibicija linearnog rasta kolonije plijesni *P. aurantiogriseum, P. brevicompactum* i *P. chrysogenum* ispitana je na krumpirovom agaru s glukozom (PDA; Biolife, Italija). Aktivitet vode PDA modificiran je zamjenom demineralizirane vode glicerolom na dvije vrijednosti a_w (0,93 i 0,98). Istražen je učinak tri koncentracije antifungalnih spojeva na linearan rast kolonija plijesni. Aktivitet vode modificiranog PDA provjeren je a_w metrom (HygroPalm AW1; Rotronic Instrument Corp., SAD). Modificirani PDA steriliziran je pri 121 °C tijekom 15 minuta i ohlađen na 50 °C u vodenoj kupelji. Nakon hlađenja, u podlogu je dodana odgovarajuća koncentracija antifungalnog spoja otopljenog u 35 g sterilne demineralizirane vode uz 10 g 10% Tween 80 i 5 g 96% etanola.

U sterilne prazne Petrijeve zdjelice sterilnom pipetom preneseno je po 20 ml podloge i ostavljeno do skrutnjavanja. Nakon skrutnjavanja, središte podloge u zdjelici je nacijepljeno s 2 µl suspenzije spora koncentracije 10^6/ml. Podloge su pripremljene u triplikatu i inkubirane u zatvorenim PVC vrećicama pri 25 °C tijekom 28 dana. Promjer kolonije plijesni mjeren je svakodnevno pomoću ravnala u dva, međusobno okomita smjera. Inhibitorni učinak eteričnih ulja ispitan je u odnosu na kontrole (modificirani PDA bez dodatka antifungalnih spojeva).

3.3. OBRADA REZULTATA

Rezultati rada obrađeni su pomoću računalnih programa Microsoft Office Excel 2003 za Windows (Microsoft Corporation, Redmond, SAD) i GraphPad Prism verzija 5.00 za Windows (GraphPad Software, San Diego, SAD).

4. REZULTATI

4.1. MINIMALNA INHIBITORNA (MIK) i MINIMALNA FUNGICIDNA (MFK) KONCENTRACIJA ETERIČNIH ULJA, TIMOLA I PROPIL GALATA

Tablica 2 Antifungalni učinak eteričnih ulja *Cinnamomum cassia* i *Litsea cubeba* te timola i propil galata (a_w = 0,93)

Vrste roda *Penicillium*	***Cinnamomum cassia***		***Litsea cubeba***		**Timol**		**Propil galat**	
	MIK	**MFK**	**MIK**	**MFK**	**MIK**	**MFK**	**MIK**	**MFK**
P. aurantiogriseum	<125	>125	250	500	250	1000	-	-
P. brevicompactum	125	>125	250	500	250	1000	-	-
P. chrysogenum	125	>125	250	500	250	1000	-	-

* Koncentracija izražena u ppm

Tablica 3 Antifungalni učinak eteričnih ulja *Cinnamomum cassia* i *Litsea cubeba* te timola i propil galata (a_w = 0,98)

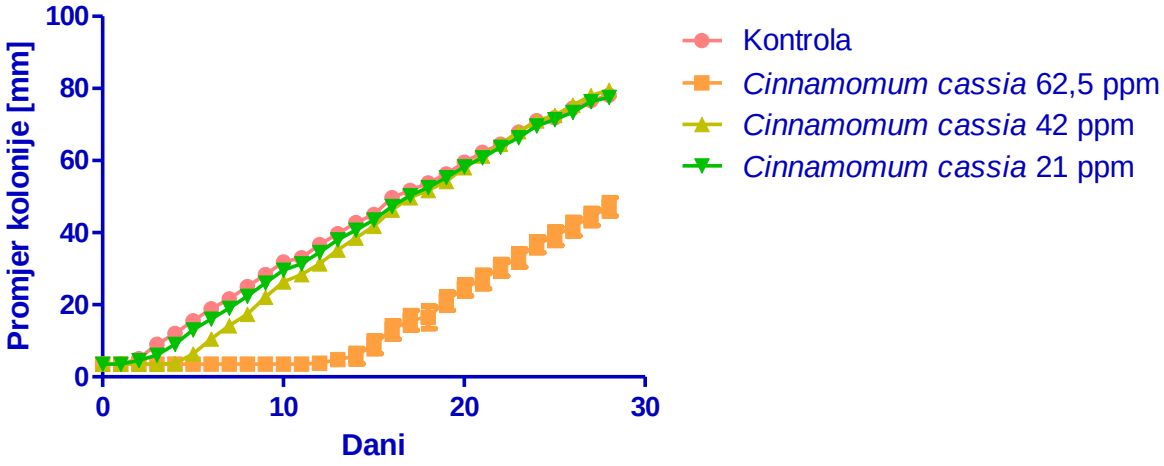
Vrste roda *Penicillium*	***Cinnamomum cassia***		***Litsea cubeba***		**Timol**		**Propil galat**	
	MIK	**MFK**	**MIK**	**MFK**	**MIK**	**MFK**	**MIK**	**MFK**
P. aurantiogriseum	<125	>125	500	>500	500	2000	-	-
P. brevicompactum	<250	>250	250	1000	500	2000	-	-
P. chrysogenum	<125	>125	250	500	500	2000	-	-

* Koncentracija izražena u ppm

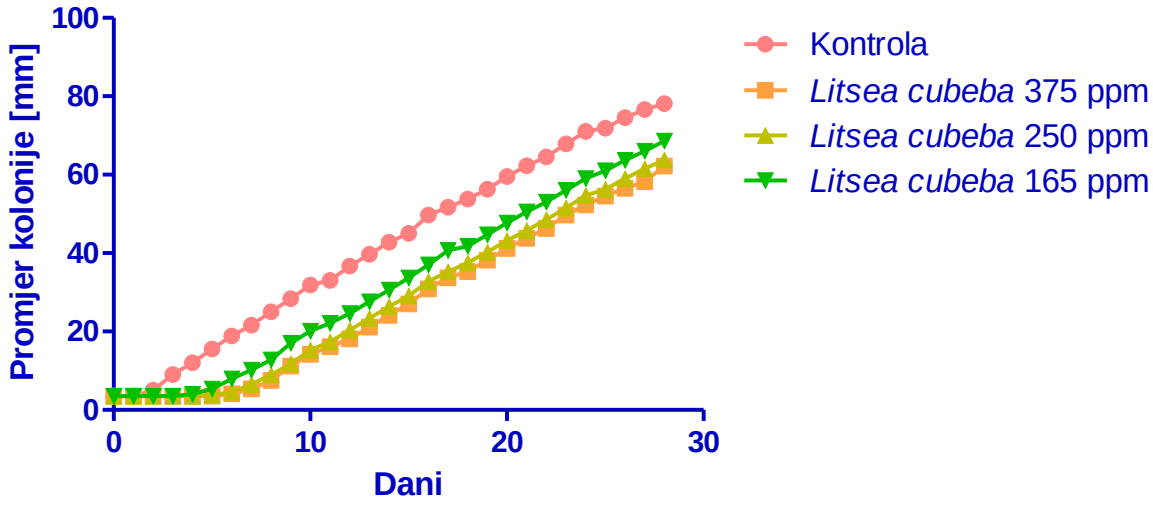
4.2. INHIBICIJA LINEARNOG RASTA KOLONIJA PLIJESNI ETERIČNIM ULJIMA *Cinnamomum cassia* I *Litsea cubeba,* TE TIMOLOM I PROPIL GALATOM

4.2.1. Inhibicija linearnog rasta kolonija plijesni pri a_w 0,93

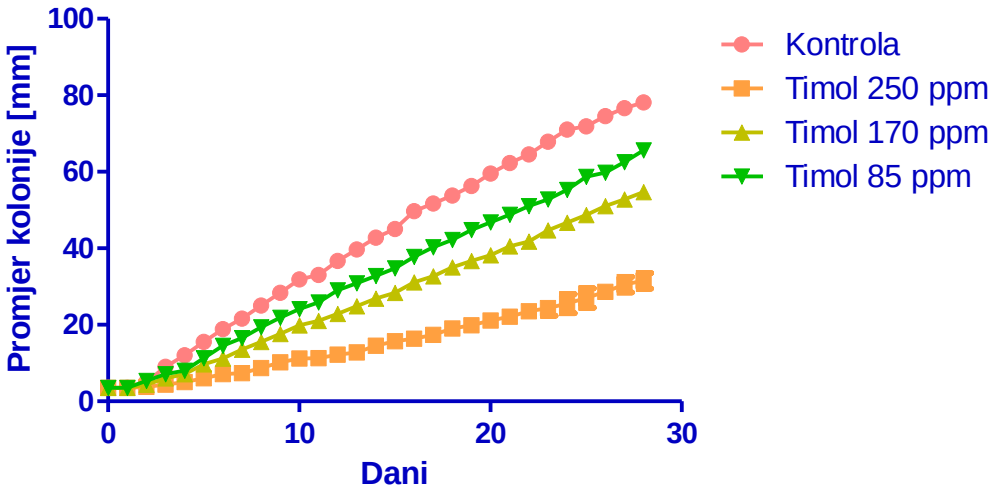
Penicillium aurantiogriseum



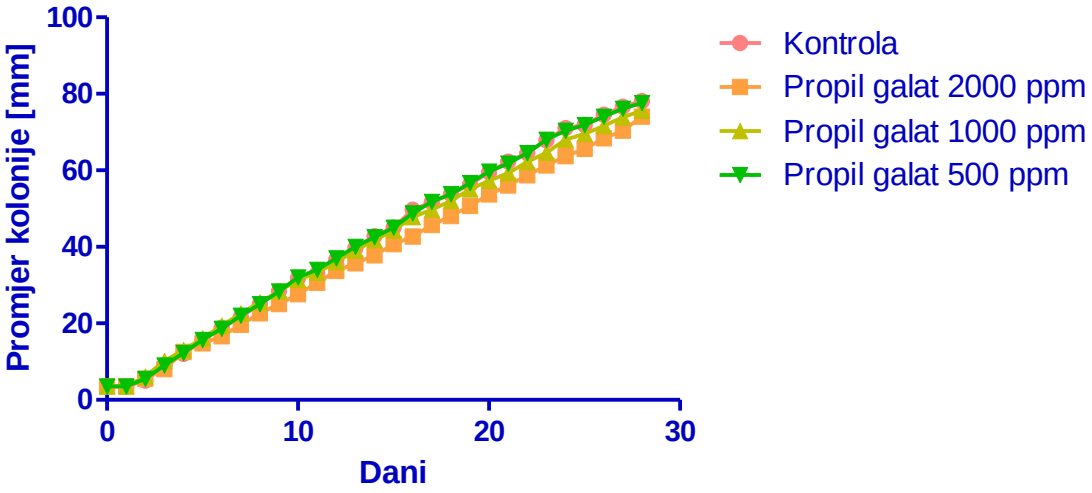
Slika 20 Inhibicija rasta plijesni *Penicillium aurantiogriseum* eteričnim uljem *Cinnamomum cassia*



Slika 21 Inhibicija rasta plijesni *Penicillium aurantiogriseum* eteričnim uljem *Litsea cubeba*

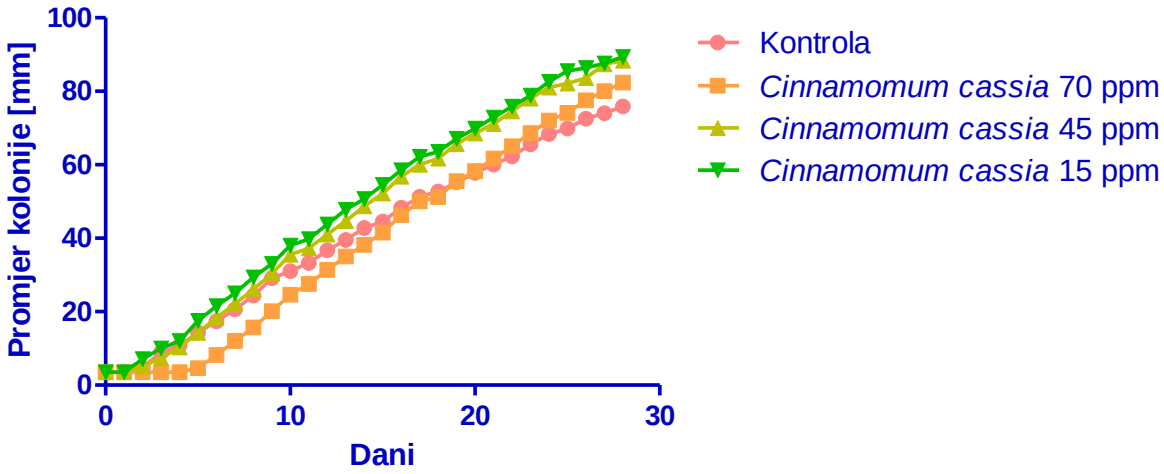


Slika 22 Inhibicija rasta plijesni *Penicillium aurantiogriseum* timolom

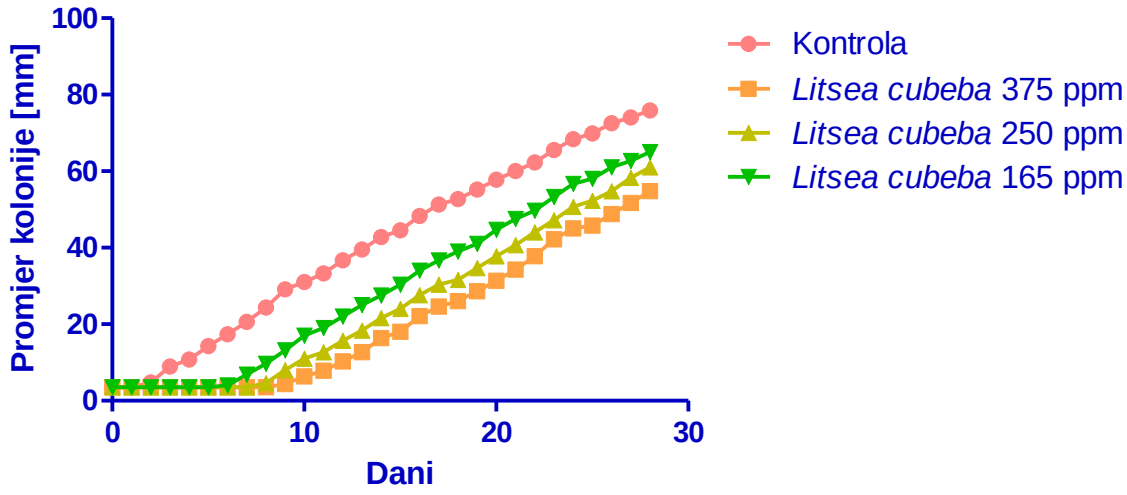


Slika 23 Inhibicija rasta plijesni *Penicillium aurantiogriseum* propil galatom

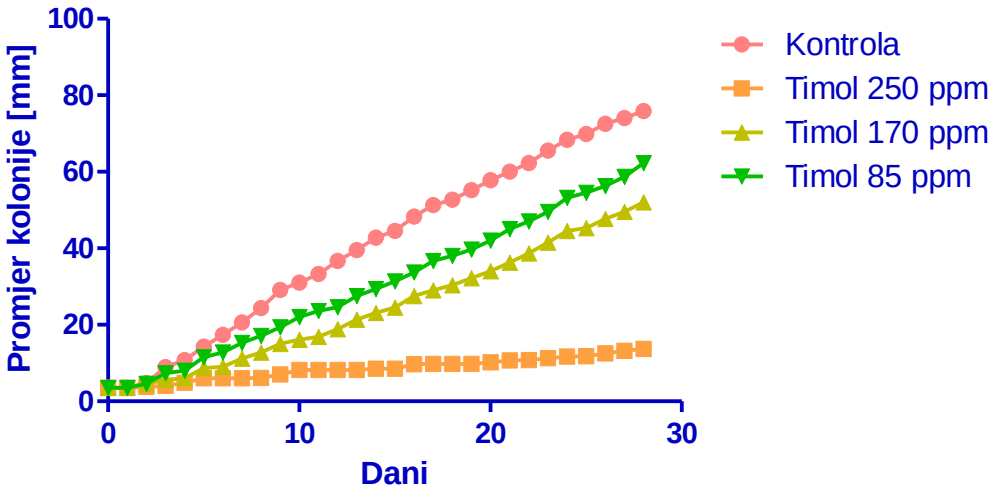
Penicillium brevicompactum



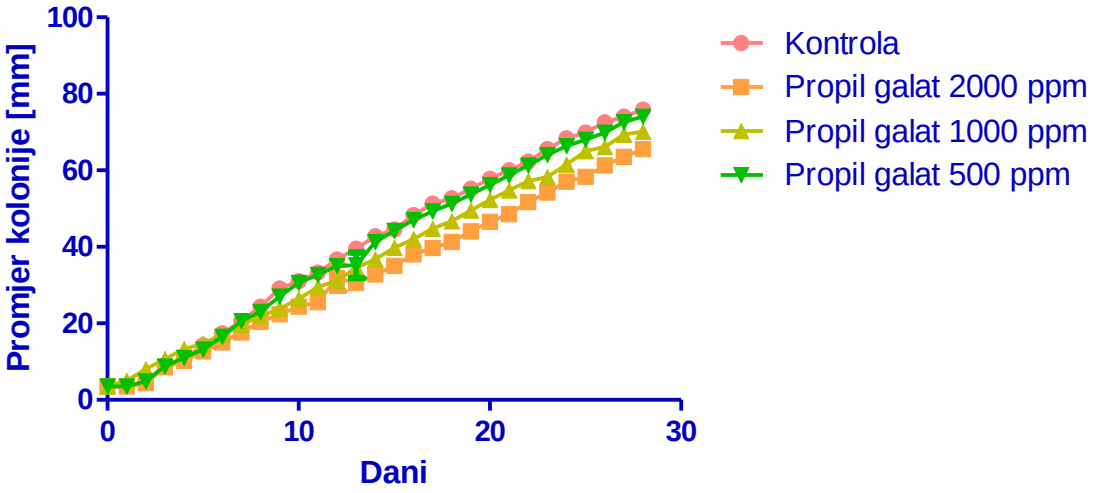
Slika 24 Inhibicija rasta plijesni *Penicillium brevicompactum* eteričnim uljem *Cinnamomum cassia*



Slika 25 Inhibicija rasta plijesni *Penicillium brevicompactum* eteričnim uljem *Litsea cubeba*

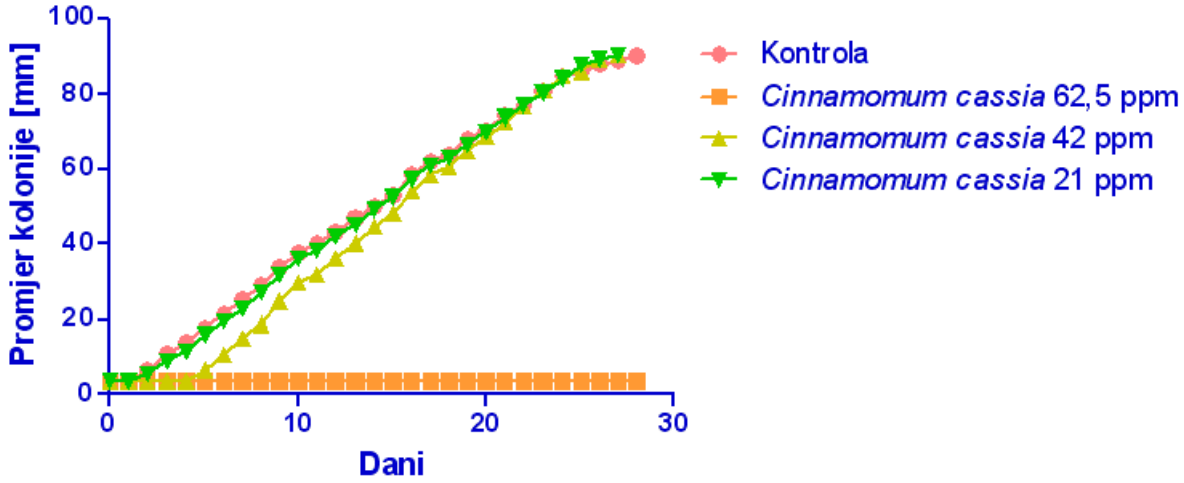


Slika 26 Inhibicija rasta plijesni *Penicillium brevicompactum* timolom

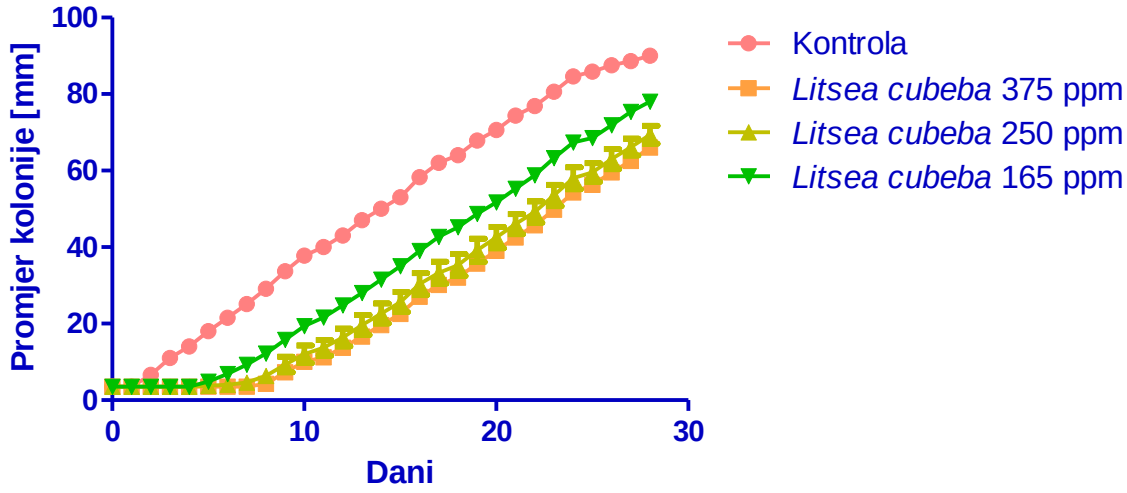


Slika 27 Inhibicija rasta plijesni *Penicillium brevicompactum* propil galatom

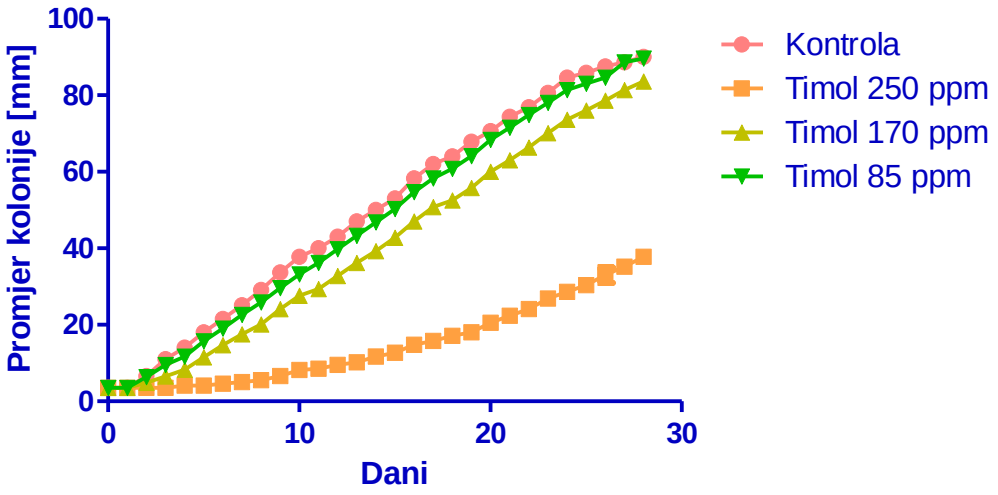
Penicillium chrysogenum



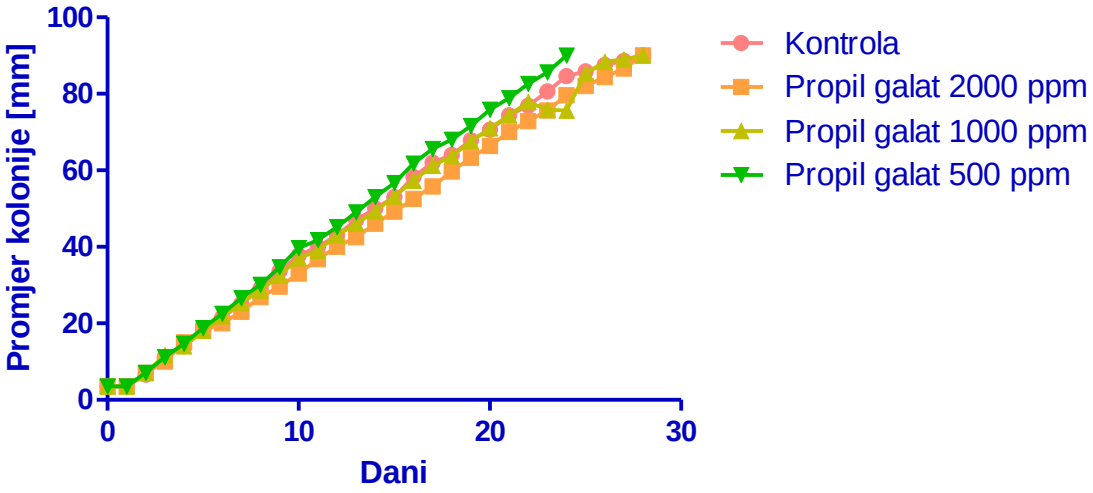
Slika 28 Inhibicija rasta plijesni *Penicillium chrysogenum* eteričnim uljem *Cinnamomum cassia*



Slika 29 Inhibicija rasta plijesni *Penicillium chrysogenum* eteričnim uljem *Litsea cubeba*



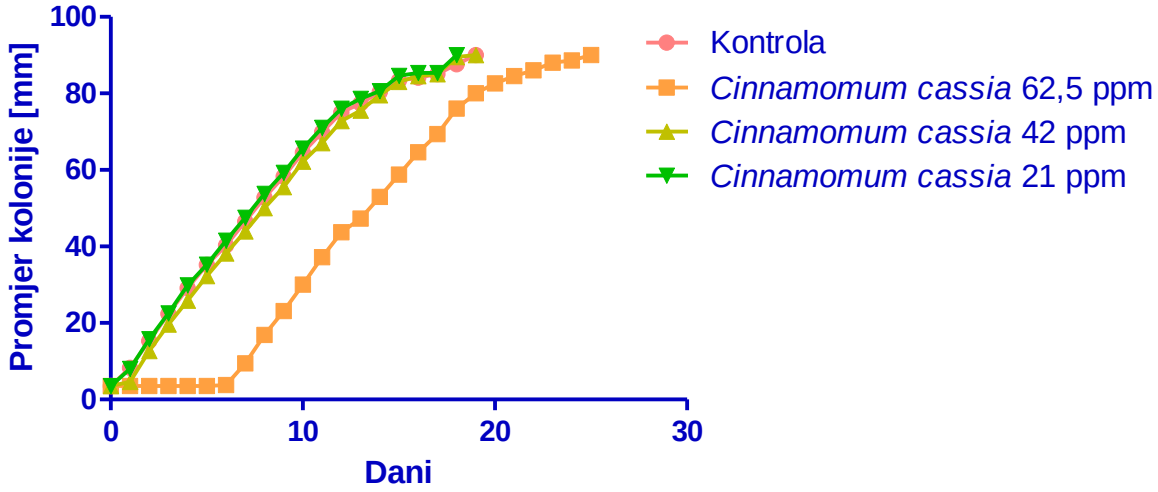
Slika 30 Inhibicija rasta plijesni *Penicillium chrysogenum* timolom



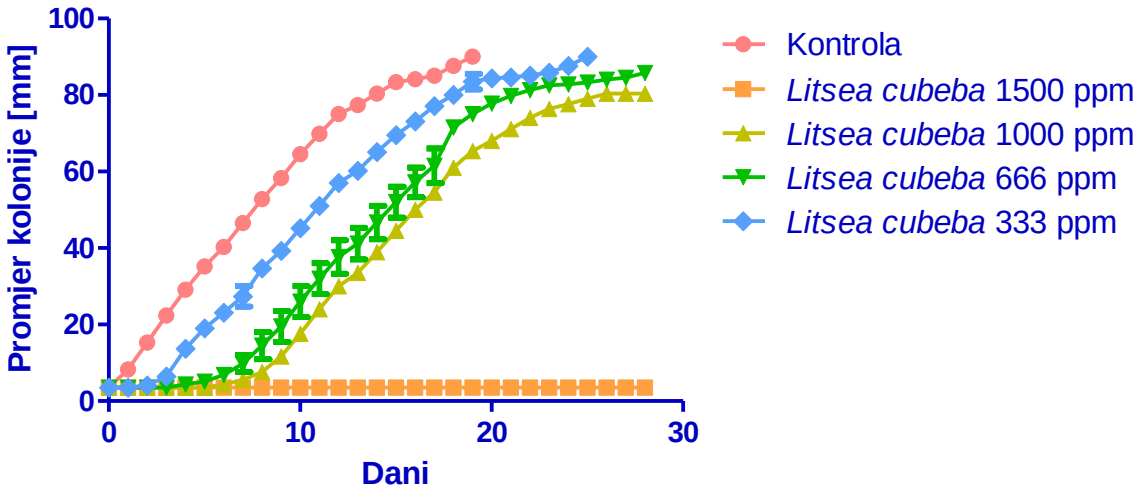
Slika 31 Inhibicija rasta plijesni *Penicillium chrysogenum* propil galatom

4.2.2. Inhibicija linearnog rasta kolonija plijesni pri a_w 0,98

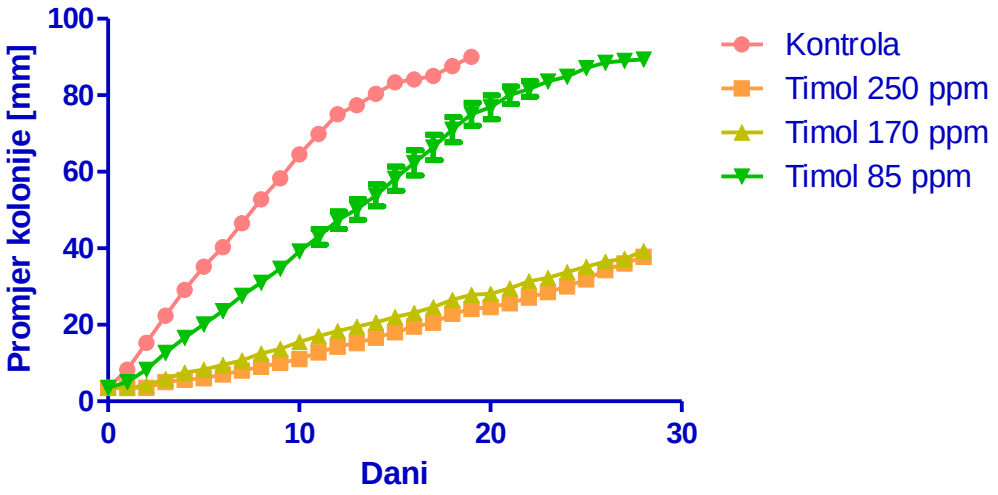
Penicillium aurantiogriseum



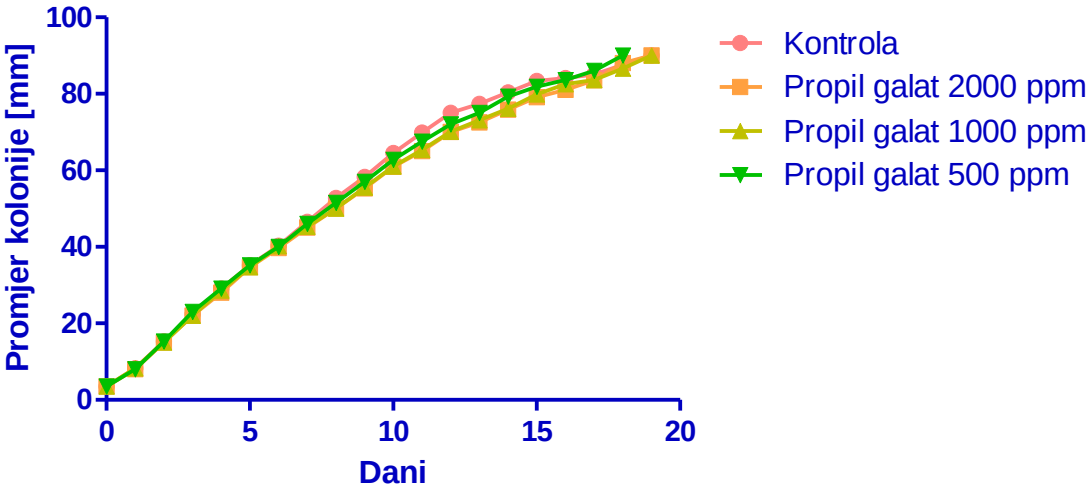
Slika 32 Inhibicija rasta plijesni *Penicillium aurantiogriseum* eteričnim uljem *Cinnamomum cassia*



Slika 33 Inhibicija rasta plijesni *Penicillium aurantiogriseum* eteričnim uljem *Litsea cubeba*

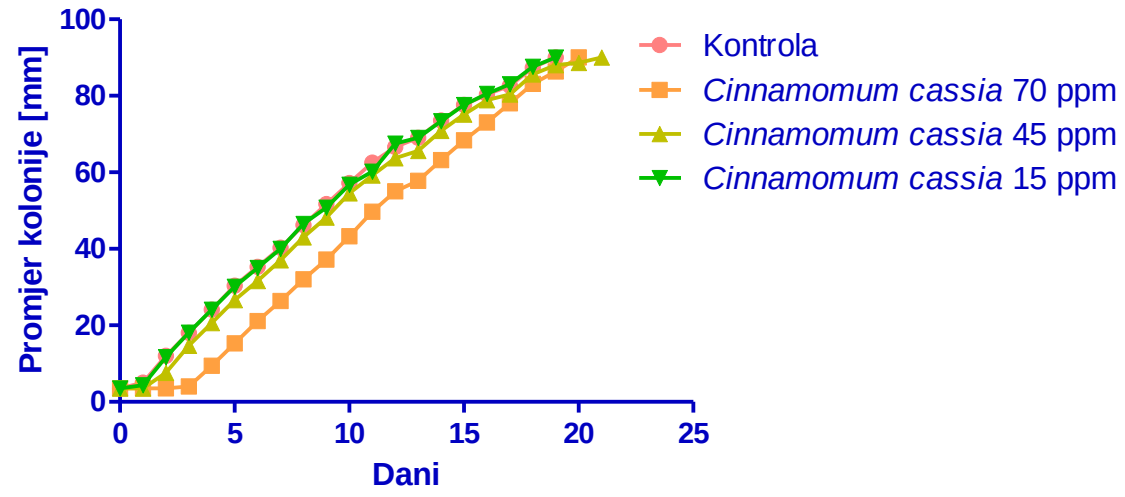


Slika 34 Inhibicija rasta plijesni *Penicillium aurantiogriseum* timolom

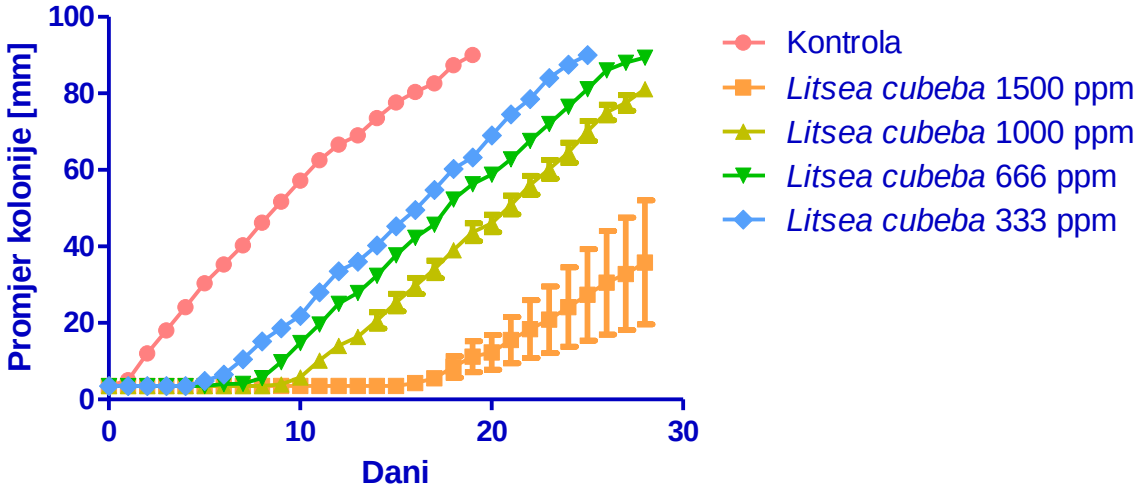


Slika 35 Inhibicija rasta plijesni *Penicillium aurantiogriseum* propil galatom

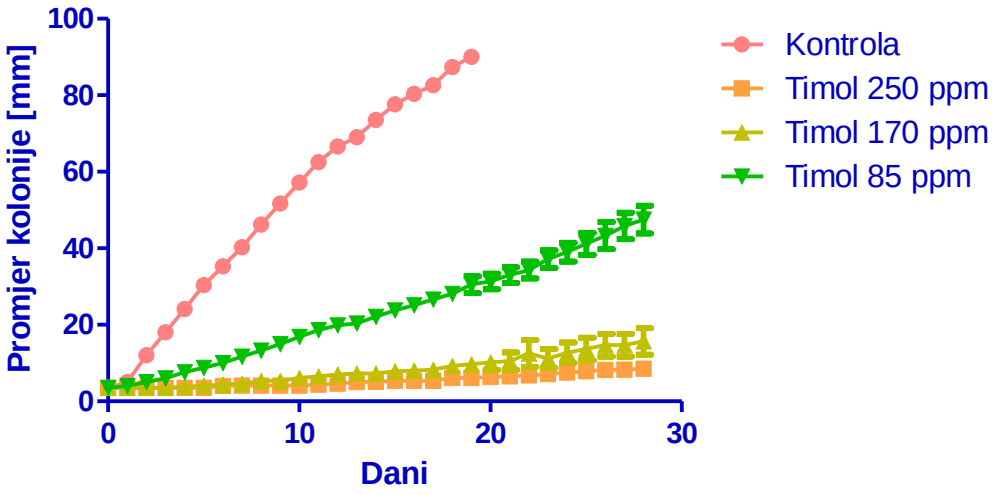
Penicillium brevicompactum



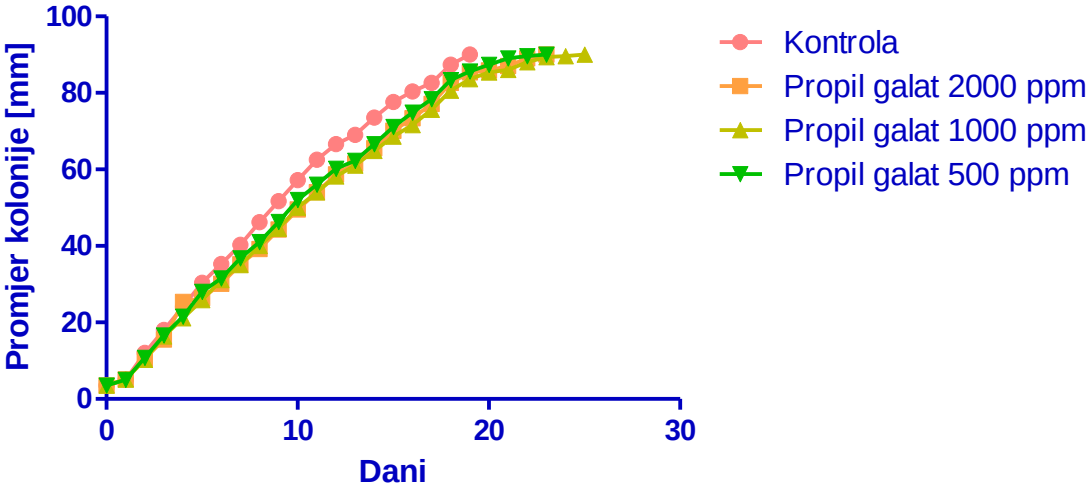
Slika 36 Inhibicija rasta plijesni *Penicillium brevicompactum* eteričnim uljem *Cinnamomum cassia*



Slika 37 Inhibicija rasta plijesni *Penicillium brevicompactum* eteričnim uljem *Litsea cubeba*

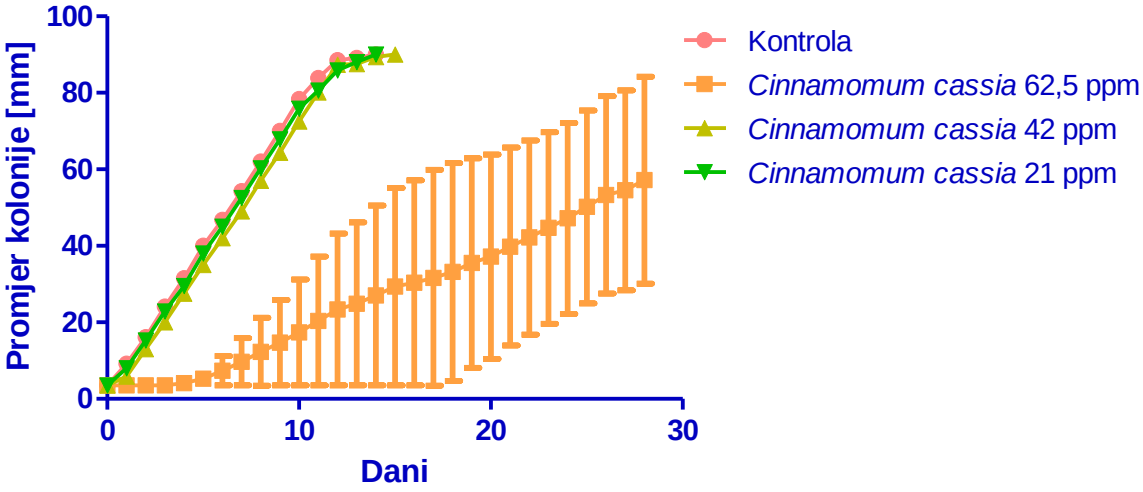


Slika 38 Inhibicija rasta plijesni *Penicillium brevicompactum* timolom

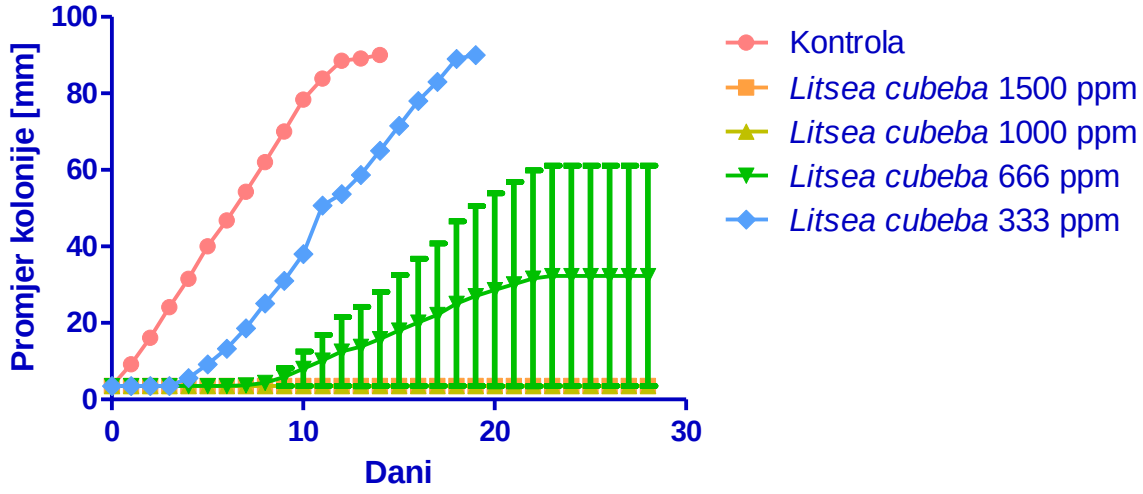


Slika 39 Inhibicija rasta plijesni *Penicillium brevicompactum* propil galatom

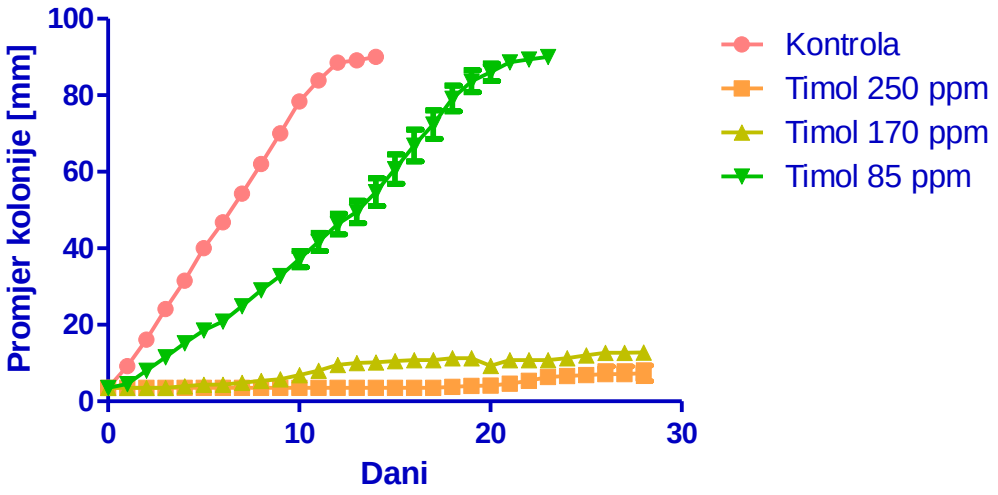
Penicillium chrysogenum



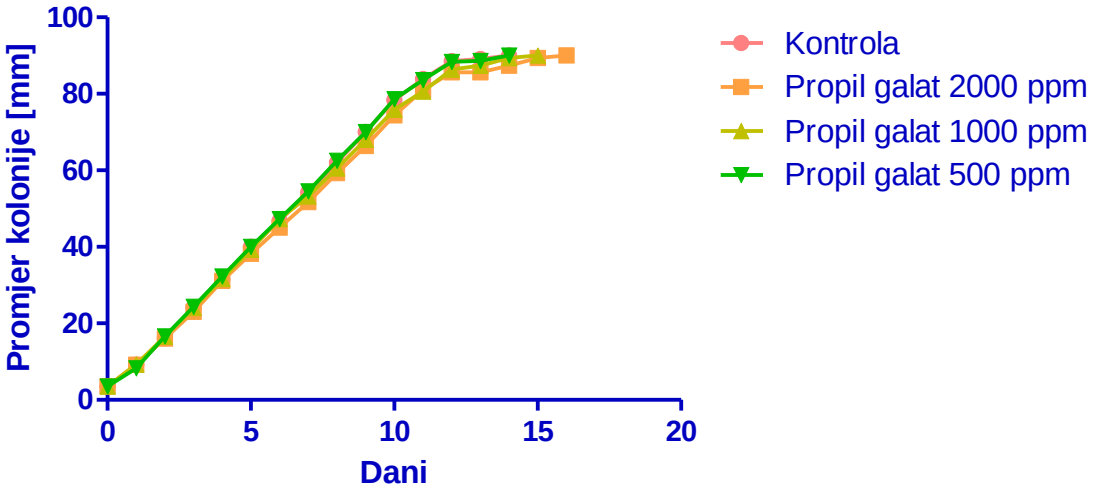
Slika 40 Inhibicija rasta plijesni *Penicillium chrysogenum* eteričnim uljem *Cinnamomum cassia*



Slika 41 Inhibicija rasta plijesni *Penicillium chrysogenum* eteričnim uljem *Litsea cubeba*



Slika 42 Inhibicija rasta plijesni *Penicillium chrysogenum* timolom



Slika 43 Inhibicija rasta plijesni *Penicillium chrysogenum* propil galatom

5. RASPRAVA

5.1. ANTIFUNGALNI UČINAK ETERIČNIH ULJA TE TIMOLA I PROPIL GALATA

Prilikom ispitivanja antifungalnih svojstava eteričnih ulja, određuju se MIK (minimalna inhibitorna koncentracija) ili fungistatična koncentracija i MFK (minimalna fungicidna koncentracija). MIK se definira kao najniža koncentracija antifungalnog spoja koja inhibira vidljivi rast test mikroorganizama (plijesni) ili zamućenost bujona. MFK se definira kao najniža koncentracija antifungalnog spoja pri kojoj uopće nema porasta kulture plijesni, nakon inkubacije u podlozi. Vrijednosti MIK i MFK ovise o različitim čimbenicima, poput svojstava eteričnih ulja, svojstava test mikroorganizama, hranjivom sadržaju podloge, a_w podloge, itd. (Burt, 2004.; Kocić-Tanackov i Dimić, 2013.).

Rezultati ispitivanja MIK i MFK eteričnih ulja *Cinnamomum cassia* i *Litsea cubeba* te timola i propil galata na odabrane vrste plijesni pri dvije različite vrijednosti a_w (0,93 i 0,98) prikazani su u **Tablicama 2** i **3.**

Eterično ulje *Cinnamomum cassia* posjeduje dobro antifungalno djelovanje s vrijednostima MIK <125 ppm za *P. aurantiogriseum* te 125 ppm za *P. brevicompactum* i *P. chrysogenum* pri manjem a_w. Nadalje, vrijednost MFK bila je >125 ppm za sve tri odabrane vrste plijesni (**Tablica 2**). Povećanjem a_w došlo je do udvostručenja vrijednosti MIK i MFK za *P. brevicompactum* (**Tablica 3**). Dakle, povećanjem a_w povećava se otpornost *P. brevicompactum* na antifungalno djelovanje eteričnog ulja *Cinnamomum cassia.*

Za inhibiciju sve tri odabrane vrste plijesni pri manjem a_w potrebna je veća koncentracija eteričnog ulja *Litsea cubeba* (250 ppm), u odnosu na eterično ulje *Cinnamomum cassia,* kao i veća MFK (500 ppm) (**Tablica 2**). Povećanjem a_w došlo je do udvostručenja koncentracije potrebne za inhibiciju *P. aurantiogriseum*, kao i do udvostručenja vrijednosti MFK za *P. brevicompactum* (1000 ppm) (**Tablica 3**). Dakle, povećanjem a_w povećava se otpornost *P. aurantiogriseum* i *P. brevicompactum* na antifungalno djelovanje eteričnog ulja *Litsea cubeba.* Povećanje a_w znači i veći udio slobodne vode u podlozi, što omogućuje olakšane metaboličke reakcije i više energije za rast plijesni, koja svojim mehanizmima oporavka može lakše popraviti oštećenja na stanicama i uspješnije porasti. To je i razlog manje koncentracije eteričnih ulja/sastojaka pri nižem, u usporedbi s višim aktivitetom vode.

Pri manjem a_w, vrijednost MIK timola bila je jednaka vrijednosti MIK eteričnog ulja *Litsea cubeba* za sve tri odabrane vrste plijesni. Nadalje, došlo je do udvostručenja MFK, u odnosu na eterično ulje *Litsea cubeba* (**Tablica 2**). Povećanjem a_w došlo je do udvostručenja vrijednosti MIK i MFK za sve tri odabrane vrste plijesni (**Tablica 3**). Dakle, povećanjem a_w povećava se otpornost sve tri odabrane vrste plijesni na antifungalno djelovanje timola.

Propil galat ne posjeduje antifungalni učinak, bez obzira na upotrijebljenu koncentraciju (**Tablice 2** i **3**).

Eterična ulja *Cinnamomum cassia* i *Litsea cubeba* te timol posjeduju određen antifungalni učinak pri dvije različite vrijednosti a_w (0,93 i 0,98) na odabrane vrste plijesni. Najsnažniji antifungalni učinak posjeduje eterično ulje *Cinnamomum cassia,* dok propil galat ne posjeduje antifungalni učinak ni u jednoj istraženoj koncentraciji. Antifungalni učinak eteričnog ulja *Cinnamomum cassia* na rast plijesni *P. aurantiogriseum, P. brevicompactum* i *P. chrysogenum* pojavljuje se pri nižim koncentracijama u odnosu na eterično ulje *Litsea cubeba* i timol, što ujedno predstavlja i manji rizik za promjenu senzorskih svojstava proizvoda. Rezultati drugih autora također govore o njegovom izraženom antifungalnom djelovanju, npr. Feng i Zheng (2007.).

5.2. UTJECAJ ETERIČNIH ULJA *Cinnamomum cassia* I *Litsea cubeba* TE TIMOLA I PROPIL GALATA NA LINEARAN RAST ODABRANIH VRSTA PLIJESNI PRI DVIJE RAZLIČITE VRIJEDNOSTI a_w (0,93 i 0,98)

Za ispitivanje utjecaja eteričnih ulja, timola i propil galata na linearan rast *P. aurantiogriseum, P. brevicompactum* i *P. chrysogenum* upotrijebljene su tri koncentracije, s obzirom na vrijednosti MFK dobivene macrobroth metodom. Cilj ovog dijela rada bio je ispitati utjecaj eteričnih ulja, timola i propil galata pri nižim koncentracijama od dobivenih vrijednosti MFK te pri dvije različite vrijednosti a_w. Budući se radi o različitoj metodologiji rada, gdje se u inhibiciji linearnog rasta kolonije koristi kruta hranjiva podloga, a i inkubacija je puno duža, usporedbe rezultata MIK i MFK (**Tablica 2** i **3**) s rastom kolonija (**Slike 20** – **43**) nisu jednostavne.

Penicillium aurantiogriseum

Kontrolni uzorak (bez dodatka antifungalnog spoja) započeo je s rastom nakon 2 dana (niži a_w), odnosno nakon 1 dana (viši a_w). Vrijeme potrebno za rast kontrolnog uzorka kolonije do ruba zdjelice (90 mm) iznosi 19 dana za viši a_w, dok kod nižeg a_w maksimalan rast nije postignut.

Najveća primijenjena koncentracija eteričnog ulja *Cinnamomum cassia* (62,5 ppm) produžava *lag* fazu za 12 dana kod nižeg a_w, nakon čega započinje rast plijesni koji je znatno sporiji, u usporedbi s ostalim primijenjenim koncentracijama (42 i 21 ppm). Smanjenjem koncentracije eteričnog ulja značajno se smanjuje *lag* faza, a inhibitorni učinak na rast

kolonija plijesni, vrlo sličan kontroli, potpuno se gubi nakon 17 dana inkubacije (**Slika 20**). Kod višeg a_w, *lag* faza najveće primijenjene koncentracije upola se skraćuje, u odnosu na niži a_w. Nadalje, vrijeme potrebno za rast kolonije plijesni do ruba zdjelice iznosi 25 dana uz najveću primijenjenu koncentraciju (62,5 ppm), odnosno gubi se inhibitorni učinak, dok inhibitorni učinak ostalih primijenjenih koncentracija u potpunosti izostaje (**Slika 32**). Kraća *lag* faza kod višeg a_w može se objasniti time što veći udio slobodne vode osigurava bržu prilagodbu plijesni na prisutnost i antifungalni učinak eteričnog ulja. Najbolji inhibitorni učinak na linearan rast plijesni posjeduje najveća primijenjena koncentracija eteričnog ulja (62,5 ppm) kod nižeg a_w.

Eterično ulje *Litsea cubeba* posjeduje inhibitorni učinak na rast kolonija plijesni. Kod obje vrijednosti a_w, *lag* faza produžila se sukladno povećanju primijenjenih koncentracija eteričnog ulja i rast kolonija se usporio, u odnosu na kontrolu. Kod nižeg a_w, najveća primijenjena koncentracija eteričnog ulja (375 ppm) odgodila je rast plijesni za 6 dana (**Slika 21**). Kod višeg a_w, vrijeme potrebno za rast kolonije plijesni do ruba zdjelice je 25 dana uz najmanju primijenjenu koncentraciju (333 ppm). Nadalje, najveća primijenjena koncentracija eteričnog ulja *Litsea cubeba* (1500 ppm) u potpunosti inhibira rast *P. aurantiogriseum* kod višeg a_w (**Slika 33**) i nema porasta početnog inokuluma sve do kraja perioda inkubacije. I u ovom slučaju primijećen je sinergizam nižeg a_w i eteričnog ulja jer su primijenjene koncentracije, koje su znatno niže u odnosu na koncentracije primijenjene kod višeg a_w, dovele do veće inhibicije porasta kolonija plijesni.

Timol, također, djeluje inhibitorno na linearan rast *P. aurantiogriseum.* Iako nema značajnog utjecaja na produženje *lag* faze kod nižeg a_w, veće koncentracije timola djeluju više inhibitorno na linearan rast kolonije plijesni (**Slika 22**). Kod višeg a_w, srednja (170 ppm) i najveća (250 ppm) primijenjena koncentracija odgađaju početak rasta plijesni za 2 dana nakon čega kolonije plijesni uspješno rastu, ali znatno manjom brzinom u odnosu na kontrolu i manju koncentraciju (85 ppm) (**Slika 34**). Iz dobivenih rezultata može se uočiti kako je djelovanje najveće primijenjene koncentracije timola približno jednako kod obje vrijednosti a_w, dok se kod višeg a_w inhibitorno djelovanje srednje koncentracije poboljšava, u odnosu na niži a_w.

Lag faza koja se postiže primjenom propil galata u koncentracijama 2000, 1000 i 500 ppm jednaka je ili vrlo slična kontroli, kod obje vrijednosti a_w. Srednja i najveća primijenjena koncentracija neznatno usporavaju rast kolonija plijesni, dok najniža primijenjena koncentracija raste istom brzinom kao i kontrola. Dobiveni rezultati ukazuju na izostanak ili slab inhibitorni utjecaj propil galata na linearan rast *P. aurantiogriseum*. Slab inhibitorni učinak gubi se nakon 18 dana (500 ppm) odnosno 19 dana (1000 ppm i 2000 ppm) kod

višeg a_w, što, ipak, ukazuje na manje izražen porast kolonija plijesni pri nižem a_w (**Slike 23** i **35**).

Penicillium brevicompactum

Kontrolni uzorak (bez dodatka antifungalnog spoja) započeo je s rastom nakon 2 dana (niži a_w), odnosno nakon 1 dana (viši a_w). Vrijeme potrebno za rast kontrolnog uzorka kolonije do ruba zdjelice (90 mm) iznosi 19 dana za viši a_w, dok kod nižeg a_w maksimalan rast nije postignut.

Inhibitorni utjecaj eteričnog ulja *Cinnamomum cassia* izostao je kod nižeg a_w primjenom manje (15 ppm), odnosno srednje (45 ppm) koncentracije jer su kolonije plijesni rasle brže u odnosu na kontrolu. Uzrok tome jesu primijenjene koncentracije eteričnog ulja, koje ne uspijevaju uništiti stanice plijesni, već ih potiču na rast i razmnožavanje. *Lag* faza najveće primijenjene koncentracije (70 ppm) traje 4 dana, a slab inhibitorni utjecaj traje 20 dana nakon čega kolonija plijesni počinje rasti brže u odnosu na kontrolu (**Slika 24**). *Lag* faza najveće koncentracije kod višeg a_w traje 3 dana, a slab inhibitorni učinak gubi se nakon 20 dana jer kolonija plijesni doseže svoj maksimalan rast (90 mm). Inhibitorni učinak niže i srednje koncentracije izostao je i kod višeg a_w (**Slika 36**). Kod obje vrijednosti a_w, slab inhibitorni učinak na linearan rast plijesni najveće primijenjene koncentracije prestaje nakon 20 dana što ukazuje na smanjenu osjetljivost *P. brevicompactum* na djelovanje eteričnog ulja *Cinnamomum cassia,* u odnosu na *P. aurantiogriseum*.

Eterično ulje *Litsea cubeba* posjeduje inhibitorno djelovanje na linearan rast kolonije *P. brevicompactum.* Kod nižeg a_w, *lag* faza trajala je 6, 7, odnosno 8 dana, ovisno o primijenjenim koncentracijama (165, 250 i 375 ppm), a sve tri primijenjene koncentracije uzrokuju zaostanak u rastu kolonija plijesni (**Slika 25**). Kod višeg a_w, primjenom najveće koncentracije (1500 ppm) trajanje *lag* faze se udvostručava, a uočava se i manji promjer kolonije, u odnosu na najveću primijenjenu koncentraciju kod nižeg a_w. Nadalje, nagib krivulje rasta smanjuje se u odnosu na kontrolu za sve tri primijenjene koncentracije što rezultira manjim promjerom kolonije i većom inhibicijom rasta plijesni. Međutim, treba uzeti u obzir da su primijenjene koncentracije eteričnog ulja (333, 666, 1000, 1500 ppm) veće od onih primijenjenih kod nižeg a_w. Vrijeme potrebno za rast kolonije do ruba zdjelice je 25 dana za najnižu primijenjenu koncentraciju kod višeg a_w (**Slika 37**). I u ovom slučaju, kao i kod *P. aurantiogriseum*, primijećen je sinergizam nižeg a_w i eteričnog ulja.

Primjenom timola u koncentracijama od 250, 170 i 85 ppm postiže se inhibicija linearnog rasta plijesni. Iako *lag* faza kod nižeg a_w nije produljena uporabom timola, nagib krivulje rasta manji je u odnosu na kontrolu za sve tri primijenjene koncentracije što rezultira manjim

promjerom kolonija i većom inhibicijom rasta plijesni (**Slika 26**). Kod višeg a_w, trajanje *lag* faze produžava se povećanjem koncentracije timola, dok je primjenom najveće koncentracije (250 ppm) *lag* faza trajala 10 dana. Nadalje, uočen je sporiji porast kolonija plijesni za sve tri primijenjene koncentracije, u odnosu na niži a_w (**Slika 38**). Može se uočiti kako je aktivnost timola kod višeg a_w veća od aktivnosti iste koncentracije kod nižeg a_w.

Utjecaj propil galata na rast kolonija plijesni slabo je izražen. Kod obje vrijednosti a_w, razlike u primijenjenim koncentracijama su uočljive, ali nedovoljno značajne. Slab inhibitorni učinak gubi se nakon 23 dana (500 i 2000 ppm), odnosno 25 dana (1000 ppm) kod višeg a_w, što ipak ukazuje na manje izražen porast kolonija plijesni pri nižem a_w (**Slike 27** i **39**). Iz dobivenih rezultata može se primijetiti jednak učinak propil galata na linearan rast plijesni *P. brevicompactum* u usporedbi s *P. aurantiogriseum.*

Penicillium chrysogenum

Kontrolni uzorak (bez dodatka antifungalnog spoja) započeo je s rastom nakon 2 dana (niži a_w), odnosno nakon 1 dana (viši a_w). Vrijeme potrebno za rast kontrolnog uzorka kolonije do ruba zdjelice (90 mm) iznosi 28 dana za niži a_w, odnosno 14 dana za viši a_w.

Primjenom eteričnog ulja *Cinnamomum cassia* uočava se bolji učinak na linearan rast *P. chrysogenum* u usporedbi s *P. aurantiogriseum* i *P*. *brevicompactum.* Kod nižeg a_w, najveća primijenjena koncentracija (62,5 ppm) u potpunosti inhibira rast plijesni. Nadalje, nagib krivulje rasta najmanje primijenjene koncentracije (21 ppm) jednak je kontroli, dok srednja primijenjena koncentracija (42 ppm) posjeduje određeni inhibitorni učinak koji vremenom slabi, te se gubi nakon 20 dana (**Slika 28**). Kod višeg a_w, nagib krivulje rasta kontrolnog uzorka jednak je nagibu krivulje uzoraka s manjom i srednjom koncentracijom eteričnog ulja, što ukazuje na izostanak inhibitornog učinka navedenih koncentracija. Nadalje, najveća primijenjena koncentracija *lag* fazu produžava za 4 dana i djeluje inhibitorno na linearan rast plijesni (**Slika 40**). Primijećen je sinergizam nižeg a_w i najveće primijenjene koncentracije eteričnog ulja, kao i u slučaju inhibicije linearnog rasta *P. aurantiogriseum*, kao i veća osjetljivost *P. chrysogenum.*

Eterično ulje *Litsea cubeba* posjeduje slična svojstva kao i u inhibiciji rasta *P. aurantiogriseum* i *P. brevicompactum.* Na **Slikama 29** i **41** može se vidjeti kako kod obje vrijednosti a_w, porastom primijenjenih koncentracija eteričnog ulja brzina rasta plijesni opada. Kod višeg a_w, vrijeme potrebno za rast kolonije do ruba zdjelice je 19 dana uz najmanju primijenjenu koncentraciju (333 ppm). Nadalje, najveće primijenjene koncentracije eteričnog ulja *Litsea cubeba* (1000 i 1500 ppm) u potpunosti inhibiraju rast *P. chrysogenum* (**Slika 41**).

Međutim, treba uzeti u obzir kako su primijenjene veće koncentracije eteričnog ulja (333, 666, 1000, 1500 ppm) kod višeg a_w, u odnosu na niži a_w (375, 250, 165 ppm). Kod višeg a_w, *P. chrysogenum* posjeduje veću osjetljivost na djelovanje dvije najveće primijenjene koncentracije, u usporedbi s *P. aurantiogriseum* i *P. brevicompactum.*

Timol posjeduje inhibitorni utjecaj na linearan rast plijesni. Kod nižeg a_w, nagib krivulje linearnog rasta uzorka s najmanjom primijenjenom koncentracijom (85 ppm) sličan je kontroli, dok najveća primijenjena koncentracija (250 ppm) posjeduje najjači inhibitorni utjecaj na brzinu rasta plijesni (**Slika 30**). Kod višeg a_w, primjenom najveće koncentracije timola *lag* faza značajno se produžila (18 dana). Srednja (170 ppm) i najveća koncentracija (250 ppm) u velikoj su mjeri usporile rast kolonija plijesni (**Slika 42**). Kao i u slučaju inhibicije *P. aurantiogriseum* i *P. brevicompactum*, iz dobivenih rezultata može se uočiti kako je aktivnost timola kod višeg a_w veća od aktivnosti iste koncentracije kod nižeg a_w.

Propil galat nije utjecao na inhibiciju rasta plijesni ni u jednoj primijenjenoj koncentraciji. Kolonija plijesni s najmanjom primijenjenom koncentracijom (500 ppm) raste brže od kontrole kod nižeg a_w, dok najveća primijenjena koncentracija (2000 ppm) nakon 10 dana inkubacije uzrokuje neznatno manji porast kolonije plijesni u odnosu na kontrolu. Sve ostale primijenjene koncentracije uzrokuju porast kolonija plijesni koji je jednak ili vrlo sličan porastu kontrole, kod obje vrijednosti a_w (**Slike 31** i **43**). Kolonije plijesni dostižu svoj maksimalan rast nakon 14, 15, odnosno 16 dana (ovisno o koncentraciji) kod višeg a_w, što ipak ukazuje na manje izražen porast kolonija plijesni pri nižem a_w. Iz dobivenih rezultata može se primijetiti jednak učinak propil galata na linearan rast plijesni *P. chrysogenum* u usporedbi s *P. aurantiogriseum* i *P. brevicompactum.*

Plijesni roda *Penicillium* široko su rasprostranjene u prirodi i česti su kontaminanti hrane. Eterična ulja i njihovi biološki aktivni sastojci posjeduju važnu ulogu u prevenciji i smanjenju mikrobiološkog kvarenja prehrambenih proizvoda, posebno onih kratkog roka trajanja koji su najpodložniji kvarenju (kruh, peciva, kolači, salate, svježe voće i povrće). Njihova uporaba u prehrambenoj industriji smanjuje potrebu za sintetskim konzervansima i aditivima, te istovremeno poboljšava svježinu, senzorska svojstva i kvalitetu proizvoda (Kocić-Tanackov i sur., 2012.). Potencijal uporabe eteričnih ulja zasniva se na njihovom prirodnom porijeklu što ih čini manje štetnim za čovjeka i okoliš, kao i u malom riziku razvoja otpornosti mikroorganizama jer eterična ulja sadrže velik broj spojeva s različitim mehanizmima antimikrobnog djelovanja (Duduk i sur., 2010.).

Ovaj rad potvrđuje kako eterična ulja *Cinnamomum cassia* i *Litsea cubeba* te timol trebaju naći praktičnu primjenu kao inhibitori rasta plijesni *Penicillium aurantiogriseum, P.*

brevicompactum i *P. chrysogenum*, čestih uzročnika kvarenja hrane. Svakako, detaljnija ispitivanja su neophodna u cilju njihove primjene u prehrambenim proizvodima.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja, iz ovog rada može se zaključiti sljedeće:

1. Eterična ulja *Cinnamomum cassia* i *Litsea cubeba* te timol posjeduju antifungalnu aktivnost na odabrane vrste plijesni, koja se može predstaviti na sljedeći način: *Cinnamomum cassia* > *Litsea cubeba* > timol;
2. Propil galat ne posjeduje antifungalni učinak na odabrane vrste plijesni;
3. MIK eteričnog ulja *Cinnamomum cassia* kod a_w 0,93 je <125 ppm za *P. aurantiogriseum*, te 125 ppm za *P. brevicompactum* i *P. chrysogenum*; kod a_w 0,98 je <125 ppm za *P. aurantiogriseum* i *P. chrysogenum*, te <250 ppm za *P. brevicompactum*;
4. MFK eteričnog ulja *Cinnamomum cassia* kod a_w 0,93 je >125 ppm sve tri odabrane vrste plijesni; kod a_w 0,98 je >125 ppm za *P. aurantiogriseum* i *P. chrysogenum*, te >250 ppm za *P. brevicompactum*;
5. MIK eteričnog ulja *Litsea cubeba* kod a_w 0,93 je 250 ppm za sve tri odabrane vrste plijesni; kod a_w 0,98 je 500 ppm za *P. aurantiogriseum*, te 250 ppm za *P. brevicompactum* i *P. chrysogenum*;
6. MFK eteričnog ulja *Litsea cubeba* kod a_w 0,93 je 500 ppm za sve tri odabrane vrste plijesni; kod a_w 0,98 je >500 ppm za *P. aurantiogriseum*, 1000 ppm za *P. brevicompactum*, te 500 ppm za *P. chrysogenum*;
7. MIK timola kod a_w 0,93 je 250 ppm za sve tri odabrane vrste plijesni; kod a_w 0,98 je 500 ppm za sve tri odabrane vrste plijesni;
8. MFK timola kod a_w 0,93 je 1000 ppm za sve tri odabrane vrste plijesni; kod a_w 0,98 je 2000 ppm za sve tri odabrane vrste plijesni;
9. Povećanjem koncentracije eteričnih ulja *Cinnamomum cassia* i *Litsea cubeba* te timola povećava se stupanj inhibicije linearnog rasta odabranih vrsta plijesni;
10. Eterična ulja *Cinnamomum cassia* i *Litsea cubeba lag* fazu rasta kolonija plijesni produžavaju kod nižeg a_w;
11. Timol posjeduje bolji inhibitorni učinak na linearan rast kolonija plijesni kod višeg a_w;
12. Propil galat ne posjeduje značajan inhibitorni utjecaj na linearan rast odabranih vrsta plijesni ni u jednoj ispitivanoj koncentraciji, neovisno o a_w.

7. LITERATURA

Adams MR, Moss MO: *Food microbiology*. RSC Publishing, Cambridge, 2008.

Angelov I, Bermejo D, Stateva R, Reglero G, Ibañez E, Fornari T: Extraction of thymol from different varieties of thyme plants using green solvents. In *III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids,* str. 1-7. Cartagena de Indias, 2013.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M: Biological effects of essential oils ‑ a review. *Food and Chemical Toxicology* 46:446-475, 2008.

Becker L: Final report on the amended safety assessment of propyl gallate. *International Journal of Toxicology* 26:89-118, 2007.

Berufsgenossenschaft RCI: *Toxicological evaluation No. 259 Thymol.* BG Chemie, 2000. https://www.bgrci.de/fileadmin/BGRCI/Downloads/DL_Praevention/Fachwissen/Gefahrstoffe/TOXIKOLOGISCHE_BEWERTUNGEN/Bewertungen/ToxBew259-E.pdf [7.09.2016.]

Blackburn C: *Food spoilage microorganisms*. Woodhead Publishing, Cambridge, 2006.

Bošković M, Baltić M, Ivanović J, Đurić J, Lončina J, Dokmanović M, Marković R: Use of essential oils in order to prevent foodborne illnesses caused by pathogens in meat – preview paper. *Tehnologija mesa* 54:14-20, 2013.

Burt S: Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology* 94:223-253, 2004.

Burt SA, Vlielander R, Haagsman HP, Veldhuizen EJA: Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O157:H7 by addition of food stabilizers. *Journal of Food Protection* 68:919-926, 2005.

Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW: *The fungi*. Academic press, New York, 2001.

Carson CF, Mee BJ, Riley TV: Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46:1914-1920, 2002.

Castro R, Souza TMPA, Bezerra LMD, Ferreira GLS, de Brito Costa EMM, Cavalcanti LA: Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: an *in vitro* study. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 15:417, 2015.

Celikel N, Kavas G: Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Czech Journal of Food Sciences* 26:174-181, 2008.

Coppen JJW: *Flavours and fragrances of plant origin*. FAO, Rim, 1995.

Cosentino S, Tuberoso CIG, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E, Palmas F: *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Letters in Applied Microbiology* 29:130-135, 1999.

Čančarević A, Bugarski B, Šavikin K, Zdunić G: Biološka aktivnost vrsta *Thymus vulgaris* i *Thymus serpyllum* i njihovo korištenje u etnomedicini. *Lekovite sirovine* 33:3-17, 2013.

Čvek D, Frece J, Markov K, Friganović M, Delaš F: Antifungalni učinak bakterije *Lactobacillus plantarum* K1 na rast plijesni *Aspergillus ochraceus* ZMPBF 318. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 5:43-47, 2010.

Delaš F: Mikrobni toksini. U *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani,* str. 31-49. HAH, Osijek, 2010.

Dijksterhuis J, Samson RA: *Food micology – a multifaceted approach to fungi and food*. CRC Press, Boca Raton, 2007.

Domaćinović M, Ćosić J, Klapec T, Peraica M, Mitak M: *Znanstveno mišljenje o mikotoksinima u hrani za životinje*. HAH, Osijek, 2012.

Dorman HJD, Deans SG: Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88:308-316, 2000.

Doyle EM: *Microbial food spoilage – losses and control strategies*. University of Wisconsin, Madison, 2007.

Dreger M, Wielgus K: Application of essential oils as natural cosmetic preservatives. *Herba Polonica* 59:142-156, 2013.

Duduk N, Obradović A, Ivanović M: Uticaj etarskih ulja timijana, cimeta i karanfilića na porast micelije *Colletotrichum acutatum*. *Pesticidi i fitomedicina* 25:151-156, 2010.

Duraković S, Delaš F, Stilinović B, Duraković L: *Moderna mikrobiologija namirnica.* Kugler, Zagreb, 2002.

Emiroğlu ZK, Yemiş GP, Coşkun BK, Candoğan K: Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Science* 86:283-288, 2010.

European Food Safety Authority: Scientific Opinion on the re-evaluation of propyl gallate (E 310) as a food additive. *EFSA Journal* 12:3642, 2014.

Feng W, Zheng X: Essential oils to control *Alternaria alternata in vitro* and *in vivo*. *Food Control* 18:1126-1130, 2007.

Fisher K, Phillips CA: The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni, Escherichia coli* O157*, Listeria monocytogenes, Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus in vitro* and in food systems. *Journal of Applied Microbiology* 101:1232-1240, 2006.

Frisvad J, Samson RA: Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate Penicillia and their mycotoxins. *Studies in Mycology* 49:1-174, 2004.

Grows on You: *Cinnamomum cassia (aromaticum) – Cassia tree.* http://www.growsonyou.com/photo/slideshow/88693-cinnamomum-cassia-aromaticum-cassia-tree [7.09.2016.]

Guo N, Jingbo L, Xiuping W, Xingming B, Rizeng M, Xuelin W, Hua X, Xuming D, Lu Y: Antifungal activity of thymol against clinical isolates of fluconazole-sensitive and -resistant *Candida albicans*. *Journal of Medical Microbiology* 58:1074-1079, 2009.

Gutierrez J, Barry-Ryan C, Bourke P: Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology* 26:142-150, 2009.

Han XJ, Wang YD, Chen YC, Lin LY, Wu QK: Transcriptome sequencing and expression analysis of terpenoid biosynthesis genes in *Litsea cubeba. PLOS ONE* 8:1-14, 2013.

Harris R: Progress with superficial mycoses using essential oils. *International Journal of Aromatherapy* 12:83-91, 2002.

Henriette's Herbal Homepage: *Cinnamomum aromaticum.* 2001. http://www.henriettes-herb.com/galleries/photos/c/ci/cinnamomum-aromaticum.html [7.09.2016.]

Holley RA, Patel D: Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology* 22:273-292, 2005.

Houbraken J, Frisvad JC, Samson RA: Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. *IMA Fungus* 1:87-95, 2011.

Hu L, Menghao D, Jingping Z, Yangdong W: Chemistry of the main component of essential oil of *Litsea cubeba* and its derivatives. *Open Journal of Forestry* 4:457-466, 2014.

Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL: Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology* 3:1-24, 2012.

Ismaiel AA, Pierson MD: Effect of sodium nitrite and origanum oil on growth and toxin production of *Clostridium botulinum* in TYG broth and ground pork. *Journal of Food Protection* 53:958-960, 1990.

Jay JM, Loessner MJ, Golden DA: *Modern Food Microbiology*. Springer, New York, 2005.

Juven BJ, Kanner J, Schved F, Weisslowicz H: Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology* 76:626-631, 1994.

Khan IA, Abourashed EA: *Leung's Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics*. Wiley, New Jersey, 2010.

Kocić-Tanackov SD, Dimić GR, Pejin DJ, Mojović LJV, Pejin JD, Tanackov IJ: Antifungal activity of the basil (*Ocimmum basilicum* L.) extract on *Penicillium aurantiogriseum, P. glabrum, P. chrysogenum* and *P. brevicompactum. Acta Periodica Technologica* 43:247-256, 2012.

Kocić-Tanackov SD, Dimić GR: Antifungal activity of essential oils in the control of food-borne fungi growth and mycotoxin biosynthesis in food. In *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education,* 2:838-849. Formatex Research Center, Badajoz, 2013.

Kocić-Tanackov SD, Dimić GR: Gljive i mikotoksini – kontaminenti hrane. *Hemijska Industrija* 67:639-653, 2013.

Kolovrat M: Cimet. *Meso*, 9:291-293, 2007.

Kubo I, Xiao D, Fujita K: Antifungal activity of octyl gallate: structural criteria and mode of action. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 11:347-350, 2001.

Labuza TP: Sorption phenomena in foods: theoretical and practical aspects. In *Theory, determination and control of physical properties of food materials*, str. 197-219. D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, 1975.

Lasztity R: *Food quality and standards*. EOLSS Publishers Co. Ltd., Oxford, 2009.

Leal PC, Mascarello A, Derita M, Zuljan F, Nunes RJ, Zacchino S, Yunes RA: Relation between lipophilicity of alkyl gallates and antifungal activity against yeasts and filamentous fungi. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19:1793-1796, 2009.

Lee KW, Everts H, Beynen AC: Essential oils in broiler nutrition. *International Journal of Poultry Science* 3:738-752, 2004.

Liao JC, Deng JS, Chiu CS, Hou WC, Huang SS, Shie PH, Huang GJ: Anti-inflammatory activities of *Cinnamomum cassia* constituents *in vitro* and *in vivo*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012:1-12, 2012.

Lima VMG, Krieger N, Sarquis MIM, Mitchell DA, Ramos LP, Fontana JD: Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum. Food Technology and Biotechnology* 41:105-110, 2003.

López-Malo A, Alzamora SM, Palou E: *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. *International Journal of Food Microbiology* 99:119-128, 2005.

López-Malo A, Barreto-Valdivieso J, Palou E, San Martín F: *Aspergillus flavus* growth response to cinnamon extract and sodium benzoate mixtures. *Food Control* 18:1358-1362, 2007.

Lotus Garden Botanicals: *May Chang (Litsea) essential oil.* http://www.lgbotanicals.com/May-Chang-Litsea-Essential-Oil_p_492.html#.V1WtsdSLSWg [7.09.2016.]

Macwan SR, Dabhi BK, Aparnathi KD, Prajapati JB: Essential oils of herbs and spices: their antimicrobial activity and application in preservation of food. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 5:885-901, 2016.

Marriott NG, Gravani RB: Principles of food sanitation. Springer, New York, 2006.

Martínez-Romero D, Guillén F, Valverde JM, Bailén G, Zapata PJ, Serrano M: Influence of carvacrol on survival of *Botrytis cinerea* inoculated in table grapes. *International Journal of Food Microbiology* 115:144-148, 2007.

Martinović A, Vesković-Moračanin S: Primena starter kultura u industriji mesa. *Tehnologija mesa* 47:226-230, 2006.

Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja RH: *Pravilnik o označavanju, reklamiranju i prezentiranju hrane.* Narodne novine 63/11, 2011.

Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi RH: *Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti predmeta široke potrošnje.* Narodne novine 125/09, 2009.

Moračanin VS, Milijašević M, Đukić D, Kurćubić V, Mašković P, Mandić L: Primena prirodnih antimikrobnih jedinjenja u biološkoj zaštiti hrane. U *XX Savetovanje o biotehnologiji, Zbornik radova*, 20:303-308, Agronomski fakultet, Čačak, 2015.

Mountain Rose Herbs: *Litsea cubeba essential oil.* https://www.mountainroseherbs.com/products/litsea-cubeba-essential-oil/profile [7.09.2016.]

Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V: Effect of essential oils on pathogenic bacteria – review. *Pharmaceuticals* 6:1451-1474, 2013.

Noller CR: *Kemija organskih spojeva*. Tehnička knjiga, Zagreb, 1973.

OMICS International: *Thymol.* http://research.omicsgroup.org/index.php/Thymol [7.09.2016.]

Organic Lifestyle Magazine: *Cinnamon – ceylon vs cassia, health benefits, and other interesting facts.* http://www.organiclifestylemagazine.com/cinnamon-ceylon-vs-cassia-health-benefits-and-other-interesting-facts [7.09.2016.]

Pandit VA, Shelef LA: Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Food Microbiology* 11:57-63, 1994.

Papić J: Biološka aktivnost i djelovanje cimeta kao začina i dodatka prehrani. *InPharma* 3:25-29, 2009.

Pavlinić V: *Što se krije iza E brojeva.* UDD, Zagreb – Split, 2005.

Pepeljnjak S, Cvetnić Z, Šegvić Klarić M: Okratoksin A i zearalenon: kontaminacija žitarica i krmiva u Hrvatskoj (1977-.2007.) i utjecaj na zdravlje životinja i ljudi. *Krmiva* 50:147-159, 2008.

Peraica M, Rašić D: Akutne i kronične mikotoksikoze u ljudi. *Krmiva* 54:81-87, 2012.

Pine SH: *Organska kemija*. Školska knjiga, Zagreb, 1994.

Pitt JI, Hocking AD: *Fungi and food spoilage*. Springer, New York, 2009.

Plush Folly Ltd: *Safety data sheet – May Chang oil.* 2013. http://plushfolly.com/WebRoot/Store10/Shops/c4309d3d-6444-497a-81dd-1c01462e73bd/MediaGallery/MSDS/Essential_Oils/may_chang.pdf [7.09.2016.]

Powder Pack Chem: *Propil gallate (antioxidant).* http://www.powderpackchem.com/propyl-gallate-antioxidant--2209439.html [7.09.2016.]

Saddi M, Sanna A, Cottiglia F, Chisu L, Casu L, Bonsignore L, De Logu A: Antiherpevirus activity of *Artemisia arborescens* essential oil and inhibition of lateral diffusion in vero cells – research. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 6:10, 2007.

Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC: *Introduction to food and airborne fungi*. CBS, Utrecht, 2004.

Scott JA, Wong B, Summerbell RC, Untereiner WA: A survey of *Penicillium brevicompactum* and *P. bialowiezense* from indoor environments, with commentary on the taxonomy of the *P. brevicompactum* group. *Botany* 86:731-741, 2008.

Serrano M, Martínez-Romero D, Guillén F, Valverde JM, Zapata PJ, Castillo S, Valero D: The addition of essential oils to MAP as a tool to maintain the overall quality of fruits. *Trends in Food Science & Technology* 19:464-471, 2008.

Shaanxi Yuanjian Biological Technology Co., Ltd: *Litsea cubeba* oil. http://www.chinaplantoil.com/herb-oil/litsea-cubeba-oil.html [7.09.2016.]

Si L, Yicun C, Xiaojiao H, Zhiyong Z, Shengping T, Qinqin C, Yangdong W: Chemical composition of essential oils of *Litsea cubeba* harvested from its distribution areas in China. *Molecules* 17:7057-7066, 2012.

Sikkema J, de Bont JAM, Poolman B: Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews* 59:201-222, 1995.

SNN Natural Products: *Thymol crystal.* http://www.indianexoticoils.com/thymol-crystal.html#thymol-crystal [7.09.2016.]

Stojković D., Glamočlija J, Ćirić A, Nikolić M, Ristić M, Šiljegović J, Soković M: Investigation on antibacterial synergism of *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* essential oils. *Archives of Biological Sciences* 65:639-643, 2013.

Strippoli V, D'Auria FD, Tecca M, Callari A, Simonetti G: Propyl gallate increases *in vitro* antifungal imidazole activity against *Candida albicans. International Journal of Antimicrobial Agents* 16:73-76, 2000.

Šegvić Klarić M, Kosalec I, Mastelić J, Pieckova E, Pepeljnak S: Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Letters in Applied Microbiology* 44:36-42, 2007.

Škrinjar M, Tešanović D: *Hrana u ugostiteljstvu i njeno čuvanje*. Prirodno matematički fakultet, Novi Sad, 2007.

Tajkarimi MM, Ibrahim SA, Cliver DO: Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21:1199-1218, 2010.

Tiwari B, Valdramidis V, O' Donnell C, Muthukumarappan K, Cullen P, Bourke P: Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:5987–6000, 2009.

Tucker GS: *Food biodeterioration and preservation*. Blackwell Publishing, Oxford, 2008.

Ultee A, Kets EPW, Alberda M, Hoekstra FA, Smid EJ: Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology* 174:233-238, 2000.

Ultee A, Bennink MHJ, Moezelaar R: The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68:1561-1568, 2002.

United States Department of Agriculture: *Introduction to the microbiology of food processing.* 2012. http://www.fsis.usda.gov/shared/PDF/SPN_Guidebook_Microbiology.pdf [7.09.2016.]

Van der Heijden CA, Janssen PJCM, Strik JJTWA: Toxicology of gallates: a review and evaluation. *Food and Chemical Toxicology* 24:1067-1070, 1986.

Velebit B, Matekalo-Sverak V, Petrović Z, Lakićević B, Janković V, Lilić S, Vranić D: Ispitivanje antimikrobne aktivnosti cinamaldehida i karvakrola na mikroorganizme prenosive hranom. *Tehnologija mesa* 53:166-172, 2012.

Vučinić M, Nedeljković-Trailović J, Trailović S, Ivanović S, Milovanović M, Krnjaić D: Mogućnost primene etarskih ulja u veterinarskoj medicini i stočarstvu s posebnim osvrtom na etarsko ulje origana. *Veterinarski Glasnik* 66:407-416, 2012.

Wikipedia: *Cinnamomum cassia*. https://en.wikipedia.org/wiki/Cinnamomum_cassia [7.09.2016.]

Wikipedia: *Thyme.* https://en.wikipedia.org/wiki/Thyme [7.09.2016.]

Windisch W, Schedle K, Plitzner C, Kroismayr A: Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. *Journal of Animal Science* 86:140-148, 2008.

Yang K, Wang CF, You CX, Geng ZF, Sun RQ, Guo SS, Du SS, Liu ZL, Deng ZW: Bioactivity of essential oil of *Litsea cubeba* from China and its main compounds against two stored product insects. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 17:459-466, 2014.

Zaidi SF, Aziz M, Muhammad JS, Kadowaki M: Diverse pharmacological properties of *Cinnamomum cassia*: a review. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 28:1433-1438, 2015.