

# Utjecaj aktiviteta vode, temperature i timola na rast odabranih vrsta plijesni roda *Aspergillus*

---

Knezović, Mirna

Master's thesis / Diplomski rad

2014

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:109:101717>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-05**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

**Mirna Knezović**

**UTJECAJ AKTIVITETA VODE, TEMPERATURE I TIMOLA NA RAST  
ODABRANIH VRSTA PLIJESNI RODA *Aspergillus***

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan 2014.

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**  
**diplomski rad**

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

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Nastavni predmet:** Mikrobiologija hrane  
**Tema rada** je prihvaćena na VII. sjednici Odbora za završne i diplomske ispite održanoj 09. 07. 2012. godine  
**Mentor:** dr. sc. Hrvoje Pavlović  
**Pomoć pri izradi:** Vedran Gradvol, dipl. ing.

**Utjecaj aktiviteta vode, temperature i timola na rast odabranih vrsta plijesni roda *Aspergillus***  
**Mirna Knezović, 74/DI**

**Sažetak:** Istražen je učinak temperature, timola i aktiviteta na odabrane vrste plijesni roda *Aspergillus*: *A. carbonarius*, *A. flavus* i *A. parasiticus*. Rast plijesni je istražen na krmivu SKDN koje je sterilizirano  $\gamma$ -zračenjem čiji je aktivitet vode prilagođen zamjenom vode glicerolom na 0,90; 0,93; 0,95 i 0,97. Inkubacija plijesni je trajala 30 dana, pri 18 i 25 °C. Inhibitorni učinak timola je istražen u tri koncentracije: od 62,5 do 1500 ppm u ovisnosti o aktivitetu vode. Rast kolonije plijesni je praćen mjerenjem promjera kolonije (u mm) svaki drugi dan inkubacije. Niža temperatura od 18 °C najsnažnije usporava rast svih odabranih plijesni, posebno vrstu *A. flavus* čiji je rast u potpunosti inhibiran pri najnižem aktivitetu vode (0,90). Pri višoj temperaturi, rast plijesni ovisi o aktivitetu vode i koncentraciji timola, pri čemu veće koncentracije snažnije inhibiraju rast odabranih vrsta plijesni.

**Ključne riječi:** temperatura, timol, aktivitet vode, *Aspergillus*

**Rad sadrži:** 55 stranica  
28 slika  
4 tablica  
0 priloga  
25 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. Lidija Lenart          | član          |
| 4. | izv. prof. dr. sc. Spomenka Kovač   | zamjena člana |

**Datum obrane:** 30. rujna 2014. godine

**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 Microbiology  
Subdepartment of Microbiology  
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Course title:** Food microbiology

**Thesis subject** was approved by the Council of the Faculty of Food Technology Osijek at its session no VII. held on 9th of July, 2012.

**Mentor:** *Hrvoje Pavlović, PhD, assistant prof.*

**Technical assistance:** *Vedran Gradvol, MSc, assistant*

**Influence of water activity, temperature and thymol on growth of selected *Aspergillus* species**  
**Mirna Knezović, 74/DI**

**Summary:** The effect of temperature, thymol and water activity was determined to selected *Aspergillus* species: *A. carbonarius*, *A. flavus* and *A. parasiticus*. The growth of fungi was assessed on forage SKDN that sterilized by  $\gamma$ -radiation which water activity level was reduced by glycerol addition to 0.90; 0.93; 0.95 and 0.97. Incubation lasted for 30 days at 18 and 25 °C. Thymol was added into growth media in three different concentrations ranging from 62,5 to 1500 ppm, depending on water activity level. Colony growth was measured every other day measuring its diameter in mm. Lower incubation temperature (18 °C) had the most inhibitory effect to growth of tested species, specially to *A. flavus* (complete growth inhibition at lowest water activity level of 0.90). At higher temperature (25 °C) fungal growth is dependent on water activity and thymol concentration. Higher thymol concentrations applied had the most potent inhibitory effect to selected fungal species growth.

**Key words:** temperature, thymol, water activity, *Aspergillus*

**Thesis contains:** 55 pages  
28 figures  
4 tables  
0 supplements  
25 references

**Original in:** Croatian

### Defense committee:

- |   |            |
|---|------------|
| 1. <i>Dajana Gašo Sokač, PhD, assist. prof.</i> | chair      |
| 2. <i>Hrvoje Pavlović, PhD, assoc. prof.</i>    | supervisor |
| 3. <i>Lidija Lenart, PhD, assist. prof.</i>     | member     |
| 4. <i>Spomenka Kovač, PhD, assist. prof.</i>    | stand-in   |

**Defense date:** 30th of September 2014.

**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. AKTIVITET VODE .....	4
2.1.1. Utjecaj aktiviteta vode na rast mikroorganizama .....	5
2.1.2. Mjerenje aktiviteta vode.....	8
2.2. TEMPERATURA .....	10
2.2.1. Klasifikacija mikroorganizama u ovisnosti o temperaturi .....	11
2.2.2. Utjecaj temperature na rast mikroorganizama .....	12
2.3. TIMOL.....	15
2.3.1. Mehanizam antimikrobnog učinka .....	18
2.3.2. Primjena u prehrambenoj industriji.....	20
2.4. PLIJESNI .....	22
2.4.1. Značaj plijesni u prirodi i mikrobiologiji hrane .....	23
2.4.2. Plijesni roda <i>Aspergillus</i> .....	25
2.4.2.1 <i>Aspergillus carbonarius</i> .....	26
2.4.2.2 <i>Aspergillus flavus</i> .....	26
2.4.2.3 <i>Aspergillus parasiticus</i> .....	27
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	29
3.1. ZADATAK.....	30
3.2. MATERIJAL I METODE.....	30
3.2.1. Timol .....	30
3.2.2. Aktivitet vode.....	30
3.2.3. Temperatura .....	31
3.3. OBRADA PODATAKA.....	31
4. REZULTATI.....	33
4.1. UTJECAJ TEMPERATURE 18 °C, TIMOLA I AKTIVITETA NA RAST ODABRANIH VRSTA RODA <i>ASPERGILLUS</i> ....	34
4.2. UTJECAJ TEMPERATURE 25 °C, TIMOLA I AKTIVITETA NA RAST ODABRANIH VRSTA RODA <i>ASPERGILLUS</i> ....	40
5. RASPRAVA .....	47
6. ZAKLJUČCI .....	51
7. LITERATURA .....	53

## Popis oznaka, kratica i simbola

PTF	Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
HAH	Hrvatska agencija za hranu
$a_w$	Aktivitet vode
LPS	Lipopolisaharidi
ATP	Adenozin trifosfat
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija
EU	Europska unija
MIC	Minimalna inhibitorna koncentracija

## **1. UVOD**

Aktivitet vode je fizikalno-kemijsko svojstvo hrane, općenito je prihvaćen kao iznos (količina) dostupne slobodne vode koja je dostupna mikroorganizmima za rast (Christian, 2000.).

Granična vrijednost aktiviteta vode za rast mikroorganizama je 0,6. Za normalnu aktivnost plijesni potrebna je najmanja  $a_w$  između 0,75 i 0,80, za kserofilne plijesni oko 0,65 (Adam i Moss, 2008.). Plijesni se u prirodi, uglavnom, nalaze u kiselijem i sušem okolišu od bakterija, te mogu tolerirati, pa čak i rasti, na nižim aktivitetima vode nego bakterije (Christian, 2000.).

Temperatura koja predstavlja okolišni čimbenik utječe na parametre rasta u *lag* fazi, na specifičnu brzinu rasta i ukupnog prinosa (Carlile i sur., 2001.). Mikroorganizmi posjeduju ograničeno temperaturno područje u kojem najbolje rastu, a ono je opisano kao glavne (kardinalne) temperature (Herbert i Sutherland, 2000.).

Mnoge gljive posjeduju maksimalnu temperaturu rasta od 30 do 40 °C i minimalnu nekoliko stupnjeva iznad točke ledišta vode (Carlile i sur., 2001.). Najniže temperature za rast gljiva u rasponu su do -7 do 8 °C (Pitt i Hocking, 2009.). Kvasci i plijesni su prilično osjetljivi mikroorganizmi na povišenu toplinu. Nespolne spore plijesni imaju tendenciju veće otpornosti na više temperature od micelija plijesni (Jay, 2000.).

Timol je fenolni monoterpenoid, s hidroksilnom skupinom na drugom položaju na fenolnom prstenu. Antimikrobno djelovanje fenolnih spojeva, kao što je timol, uzrokuje strukturalne i funkcionalne štete na citoplazmatskoj membrani, te utječe na propusnost membrane, što je dokazano gubitkom membranskog potencijala i propuštanje iona kalija i ATP (Hyldgaard i sur., 2012.).

Plijesni su filamentozne gljive koje su odgovorne za razgradnju i recikliranje organskih tvari i nutrijenata. Ponekad je kvarenje jednostavno posljedica opsežne razgradnje materijala (Carlile, 2001.).

Cilj ovog rada je ispitati kako aktiviteta vode, temperature i timola utječu na rast plijesni *Aspergillus carbonarius*, *A. flavus* i *A. parasiticus*.



## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. AKTIVITET VODE

Živi organizmi u potpunosti ovise o prisutnosti određene količine vode u tekućem stanju. Voda je osnovno otapalo i neophodna je za sve reakcije u živom svijetu, pa zbog toga udio vode utječe na rast i razmnožavanje mikroorganizama.

Reakcije u citoplazmi se odvijaju u vodenom mediju. Citoplazma je okružena membranom koja je propusna za molekule vode koje mogu slobodno prolaziti iz citoplazme u okoliš i obrnuto. Koristan parametar koji nam pomaže u razumijevanju tog dinamičnog dvosmjernog protoka jest aktivitet vode ( $a_w$ ) koji je pokazatelj one količine vode kojom mikroorganizam raspolaže u reakcijama metabolizma (Adam i Moss, 2008.).

Živi organizmi sadrže vodu koja im omogućuje rast i povećanje volumena, a moraju je uzeti iz okoline. Zbog dvosmjernog protoka, voda može prijeći u okoliš što može dovesti do isušivanja i smrti stanice. Ulaz ili izlaz vode iz stanice ovisi o razlici vodenog potencijala u stanici i okolnog medija. Voda se kreće iz područja višeg u područje nižeg potencijala (Carlile i sur., 2001.).

Slobodna voda u hrani najlakše se mjeri kao aktivitet vode. Aktivitet vode je fizikalni parametar, koji je Scott uveo u mikrobiologiju (1957.), koji je pokazao da aktivitet vode učinkovito kvantificira odnos između vlage u hrani i količine vode s kojom mikroorganizam raspolaže u reakcijama metabolizma (Pitt i Hocking, 2009.).

Treba napomenuti da aktivitet vode u nekoj namirnici nije isto što i sadržaj vlage. Neki proizvodi mogu imati jednak sadržaj vlage uz različite  $a_w$  vrijednosti. Sadržaj vlage može se definirati kao težinski postotak vlage u odnosu na suhu tvar proizvoda, u pogledu sadržaja vlage proizvoda, uvjeti u kojima ne dolazi do izmjene vlage između proizvoda i njegove okoline nazivaju se statičkim ekvilibrija (Karolyi, 2004.).

Pod takvim uvjetima parcijalni tlak vodene pare ( $p$ ) na površini proizvoda jednak je parcijalnom tlaku vodene pare u neposrednoj okolini proizvoda. Izmjena vlage između proizvoda i njegove okoline pod utjecajem je razlike između ova dva parcijalna tlaka. Aktivitet vode se definira u uvjetima statičnog ekvilibrija (ravnoteže), a mjeri tlak pare koju proizvodi vlaga prisutna u proizvodu (Karolyi, 2004.).

Izračunava se kao:

$$a_w = p / p_s \quad (1)$$

gdje je:

p - parcijalni tlak vodene pare na površini proizvoda

p<sub>s</sub> - parcijalni tlak vodene pare iznad čiste vode pri istoj temperaturi.

Aktivitet vode izražava aktivni dio sadržaja vlage ili dio koji pod normalnim okolnostima može biti izmijenjen između proizvoda i njegovog okruženja. Sadržaj vlage može obuhvaćati i imobilizirani dio kao i aktivnu (slobodnu) vodu u proizvodu. Vrijednosti  $a_w$  mogu se kretati od 0 do 1 (čista voda) (Carlile i sur., 2001.).

Aktivitet vode je koligativno svojstvo. To je svojstvo otopina koje ovisi o broju otopljenih čestica, a ne o njihovoj vrsti, tako da je spoj kao NaCl bolji u smanjenju aktiviteta vode nego spoj saharoze (Adam i Moss, 2008.).

### 2.1.1. Utjecaj aktiviteta vode na rast mikroorganizama

Pomoću vrijednosti aktiviteta vode može se procijeniti koliki dio slobodne vode stoji na raspolaganju za odvijanje metabolizma prisutnih mikroorganizama, to jeste aktivitet vode je pogodan parametar pomoću kojeg se može kontrolirati rast i razvoj mikroorganizama. Pored ovog utjecaja, dokazan je i utjecaj vrijednosti aktiviteta vode na brzinu odvijanja raznih nepoželjnih kemijskih promjena u hrani kao što su: autooksidacija (masti), neenzimsko posmeđivanje, enzimska aktivnost, djelovanje plijesni, djelovanje kvasaca, aktivnost bakterija itd. (Adam i Moss, 2008.).

Rast i metabolička aktivnost mikroorganizama uključujući bakterije i gljive ovisi o dostupnoj vodi. Redukcija u odnosu na optimalnu  $a_w$  vrijednost rasta mikroorganizama općenito dovodi do odgađanja diobe stanica, ograničavanja brzine rasta, te smanjenog broja mikrobnih stanica. Različite skupine mikroorganizama posjeduju različite minimalne vrijednosti  $a_w$  za svoj rast koje su prikazane u **Tablici 1.** (Adam i Moss, 2008.).

**Tablica 1.** Minimalni aktivitet vode za mikroorganizme (Adam i Moss, 2008.)

Skupina mikroorganizama	Minimalni $a_w$
Većina gram negativnih bakterija	0,97
Većina gram pozitivnih bakterija	0,90
Većina kvasaca	0,88
Većina plijesni	0,80
Halofilne bakterije	0,75
Kserofilne plijesni	0,61

Za normalnu aktivnost bakterija potrebna je najveća  $a_w$  vrijednost od 0,92 i 0,96. Za većinu kvasaca je neophodna vrijednost oko 0,88, za plijesni najmanje 0,75 do 0,80, za kserofilne plijesni oko 0,65. Na vrijednost  $a_w$  utječu i faktori kao što su temperatura, pH sredine, sadržaj dodane soli i drugo.

Granična vrijednost aktiviteta vode za rast mikroorganizama je 0,6, a ispod te vrijednosti kvarenje hrane nije mikrobiološki moguće, ali može se dogoditi zbog kukaca ili kemijskih reakcija. Pri aktivitetu vode od 0,6 citoplazma bi trebala sadržavati vrlo visoke koncentracije otopljenih tvari i što bih vjerojatno uzrokovalo da makromolekule kao DNK ne funkcioniraju pravilno, pri čemu je aktivnost i rast onemogućen ili otežan. Međutim, važno je napomenuti da je preživljavanje moguće; mnogi mikroorganizmi mogu opstati pri vrlo niskim aktivitetima (Adam i Moss, 2008.).

Niski aktivitet vode je povezan s tri različite skupine mikroorganizama koji se mogu pronaći u namirnicama:

- pri velikoj koncentraciji soli – halotolerantni,
- pri velikoj koncentraciji šećera – osmotolerantni,
- na suhim/osušanim namirnicama-kserotolerantni.

Ovi pojmovi općenito prikazuju veće grupe mikroorganizama, pa se koriste u kontekstu istraživanja pojedinih prehrambenih namirnica; dokazano je da neki mikroorganizmi rastu

bolje pri smanjenoj  $a_w$  vrijednosti i mogu se opisati kao halotolerantni, osmotolerantni i kserotolerantni (Adam i Moss, 2008.).

Iako mnogi prehrambeni procesi imaju za cilj uništenje mikroorganizama u hrani, drugi procesi, kao što su fermentacije, ovise o njihovom opstanku. Aktivitet vode igra važnu ulogu u procesima uništavanja i očuvanja mikroorganizama u hrani.

Kontrola aktiviteta vode, bilo pojedinačno ili u kombinaciji s drugim inhibitornim čimbenicima, je oblik očuvanja širokog spektra namirnica od mikrobiološkog kvarenja prikazane su u **Tablici 2.** (Christian, 2000.).

**Tablica 2.** Vrijednosti aktiviteta vode za namirnice i mikroorganizme (Alzamora i sur., 2003.)

$a_w$	Vrsta mikroorganizama	Namirnice
1,00 – 0,95	Gram negativne bakterija, spore bakterija, neki kvasci	Namirnice koje sadrže do 40% šećera ili do 7% NaCl, mnoge vrste kobasica, kruh
0,95 – 0,91	Najčešće okruglasti oblici bakterija, laktobacili, vegetativne stanice	Namirnice s oko 50% šećera ili s 12% NaCl; neke vrste salama, trajni sirevi
0,91 – 0,86	Najveći broj kvasaca	Namirnice s oko 65% šećera ili 15% NaCl; suha šunka, polutrajni sirevi, voćni sokovi
0,87 – 0,80	Najveći broj plijesni	Namirnice sa sadržajem 15-20% vlage; voćni kolači, kondenzirano zaslađeno mlijeko
0,80 – 0,75	Najveći broj halofilnih bakterija	Namirnice s 26% soli i visokim sadržajem šećera
0,75 – 0,65	Kserofilne plijesni	Zdrobljeno i djelomično obrano zrno zobi (s oko 10% vlage)
0,65 – 0,60	Osmofilni kvasci	Suho voće s 15-20% vode; karamelna masa s oko 8% vode
Ispod 0,60	Nema mikrobiološkog rasta	Tjestenine i začini s 10-20% vode, jaja u prahu s 5% vode, biskvit, prepržen kruh, kora kruha – sadržaj vode oko 3-5%, mlijeko u prahu (2-3% vode), sušeno povrće (oko 5% vode), kukuruzne pahuljice (oko 5% vode)

Dobro pravilo je da se za dugoročno skladištenje (1 godine ili više) hrana mora održavati na ili ispod 0,68  $a_w$  vrijednosti, dok kod roka trajanja od šest mjeseci na 0,72, a razina iznad 0,77  $a_w$  vrijednosti za kratkoročno skladištenje. Te se brojke odnose na  $a_w$  vrijednosti normalne temperature okoline, odnosno 20 do 30 °C. Ako su primijenjene niske temperature skladištenja, rok trajanja ne ovisi o  $a_w$  vrijednosti, pod uvjetom da je zrak učinkovito isušen (Pitt i Hocking, 2009.).

Kvasci i plijesni se u prirodi, uglavnom, nalaze u kiselijem i sušem okolišu od bakterija, te mogu tolerirati, pa čak i rasti, na nižim aktivitetima vode nego bakterije (Christian, 2000.).

Najniža  $a_w$  vrijednost na kojem rastu bakterije je zabilježena pri 0,75 (zasićena otopina NaCl). Nasuprot tome, kserofilne plijesni mogu rasti pri 0,62 do 0,61, u prisutnosti visokih koncentracija šećera. Ne samo da takvi organizmi rastu u otopinama visoke koncentracije otopljenih tvari, nego se i replikacija genetskog materijala odvija u blizini aktiviteta koji iznosi 0,55, a pri tome aktivitetu DNK je nestabilan (Christian, 2000.).

Raspon  $a_w$  vrijednost pri kojem je moguće klijanje spora je širi na optimalnoj temperaturi, a viša  $a_w$  vrijednost je potrebna za stvaranje nego za klijanje spora. Nadalje, minimalne  $a_w$  razine za rast su niže od onih koje su potrebne za proizvodnju mikotoksina (Abellana, 1999.). Od velikog interesa su *Aspergillus flavus* i *A. parasiticus* koji proizvode aflatoksine kod minimalnih  $a_w$  vrijednost za rast od 0,78, a aflatoksin se ne sintetizira pri aktivitetu od 0,83 u kikirikiju, dok u kukuruзу aflatoksin se sintetizira već od 0,87 pri 30 °C (Christian, 2000.).

### 2.1.2. Mjerenje aktiviteta vode

Aktivitet vode može se mjeriti mjerenjem izravnog ili neizravnog odnosa ravnoteže vlažnosti atmosfere koja je u kontaktu s uzorkom (Christian, 2000.; Adam i Moss, 2008.). To se može postići:

- Manometri za mjerenje tlaka vodene pare - Pri ovom postupku namirnica se stavlja pod vakuum uvjete da bi uspostavila ravnotežu (na kontroliranoj temperaturi) s okolnim zrakom. Nakon uspostave ravnoteže između napona pare ispitivanog uzorka i napona pare okolnog zraka, manometrom se mjeri napon pare okolnog zraka, a pošto je potrebno dosta vremena da bi se postigla ravnoteža ova metoda nije pogodna za brze rutinske analize (Alzamora i sur., 2003.);

- Higrometar za određivanje točke rosišta - Ova metoda se zasniva na kondenzaciji vodene pare na površini zrcala koje je ohlađeno do temperature rosišta u atmosferi izazvanoj ispitivanjem uzorka. Točka rosišta se utvrđuje fotoelektrički i povezana je s  $a_w$  vrijednosti korištenjem psihrometarskih dijagrama. Ovaj uređaj se koristi radi utvrđivanja  $a_w$  vrijednost u širokom rasponu i također omogućuje mjerenje na različitim temperaturama. Mjerenje je vrlo brzo (oko 2 min) ali može se usporiti u slučaju kondenzacije na nižim kritičnim temperaturama nego što je za vodu i nečistom površinom zrcala (Alzamora i sur., 2003.);
- Metode sniženja ledišta - Ova metoda je pogodna za mjerenje  $a_w$  vrijednosti uglavnom tekućih namirnica s  $a_w > 0,97$  iako se preporučuje i za vrijednosti niže od 0,80, također, za tekuće ekstrakte, ali i za homogene čvrste namirnice. Vrijednosti  $a_w$  izračunavaju se mjerenjem točke ledišta i ne razlikuju se mnogo od vrijednosti izmjerenih na 25 °C (razlike su manje od 0,01  $a_w$  jedinice) (Alzamora i sur., 2003.);

Postoji niz instrumenata kojima se mjeri vlažnost zraka zbog njegovog utjecaja na električna svojstva, kao što su provodljivost ili otpor materijala (Adam i Moss, 2008.).

- Električni higrometri - Ovi instrumenti se baziraju na tri tipa senzora vlažnosti:
  - Senzori oblikovani od električne žice prevučene visoko - higroskopnom soli, obično litijevim kloridom (LiCl), čija električna provodljivost ili otpornost ovise o stupnju hidratacije, a samim tim i od relativne vlažnosti uzorka (u ravnoteži sa senzorom),
  - Senzori napravljeni od tekuće higroskopne tvari koja apsorbira i resorbira vlagu (prima i otpušta vlagu) i čija se el. impedanca mijenja sa sadržajem vlage,
  - Senzori sastavljeni od tankog polimernog nositelja čiji se kapacitet mijenja proporcionalno relativnoj vlažnosti (Alzamora i sur., 2003.; Christian, 2000.),
- Higrometar s vlaknima - Ovaj instrument kao senzor koristi sintetičku poliamidnu nit koja se skuplja kada je izložena visokoj relativnoj vlažnosti. Vrijeme uspostavljanja ravnoteže između namirnice i vlakna je približno 3 sata s točnošću od  $\pm 0,01 a_w$  jedinice. Odziv senzora je na poseban način pogođen temperaturnim promjenama i prisustvom isparljivosti. Unatoč njegovoj niskoj osjetljivosti kao i relativno niskoj

cijeni, higrometar s vlaknima se dosta koristi za rutinska ispitivanja u prehrambenoj industriji (Alzamora i sur., 2003.; Christian, 2000.).

Izravno mjerenje tlaka vodene pare je ekstremno teško, a posredne metode se obično koriste za određivanje  $a_w$  vrijednosti.

Točnost dobivena korištenjem posrednih metoda ovisi o kalibracijskoj krivulji s referentnim standardima u intervalu  $a_w$  vrijednosti koja nas zanima (Adam i Moss, 2008.; Christian, 2000.).

## **2.2. TEMPERATURA**

Temperatura je važan okolišni čimbenik za rast mikroorganizama. Mikroorganizmi mogu rasti u rasponu temperature od oko  $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pri atmosferskom tlaku. Najvažniji uvjet je prisutnost vode u tekućem stanju, a time i dostupnost za rast mikroorganizama. Niti jedan organizam nije sposoban za rast u cijelom temperaturnom rasponu. Bakterije su obično ograničene na temperature od oko  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a plijesni oko  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Adams i Moss, 2008.).

Mikroorganizmi su posebno osjetljivi na vanjsku temperaturu, jer oni ne mogu regulirati vlastitu unutarnju temperaturu. Važan faktor koji utječe na rast je osjetljivost enzimskih reakcija na temperaturu, jer svaki enzim posjeduje određenu temperaturu pri kojoj funkcionira optimalno, dok kod drugih temperatura gubi svoju katalitičku funkciju. Kako temperatura raste tako se i brzina katalitičkih reakcija povećava, pri čemu se brzina reakcije udvostručuje za svaki  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  porasta temperature. Kako se povećava brzina reakcija tako i metabolizam postaje aktivni, a mikroorganizam raste brže, no sve do određene temperature. Daljnje povećanje temperature zapravo usporava rast i dovoljno visoke temperature su smrtonosne. Visoke temperature denaturiraju enzime i druge proteine (Willey i sur., 2009.).

Temperatura, također, ima značajan učinak na membrane stanica. Pri vrlo niskim temperaturama membrane se skrutnu (Willey i sur., 2009.). Ovaj učinak može biti zbog ukrućenja lipida membrane koji se događa ispod temperature optimuma, što dovodi do smanjenja učinkovitosti transportnih proteina u membrani. Temperaturni minimum za rast je temperatura na kojoj organizam više nije u mogućnosti rasti (neaktivan) (Nedwell, 1999.). Pri visokim temperaturama lipidni dvosloj jednostavno se topi i raspada (Willey i sur., 2009.).



Mikroorganizmi koji su prilagođeni niskim temperaturama okoline (psihrotrofni i psihrofilni) imaju tendenciju da posjeduju povećani udio nezasićenih membranskih lipida i smanjeni udio lipida u razgranatim lancima u odnosu na vrste prilagođene umjerenim (mezofili) ili visokim (termofili) temperaturama. Također, slične promjene u lipidima membrane mogu se javljati unutar jedne vrste ako se uzgaja u različitim vrijednostima unutar optimalne temperature (Nedwell, 1999.).

### 2.2.1. Klasifikacija mikroorganizama u ovisnosti o temperaturi

Mikroorganizmi se mogu svrstati u nekoliko fizioloških skupina na temelju kardinalnih temperatura, te ih možemo podijeliti prema optimalnoj temperaturi rasta. Prikladnije je definirati kardinalne temperature kao raspon umjesto jedne vrijednosti (**Tablica 3.**) (Adams i Moss, 2008.).

**Tablica 3.** Kardinalne temperature za mikrobni rast (Adams i Moss, 2008.)

Skupine	Temperatura °C		
	Minimalna	Optimalna	Maksimalna
Termofili	40–45	55–75	60–90
Mezofili	5–15	30–40	40–47
Psihrofili	-5 do +5	12–15	15–20
Psihrotrofi	-5 do +5	25–30	30–35

Psihrofili i psihrotrofi posjeduju sposobnost rasta na niskim temperaturama. Oko 1960. pojam psihotrofi predložen je za organizme koji mogu rasti na 5 °C ili niže (Jay, 2000.).

Psihrofili dobro rastu pri 0 °C i posjeduju optimalnu temperaturu za rast 10 °C ili niže, maksimum na oko 15 °C. Mogu rasti na Arktiku i Antarktiku. Oceani predstavljaju ogromna staništa za psihrofile, jer 90% oceanske vode je temperature 5 °C ili hladnije. Psihrotrofi (fakultativni psihrofili) rastu na temperaturama od 0 do 7 °C, iako posjeduju optimalnu

temperaturu između 20 i 30 °C i maksimalnu oko 35 °C. Psihrotrofne bakterije i gljive su glavni uzročnici kvarenja hrane u hladnjacima (Willey i sur., 2009.).

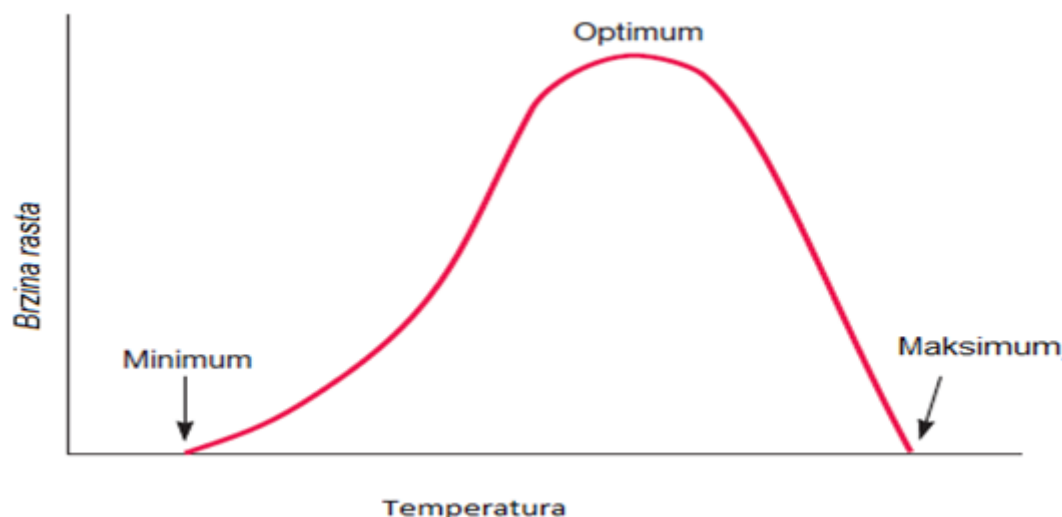
Mezofili su mikroorganizmi koji rastu pri temperaturnom optimumu oko 20 do 45 °C. Oni često posjeduju temperaturni minimum od 15 do 20 °C, a njihov maksimum iznosi oko 45 °C ili niže. Većina mikroorganizama pripadaju toj kategoriji. Gotovo svi ljudski patogeni su mezofili, što se može i očekivati, jer ljudsko tijelo je konstantne temperature od 37 °C (Willey i sur., 2009.).

Termofili mogu rastu na temperaturama između 55 i 85 °C. Njihova minimalna temperatura rasta je obično oko 45 °C, često posjeduju optimum između 55 i 65 °C. Velika većina su prokarioti, iako mogu biti i fotosintetski protisti i gljive. Ovi organizmi uspijevaju u mnogim staništima: kompostu, vulkanskim izvorima i vrućim izvorima. Hipertermofili posjeduju temperaturni optimum između 85 °C i oko 113 °C i obično ne rastu ispod 55 °C (Willey i sur., 2009.).

Psihrotrofni rast se, pri snižavanju temperature, smanjuje sporije nego kod mezofila. Koeficijenti temperature (Q<sub>10</sub>) za različite materijale kao što su acetat i glukoza su niži za uzgoj psihrotrofa nego za mezofile. Kako se temperatura smanjuje brzina sinteze proteina također opada, a to se događa kod odsutnosti promjene u količini stanične DNK. Jedan od razloga mogu biti molekulske vodikove veze koje se javljaju pri niskim temperaturama što dovodi do gubitaka katalitičke aktivnosti enzima. Niske temperature mogu utjecati na vjernost prijevoda glasničke RNK (mRNK) za vrijeme sinteze proteina (Jay, 2000.).

### 2.2.2. Utjecaj temperature na rast mikroorganizama

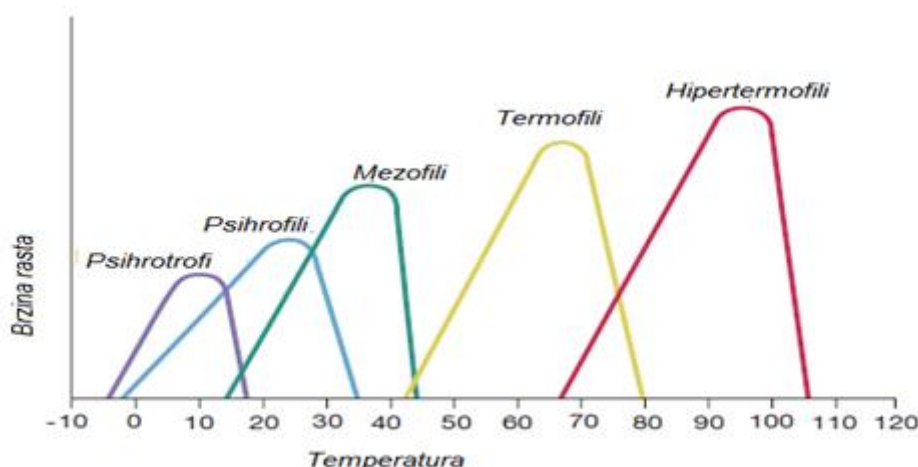
Mikroorganizmi imaju ograničeno temperaturno područje u kojem najbolje rastu, a to su minimalne, maksimalne i optimalne temperature i one su opisane kao glavne (kardinalne) temperature (**Slika 1.**). Minimalne i maksimalne temperature se koriste za određivanje granica rasta organizma, a optimalna temperatura je ona na kojoj se rast odvija na najvećoj brzini. Kardinalna temperatura može varirati ovisno o stupnju razvoja (Herbert i Sutherland, 2000.).



**Slika 1** Rast mikroorganizma pri različitim temperaturama (Willey i sur., 2009.)

Temperatura utječe na parametre rasta u *lag* fazi, na specifičnu brzinu rasta i ukupnog prinosa (Carlile i sur., 2001.). Tako kad se temperatura spusti ispod optimuma za rast određenog mikroorganizma, *lag* faza i generacijsko vrijeme se povećava, a brzina rasta smanjuje, sve dok se temperatura ne približi minimumu za rast gdje dioba stanica prestaje (Herbert i Sutherland, 2000.).

Optimalna temperatura je uvijek bliža maksimalnoj nego minimalnoj temperaturi. Oblik krivulje ovisi o brzini rasta, a temperatura varira. Kardinalne temperaturene točke su karakteristične za svaku vrstu, što je vidljivo na **Slici 2**. Mikroorganizmi se značajno razlikuju i ovise o drugim čimbenicima okoliša kao što su pH i raspoložive hranjive tvari. Glavne mikrobne skupine međusobno se razlikuju u pogledu njihovih maksimalnih temperatura rasta. Gornja granica za protiste je oko 50 °C. Neke gljive rastu na temperaturama od 55 do 60 °C. Prokarioti mogu rasti po znatno višim temperaturama od eukariota. Smatra se da eukarioti ne mogu proizvesti stabilne i funkcionalne membrane pri temperaturama iznad 60 °C (Willey i sur., 2009.).



**Slika 2** Utjecaj temperature na brzinu rasta pojedinih skupina mikroorganizama (Willey i sur., 2009.)

U prehrambenoj mikrobiologiji mezofilni i psihrotrofni organizmi su uglavnom od najveće važnosti, uključujući mnoge od češćih uzročnika bolesti koje se prenose hranom kao što su *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* i *Clostridium perfringens*. U pravilu, mezofili rastu brže, jer se procesi odvijaju na njihovoj optimalnoj temperaturi, za razliku od psihrotrofa. Termofili su, uglavnom, daleko manje važnosti u prehrambenoj mikrobiologiji, iako termofilne spore kod određenih vrsta *Bacillus* i *Clostridium* predstavljaju probleme u ograničenom broju situacija (Adams i Moss, 2008.).

Bakterije koje mogu rasti na ili ispod 7 °C su najčešće gram negativne i, rjeđe, gram pozitivne. Najniža zabilježena temperatura za rast mikroorganizama u hrani je -34 °C (*Rhodotorula*). Kvasci i plijesni mogu rasti češće na temperaturi ispod 0 °C nego bakterije (Jay, 2000.).

Mnoge gljive posjeduju maksimalnu temperaturu za rast od 30 do 40 °C (Carlile i sur., 2001.). Najniže temperature za rast gljiva u rasponu od -7 do 8 °C na vrste *Fusarium*, *Cladosporium* i *Penicillium* (Pitt i Hocking, 2009.).

Termofilne gljive, tj. one koje rastu samo na visokim temperaturama rijetko su od značaja u kvarenju namirnica.

Termotolerantne gljive tj. vrste koje mogu rasti i pri umjerenim i visokim temperaturama su mnogo značajnije. *Aspergillus flavus* i *A. niger* mogu rasti između 8 i 45 °C i pripadaju u destruktivne plijesni (Pitt i Hocking, 2009.).

Askospore plijesni su otporniji pri višim temperaturama od konidiospora (Pitt i Hocking, 2009.).

Kvasci i plijesni su prilično osjetljivi na toplinu. Kvaščeve spore su samo malo otpornije od vegetativnih kvasaca. Nespolne spore plijesni su otpornije od micelija plijesni na višim temperaturama (Jay, 2000.).

Gljive i bakterije proizvode veće stanice tijekom rasta u psihrotrofnim uvjetima, nego pri mezofilnim (Jay, 2000.).

### 2.3. TIMOL

Timol je jedan od glavnih sastojaka eteričnog ulja origana *Origanum vulgare* L. i majčine dušice *Thymus vulgaris* L., koji ima antimikrobni učinak (**Tablica 4.**). Eterična ulja su aromatične i hlapljive tekućine ekstrahirane iz biljaka, koje se odlikuju jakim mirisom (Burt, 2004.; Evans i Martin, 2000.).

**Tablica 4.** Glavni sastojci odabranih eteričnih ulja koji pokazuju antibakterijska svojstva (Burt, 2004.).

Naziv eteričnih ulja	Latinski naziv biljnih izvora	Glavni sastojci	Približan sastav u %
Origano	<i>Origanum vulgare</i> L.	Karvakrol Timol $\gamma$ -Terpinen p-Cimen	tragovi-80% tragovi-64% 2 –52% tragovi-52%
Timijan	<i>Thymus vulgaris</i> L.	Timol Karvakrol $\gamma$ -Terpinen p-Cimen	10–64% 2 – 11% 2 –31% 10–56%

Eterična ulja su biljni derivati s hidrofobnim svojstvima. Oni se izdvajaju iz različitih biljnih organa, lišća, voća, cvijeća, lukovica, sjemenki, korijenja, kore drveta i aromatičnog bilja. Na primjer, eterično ulje dobiveno iz sjemena korijandera (*Coriandrum sativum* L.) ima drugačiji sastav od eteričnog ulja koji se dobiva iz nezrelog lišća iste biljke; kemijske razlike postoje među eteričnim uljima ekstrahirani iz pojedinih biljaka ili različitih sorti biljaka, također postoje i razlike na genetskoj osnovi, starosti biljke i okruženju u kojem biljka raste (Benchaar i sur., 2008.).

Eterična ulja su hidrofobna, topiva u alkoholima, nepolarnim ili slabo polarnim otapalima, voskovima i uljima, ali samo slabo topivi u vodi; najčešće su bezbojni ili blijedo žute boje s izuzetkom plavog eteričnog ulja kamilice (*Matricaria chamomilla* L.) i većinom tekući i niže gustoće od vode (eterična ulja cimeta i klinčića kao iznimke) (Djilani i Dicko, 2012.).

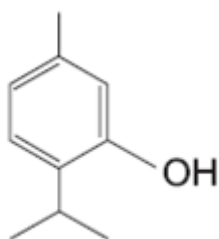
Oni se dobivaju fermentacijom, ekstrakcijom ili tiještenjem te metodom destilacije vodenom parom koja se najčešće koristi u komercijalnoj proizvodnji eteričnih ulja. Naziv „essential oil“ potječe iz 16. stoljeća od švicarskog reformatora medicine Paracelsusa von Hohenheima koji je aktivne komponente u lijekovima nazivao *Quinta essentia* (Burt, 2004.). Iako je svega 100 vrsta biljaka dobro poznato po svojim eteričnim uljima postoji više od 2000 biljaka raspoređenih u oko 60 porodica poput *Lamiaceae*, *Umbelliferae* i *Compositae* koje mogu sintetizirati eterična ulja. Procjenjuje se kako postoji 3000 vrsta eteričnih ulja od kojih je oko 300 u komercijalnoj uporabi (Djilani i Dicko, 2012.).

Eterična ulja su vrlo složene prirodne smjese koje mogu sadržavati oko 20 do 60 komponenata pri različitim koncentracijama. Karakteriziraju ih dvije ili tri glavne komponente u prilično visokim koncentracijama (20-70%) u odnosu na ostale komponente prisutne u tragovima. Na primjer karvakrol (30%) i timol (27%) su glavne komponente eteričnog ulja origana (Bakkali i sur., 2008.).

Većinske komponente eteričnih ulja čine dvije grupe različitog biosintetskog porijekla. Prva grupa se sastoji od terpena i terpenoida, a druga od aromatskih i alifatskih sastojaka, a sve su male molekulske mase (Bakkali i sur., 2008.).

Timol (5-metil-2-(1-metiletil) fenol) pripada u terpenoide. Timol je strukturno vrlo sličan karvakrolu (**Slika 3**), koji ima hidroksilnu skupinu na različitom mjestu fenolnog prstena; oba

povećavaju propusnost stanične membrane bakterija, no s kemijske točke gledišta, karvakrol reaktivniji od timola. Kod timola izopropil grupa se nalazi u orto položaju, jače odbija elektrone od metil grupe i ugljika za koji je vezana hidroksilna grupa ima manju potrebu da privlači elektrone. Također su jače van de Waalsove privlačne sile na izopropil grupe u odnosu na metil grupu i sve to čini hidroksilnu grupu manje reaktivnom. Karvakrol i timol mogu uzrokovati raspad vanjske membrane gram pozitivnih bakterija iz koje se otpuštaju lipopolisaharidi (LPS) i povećava propusnost citoplazmatske membrane za ATP (Burt, 2004.).



**Slika 3** Strukturna formula timola (Burt, 2004.).

Terpeni čine strukturno i funkcionalno različite klase, to su prirodni spojevi koji nastaju “izoprenskim biosintetskim putem” od aktivnih C5-jedinica, tj. “aktivnog izoprena” izopentenilni difosfat (IPP) i njegovog izomera dimetilalildifosfata (Bakkali i sur., 2008.).

Terpenoidi su terpeni koji prolaze biokemijske promjene putem enzima koji im ugrađuju molekule kisika i premještaju ili uklanjaju metil skupine. Terpenoidi se mogu podijeliti u alkohole, estere, aldehide, ketone, etere i fenole. Primjeri terpenoidi su: timol, karvakrol, linalool, linalil acetat, citronelol, piperiton, mentol i geraniol (Hyltdgaard i sur., 2012.).

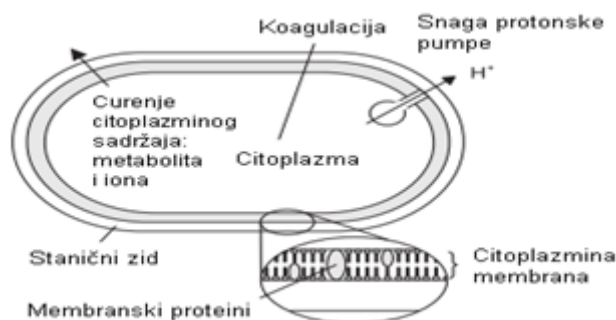
Monoterpeni se tvore spajanjem dviju izopren jedinice (C10), a biokemijskim promjenama putem enzima prelaze u monoterpenoide i oni su najznačajnije molekule koje čine 90% eteričnih ulja i omogućuju veliku raznolikost struktura. Jedna od struktura su fenoli u koje pripada timol (Bakkali i sur., 2008.).

Fenoli su aromatski spojevi koje su među najreaktivnijima, potencijalno toksični, nadražuju kožu i sluznicu. Njihova svojstva su slična alkoholima, ali izraženija. Osim što djeluju antimikrobno, mogu stimulirati imunološki i živčani sustav i mogu smanjiti kolesterol. Fenoli se često nalaze u kristalnom obliku, pri sobnoj temperaturi (Djilani i Dicko, 2012.).

### 2.3.1. Mehanizam antimikrobnog učinka

S obzirom na vrlo veliki broj različitih eteričnih ulja i njihovih sastojaka, njihova antimikrobna svojstva ne mogu se pripisati samo jednom specifičnom mehanizmu djelovanja. Stoga su različiti načini djelovanja uključeni u antimikrobno djelovanje eteričnih ulja (Džilani i Dicko, 2012.).

Mjesta i mehanizmi djelovanja komponenata eteričnih ulja u stanici označena su na **Slici 4**. Mehanizmi nisu odvojeni jedan od drugog, jer se neki odvijaju kao posljedica drugih mehanizama (Burt, 2004.). Jedan od mogućih mehanizama je nepovratno oštećenje membrane stanica, koje izaziva oštećenje citoplazme, propuštanje iona, gubitak energije (glukoze, ATP), što izravno vodi do razgradnje mikroorganizama, a time i smrti stanice. Drugo moguće djelovanje je inhibicija proizvodnje amilaze i proteaze pri čemu se zaustavi tok elektrona, što izaziva koagulaciju sadržaja stanica (Džilani i Dicko, 2012.).



**Slika 4** Mehanizam djelovanja eteričnih ulja na stanicu mikroorganizma (Burt, 2004.)

Važno svojstvo eteričnih ulja i njihovih komponenata je hidrofobnost, što dovodi do narušavanja strukture bakterijske stanične membrane i mitohondrija te stanična membrana postaje još propusnija. Može doći do curenja citoplazmatskog sadržaja: metabolita i iona. Određena količina istjecanja citoplazmatskog sadržaja iz bakterijske stanice se može tolerirati bez gubitka vitalnosti, ali veći gubitak staničnog sadržaja te izlazak ključnih molekula i iona dovodi do smrti stanice (Burt, 2004.).

Antifungalna aktivnosti je prilično slična bakterijskoj. Međutim, dva dodatna inhibirajuća djelovanja koja su karakteristična za antifungalnu aktivnost su: uspostavljanje pH gradijenta u području citoplazmatske membrane i blokiranje proizvodnje energije kod kvasaca pri čemu dolazi do narušavanja membrane (Džilani i Dicko, 2012.).



Timol je strukturno vrlo sličan karvakrolu, koji ima hidroksilnu skupinu na drugom položaju na fenolnom prstenu. Antimikrobno djelovanje fenolnih spojeva, kao što je timol, uzrokuje strukturalne i funkcionalne štete na citoplazmatskoj membrani (Hyldgaard i sur., 2012.).

Hipotezu o načinu djelovanja timola na *Salmonella typhimurium* i *Staphylococcus aureus*, postavio je Juven i sur. (1994.) prema njoj timol se veže na proteine membrane hidrofobnim dijelom vodikovim vezama i na taj način mijenja propusnost membrane. Bolje djelovanje ima pri pH 5,5 nego pri 6,5 jer nije disociran i zbog toga je još više hidrofoban te je njegovo vezanje na staničnu membranu bolje (Burt, 2004.).

Istraživanja su pokazala kako postoji interakcija između timola i stanične membrane pri čemu ona postaje propusna, što je dokazano gubitkom membranskog potencijala i propuštanjem iona kalija i ATP (Hyldgaard i sur., 2012.).

Obrada stanica *E. coli* s timolom uzrokuje oslobađanje lipopolisaharida i poremećaj vanjske membrane. Timol se veže za polarni dio lipidnog dvosloja, što uzrokuje promjene u staničnoj membrani, a pri niskim koncentracijama timola moguća je adaptacija tj. prilagodba membranskih lipida u svrhu kompenzacije fluidnog učinka timola za održavanje membrane i strukture (Hyldgaard i sur., 2012.).

Osim interakcije s membranskim fosfolipidima, postoje dokazi interakcija timola s membranskim proteinima, koji usporavaju oporavak stanica nakon privremenog izlaganja. Juven i sur. (1994) su pretpostavili kako timol tvori kompleks s membranskim proteinima putem vodikovih veza i hidrofobnih interakcija (Hyldgaard i sur., 2012.).

Timol, također, usporava ciklus limunske kiseline i utječe na mnoge enzime koji izravno ili posredno sudjeluju u sintezi ATP-a i, na taj način, pokazuje utjecaj na važne energente i procese koji smanjuju sposobnost oporavka stanica nakon izlaganja (Hyldgaard i sur., 2012.).

Fungicidno djelovanje timola protiv plijesni i kvasca je slabo istraženo. Neka istraživanja ukazuju na interakcije s membranom stanica i unutarstaničnim enzimima. Timol remeti vakuole i staničnu membranu, a smanjuje biosintezu ergosterola sojeva *Candida*, a time utječe na integritet stanične membrane, jer ergosterol regulira fluidnost membrane (sličan kolesterolu u životinjskim stanicama) (Hyldgaard i sur., 2012.).

### 2.3.2. Primjena u prehrambenoj industriji

Iako prehrambena industrija prvenstveno koristi eterična ulja kao arome, oni predstavljaju zanimljiv izvor prirodnih antimikrobnih sredstava za očuvanje hrane. Međutim, primjena eteričnih ulja kao konzervanasa zahtijeva detaljno znanje o njihovim svojstvima, tj. minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIC), raspon djelovanja na ciljane organizme, način djelovanja, te učinak na matriks hrane (Hyldgaard i sur., 2012.).

Unatoč modernim poboljšanjima u higijeni i proizvodnji, sigurnost hrane je važno pitanje za javno zdravstvo (WHO, 2002a). Procijenjeno je kako čak 30% ljudi svake godine u razvijenim zemljama pati od bolesti koje se prenose hranom (Burt, 2004.). Procjenjuje se da se svake godine u SAD-u, 31 vrsta patogena uzrokuju 9,4 milijuna slučajeva bolesti koje se prenose hranom (Hyldgaard i sur., 2012.). Prema tome, postoji i dalje potreba za novim postupcima za smanjenje ili uklanjanje patogene hrane, eventualno u kombinaciji s postojećim metodama (Burt, 2004.).

Osim toga, javlja se trend potrošača koji žele proizvode s nižim sadržajem soli i šećera, što predstavlja povećanu potrebu za novim i učinkovitim konzervansima, jer se snižavanjem sadržaja soli i šećera ugrožava rok trajanja proizvoda. Širok raspon konzervansa se koristi za povećanje roka trajanja proizvoda tako što inhibiraju rast mikroorganizama (Hyldgaard i sur., 2012.). U isto vrijeme, u zapadnom društvu se javlja trend 'zelenog' konzumerizma, tj. konzumiranje hrane koja sadrži manje sintetskih aditiva (Burt, 2004.). Zbog negativne percepcije potrošača prema sintetičkim dodacima prehrani javlja se zanimanje za pronalaženje prirodnih alternativnih tradicionalnih rješenja. Iako su se eterična ulja prvobitno koristila radi promjene ili poboljšanja okusa, njihovo antimikrobno djelovanje ih je učinilo atraktivnim izborom za zamjenu sintetskih konzervansa i aditiva (Hyldgaard i sur., 2012.).

Mnoge komponente eteričnog ulja su prihvaćene od strane Europske komisije za uporabu kao arome u prehrambenim proizvodima. Registrirane arome su npr., linalool, timol, eugenol, karvon, cinamaldehyd, vanilija, karvakrol, citral i limonen, i smatra se da ne predstavljaju opasnost za zdravlje potrošača (Hyldgaard i sur., 2012.). Estragol i metil eugenol su uklonjeni s popisa 2001., zbog toga što su genotoksični (Odluka Komisije od 23.

siječnja 2002.). Nove arome mogu se registrirati nakon provedbe toksikološke i metaboličke studije (Burt, 2004.).

Unatoč pokazateljima potencijala eteričnih ulja i njihovih sastojaka, njihova upotreba kao konzervansa u hrani je ograničena, jer su visoke koncentracije potrebne za postizanje dovoljne antimikrobne aktivnosti. U mnogim prehrambenim proizvodima, hidrofobni sastojci eteričnih ulja su ugroženi radi interakcija s komponentama matriksa hrane, kao što su masti, proteini i škrob. Nadalje, antimikrobna potencija sastojaka eteričnih ulja ovisi o pH, temperaturi i kontaminaciji (Hylgaard i sur., 2012.).

Intenzivan miris eteričnih ulja, pa čak i pri niskim koncentracijama, može izazvati negativan učinak na organoleptičke karakteristike. Radi interakcije s komponentama matriksa hrane potrebno je povećati koncentraciju eteričnih ulja, što ograničava njihovu primjenu. Različite strategije mogu se koristiti kako bi se izbjegao ovaj problem. Jedna mogućnost je korištenje eteričnih ulja u aktivnoj ambalaži, a ne kao sastojak u samom proizvodu. Eterična ulja mogu se ukomponirati u jestive polimere i biorazgradive premaze ili vrećice koje pružaju sporo otpuštanje na površini hrane ili u slobodni prostor paketa, primjerice voće, meso i riba (Hylgaard i sur., 2012.).

Sastav i struktura hrane imaju značajan utjecaj na dinamičke i završne rezultate interakcije između namirnica i eteričnog ulja. Prisutni sastojci mogu poboljšavati ili inhibirati interakciju, tako da se može manipulirati prehrambenim pripravcima kako bi se postigao željeni učinak. U prehrambenoj proizvodnji eterična ulja se koriste u pekarskim proizvodima, siru, mesu i voću (Rasooli, 2007.).

Bakterijska osjetljivost na antimikrobni učinak eteričnih ulja također se povećava sa smanjenjem pH hrane, temperature skladištenja i količine kisika u pakiranju. Pri niskom pH hidrofobnost eteričnih ulja se povećava, što omogućuje da se lakše otapaju u lipidima stanične membrane ciljanih bakterija (Rasooli, 2007.).

Općenito se pretpostavlja da visoke razine masti i / ili proteina u hrani štite bakterije od djelovanja eteričnih ulja. Na primjer, ako se eterična ulja otope u lipidnoj fazi hrane biti će manje dostupni da djeluju na bakterije prisutne u vodenoj fazi. Ugljikohidrati u hrani ne

predstavljaju zaštitu za bakterije od djelovanja eteričnih ulja, koliko masti i bjelančevina to čine. Visoka razina vode i / ili soli olakšava djelovanje eteričnih ulja (Burt, 2004.).

## 2.4. PLIJESNI

Plijesni su velika skupina gljiva, to su eukarioti, nefotosintetski organizmi, stanice obavijene staničnom stijenkom koja je najčešće, sastavljena od polisaharida hitina (Duraković, 1996.).

Tijelo plijesni je građeno od gustog sustava cjevastih stanica bez klorofila, obično bezbojnih. Nitaste su građe, a niti (hife) rastu kao isprepletana masa koja se naziva micelij. Micelij se, kao prašnjava ili paučinasta (pahuljasta) prevlaka, rasprostire po podlozi (Čvek i sur., 2010.).

Postoje tri osnovna ekološka tipa plijesni i to: plijesni polja (*Alternaria*, *Helminthosporium*, *Cladosporium* i *Fusarium*), plijesni u skladištima (*Penicillium* i *Aspergillus*) i plijesni uznapredovalog kvarenja (*Papulaspora*, *Sordaria*, *Mucor*, *Chaetomium* i *Rhizopus*) (Mašek i Šerman, 2006.). Mogu se klasificirati i prema vrsti hifa tada se dijele na one koje imaju septirane, tj pregrađene hife i na one koje to nemaju. Septirane hife poprečno pregrađene nitima, koje imaju pore i omogućavaju protok citoplazme i brojnih staničnih organela. U neseptiranih hifa nema fizičke granice prema kojoj bi se razlikovale pojedinačne stanice (Duraković, 1996.).

Plijesni se razmnožavaju putem spora koje mogu biti spolne i nespodne, spolne spore se rjeđe stvaraju od nespodnih. Spore nastaju na krajevima zračnih hifa, proizvode se u velikom broju, lagano se šire i otpornije su u uvjetima koji uništavaju vegetativne stanice. Zajednička svojstva spora plijesni jesu razmnožavanje, širenje i zaštita vrste od štetnih okolišnih uvjeta. Nespodne spore stvaraju se u procesu jednostavnog dijeljenja stanica bez oplodnje i mejoze. Spodne spore rezultat su spolnog razmnožavanja koji se sastoji od 3 faze: Haploidna faza stanice donora prodire u stanicu akceptora, spajaju se jezgre tvoreći diploidnu zigotu i mejozom se reducira broj kromosoma, stvaraju se haploidne jezgre (haploidne spore).

Nove kolonije plijesni mogu biti oblikovane i od fragmenta hifa. Za takav način razmnožavanja nisu potrebne spore. Fragmenti hifa jednostavno rastu stalno i tvore nove kolonije koje nisu istovjetne roditeljskoj, taj način tvorbe kolonija naziva se vegetativno razmnožavanje (Duraković, 1996.).

Svojim metabolizmom plijesni proizvode različite kemijske spojeve, od jednostavnih organskih kiselina do velikih i složenih molekula. Jedna od važnijih skupina metabolita plijesni su mikotoksini koji uzrokuju oboljenja nazvana mikotoksikoze (Čvek i sur., 2010.). Mikotoksini su produkti sekundarnog metabolizma. Za razliku od antibiotika koji su toksični za mikroorganizme, mikotoksini su, osim za mikroorganizme, štetni za ljude i životinje. Aflatoksin je, ekonomski gledano, najvažniji mikotoksin u prehrambenim proizvodima. Proizvode ga plijesni *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* i druge vrste plijesni, a do sada je poznato 16 frakcija. Četiri frakcije aflatoksina B1, B2, G1 i G2 su najtoksičnije i uzrokuju oštećenja i cirozu jetre kod ljudi i životinja te iniciraju tumore i teratogene efekte (Pitt i Hocking, 2009.).

#### **2.4.1. Značaj plijesni u prirodi i mikrobiologiji hrane**

Plijesni su filamentozne gljive koje su odgovorne za razgradnju i recikliranje organskih tvari i nutrijenata, taj se proces prirodno pojavljuje u okolišu. No, mikrobn metabolizam hranjivih tvari, koji ih čine neprihvatljivim za ljudsku upotrebu, obično se označava kao mikrobiološko kvarenje. Kvarjenje se događa svuda, ali je osobito važno u vlažnim područjima gdje toplina i vlaga potiču rast gljiva. Ponekad je kvarenje jednostavno posljedica opsežne razgradnje materijala, međutim, može se dogoditi kod ograničenog rasta plijesni koje stvaraju toksične sekundarne metabolite, mikotoksine. Kada mikroorganizmi djeluju u korist ljudi, te procese nazivamo fermentacija ili biotransformacija (Carlile, 2001.).

Plijesni koloniziraju sastojke hrane, prodiru u njih, ispuštaju razne enzima, povećavaju metabolite i reakcijske produkte, povećaju svoju biomasu. U mnogim slučajevima se taj slijed događaja smatra kvarenjem, zbog lošeg mirisa, neželjenih promjena boje, nepoželjnog okusa, i toksičnosti. Zanimljivo je, međutim, da u određenim situacijama, kolonizacije plijesni mogu donijeti poželjne promjene u hrani, a nazivamo ih fermentacijom. Obzirom da je metabolizam plijesni aeroban proces, korištenje termina fermentacije, što ukazuje na anaerobni mehanizam proizvodnje energije, je pogrešna po definiciji. Ipak termin fermentacija plijesnima je široko prihvaćen u smislu bioprocesa koji rezultira poboljšanjem kvalitete (Nout, 2007.).

Primjeri gdje plijesni fermentacijom poboljšavaju teksturu, probavljivost, prehrambenu vrijednost, okus ili izgled sirovina su tempeh, rižino vino i soja umak. Iako se znatno razlikuju

po karakteru, rižino vino i soja umak imaju dovoljno zajedničkih obilježja u proizvodnji, oba su predstavnici proizvoda koji uključuju aktivnost plijesni u dvostupanjskoj fermentaciji (Adams i Moss, 2008.). *Aspergillus oryzae* i *Aspergillus sojae* su tipične industrijske plijesni koje se stoljećima koriste u proizvodnji *Koji* za proizvodnju soja umaka i rižinog vina (Nout, 2007.).

Tempeh je tradicionalni indonezijski (točnije japanski) prehrambeni proizvod od soje i starter kulture plijesni. Mješovita kultura gljiva i bakterija utječe na fermentaciju kod tempeha, ali najvažnija komponenta je *Rhizopus oligosporus*, iako su i *Rhizopus* i *Mucor* vrste često izolirane (Adams i Moss, 2008.).

Za razliku od mnogih fermentiranih namirnica, tempeh nije sredstvo za poboljšanje roka trajanja njegovog sirovog materijala koji je u svakom slučaju po sebi vrlo stabilan. Tempeh sadrži antioksidanse koji usporavaju razvoj užeglosti, ali proizvod ima rok od jedan do dva dana nakon čega se razvija miris amonijaka. Proizvod tempeh poboljšava prihvatljivost inače neprihvatljive hrane. Svježi tempeh ima ugodan miris i okus po orahu i može se konzumirati na razne načine, a osim poboljšanja prihvatljivosti, fermentacija također poboljšava prehrambenu kvalitetu zrna soje (Adams i Moss, 2008.).

Tijekom 1950-ih pokrenuta su istraživanja za novim izvorima proteina, jer je procijenjeno da životinjski proteini neće biti dovoljni da zadovolje ljudske potrebe. Izvori mnogih istraživanja prvenstveno namijenjenih za stočnu hranu su fokusirani na mikroorganizme kao proteine, koji su nazvani proteini jedne stanice (*single-cell protein*). Opći problem kod proteina plijesni tj. mikroproteina je moguće onečišćenje mikotoksinima. *Fusarium* vrsta je jedini komercijalno dostupni mikroprotein proizvod za prehranu ljudi: *Quorn*<sup>®</sup>, i to od vrste *Fusarium venenatum* (Thrane, 2007.).

Mikroprotein je prehrambeno preporučljiv proizvod, koji kada je svjež dobiven ima sadržaj proteina od 12% i dobar sastav aminokiselina, sve esencijalne aminokiseline su prisutne u koncentracijama sličnim onim u jajetu. Probavljivost proteina može se usporediti s goveđim i sojinim proteinima, koja je čak povećana u konačnim pripravcima (*Quorn*<sup>®</sup> proizvodi) zbog dodatka proteina jaja i mlijeka. Mikroprotein ima nezasićene / zasićene masne kiseline omjer 4/1, a ne sadrži kolesterol, i za razliku od životinjskih izvora proteina, mikroprotein sadrži 6% dijetalnih vlakana iz micelija stanične stijenke (Thrane, 2007.).

Gljive uzrokuju goleme gospodarske gubitke. Kao saprofiti razgrađuju uginule organizme sve do najjednostavnijih kemijskih spojeva. Konačni produkti razgradnje su voda, ugljikov-dioksid i dušik. Može se reći da proces razgradnje "pokreće život" jer se hranjive i mineralne tvari oslobađaju natrag u tlo i organizmi ih ponovno mogu iskoristiti, no na isti način dovode do oštećenja hrane i industrijskih dobara. Kao paraziti uzrokuju gubitke usjeva, bolesti ljudi i domaćih životinja. Blagotvorna aktivnosti gljiva, međutim, je također od velikog ekonomskog značaja (Carlile, 2001.).

Plijesni su najčešći uzročnici kvarenja voća, jer im pogoduje niži pH, koji je u voću uzrokovan velikim sadržajem organskih kiselina. Kao i kod koncentriranih proizvoda od voća kao što su pekmezi, marmelade i džemovi, gdje im za rast pogoduje visok sadržaj šećera. U mliječnim proizvodima kao što su jogurti i sirevi, također su prisutni, zbog snižene pH vrijednosti. Žitarice, sjemenke i orašasti plodovi najpogodniji su za rast plijesni, kao i za proizvodnju mikotoksina. Za rast im pogoduje, uz nizak pH, i niska koncentracija dušika. Mogu iskorištavati složene ugljikohidrate, podnose visoki osmotski tlak tako da mogu rasti i u okolišu s visokim sadržajem šećera ili soli (Pitt i Hocking, 2009.).

#### **2.4.2. Plijesni roda *Aspergillus***

*Aspergillus* vrste su veoma raširene u prirodi, prije svega u zemljištu. Mogu se naći na raznim uskladištenim proizvodima kao što su žitarice, orašasti plodovi i začini, a češće u tropskim i subtropskim nego u umjerenim klimatskim područjima (Hocking, 2006.).

*Aspergillus* je prvi put opisana prije gotovo 300 godina, te je važan i sa stajališta kvarenja, jer mnoge vrste proizvode mikotoksine, no nekoliko vrsta se koriste u proizvodnji fermentirane hrane (npr. *Aspergillus oryzae*) (Hocking, 2006.), a koristi se i za sintezu kemikalija za biosintetsku transformaciju i proizvodnju enzima (Pitt i Hocking, 2009.).

Proizvodnja enzima važna je uloga *Aspergillus* vrste u proizvodnji hrane, zbog sposobnosti da proizvode velike količine izvanstaničnih enzima kao što su proteaze, amilaze, lipaze i pektinaze. Ti enzimi su važni u industrijskoj proizvodnji mliječnih, pekarskih proizvoda, proizvodnji piva, sokova i kože te u industriji škroba (Webster i Weber 2007.).

Toksini *Aspergillus* vrste posjeduju široki spektar toksičnosti. Aflatoksin B1 je kancerogen za jetru velikog broja životinjskih vrsta, uključujući i ljude. Okratoksin i citrinin utječu na funkciju

bubrega, ciklopiazonička kiselina ima širok spektar djelovanja. Toksini koje proizvodi *Aspergillus* vrsta su i sterigmatocistin, fumitremorgen (Hocking, 2006.).

#### 2.4.2.1 *Aspergillus carbonarius*

*Aspergillus carbonarius* je rod plijesni iz sekcije *Nigri*.

Istaknut je u posljednjih 10-ak godina zbog svoje sposobnosti da proizvodi okratoksin A u grožđu (Hocking, 2006.). Pojavljuje se na grožđu tijekom sušenja i može se razviti na voću ako je prije berbe bilo kiše (Pitt i Hocking, 2009.).

*Aspergillus carbonarius* karakteriziraju velike, gotovo crne konidiospore promjera 7 do 11  $\mu\text{m}$  grubih stijenki, tankih glatkih stijenki i fino zaobljene, bezbojne do smečkaste prema vrhu. Vezikule su promjera 60 do 90  $\mu\text{m}$  gotovo okrugle. Metule pokrivaju cijelu površinu vezikule (Hocking 2006.). Kolonije su crne, a sve glave proizvode metule (Pitt i Hocking, 2009.).

*Aspergillus carbonarius* može rasti na temperaturi od 10 °C, ali ne i pri 7 i 8 °C, posjeduje optimalnu temperature oko 30 °C i maksimalnu oko 41 °C. Optimalna  $a_w$  za rast je oko 0,96 do 0,98, s najmanje  $a_w$  0,85 pri temperaturi od 25 do 30 °C (Pitt i Hocking, 2009.). Međutim, optimalna temperatura za proizvodnju okratoksina A je manja nego za rast i kreće se oko 15 do 20 °C (Hocking, 2006.).

#### 2.4.2.2 *Aspergillus flavus*

*Aspergillus flavus* je rod plijesni iz sekcije *Flavi*.

*Aspergillus flavus* je kozmopolit (Hocking, 2006.). Osobito mu odgovara tropska klima, i često je prisutan na kikirikiju i orašastim plodovima, sjemenu uljarica, žitaricama i sušenom voću (Pitt i Hocking, 2009.).

*Aspergillus flavus* je karakterističan po svojoj svijetlo žuto-zelenoj (ili rjeđe žutoj) boji konidija, konidije su prilično promjenjive u obliku i veličini, posjeduju relativno tanke stijenke i osim toga, vezikule su veće i do 50  $\mu\text{m}$  promjeru, a obično metule pokrivaju tri četvrtine površine vezikule (Pitt i Hocking, 2009.). *Aspergillus flavus* može proizvesti aflatoksine B1, B2 i ciklopiazoničnu kiselinu (CPA) (Hocking, 2006.).

Minimalne temperature za rast *Aspergillus flavus* je oko 10 do 12 °C, a najviše oko 43 do 48 °C i optimalna pri 33 °C. Aflatoksini se proizvodi pri 12 do 40 °C. Njegov optimalni  $a_w$  za rast je 0,996, a kod minimalnim  $a_w$  za rast postoje različiti podaci tako pri 33 °C  $a_w$  je 0,78  $a_w$  i 0,82 na 25 °C, 0,81 na 30 °C i 0,80 na 37 °C (Hocking, 2006.).



### 2.4.2.3 *Aspergillus parasiticus*

*Aspergillus parasiticus* je rod plijesni iz sekcije *Flavi*.

Prirodno prebivalište mu je u tlu, žitaricama i hrani, uglavnom povezane s uzgojem kikirikija. Za rast mu pogoduju više temperature i povećana vlaga, tako da mu najviše odgovara tropska klima. Najvažniji izvor iz hrane je kikiriki. *Aspergillus parasiticus* proizvodi aflatoksine B1, B2, G1 i G2, kojičnu i aspergiličnu kiselina, ali ne i ciklopiazoničnu kiselinu (Pitt i Hocking, 2009.).

Konidije *Aspergillus parasiticus* su kuglaste i posjeduju relativno debele, grube stijene. Vezikule rijetko prelazi 30 µm u promjeru i metule su rijetke (Hocking, 2006.).

*Aspergillus parasiticus* raste u rasponu temperatura od 12 do 42 °C, s optimalnom temperaturom od 32 °C. Minimalni aktivitet vode za rast na 25 °C je 0,82, 0,81 pri 30 °C, i 0,80 za 37 °C. Rast *Aspergillus parasiticus* odvija se u rasponu pH od 2,4 do 10,5 pri 25, 30 i 37 °C, a rast nije moguć na pH 2,2 pri temperaturi od 25 °C. Uvjeti pod kojima *Aspergillus parasiticus* proizvodi aflatoksine su slični onima kod *Aspergillus flavus*. Podaci ukazuju na proizvodnju u temperaturnom području od 12 do 40 °C, pri aktivitetu vode od 0,86, i rasponu pH od 3 do 8 ili više. Proizvodnja aflatoksina G1, u odnosu na B1, je viša pri nižim temperaturama (Pitt i Hocking, 2009.).



### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK

Zadatak rada je ispitati utjecaj aktiviteta vode, temperature i timola na linearni rast kolonija plijesni roda *Aspergillus*: *A. carbonarius*, *A. flavus* i *A. parasiticus*.

### 3.2. MATERIJAL I METODE

Za istraživanje navedenih utjecaja upotrijebljene su čiste kulture plijesni vrsta:

*Aspergillus carbonarius*

*Aspergillus flavus* i

*Aspergillus parasiticus*

iz kolekcije kultura mikroorganizama Katedre za biologiju i mikrobiologiju Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek.

Kulture su održavane na krumpirovom agaru s glukozom (PDA; Biolife, Italija). Prije eksperimentalnog rada, kulture su regenerirane precijepljivanjem na sterilni PDA. Nakon inkubacije od 7 dana pri 25 °C pripremljena je suspenzija spora koncentracije  $1 \times 10^5$  spora/mL. U središte petrijeve zdjelice, prenesen je 10 µL pripremljene suspenzije kulture. Istraženi utjecaji (timola, temperature i aktiviteta vode) su provedeni u tri ponavljanja, tijekom 30 dana inkubacije, uz mjerenje promjera kolonije svaka dva dana.

#### 3.2.1. Timol

Timol (Sigma, Njemačka) je pripremljen otapanjem u sterilnoj demineraliziranoj vodi uz 10 % Tween 80 (radi boljeg otapanja i homogenizacije s podlogom).

#### 3.2.2. Aktivitet vode

Kao supstrat za određivanje utjecaja timola, temperature i aktiviteta upotrijebljeno je krmivo SKDN (krmna smjesa za dojne krmače) koje je sterilizirano  $\gamma$  – zračenjem (Institut Ruđer Bošković, Zagreb). Krmivu je dodana voda kako bi se dobila podloga željenog aktiviteta vode (0,90; 0,93; 0,95 i 0,97). Aktivitet vode pripremljene podloge provjeren je  $a_w$  metrom (HygroPalm  $A_w1$ ; Rotronic Instrument Corp., Hauppauge NY, SAD) s točnosti  $\pm 0,01$ . U

sterilno krmivo dodana je sterilna demineralizirana voda i timol otopljen u kombinaciji 96 % etanola (Kemika, Zagreb) i 10 % Tweena 80 (Biolife, Italija), te homogenizirano mućkanjem. Nakon toga, tikvice s krmivom su ostavljene u hladnjaku na +4 °C tijekom 48 sati kako bi se u krmivu uravnotežio željeni  $a_w$ . Poslije 48 sati, odvagano je po 20 g uzroka modificiranog krmiva u sterilne prazne petrijeve zdjelice i nacijepljeno s  $10 \mu\text{L } 1 \times 10^5$  spora/mL u središte krmiva. Podloge su pripremljene u triplikatu i inkubirane u zatvorenim PVC vrećicama s plastičnom tikvicom u kojoj se nalazila vodena otopina NaCl istog aktiviteta vode kao i podloga.

Podloge su inkubirane pri 25°C tijekom 28 dana pri čemu je promjer kolonije mjeran pomoću ravnala (u dva, međusobno okomita, smjera), tijekom 30 dana. Inhibitorni učinak timola, aktiviteta vode i temperature ispitan je u odnosu na kontrole – modificirano SKDN krmivo bez dodatka timola.

#### **3.2.3. Temperatura**

Ispitan je utjecaj dvije različite temperature na rast plijesni: 18 i 25 °C.

### **3.3. OBRADA PODATAKA**

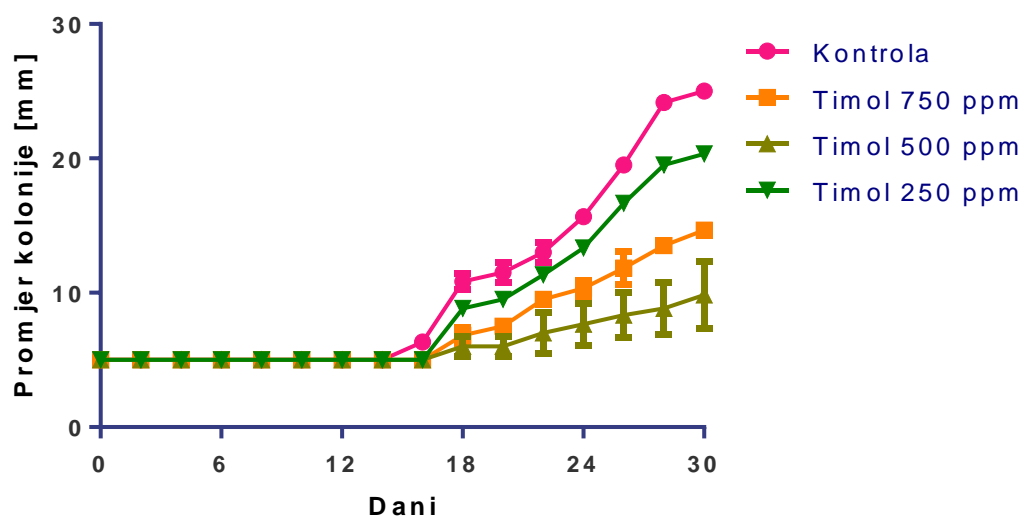
Rezultati ispitivanja učinka timola, temperature i aktiviteta vode na plijesni su obrađeni uz pomoć računalnih programa Microsoft® Office Excel 2003 za Windows (Microsoft Corporation, Redmond, SAD) i GraphPad Prism verzija 5.00 za Windows (GraphPad Software, San Diego, SAD).



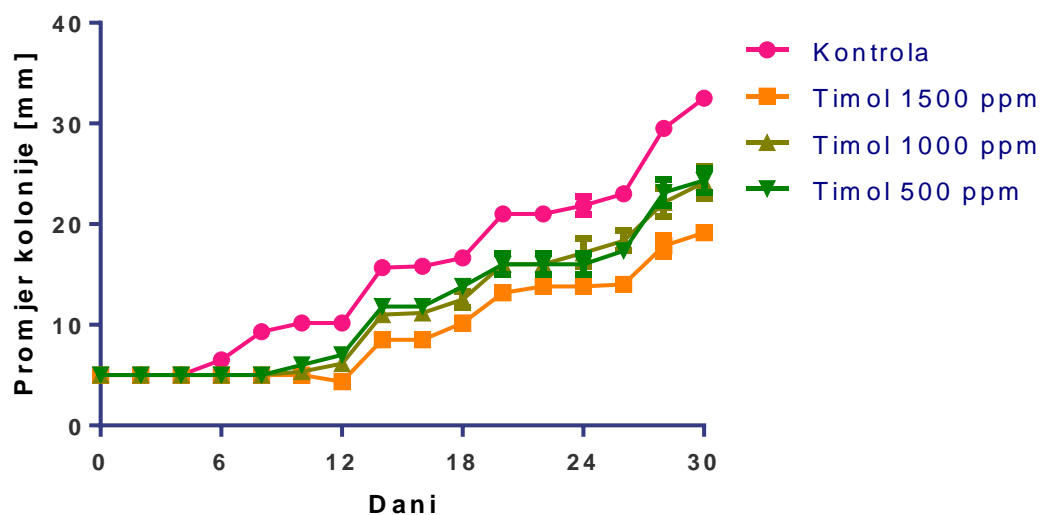
## **4. REZULTATI**

#### 4.1. UTJECAJ TEMPERATURE 18 °C, TIMOLA I AKTIVITETA NA RAST ODABRANIH VRSTA RODA *Aspergillus*

*Aspergillus carbonarius*

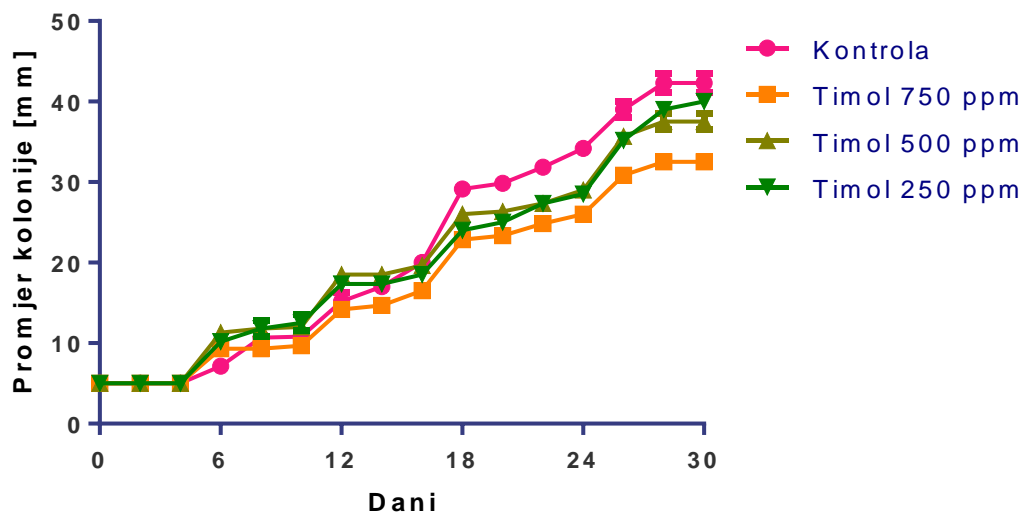


Slika 5 Utjecaj timola i  $a_w$  0,90 na rast *A. carbonarius*

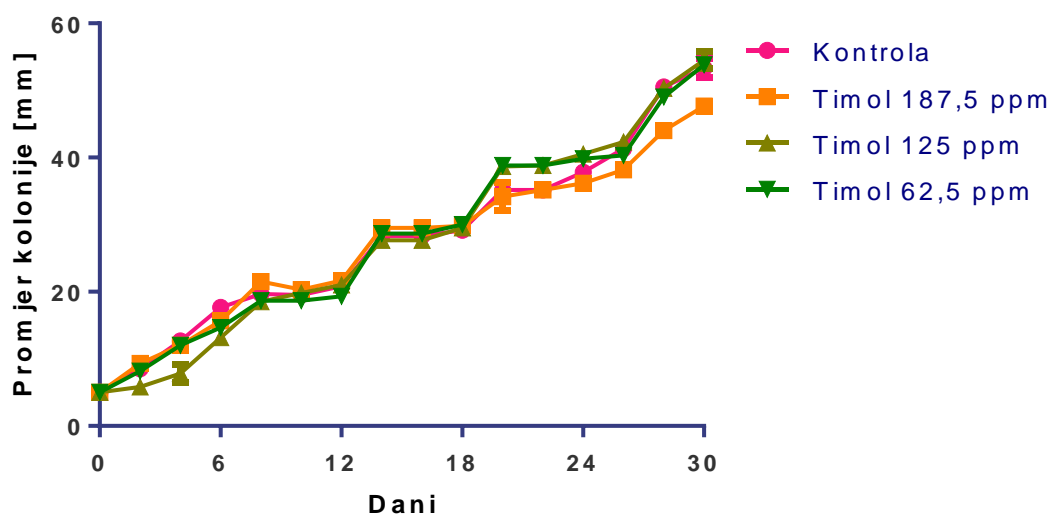


Slika 6 Utjecaj timola i  $a_w$  0,93 na rast *A. carbonarius*



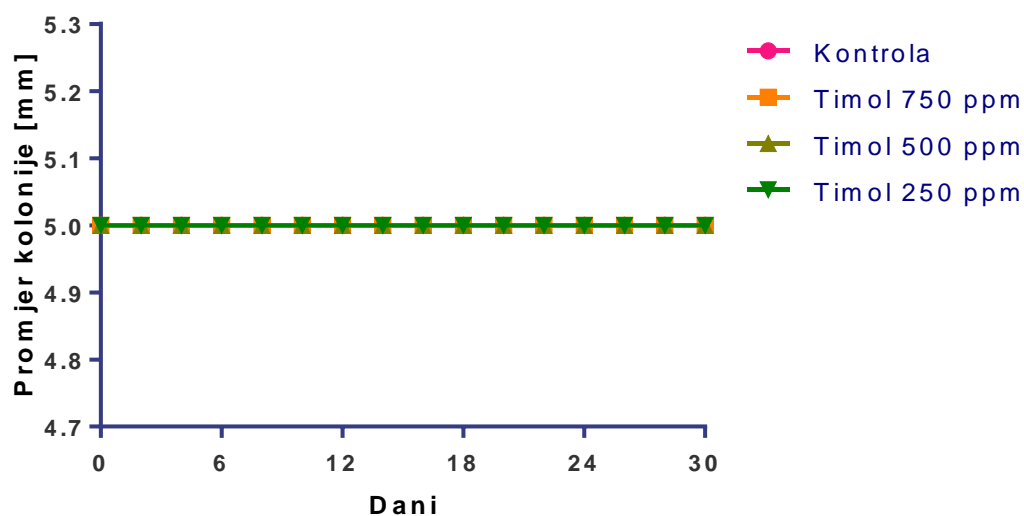
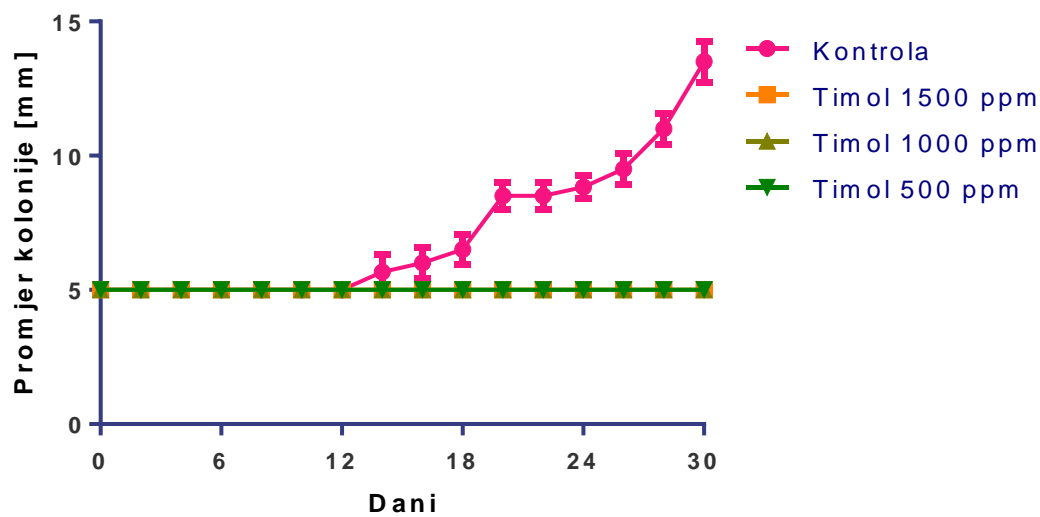


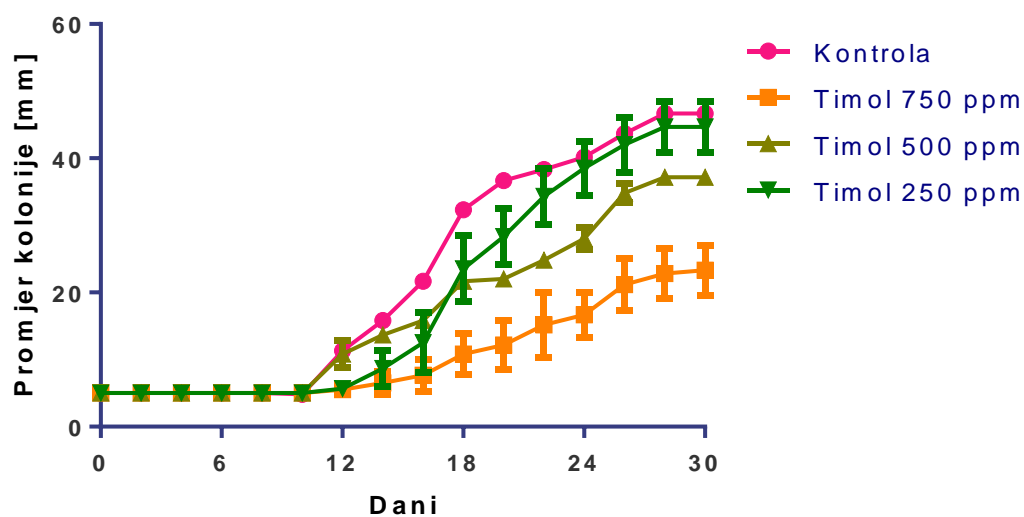
Slika 7 Utjecaj timola i  $a_w$  0,95 na rast *A. carbonarius*



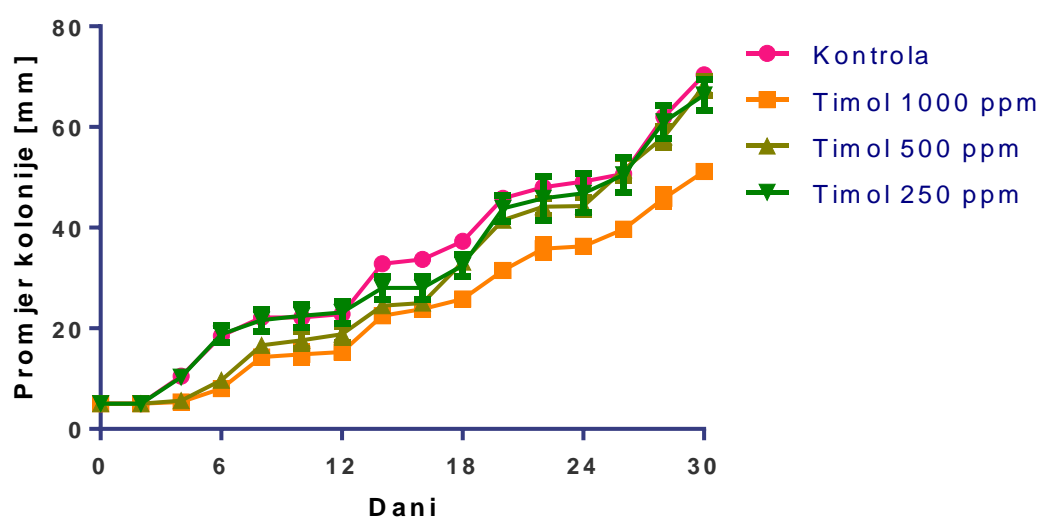
Slika 8 Utjecaj timola i  $a_w$  0,97 na rast *A. carbonarius*

## Aspergillus flavus

Slika 9 Utjecaj timola i  $a_w 0,90$  na rast *A. flavus*Slika 10 Utjecaj timola i  $a_w 0,93$  na rast *A. flavus*

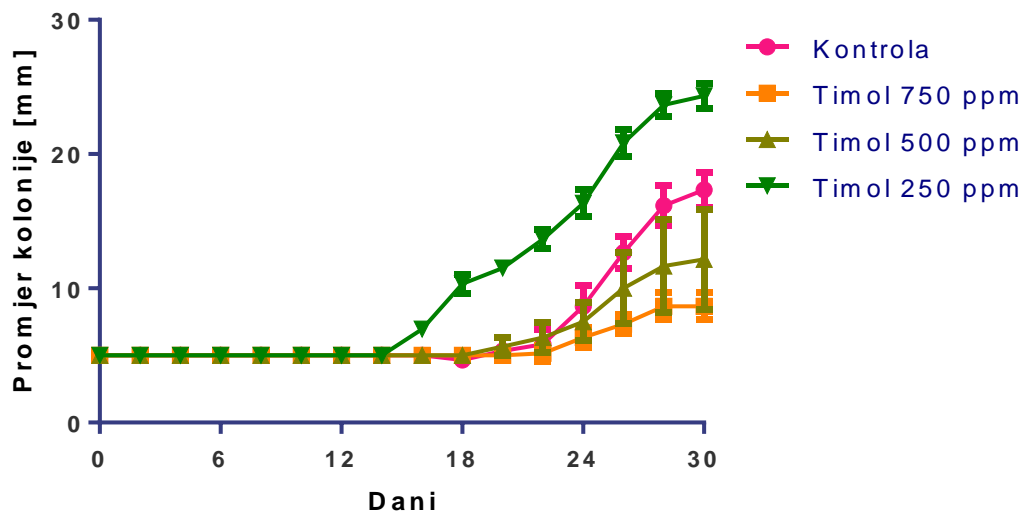
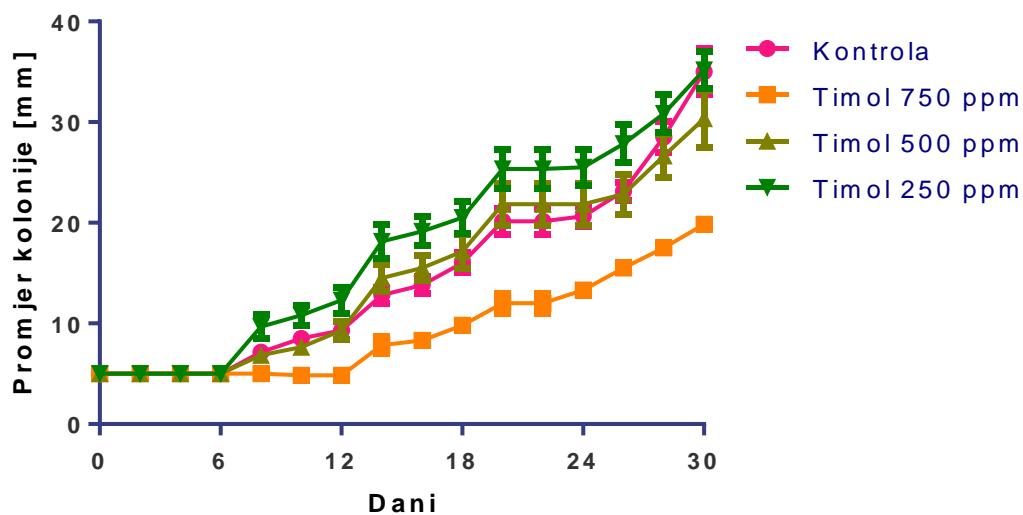


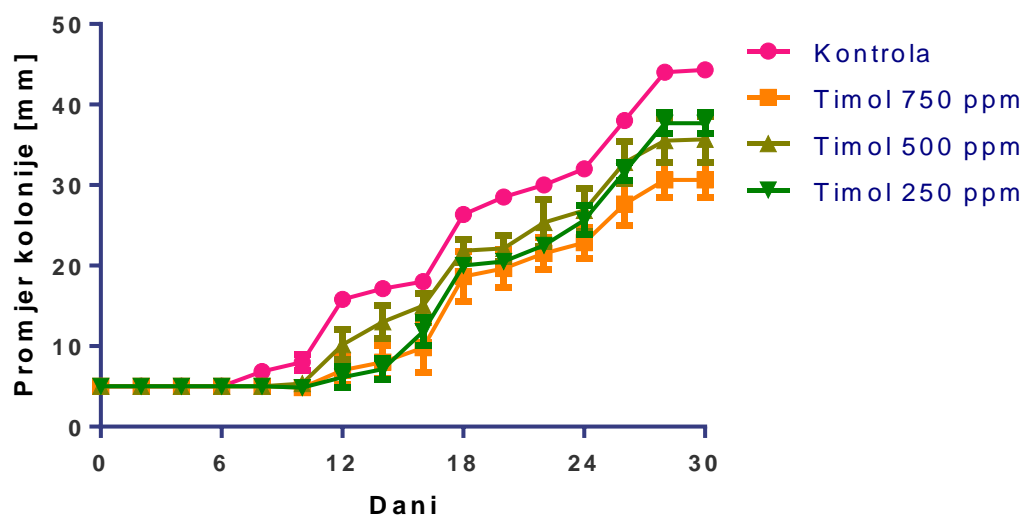
Slika 11 Utjecaj timola i  $a_w$  0,95 na rast *A. flavus*



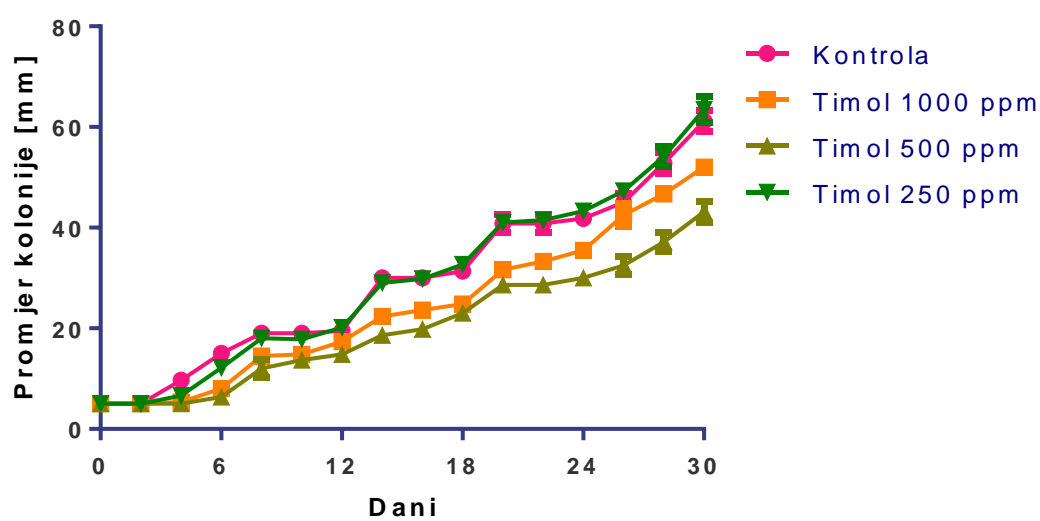
Slika 12 Utjecaj timola i  $a_w$  0,97 na rast *A. flavus*

## Aspergillus parasiticus

Slika 13 Utjecaj timola i  $a_w$  0,90 na rast *A. parasiticus*Slika 14 Utjecaj timola i  $a_w$  0,93 na rast *A. parasiticus*



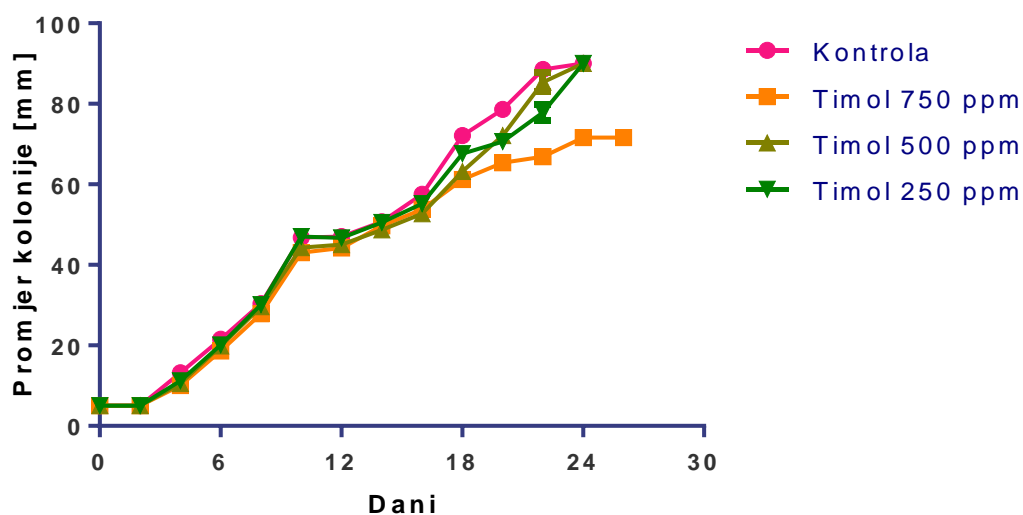
Slika 15 Utjecaj timola i  $a_w$  0,95 na rast *A. parasiticus*



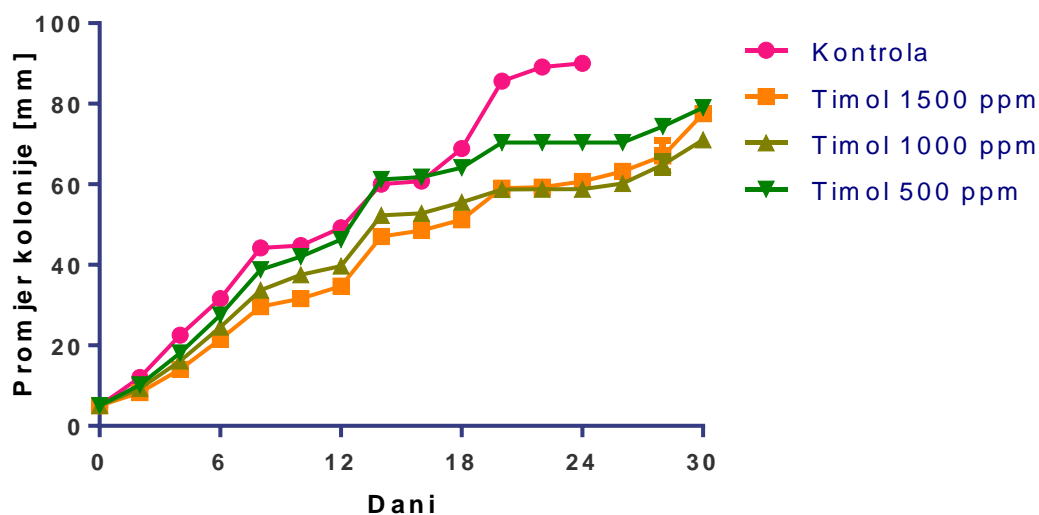
Slika 16 Utjecaj timola i  $a_w$  0,97 na rast *A. parasiticus*

## 4.2. UTJECAJ TEMPERATURE 25 °C, TIMOLA I AKTIVITETA NA RAST ODABRANIH VRSTA RODA *Aspergillus*

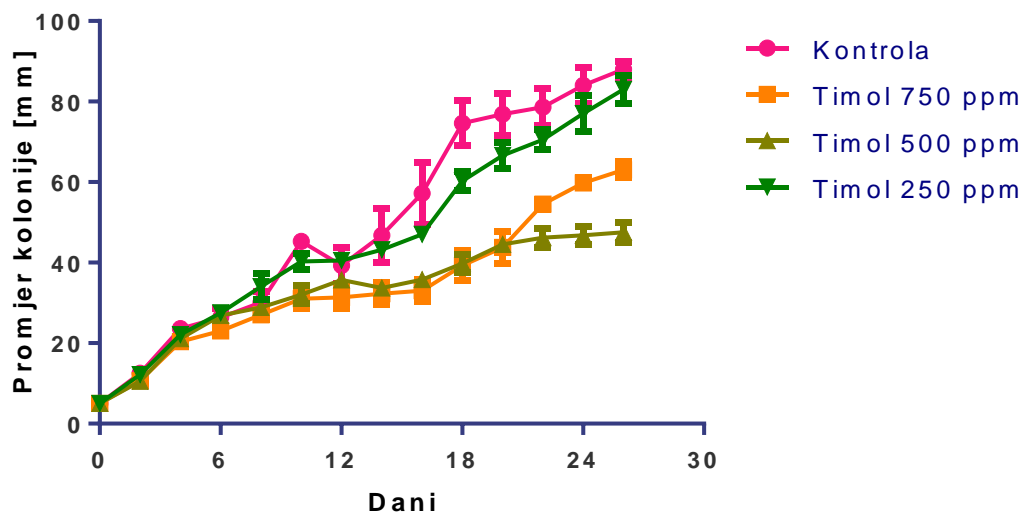
*Aspergillus carbonarius*



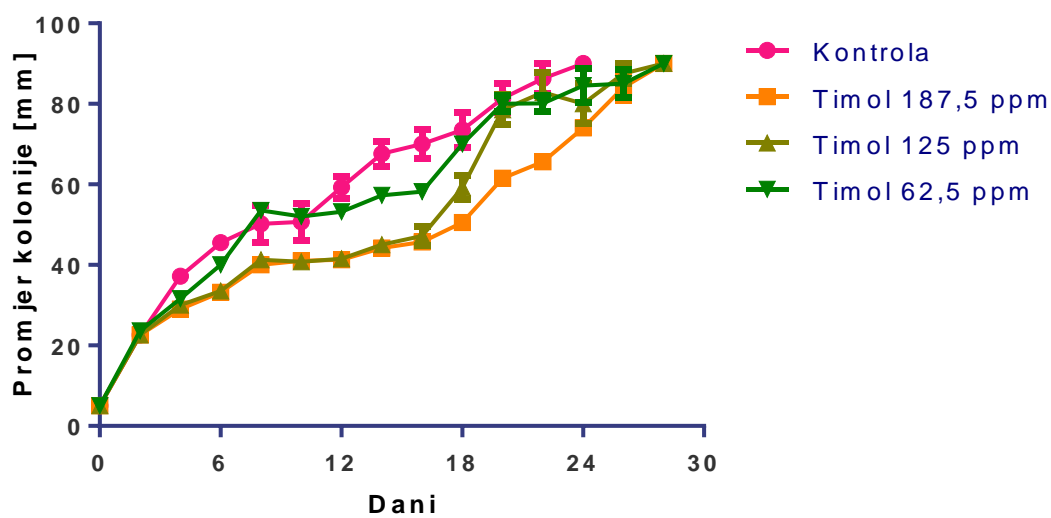
Slika 17 Utjecaj timola i  $a_w$  0,90 na rast *A. carbonarius*



Slika 18 Utjecaj timola i  $a_w$  0,93 na rast *A. carbonarius*

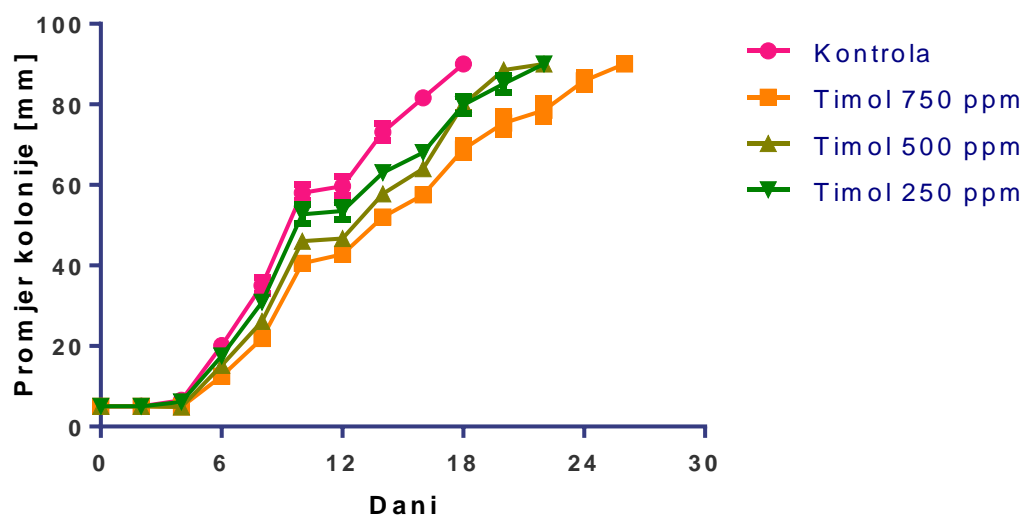
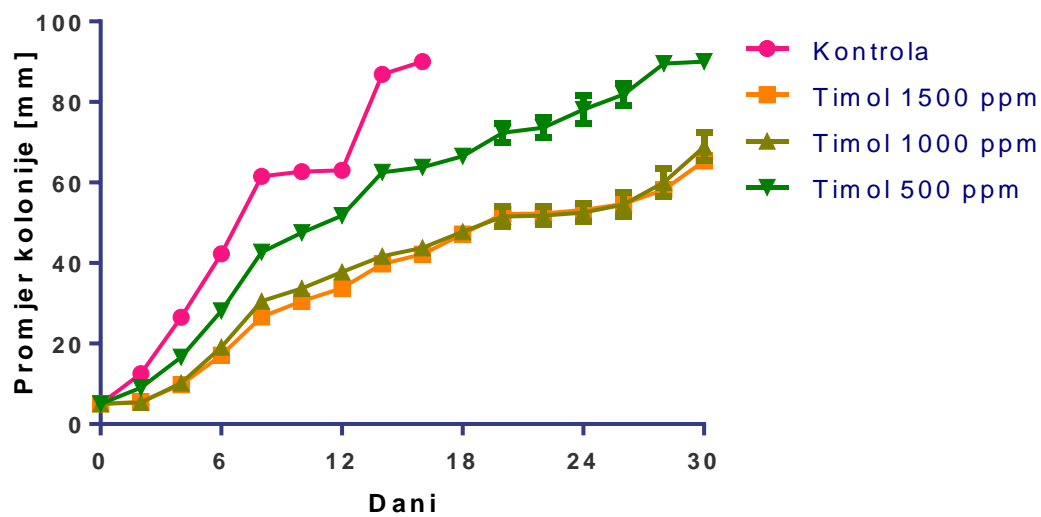


Slika 19 Utjecaj timola i  $a_w$  0,95 na rast *A. carbonarius*

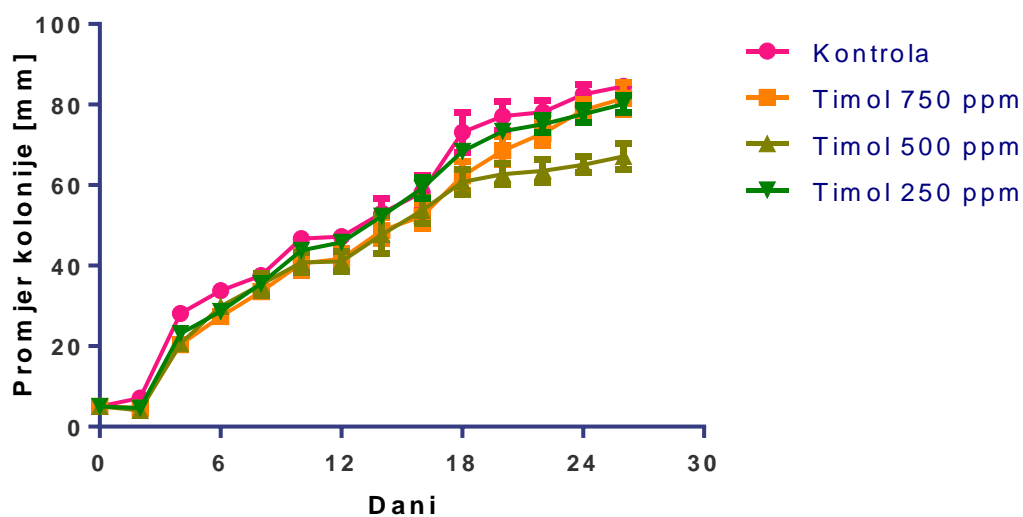


Slika 20 Utjecaj timola i  $a_w$  0,97 na rast *A. carbonarius*

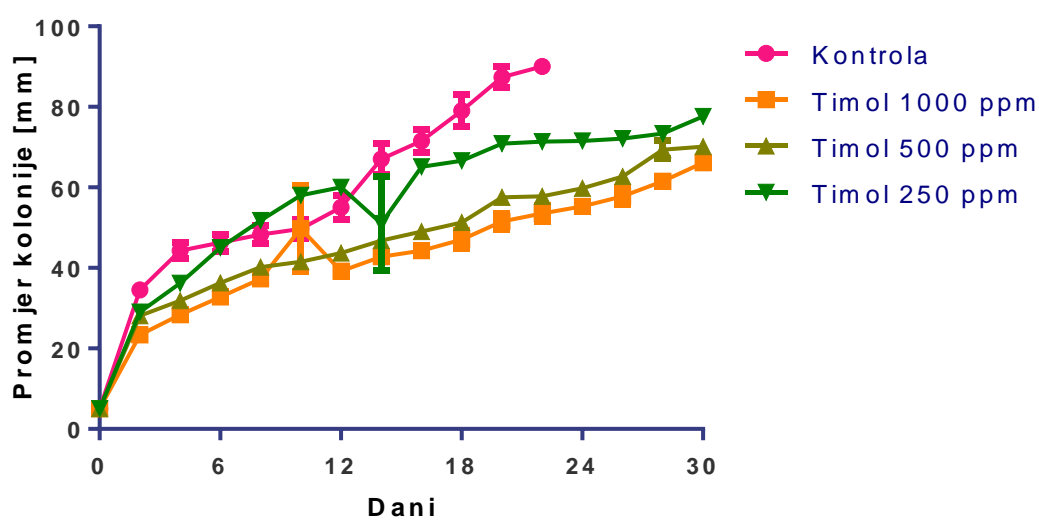
## Aspergillus flavus

Slika 21 Utjecaj timola i  $a_w$  0,90 na rast *A. flavus*Slika 22 Utjecaj timola i  $a_w$  0,93 na rast *A. flavus*



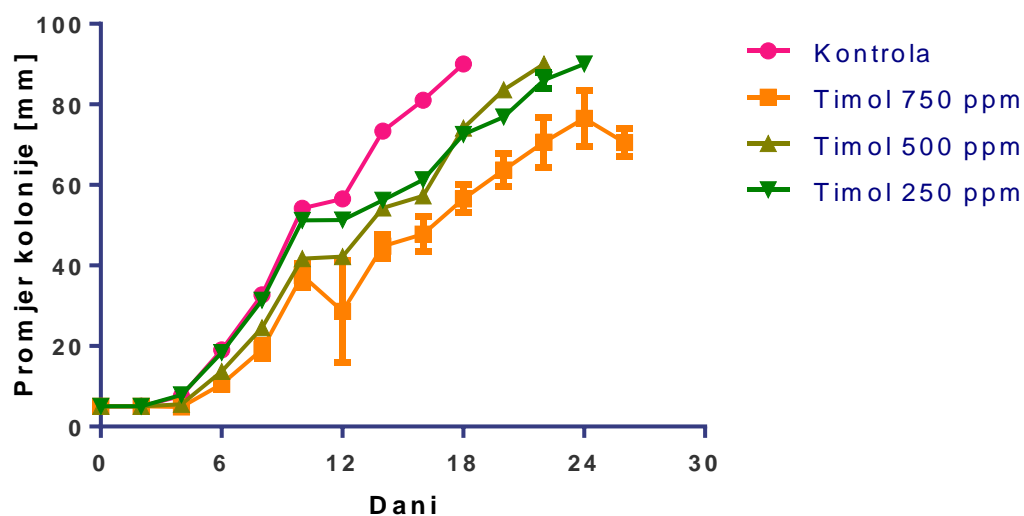
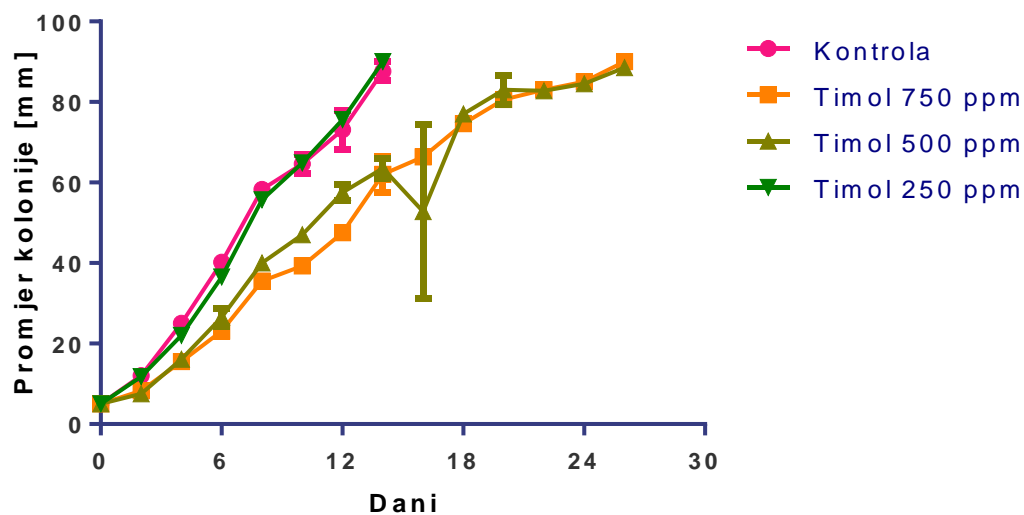


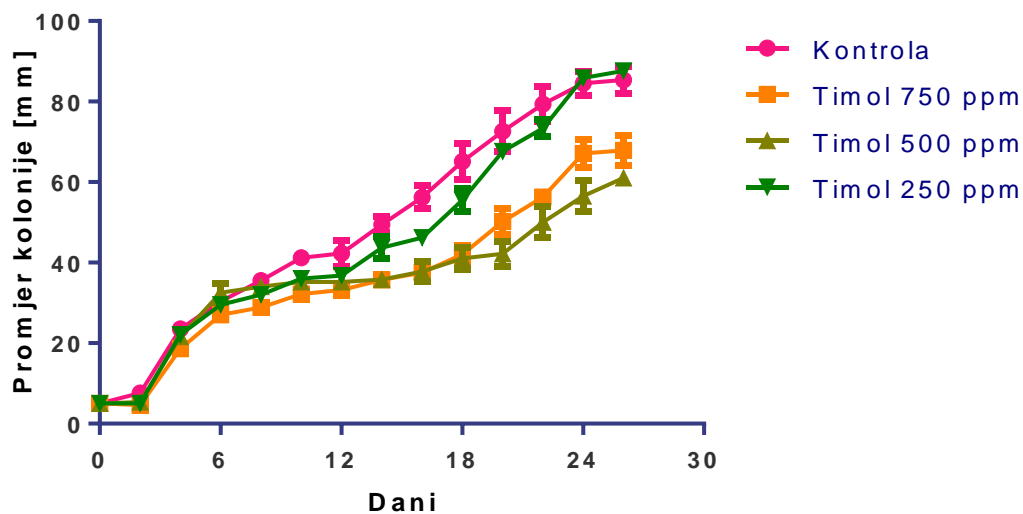
Slika 23 Utjecaj timola i  $a_w$  0,95 na rast *A. flavus*



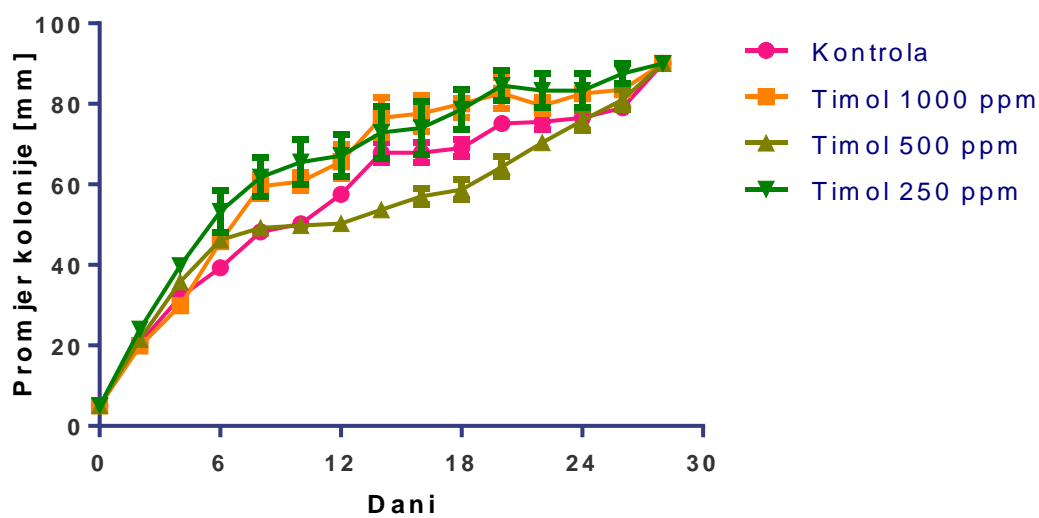
Slika 24 Utjecaj timola i  $a_w$  0,97 na rast *A. flavus*

## Aspergillus parasiticus

Slika 25 Utjecaj timola i  $a_w$  0,90 na rast *A. parasiticus*Slika 26 Utjecaj timola i  $a_w$  0,93 na rast *A. parasiticus*



Slika 27 Utjecaj timola i  $a_w$  0,95 na rast *A. parasiticus*



Slika 28 Utjecaj timola i  $a_w$  0,97 na rast *A. parasiticus*



## **5. RASPRAVA**

*Aspergillus carbonarius*

Rezultati utjecaja temperature od 18 °C na linearni rast kolonije plijesni *A. carbonarius* prikazani su **Slikama 5 – 8**. Pri najnižem aktivitetu (0,90; **Slika 5**) *lag* faza rasta ove vrste traje 16 dana, nakon čega započinje rast, koji je značajno sporiji, u usporedbi s ostalim rezultatima pri istoj temperaturi. Za primijetiti je razlika u primijenjenoj koncentraciji timola, pri različitim aktivitetima vode. To je posljedica razlike u minimalnoj inhibitornoj koncentraciji timola pri različitim udjelima slobodne vode, tj. različitim aktivitetima vode. Pri višim aktivitetima vode (npr. 0,97) veći je udio slobodne vode i tim je lakše otapanje samog spoja u hranjivoj podlozi (krmivu). Uslijed toga je olakšan ulaz u samu stanicu i uzrokovanje toksičnog učinka (odnosno minimalne inhibitorne koncentracije), stoga su primijenjene i niže koncentracije spoja za ispitivanje inhibicije rasta kolonije plijesni na krmivu (pri MIC koncentraciji uopće ne bi došlo do porasta kolonije). Usporedba **Slike 5 i 7** (istraživanje je izvedeno pri istim koncentracijama) ukazuje na skraćivanje *lag* faze rasta plijesni s 16 na 3 dana. Nadalje, kolonija (u kontrolnom uzorku pri 0,90) doseže promjer manji od 30 mm, dok je pri  $a_w$  0,95 promjer kontrole 10 mm veći. U pravilu, veće koncentracije timola djeluju više inhibitorno na linearni rast kolonije, iako se, ponekad, mogu uočiti i iznimke (npr. **Slika 5**). Ova razlika može biti posljedica nedovoljne homogenizacije podloge i ispitanog spoja, uslijed čega se, u podlozi, mogu pronaći lokalno snižene koncentracije timola te je tim olakšan rast plijesni.

Utjecaj temperature je izrazit, i u ovom istraživanju predstavlja najznačajniji čimbenik koji utječe na rast i najbolje se može uočiti usporedbom s rezultatima prikazanim **Slikama 17 – 20** koji su izvedeni pri temperaturi od 25 °C. Iako se radi o, relativno, maloj razlici temperatura (7 °C), *lag* faza rasta plijesni pri najnižem  $a_w$  (0,90) traje samo 2 dana, dok pri 18 °C traje do 16 dana (**Slika 5 i 17**). Slični rezultati se mogu uočiti i pri ostalim aktivitetima vode. Potrebno je napomenuti kako je istraživanje provedeno pri istim koncentracijama timola i aktiviteta vode, samo je temperatura različita. Niže koncentracije timola pri temperaturi 25 °C ne uspijevaju inhibirati rast kolonije, stoga ona često doseže do ruba petrijeve zdjelice (90 mm) (**Slika 17 – 20**).

*Aspergillus flavus*

Kada se radi o vrsti *A. flavus*, u usporedbi s vrstom *A. carbonarius*, rezultati se značajno razlikuju. Iako su može reći kako obje vrste pripadaju tzv. brzorastućim plijesnima (vrstama

koje izrazito brzo rastu, u povoljnim uvjetima), *A. flavus* sporije raste. U slučaju niže temperature (18 °C) i najnižeg  $a_w$  (0,90) rast je u potpunosti izostao (**Slika 9**). Slično je i pri  $a_w$  0,93 (**Slika 10**) gdje je uspjela porasti samo kontrola. *Lag* faza pri 0,95 traje 10 dana (**Slika 11**), dok pri  $a_w$  0,97 (**Slika 12**) samo 2 dana za kontrolu i 4 dana za odabrane koncentracije. Pri višoj temperaturi rasta (25 °C) *lag* faza pri  $a_w$  0,90 (**Slika 21**) traje 4 dana (pri nižoj temperaturi, rast plijesni je potpuno inhibiran). Slični rezultati su vidljivi i pri drugim istraženim aktivitetima vode (**Slike 22 – 24**). Pri najvišem  $a_w$  (0,97) *lag* faza rasta je u potpunosti izostala i kolonija plijesni počinje ubrzano rasti (**Slika 24**). Iako se i *A. carbonarius* i *A. flavus* smatraju brzorastućim plijesnima, potonja vrsta raste brže, u za nju optimalnim uvjetima.

#### *Aspergillus parasiticus*

Vrsta *A. parasiticus* je vrlo srodna vrsti *A. flavus*. Ipak, raste nešto sporije. Pri nižoj temperaturi (18 °C) i najnižem  $a_w$  (0,90) *lag* faza rasta traje 14 dana (**Slika 13**). Za primijetiti je kako je kolonija koja raste na podlozi s 250 ppm timola veća u usporedbi s kontrolnim uzorkom koji raste bez dodatka timola. U nekim uvjetima, posebno kada se radi o nižim koncentracijama antimikrobnog spoja/spojeva, kolonije mogu rasti i većom brzinom. To se objašnjava tzv. stresnim uvjetima rasta, pri čemu plijesan mobilizira svoju energiju na izrazit rast (**Slika 14, 28**). Sa stanovišta prehrambene tehnologije i metoda konzerviranja hrane, ovo je od posebnog značaja, jer će, umjesto prestanka rasta, rast biti ubrzan. Nadalje, jedan od velikih problema je i povećana sinteza mikotoksina, koja je potencirana upravo zbog stresnih uvjeta okoline na plijesan. Ipak se, slično kao i u rezultatima ostalih vrsta, primjenom većih koncentracija postiže i jača inhibicija rasta. Povećanjem udjela slobodne vode (**Slike 13 – 16**) ubrzava se rast, bez obzira na koncentraciju timola. Ipak, *lag* faza pri  $a_w$  0,95 traje 10 dana (**Slika 15**), dok je pri  $a_w$  0,93 (**Slika 14**) trajala 12 dana samo pri najvećoj koncentraciji timola. Pri nižim koncentracijama je *lag* faza trajala kraće pri većem aktivitetu vode. Viša temperatura (25 °C) (**Slike 25 – 28**) uzrokuju i ubrzan rast vrste *A. parasiticus*. Jedino se pri  $a_w$  0,90 i 0,95 (**Slike 25 i 27**) može uočiti *lag* faza rasta, ali ona traje do 4 dana pri nižem ili do 2 dana pri višem aktivitetu. U ostalim slučajevima (**Slike 28 i 26**) prava *lag* faza u kojoj nije utvrđen rast kolonije nije ustanovljena.

U ovom istraživanju, temperatura se pokazala kao najznačajniji čimbenik u rastu kolonija plijesni. Zajedno sa smanjenim aktivitetom vode i antifungalnim tvarima (u ovom slučaju timolom) moguće je značajno smanjenje rasta pojedinih vrsta plijesni.



## **6. ZAKLJUČCI**

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Pri temperaturi od 18 °C, *lag* faza rasta plijesni vrste *Aspergillus carbonarius* traje od 6 do 14 dana. Dužina *lag* faze rasta ovisi o  $a_w$ ; što je niži to je ova faza duža. Veće koncentracije timola, u većoj mjeri inhibiraju rast kolonije plijesni, ali taj učinak prestaje pri višoj temperaturi čuvanja (25 °C).
2. Uočen je sinergistički učinak niže temperature (18 °C) i  $a_w$  0,90 prema vrsti *A. flavus* čiji je rast u potpunosti inhibiran. Pri 18 °C, *lag* faza rasta traje od 2 do 12 dana i ovisi o  $a_w$  podloge. Pri višoj temperaturi inkubacije (25 °C) *lag* faza izostaje ( $a_w$  0,93) ili traje do najviše 6 dana ( $a_w$  0,90). Veće koncentracije uzrokuju veće zaostajanje u rastu, u usporedbi s kontrolnim uzorkom.
3. Rast plijesni vrste *A. parasiticus* pri 18 °C je inhibiran do 14. dana inkubacije pri  $a_w$  0,90, dok pri temperaturi od 25 °C inhibicija traje do 4 dana. Pri višoj temperaturi (25 °C) inkubacije, *lag* faza rasta se značajno smanjuje. Veće koncentracije timola snažnije inhibiraju rast kolonije plijesni.
4. Temperatura je najznačajniji čimbenik u inhibiciji rasta odabranih vrsta plijesni. Uz dodatak timola, snižavanje  $a_w$  podloge i temperature, moguće je potpuno inhibirati rast vrste *A. flavus*.

## **7. LITERATURA**

- Abellana M, Benedi J, Sanchis V, Ramos AJ: Water activity and temperature effects on germination and growth of *Eurotium amstelodami*, *E. chevalieri* and *E. herbariorum* isolates from bakery products. *Journal of Applied Microbiology* 87:371-380, 1999.
- Adams MR, Moss MO: *Food Microbiology*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2008.
- Alzamora SM, Tapia MS, Lopez-Malo A, Welte-Chanes J: The control of water activity. U *Food preservation techniques*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 2003.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M: Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46:446-475, 2008.
- Benchaar C, Calsamiglia S, Chaves AV, Fraser GR, Colombatto D, McAllister TA, Beauchemin KA: A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology* 145:209-228, 2008.
- Burt S: Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 94:223-253, 2004.
- Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW: *The Fungi*. Academic Press, London, 2001.
- Christian JHB: Drying and Reduction of Water Activity. U *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Aspen Publishers, Maryland, 2000.
- 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.
- Djilani A, Dicko A: The Therapeutic Benefits of Essential Oils. U *Nutrition, Well-Being and Health*. InTech, Rijeka, Croatia, 2012.
- Duraković S: *Opća mikrobiologija*. Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb, 1996.
- Evans JD, Martin SA: Effects of Thymol on Ruminal Microorganisms. *Current Microbiology* 41:336-340, 2000.

- Herbert RA, Sutherland JP: Chill Storage. U *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, 2000.
- Hocking AD: *Aspergillus* and related teleomorphs. U *Food spoilage microorganisms*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, 2006.
- Hyltdgaard M, Mygind T, Meyer RL: Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology* 3:12-24, 2012.
- Jay JM: *Modern Food Microbiology*. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, 2000.
- Karolyi D: Aktivitet vode ( $a_w$ ) kao čimbenik održivosti mesa. *Meso* 6:9-13, 2004.
- Mašek T, Šerman V: Utjecaj mikotoksina na zdravlje i proizvodnost preživača. *Krmiva* 48:19-31, 2006.
- Nedwell DB: Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature. *FEMS Microbiology Ecology* 30:101-111, 1999.
- Nout RMJ: The colonizing fungus as a food provider. U *Food Mycology A Multifaceted Approach to Fungi and Food*. CRS press Taylor & Francis Group, New York, 2007.
- Pitt JI, Hocking AD: *Fungi and Food Spoilage*. Springer, London, New York, 2009.
- Rasooli I: Food Preservation – A Biopreservative Approach. *Food* 1:111-136, 2007.
- Thrane U: Fungal protein for food. U *Food Mycology A Multifaceted Approach to Fungi and Food*. Taylor & Francis Group, New York, 2007.
- Webster J, Weber R: *Introduction to Fungi*. Cambridge University Press, New York, 2007.
- Willey J, Woolverton C, Sherwood L: *Prescott's Principles of Microbiology*. McGraw-Hill Higher Education, Boston, 2009.