

# Utjecaj benzoata i sorbata na rast odabranih vrsta plijesni roda *Penicillium*

---

Šego, Jelena

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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:109:032460>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-30**

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**

**Jelena Šego**

**Utjecaj benzoata i sorbata na rast odabranih vrsta plijesni  
roda *Penicillium***

DIPLOMSKI RAD

Osijek, travanj, 2015.

## 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 VI. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 31. ožujka 2015. godine.  
**Mentor:** dr. sc. Hrvoje Pavlović, izv. prof.  
**Pomoć pri izradi:** Vedran Gradvol, dipl.ing.

### UTJECAJ BENZOATA I SORBATA NA RAST ODABRANIH VRSTA PLIJESNI RODA

*Penicillium*  
JELENA ŠEGO, 129/DI

#### Sažetak:

Zadatak rada bio je ispitati antifungalni učinak Na-benzoata i K-sorbata na odabrane vrste plijesni: *Penicillium aurantiogriseum*, *P. expansum* i *P. italicum* pri različitim pH vrijednostima. Natrijev benzoat je konzervans koji se najviše koristi u proizvodnji gaziranih pića, voćnih sokova, marmelada, ukiseljenog povrća, kiselih krastavaca i začina gdje je, zbog niske pH vrijednosti, moguć rast plijesni. Kalijev sorbat se primarno koristi kao konzervans u proizvodnji hrane i pića. Djeluje inhibitorno na rast plijesni i kvasaca u mnogim namirnicama kao što su sir, vino, jogurt, bezalkoholna pića, pekarski proizvodi, itd. Prema dosadašnjim rezultatima eksperimenta, utvrđeno je kako se snižavanjem pH vrijednosti i antifungalni učinak spojeva povećava. Oba spoja su podjednako učinkovita na odabrane vrste plijesni, ali snižavanje pH s 4,4 na 4,16 pojačava učinak K-sorbata. Ispitana je inhibicija linearnog rasta kolonija plijesni pri koncentracijama od 50, 100 i 200 ppm Na-benzoata i K-sorbata pri pH vrijednosti 4,4 i 4,16. K-sorbat učinkovitije inhibira linearni rast kolonije u usporedbi s Na-benzoatom.

**Ključne riječi:** Na - benzoat, K - sorbat, antifungalni učinak, *Penicillium*, pH vrijednost

**Rad sadrži:** 41 stranicu  
24 slike  
2 tablice  
0 priloga  
29 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za obranu:

1.	dr. sc. <i>Dajana Gašo-Sokač</i> , doc.	predsjednik
2.	dr. sc. <i>Hrvoje Pavlović</i> , izv. prof.	član-mentor
3.	dr. sc. <i>Natalija Velić</i> , doc.	član
4.	dr. sc. <i>Lidija Jakobek</i> , doc.	zamjena člana

**Datum obrane:** 21. travnja 2015.

**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 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 VI. held on March 31, 2015.  
**Mentor:** *Hrvoje Pavlović, PhD, associate prof.*  
**Technical assistance:** *Vedran Gradvol, dipl.ing.*

### INFLUENCE OF BENZOATE AND SORBATE ON GROWTH OF SELECTED FUNGI OF *Penicillium* GENERA Jelena Šego, 129/DI

#### Summary:

The aim of the study was to test antifungal activity of sodium benzoate and potassium sorbate on selected fungal species: *Penicillium aurantiogriseum*, *P. expansum* and *P. italicum* at various pH. Sodium benzoate is a preservative most widely used in carbonated drinks, fruit juices, jams, conserved vegetables, pickles and condiments where, at acidic environment, inhibits fungal growth. Potassium sorbate is primary used as a food preservative. It inhibits molds and yeasts in many food products, such as cheese, wine, yogurt, soft drinks and baked goods. Experimental results suggest increased antifungal activity of tested compounds at lower pH values. Both compounds inhibit fungi at similar concentrations, although lower pH (4.16) enhances inhibitory effect of K-sorbate. Linear inhibition of fungal growth at 50, 100 and 200 ppm of Na-benzoate and K-sorbate at pH 4.4 and 4.16 was tested. Stronger inhibitory potential of K-sorbate in linear colony growth was observed, compared to effect of Na-benzoate.

**Key words:** Na - benzoate, K - sorbate, antifungal activity, *Penicillium*, pH

**Thesis contains:** 41 pages  
24 figures  
2 tables  
0 supplements  
29 references

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

1.	<i>Dajana Gašo-Sokač</i> , PhD, assistant prof.	chair person
2.	<i>Hrvoje Pavlović</i> , PhD, associate prof.	supervisor
3.	<i>Natalija Velić</i> , PhD, assistant prof.	member
4.	<i>Lidija Jakobek</i> , PhD, associate prof.	stand-in

Defense date: April 21, 2015.

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

## Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. PLIJESNI .....</b>	<b>4</b>
2.1.1. Uvjeti za rast plijesni .....	5
2.1.2. Značaj gljiva .....	5
2.1.3. Sistematika plijesni u namirnicama .....	6
2.1.4. Rod <i>Penicillium</i> .....	7
2.1.4.1. Opća svojstva plijesni <i>Penicillium aurantiogriseum</i> .....	8
2.1.4.2. Opća svojstva plijesni <i>Penicillium expansum</i> .....	9
2.1.4.3. Opća svojstva plijesni <i>Penicillium italicum</i> .....	11
<b>2.2. PH VRIJEDNOST I PROCESIRANJE PROMJENOM PH VRIJEDNOSTI.....</b>	<b>12</b>
2.2.1. Mehanizam djelovanja niske pH vrijednosti na mikroorganizme .....	12
2.2.2. pH vrijednost voća i sokova.....	13
2.2.3. Kontrola rasta mikroba organskim kiselinama .....	13
<b>2.3. KEMIJSKI KONZERVANS I.....</b>	<b>15</b>
2.3.1. Mehanizam djelovanja kemijskih konzervanasa .....	15
2.3.2. Svojstva i mehanizam djelovanja kalijeva sorbata i sorbinske kiseline .....	17
2.3.3. Svojstva i mehanizam djelovanja natrijeva benzoata i benzojeve kiseline .....	17
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1. ZADATAK .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2. MATERIJAL I METODE .....</b>	<b>20</b>
3.2.1. Podloge za ispitivanje antifungalnog učinka konzervanasa .....	20
3.2.2. Priprema otopina K-sorbata i Na-benzoata.....	21
3.2.3. Određivanje minimalne inhibitorne (MIK) i fungicidne (MFK) koncentracije .....	21
3.2.4. Određivanje inhibicije linearnog rasta kolonija plijesni .....	22
3.2.5. Obrada rezultata .....	22
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>23</b>
<b>4.1. ANTIFUNGALNI UČINAK K-SORBATA I NA-BENZOATA NA ODABRANE VRSTE PLIJESNI.....</b>	<b>24</b>
<b>4.2. INHIBICIJA LINEARNOG RASTA KOLONIJA PLIJESNI K-SORBATOM I NA-BENZOATOM.....</b>	<b>24</b>
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>31</b>
<b>5.1. ANTIFUNGALNI UČINAK K-SORBATA I NA-BENZOATA NA ODABRANE VRSTE PLIJESNI .....</b>	<b>20</b>
<b>5.2. INHIBICIJA LINEARNOG RASTA KOLONIJA PLIJESNI K-SORBATOM I NA-BENZOATOM.....</b>	<b>20</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>37</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>39</b>

## **1. UVOD**

Plijesni su mikroskopske heterotrofne aerobne višestanične gljive građene od gustog sustava cjevastih stanica bez klorofila.

Plijesni mogu rasti na raznim namirnicama i uzrokovati njihovo kvarenje. Rast plijesni uzrokuje kvarenje namirnica na nekoliko načina: nestanak okusa, diskoloracija namirnica, truljenje i formiranje patogenih ili alergogenih spora. Neke plijesni u nepovoljnim uvjetima stvaraju mikotoksine. Mikotoksini su sekundarni produkti metabolizma nekih vrsta plijesni koji uzrokuju trovanje ljudi i životinja.

pH vrijednost označava negativni logaritam koncentracije vodikovih iona. Optimalni pH za rast i razvoj većine mikroorganizama je blizu neutralne vrijednosti (7,0). Kvasci najbolje rastu u srednje kiseloj sredini (od 4,0 do 4,5). Plijesni se mogu razvijati u pH području od 2,0 do 8,0, iako je njihov rast optimalan u kiselom pH području. pH vrijednost okoline značajno utječe na aktivnost i stabilnost enzima, pa tako i na rast i metabolizam nekog mikroorganizma. Nizak pH djeluje nepovoljno na rast i razvoj većine mikroorganizama.

Konzervansi su tvari dodane u hranu koje sprječavaju rast ili uništavaju mikroorganizme te inhibiraju enzimске i oksidacijske procese u hrani. Najčešći konzervansi koji se dodaju u namirnice su sorbinska kiselina i njezine soli te benzojeva kiselina i njezine soli.

Natrijev benzoat ( $C_6H_5NaO_2$ ) je natrijeva sol benzojeve kiseline. Bezbojni je kristalni prah koji se dobro otapa u vodi. Djeluje inhibitorno na bakterije i plijesni, a pri nižim pH vrijednostima se povećava njegova antimikrobna aktivnost. Dodaje se u namirnice s nižom pH vrijednošću kao što su voće i proizvodi od voća, gazirana pića, fermentirano povrće i sirupi.

Kalijev sorbat ( $C_6H_7KO_2$ ) je kalijeva sol sorbinske kiseline. Bolje se otapa u vodi od sorbinske kiseline te djeluje inhibitorno na rast kvasaca i plijesni. Kao i natrijev benzoat, djeluje učinkovitije pri nižim pH vrijednostima. Sorbati se dodaju u namirnice kao što su sir, pekarski proizvodi, voćni sokovi, pića, preljevi za salate i slični proizvodi.

Cilj rada je bio ispitati antifungalni učinak kalijevog sorbata i natrijevog benzoata na odabrane vrste plijesni roda *Penicillium* - *P. aurantiogriseum*, *P. expansum* i *P. italicum* pri različitim pH vrijednostima.

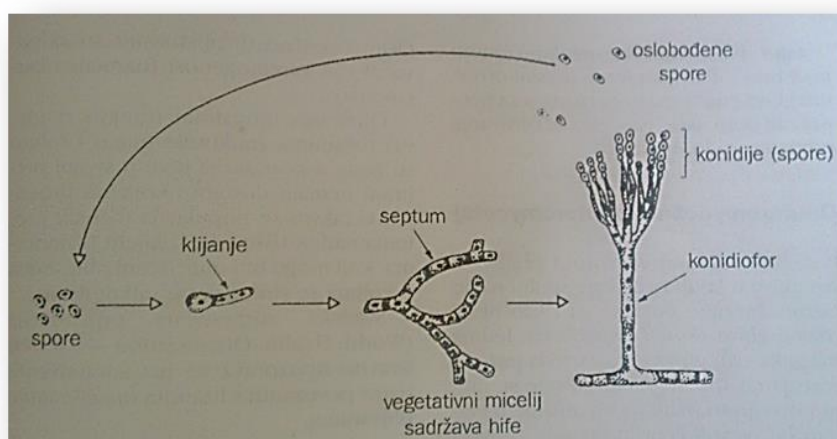
Određena je minimalna inhibitorna (MIK) i minimalna fungicidna koncentracija (MFK) kalijevog sorbata i natrijevog benzoata te učinak kemijskih konzervansa u inhibiciji linearnog rasta kolonije plijesni tijekom uzgoja na krumpirovom agaru s glukozom pri različitim pH vrijednostima.

## **2. TEORIJSKI DIO**



## 2.1 . PLIJESNI

Plijesni su višestanične gljive. Stanice su im izdužene i čine cjevastu tvorbu - hifu (grč. *Hyphē*-tkanje). Kod većine vrsta plijesni dužina stanice iznosi od 5 do 50  $\mu\text{m}$ , a širina od 2 do 5  $\mu\text{m}$ . Unutrašnjost stanice plijesni ispunjena je citoplazmom u kojoj se nalazi jedna ili više jezgri (Volner, 2000.). Djelomično se plijesni klasificiraju i identificiraju i prema tome da li su im hife septirane (pregrađene) ili nisu. Septirane hife su poprečno pregrađene nitima nazvanim *septa* (jd. *septum*), koje hifu pregrađuju u pojedinačne stanične dijelove. Septumi nisu nepropusni već posjeduju pore koje omogućuju strujanje citoplazme i brojnih staničnih organela. U neseptiranih hifa nema fizičke granice prema kojoj bi se, unutar hife, razlikovale pojedinačne stanice (Duraković, 1996.). Rastom i grananjem hifa nastaje splet koji se zove micelij. Razlikuju se vegetativni ili bazalni micelij i zračni ili reproduktivni micelij. Vegetativni micelij čini splet hifa koje prodiru u hranjivu podlogu na kojoj plijesan raste i iz nje apsorpcijom pribavlja potrebne tvari za rast. Zračni micelij izdiže se iznad hranjive podloge i nosi tvorbe potrebne za razmnožavanje plijesni. Zajedno, obje vrste micelija čine talus ili tijelo plijesni (Volner, 2000.). Kako plijesni ne sadrže klorofil, te stoga ne mogu koristiti sunce kao izvor energije, moraju ovisno o hranidbenim potrebama kao izvore hrane koristiti organske tvari bogate energijom kao što su ugljikohidrati ili masti (Müller, 1975.). Plijesni se mogu spolno i nespolno razmnožavati. Reproductivna hifa se obično pruža u visinu i oblikuje egzospore, konidije ili sporangij. Oblik, veličina i boja spore se koriste kod taksonomske klasifikacije plijesni (Bibek i Arun, 2008.). Plijesni se mogu ovisno o vrsti, razmnožavati nespolno na više načina, npr. cijepanjem hife na atrokonidije i stvaranjem fialokonidija unutar fialida. Plijesni se spolno razmnožavaju stvaranjem askospora, zigospora i bazidiospora (Volner, 2000.).



**Slika 1** Shematski prikaz nespolnog ciklusa razmnožavanja u plijesni iz roda *Penicillium* (Duraković, 1996.)

### 2.1.1. Uvjeti za rast plijesni

*Zahtjevi za vlagom.* Općenito, većina plijesni zahtjeva manje dostupne vlage u odnosu na većinu kvasaca i bakterija. Dostupnost vlage se može izraziti preko aktiviteta vode ( $a_w$ ).  $a_w$  je dominantni okolišni faktor odgovoran za stabilnost i kvarenje hrane (Pitt i Hocking, 2009.). Minimalni  $a_w$  potreban za germinaciju spora nekih plijesni je 0,62, dok za druge plijesni iznosi 0,93 (npr. rodovi *Mucor*, *Rhizopus* i *Botrytis*). Svaka plijesan također ima svoj optimalni  $a_w$  i raspon  $a_w$  potreban za rast. Primjeri optimalnog  $a_w$  su 0,98 za *Aspergillus* spp, od 0,95 do 0,98 za *Rhizopus* spp., i 0,93 za *Penicillium* spp.  $a_w$  bi trebao biti ispod 0,62 kako bi se otklonila mogućnost rasta plijesni, iako  $a_w$  vrijednost ispod 0,70 inhibira većinu plijesni uzročnike kvarenja namirnica (Frazier, 1958.).

*Zahtjevi za temperaturom.* Većina plijesni se smatra mezofilima, te dobro rastu na sobnoj temperaturi. Optimalna temperatura rasta za većinu plijesni je 25-30 °C (Frazier, 1958.). Najniže temperature za rast plijesni su u rasponu od -7 do 0 °C za rodove *Fusarium*, *Cladosporium*, *Penicillium* i *Thamnidium* (Pitt i Hocking, 2009.).

*Kisik i zahtjevi za pH.* Plijesni zahtjevaju slobodan kisik za svoj rast (Frazier, 1958.). Koncentracija kisika otopljena u supstratu posjeduje puno veći utjecaj na rast plijesni u odnosu na atmosferski kisik (Pitt i Hocking, 2009.). U odnosu na bakterije, koje preferiraju neutralne do slabo lužnate medije, plijesni najbolje uspijevaju u kiselom pH području, no pojavnost im nije ograničena samo na kisele proizvode (Müller, 1975.). Većina plijesni raste u pH rasponu od 3 do 8 (Pitt i Hocking, 2009.).

*Konzistencija supstrata.* Općenito, kvasci će prije uzrokovati kvarenje tekućih proizvoda jer se jednostanični organizmi lakše dispergiraju u tekućinama. Plijesni će bolje uspijevati na čvrstom supstratu gdje je kisik odmah dostupan (Pitt i Hocking, 2009.).

*Zahtjevi za nutrijentima.* Metabolizmu gljiva najviše odgovaraju supstrati bogati ugljikohidratima, dok će bakterije prije kvariti hranu bogatu proteinima (Pitt i Hocking, 2009.).

### 2.1.2. Značaj gljiva

Plijesni mogu imati čitav niz nepoželjnih učinaka u poljoprivredi i industriji jer se brzo prilagođavaju na nove izvore hrane (Duraković, 1996.).

Plijesni mogu rasti na raznim namirnicama kao što su žitarice, meso, mlijeko, voće, povrće, orašasti plodovi, masti te na proizvodima od spomenutih namirnica. Rast plijesni uzrokuje kvarljivost namirnica na nekoliko načina: nestanak okusa, toksini u namirnici, diskoloracija, truljenje i formiranje spora. Plijesni mogu proizvesti veliki broj enzima: lipaze, proteaze, ugljikohidraze i dr. Jednom kada uđu u namirnicu navedeni enzimi mogu nastaviti svoje djelovanje neovisno o tome je li micelij uništen ili odstranjen. Plijesni mogu proizvesti hlapljive tvari kao što su dimetil disulfid, geosmin i 2-metilizoborneol koje mogu utjecati na kvalitetu namirnica čak i ako su prisutne u vrlo malim količinama. Takve spojeve u velikim količinama proizvode vrste različitih rodova kao što su *Penicillium*, *Aspergillus* i *Fusarium*. No, sa stajališta kvarljivosti namirnica uzrokovane plijesnima, najvažnija je tvorba mikotoksina. Poznato je preko 400 vrsta mikotoksina, a među njima su najpoznatiji aflatoksini. Mikotoksini su sekundarni metaboliti koji su toksični za kralježnjake u malim količinama (Filtenborg i sur., 1996.). Aflatoksini su toksični spojevi koje općenito sintetiziraju vrste iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium* tijekom rasta na zrnu žitarica i orašastim plodovima. Budući da im je temperatura razgradnje uglavnom viša od 250 °C, aflatoksini se ne razaraju toplinskim postupcima obrade namirnica. Mnogi se fungalni toksini sintetiziraju samo kada gljive rastu u okolišu s velikim udjelom vode i pri visokim temperaturama (Duraković, 1996.).

### 2.1.3. Sistematika plijesni u namirnicama

Razdjel: *Zygomycota*

Podrazdjel: *Zygomycetes* (neseptirani micelij, razmnožavanje pomoću

sporangiospora, brz rast)

Red: *Mucorales*

Obitelj: *Mucoraceae*

Rod: *Mucor*

*Rhizopus*

*Thamnidium*

Razdjel: *Ascomycota*

Podrazdjel: *Plectomycetes* (septirani micelij, askospore se stvaraju u pravilu u  
auskusima, najčešće po 8 askospora)

Red: *Eurotiales*

Obitelj: *Trichomaceae*

Rod: *Byssochlamys*

*Eupenicillium*

*Emericella*

*Eurotium*

Razdjel: *Deuteromycota* / nesavršeni, anamorfnj (nespolni) stadij;  
savršeni (spolni) stadiji nisu poznati

Podrazdjel: *Coelomycetes*

Rod: *Colletotrichum*

Podrazdjel: *Hypomycetes*

Obitelj: *Moniliaceae*

Rod: *Alternaria*

*Aspergillus*

*Aurobasidium (Pullularia)*

*Botrytis*

*Cladosporium*

*Fusarium*

*Geotrichum*

*Helminthosporium*

*Monilia*

*Penicillium*

*Stachybotrys*

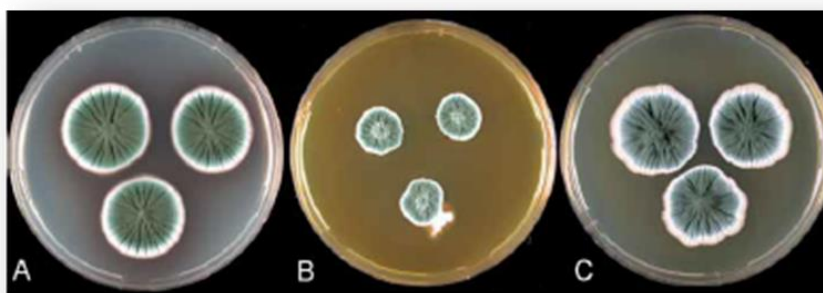
*Trichothecium* (Duraković i Duraković, 2001.).

#### 2.1.4. Rod *Penicillium*

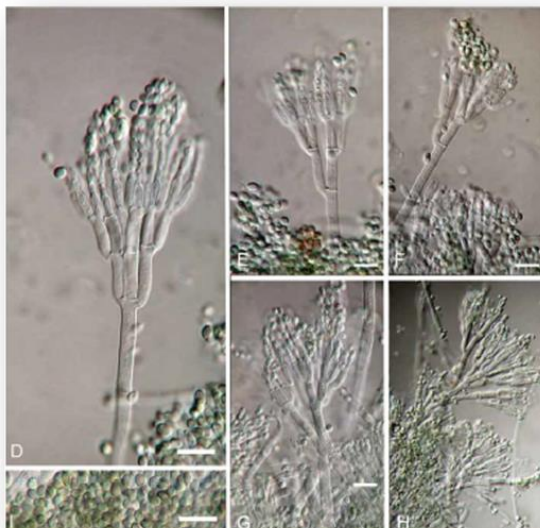
*Penicillium* je rod s oko 200 priznatih vrsta, od kojih se 50 vrsta uobičajeno pojavljuje u prirodi. Samo je mali broj prirodno izoliran iz namirnica. Plijesni roda *Penicillium* obično oblikuju isprepletene neprozirne plosnate kolonije s bijelim zračnim micelijima. Spore su zasebne, obično okrugle, ovalne ili rjeđe cilindrične te posjeduju glatku ili hrapavu površinu (Müller, 1975.). Kada su konidiofori i konidije jedine strukture za razmnožavanje, taj rod pripada u *Deuteromycota*. Kada su stvoreni kleistoteciji s askosporama, tada se predstavnici označavaju kao pripadajući askomicetima. U tijeku rasta na namirnicama, predstavnici tog roda su plave do plavo-zelene boje. Neke vrste uzrokuju zeleno pljesnivo truljenje limuna i plavo pljesnivo truljenje jabuka, krušaka i koštuničavog voća (Duraković i Duraković, 2001.). Za izolaciju *Penicillium* vrsta obično se upotrebljava Czapek-ov kvašev agar (CYA) ili sladni agar (MEA) (Pitt, 1999.).

##### 2.1.4.1. Opća svojstva plijesni *Penicillium aurantiogriseum*

Prirodno stanište *P. aurantiogriseum* su žitarice i prisutne su na žitaricama prije žetve ili neposredno nakon žetve (Pitt, 1999.). Konidije su okruglaste (rijetko elipsaste) glatkih stijenki. Boja konidija na CYA je plavo-zelena do sivo-zelena ili tamno zelena. Boja konidija na suprotnoj strani na CYA je curry žuta do toplo narančaste ili crvenkasto smeđe. Ova vrsta proizvodi mješavinu mikotoksina: penicilinsku kiselinu, verukozidin i nefrotoksične glikopeptide (Frisvad i Samson, 2004.).



**Slika 2** *Penicillium aurantiogriseum*; 7 dana stare kolonije na: (A) CYA, (B) MEA, (C) YES  
(Frisvad i Samson, 2004.)



**Slika 3** Konidiofore plijesni *P. aurantiogriseum* (Frisvad i Samson, 2004.)

Istraživanja su pokazala kako kobasica inokulirana s *P. aurantiogriseum* proizvodi značajne količine nekih organskih kiselina, kao što su octena, propionska, maslačna, i vjerojatno heksanska kiselina zbog površinske lipolitičke aktivnosti ili zbog katabolizma određenih aminokiselina. Površinska inokulacija *P. aurantiogriseum* pojačava miris i okus što se može objasniti povećanjem udjela hlapljivih komponenti iz katabolizma aminokiselina, akumulaciji estera nastalih metabolizmom plijesni te nižim stupnjem oksidacije u tretiranoj kobasici što je posljedica antioksidativnog učinka *P. aurantiogriseum* (Bruna i sur., 2001.).

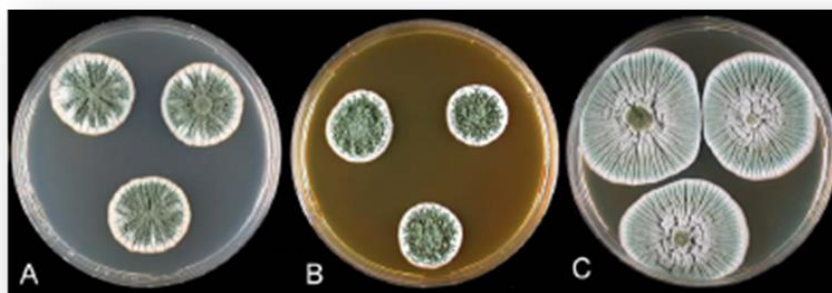
Minimalna temperatura potrebna za rast *P. aurantiogriseum* iznosi  $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , dok optimalna temperatura rasta iznosi  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Minimalni potrebni  $a_w$  iznosi 0,81, a rast potiče ugljični dioksid u razini iznad 10 %. Proizvodi hlapljive kiseline kao što su 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 3 metil-1-butanol, 1-okten-3-ol i 3-oktanon na ječmu, pšenici i umjetnom materijalu (Pitt i Hocking, 2009.). Izolati *P. aurantiogriseum* obično proizvode penicilinsku kiselinu, verukozidin i nefrotoksične glikopeptide. Uzrokuje kvarenje skladištenog voća i povrća, uključujući jabuke, kruške, jagode, grožđe, lubenice, rajčice i krumpir (Pitt i Hocking, 2009.).

#### 2.1.4.2. Opća svojstva plijesni *Penicillium expansum*

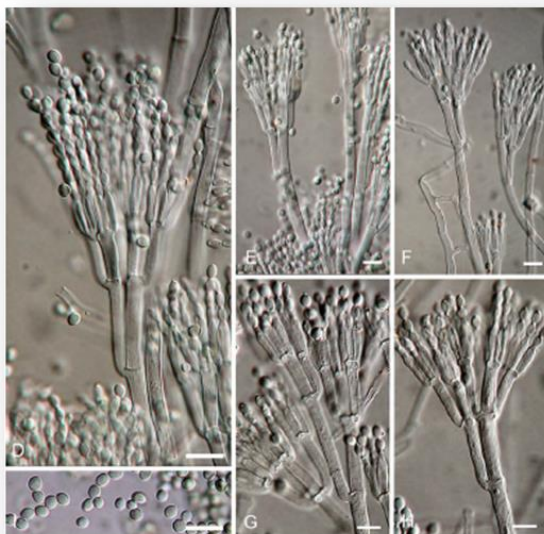
*P. expansum* se pretežno izolira iz trulih jabuka i krušaka, no može se izolirati i iz drugog voća kao što su rajčice, jagode, avokado, mango, grožđe. Manja mu je pojavnost na žitaricama od ostalih vrsta ovog roda (Pitt i Hocking, 2009.).

Konidije *P. expansum* su elipsaste, glatkog ruba, a tekstura kolonije je flukozna sa slabim fascikulama. Boja konidija na CYA je plavo-zelena do zelena, dok je boja konidija na suprotnoj strani CYA krem do žuta sa smeđim središtem. Miris i hlapljivi metaboliti koje proizvodi *P. expansum* su izobutanol, izopentanol, 1-metoksi-3-metil-benzen i geosmin (Frisvad i Samson, 2004.).

Proizvodi mikotoksine kao što su patulin, ketoglobozin C, roqufortine C, citrinin i komunezin A i B. Samo je koncentracija patulina regulirana (pogotovo u soku od jabuke) (Frisvad i Samson, 2004.). Istraživanja su potvrdila kako patulin oštećuje bubrežne stanice i uzrokuje oksidativni stres stanica te je kao takav toksičan za ljude. Neke zemlje su odredile maksimalno dopuštenu granicu patulina od 50 µg/L u soku od jabuke i drugim jabučnim proizvodima (FAO, 2003.; Pitt i Hocking, 2009.).



**Slika 4** *Penicillium expansum*; 7 dana stare kolonije na: (A) CYA, (B) MEA, (C) YES



**Slika 5** Konidiofore plijesni *Penicillium expansum* (Frisvad i Samson, 2004.)

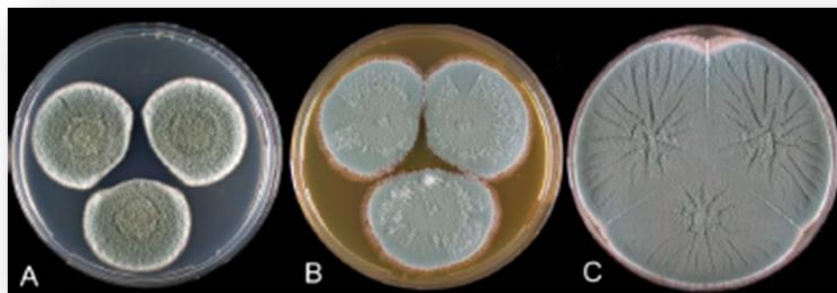
Glavna svojstva po kojima se prepoznaje *P. expansum* su tupe zelene konidije, glatkih rubova na CYA i MEA, a ponekad je prisutan narančasto-smeđi do smeđi eksudat (Pitt i Hocking, 2009.).

*P. expansum* je psihrofil, a najniže zabilježene temperature potrebne za njegov rast su  $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Raste prilično dobro na  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Optimalna temperatura rasta za ovu vrstu je  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a maksimalna  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Minimalni potrebni  $a_w$  za ovu vrstu iznosi  $0,82 - 0,83$ . Posjeduje jako slabu potrebu za kisikom (Pitt i Hocking, 2009.).

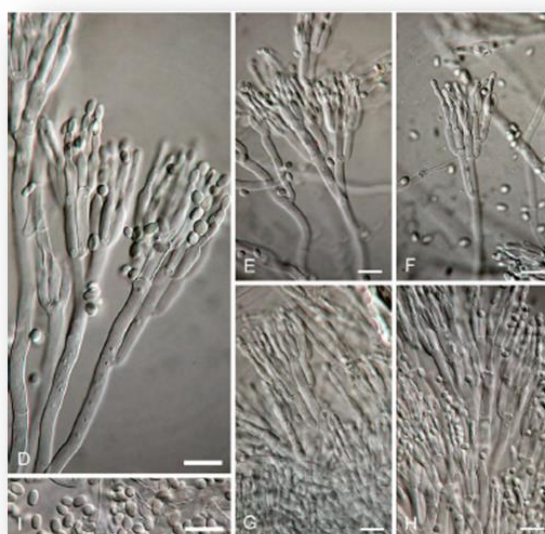
#### **2.1.4.3. Opća svojstva plijesni *Penicillium italicum***

*P. italicum* posjeduje cilindrične do elipsoidne konidije glatkog obruba te ima slab porast. Na CREA agaru ne otpušta kiselinu te posjeduje korastu teksturu na YES agaru. Vjeruje se kako nije toksičan (Frisvad i Samson, 2004.).





**Slika 6** *Penicillium italicum*; 7 dana stare kolonije na: (A) CYA, (B) MEA, (C) YES (Frisvad i Samson, 2004.)



**Slika 7** Konidiofore plijesni *Penicillium italicum* (Frisvad i Samson, 2004.)

Kolonije *P. italicum* na CYA su promjera 30 – 40 mm, dok je promjer kolonija na MEA 35 – 40 mm (Pitt i Hocking, 2009.). *P. italicum* se u prirodi odmah prepoznava kao uzročnik plavo-zelenog truljenja limuna i drugog citrusnog voća. Oblikuje relativno široke, sivo-zelene kolonije koje su na suprotnoj strani tamno smeđe. Povećava se i širi tijekom sazrijevanja (Pitt i Hocking, 2009.).

*P. italicum* raste u temperaturnom rasponu od -3 °C do 34 °C, a optimalna temperatura rasta je od 22 do 24 °C. Minimalni  $a_w$  potreban za germinaciju spora pri 10 i 25 °C iznosi 0,87, dok pH raspon potreban za rast iznosi 1,6 - 9,8 (Pitt i Hocking, 2009.).

Primarno stanište ove plijesni je citrusno voće, osobito limun i naranča. Otporan je na uobičajeno korištene fungicide kao što je imazalil. Izoliran je još i iz avokada, rajčica, riže, mesa, kobasica, sira i iz voćnih sokova (Pitt i Hocking, 2009.).

## **2.2. PH VRIJEDNOST I PROCESIRANJE PROMJENOM PH VRIJEDNOSTI**

Mjeren staklenom elektrodom, pH označava negativni logaritam aktiviteta vodikovih iona. Aktivitet vodikovih iona je proporcionalan koncentraciji i konstanti proporcionalnosti, koeficijentu djelotvornosti koji se približava jedinici kako otopina postaje razrijeđenija. Dakle:

$$\text{pH} = -\log(a_{\text{H}}) = \log 1/(a_{\text{H}}) \approx \log 1/[\text{H}^+]$$

gdje ( $a_{\text{H}}$ ) označava aktivitet vodikovih iona, a  $[\text{H}^+]$  koncentraciju vodikovog iona

Za vodene otopine, pH 7 odgovara neutralnoj vrijednosti. pH vrijednosti ispod 7 ukazuju na kiselo, a vrijednosti iznad 7 ukazuju na lužnato okruženje (Adams i Moss, 2008.).

Općenito, bakterije brže rastu u pH rasponu od 6,0 do 8,0, kvasci od 4,5 do 6,0, a filamentozne gljive od 3,5 do 4,0. Kiselost namirnice može znatno utjecati na mikrobnu ekologiju i na stupanj te vrstu kvarenja. Povrće je uglavnom umjereno kiselo, te su za njihovo meko kvarenje uglavnom odgovorne bakterije kao što je npr. rod *Pseudomonas*. Voće posjeduje nižu pH vrijednost čime se sprječava razvoj bakterija te su za kvarenje uglavnom odgovorni kvasci i plijesni (Adams i Moss, 2008.).

### **2.2.1. Mehanizam djelovanja niske pH vrijednosti na mikroorganizme**

Nedisocirane molekule lipofilne kiseline mogu slobodno proći kroz staničnu membranu, te kiselina unutar stanice disocira na anione i protone čime dolazi do zakiseljavanja citoplazme stanice. Stanica će pokušati zadržati svoj visoki unutarnji pH tako što će neutralizirati ili izbaciti protone, no to će usporiti rast jer se troši energija koja je potrebna za rast stanice. Ako je vanjski pH dovoljno nizak, a koncentracija kiseline izvan stanice dovoljno visoka, stanica postaje preopterećena, pH citoplazme pada do granice kada rast više nije moguć i stanica naposljetku odumire (Adams i Moss, 2008.). Do optimalne inhibitorne aktivnosti dolazi pri niskom pH jer to pogoduje nedisociranom stanju molekule kiseline koja može slobodno proći kroz plazmatsku membranu (López-Malo i sur., 2007.).

### 2.2.2. pH vrijednosti voća i sokova

S obzirom na pH vrijednost, namirnice se mogu podijeliti na visoko kisele (pH ispod 4,6) i nisko kisele (pH iznad 4,6) (Bibek i Arun, 2008.). Voće zbog svog visokog sadržaja ugljikohidrata i niskog pH omogućuje rast različitim vrstama plijesni, kvasaca i bakterijama mliječne kiseline. Mikroorganizmi uglavnom dopijevaju na voće iz zraka, zemlje, sa kukaca i oštećene opreme. Općenito, prosječna količina neke mikrobne kulture na voću iznosi  $10^{3-6}$  CFU/g. (Bibek i Arun, 2008.). Pljesnivo kvarenje mesnatog voća kao što su jabuke i breskve često se očituje po smeđim područjima na čijim mjestima micelij plijesni urasta u tkivo ispod kože (Frazier, 1958.).

Bezalkoholna pića sadrže vodu, zaslađivače, kiseline, arome, emulgirajuće tvari i konzervanse. Neka sadrže voćni sok i mogu biti gazirana ili negazirana s pH vrijednošću od 2,5 do 4,0. pH stopostotnih voćnih sokova iznosi do 4,0. U bezalkoholnim pićima mogu biti prisutne različite vrste mikroorganizama ali se samo plijesni, kvasci, bakterije mliječne kiseline te bakterije octene kiseline mogu razmnožavati u bezalkoholnom piću. U sodiranim pićima se mogu razmnožavati neki mikroaerofilni kvasci (Bibek i Arun, 2008.).

### 2.2.3. Kontrola rasta mikroorganizama organskim kiselinama

Antimikrobno svojstvo neke organske kiseline se povećava s povećanjem topline, niskim  $a_w$ , prisutnošću drugih konzervansa i niskim temperaturama skladištenja. Kvasci i plijesni su osjetljiviji na propionsku i sorbinsku kiselinu, a bakterije su osjetljivije na octenu kiselinu. Za antimikrobni učinak je važna i topljivost kiseline. Acetat, propionat, laktat i citrat su jako topljivi u vodi, dok su benzoat, sorbat i paraben slabo topljivi (Bibek i Arun, 2008.).

Vrste organskih kiselina i njihovih soli koji se dodaju u namirnice su soli benzojeve i sorbinske kiseline, kao i octena, mliječna te propionska kiselina. Dodana kiselina i određena pH vrijednost mogu neovisno jedna o drugoj djelovati kao što može i njihova interakcija utjecati na rast bakterijskih stanica (Barth i sur., 2009.). Octena kiselina i njene soli se koriste u mnogim namirnicama kako bi se inhibirao rast Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija, kvasaca i plijesni. Baktericidna je u koncentraciji iznad 0,3 %. Propionska kiselina i njene soli se koriste u namirnicama kao fungistatična tvar, te se koriste kako bi kontrolirali plijesni u siru, maslacu i pekarskim proizvodima. Mliječna kiselina i njene soli se više dodaju zbog pojačanja arome nego zbog antibakterijskog učinka, no imaju i određeni antibakterijski

učinak kada se upotrebljavaju u koncentraciji od 1 do 2 %. Limunska kiselina se koristi u koncentraciji od 1 % u bezalkoholnom piću, pekarskim proizvodima i siru. Ima slabiji inhibični učinak od mliječne kiseline protiv bakterija, gljivica i plijesni (Bibek i Arun, 2008.). Stratford i sur. (2013.) su pokazali kako dvije različite slabe kiseline (sorbinska i octena) ne djeluju jednako na inhibiciju (različite sojeve kvasca *Saccharomyces cerevisiae*). Utvrdili su da sorbinska kiselina inhibira rast svih primjenjenih sojeva na mnogo nižoj koncentraciji nego octena kiselina (3,33 mM naprama 138 mM).

Najvažnije vrste plijesni koje uzrokuju kvarenje raženog kruha u koji nije dodan konzervans su *Penicillium roqueforti*, *P. paneum*, *P. carneum*, *P. corylophilum*, *Eurotium repens* i *E. rubrum*. Kada se dodaju konzervansi poput sorbinske kiseline i propionske kiseline ostaje samo plijesan *P. roqueforti* (Filtenbourg i sur., 1996.).

Istraživanje učinka kalijevog sorbata u kontroli truljenja citrusnog voća napadnutog s *Penicillium digitatum* i *P. italicum* pokazalo je kako kalijev sorbat najjače inhibira rast plijesni pri temperaturi od 62 °C. Upotrebom kalijeva sorbata dolazi do smanjenja broja obje vrste roda *Penicillium* za 20, 25, 50, 80 i čak 95 % na klementinama, mandarinama i narančama (Montesinos-Herrero i sur., 2009.).

Rezultati istraživanja efekta slabih kiselina na rast plijesni uzročnika kvarenja pekarskih proizvoda primjenom različitih aktiviteta vode i pH vrijednosti su pokazali kako je koncentracija propionata od 0,3 % pri  $a_w$  0,97 i pH od 4,8 potpuno inhibirala rast plijesni u periodu od 2 tjedna (Suhr i Nielsen, 2004.).

Istraživanje utjecaja kalijevog sorbata, vruće vode i tiabendazola protiv zelene plijesni na limunu je pokazalo da je kombinacija vruće vode (53 °C) sa kalijevim sorbatom imala umjerenu učinkovitost u kontroli truljenja limuna te da kalijev sorbat poboljšava djelovanje tiabendazola (D'Aquino i sur., 2013.).

Pri pH 4,5 mješavina cimeta i natrijevog benzoata pokazuje sinergistički učinak te uspješno inhibira rast plijesni. Ova mješavina predstavlja alternativu u odnosu na konvencionalne fungicide, pogotovo u pekarskim proizvodima gdje se cimet uobičajeno koristi (López-Malo i sur., 2007.).

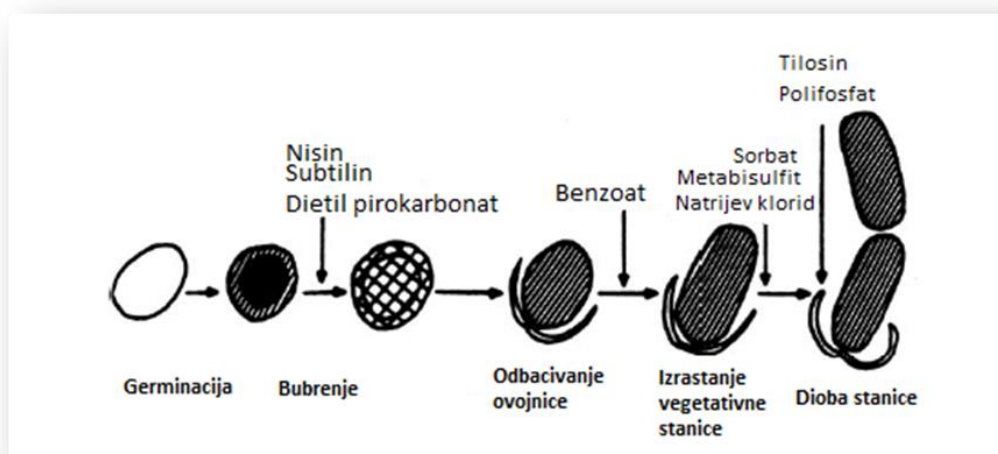
## 2.3. KEMIJSKI KONZERVANSI

Konzervansi su tvari sposobne inhibirati, odgoditi ili spriječiti rast mikroorganizama ili bilo koje kvarenje nastalo njihovom prisutnošću (Adams i Moss, 2008.). Količina konzervansa koja se primjenjuje ovisi o sastavu namirnice, vrsti mikrobnog kvarenja i željenoj trajnosti. Najvažniji čimbenici u odabiru konzervansa su specifična fizikalna svojstva i cijena. Konzervansi se dodaju direktno u hranu ili se razvijaju za vrijeme procesiranja namirnice (Surekha i Reddy, 2000.).

### 2.3.1. Mehanizam djelovanja kemijskih konzervansa

Konzervansi ne inhibiraju samo metabolizam, već i rast mikroorganizama. Djelovanje konzervansa općenito uključuje fizikalne kao i fizikalno-kemijske mehanizme, pri čemu je osobito važno inhibitorno djelovanje na enzime.

U sprječavanju mikrobnog rasta važnu ulogu ima djelomično disocirana lipofilna kiselina. Nedisocirane lipofilne kiseline mogu slobodno prolaziti kroz membranu. Lipofilne kiseline iz područja vanjskog niskog pH prolaze u citoplazmu s visokim pH. Zbog visoke pH vrijednosti kiselina disocira kako bi proizvela protone koji zakiseljavaju citoplazmu. Kako bi zadržala unutarnji pH, stanica pokušava izbaciti protone. Time se preusmjerava energija potrebna za rast zbog čega se rast stanice kao i prinos zaustavljaju (Surekha i Reddy, 2000.).



**Slika 8** Shematski prikaz djelovanja nekih konzervansa na određene faze nastajanja vegetativne stanice iz endospore primjenom minimalne inhibitorne koncentracije

(Jay i sur., 2005.)

**Tablica 1** Konzervansi koji se koriste u namirnicama (Surekha i Reddy, 2000.)

Tradicionalni konzervansi	Sintetički konzervansi	Antibiotici
	<i>Organski:</i>	
Šećer	octena kiselina,	Nizin
Sol	acetati i diacetati	Pimaricin
Dim		
Začini	sorbinska kiselina i njene soli	Tilozin
Vinobran	benzojeva kiselina i njene soli	
alkohol	p-hidroksibenzojeva kiselina	
	borna kiselina i boratilimunska kiselina i njene soli	
	mliječna kiselina i njene soli	
	propionska kiselina i njene soli	
	<hr/> <i>Anorganski:</i>	
	ugljična kiselina (CO <sub>2</sub> )	
	sumporasta kiselina i sulfiti (SO <sub>2</sub> )	
	nitriti i nitrati	
	fosfati	
	vodikov peroksid	

---

### 2.3.2. Svojstva i mehanizam djelovanja kalijeva sorbata i sorbinske kiseline

Sorbinska kiselina ( $C_6H_8O_2$ ) je nazasićena alifatska ravnolančana monokarboksilna masna kiselina. U namirnice se stavlja kao kiselina i u obliku natrijeve, kalcijeve i kalijeve soli. Obično se koristi kalijeva sol jer je stabilnija, topljivija i jednostavnije se proizvodi (Surekha i Reddy, 2000.). Topljivost kalijevog sorbata ( $C_6H_7KO_2$ ;  $M_r = 150,22$ ) u vodi pri 20 °C je oko 58 % (Jay, 1995.). Prvotno se mislilo kako sorbati posjeduju samo antifungalna svojstva ali danas se zna kako inhibiraju i bakterije. Učinkovite koncentracije ne mijenjaju okus niti miris hrane (Surekha i Reddy, 2000.).

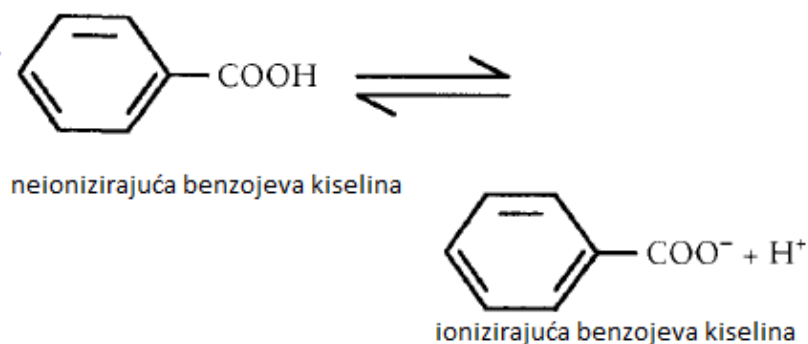
Inhibicija sorbatima uzrokuje odumiranje stanice, usporavanje rasta i sprječavanje germinacije spora. Stupanj inhibicije ovisi o samom proizvodu kao i okolišnim uvjetima kao što je pH vrijednost (Surekha i Reddy, 2000.). Sprječava djelovanje dehidrogenaza i oksidira SH-skupine aktivnih enzima, pri čemu se sorbinska kiselina reducira. Snižanjem pH vrijednosti medija pojačava se djelovanje sorbinske kiseline zbog smanjene disocijacije, no i kod relativno visokih pH vrijednosti (između 5 i 6) pokazuje još uvijek dobro djelovanje (Müller, 1975.). Koncentracija koja se koristi varira od 500 do 2000 ppm (0,05 – 0,2 %). Inhibitorna koncentracija nedisocirane kiseline za određene mikrobne vrste je sljedeća: 0,01 % (100 ppm) za *Pseudomonas* spp., *S. aureus*, *E. coli* i *Serratia* spp.; 0,1 % za *Lactobacillus* spp. i *Salmonella* spp.; 0,02 % za većinu plijesni i kvasaca (Bibek i Arun, 2008.).

Sorbati se dodaju u namirnice kao što su sir, pekarski proizvodi, voćni sokovi, pića, preljeve za salate i slične proizvode (Jay i sur., 2005.).

### 2.3.3. Svojstva i mehanizam djelovanja natrijeva benzoata i benzojeve kiseline

Benzojeva kiselina ( $C_7H_6O_2$ ,  $M_r = 122,12$ ) je slaba karboksilna kiselina (Surekha i Reddy, 2000.). U svom izvornom obliku benzojeva kiselina je bijeli kristalni prah. Soli benzojeve kiseline koje su topljive u vodenoj fazi hrane također su bijele boje te su poznate kao benzoati (Surekha i Reddy, 2000.). Natrijev benzoat ( $C_6H_5NaO_2$ ,  $M_r = 144,11$ ) je jako topljiv u vodi (0,5 g/mL) (Jay, 1995.), te se zbog toga natrijeva sol više koristi (Desrosier, 1963.). Uglavnom se koristi za inhibiciju rasta kvasaca i plijesni (Adams i Moss, 2008.).

Učinak benzojeve kiseline leži u nedisociranim (neionizirana kiselina) molekulama koje postaju brojnije s opadanjem pH u okolini namirnice. Disocijacijska konstanta (pKa) benzojeve kiseline je 4,2 pri čemu je koncentracija disocirane i nedisocirane frakcije jednaka (Surekha i Reddy, 2000.).



**Slika 9** Strukturne formule nedisocirane i disocirane benzojeve kiseline  
(Surekha i Reddy, 2000.)

Inhibicija benzojevom kiselinom je višestruka. Sposobnost nedisocirane molekule da remeti proizvodnju energije i funkciju membrane je od primarne važnosti jer dolazi do inhibicije rasta mikroorganizama (Adams i Moss, 2008.). U nedisociranom obliku benzojeva kiselina je topljiva u staničnoj membrani i djeluje kao proton ionofora. Na taj način omogućuje ulazak protona u stanicu te stanica troši energiju kako bi održala uobičajeni unutarnji pH (Jay, i sur., 2005.).

Benzojeva kiselina se upotrebljava kao kiselina ili natrijeva sol u koncentraciji od 500 do 2000 ppm (0,05 do 0,2 %) (Bibek i Arun, 2008.). Benzoati u namirnicama u koncentraciji od 0,1 % se mogu osjetiti te mogu dati neugodan “paprast” ili „gorući“ okus (Desrosier, 1963.). Inhibitorna koncentracija nedisocirane kiseline je od 0,01 do 0,02 % protiv bakterija i od 0,05 do 0,1 % protiv kvasaca i plijesni (Bibek i Arun, 2008.).

Učinkovita je pri niskom pH stoga se dodaje u namirnice s nižom pH vrijednošću kao što su voće i proizvodi od voća, gazirana pića, fermentirano povrće i sirupi (Surekha i Reddy, 2000.).





### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK

Zadatak rada bio je ispitati antifungalni učinak konzervanasa: K-sorbata i Na-benzoata na odabrane vrste plijesni roda *Penicillium*: *P. aurantiogriseum*, *P. expansum* i *P. italicum* pri dvije niske pH vrijednosti (pH<sub>1</sub>: 4,4 i pH<sub>2</sub>: 4,16). Pri tome je zadatak bio odrediti minimalnu inhibitornu (MIK) i fungicidnu (MFK) koncentraciju. Cilj rada bio je i ispitati inhibiciju linearnog rasta kolonija plijesni na agarnoj ploči pri različitim koncentracijama konzervanasa i dvije pH vrijednosti.

### 3.2. MATERIJAL I METODE

Kulture plijesni korištene u ovom radu nalaze se u kolekciji kultura mikroorganizama Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Katedre za biologiju i mikrobiologiju. Kulture su porijekom iz kolekcije kultura mikroorganizama Zavoda za biologiju, Fakulteta Znanosti, Sveučilišta Charles iz Praga, Republika Češka. Vrste korištene su ovom radu su:

- *Penicillium aurantiogriseum*
- *Penicillium expansum* i
- *Penicillium italicum*

Kulture plijesni uzgojene su na kosom krumpirovom agaru s glukozom (Liofilchem, Italija) tijekom inkubacije od 5 dana na 25°C.

Konzervansi korišteni u ispitivanju inhibicije rasta plijesni: K-sorbat i Na-benzoat (Kemika, Zagreb).

Za prilagodbu pH vrijednosti podloga za rast navedenih vrsta plijesni korištena je 1 M kloridna kiselina (HCl) Kemika, Zagreb.

#### 3.2.1. Podloge za ispitivanje antifungalnog učinka konzervanasa

Antifungalni učinak (MIK i MFK) pri sniženoj pH vrijednosti podloge (krumpirov glukozni bujon, PDB; Liofilchem, Italija) ispitan je u sterilnoj podlozi čiji je pH (5,12) prilagođen na 4,4 i 4,16 dodatkom sterilne 1 M HCl. pH vrijednost promijenjene podloge je provjeravana pH metrom Five Easy™ Fe20 (Mettler Toledo, Švicarska)

Ispitivanje inhibicije linearnog rasta kolonije ispitano je na krutoj podlozi – krumpirov glukozni agar (PDA; Liofilchem, Italija) čiji je pH (5,12) također prilagođen na željenu vrijednost (4,4 i 4,16) dodatkom 1 M sterilne HCl, nakon sterilizacije.

### **3.2.2. Priprema otopina K-sorbata i Na-benzoata**

Radne otopine konzervansa K-sorbata i Na-benzoata su pripravljene otapanjem kemijskih spojeva u sterilnoj demineraliziranoj vodi i sterilizirane propuštanjem kroz filter promjera otvora 0,22  $\mu\text{m}$ . Otopine su upotrijebljene neposredno nakon pripreve.

Na kosi PDA agar porasta kulture inkubirane 5 dana pri 25°C dodana je otopina za pripremu suspenzija spora (1,5 % agar s dodatkom 0,05 % Tween 80; Biolife, Italija). Povlačenjem po kosini agara pripravljena je suspenzija spora. Nakon toga, pripravljena je suspenzija spora plijesni koncentracije  $1 \times 10^6$  spora/mL prebrojavanjem stanica u Bürker – Türkovoj komorici. Navedena koncentracija je upotrijebljena za sva ispitivanja provedena u ovom radu.

### **3.2.3. Određivanje minimalne inhibitorne (MIK) i fungicidne (MFK) koncentracije**

Inhibitorna i fungicidna koncentracija spojeva je ispitana u epruvetama s 5 mL sterilnog krumpirovog glukoznog bujona (PDB) prilagođene pH vrijednosti (4,4 i 4,16). U svaku epruvetu je prenesen odgovarajući volumen pripravljene stock otopine konzervansa (8 800 ppm) kako bi se pripravile sljedeće koncentracije: 800, 400, 200, 100 i 50 ppm. Dvije epruvete su upotrijebljene u svrhu kontrole: jedna samo sa suspenzijom spora plijesni (kontrola rasta), a druga samo s konzervansom (kontrola sterilnosti otopine konzervansa). Nakon toga, epruvete su nacijepljene sa 100  $\mu\text{L}$  suspenzije spora koncentracije  $1 \times 10^6$  spora/mL. Poslije inkubacije od 48 sati pri 25°C, nakon provjere porasta micelija plijesni, preneseno je po 100  $\mu\text{L}$  uzgoja PDB bujona u sterilan PDB bujon bez konzervansa. Ukoliko i nakon dodatne inkubacije od 48 sati pri 25°C nije došlo do porasta micelija, pripadajuća koncentracija konzervansa je minimalna fungicidna (MFK). Međutim, ako je, nakon dodatne inkubacije u sterilnom PDB bujonu bez konzervansa, porastao micelij plijesni, pripadajuća koncentracija je minimalna inhibitorna (MIK). Sva ispitivanja su provedena u paralelama.

### 3.2.4. Određivanje inhibicije linearnog rasta kolonija plijesni

Iz rezultata određivanja inhibitorne i fungicidne koncentracije konzervansa, odabrane su po tri koncentracije istih i ispitan je njihov učinak na inhibiciju linearnog rasta plijesni na PDA agaru prilagođene pH vrijednosti. Nakon sterilizacije (121°C/15 minuta) i hlađenja agara (u vodenoj kupelji pri 52°C) u podlogu su dodani konzervansi kako bi postigli njihovu željenu koncentraciju (50, 100 i 200 ppm) te 1 M HCl za prilagodbu podloge na željene pH (4,4 i 4,16). Potom je, u sterilnim uvjetima, preneseno po 20 mL podloge u sterilne, prazne Petrijeve zdjelice i ostavljeno 24 sata na sobnoj temperaturi kako bi se podloga osušila. Nakon sušenja, središte svake zdjelice je nacijepljeno s 2 µL suspenzije spora koncentracije  $1 \times 10^6$  spora/mL. Svaka koncentracija konzervansa je ispitana u tri zdjelice. Zdjelice su inkubirane pri 25°C tijekom 28 dana. Svaka dva dana izmjeren je promjer porasle kolonije plijesi mjerenjem u dva, međusobno okomita, smjera.

### 3.2.5. Obrada rezultata

Rezultati su prikazani slikama izrađenim u računalnom programu GraphPad Prism ver. 6 za računalni sustav Windows, GraphPad Software, La Jolla California, SAD.

## **4. REZULTATI**

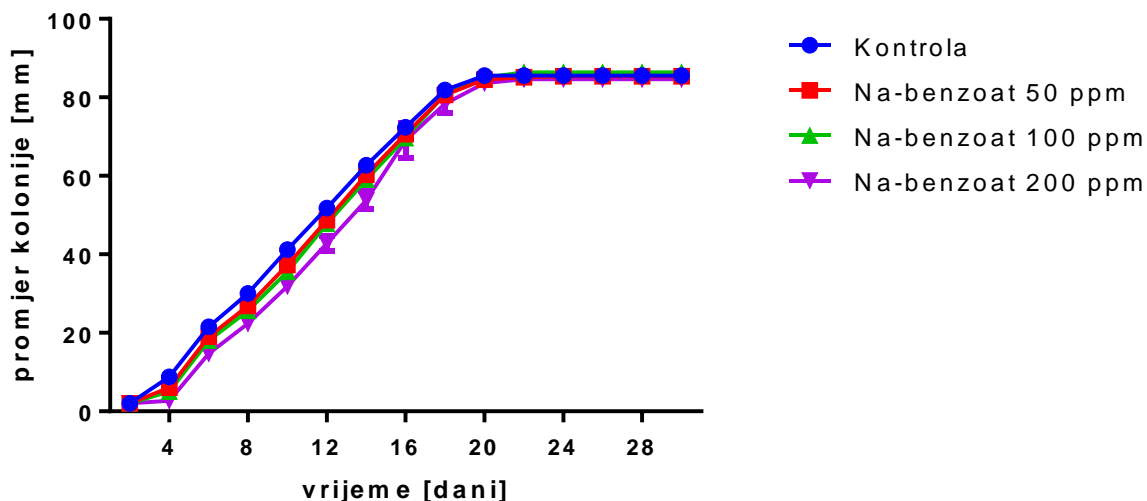
#### 4.1. ANTIFUNGALNI UČINAK K-SORBATA I NA-BENZOATA NA ODABRANE VRSTE PLIJESNI

Tablica 2 Minimalna inhibitorna (MIK) i minimalna fungicidna (MFK) koncentracija Na-benzoata i K-sorbata

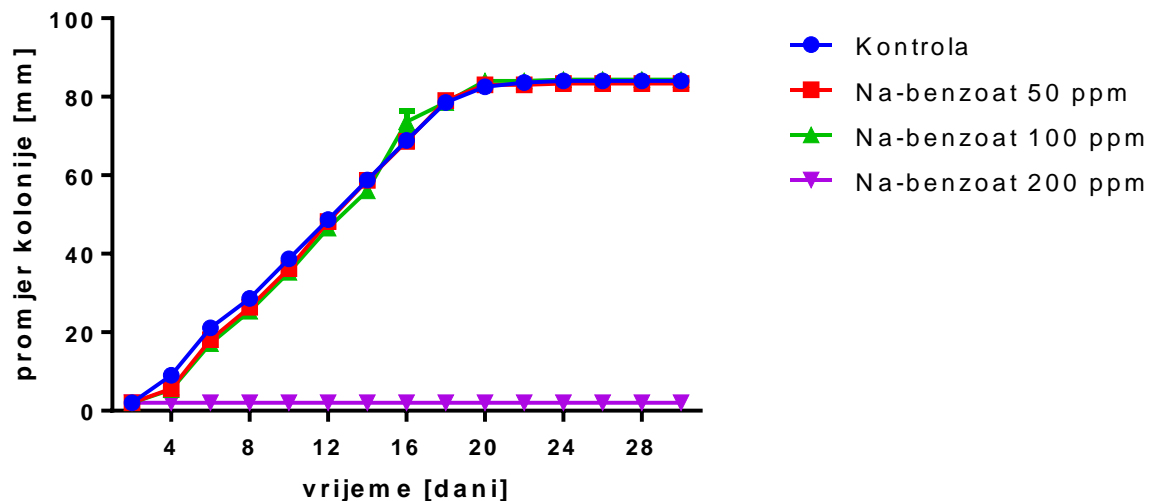
Vrsta plijesni	Učinak	Na-benzoat		K-sorbat	
		pH 4,4	pH 4,16	pH 4,4	pH 4,16
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	MIK	200*	100	200	100
	MFK	800	400	800	400
<i>Penicillium expansum</i>	MIK	-	100	100	100
	MFK	400	100	400	400
<i>Penicillium italicum</i>	MIK	400	100	200	100
	MFK	> 800	400	800	> 400

Napomena: prikazane vrijednosti izražene su u ppm

##### Na-benzoat

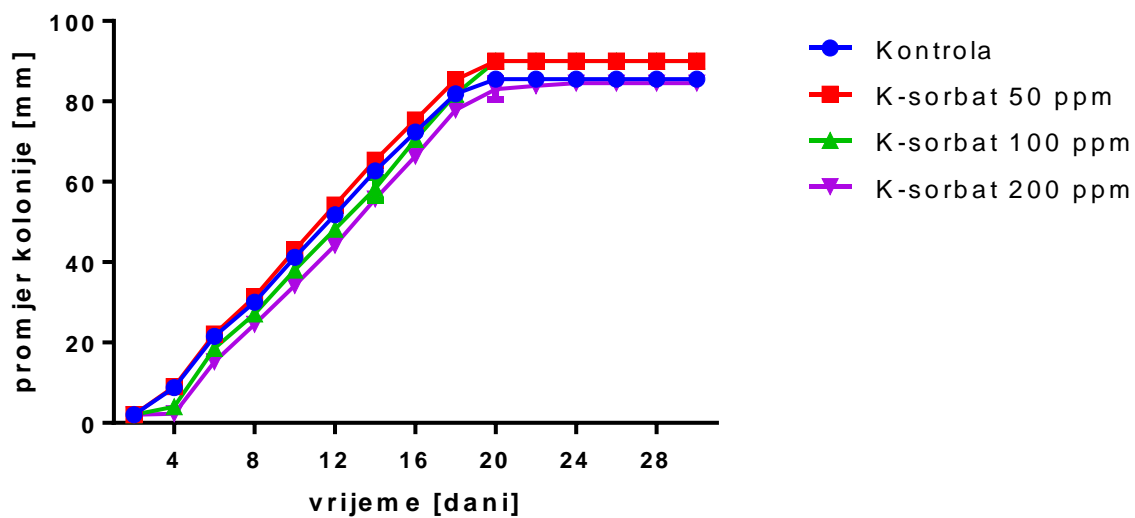


Slika 13 Utjecaj Na-benzoata na rast *P. aurantiogriseum* pri pH 4,4



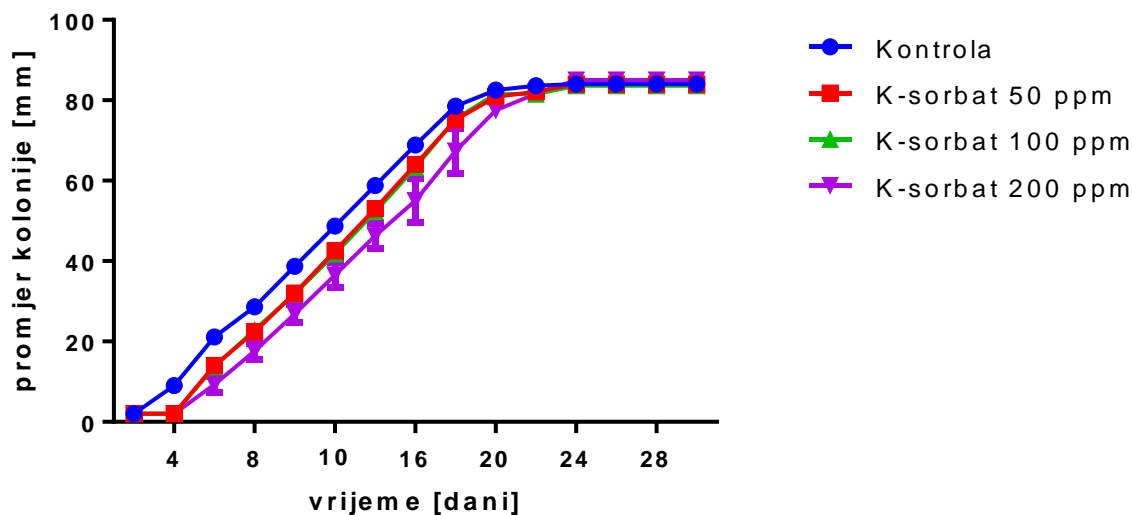
Slika 14 Utjecaj Na-benzoata na rast *P. aurantiogriseum* pri pH 4,16

#### K-sorbat



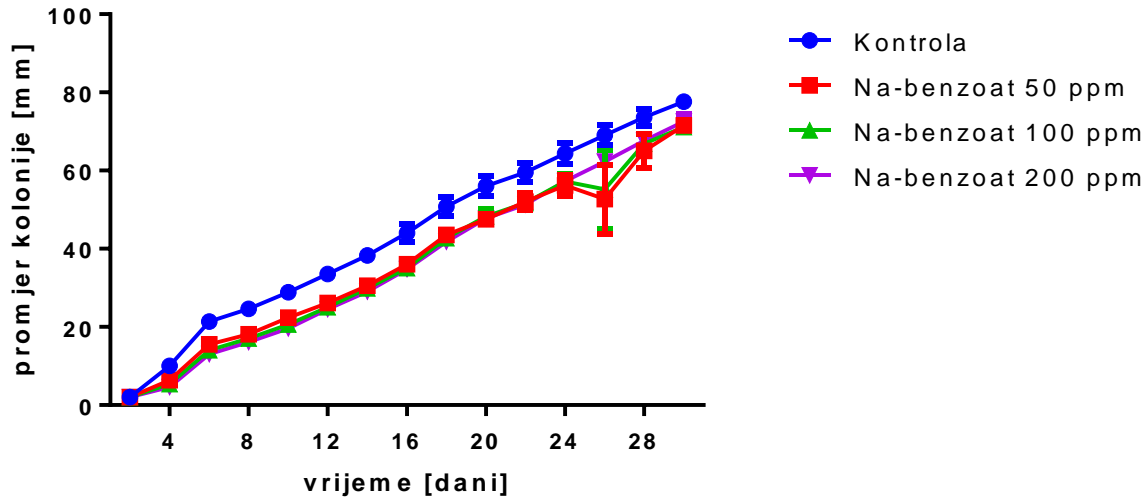
Slika 15 Utjecaj K-sorbata na rast *P. aurantiogriseum* pri pH 4,4



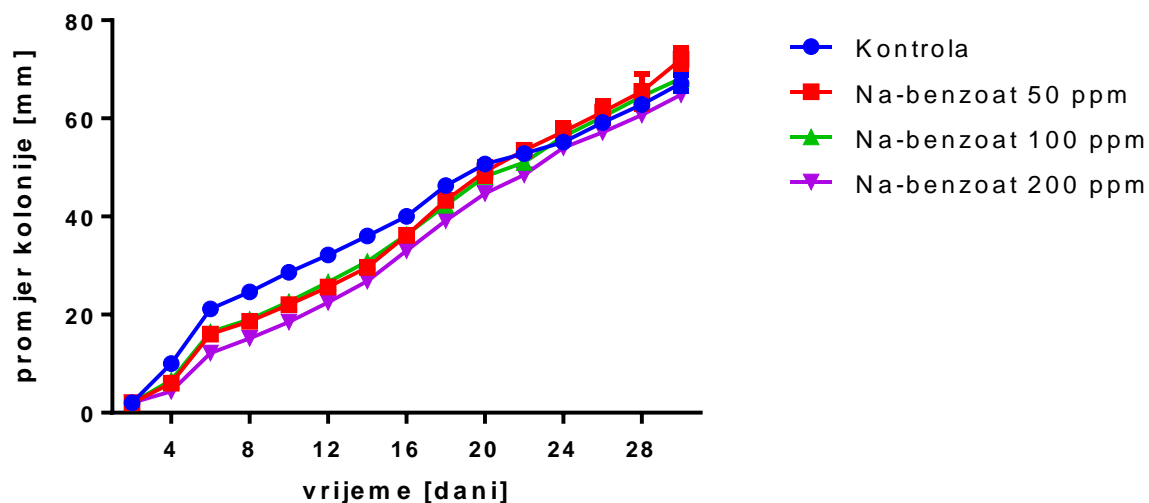


Slika 16 Utjecaj K-sorbata na rast *P. aurantiogriseum* pri pH 4,16

#### Na-benzoat

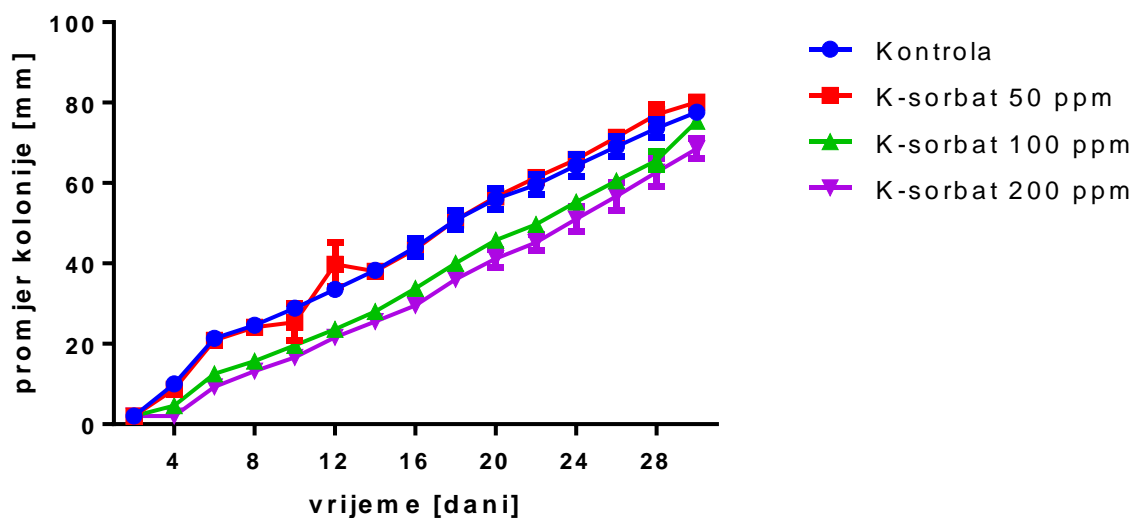


Slika 17 Utjecaj Na-benzoata na rast *P. expansum* pri pH 4,4

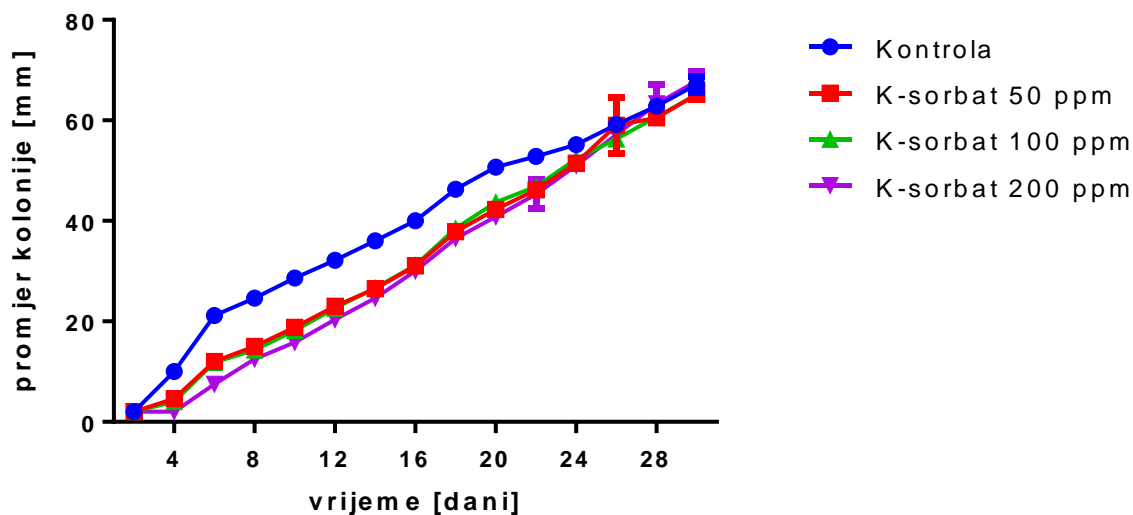


Slika 18 Utjecaj Na-benzoata na rast *P. expansum* pri pH 4,16

#### K-sorbat

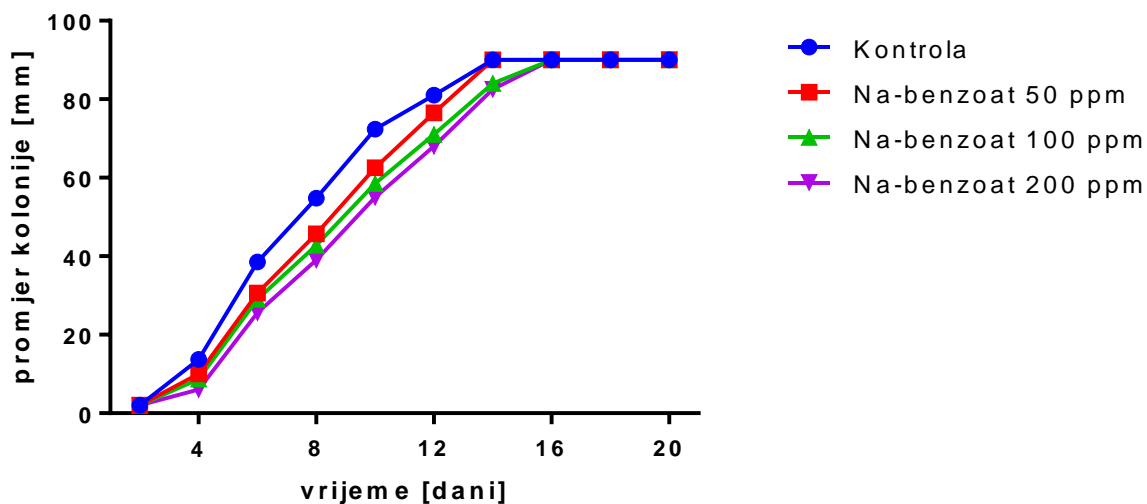


Slika 19 Utjecaj K-sorbata na rast *P. expansum* pri pH 4,4

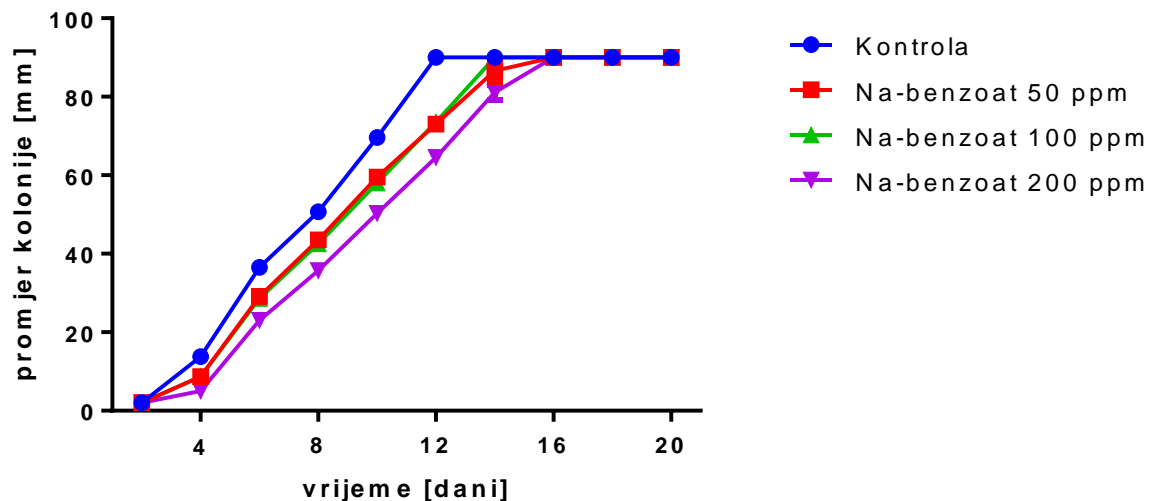


Slika 20 Utjecaj K-sorbata na rast *P. expansum* pri pH 4,16

#### Na-benzoat

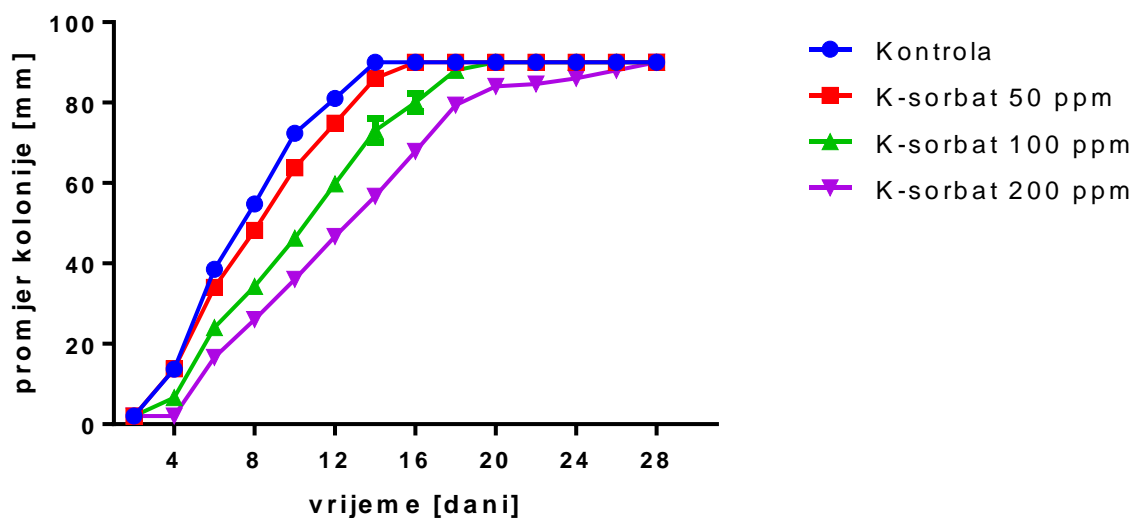


Slika 21 Utjecaj Na-benzoata na rast *P. italicum* pri pH 4,4

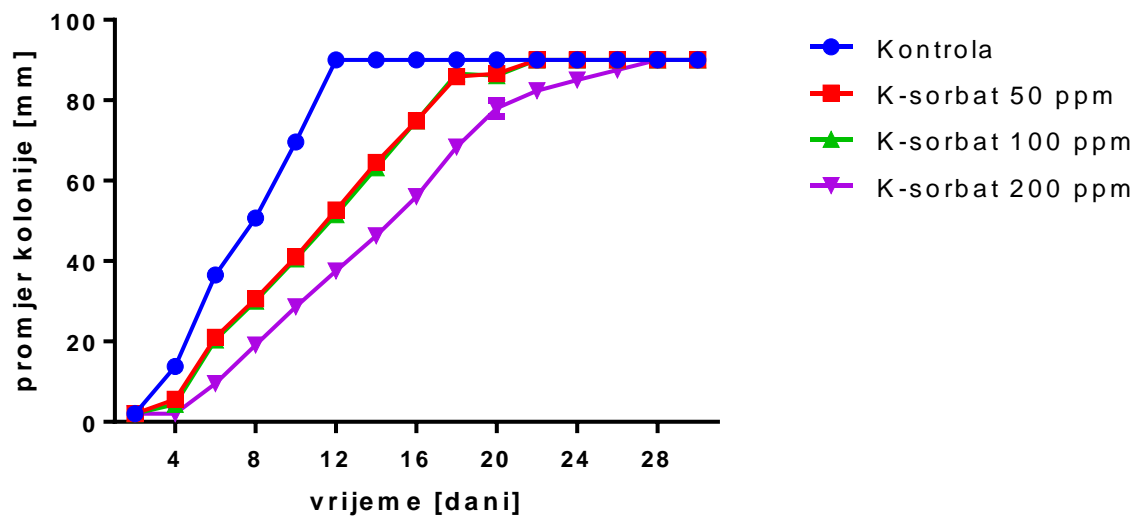


Slika 22 Utjecaj Na-benzoata na rast *P. italicum* pri pH 4,16

#### K-sorbat



Slika 23 Utjecaj K-sorbata na rast *P. italicum* pri pH 4,4



Slika 24 Utjecaj K-sorbata na rast *P. italicum* pri pH 4,16

## **5. RASPRAVA**

## 5.1. ANTIFUNGALNI UČINAK K-SORBATA I NA-BENZOATA NA ODABRANE VRSTE PLIJESNI

Rezultati prikazani tablicom 2 upućuju na sličan antifungalni učinak Na-benzoata i K-sorbata na sve analizirane vrste roda *Penicillium*. Pri pH vrijednosti od 4,4 najniža fungicidna koncentracija Na-benzoata je primijećena kod vrste *P. expansum* (400 ppm), dok je dvostruko veća koncentracija potrebna za uništavanje spora vrste *P. aurantiogriseum* (800 ppm). Vrsta *P. italicum* se pokazala najotpornijom na ovaj konzervans koji uništava spore pri koncentraciji > 800 ppm. Inhibitorna koncentracija, tj. ona koncentracija koja onemogućuje klijanje spora je u vrsta *P. aurantiogriseum* i *P. italicum* 200, odnosno 400 ppm, dok u vrste *P. expansum* nije utvrđena. Pretpostavka je kako je minimalna inhibitorna koncentracija bliža fungicidnoj koncentraciji, te se nije mogla (zbog eksperimentalnih razloga) utvrditi u ovom radu. Snižavanjem pH vrijednosti za samo 0,24 jedinice značajno se mijenja antifungalni učinak Na-benzoata. Redovito se radi smanjenju i inhibitorne i fungicidne koncentracija za polovicu (u slučaju *P. aurantiogriseum* i *P. italicum*) fungicidne koncentracije dok se inhibitorna koncentracija smanjuje dva puta (*P. aurantiogriseum*) do čak četiri puta (*P. expansum*). Iz navedenih rezultata, može se primijetiti kako se snižavanjem pH vrijednosti u hranjivoj podlozi (a time, analogno, i u namirnici), rast plijesni može kontrolirati i manjim koncentracijama konzervanasa. Budući je percepcija javnosti prema konzervansima, uglavnom, negativna, kontrola rasta plijesni samo snižavanjem pH vrijednosti (dodatkom prirodnih kiselina poput mliječne ili octene) može biti vrijedan podatak.

Drugi odabrani konzervans je K-sorbat. Slične vrijednosti, kao i u slučaju Na-benzoata, mogu se primijetiti za istraženi konzervans u tablici 2. Najotpornije vrste plijesni, pri pH 4,4 su *P. aurantiogriseum* i *P. italicum* za čije uništavanje spora je potrebno 800 ppm, dok je *P. expansum* najosjetljivija vrsta s 400 ppm potrebnih za potpuno uništavanje spora. Inhibitorne koncentracije su, slične kao i kod Na-benzoata, osim kod vrste *P. italicum* koju inhibira manja koncentracija sorbata (200 ppm), u usporedbi s 400 ppm benzoata. I u ovom slučaju se, snižavanja pH vrijednosti, pokazalo učinkovitim u postizanju antifungalnog učinka istraženih vrsta, osim u slučaju vrste *P. expansum* na koju snižavanje pH nije uopće djelovalo u smanjenju potrebne koncentracije za inhibiciju spora. Bez obzira na ovu vrstu i ovdje se može primijetiti kako snižavanjem pH vrijednosti dolazi do većeg oštećenja spora koje više nisu sposobne klijati u micelij.

## 5.2. INHIBICIJA LINEARNOG RASTA KOLONIJA PLIJESNI K-SORBATOM I NA-BENZOATOM

Za ispitivanje inhibicije linearnog rasta kolonija plijesni odabrane su tri različite koncentracije konzervanasa: 50, 100 i 200 ppm (iz rezultata MIK vrijednosti). Na **Slici 13** prikazan je učinak dodatka navedenih koncentracija Na-benzoata na *P. aurantiogriseum* pri pH 4,4. Iz rezultata je vidljivo kako u nepromijenjenoj podlozi nema značajnog učinka na inhibiciju kolonije jer plijesan raste jednako kao i u slučaju uzorka u kojemu konzervans nije dodan. Razlike u koncentracijama postoje i mogu se uočiti od 4. do 20. dana, ali one iznose nekoliko mm u promjeru kolonije. U 20. tom danu, bez obzira na primijenjenu koncentraciju, kolonija dostiže vrijednost od 90 mm koliko iznosi promjer Petrijeve zdjelice i ne mijenja se tijekom daljnje inkubacije. Pri pH vrijednosti 4,16 (**Slika 14**) niža i srednja koncentracija benzoata nisu učinkovite u inhibiciji linearnog rasta kolonije, ali pri najvišoj vrijednosti (200 ppm) Na-benzoata, dolazi do potpune inaktivacije spora *P. aurantiogriseum* koje više nisu sposobne klijati i nema nikakvog porasta početnog inokuluma sve do kraja perioda inkubacije.

Sličan učinak se može primijetiti i djelovanjem K-sorbata (**Slika 15**) gdje su razlike u koncentracijama uočljive, ali nedovoljno značajne. Također, kao i u slučaju Na-benzoata, *P. aurantiogriseum*, dosiže rub zdjelice u 20. tom danu. Niža pH vrijednost (**Slika 16**) djeluje sinergistički s primijenjenim konzervansom (K-sorbat) budući se može primijetiti *lag* faza rasta od 2 dana na početku perioda inkubacije. *Lag* faza rasta je faza u kojoj se plijesan priprema za rast u novim uvjetima, i cilj je zadržati plijesni što duže u ovoj fazi, kako spore ne bi uspjele proklijati u micelij koji se, potom, brzo umnožava. No, nakon početne *lag* faze, nakon 4. tog dana, *P. aurantiogriseum* raste na agarnoj ploči, iako se, u ovom slučaju, može primijetiti veća razlika u brzini rasta primjenom većih koncentracija K-sorbata, no svejedno nedovoljno u značajnijoj inhibiciji rasta plijesni. Kao i u prethodnom slučaju, u 20. ili 22. danu kolonija dosiže rub zdjelice.

Veće razlike u učinku Na-benzoata se mogu primijetiti u rastu vrste *P. expansum* (**Slika 17**). Iz priloženih rezultata, jasno je vidljivo kako se kontrolni uzorak (podloga čiji je pH prilagođen na 4,4 bez dodatka konzervansa) plijesni umnožava gotovo konstantnom brzinom, dok primijenjene koncentracije (i to sve podjednako) uzrokuju zaostajanje u rastu. U usporedbi s prethodnom vrstom, *P. expansum* sporije raste (iako mu ime sugerira brz rast). Pri nižoj pH



vrijednosti (4,16), također se može uočiti razlika u rastu kolonija koje su izložene Na-benzoatu, u usporedbi s kontrolnim uzorkom (**Slika 18**) no, ove razlike postaju sve manje nakon 18. dana inkubacije te se rast kolonija gotovo izjednačava s kontrolnim uzorkom. Izraženije razlike u rastu *P. expansum* se mogu uočiti iz rezultata djelovanja K-sorbata pri pH 4,4 i 4,16 (**Slike 19 i 20**). Slično kao i prethodnom slučaju s vrstom *P. aurantiogriseum*, srednja i viša primijenjena koncentracija (100 i 200 ppm) uzrokuju pojavu *lag* faze rasta koja traje 2 dana, no poslije toga, kolonija uspješno raste, ali nešto manjom brzinom, u usporedbi s kontrolnim uzorkom i uzorkom tretiranim s 50 ppm K-sorbata (**Slika 19**). Niža pH vrijednost, a radi se o samo 0,24 jedinice, izraženo djeluje na rast kolonije, kako kontrolnog, tako i uzoraka tretiranih K-sorbatom (**Slika 20**). Primijećen je sporiji rast svih uzoraka i promjer kolonija je manji za gotovo 20 mm, iako se u 24. danu gubi inhibitorni učinak konzervansa. No, bez obzira na ovaj podatak, niže koncentracije K-sorbata, zajedno s nižom pH vrijednosti, mogle bi se upotrijebiti u konzerviranju proizvoda koji, nužno, ne moraju biti dugo vremena na policama.

Slični rezultati, kao i kod vrste *P. expansum*, mogu se uočiti i kod *P. italicum*. Na-benzoat (**Slika 21**) pri najvišoj primijenjenoj koncentraciji od 200 ppm uzrokuje pojavu *lag* faze rasta u trajanju od 1 do 2 dana, a vidljiv je i učinak ostalih koncentracija na nižu linearnu brzinu rasta kolonije plijesni. U ovisnosti o primijenjenoj koncentraciji, kolonija doseže rub zdjelice u 14. ili 16. danu inkubacije. Brži rast pri nižoj pH (4,16) se može uočiti iz rezultata prikazanih **Slikom 22** gdje je kontrolni uzorak dosegao rub već u 12. danu inkubacije. U usporedbi s prethodnim rezultatom, još je izrazitiji učinak najveće koncentracije od 200 ppm. 50 i 100 ppm se gotovo uopće ne razlikuju u inhibiciji rasta, osim u 14. danu, no već u 16. danu kolonija poraste do najvećeg promjera od 90 mm.

Najizrazitiji učinak konzervansa na rast *P. italicum* se može uočiti iz rezultata prikazanih **Slikama 23 i 24** gdje se jasno može uočiti povećana inhibicija rasta kolonija primjenom većih koncentracija K-sorbata. Također je moguće uočiti *lag* fazu rasta u trajanju od 2 dana, nakon čega kolonije rastu, ali sporije u usporedbi s kontrolnim uzorkom (**Slika 23**). Dok kontrolni uzorak poraste do 90 mm za 12 dana, kolonija *P. italicum* treba dodatnih 16 dana rasta do najvećeg promjera. Snižavanje pH na 4,16 (**Slika 24**) uzrokuje nešto veću brzinu rasta kontrolnog uzorka, ali i smanjenu brzinu rasta kolonije porasle na agaru s 50 ppm K-sorbata,

u usporedbi s uzorkom rasta pri pH 4,4. Najveća koncentracija K-sorbata (200 ppm) uzrokuje gotovo istovjetnu inhibiciju rasta pri ovoj, kao i pri višoj pH vrijednosti.

Iz dobivenih rezultata, moguće je uočiti različito ponašanje odabranih vrsta plijesni prema konzervansima K-sorbatu i Na-benzoatu što ukazuje na potrebu ispitivanja različitih vrsta plijesni, tj. najčešćih uzročnika kvarenja proizvoda na spojeve koje se koriste u zaštiti istih jer se poznavanjem njihova odgovora mogu primjenjivati i niže koncentracije spojeva, što potrošači sve više i očekuju.

Nadalje, rezultati ovog istraživanja su dobiveni u uvjetima koji najviše odgovaraju porastu plijesni, tj. pri temperaturi od 25°C, kako bi se mogao najlakše uočiti utjecaj konzervansa i pH vrijednosti. Svakako bi se, snižavanjem temperature, rast plijesni mogao još i više usporiti te bi dobiveni proizvod zadovoljio očekivanja potrošača, kao i sigurnosne kriterije.



## **6. ZAKLJUČCI**

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

1. Minimalna fungicidna koncentracija (MFK) Na-benzoata za najosjetljiviju vrstu roda *Penicillium* (*P. expansum*) pri pH 4,4 je 400 ppm; za *P. aurantiogriseum* 800 ppm, a *P. italicum* > 800 ppm. Snižavanjem pH na 4,16 MFK za *P. expansum* je 400 ppm, a 400 ppm za *P. aurantiogriseum* i *P. italicum*.
2. Minimalna fungicidna koncentracija (MFK) K-sorbata za najosjetljiviju vrstu roda *Penicillium* (*P. expansum*) pri pH 4,4 je 400 ppm; za *P. aurantiogriseum* 800 ppm, a *P. italicum* > 800 ppm. Snižavanje pH vrijednosti s 4,4 na 4,16 pojačava fungicidni učinak K-sorbata za *P. aurantiogriseum*, ali ne i za *P. expansum* i *P. italicum*.
3. Osim koncentracije Na-benzoata od 200 ppm koja inhibira *P. aurantiogriseum* pri pH 4,6 primjena Na-benzoata nema značajniji učinak u inhibiciji rasta kolonije pri obje pH vrijednosti.
4. Veće koncentracije Na-benzoata i K-sorbata snažnije inhibitorno djeluju na *P. aurantiogriseum* pri obje pH vrijednosti, posebno pri 4,16.
5. Veće koncentracije Na-benzoata i K-sorbata snažnije inhibitorno djeluju na *P. expansum* pri obje pH vrijednosti, posebno pri 4,16.
6. Veće koncentracije Na-benzoata i K-sorbata snažnije inhibitorno djeluju na *P. italicum* pri obje pH vrijednosti, posebno pri 4,16.
7. Niža pH vrijednost i primjenjeni konzervansi (posebno K-sorbat) snažnije inhibiraju rast istraženih vrsta plijesni roda *Penicillium*.

## **7. LITERATURA**

---

- Adams RM, Moss OM: *Food microbiology*. Royal Society of Chemistry, Cambridge UK, 2008.
- Ahvenainen R: New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruit and vegetables. *Trends in Food Science & Technology* 7:179–187, 1996.
- Barth M, Hankinson TR, Zhuang H, Breidt F: Microbiological spoilage of fruits and vegetables. U *Compendium of methods for microbiological spoilage of foods and beverages*. Springer Science, LLC, New York, 2009.
- Bibek R, Arun B: *Fundamental food microbiology*. CRC Press Taylor & Frands Group, Boca Raton, 2008.
- Bruna JM, Hierro EM, de la Hoz L, Mottram DS, Fernández M, Ordonez JA: The contribution of *Penicillium aurantiogriseum* to the volatile composition and sensory quality of dry fermented sausages. *Meat Science* 59:97–107, 2001.
- D'Aquino S, Fadda A, Barberis A, Palma A, Angioni A, Schirra M: Combined effects of potassium sorbate, hot water and thiabendazole against green mould of citrus fruit and residue levels. *Food Chemistry* 141:858–864, 2013.
- Desrosier NW: *The Technology of Food Preservation*. The Avi publishing Company, INC., Westport, Conncticut, 1963.
- Duraković S, Duraković L: *Mikrobiologija namirnica osnove i dostignuća : knjiga treća*. Kugler, Zagreb, 2001.
- Duraković S: *Opća mikrobiologija*. Prehrambeno tehnološki fakultet, Zagreb, 1996.
- Filténborg O, Frisvad JC, Thrane U: Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology* 33:85-102, 1996.
- Jay JM, Loessner MJ, Golden DA: *Modern food microbiology*. Springer Science + Business Media Inc., New York, 2005.
- Frazier WC : *Food microbiology*. McGraw—Hill Book Company INC., New York, 1958.
- Frisvad CJ, Samson AR: *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites. U *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.
- Gorny J: Microbial contamination of fresh fruits and vegetables. U *Microbiology of fruits and vegetables*. CRC Press, Boca Raton, 2006.
- Heard GM: Microbiology of fresh-cut produce. U *Fresh-cut Fruits and Vegetables, Science, Technology, and Market*. Lamikanra Olusola, CRC Press, Boca Raton, 2002.
- Hurst WC: Safety aspects of fresh-cut fruits and vegetables. U *Fresh-cut Fruits and Vegetables, Science, Technology, and Market*. Lamikanra Olusola, CRC Press, Boca Raton, 2002.

- Idared jabuka*. Voćarstvo Šarčević, 2012. <http://www.vocarstvo-sarcevic.com/proizvodi.php> [12.8.2014.]
- Jay JM: Antimicrobial food preservatives. U *Handbook of biocide and preservative use*. Blackie Academic and Professional, Glasgow, 1995.
- 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.
- Montesinos-Herrero C, del Río MA, Pastor C, Brunetti O, Palou L: Evaluation of brief potassium sorbate dips to control postharvest *Penicillium* decay on major citrus species and cultivars. *Postharvest Biology and Technology* 52:117–125, 2009.
- Müller G: *Grundlagen der Lebensmittelmikrobiologie*. Veb fachbuchverlag, Leipzig, 1975.
- Pitt JI, Hocking DA: *Fungi and food spoilage*. Springer, New York, 2009.
- Pitt JI: *Penicillium*. U *Encyclopedia of food microbiology*. Academic press, California, 2000.
- Solvia-Fortuny RC, Oms-Oliu G, Martín-Belloso O: Effects of ripeness stages on the storage atmosphere, color, and textural properties of minimally processed apple slices. *Journal of Food Science* 67:1958–1963, 2002.
- Stratford M, Nebe-von-Caron G, Steels H, Novodvorska M, Ueckert J, Archer BD: Weak-acid preservatives: pH and proton movements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology* 161:164–171, 2013.
- Suhr KI, Nielsen PV: Effect of weak acid preservatives on growth of bakery product spoilage fungi at different water activities and pH values. *International Journal of Food Microbiology* 95:67–78, 2004.
- Surekha M, Reddy SM: Preservatives/Classification and Properties. U *Encyclopedia of food microbiology*. Academic press, San Diego, 2000.
- Thompson AK: *Fruit and vegetables harvesting, handling and storage*. Blackwell Publishing, Oxford 2003.
- Volner Z: *Opća medicinska mikrobiologija s epidemiologijom i imunologijom*. Školska knjiga, Zagreb, 2000.