

# Utjecaj kalijevog sorbata, natamicina i timola na odabrane vrste plijesni roda *Penicillium*

---

Putnik, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:109:630758>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#) / [Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-30**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

**Matea Putnik**

**UTJECAJ KALIJEVOG SORBATA, NATAMICINA I TIMOLA  
NA ODABRANE VRSTE PLIJESNI RODA *Penicillium***

**DIPLOMSKI RAD**

Osijek, rujan, 2024

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Sveučilišni diplomski studij Prehrambeno inženjerstvo

Zavod za ispitivanje hrane i prehrane  
Katedra za mikrobiologiju  
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Tema rada** je prihvaćena na X. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 17. srpnja, 2023.  
**Mentor:** prof. dr. sc. Hrvoje Pavlović  
**Pomoć pri izradi:**

**Utjecaj kalijevog sorbata, natamicina i timola na odabrane vrste plijesni roda *Penicillium***  
Matea Putnik, 0113145334

### Sažetak:

Cilj rada bio je istražiti učinak kalijevog sorbata, natamicina i timola na odabrane vrste plijesni roda *Penicillium*: *P. camemberti*, *P. nalgiovense* i *P. roqueforti*. Konzervansima je određena minimalna inhibitorna (MIK) i fungicidna koncentracija (MFK) te inhibicija linearnog rasta kolonija plijesni na krumpirovom glukoznom agaru (PDA) i *in situ* uvjetima na ploškama sira Gouda. Od istraživanih plijesni, najotpornija vrsta je *P. roqueforti*, potom *P. nalgiovense*, a najmanje otporna (tj. inhibirana najnižim koncentracijama spojeva) je *P. camemberti*. S najnižim koncentracijama prema odabranim vrstama plijesni, natamicin je najučinkovitiji antifungalni spoj, a slijede ga timol i K-sorbat pri inhibiciji linearnog rasta kolonija plijesni na PDA i na ploškama sira Gouda.

**Ključne riječi:** *Penicillium*, natamicin, K-sorbat, timol, inhibicija

**Rad sadrži:** 40 stranica  
20 slika  
2 tablica  
0 priloga  
34 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

### Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

1. prof. dr. sc. Nela Nedić Tiban	predsjednik
2. prof. dr. sc. Hrvoje Pavlović	član-mentor
3. izv. prof. dr. sc. Mirela Lučan Čolić	član
4. prof. dr. sc. Lidija Jakobek Barron	zamjena člana

**Datum obrane:** 24. rujna 2024.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku, pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek  
Faculty of Food Technology Osijek  
University Graduate Study Food Engineering  
Department of food analysis and nutrition research  
Subdepartment of Microbiology  
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. X held on July 17, 2023.

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

**Technical assistance:**

### Effect of Potassium Sorbate, Natamycin and Thymol on Selected Species of *Penicillium*

Matea Putnik, 0113145334

#### Summary: (up to 200 words)

The aim of the work was to investigate the effect of potassium sorbate, natamycin and thymol on selected species of molds of the genus *Penicillium*: *P. camemberti*, *P. nalgiovense* and *P. roqueforti*. The minimum inhibitory (MIC) and fungicidal concentration (MFK) and the inhibition of the linear growth of mold colonies on potato glucose agar (PDA) and in situ conditions on Gouda cheese slices were determined by preservatives. Of the investigated molds, the most resistant species was *P. roqueforti*, followed by *P. nalgiovense*, and the least resistant (i.e. inhibited by the lowest concentrations of compounds) was *P. camemberti*. With the lowest concentrations according to the selected mold species, natamycin was the most effective antifungal compound, followed by thymol and K-sorbate in inhibiting the linear growth of mold colonies on PDA and on Gouda cheese slices.

**Keywords:** *Penicillium*, natamycin, potassium sorbate, thymol, inhibition

**Thesis contains:** 40 pages  
20 figures  
2 tables  
0 supplements  
34 references

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

- |   |              |
|---|--------------|
| 1. Nela Nedić Tiban, PhD, prof.             | chair person |
| 2. Hrvoje Pavlović, PhD, prof.              | supervisor   |
| 3. Mirela Lučan Čolić, PhD, associate prof. | member       |
| 4. Lidija Jakobek Barron, PhD, prof.        | stand-in     |

**Defense date:** September 24, 2024.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

**DIPLOMSKI RAD JAVNO JE OBRANJEN DANA**

24. rujna 2024. god.

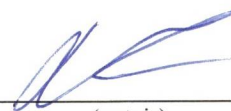
**TE OCIJENJEN USPJEHOM**

izvstan (5)

**Pred Povjerenstvom za obranu diplomskog rada:**

1. **prof. dr. sc. Nela Nedić Tiban**

predsjednik



(potpis)

2. **prof. dr. sc. Hrvoje Pavlović**

član



(potpis)

3. **izv. prof. dr. sc. Mirela Lučan Čolić**

član



(potpis)

Zahvaljujem prvenstveno svom mentoru, prof. dr. sc. Hrvoju Pavloviću, na neizmjernoj podršci, stručnom vodstvu i strpljenju tijekom cijelog procesa izrade ovog diplomskog rada.

Također, želim zahvaliti i ostalim profesorima i zaposlenicima Fakulteta na njihovom trudu i znanju koje su nesebično dijelili te na svim resursima i podršci koju su mi pružili tijekom studija.

Zahvaljujem svojim roditeljima, kao i sestri Teni i bratu Zvonku na podršci i razumijevanju, te Aniti, Ivani, Klari, Moreni i Jacu na njihovoj stalnoj motivaciji i ohrabrenju koji su mi bili od velike važnosti.

## Sadržaj

1.	UVOD.....	1
2.	TEORIJSKI DIO .....	3
2.1.	Plijesni.....	4
2.1.1.	<i>Penicillium camemberti</i> .....	5
2.1.2.	<i>Penicillium nalgiovense</i> .....	7
2.1.3.	<i>Penicillium roqueforti</i> .....	8
2.2.	Konzervansi.....	11
2.2.1.	Kalijev sorbat .....	13
2.2.2.	Natamicin .....	15
2.2.3.	Eterična ulja i njihovi sastojci .....	16
2.2.4.	Timol.....	18
3.	EKSPERIMENTALNI DIO.....	20
3.1.	Zadatak .....	21
3.2.	Materijal i metode .....	21
3.2.1.	Nacjepeljivanje kultura plijesni i priprema suspenzija spora.....	21
3.2.1.	Određivanje minimalne inhibitorne (MIK) i fungicidne (MFK) koncentracije .....	22
3.2.2.	Određivanje inhibicije linearnog rasta kolonija plijesni.....	22
3.2.3.	Određivanje aktivnosti konzervanasa u <i>in situ</i> uvjetima.....	22
3.2.4.	Obrada rezultata .....	23
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	24
4.1.	Minimalna inhibitorna i fungicidna koncentracija odabranih spojeva prema <i>Penicillium camemberti</i> , <i>P. nalgiovense</i> i <i>P. roqueforti</i> .....	25
4.2.	Inhibicija linearnog rasta kolonije <i>Penicillium camemberti</i> na PDA agaru i <i>in situ</i> na ploškama sira <i>Gouda</i> .....	25
4.3.	Inhibicija linearnog rasta kolonije <i>Penicillium nalgiovense</i> na PDA agaru i <i>in situ</i> na ploškama sira <i>Gouda</i> .....	28
4.4.	Inhibicija linearnog rasta kolonije <i>Penicillium roqueforti</i> na PDA agaru i <i>in situ</i> na ploškama sira <i>Gouda</i> .....	31
5.	ZAKLJUČCI .....	34
6.	LITERATURA .....	36

### **Popis oznaka, kratica i simbola**

CYA	Czapek Yeast Autolysate agar, Czapekov kvaščev agar
MEA	malt extract agar, agar s ekstraktom slada



## **1. UVOD**

Mikrobiološka kvaliteta hrane vrlo je značajna kako bi se sačuvalo zdravlje potrošača. Prisustvo mikroorganizama i njihov nesmetan rast u hrani dovodi do prijenosa patogenih organizama na potrošače, bolesti, gubitka nutrijenata u hrani i kvarenja. Kvarenje hrane moguće je spriječiti korištenjem fizikalnih metoda kao što su zagrijavanje, dehidratacija, korištenje visokoga tlaka te korištenjem konzervanasa (Davidson i sur., 2020).

Proizvodnja sira drevni je proces koji je omogućio duže skladištenje mlijeka, jednostavniji transport, olakšao probavu mlijeka i uveo raznolikost u prehranu ljudi. Jedan od načina proizvodnje sira je korištenjem plijesni (Gillot i sur., 2015). Plijesni su prisutne u vodi, zraku, zemlji, mogu kontaminirati mlijeko i mliječne proizvode te mogu sudjelovati u procesima fermentacije, kvarenja i proizvoditi nepoželjne mikotoksine (Sørhaug 2011). Plijesni se mogu koristiti i za dozrijevanje sira, njihovi enzimi uzrokuju hidrolizu velikih organskih molekula (masti i proteina) čime dolazi do stvaranja arome, okusa, plinova, meke i mazive konzistencije sira (Erkmen i Bozoglu, 2016).

Konzervansi su prirodne ili sintetičke tvari koje se dodaju u hranu, kozmetiku i farmaceutske preparate kako bi se produljila trajnost i održala kvaliteta i sigurnost proizvoda. U prirodne konzervanse uključujemo sol, šećer, ocat, određene začine, med i eterična ulja, dok su sintetički odnosno kemijski konzervansi, primjerice, benzoat, sorbat, nitriti, nitrati i dr. (Kumari i sur., 2019).

Cilj rada bio je istražiti učinak kalijevo sorbata, natamicina i timola na tri odabrane vrste plijesni roda *Penicillium* – *P. camemberti*, *P. nalgiovense* i *P. roqueforti*.

Odabranim vrstama plijesni roda *Penicillium* određena je minimalna inhibitorna i fungicidna koncentracija istraživanih spojeva. Iz dobivenih podataka odabrane koncentracije konzervanasa su primijenjene u inhibiciji rasta kolonija plijesni na krumpirovom-glukoznom agaru. Nadalje, istražen je učinak odabranih inhibitornih spojeva i u *in situ* uvjetima, tj. ploškama sira Gouda.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. PLIJESNI

Plijesni su eukariotski, višestanični mikroorganizmi koji rastu u nitastim strukturama - hifama. Stanice plijesni veće su od prokariotskih stanica, imaju čvrsti stanični zid. Citoplazma stanice je u tekućem stanju i sadrži organele kao što su mitohondriji, endoplazmatski retikulum, vakuole i druge, dok se u plazmi membrane nalaze steroli. Stanični zid sastoji se od celuloze ili hitina (Erkmen i Bozoglu, 2016). Nitasta struktura plijesni formira zapetljanu masu koja se brzo širi, masa plijesni naziva se micelij a sastoji se od niti koje nazivamo hife (Jay i sur., 2005). Hife mogu biti vegetativne i reproduktivne. Plijesni se hrane na način da vegetativne hife, koje su uronjene u organsku tvar, izlučuju enzime koji razgrađuju hranu na jednostavnije nutrijente koje plijesni mogu apsorbirati. Osim nutrijenata hife mogu apsorbirati i vodu (Erkmen i Bozoglu, 2016). Plijesni se mogu razlikovati i klasificirati prema načinu na koji su građene hife, tako postoje septirane i neseptirane hife. Kod septiranih plijesni postoje pregrade (septe) koje hifu dijele na više segmenata. Svaki segment sadrži jednu ili više jezgri. Ovisno jesu li jezgre genetski jednake ili različite razlikujemo homokaritoske ili heterokariotske micelije. Heterokariotski miceliji posljedica su fuzije genetski različitih hifa. Kod neseptiranih hifa jezgre se nalaze u nepregrađenoj citoplazmi (Davidson i sur., 2020).

Plijesni su većinom striktni aerobi, za njihov rast potreban je kisik stoga je moguće zaustaviti njihov rast pakiranjem namirnica u vakuumu ili u hermetički zatvorenim posudama (iako neke plijesni mogu rasti i u uvjetima vrlo niske koncentracije kisika, npr. *Mucor*). Optimalna temperatura za rast plijesni je 15-20 °C, ali mogu rasti i pri nižim temperaturama. Optimalan pH za rast plijesni iznosi 4,0 – 6,8. Aktivitet vode ( $a_w$ ) je mjera slobodne vode dostupne za rast mikroorganizama. Raspon aktiviteta vode je od 1 (čista voda) do 0 (proizvod bez dostupne vode). Što je aktivitet vode niži to je manje vode dostupno za mikroorganizme. Otopljene tvari u vodi snižavaju aktivitet vode te se tako usporava rast. Plijesni mogu rasti i pri vrlo niskom aktivitetu vode 0,70 – 0,80 (Oyarzabal i Backert, 2012).

Plijesni su visokospecijalizirani organizmi koji mogu rasti samo u određenim uvjetima stoga postoje određene tehnike i hranjive podloge koje su pogodne za izolaciju, uzgoj i identifikaciju. Izolacija plijesni provodi se tako što se procijeni koji dio hife ili spore je potrebno prenijeti na svježnu hranjivu podlogu. Čistoća uzorka procjenjuje se nakon inkubacije kada se vidi uniformnost novonastale kolonije (Pitt i Hocking, 2022).

Patogene plijesni uzrokuju bolesti (infekcije) ili intoksikacije jer kao sekundarne metabolite proizvode tvari koje su toksične za ljude i životinje, a nazivaju se mikotoksini. Konzumacijom

hrane koja sadrži mikotoksine može doći do bolesti koja se nazivaju mikotoksikoze. Plijesni koje stvaraju mikotoksine pripadaju ovim rodovima: *Aspergillus*, *Alternaria*, *Claviceps*, *Fusarium*, *Penicillium* i dr. Nije moguće prepoznati plijesan koja proizvodi mikotoksine s obzirom na morfološka obilježja već je potrebno provesti inkubaciju u pogodnim uvjetima te zatim testirati materijale na prisutnost mikotoksina (Erkmen i Bozoglu, 2016).

Kontaminacija i kvarenje sireva uzrokovano plijesnima ovisi o čistoći pogona prilikom proizvodnje i sazrijevanja sira, duljini trajanja procesa sazrijevanja, uvjetima tijekom skladištenja kao što su temperatura i vlažnost, o aktivitetu vode i sastavu proizvoda (Sørhaug 2011). Prilikom proizvodnje hrane u prehrambenoj industriji koriste se razni mikroorganizmi, najčešće su to kvasci i bakterije dok je korištenje plijesni manje istraženo zbog kompliciranijeg uzgoja, sporijeg rasta te zato što proizvode velike količine spora (Poirier i sur., 2022). Na površinu hrane nanosi se starter kultura plijesni određene koncentracije spora. Odabir koncentracije spora ovisiti će o okolnim uvjetima kao što su temperatura, aktivitet vode, pH, količini natrijeva klorida i drugih inhibitora. Klijanje spora plijesni potrebno je ubrzati kako bi se osigurao rast željene kulture plijesni nad patogenim vrstama ili drugim mikroorganizmima koji bi uzrokovali kvarenje hrane (Kalai i sur., 2017).

U Europi samo su neke vrste plijesni dozvoljene za uporabu pri proizvodnji fermentirane hrane, većina dozvoljenih vrsta pripadaju rodu *Penicillium*. Tako se za proizvodnju bijelih sireva (Camembert i Brié) koristi *Penicillium camemberti*, dok se za proizvodnju plavih sireva (Roquefort, Gorgonzola, Stilton, Gammelost) koristi plijesan *Penicillium roqueforti* (Kalai i sur., 2017). Nalžovy sir, porijeklom iz Češke, proizvodi se pomoću plijesni roda *P. nalgiovense* koja se koristi kao sekundarni mikroorganizam (Mrázek i sur., 2016).

### **2.1.1. *Penicillium camemberti***

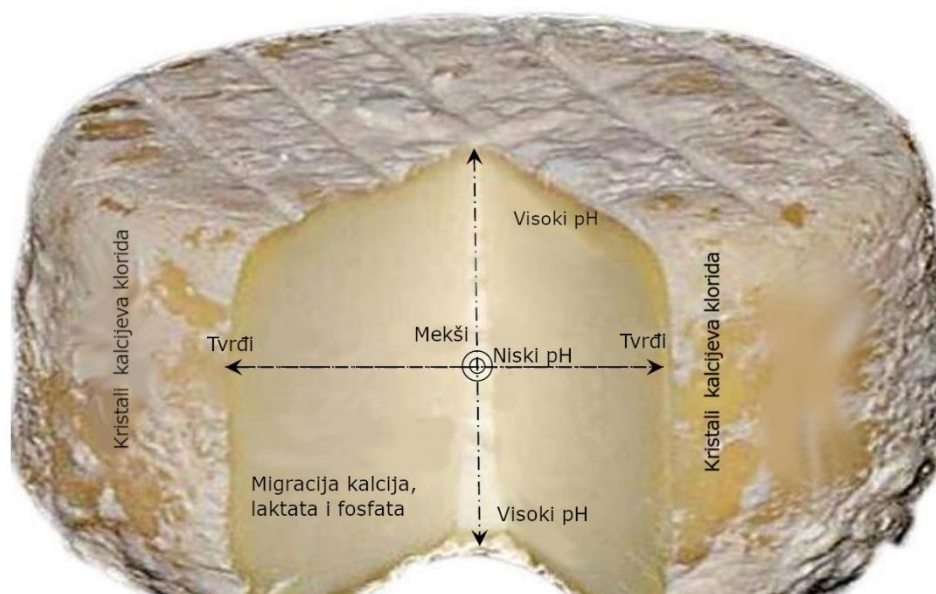
Sir Camembert vrsta je mekoga sira porijeklom iz Francuske. Proces sazrijevanja sireva vrste Camembert i Brié uključuje plijesan *Penicillium camemberti* na površini ovih vrsta sira. Miceliji *P. camemberti* zaslužni su za reološka i senzorska svojstva sira (Bizet i sur., 1997). Proizvodnjom enzima lipaze, proteinaze i peptidaze, *P. camemberti* razgrađuje masne kiseline, proteine, peptide i aminokiseline. Lipolitičke i proteolitičke aktivnosti enzima doprinose organoleptičkim svojstvima sira jer nastaju hlapljivi aromatski spojevi kao što su metil, ketoni, laktoni, alkohol, aldehidi i amini (Valle i sur., 2023). *P. camemberti* lako je prepoznatljiv po bijelim, baršunastim kolonijama, raste pri nižim temperaturama, na sintetičkim hranjivim

podlogama ova plijesan proizvodi mikotoksin, ciklopiazoničku kiselinu, koji je toksičan. Toksičnost ovog mikotoksina nije potvrđena kod ljudi te se ustanovilo da ne nastaje prilikom proizvodnje sira. **Slika 1** prikazuje izgled kolonija *P. camemberti* na dvije vrste agara, CYA (Czapek Yeast Extract Agar) i MEA (Malt Extract Agar) (Pitt i Hocking, 2022).



**Slika 1** Izgled kolonija plijesni *P. camemberti* na CYA i MEA agaru (Pitt i Hocking, 2022)

Sirevi Brié i Camembert proizvode se od pasteriziranog mlijeka kojemu se dodaju starter kulture bakterija mliječne kiseline (*Lactococcus spp.*) koje stvaraju mliječnu kiselinu. Sekundarni mikroorganizmi, uključujući *P. camemberti*, razgrađuju mliječnu kiselinu na ugljikov dioksid i vodu čime doprinose izgledu, boji, teksturi, aromi i antimikrobnoj aktivnosti sira. Sir na svojoj površini ima viši pH (oko 7,5) dok je u centru sira pH niži (4,7). Zbog povećanja pH i zbog migracije kalcija i fosfata prema površini dolazi do mekšanja unutrašnjosti samoga sira. **Slika 2** prikazuje gradijent pH unutar sira kao i promjenu teksture sira (McSweeney i McNamara, 2022).



**Slika 2** Gradijent pH, promjene u teksturi i migracije unutar sira Camembert (McSweeney i McNamara, 2022)

### 2.1.2. *Penicillium nalgiovense*

Plijesan *Penicillium nalgiovense* koristi se tijekom procesa dozrijevanja sira tipa Nalžovy. Prilikom proizvodnje izvornog sira ovoga tipa plijesan je prirodno kontaminirala sir, odnosno sir se nalazio u podrumu za sazrijevanje visoke relativne vlažnosti i niske temperature koja je odgovarala rastu raznih vrsta plijesni. Kako se kvaliteta sira proizvedenog na ovaj način smanjivala tako je i zaustavljena proizvodnja. Plijesan *P. nalgiovense* sada se većinom koristi u proizvodnji fermentiranih mesnih proizvoda (Mrázek i sur., 2016).

Prilikom proizvodnje mesnih proizvoda i sireva plijesan *P. nalgiovense* daje ugodnu aromu, ne proizvodi mikotoksine, može rasti u uvjetima s velikom koncentracijom soli (6-8% natrijeva klorida), pri temperaturi između 5°C i 32°C i pri pH 3,5-8. Kolonije *P. nalgiovense* u prirodi imaju zelene konidije dok su kolonije koje imaju bijeli micelij i bijele konidije mutanti. Na mesnim proizvodima i sirevima može doći do kontaminacije i s bijelim i zelenim tipom *P. nalgiovense* (Batt i Tortorello, 2014).



**Slika 3** Izgled kolonija plijesni *P. nalgiovense* na CYA i MEA agaru (Pitt i Hocking, 2022)

Prije se smatralo kako je *P. nalgiovense* nastao domestikacijom *Penicillium chrysogenum*, ali se uspostavilo kako se radi o različitim vrstama koje su u srodstvu. **Slika 3** prikazuje izgled kolonija plijesni *P. nalgiovense* na CYA i MEA agaru, prepoznatljive značajke su umjeren rast, sporulacija bijele i zelene boje, na MEA agaru kolonija je s donje strane narančasta. *P. nalgiovense* koristi se kao starter kultura u proizvodnji fermentiranih mesnih proizvoda i sira u Europi, dok se u prirodi rijetko mogu pronaći i na orasima (Pitt i Hocking, 2022).

*P. nalgiovense* ne proizvodi niti jedan od poznatih mikotoksina ali proizvodi penicilin koji nije poželjan u hrani jer može dovesti do alergijskih reakcija ili do otpornosti kod bakterija u ljudskom organizmu. *P. nalgiovense* na površini mesnih proizvoda razvija svoje bijele micelije koje pomažu pri stvaranju okusa i sprječavaju rast drugih plijesni koje bi mogle stvarati mikotoksine. *P. nalgiovense* je vrlo raširena vrsta koja se prirodno nalazi na siru, ali se više ne koristi kao starter kultura u njegovoj proizvodnji. Postoji sve više interesa za razvoj metoda proizvodnje sira pomoću *P. nalgiovense* kao starter kulture (Moavro i sur., 2019).

### 2.1.3. *Penicillium roqueforti*

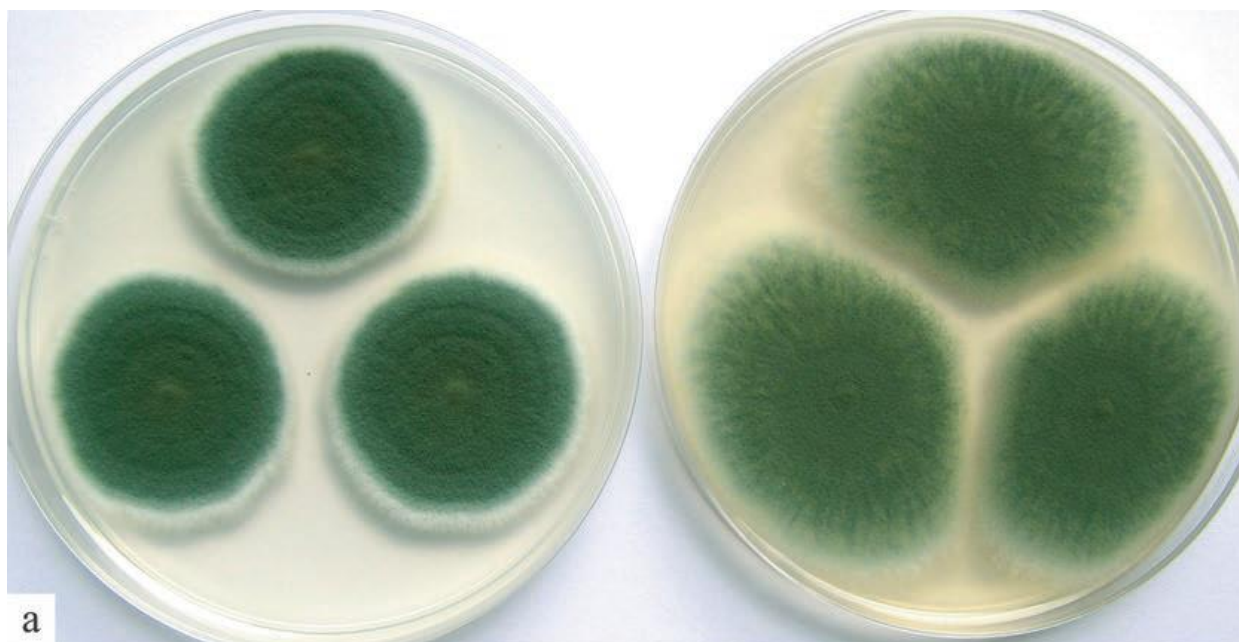
*Penicillium roqueforti* koristi se kao starter kultura prilikom proizvodnje sireva prošaranih plavom plemenitom plijesni, tim sirevima daje boju i specifičan okus. *P. roqueforti* također je i prirodno prisutan u različitim vrstama hrane (Gillot i sur., 2015). Zbog svoje sposobnosti rasta



pri niskim temperaturama česti je uzrok kvarenja kod namirnica koje se skladište pri niskim temperaturama (Pitt i Hocking, 2022).

Kod komercijalne proizvodnje plavih sireva koristi se pasterizirano homogenizirano mlijeko sa sadržajem mliječne masti od 3,5%. Mlijeku se dodaju starter kulture bakterija mliječne kiseline koje razgrađuju laktozu iz mlijeka u mliječnu kiselinu i tako snižavaju pH, nakon toga dodaje se sirilo koje uzrokuje zgrušnjavanje kazeina i stvaranje skute. Skuti se dodaju određeni sojevi *P. roqueforti* i sol. Proces odležavanja sira traje 70 – 100 dana pri temperaturi od 8°C i relativnoj vlažnosti od 95%, ovaj proces zahtjeva velike prostorije za dozrijevanje s konstantnim održavanjem temperature i vlažnosti (Kinsella i sur., 1976). *P. roqueforti* koristi se za proizvodnju Stilton, Gorgonzola, Danablu i Roquefort vrsta sireva. Jedino se sir koji je proizveden od ovčjeg mlijeka u Francuskoj može nazivati Roquefort (Batt i Tortorello, 2014).

*P. roqueforti* proizvodi dvije vrste izvanstaničnih lipaza i jednu unutarstaničnu lipazu koje sudjeluju u hidrolizi lipida u slobodne masne kiseline koje daju aromu siru i pomoću kojih nastaju drugi aromatski sastojci kao što su metil-ketoni. Proteolitička aktivnost *P. roqueforti* potječe od proteinaza koje sudjeluju u hidrolizi kazeina i čime se otpuštaju peptidi i aminokiseline. Zahvaljujući lipolitičkim i proteolitičkim enzimima u siru nastaje širok raspon aromatskih tvari. Proteolitička i lipolitička aktivnost znatno se razlikuje ovisno o soju plijesni koja se koristi (Gillot i sur., 2017). Zbog svoje tolerancije na produkte razgradnje bakterija mliječne kiseline kao što su mliječna kiselina, octena kiselina i ugljikov dioksid, *P. roqueforti* može rasti u unutrašnjosti sira i njegove hife joj daju karakterističan izgled – sir je prošaran plavom plijesni (Batt i Tortorello, 2014). **Slika 4** prikazuje izgled kolonija plijesni *P. roqueforti* na CYA i MEA agaru, prepoznatljive značajke su svilenkasta i ravna površina s brazdama, micelij je neprimjetan i bijel, proizvodnja konidija je umjerena, zelene je boje (Pitt i Hocking, 2022).



**Slika 4** Izgled kolonija plijesni *P. roqueforti* na CYA i MEA agaru (Pitt i Hocking, 2022)

*P. roqueforti* proizvodi toksične spojeve kao što su roquefortin, PR toksin i festuklavin. Roquefortin je neurotoksin koji može uzrokovati jake grčeve, oštećenja na jetri i krvarenje u probavnom traktu kod miševa. PR toksin neutraliziraju ostali sastojci sira i njegova toksičnost je niska. Neki sojevi *P. roqueforti* proizvode patulin, citrinin, penicilnu kiselinu i mikofenolnu kiselinu. Opasnost *P. roqueforti* na ljudsko zdravlje je minimalna ili ne postoji i do tog zaključka je moguće doći jer se sir prošaran plavom plijesni konzumira već stoljećima bez očitih štetnih učinaka (Batt i Tortorello, 2014).

## 2.2. KONZERVANSI

Konzerviranje je proces produljenja trajnosti proizvoda i očuvanja kvalitete proizvoda kako bi bio spreman za daljnje korištenje. Konzerviranjem se nastoji odgoditi ili u potpunosti spriječiti rast mikroorganizama. Procesi konzervacije uključuju fizikalne, kemijske, enzimske, a ponekad i mikrobiološke reakcije. **Tablica 1** prikazuje različite procese koji se koriste u svrhu konzerviranja proizvoda (Russell i Gould, 2003).

**Tablica 1** Načini konzerviranja proizvoda i kako djeluju (Russell i Gould, 2003)

PROCES	FAKTOR KOJIM SE UTJEČE NA RAST
<b>Hlađenje</b>	Smanjenje temperature kako bi se usporio rast mikroorganizama
<b>Smrzavanje</b>	Smanjenje temperature i smanjenje aktivnosti vode kako bi se usporio rast mikroorganizama
<b>Sušenje</b>	Smanjenje aktivnosti vode kako bi se usporio ili spriječio rast mikroorganizama
<b>Vakuumiranje i pakiranje u uvjetima bez kisika</b>	Inhibicija rasta striktno aerobni mikroorganizama i usporavanje rasta fakultativnim aerobima
<b>Pakiranje u modificiranoj atmosferi</b>	Ugljikov dioksid i drugi plinovi inhibiraju rast mikroorganizama
<b>Dodatak kiselina</b>	Smanjenje pH
<b>Mliječna i octena fermentacija</b>	Smanjenje pH zbog aktivnosti mikroorganizama
<b>Alkoholna fermentacija</b>	Povećana je koncentracija etanola
<b>Dodatak konzervanasa</b>	Inhibicija određene grupe mikroorganizama
<b>Pasterizacija i sterilizacija</b>	Zagrijavanje kako bi se inaktivirali mikroorganizmi
<b>Radijacija</b>	Korištenjem ionizirajuće radijacije kako bi se inaktivirali mikroorganizmi
<b>Aseptičko procesiranje</b>	Pakiranje u sterilnim uvjetima

Prema Pravilniku o prehranbenim aditivima (MZSS, 2010) prehranbeni aditiv je svaka tvar koja se sama po sebi ne konzumira kao hrana, niti je prepoznatljiv sastojak određene hrane bez obzira na hranjivu vrijednost, a čije je dodavanje hrani namjerno zbog tehnoloških razloga u proizvodnji, preradi, pripremi, obradi, pakiranju, prijevozu ili skladištenju i ima za posljedicu ili se može očekivati da će imati za posljedicu, da će aditiv ili njegov derivat postati izravno ili neizravno sastojak hrane. U istom pravilniku konzervansi su definirani kao tvari koje produljuju

trajnost hrane štiteći je od kvarenja uzrokovanog mikroorganizmima i/ili koji štite od razvoja patogenih mikroorganizama.

Konzervansi su stvari koje se dodaju hrani kako bi im se povećala trajnost, zadržao izgled, okus i struktura te kako ne bi došlo do smanjenja prehrambene vrijednosti. Konzervansi mogu biti prirodni ili sintetički, a u hranu se dodaju u manjim količinama tijekom procesa proizvodnje (Silva i Lidon, 2016). Prirodni konzervansi uglavnom su bolje prihvaćeni od strane potrošača. Životinje, biljke i mikroorganizmi sadrže razne spojeve koji imaju antimikrobna i antioksidativna svojstva (Msagati, 2012). Kod biljaka postoji varijacija u prinosu zbog nedostupnosti tijekom cijele godine, klimatskih varijacija i sortnih razlika. Mikroorganizmi su preferirani izvor prirodnih konzervanasa jer se mogu izolirati u kontroliranom okruženju i prinosi su veći (Meena i sur., 2021).

Prednosti konzervanasa su što nam osiguravaju sigurnost od mikroorganizama koji mogu smanjiti kvalitetu hrane i ugroziti naše zdravlje, osim toga mogu poboljšati nutritivna svojstva hrane, smanjiti štetnost određenih sastojaka i poboljšati teksturu, okus i izgled namirnice. Nedostaci dodavanja konzervanasa u hranu su mogući zdravstveni problemi, primjerice alergijske reakcije, astma, glavobolja ili osip. Kako bi se smanjio negativan utjecaj konzervanasa i drugih aditiva postavljene su granice unosa ispod kojih je dokazano da je tvar sigurna za konzumaciju, prepoznati su mehanizmi metabolizma i načini na koji tijelo apsorbira te stvari, te se provode studije o kancerogenosti i o dugotrajnim učincima na ljudsko zdravlje (Kumari i sur., 2019).

Preduvjet za učinkovitost konzervanasa je provedba dobre higijenske prakse u svakoj fazi proizvodnje, prerade i distribucije hrane. Unatoč optimalnim higijenskim uvjetima proizvodnje i skladištenja neki proizvodi ostaju osjetljivi na razvoj plijesni, u tim slučajevima rast plijesni sprječava se korištenjem antifungalnih sredstava. Prevencija rasta plijesni važna je u prilikom proizvodnje sira. Sir je dobra podloga za rast plijesni te ga uvjeti skladištenja i sazrijevanja čine još osjetljivijim. Relativna vlažnost zraka u siranama za dozrijevanje sireva tipa Gouda iznosi 80-85% (Russell i Gould, 2003).

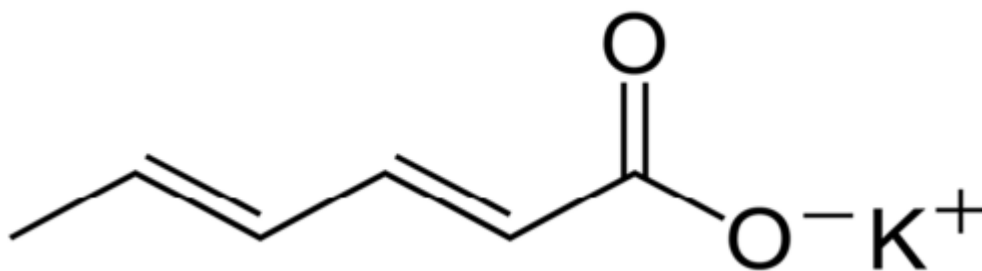
Plijesni kao sekundarne metabolite proizvode mikotoksine koji mogu ozbiljno narušiti zdravlje ljudi i životinja. Uklanjanje samo vidljivog dijela plijesni s površine hrane kao i korištenje antifungalnih konzervanasa za sprječavanje rasta plijesni i kvasaca ne garantira sigurnost jer toksini prelaze u unutrašnjost prehrambenih proizvoda. Prehrambena industrija sve se više

usmjerava prema korištenju prirodnih konzervanasa zbog veće sigurnosti i efikasnosti (Meena i sur., 2021).

### 2.2.1. Kalijev sorbat

Kalijev sorbat koristi se kao konzervans u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. U prehrambenoj industriji koristi se za zaštitu prerađene hrane kao što su voćni sokovi, gazirana pića. Kalijev sorbat inhibira rast plijesni, sprječava kvarenje i čuva svježinu proizvoda. Kalijev sorbat industrijski se proizvodi neutralizacijom sorbinske kiseline s kalijevim hidroksidom (Dehghan i sur., 2018).

Sorbinska kiselina je mononezasićena masna kiselina (2,4-heksadienolna kiselina). Sorbinska kiselina (E 200) i njezine soli kalijev sorbat (E 202) i kalcijev sorbat (E 203) koriste se kao konzervansi jer imaju inhibitorna svojstva te djeluju na plijesni uključujući i na producente mikotoksina (*Penicillium patulum*, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus flavus*) (Vulić i sur., 2023). Kalijev sorbat je sol sorbinske kiseline kemijske formule  $C_6H_7KO_2$  i bijela je, bezmirisna kristalna tvar molekularne mase od 150,22 g/mol i talištem od 270°C. Molekularna formula kalijeva sorbata prikazana je na **sluci 5**. Antimikrobni učinak kalijeva sorbat ovisi o stupnju disocijacije sorbinske kiseline i pH vrijednosti, pKa sorbata je 4,7 pri pH 4,4, u ovim uvjetima 70% kalijeva sorbata je neionizirano, dok je pri pH 7 samo 0,6% kalijeva sorbata neionizirano. Kalijev sorbat se lako otapa u vodi, kloroformu i kukuruznom ulju, slabo je topiv u etanolu i acetonu, dok je u benzenu netopljiv. Topljivost kalijeva sorbata u vodi ovisi o temperaturi vode. Porastom temperature vode povećava se i topljivost kalijeva sorbata. Osim temperature i pH na stabilnost kalijeva sorbata utječe i aktivnost vode, prisutni metali i drugi dodaci u hrani. Sorbat je relativno nestabilan tijekom skladištenja, tijekom skladištenja pri 30°C može doći do 35%-tne razgradnje nakon 3 mjeseca, dok u hrani s postotkom vlage manjim od 25% ostaje stabilan i nakon 40 dana pri temperaturi 35°C. U prisustvu karboksilnih skupina sorbat tvori konjugate preko dvostrukih veza; razgradnjom i polimerizacijom sorbata pomoću oksidacijskih sredstava nastaju peroksidi i razgradni proizvodi kao što su malondialdehid, krozon-aldehid i fumaraldehidna kiselina. Sorbati u prehrambenim proizvodima mogu reagirati i sa sekundarnim aminima, askorbinskom kiselinom i time dovesti do tamnjenja hrane (Dehghan i sur., 2018).



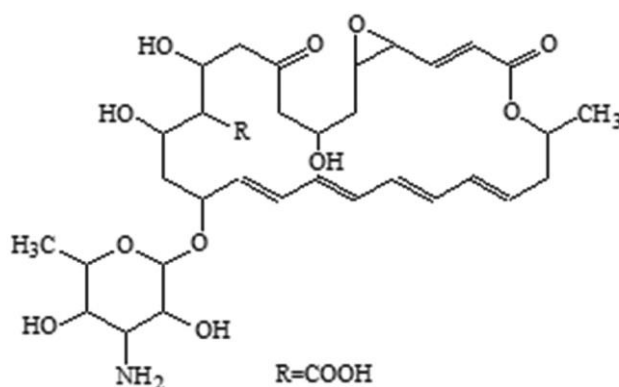
**Slika 5** Molekularna formula kalijeva sorbata (Dehghan i sur., 2018)

Sorbati se koriste kao konzervansi u različitim granama prehrambene industrije kao što su industrija mliječnih i slastičarskih proizvoda, dijetalnih napitaka, preljeva za salate, majoneze, površinsku obradu mesnih proizvoda, za konzerviranje suhog voća te u proizvodnji vina jer zaustavljaju fermentacijske procese izazvane aktivnošću kvasaca. Sorbati se vrlo često koriste u kombinaciji s drugim konzervansima. Sorbinska kiselina i njezine soli imaju neutralan okus i miris što je važna karakteristika jer njihov dodatak u prehrambene proizvode ne utječe na senzorska svojstva proizvoda (Vulić i sur., 2023).

### 2.2.2. Natamicin

Natamicin je prirodni antimikrobni peptid kojeg proizvode sojevi bakterija roda *Streptomyces natalensis*. Koristi se u prevenciji rasta plijesni na prehrambenim proizvodima kao što su jogurt, kobasice, vino i sokovi (Meena i sur., 2021). Natamicin se koristi već desetljećima za usporavanje rasta plijesni na površini sireva i kobasica, poznat je po svojoj učinkovitosti na raznim vrstama plijesni kao i po sigurnošću korištenja. Natamicin se veže na ergosterol čime ometa membranski prijenos tvari i uzrokuje prestanak aktivnog rasta plijesni. Natamicin, također, inhibira transport aminokiselina i šećera u stanicu na reverzibilan način (Streekstra i sur., 2016).

Natamicin je bijeli ili kremasto bijeli prah s molekularnom masom od 665,75 g/mol. Empirijska formula je  $C_{33}H_{47}NO_{13}$ . Strukturna formula natamicina prikazana je na **Slici 6**. Natamicin je slabo topljiv u vodi ali je topiv u organskim otapalima. Stabilnost natamicina ovisi o korištenom otapalu, temperaturi, tlaku, pH, svjetlosti, prisutnosti oksidanasa i teških metala. Natamicin ostaje na površini prehrambenih proizvoda zbog svoje slabe topljivosti u vodi te ne migrira u unutrašnjost hrane. Povećanjem temperature povećava se i topljivost natamicina u organskim otapalima. Natamicin ostaje stabilan nekoliko sati pri temperaturi zagrijavanja od 100°C, te postaje neaktivan tek na 121°C tijekom 30 minuta. Pri niskim pH vrijednostima dolazi do hidrolize glikozidne veze natamicina te se stvara mikosamin, dok pri visokim pH vrijednostima dolazi do saponifikacije laktonskog prstena te nastaje natamikoinska kiselina. Izlaganje UV svjetlu tijekom 99 minuta i fluorescentnom svjetlu tijekom 10 dana može rezultirati uništenjem ili inaktivacijom natamicina. Natamicin je također osjetljiv na gama zračenje (Meena i sur., 2021).



**Slika 6** Strukturna formula natamicina (Silva i Lidon 2016)

Natamicin je najčešće preferiran u odnosu na druge konzervanse jer nema mirisa ni boje. Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA), Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) i Uprava za hranu i lijekove (FDA) prepoznale su natamicin kao sigurnim prirodnim konzervansom. Natamicin je, također, certificiran za sigurnu uporabu za liječenje gljivičnih infekcija kod ljudi. Natamicin nije učinkovit protiv bakterija i virusa (Meena i sur. 2021).

Natamicin je prikladan za prevenciju rasta plijesni na površini proizvoda. Zbog niske topljivosti uglavnom je prisutan u obliku kristala, rastopljeni dio natamicina teško prodire u sir. Prednost u odnosu na druge konzervanse poput sorbata je upravo u tome što natamicin ostaje na površini proizvoda. Kristalni oblik natamicina je vrlo stabilan te jamči produljeno djelovanje, ali samo otopljeni dio natamicina ima antifungalnu aktivnost.

Antifungalna aktivnost natamicina posljedica je vezanja natamicina na glavne sterole staničnih membrana plijesni, ergosterole. Natamicin se sastoji od laktonskog prstena i lipofilnog lanca koji sadrži konjugirane dvostruke veze i hidrofilni dio s nekoliko hidroksilnih skupina. Hidrofobni dio natamicina veže se za ergosterol u membrani stanice plijesni i formira polarni kanal koji omogućava prolaz manjim ionima kao što su  $K^+$ ,  $H^+$ , aminokiselina i drugim metabolitima čime dolazi do narušavanja ionskog sastava membrane što može dovesti do smrti stanice. Stanice bakterija nemaju sterole te su prirodno otporne na natamicin. Membrane životinjskih stanica imaju kolesterol kao glavni sterol membrane, ali natamicin posjeduje manju specifičnost za kolesterol nego za ergosterol. Ljudska gastrointestinalna flora može biti izložena ostacima natamicina, međutim kako je intestinalna mikroflora pretežno sastavljena od bakterijskih vrsta, a plijesni se nalaze u vrlo malim količinama u crijevnom traktu posljedica izloženosti tragovima unesenog natamicina mogu se smatrati minimalnim (Brik, 1981).

### **2.2.3. Eterična ulja i njihovi sastojci**

Hrana koja sadrži prirodne antioksidanse i konzervanse za produljenje trajnosti i poboljšanje oksidacijske stabilnosti postaje sve veći trend u prehrambenoj industriji. Prirodni antioksidansi i antimikrobni spojevi prisutni su u začinima, bilju, povrću, voću, sjemenkama, uljima, korama i dr. Eterična ulja sadrže komponente koje pokazuju jaka antioksidativna, antimikrobna i insekticidna svojstva. Eterična ulja se također mogu dodati u pakiranja hrane za stvaranje aktivnog sustava pakiranja koji s vremenom oslobađa spojeve u hranu (Sen, 2022). Pakiranje prehrambenih proizvoda ključan je element lanca distribucije hrane. Ambalaža štiti proizvod



tijekom cijelog životnog ciklusa, aktivno antimikrobno pakiranje jedna je od tehnika za smanjenje rasta mikroba i gljivica u prehrambenim proizvodima (Sivaram i sur., 2022).

Eterična ulja su sekundarni metaboliti koje sintetiziraju aromatične i ljekovite biljke. Eterična ulja su hlapljiva, obično tekuća i bezbojna pri sobnoj temperaturi. Slabo su topljiva u vodi, ali su vrlo topljiva u alkoholu, organskim otapalima i nehlapivim uljima. Eterična ulja imaju promjenjiv indeks loma svjetlosti, vrlo visoku optičku aktivnost, specifičan okus i karakterističan miris. Eterična ulja obavljaju mnoge važne funkcije za biljke kao što su privlačenje korisnih insekata i oprašivača, zaštita biljaka od vrućine, hladnoće, štetnika i mikroorganizama. Dokazano je kako bioaktivna eterična ulja posjeduju antimikrobna, antifungalna, antioksidativna, antivirusna, antiparazitska i insekticidna svojstva (Falleh i sur., 2020). Većina eteričnih ulja ne uspijeva iskoristiti svoj puni potencijal u konzerviranju prehrambenih sustava zbog slabe topljivosti u vodi, niže bioraspoloživosti, hlapljivosti i stabilnosti. Ograničenja u korištenju eteričnih ulja mogu se riješiti mikro/nanoenkapsulacijom s otpuštanjem eteričnih ulja u pravom trenutku i na pravom mjestu te se tako zadržava njihova biološka aktivnost, povećava iskorištenje, minimizira negativni učinak mirisa i smanjuje hlapljivost (Al-Maqtari i sur., 2022).

Destilacija vodenom parom najčešće je korištena metoda za komercijalnu proizvodnju eteričnih ulja. Ekstrakcija pomoću tekućeg ugljičnog dioksida pri niskoj temperaturi i visokom tlaku daje prirodniji organoleptički profil eteričnog ulja, ali je skuplja. Razlika u organoleptičkom profilu daje različit sastav ulju što može utjecati na antimikrobna svojstva. Eterična ulja su hlapljiva i stoga ih je potrebno čuvati u hermetički zatvorenim posudama na tamnom mjestu kako bi se spriječile promjene u sastavu. Detaljna analiza sastava eteričnih ulja postiže se plinskom kromatografijom i masenom spektrometrijom. Eterična ulja mogu sadržavati više od 60 pojedinačnih komponenti. Glavne komponente čine do 85% eteričnog ulja, dok su ostale komponente prisutne samo u tragovima (Burt, 2004).

Eterična ulja su složene smjese različitih sekundarnih metabolita, kao što su terpenoidi, terpeni, fenilpropeni, ketoni, fenoli, aldehidi, esteri, kiseline, alkoholi i eteri, koji pokazuju antioksidativne i antimikrobne aktivnosti. Dobivaju se iz različitih dijelova biljke poput listova (metvica, origano, timijan, kadulja i eukaliptus), cvjetova (jasmin, ruža, ljubičica i lavanda), pupoljaka (klinčić), kore ploda (citrusi), sjemenki (kardamom), plodova (naranča i limun), kore (cimet) (Al-Maqtari i sur., 2022).

Većina eteričnih ulja proučavanih zbog svoje antimikrobne aktivnosti dolazi iz biljaka ili začina koji se koriste kao hrana. Lipofilna i hidrofилna priroda eteričnih ulja omogućava im prolaz kroz stanične membrane jer utječu na konformaciju polisaharida, masnih kiselina i fosfolipida te mogu imati interakcije s membranskim proteinima čime mogu dovesti do curenja staničnog sadržaja te uzrokovati oštećenje i smrt stanice. **Slika 7** prikazuje različite načine na koje eterična ulja utječu na mikroorganizme. Aktivni spojevi koji su prisutni u eteričnim uljima uglavnom pripadaju terpenima (monoterpeni, diterpeni i seskviterpeni) i terpenoidima (monoterpenoidi), iako mogu biti i aldehidi, fenoli i derivati. Terpeni su ugljikovodici formirani od povezanih izoprenskih jedinica. Najaktivnijim monoterpenima smatraju se timol i karvakrol, oni su najhlapljiviji su sastojci origana, timijana i vrijeska. Terpenoidi su aktivni spojevi sa značajnim antimikrobnim djelovanjem, derivati su terpena. Primjeri terpenoida prisutnih u eteričnim uljima su linalool, linalil acetat, citronelal, piperiton, mentol i geraniol (Davidson i sur., 2020).



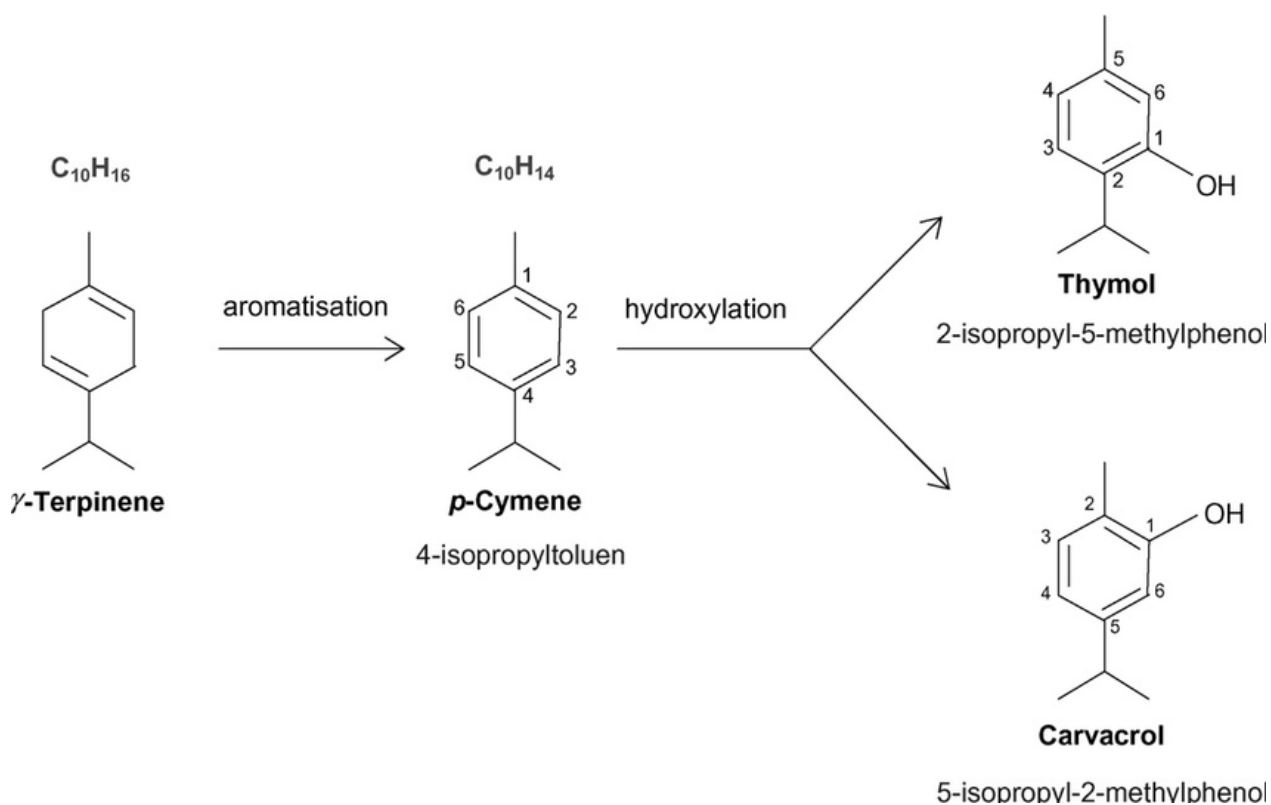
**Slika 7** Mehanizam djelovanja eteričnih ulja na mikroorganizme (Bhavaniramy i sur., 2019)

#### 2.2.4. Timol

Timol je glavni hlapljivi spoj u eteričnim uljima dobivenim iz biljaka koje pripadaju obitelji *Lamiaceae*. Općenito je prepoznat kao siguran od strane Europske unije i Američke agencije za hranu i lijekove. Timol ima sposobnost narušavanja lipidnog dvosloja stanične membrane čime može doći do povećanja propusnosti membrane. Dokazano je kako timol posjeduje antimikrobno djelovanje protiv velikog broja mikroorganizama, uključujući bakterije, plijesni i kvasce. Timol se koristi za očuvanje hrane i kontrolu propadanja svježih proizvoda nakon berbe. Rukovanje s timolom otežano je jer je vrlo hlapljiv i lako oksidira pri izlaganju zraku ili ultraljubičastom svjetlu. Kako bi se poboljšala stabilnost timola i postiglo njegovo postupno

otpuštanje koriste se nosači poput filmova prilikom pakiranja prehrambenih proizvoda (Zhang i sur., 2019).

Timol je prisutan u biljkama iz roda *Thymus*, *Monarda* i *Origanum*, među ostalim biljkama iz obitelji *Lamiaceae*. *Thymus vulgaris* (timijan) najčešći je izvor timola te sadrži između 10 i 64% ovog spoja. Timol se u tradicionalnoj medicini koristi za liječenje probavnih smetnji, bolova u želucu, proljeva i groznice. Biosinteza i skladištenje timola rezultat su prisutnosti različitih struktura u biljnim organima, poput žljezdanih trihoma za proizvodnju spojeva te šupljina i kanala za njihovo prenošenje. Iz prekursora timola i karvakrola ( $\gamma$ -terpinena i  $p$ -cimena) se pomoću  $\gamma$ -terpinen sintaze proizvodi monoterpen timol i karvakrol. Proces biosinteze timola prikazan je na **slici 8**. U industrijskoj proizvodnji eteričnog ulja koriste se hidrodestilacija, destilacija parom i ekstrakcija superkričnim fluidom. Eterično ulje ekstrahirano hidrodestilacijom iz nadzemnih dijelova timijana sadrži 18 komponenti, pri čemu timol čini 79,1% ulja. Timol pokazuje antifungalne učinke na plijesni koje uzrokuju propadanje hrane. Timol inhibira rast micelija što je povezano sa smanjenom proizvodnjom aflatoksina (Sivaram i sur., 2022).



**Slika 8** Biosinteza timola (Soleimani i sur., 2022)

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK

Zadatak rada bio je istražiti antifungalni učinak konzervanasa: natamicina, K-sorbata i timola na tri odabrane vrste plijesni: *Penicillium camemberti*, *P. nalgiovense* i *P. roqueforti*. Pri tome, zadatak je bio odrediti minimalnu inhibitornu (MIK) i fungicidnu (MFK) koncentraciju. Cilj rada bio je i ispitati inhibiciju linearnog rasta kolonija plijesni na agarnim pločama pri različitim koncentracijama i *in situ* utjecaj konzervanasa na plijesni nacijepljene ne ploške sira Gouda.

### 3.2. MATERIJAL I METODE

Kulture plijesni korištene u ovom rada se nalaze u kolekciji kultura mikroorganizama Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Katedre za biologiju i mikrobiologiju. Kulture *Penicillium camemberti* i *P. roqueforti* s izolirane iz sireva s plemenitim plijesnima (Camembert i Roquefort) dok je vrsta *P. nalgiovense* porijeklom iz kolekcije kultura mikroorganizama Zavoda za biologiju, Fakultet Znanosti, Sveučilište Charles iz Praga, Republika Češka.

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

Konzervansi korišteni u istraživanju inhibicije rasta plijesni su: K-sorbat (Merck KgaA, Darmstadt, Njemačka), natamicin (Nataproq – 50 % natamicina i 50 % laktoze, Proquiga Biotech, Bergondo, Španjolska) i timol (99,5 %, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, SAD).

Radne otopine konzervanasa pripremljene su otapanjem kemijskih spojeva u dimetil sulfoksidu (DMSO, Carlo Erba Reagents, Milano, Italija s dodatkom 10 % Tween 80, Biolife, Monza, Italija). Pripremljene otopine su upotrijebljene neposredno nakon pripreve.

#### 3.2.1. Nacijepljivanje kultura plijesni i priprema suspenzija spora

Kulture plijesni su nacijepljene na kosi krumpirov-glukozni agar (PDA; Biolife, Monza, Italija) i inkubirane pri 25°C tijekom 7 dana. Suspenzija spora pripremljena je dodatkom otopine (0,15% agar s dodatkom 0,05 % Tween 80; Biolife, Monza, Italija) i povlačenjem mikrobiološke ušice po kosini PDA. Prebrojavanjem spora u Bürker – Türkovoj komorici pripremljena je suspenzija spora koncentracije  $1 \times 10^6$  spora/mL.

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

Minimalna inhibitorna (MIK) i fungicidna (MFK) koncentracije određena je macrobroth metodom u epruvetama (13×100 mm) uz krumpirov-glukozni bujon (PDB, Biolife, Monza, Italija). U epruvete s 1 mL sterilne podloge (PDB) dodani su konzervansi kako bi se postigle željene koncentracije (800, 400, 200, 100, 50...ppm) dok su dvije epruvete služile kako kontrola konzervansa (bez dodatka spora plijesni) i kontrola rasta (nacijejljena samo sa sporama plijesni, bez konzervanasa). Epruvete su, potom, nacijejljene sa 100 µL pripremljene suspenzije spora. Nakon inkubacije od 48 h pri 25°C, iz epruveta u kojima nije bilo porasta micelija (MIK) preneseno je po 100 µL uzgoja u epruvetu s 1 mL sterilnog PDB i inkubirano 48 h pri 25°C. Ukoliko i nakon inkubacije u epruveti nije uočen porast plijesni, pripadajuća koncentracije je minimalna antifungalna (MFK). Ukoliko je, nakon inkubacije, primijećen micelijski rast, pripadajuća koncentracija je minimalna inhibitorna (MIK). Sva istraživanja su provedena u dvije paralele.

### **3.2.2. Određivanje inhibicije linearnog rasta kolonija plijesni**

Iz prethodno dobivenih rezultata, odabrane su tri koncentracije konzervanasa i istražen je inhibitorni učinak na linearni rast kolonija plijesni na PDA. Nakon sterilizacije PDA (121°C/15 minuta) i hlađenja u vodenoj kupelji pri 50°C, u podlogu su dodani konzervansi u tri koncentracije. Pomoću sterilnih kiveta, u sterilnim uvjetima, preneseno je 20 mL pripremljene podloge u sterilne, prazne petrijeve zdjelice (promjer 90 mm) koje su ostavljene 24 h pri sobnoj temperaturi radi sušenja. Nakon sušenja, središte svake zdjelice je nacijejljeno s 2 µL suspenzije spora koncentracije  $1 \times 10^6$  spora/mL. Zdjelice su inkubirane pri 25°C i promjer porasle kolonije plijesni izmjeren pomoću digitalne pomične mjerke svakih 48 h tijekom 10 dana. Sva istraživanja su provedena u tri ponavljanja. Kao kontrole su korištene zdjelice s podlogom bez dodatka konzervanasa.

### **3.2.3. Određivanje aktivnosti konzervanasa u *in situ* uvjetima**

Određivanje aktivnosti konzervanasa u *in situ* uvjetima određeno je na ploškama sira Gouda (Dukat d.d., Zagreb, Hrvatska, min. 45 % mliječne masti u suhoj tvari). Nakon rezanja na ploške debljine 3 mm na sterilnoj mesoreznici u sterilnim uvjetima, iz ploški sira su, pomoću sterilne metalne šablone, izrezani krugovi promjera 41 mm. Izrezane ploške sira u, pojedinačno,

stavljene u petrijeve zdjelice, sterilnim kistom premazane s 50  $\mu\text{L}$  odabrane koncentracije konzervanasa (kontrolne su premazane otopinom za otapanje konzervanasa, ali bez istih) i, nakon 1 h pri 25°C, središte je nacičepjeno s diskom agara porasle kulture (nakon 5 dana pri 25°C na PDA) izrezanim sterilnim bušaćem čepova promjera 5 mm. Agarni disk je postavljen s porastom kulture prema gore. Promjer kolonija plijesni mjereno je pomoću digitalne pomične mjerke svakih 48 h pri 25°C tijekom 8 dana. Sva istraživanja su provedena u tri ponavljanja.

#### **3.2.4. Obrada rezultata**

Rezultati prikazani slikama su izrađeni u računalnom programu Excel 2016 (MS Office 2016, Microsoft Corporation, Redmond, SAD).

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**



#### 4.1. Minimalna inhibitorna i fungicidna koncentracija odabranih spojeva prema *Penicillium camemberti*, *P. nalgiovense* i *P. roqueforti*

**Tablica 2** Minimalna inhibitorna (MIK) i minimalna fungicidna (MFK) koncentracija timola, natamicina i K-sorbata prema odabranim vrstama plijesni roda *Penicillium*

Vrsta plijesni	Učinak	Timol	Natamicin	K-sorbat
<i>Penicillium camemberti</i>	MIK	50	50	200
	MFK	800	200	>800
<i>Penicillium nalgiovense</i>	MIK	100	50	800
	MFK	>800	100	>800
<i>Penicillium roqueforti</i>	MIK	200	50	200
	MFK	>800	400	>800

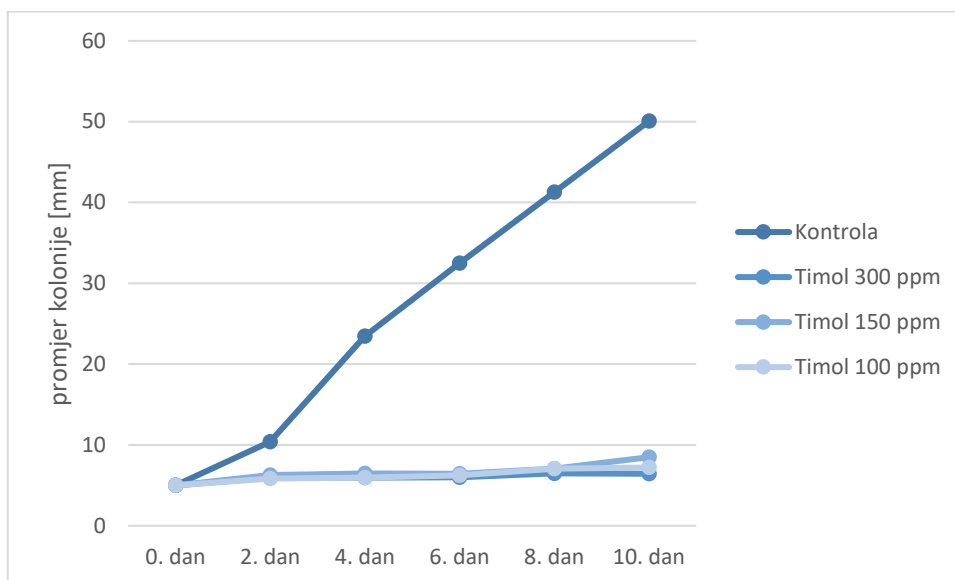
Napomena: prikazane vrijednosti izražene su u ppm

Inhibitorna i fungicidna koncentracija prema odabranim vrstama plijesni roda *Penicillium* može se očitati iz **Tablice 2** pri čemu se može uočiti velika razlika u učinkovitosti istraženih spojeva na odabrane vrste plijesni roda *Penicillium*. Najsnažniji učinak primjećuje se kod natamicina čije su inhibitorne i fungicidne koncentracije (gotovo) redovito najniže, za razliku od K-sorbata koji se pokazao najslabije učinkovitim prema odabranim vrstama plijesni. Plijesan koja se pokazala najotpornijom na sve istražene spojeve je vrsta *P. roqueforti* koja je i najčešći uzročnik kvarenja hlađenih proizvoda. Nakon *P. roqueforti* slijede *P. nalgiovense* i *P. camemberti* koji se pokazao kao najosjetljivijim na antifungalni učinak odabranih tvari.

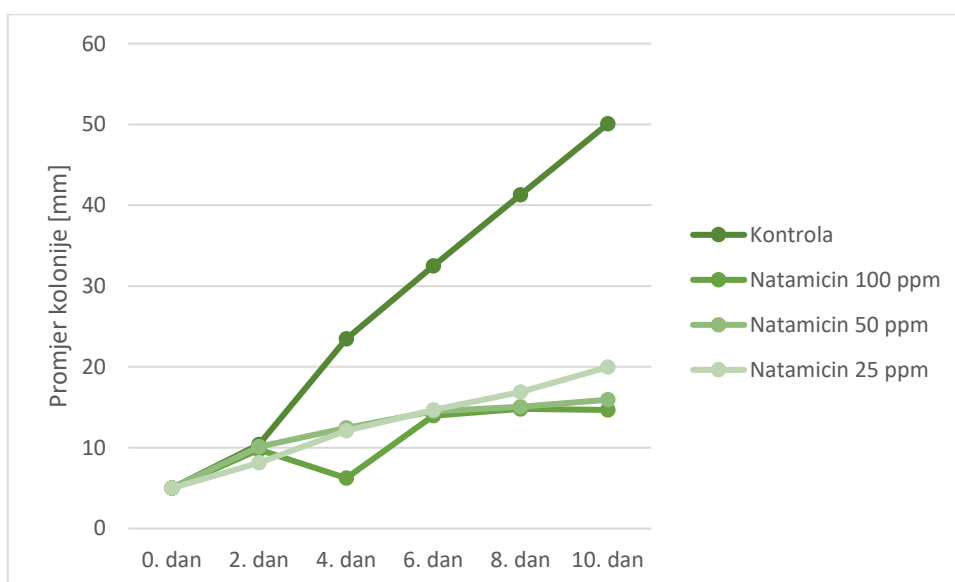
#### 4.2. Inhibicija linearnog rasta kolonije *Penicillium camemberti* na PDA agaru i *in situ* na ploškama sira *Gouda*

Inhibitorni učinak na linearni rast kolonija plijesni, istražen je na PDA agaru. U podlogu je, nakon sterilizacije i hlađenja, dodan konzervans u odgovarajućoj koncentraciji, a nakon izlijevanja 20 mL podloge i sušenja, središte je nacijeppljeno sa suspenzijom spora te inkubirano pri 25°C. Kao što je vidljivo iz **Slika 9-11**, na *P. camemberti* je najsnažnije inhibiran timolom

(Slika 9) gdje se inhibicija rasta kolonije zadržala sve do 10. dana inkubacije, uz slab porast pri nižim koncentracijama od 100 i 150 ppm u 10. danu.

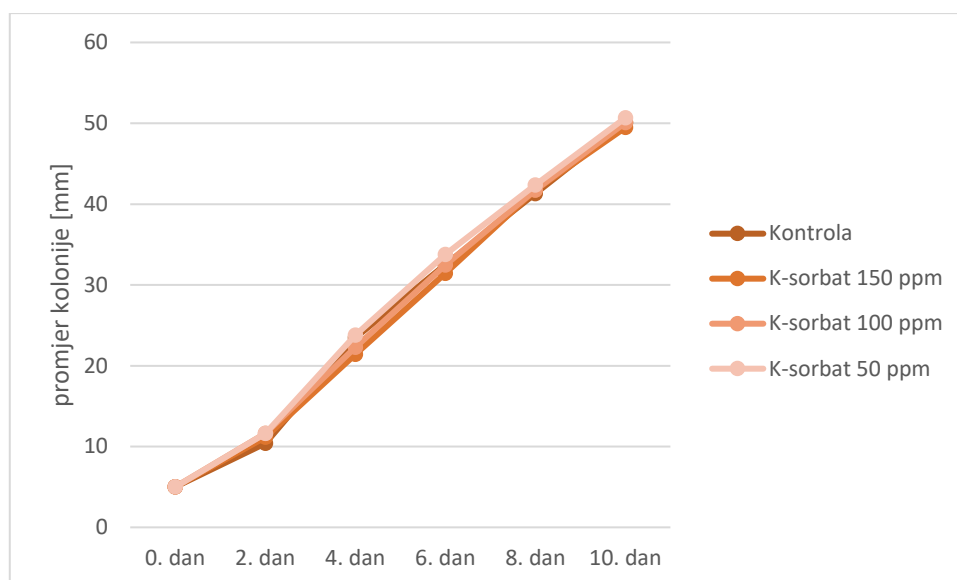


Slika 9 Inhibicija rasta *P. camemberti* timolom na PDA agaru



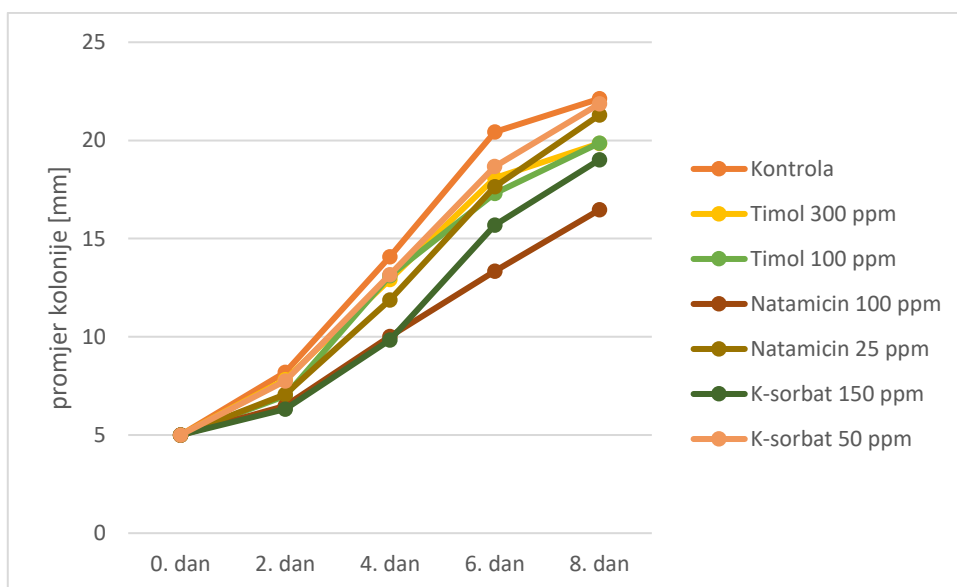
Slika 10 Inhibicija rasta *P. camemberti* natamicinom na PDA agaru

I natamicin (Slika 10) se pokazao učinkovitim inhibitorom na agaru jer je i pri najnižoj koncentraciji od 25 ppm promjer kolonije više od dva puta manji u usporedbi s kontrolom. Krivulja rasta je (uz manje odstupanje u 4. danu) gotovo jednaka za sve koncentracije natamicina, ali od 8. dana se može uočiti kako se pri najnižoj koncentraciji od 25 ppm inhibitorski učinak smanjuje.



**Slika 11** Inhibicija rasta *P. camemberti* K-sorbatom na PDA agaru

U usporedbi s timolom i natamicinom, najslabiji inhibitorski učinak, može se reći i njegov potpuni izostanak je primijećen djelovanjem K-sorbata u svim primijenjenim koncentracijama. Kolonija plijesni raste, uz malo smanjenje do 2. dana konstantnom brzinom, jednako kao i kontrolni uzorak.



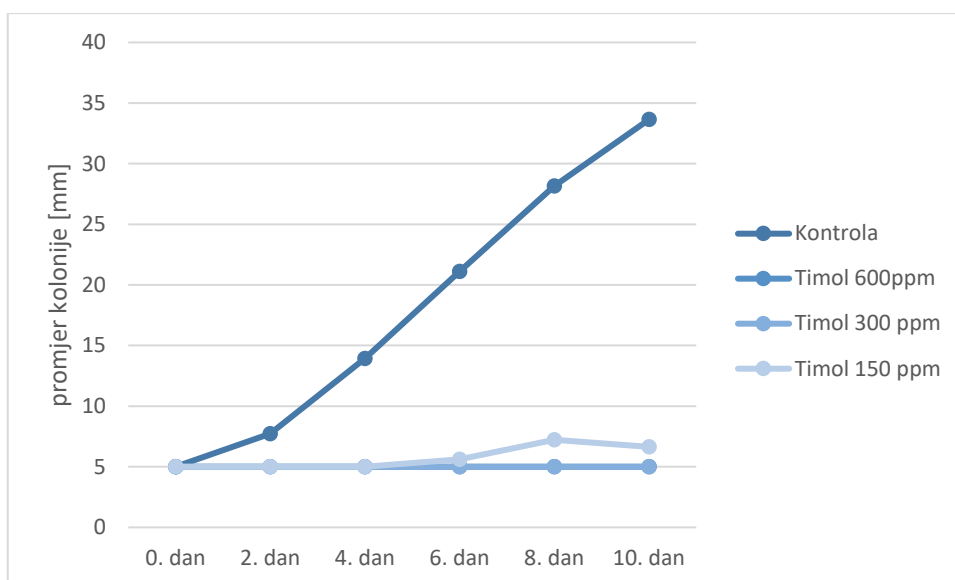
**Slika 12** Inhibicija rasta *P. camemberti* u *in situ* uvjetima, na ploškama sira Gouda

Za razliku od agarne podloge (PDA agar) koja sadrži više slobodne vode i ugljikohidrata za rast (glukoza i ugljikohidrati iz krumpira), na ploškama sira Gouda su drugačiji uvjeti rasta, koji su uvjetovali i smanjenu brzinu rasta kolonije. Uz nižu dostupnu vodu (niži aktivitet vode), nižu

pH vrijednost i značajno veću količinu soli, čak je i K-sorbat koji se nije pokazao učinkovitim na PDA agaru djelovao inhibitoryno (**Slika 12**), iako su obje primijenjene koncentracije djelovale gotovo jednako na odabranu vrstu. Timol se pokazao gotovo jednako učinkovitim u inhibiciji rasta (u obje koncentracije), kao i K-sorbat od 150 ppm što je bila najveća koncentracija u eksperimentu s PDA agarom gdje je inhibitoryni učinak potpuno izostao (**Slika 11**). U ovom eksperimentu, natamicin od 100 ppm se pokazao najsnažnijim inhibitorom te je kolonija *P. camemberti* gotovo 5 mm manja, u usporedbi s kontrolnim uzorkom. Sigurno je kako smanjen aktivitet vode, niska pH vrijednost i veća koncentracija NaCl djeluju sinergistički s konzervansima u inhibiciji plijesni, što i predstavlja jednu od važnih metoda u konzerviranju hrane – tehnologiju prepreka gdje skup više nepovoljnih uvjeta na nižoj razini/koncentraciji djeluje snažnije zajedno od jednog učinka pri višoj razini. Ipak, potrebno je napomenuti kako se način naciepljivanja agara i Goude razlikuje. Agar je naciepljen sa suspenzijom spora, dok su ploške Goude naciepljene agarnim diskom porasta plijesni. Različiti način naciepljivanja je odabran stoga što se mala kapljica suspenzije spora na siru ne može vidjeti i bilo bi vrlo teško uočiti i izmjeriti nježne stanice hifa plijesni. Agarni disk se sastoji od hranjive podloge koja omogućuje rast plijesni, dakle djelovanje konzervansa nije trenutno, kao u slučaju eksperimenta na agaru.

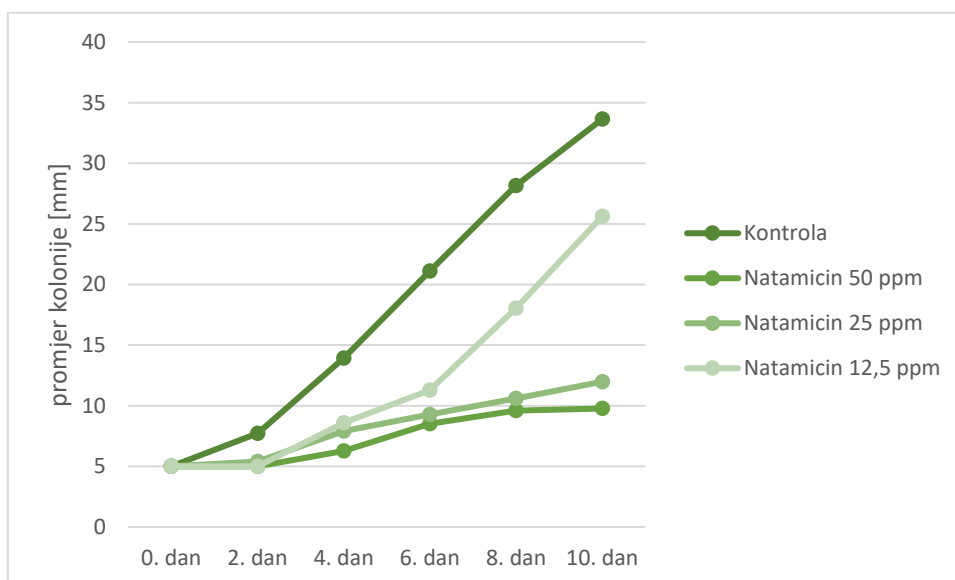
### **4.3. Inhibicija linearnog rasta kolonije *Penicillium nalgiovense* na PDA agaru i *in situ* na ploškama sira Gouda**

Slični inhibitoryni učinak prema *P. nalgiovense* se može uočiti na **Slici 13** gdje je timol uspješno inhibirao rast kolonije i pri 150 ppm, uz potpunu inhibiciju pri obje više koncentracije od 300 i 600 ppm.

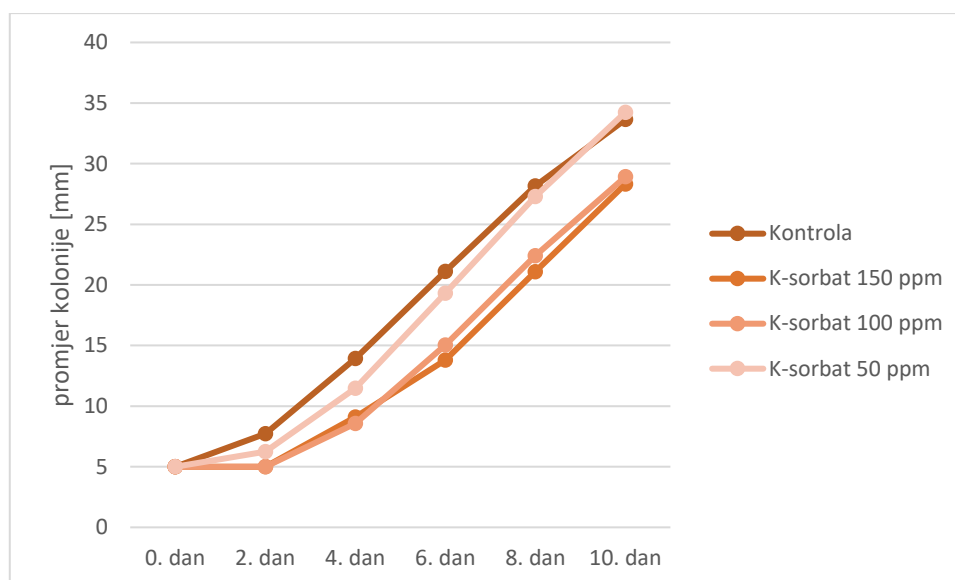


**Slika 13** Inhibicija rasta *P. nalgiovensis* timolom na PDA agaru

Natamicin (**Slika 14**) se pokazao djelotvornim prema istoj vrsti čak i pri najnižoj koncentraciji od 12,5 ppm, ali do 6. dana nakon kojeg počinje brzi rast. Najveća i srednja koncentracija (50 i 25 ppm) su, nakon *lag* faze rasta (faze prilagodbe kulture) inhibirale rast kolonije, ali u gotovo jednakom iznosu.

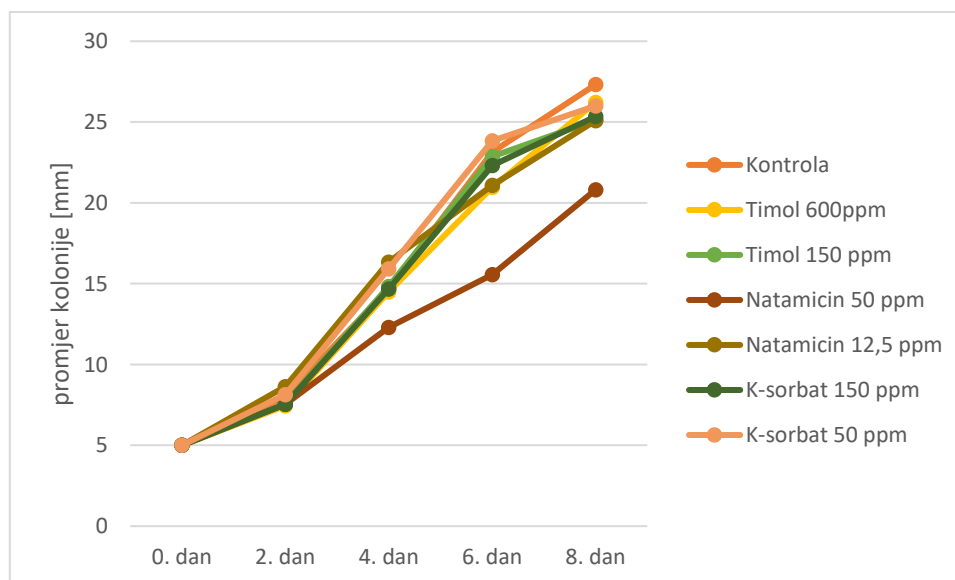


**Slika 14** Inhibicija rasta *P. nalgiovensis* natamicinom na PDA agaru



**Slika 15** Inhibicija rasta *P. nalgiovensis* K-sorbatom na PDA agaru

Najslabijim inhibitorom se pokazao K-sorbat (**Slika 15**) koji je zaustavio rast samo u do 2. dana inkubacije, nakon čega najniža koncentracija od 50 ppm gotovo da i nema inhibitorno djelovanje te u 10. danu doseže vrijednosti kontrole. Ipak, za razliku od *P. camemberti*, kod *P. nalgiovensis* je moguće uočiti inhibiciju veće i srednje koncentracije (150 i 100 ppm) koje, u gotovo jednakom iznosu djeluju na istraživanu vrstu plijesni.

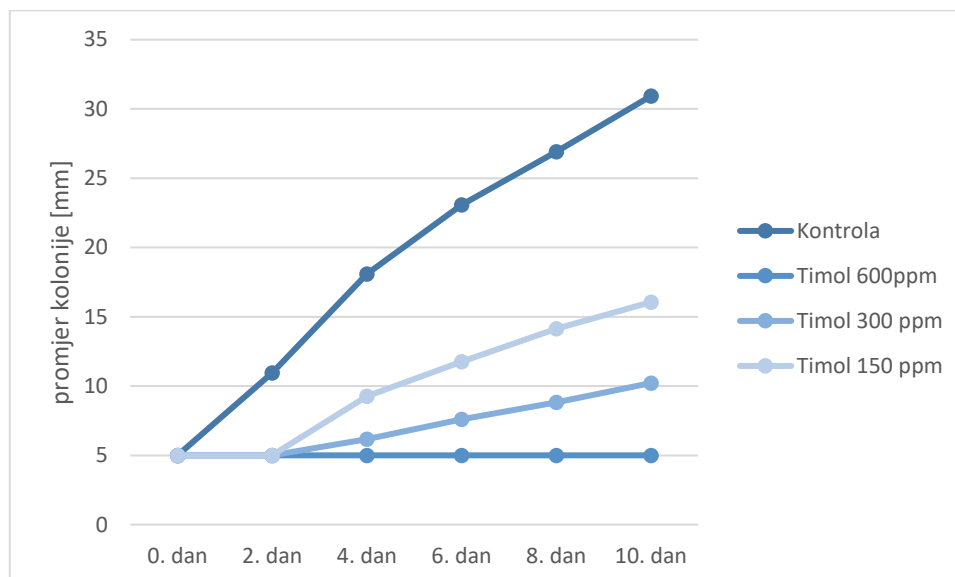


**Slika 16** Inhibicija rasta *P. nalgiovensis* u *in situ* uvjetima, na ploškama sira Gouda

Inhibicija rasta *P. nalgiovensis* na ploškama Goude prati sličan trend kao i kod *P. camemberti* (**Slika 12**), također je najveća koncentracija natamicina od 50 ppm i najviše inhibirala rast *P.*

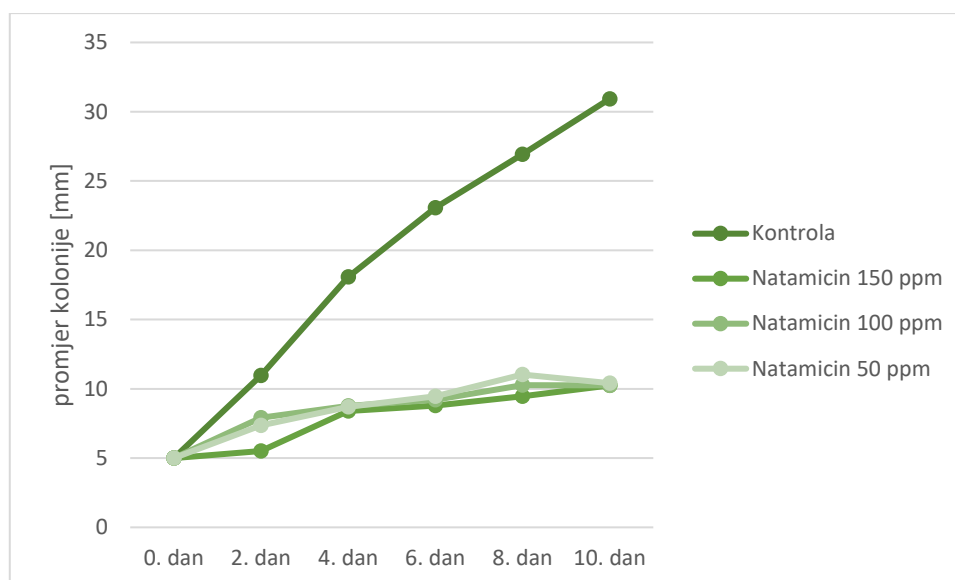
*nalgiovense* (promjer kolonije je manji za 5 mm). Ostali spojevi nisu bili dovoljno učinkoviti u inhibiciji, sa samo nekoliko mm zaostajanja plijesni u porastu.

#### 4.4. Inhibicija linearnog rasta kolonije *Penicillium roqueforti* na PDA agaru i *in situ* na ploškama sira Gouda



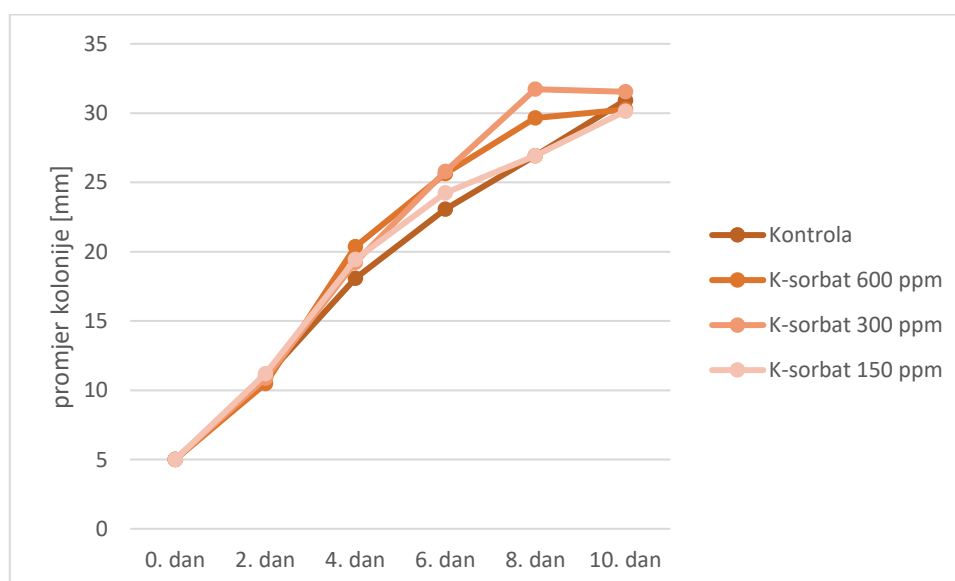
**Slika 17** Inhibicija rasta *P. roqueforti* timolom na PDA agaru

Najbolji učinak koncentracije konzervansa se može uočiti djelovanjem timola na *P. roqueforti* (Slika 17) gdje se može primijetiti kako je najveća koncentracija od 600 ppm u potpunosti inhibirala rast kolonije plijesni i u 10. danu inkubacije. Lag faza rasta za uzorke s 300 i 150 ppm traje 2 dana, nakon čeka započinje rast plijesni, no brzina rasta je sporija pri većoj koncentraciji timola (300 ppm). Koncentracija od 300 ppm je smanjila brzinu rasta tri puta, dok je pri 150 ppm brzina rasta smanjena za polovicu.



**Slika 18** Inhibicija rasta *P. roqueforti* natamicinom na PDA agaru

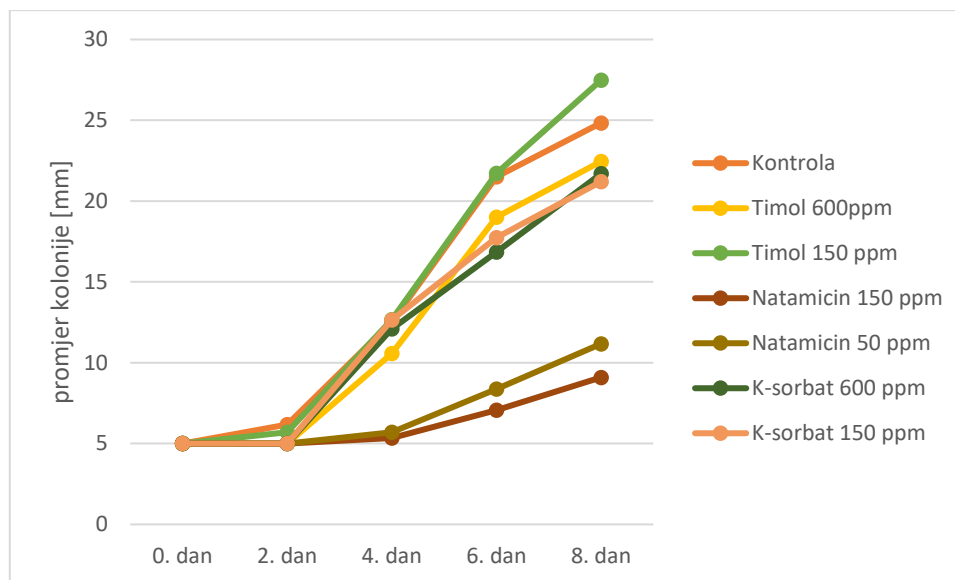
Za razliku od timola (Slika 17), utjecaj koncentracije natamicina na rast *P. roqueforti* ne može se uočiti iz eksperimentalnih rezultata (Slika 18). Sve primijenjene koncentracije djeluju gotovo jednako, jedino se može primijetiti kako je pri najvećoj koncentraciji od 150 ppm lag faza produžena na dva dana, nakon čega plijesan započinje svoj usporeni rast. Bez obzira na izostanak razlike u primijenjenim koncentracijama natamicina, promjer kolonije plijesni je tri puta manji u 10. danu inkubacije. Svakako je vrijedno napomenuti kako je primjena što nižih koncentracija (koje su ipak i djelotvorne) važna stoga što mnogi potrošači zaziru od dodanih konzervanasa zbog njihovog (često negativnog) učinka na zdravlje.



**Slika 19** Inhibicija rasta *P. roqueforti* K-sorbatom na PDA agaru



Slični rezultati kao s natamicinom (Slika 18) su dobiveni primjenom K-sorbata (Slika 19) gdje se može uočiti i bolji rast ove plijesni u usporedbi s kontrolom. Iako ova pojava nije česta, ponekad se rast plijesni može i pojačati u prisustvu inhibitornih tvari. Plijesni mogu reagirati tako što se rast ubrza ili mogu početi proizvoditi proizvode sekundarnog metabolizma što je u slučaju producenata mikotoksina nepoželjno.



**Slika 20** Inhibicija rasta *P. roqueforti* u *in situ* uvjetima, na ploškama sira Gouda

Slične rezultate kao s K-sorbatom (Slika 19) možemo vidjeti i na rezultatima u *in situ* eksperimentu na ploškama sira Gouda gdje timol od 150 ppm nije inhibirao rast kolonije, tj. rast se ubrzao od 6. do 8. dana inkubacije. Ostale primijenjene tvari su pri većoj koncentraciji snažnije inhibirale rast plijesni *P. roqueforti*.

Primjena konzervansa u prehrambenoj industriji je od izuzetnog značaja, ne samo zbog ekonomskih troškova zbog kvarenja, već i zbog sprječavanja bolesti uzrokovanih hranom. Sve snažniji otpor potrošača prema sintetičkim konzervansima nameće potrebu prehrambene industrije prema prirodnim tvarima ili smjesama (npr. eterična ulja ili njihovi sastojci) čije djelovanje inhibira nepoželjne mikroorganizme, a istovremeno ne posjeduju negativan učinak na zdravlje potrošača. Iako su vrste plijesni korištene u ovom radu, prvenstveno, namijenjene u industrijskoj proizvodnji fermentiranih mliječnih i mesnih proizvoda, vrsta *P. roqueforti* je jedna od najčešćih uzročnika kvarenja hrane pri niskim temperaturama. Zbog svoje raširenosti i nepoželjnog učinka na hladene namirnice, potrebno je pronalaziti učinkovite metode ograničavanja rasta ove vrste plijesni.

## **5. ZAKLJUČCI**

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

1. Na vrstu *P. camemberti* najsnažniji inhibitorni učinak uzrokovali su timol i natamicin (50 ppm) dok je K-sorbat bio djelotvoran pri 200 pp. Minimalna fungicidna koncentracija (MFK) uočena je kod natamicina 200 ppm, timola pri 800 ppm, dok je za K-sorbat MFK >800 ppm.
2. Po padajućoj koncentraciji, na *P. nalgiovense* najsnažniju inhibiciju je uzrokovao natamicin (50 ppm) potom timol (100 ppm), a najslabiji se pokazao K-sorbat (800 ppm). MFK najsnažnijeg antifungalnog spoja – natamicina je iznosila 100 ppm dok su za timol i K-sorbat potrebne koncentracije >800 ppm.
3. Na vrstu *P. roqueforti*, najsnažniji inhibitorni učinak je uzrokovao natamicin (50 ppm), a timol i K-sorbat su jednako inhibitorni (200 ppm). MFK natamicina je iznosila 400 ppm dok su za timol i K-sorbat potrebne koncentracije >800 ppm.
4. Po rastućoj otpornosti na istražne spojeve istražene plijesni roda *Penicillium* se mogu poredati: *P. camemberti* < *P. nalgiovense* < *P. roqueforti*.
5. Po antifungalnom učinku istraženih spojeva prema rastućem učinku djelovanja: K-sorbat < timol < natamicin.
6. Timol je najsnažnije inhibirao rast kolonije *P. camemberti* na PDA agaru, potom natamicin, dok za K-sorbat nije ustanovljen inhibitorni učinak. U *in situ* uvjetima – ploškama sira Gouda, natamicin pri 100 ppm je najsnažnije inhibirao rast kolonije plijesni.
7. Timol je najsnažnije inhibirao rast kolonije *P. nalgiovense* na PDA agaru, potom natamicin pri 25 i 50 ppm, dok je K-sorbat pri 100 i 150 ppm jednako utjecao na rast kolonije. Najučinkovitiji spoj u inhibiciji *P. nalgiovense* u *in situ* ploškama Goude je natamicin pri 50 ppm dok se ostali spojevi nisu značajno razlikovali u inhibiciji rasta.
8. Natamicin pri svim primijenjenim koncentracijama (50, 100 i 150 ppm) je najsnažnije inhibirao rast kolonije *P. roqueforti* na PDA agaru, potom timol, dok K-sorbat nije uzrokovao inhibiciju rasta. Na ploškama Goude, natamicin pri 50 i 150 ppm je najsnažnije inhibirao rast kolonije, potom K-sorbat od 600 i 150 ppm te timol od 600 ppm.

## **6. LITERATURA**

- Al-Maqtari, Q.A., Abdur, R., Amer, A.M., Waleed, A.A., Minping, W., Zhou, Y., Hsu Mon, P., Obakeng, G., Wrong, Y. (2022) 'Application of Essential Oils as Preservatives in Food Systems: Challenges and Future Prospectives – a Review' *Phytochemistry Reviews*, 21 (4), str. 1209–1246.
- Batt, C. A. i Tortorello, M.L. (2014) *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2. izdanje. London: Elsevier.
- Bhavaniramy, S., Selvaraju, V., Mohammad, S.A.A., Rajendran, V., Dharmar, B. (2019) 'Role of Essential Oils in Food Safety: Antimicrobial and Antioxidant Applications' *Grain & Oil Science and Technology*, 2(2), str. 49–55.
- Bizet, C., Desobry, S., Fanni, J., Hardy, J. (1997) 'Composition and Physical Properties of the *Penicillium Camemberti* Mycelium', *Le Lait*, 77(4), str. 461–466.
- Brik, H. (1981) 'Natamycin', *Analytical Profiles of Drug Substances*, 10, str. 513–561.
- Burt, S. (2004) 'Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods—a Review', *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253.
- Davidson, P.M., Matthew, T., Jairus, R.D. (2020) *Antimicrobials in Food*. 3. izdanje. Boca Raton: CRC Press.
- Dehghan, P., Ali, M., Hossein, M.A., Jafar, E.N.D. (2018) 'Pharmacokinetic and Toxicological Aspects of Potassium Sorbate Food Additive and Its Constituents', *Trends in Food Science & Technology*, 80, str. 123–130.
- Erkmen, O., Faruk, T.B. (2016) *Food Microbiology: Principles into Practice*. West Sussex: John Wiley & Sons.
- Falleh, H., Mariem, B.J., Mariem, S., Riadh, K. (2020) 'Essential Oils: A Promising Eco-Friendly Food Preservative', *Food Chemistry*, 330, br. 127268
- Guillaume, G., Jany, J.L., Coton, M., Le Floch, G., Debaets, S., Ropars, J., López-Villavicencio, M. (2015) 'Insights into *Penicillium Roqueforti* Morphological and Genetic Diversity', *PLOS ONE*, 10(6) br. 0129849.
- Guillaume, G., Jany, J.L., Poirier, E., Maillard, M.B., Debaets, S., Thierry, A., Coton, E., Coton, M. (2017) 'Functional Diversity within the *Penicillium Roqueforti* Species', *International Journal of Food Microbiology*, 241, str. 141–150.

- James, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. (2005) *Modern Food Microbiology*. New York: Springer.
- Kamala, K., Akhila, S., Rao, S., Devi, R. (2019) 'Alternative to Artificial Preservatives', *Systematic Reviews in Pharmacy*, 10(1), str. 99-102.
- Kinsella, J.E., Hwang, D.H., Dwivedi, B. (1976) 'Enzymes of *Penicillium Roqueforti* Involved in the Biosynthesis of Cheese Flavor', *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 8(2), str. 191–228.
- McSweeney, P., McNamara, J. (2022) *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Amsterdam: Elsevier Ltd.
- Meena, M., Prajapati, P., Ravichandran, C., Sehrawat, R. (2021) 'Natamycin: A Natural Preservative for Food Applications—a Review', *Food Science and Biotechnology*. The Korean Society of Food Science and Technology, 30, str. 1481–1496.
- Moavro, A., Stenglein, S., Delfederico, L., Wagner, J., Ludemann, V. (2019) 'Novel Use of *Penicillium Nalgioense* on Stuffed Semi–Hard and Hard Cheeses', *LWT*, 110, str. 255–261.
- Mrázek, J., Pachlová, V., Buňka, F., Černíková, M., Dráb, V., Bejblová, M., Staněk, K., Buňková, L. (2016) 'Effects of Different Strains *Penicillium Nalgioense* in the Nalžovy Cheese during Ripening', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(7), str. 2547–2554.
- Msagati, T.A.M. (2012) *Chemistry of Food Additives and Preservatives*. West Sussex: John Wiley & Sons.
- Oyarzabal, O.A., Backert, S. (2012) *Microbial Food Safety*. New York: Springer.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. (2022) *Fungi and Food Spoilage*. Cham: Springer.
- Poirier, M., Hugot, C., Spatz, M., Da Costa, G., Lapiere, A., Michaudel, C., Danne, C. (2022) 'Effects of Five Filamentous Fungi Used in Food Processes on In Vitro and In Vivo Gut Inflammation', *Journal of Fungi*, 8(9), str. 893.
- Russell, N.J., Gould, G.W. (2003) *Food Preservatives*. Boston: Springer.
- Safaa, K., Anzala, L., Bensoussan, M., Dantigny, P. (2017) 'Modelling the Effect of Temperature, PH, Water Activity, and Organic Acids on the Germination Time of

- Penicillium Camemberti and Penicillium Roqueforti Conidia', *International Journal of Food Microbiology*, 240, str. 124–130.
- Sen, M. (ur.) (2022) *Food Chemistry*. Hoboken: Scrivener Publishing.
- Silva, M., Lidon, F. (2016) 'Food Preservatives - An Overview on Applications and Side Effects', *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 28(6), str. 366.
- Sivaram, S., Somanathan, H., Kumaresan, S.M., Muthuraman, M.S. (2022) 'The Beneficial Role of Plant Based Thymol in Food Packaging Application: A Comprehensive Review', *Applied Food Research*, 2(2), br. 100214.
- Soleimani, M., Arzani, A., Arzani, V., Roberts, T.H. (2022) 'Phenolic Compounds and Antimicrobial Properties of Mint and Thyme', *Journal of Herbal Medicine*, 36, br. 100604.
- Sørhaug, T. (2011) 'Yeasts and Molds Spoilage Molds in Dairy Products' u Fuquay, J.W. (ur.) *Encyclopedia of Dairy Sciences*, London: Elsevier Ltd, 780–784.
- Streekstra, H., Verkennis, A.E.E., Jacobs, R., Dekker, A., Stark, J., Dijksterhuis, J. (2016) 'Fungal Strains and the Development of Tolerance against Natamycin', *International Journal of Food Microbiology*, 238, str. 15–22.
- Valle, M., Nguyen Van Long, N., Jany, J.N., Koullen, L., Rigalma, K., Vasseur, V., Huchet, V., Coroller, L. (2023) 'Impact of Sodium Chloride and Carbon Dioxide on Conidial Germination and Radial Growth of Penicillium Camemberti', *Food Microbiology*, 115, br. 104309.
- Vulić, A., Lešić, T., Dergestin Bačun, L., Dugonjić Odak, Z., Pleadin, J., Kudumija, N. (2023) 'Sorbinska Kiselina – Aditiv s Antimikrobnim Djelovanjem u Hrani Životinjskog Podrijetla', *Veterinarska Stanica*, 55(2), str. 129–136.
- Zhang, Y., Zhang, Y., Zhu, Z., Jiao, X., Shang, Y., Wen, Y. (2019) 'Encapsulation of Thymol in Biodegradable Nanofiber via Coaxial Electrospinning and Applications in Fruit Preservation', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(6), str. 1736–1741.

**DIPLOMSKI RAD JAVNO JE OBRANJEN DANA**

---

**TE OČIJENJEN USPJEHOM**

---

**Pred Povjerenstvom za obranu diplomskog rada:**

**1. prof. dr. sc. Nela Nedić Tiban**

predsjednik \_\_\_\_\_

(potpis)

**2. prof. dr. sc. Hrvoje Pavlović**

član \_\_\_\_\_

(potpis)

**3. izv. prof. dr. sc. Mirela Lučan Čolić**

član \_\_\_\_\_

(potpis)