

Primjena eteričnih ulja i njihovih sastojaka u antifungalnoj zaštiti grožđa

Novoselić, Tereza

Master's thesis / Diplomski rad

2014

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:048552>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-09**

REPOZITORIJ

PTF

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**

Tereza Novoselić

**PRIMJENA ETERIČNIH ULJA I NJIHOVIH SASTOJAKA U
ANTIFUNGALNOJ ZAŠTITI GROŽĐA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, siječanj 2014.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Mikrobiologija hrane
Tema rada prihvaćena na XI. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 23. rujna 2013.
Mentor: izv. prof. dr. sc. *Hrvoje Pavlović*
Pomoć pri izradi: *Vedran Gradvol*, dipl. ing.

PRIMJENA ETERIČNIH ULJA I NJIHOVIH SASTOJAKA U ANTIFUNGALNOJ ZAŠTITI GROŽĐA

Tereza Novoselić 107-DI

Sažetak:

U ovom radu ispitan je antifungalni učinak eteričnih ulja *Cinnamomum cassia* (kineskog cimeta) i *Allium tuberosum* (kineskog češnjaka) na vrste plijesni *Aspergillus flavus* (sojevi 3.2758 i 3.4408) te *A. oryzae*. Najzastupljeniji je sastojak eteričnog ulja *C. cassia* cinamaldehyd (87,23%), a eteričnog ulja *A. tuberosum* dialil trisulfid (40,05%). Na krumpirovu agaru s glukozom najsnažniju je inhibiciju rasta ispitanih vrsta plijesni uzrokovao cinamaldehyd, nešto slabije eterično ulje kineskog cimeta, još slabije eterično ulje kineskog češnjaka, a najslabije dialil trisulfid. Na grožđu sorte kardinal eterično je ulje kineskog cimeta snažnije od cinamaldehyda inhibiralo rast plijesni *A. flavus* 3.2758 i *A. oryzae*. Sva ispitana ulja i sastojci imali su snažniji inhibitorni učinak pri nižem aktivitetu vode (0,95 u usporedbi s 0,98).

Ključne riječi: *Kineski cimet (Cinnamomum cassia), Kineski češnjak (Allium tuberosum), Aspergillus flavus, Aspergillus oryzae, antifungalni učinak*

Rad sadrži: 42 stranice
25 slika
2 tablice
0 priloga
35 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. izv. prof. dr. sc. *Nela Nedić Tiban* – predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. *Hrvoje Pavlović* – mentor
3. doc. dr. sc. *Lidija Lenart* – član
4. doc. dr. sc. *Dajana Gašo Sokač* – zamjenska članica

Datum obrane: 22. siječanj 2014.

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 science and nutrition
Subdepartment of biology and microbiology
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Food microbiology
Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. XI. held on 30th of September 2013.
Mentor: *Hrvoje Pavlović, PhD, associate professor*
Technical assistance: *Vedran Gradvol gr. eng*

APPLICATION OF ESSENTIAL OILS AND THEIR COMPONENTS IN ANTIFUNGAL PROTECTION OF GRAPES

Tereza Novoselić 107-DI

Summary:

In this study, the effect of *Cinnamomum cassia* and *Allium tuberosum* essential oils, on *Aspergillus flavus* (strains 3.2758 and 3.4408) and *A. oryzae* was tested. The major compound of *C. cassia* essential oil was cinnamaldehyde (87,23%). *A. tuberosum* oil major compound was diallyl trisulphide (40,05%). On potato dextrose agar, the strongest growth inhibition on tested species was caused by cinnamaldehyde, followed by chinese cinnamon, chinese garlic essential oil and diallyl trisulphide. Stronger inhibitory effect of all tested oils/compounds was noticed at a lower water activity level (0.95 compared to 0.98). Compared to cinnamaldehyde, chinese cinnamon essential oil induced stronger inhibitory growth effect of *A. flavus* 3.2758 and *A. oryzae* on Kardinal grapes variety.

Key words: *Chinese cinnamon (Cinnamomum cassia), Chinese garlic (Allium tuberosum), Aspergillus flavus, Aspergillus oryzae, antifungal effect*

Thesis contains: 42 pages
25 figures
2 tables
0 supplements
35 literaturnih referenci

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|---|--------------|
| 1. <i>Nela Nedić Tiban, PhD, associate professor</i> | chair person |
| 2. <i>Hrvoje Pavlović, PhD, associate professor</i> | supervisor |
| 3. <i>Lidija Lenart, PhD, assistant professor</i> | member |
| 4. <i>Dajana Gašo Sokač, PhD, assistant professor</i> | stand-in |

Defense date: January, 22, 2014.

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

Posebno želim zahvaliti svojim roditeljima Vladi i Evici i sestri Nikolini koji su me tijekom čitavog mog školovanja podupirali i poticali moju težnju k ostvarivanju sve viših i viših ciljeva.

Želim zahvaliti svim prijateljima, posebno Nives Stojanović, Dariji Nieder i Aniti Antinac Dekany, koji su mi vrijeme provedeno na fakultetu uljepšali svojom prisutnošću i pomogli da to vrijeme smatram najljepšim dijelom svoga života.

Zahvaljujem Borku Bosancu što je bio uz mene.

Posvećujem ovaj rad Mati Turkoviću. Znam da sada gledaš sa neba i smiješ se.

Sadržaj

1. UVOD	0
2. TEORIJSKI DIO	
2.1. ETERIČNA ULJA I NJIHOVI SASTOJCI	2
2.1.1. Eterično ulje kineskog češnjaka (<i>Allium tuberosum</i>)	3
2.1.2. Eterično ulje kineskog cimeta (<i>Cinnamomum cassia</i>)	4
2.1.3. Sastojci eteričnih ulja	6
2.1.4. Mehanizam djelovanja eteričnih ulja i njihovih sastojaka	8
2.1.5. Sinergizam i antagonizam između sastojaka eteričnih ulja	12
2.2. PRIMJENA ETERIČNIH ULJA U OBRADI I PROIZVODNJI NAMIRNICA	12
2.2.1. Minimalno procesirano voće i povrće.....	13
2.2.2. Procesirano mlijeko i mliječni proizvodi	14
2.2.3. Procesirano meso.....	14
2.2.4. Procesirana riba i riblji proizvodi	15
2.2.5. Procesirani konditorski proizvodi.....	15
2.2.6. Ostale primjene eteričnih ulja	15
2.2.7. Sigurnost primjene eteričnih ulja i sastojaka.....	16
2.3. PLIJESNI	17
2.3.1. Plijesni koje uzrokuju bolesti.....	17
2.3.2. Rast plijesni	19
2.3.3. Kvarjenje namirnica	20
2.3.4. Plijesan <i>Aspergillus flavus</i>	21
2.3.5. Plijesan <i>Aspergillus oryzae</i>	22
2.4. MINIMALNO PROCESIRANI POSTUPCI	23
2.4.1. Tehnike minimalnog procesiranja voća i povrća.....	24
2.4.2. Promjene tijekom minimalnog procesiranja voća i povrća	25
2.4.3. Pakiranje voća i povrća.....	25
2.4.4. Preporuke i standardi organizacija FAO i WHO	26
3. EKSPERIMENTALNI DIO	
3.1. ZADATAK	28
3.2. MATERIJAL I METODE	28
3.2.1. Priprema podloge.....	28
3.2.2. Ispitivanje utjecaja eteričnog ulja kineskog cimeta (<i>Cinnamomum cassia</i>) i cinamaldehida na odabrane vrste plijesni na grožđu sorte kardinal	29
3.2.3. Obrada podataka	29
4. REZULTATI	
4.1. SASTAV ETERIČNIH ULJA KINESKOG ČEŠNJAKA (<i>ALLIUM TUBEROSUM</i>) I CIMETA (<i>CINNAMOMUM CASSIA</i>)	30
4.2. UTJECAJ ETERIČNIH ULJA I SASTOJAKA NA LINEARNI RAST KOLONIJA PLIJESNI .	31

4.3. UČINKOVITOST ETERIČNOG ULJA KINESKOG CIMETA (<i>CINNAMOU</i> M CASSIA) I CINAMALDEHIDA NA GROŽĐU	34
5. RASPRAVA	36
6. ZAKLJUČCI	39
7. LITERATURA	40

Popis oznaka, kratica i simbola

WHO - World Health Organisation

ROS - reaktivne vrste kisika

GRAS - generally recognised as safe

FDA - Američka organizacija za hranu i lijekove

FAO - Food and Agriculture Organisation

1. UVOD

Eterična su ulja aromatični ekstrakti iz biljnog materijala, kao što je pupoljak, cvijet, sjeme, lišće, kora, korijenje voća i drugih dijelova biljaka. Odavno su prepoznata po svojim antimikrobnim, antibakterijskim, antivirusnim, antifungalnim, antitoksikogenim, antiparazitnim i insekticidnim svojstvima. To im omogućuje veliku primjenu u različitim industrijama, posebice farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj te u poljoprivredi gdje se koriste kao alternativa za različite sintetske kemijske proizvode radi zaštite i održavanja ekološke ravnoteže.

Eterična se ulja najviše primjenjuju na svježem voću i povrću, ponajprije kako bi zaustavila razvoj patogenih mikroorganizama i procese brzog propadanja voća i povrća nakon branja (Chien i sur., 2008.). No sigurnost hrane, unatoč poboljšanjima u higijeni i tehnikama prehrambene proizvodnje, i nadalje je važno pitanje za potrošače i javno zdravstvo jer je procijenjeno kako čak 30% ljudi u razvijenim zemljama pati od bolesti koje se prenose hranom te svake godine širom svijeta najmanje dva milijuna ljudi umire od dijareje. Stoga još uvijek postoji potreba za novim načinom smanjenja ili uklanjanja patogena prenosivih putem hrane (Burt, 2004.).

Zapadno društvo nastoji smanjiti sintetičke prehrambene aditive i proizvode koji utječu na okoliš kao što je npr. sol. A nedavna preporuka Svjetske zdravstvene organizacije da se smanji potrošnja soli kako bi se smanjila učestalost kardiovaskularnih bolesti otvara mogućnost primjene drugih aditiva za održavanje sigurnosti hrane u procesiranoj hrani. Jedna je takva mogućnost primjena eteričnih ulja kao antibakterijskih ili antifungalnih aditiva (Burt, 2004.), a prema čemu je usmjeren ovaj rad.

Cilj je ovoga rada ispitati antifungalni učinak eteričnih ulja kineskog češnjaka (*Allium tuberosum*) i kineskog cimeta (*Cinnamomum cassia*) i njihovih najzastupljenijih sastojaka, dialil trisulfida i cinamaldehida, na plijesni vrste *Aspergillus flavus* i *Aspergillus oryzae* u *in vitro* uvjetima te na grožđu sorte kardinal (u *in situ* uvjetima). S obzirom na iz literature poznata svojstva eteričnih ulja kineskog češnjaka (*Allium tuberosum*) i kineskog cimeta (*Cinnamomum cassia*) pretpostavilo se da će eterična ulja kineskog češnjaka (*Allium tuberosum*) i kineskog cimeta (*Cinnamomum cassia*) biti učinkovita u suzbijanju plijesni *Aspergillus flavus* i *Aspergillus oryzae*, koje se pojavljuju na prehrambenim namirnicama poput voća i povrća, i stoga biti nadopuna štetnijim konzervansima koji se danas koriste ili ih s vremenom postupno zamjeniti te tako pridonijeti većoj sigurnosti hrane.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Eterična ulja i njihovi sastojci

Eterična su ulja hlapivi, prirodni, kompleksni spojevi čije je obilježje jak miris, a nastaju u aromatičnim biljkama kao sekundarni metaboliti. Obično se dobivaju pomoću destilacije vodenom parom, koju su prvi razvili Arapi u srednjem vijeku (Bakkali i sur., 2008.), iz biljnog materijala (cvijeća, pupova, sjemenki, lišća, grančica, kore, trave, drva, plodova i korijenja) (Burt, 2004.).

Do 13. st. eterična su se ulja proizvodila u ljekarnama i njihovi su farmakološki učinci opisani u farmakopejama, no čini se kako njihova upotreba nije bila rasprostranjena u Europi sve do 16. st. kad je u Londonu započela trgovina eteričnim uljima (otad i potječe pojam „eterično ulje“, a od švicarskog reformatora medicine Paracelsusa von Hohenheima koji je imenovao djelotvorni sastojak lijeka „quinta essentia“). Tada je na tržištu bio dostupan samo mali broj eteričnih ulja, kao što su terpentini, ulje smreke, ružmarina, lavande, klinčića, muškato oraščića, anisa i cimeta. Prva upotreba eteričnog ulja čajevca u medicinske svrhe dokumentirana je u vrijeme kolonizacije Australije, krajem 18. st. Vjeruje se kako je prvo eksperimentalno istraživanje baktericidnih svojstava para eteričnih ulja proveo De La Croix 1881. god. Međutim, tijekom 19. i 20. st. upotreba se eteričnih ulja u medicini znatno smanjila u odnosu na njihovu uporabu kao začina i aroma. Danas se eterična ulja najčešće koriste u proizvodnji namirnica – kao arome (kao i pojedini sastojci eteričnih ulja, izolirani iz biljke ili umjetno proizvedeni), u proizvodnji parfema i mirisa te farmaceutskih proizvoda (zbog njihovih funkcionalnih svojstava) (Burt, 2004.).

No eterična se ulja danas koriste i u medicini, kao lijek (analgetik, sedativ te kao lokalni anestetik), a važan su dio tradicionalne medicine mediteranskih i tropskih zemalja koje ih dobivaju iz raznih tamošnjih aromatičnih biljaka. Budući da su poznata po svojim ljekovitim antiseptičkim, baktericidnim, antivirusnim i antifungalnim svojstvima, eterična se ulja koriste i u očuvanju namirnica. Zbog njihovih baktericidnih i fungicidnih svojstava, farmaceutska i prehrambena industrija sve ih više upotrebljava kao alternativu za sintetičke kemijske proizvode u zaštiti ekološke ravnoteže (Bakkali i sur., 2008.). Eterična ulja štite biljke od različitih štetnih mikroorganizama, ali i od biljojeda smanjujući njihov apetit za određenom biljkom. K tomu, mogu privući neke kukce koji oprašuju biljke ili otjerati one nepoželjne. Od oko 3000 do danas poznatih eteričnih ulja njih 300 koristi se u farmaceutskoj, poljoprivrednoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Osim u industrijske svrhe, eterična se ulja mogu koristiti i u aromaterapiji (Bakkali i sur., 2008.).

Eterična se ulja mogu dobiti ili ekstrahirati na nekoliko načina. Mogu se koristiti metode tekućeg ugljičnog dioksida ili mikrovalova te, već spomenuta, metoda destilacije vodenom parom pod niskim ili visokim tlakom koja je i najčešća jer su na taj način antibakterijska i antifungalna svojstva eteričnih ulja najbolje očuvana. Ekstrakcija parnom destilacijom posebno je poželjna za citrusne. Za parfeme se najčešće koristi ekstrakcija lipofilnim otapalom te, katkad, perkritičnim ugljičnim dioksidom. Proizvod ekstrakcije može varirati u kvaliteti, količini te sastavu, ovisno o klimatskim uvjetima te dobi i fazi vegetacijskog ciklusa.

Kemijska svojstva proizvoda nastalih od eteričnih ulja ne razlikuju se samo u broju različitih molekula nego i u stereokemijskom obliku ekstrahirane molekule, ovisno o vrsti ekstrakcije koja se primjenjuje, što ovisi o uporabi eteričnog ulja (Bakkali i sur., 2008.).

Razlike u organoleptičkim svojstvima eteričnih ulja upućuju na razlike u sastavu ulja što je posljedica odabranog postupka njihova dobivanja (npr. ekstrakcija otapalom u usporedbi s destilacijom), a što može utjecati i na antimikrobna svojstva. To se može potvrditi činjenicom kako eterična ulja ekstrahirana pomoću heksana pokazuju veću antimikrobnu aktivnost nego ona dobivena destilacijom vodenom parom (Burt, 2004.).

Kako bi se dobila eterična ulja stalnog sastava, eterična se ulja moraju ekstrahirati pod istim uvjetima, iz istog dijela biljke koja je uzgajana na istom tlu, u istim klimatskim uvjetima (Bakkali i sur., 2008.), a kako bi se spriječile promjene u sastavu već ekstrahiranog eteričnog ulja, treba ih čuvati u mračnim prostorijama i u hermetički zatvorenim posudama (zbog njihove lake hlapljivosti).

Do danas se svojstva eteričnih ulja nisu značajno promijenila, samo su otkriveni neki mehanizmi djelovanja, posebno na antimikrobnoj razini.

2.1.1. Eterično ulje kineskog češnjaka (*Allium tuberosum*)

Eterično se ulje kineskog češnjaka (*Allium tuberosum*) dobiva iz istoimene biljke *Allium tuberosum*. Ta je biljka višegodišnja trajnica koja raste u obliku grma šireći se u stranu pomoću izdanaka, ali i mnogobrojnog sjemenja. Podrijetlom je iz Azije i nezaobilazni je sastojak mnogih azijskih jela. Najčešće se upotrebljava u kineskoj i korejskoj kuhinji, kao i u Indiji, Nepal i Vijetnamu. Biljka ima veliki, bijeli, atraktivni cvijet (**Slika 1**), vrlo ugodnog mirisa koji se nalazi na ravnoj, tankoj stabljici koja je viša od listova. *Allium tuberosum* kultivirani je oblik, a divlji oblik nalazimo pod imenom *Allium ramosum* (Alizadeh i sur., 2013.).



Slika 1 Biljka *Allium tuberosum*

(<http://aphotoflora.com>, 2013.)

Allium tuberosum uzgaja se zbog lišća i cvjetova koji zajedno daju okus slatkog češnjaka te se koriste za pripremu juha, salata i tradicionalnih kineskih i japanskih jela. U posljednje je vrijeme postao popularan u središnjoj i zapadnoj Europi gdje se drži da njegovo lišće ima terapijski učinak na tumore.

Bogat je vitaminima A, B, C, E i mineralima, posebice kalcijem, fosforom, željezom i magnezijem. Pozitivno utječe na zdravlje – među ostalim, snižava kolesterol i ojačava imunološki sustav. Kao dodatak hrani i za proizvodnju eteričnog ulja mogu se koristiti zeleni listovi biljke, cvjetni pupoljci, lukovice i blanširani listovi (Hu i sur., 2013.).

2.1.2. Eterično ulje kineskog cimeta (*Cinnamomum cassia*)

Eterično se ulje kineskog cimeta (*Cinnamomum cassia*) dobiva iz istoimene biljke *Cinnamomum cassia*. Zimzelena je gromolika biljka koja naraste i do 7 m u visinu te ima bijelu aromatičnu koru (**Slika 2**). Listovi su duguljasti, kopljasti, duljine oko 18 cm. Mali žuti listovi vise s dugih grana, a cvjetaju u rano ljeto. Divlja i komercijalno uzgojena *Cinnamomum cassia*, poznatija kao mješoviti ili kineski cimet, raste u područjima vruće, vlažne i tropske klime, a potječe iz Burme. Cimet ima dugu povijest upotrebe kao konzervans te se koristio za liječenje dijareje, želučanih problema, lošeg zadaha, kao i za pomoć pri mučnini, grčevima i smanjenom apetitu.



Slika 2 Biljka *Cinnamomum cassia*

(<http://toptropicals.com>, 2013.)

Poput cimeta i *Cinnamomum cassia* se dobiva iz kore nešto većeg zimzelenog stabla iz iste porodice. Štapići su joj (**Slika 3**) veći i grublji od štapića cimeta, a razlikuju se od njega po crvenijoj boji.



Slika 3 Začinski štapić *Cinnamomum cassia* (kineski cimet)

(<http://zdravlje.hzjz.hr/clanak.php?id=13322>, 2013.)

Osnovni je začim u južnoj i središnjoj Aziji. U zapadnim se zemljama preferira cejlonski cimet zbog čistoće i slabije izraženog mirisa. *Cinnamomum cassia* teško je dostupna u Europi (osim u nekim specijaliziranim kineskim prodavaonicama). Njezino ulje ima oporan i topao miris (**Slika 4**). Sadržava, među ostalim, 1 – 2% hlapivih ulja koji su uglavnom odgovorni za aromu i miris, tanine, šećere, smole i gume. Kineski cimet pozitivno djeluje na smanjenje glukoze u krvi kod bolesnika s dijabetesom tipa 2, ali uzrokuje dermatitis, pojačanu kožnu osjetljivost i iritira sluznicu membrane, te ga trudnice trebaju izbjegavati (Hoehn i Stockert, 2012.).



Slika 4 Eterično ulje *Cinnamomum cassia*

(<http://natureskissproducts.com>, 2013.)

2.1.3. Sastojci eteričnih ulja

Eterična su ulja složene prirodne mješavine koje mogu sadržavati od 20-ak do 60 sastojaka različitih koncentracija (Bakkali i sur., 2008.). Karakteriziraju ih dva ili tri glavna sastojka u visokim koncentracijama – od 20% do 70% (u nekim slučajevima i do 85%), a ostali se sastojci nalaze u tragovima (Burt, 2004.; Bakkali i sur., 2008.).

Glavni sastojci određuju biološka svojstva eteričnih ulja. Glavna skupina terpena sastavljena je od terpentina i terpenoida, a karakterizira ih niska molekularna masa. Ova glavna skupina prikazana je na **Slici 5** (Bakkali i sur., 2008.).

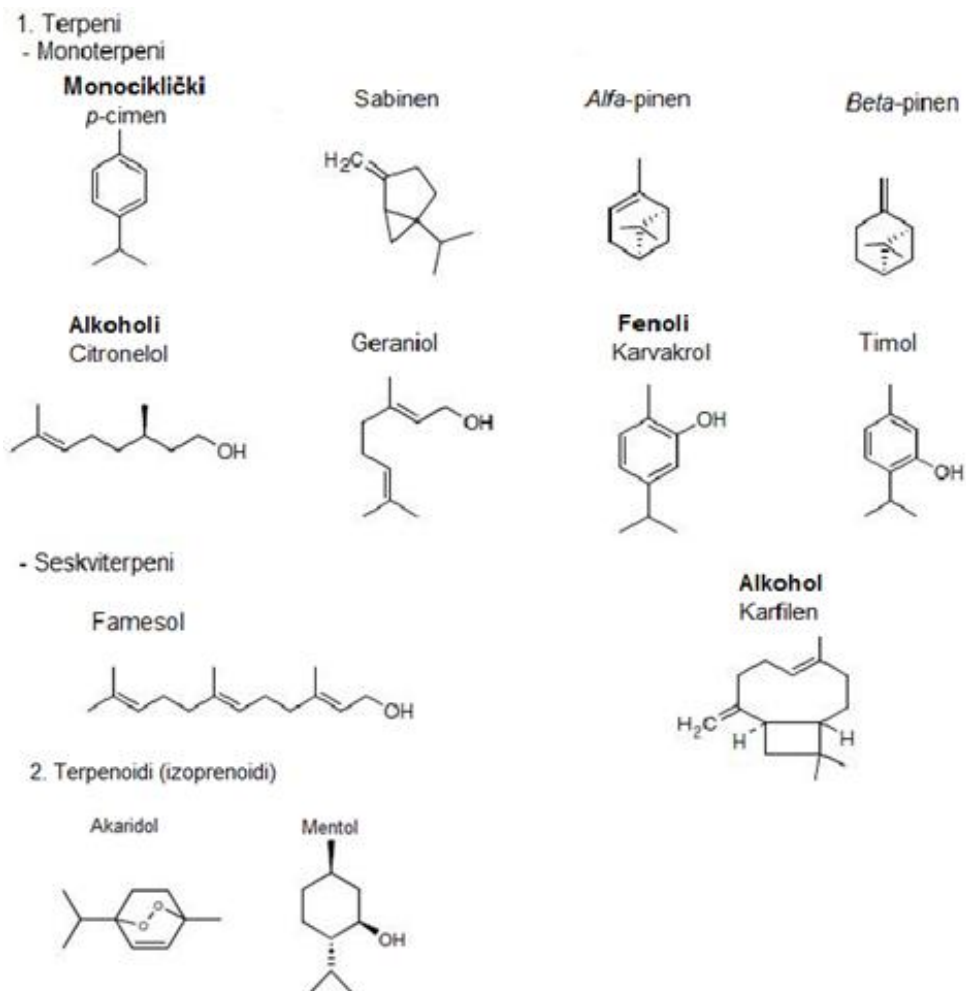
Terpeni mogu biti različitih strukturalnih i funkcionalnih svojstava. Sastoje se od nekoliko kombinacija C_5 jedinica tzv. izoprena. Od terpena u eteričnim su uljima najzastupljeniji monoterpeni (C_{10}) i seskviterpeni (C_{15}), ali su prisutni i hemiterpeni (C_5), diterpeni (C_{20}), triterpeni (C_{30}) te tetraterpeni (C_{40}). Monoterpeni nastaju spajanjem dviju (C_{10}) izoprenskih jedinica. To su najzastupljenije molekule koje čine 90% eteričnih ulja i vrlo su raznolike strukture (Bakkali i sur., 2008.).

Terpeni se dijele na nekoliko skupina spojeva:

- ugljikovodici: azulen, β -bisabolon,
- alkoholi: bisabol, cedrol,
- aldehidi: gerenial, neral,
- ketoni: menton, karvon,
- esteri: propionat,

- eteri,
- peroksidi i
- fenoli: timol, karvakrol.

Navedene spojeve sadržavaju, među ostalima, i sljedeće biljke: bergamot, lavanda, limunska trava, čajevac, mandarina, naranča, timijan, ružmarin (Bakkali i sur., 2007.). Općenito, eterična ulja koja imaju najjača antifungalna svojstva kod patogena hrane sadržavaju i visoku koncentraciju tih spojeva (Burt, 2004.; Tajkarimi i sur., 2010.).

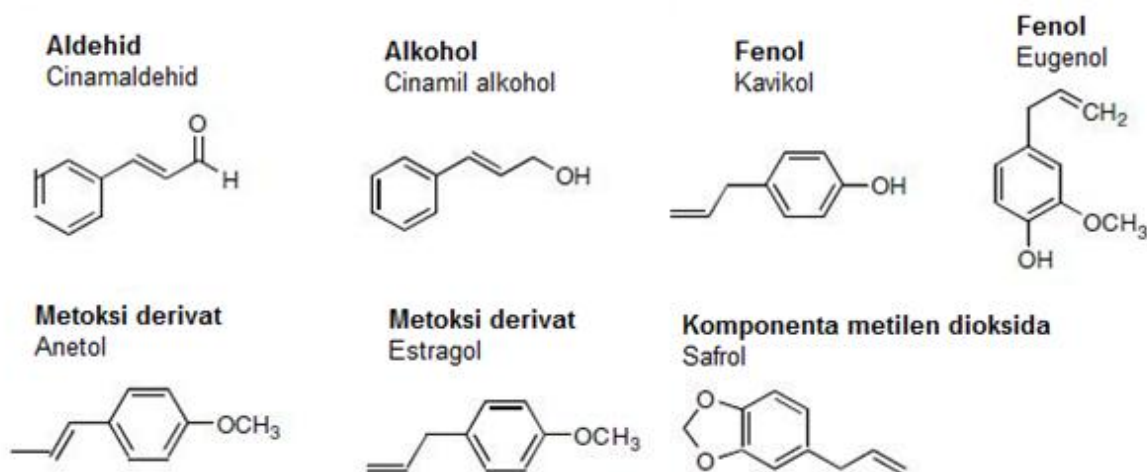


Slika 5 Kemijska struktura terpena u eteričnom ulju (Bakkali i sur., 2008.)

Aromatski spojevi u eteričnim uljima nastaju iz fenilpropana te su rjeđe zastupljeni u eteričnim uljima od terpena.

Aromatski spojevi (**Slika 6**) uključuju:

- aldehide,
- alkohole,
- fenole,
- metoksi derivate i
- metilen dioksi spojeve (Bakkali i sur., 2007.).

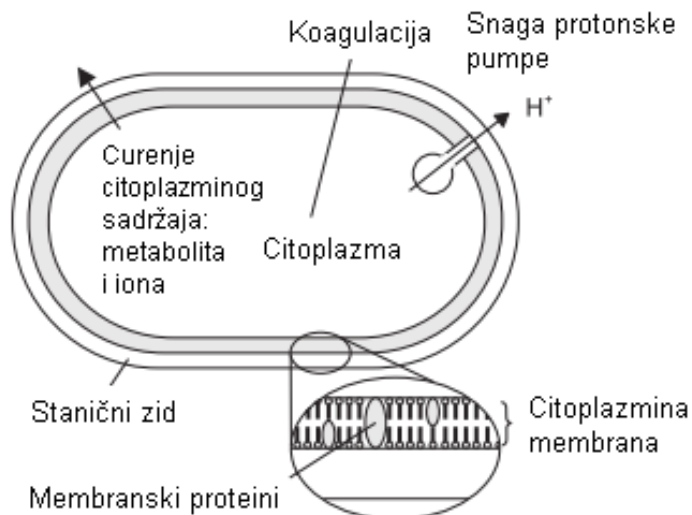


Slika 6 Kemijska struktura aromatskih sastojaka u eteričnom ulju

(Bakkali i sur., 2008.)

2.1.4. Mehanizam djelovanja sastojaka eteričnih ulja

Važno je svojstvo eteričnih ulja i njihovih sastojaka hidrofobnost koja im omogućuje raspodjelu između lipida stanične membrane i mitohondrija bakterijske stanice, narušavajući im strukturu i čineći ih propusnijima. Uslijed toga dolazi do istjecanja iona (K^+) i ostalih staničnih sastojaka zbog čega bakterijska stanica može uginuti. Brojnim se teorijama pokušavalo objasniti mehanizam kojim eterična ulja stvaraju antifungalni učinak. Budući da se eterična ulja sastoje od velikog broja različitih kemijskih spojeva, postoje različiti mehanizmi njihova djelovanja. Općenito, eterična ulja pokazuju najjača antifungalna svojstva u borbi protiv patogena u hrani jer sadržavaju visok postotak fenolnih spojeva kao što su karvakrol, eugenol i timol (Burt, 2004.). Ovisno o sastavu eteričnog ulja, a posebno njegovu sadržaju fenolnih spojeva, neka eterična ulja pokazuju različite razine citotoksičnosti.



Slika 7 Mehanizam djelovanja eteričnih ulja na stanicu mikroorganizma (Burt, 2004.)

Vjeruje se da većina eteričnih ulja djeluje antimikrobno u interakciji s procesima koji su povezani s bakterijskom staničnom membranom uključujući transport elektrona, premještanje protona, fosforilaciju i druge reakcije ovisne o enzimima. Na **Slici 7** može se vidjeti mehanizam djelovanja eteričnih ulja na stanicu mikroorganizma (Burt, 2004.).

Eterična ulja djeluju na stanicu mikroorganizama tako da kad prođu kroz staničnu stijenku i citoplazmatsku membranu, dolazi do poremećaja stanične propusnosti i oštećenja mitohondrijske membrane. U mitohondriju nastaju promjene toka elektrona u lancu prijenosa elektrona te dolazi do proizvodnje slobodnih radikala koji oksidiraju lipide, proteine i DNK. Štoviše, neki fenolni sastojci eteričnih ulja oksidiraju kada su u kontaktu s reaktivnim vrstama kisika (ROS) te nastaju reaktivni fenolni radikali koje, zajedno s ROS-ovima, otpušta mitohondrij. Hlapivi sastojci eteričnih ulja poput terpena i fenola mogu djelovati kao prooksidanti te utjecati na stanični redoks status. To znači da potiču nastajanje ROS-ova što, u konačnici, dovodi do apoptoze ili nekroze uključujući oštećenje proteina i DNK (Bakkali i sur., 2008.). Općenito se drži kako se antifungalni mehanizam djelovanja eteričnog ulja očituje u degradaciji stanične membrane, oštećenju citoplazmatske membrane i membrane proteina, poremećajem toka elektrona i aktivnog transporta, curenjem staničnog sadržaja, koagulacijom citoplazme i smanjenjem snage protonske pumpe (Burt, 2004.).

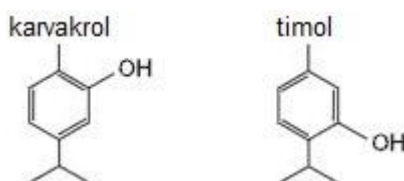
Burt (2004.) navodi nekoliko sastojaka eteričnih ulja (karvakrol, timol, *p*-cimen, karvon, cinamaldehyd i γ -terpinen) te donosi njihove mehanizme djelovanja.

Karvakrol (2-metil-5-(1-metiletil)-fenol) jedan je od glavnih sastojaka eteričnog ulja timijana. Njegov inhibitorni i biocidni učinak utvrđen je kod mnogih bakterija, kao što su *E. coli*,

Bacillus cereus, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni* i *Lactobacillus sakei*. Karvakrol je sposoban inhibirati stvaranje toksina bakterije *Bacillus cereus* (uzročnik proljeva) u tekućim hranjivim podlogama i realnom sustavu - juhi. Ako se odvija oslobađanje toksina, tada može postojati manjak ATP-a (adenozin trifosfat) za njegovo izbacivanje iz stanice. Slabiji rast stanica može upućivati na to da stanica iskorištava energiju radi održavanja vitalnosti, pri čemu ostavlja jako malo energije za stvaranje toksina. Karvakrol i cinamaldehyd u koncentracijama od $0,15 \mu\text{l ml}^{-1}$ vrlo su učinkoviti u smanjenju broja prirodne mikroflore na kiviju, ali su manje učinkoviti na voću kao što je dinja. pH-vrijednosti voća moguća je: pH kivija je 3,2-3,6, a pH dinje 5,4-5,5. Iz tih se rezultata može zaključiti kako je učinkovitost eteričnih ulja veća pri manjoj pH-vrijednosti (Burt, 2004.).

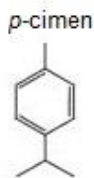
Timol (5-metil-2-(1-metiletil)-fenol) strukturno je vrlo sličan karvakrolu (**Slika 8**), ali s drukčijim položajem hidroksilne skupine. No oba spoja staničnu membranu mogu učiniti propusnom. Antifungalni učinak timola je djelotvoran protiv *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *L. monocytogenes*, *C. jejuni* i *S. enterica*. Osim toga ima i insekticidni učinak.

Istraživanjem djelovanja timola na bakterije kao što je *Salmonella typhimurium* i *S. aureus* pokazalo se kako taj spoj stvara hidrofobne veze s membranskim proteinima i pomoću vodikovih veza mijenja propusnost membrane. Primijećen je i značajan utjecaj pH-vrijednosti na antimikrobnu aktivnost timola. Timol djeluje jače inhibitorno pri pH 5,5 nego pri pH 6,5. Pri niskom pH molekula timola neće disociirati i stoga će biti hidrofobnija, pa će se bolje vezati za hidrofobna područja proteina i bolje otopiti u lipidnoj fazi (Burt, 2004.).



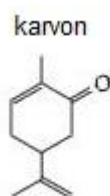
Slika 8 Kemijska struktura karvakrola i timola (Bakkali i sur., 2008.)

Prekursor karvakrola je **p-cimen** (**Slika 9**). Hidrofoban je i uzrokuje veće bubrenje citoplazmatske membrane nego sam karvakrol te, ako se koristi sam, ne djeluje antifungalno, nego tek u kombinaciji s karvakrolom (Burt, 2004.).



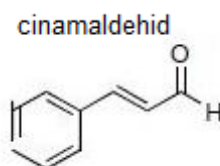
Slika 9 Kemijska struktura p-cimena (Burt, 2004.)

Karvon (Slika 10) po kemijskom je sastavu terpenoid koji se nalazi u mnogim eteričnim uljima, a najviše je prisutan u sjemenkama kopra i kima. Istraživanjem djelovanja karvona na *E. coli*, *S. thermophilus* i *Lactobacillus lactis* uočeno je kako se povećanjem njegove koncentracije smanjuje brzina rasta navedenih bakterija, a vjerojatan je razlog tomu što karvon remeti metabolizam energije stanica. No u drugom istraživanju otkriveno je kako karvon ne izaziva oštećenje vanjske stanične membrane *S. typhimurium* i *E. coli* te nema utjecaja na razinu ATP-a unutar stanice (Burt, 2004.).



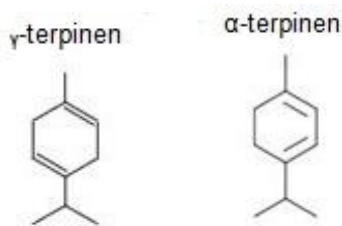
Slika 10 Kemijska struktura karvona (Burt, 2004.)

Poznato je da **cinamaldehyd (3-fenil-2-propenal) (Slika 11)** inhibira rast *E. coli* O157:H7 i *S. typhimurium*, u sličnim koncentracijama kao i karvakrol i timol, ali ne tako da oštećuje vanjsku membranu ili troši unutarstanični ATP (Burt, 2004.).



Slika 11 Kemijska struktura cinamaldehyda (Bakkali i sur., 2008.)

γ -terpinen (Slika 12) ne djeluje inhibitorno na rast *S. typhimurium*, dok ju α -terpinen inhibira.



Slika 12 Kemijska struktura γ -terpinena (Burt, 2004.)

2.1.5. Sinergizam i antagonizam između sastojaka eteričnih ulja

U nekim je istraživanjima dokazano kako se upotrebom eteričnog ulja postiže bolja antifungalna aktivnost nego upotrebom smjese nekoliko glavnih sastojaka eteričnih ulja. Iz toga se može zaključiti kako su sastojci eteričnih ulja prisutni u manjim koncentracijama nužni za antifungalno djelovanje eteričnih ulja te mogu imati sinergistički učinak s ostalim sastojcima (Burt, 2004.).

Sinergizam između karvakrola i njegova prekursora *p*-cimena uočen je praćenjem njihova djelovanja na *B. cereus*. *p*-cimen, inače slabe antifungalne aktivnosti, uzrokuje jače bubrenje stanične membrane nego karvakrol. Na taj način on omogućuje karvakrolu lakši transport unutar stanice (Burt, 2004.; Bakkali i sur., 2008.).

2.2. PRIMJENA ETERIČNIH ULJA U OBRADI I PROIZVODNJI NAMIRNICA

Eterična se ulja zbog kombinacije svojih svojstava arome i okusa sve češće koriste u procesiranju hrane. Osim toga, zahvaljujući njihovoj antimikrobnoj aktivnosti, sve veća pozornost istraživanja usmjerena je prema njihovoj primjeni kao prirodnih konzervansa (Tajkarimi i sur., 2010.; Fisher i Phillips, 2006.).

Eterična ulja s takvim svojstvima zadovoljavaju i zahtjeve potrošača za uporabom prirodnih proizvoda kao alternative za različite kemijske konzervanse, što bi trebalo omogućiti i veću zdravstvenu sigurnost hrane. Brojna istraživanja pokazala su kako su za antimikrobno djelovanje potrebne više koncentracije eteričnih ulja u namirnicama nego u *in vitro* istraživanjima. Zbog navedenog eterična ulja umnogome utječu na organoleptička svojstva prehrambenih proizvoda (Fisher i Phillips, 2006.).

S obzirom na to da su pojedini nutrijenti prisutni u različitim količinama u namirnicama, antimikrobno se djelovanje eteričnih ulja značajno razlikuje od namirnice do namirnice (Fisher i Phillips, 2006.). Naime, utvrđeno je kako eterična ulja imaju slabije antimikrobno djelovanje u namirnicama bogatim uljima i masnoćama, a učinkovitija su u namirnicama s visokim sadržajem proteina. Također je utvrđeno kako niži pH hrane pojačava njihov antimikrobni učinak. Osim toga, njihov učinak ovisi i o temperaturi skladištenja namirnice, količini kisika te samoj koncentraciji aktivnog sastojka (Tajkarimi i sur., 2010.).

Eterična ulja koja su se koristila za testiranje voća i povrća pokazala su se vrlo učinkovitima u sprječavanju kvarenja hrane u koncentracijama od 0,1 do 10 $\mu\text{l g}^{-1}$. Cinamaldehyd i timol učinkoviti su protiv šest serotipova salmonele na sjemenkama lucerne kada se primjenjuju na vrućem zraku pri temperaturi od 50 °C. Ulje origana u koncentracijama od 7 do 21 $\mu\text{l g}^{-1}$ djeluje inhibitorno na *E. coli* O157:H7 te dovodi do smanjenja konačne populacije u patlidžanu u odnosu na netretirane kontrolne uzorke (Burt, 2004.). Stoga se može zaključiti kako je potreban pažljiv odabir eteričnih ulja pri proizvodnji hrane, a koji će ujedno odgovarati organoleptičkim svojstvima namirnice te njezinu sastavu (Gutierrez i sur., 2009.).

Eterično ulje limunske trave i geraniol pokazali su se djelotvornim na 35 °C protiv bakterija *E. coli*, *Salmonella* spp. i *Listeria* spp. u soku od jabuke, kruške i dinje. Eterična ulja pokazala su se najučinkovitijima primijenjena u soku jabuke (Fisher i Phillips, 2006.). Eterično ulje cimeta inhibira kvasac *Candida albicans* i plijesni *Aspergillus flavus*, *Eurotium repens*, *Penicillium nalgiovense* i *Penicillium roqueforti* pri pakiranju jagoda u aktivnu ambalažu od papira (Rodríguez i sur., 2007.). Sivo kvarenje, koje uzrokuje *Botrytis cinerea*, glavni je uzrok propadanja stolnog grožđa poslije berbe. Gubitak težine, posmeđivanje i ubrzano omekšavanje grožđa također može biti problem. Nedavno je otkriveno kako se korištenjem etanola kao zaštite uz dodatke s antimikrobnim djelovanjem može očuvati svježina grožđa te spriječiti njegovo truljenje (Del Nobile i sur., 2009.). Utvrđeno je kako se ispiranjem listova kupusa eteričnim uljem bergamota, linalola ili citrala može smanjiti broj gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija, uključujući *C. jejuni*, *L. monocytogenes*, *B. cereus* i *S. aureus* (Fisher i Phillips, 2006.).

2.2.1. Minimalno procesirano voće i povrće

Potrošači danas sve više traže hranu visoke kakvoće koja je po svojim organoleptičkim značajkama što sličnija sirovoj neprerađenoj hrani, posebice kada je riječ o voću i povrću, isključivo zbog znatno blažih uvjeta primijenjenih pri njezinu procesiranju ili zbog primjene novih, blažih postupaka proizvodnje ili konzerviranja. To znači da se npr. termički procesi

provode u znatno blažim uvjetima procesiranja (niže temperature, kraće vrijeme), umjesto standardnih termičkih postupaka primjenjuju se drugi postupci kao što su dielektrično zagrijavanje, pulsirajuće električno polje, termička obrada u vakuumu ili pulsirajuće svjetlo.

Sve se više primjenjuje i tehnika konzerviranja preprekama, serija procesnih prepreka koje prisutne mikroorganizme inhibiraju. Te prepreke mogu biti temperatura, aktivitet vode, pH, redoks potencijal, konzervansi i sl. Upravo takvom kombinacijom prepreka svaki pojedinačni proces u seriji može se provoditi u znatno blažim uvjetima nego kada se koristi sam (Lelas, 2006.).

Minimalno procesirano voće i povrće i nepasterizirani voćni sokovi imaju kratak rok trajanja zbog mikrobnog enzimatskog kvarenja. U minimalno procesiranoj hrani u pravilu se ne postiže komercijalna sterilnost te se, radi produljenja njezine trajnosti, posebna pozornost mora usmjeriti na odabir ambalažnog materijala (materijali koji ne propuštaju plinove i vlagu, jestivi zaštitni filmovi), na odabir načina pakiranja (modificirana atmosfera, vakuum) te uvjete čuvanja (niske temperature, relativna vlažnost zraka) (Lelas, 2006.).

2.2.2. Procesirano mlijeko i mliječni proizvodi

Mlijeko i mliječni proizvodi pripadaju skupini lako kvarljivih namirnica. Kako bi se njihovo kvarenje spriječilo, u istraživanjima su se primijenila eterična ulja naranče, limuna, grejpa, mandarine, limete bez terpena, δ -limonen, terpineol i geraniol protiv bakterija *Salmonella senftenberg*, *E. coli*, *S. aureus* i *Pseudomonas* spp.

Istraživanjima se pokazalo da je u mlijeko prihvatljivo dodavati samo eterično ulje naranče, limuna i grejpa te se utvrdila maksimalna dopuštena koncentracija eteričnog ulja naranče od 1000 μ l na 1 l obranog mlijeka. Učinak eteričnog ulja varirao je ovisno o sadržaju mliječne masti, a najučinkovitije je bilo na obranom mlijeku. Utvrđeno je kako povećanjem udjela masti u mlijeku i mliječnim proizvodima antifungalni učinak opada. Nadalje, eterično ulje naranče pokazalo se djelotvornim samo na obranom mlijeku te manje djelotvornim od terpineola. Mogući razlog slabijeg antibakterijskog djelovanja eteričnih ulja u mliječnim proizvodima s većim sadržajem masti veća je koncentracija prisutnih lipida u mlijeku koji stvaraju zaštitni sloj oko bakterija, što eteričnim uljima onemogućava prodiranje u bakterijsku stanicu (Fisher i Phillips, 2006.).

2.2.3. Procesirano meso

Istraživanjem koje je provedeno na usitnjenom goveđem mesu utvrdilo se kako eterično ulje timijana koncentracije 0,6% u kombinaciji s nizinom (500 ili 1000 IU/g) ima pojačan

antibakterijski učinak protiv bakterije *E. coli* O157:H7. Antifungalni učinak bio je znatno veći na temperaturi od 10 °C nego na 4 °C, a istraživanja u *in vitro* uvjetima pokazala su još jače antifungalno djelovanje i na višim temperaturama. U istom je istraživanju utvrđeno kako eterično ulje timijana u koncentraciji od 0,9% nepovoljno djeluje na organoleptička svojstva mesa (Solomakos i sur., 2008.). Eugenol, kao jedan od glavnih sastojaka eteričnog ulja cimeta, pokazao je snažan inhibitorni učinak na rast bakterije *Aeromonas hydrophila* u kuhanom mesu govedine i peradi čuvanom na niskim temperaturama (Uyttendaele i sur., 2004.).

2.2.4. Procesirana riba i riblji proizvodi

Istraživanja su pokazala da sastojci eteričnih ulja citrala i linalola primijenjeni na ribi šaranu smanjuju broj mikroorganizama na šaranovim ljuskama, škrgama i iznutricama pri temperaturi od 20 °C za 48 sati. Linalol se pokazao učinkovitim protiv bakterija izoliranih s ljuske šarana (*Acinetobacter* spp., bakterije porodice *Enterobacteriaceae* spp., *Moraxella* spp. i *Vibrionaceae* spp.), a citral je učinkovitiji kod većeg broja bakterija izoliranih s ljuske, škrga i iznutrica šarana. Osim toga, citral se pokazao učinkovitim protiv bakterije *S. typhimurium* kod ribljih štapića (Fisher i Phillips, 2006.).

2.2.5. Procesirani konditorski proizvodi

Mliječna čokolada potencijalni je izvor bakterija *E. coli*, *L. monocytogenes* i *S. aureus*. Fisher i Phillips (2006.) inokulirali su te kulture na 1 kg mliječne čokolade. Nakon toga uzorci su ostavljeni 24 sata na temperaturi od 7 °C i aktivitetu vode (a_w) 0,450 te nakon toga na temperaturi od 20 °C i aktivitetu vode 0,340. Najučinkovitijim protiv *E. coli* pokazalo se eterično ulje limuna, a antibakterijsko djelovanje eteričnog ulja limunske trave utvrđeno je tek nakon 5 dana, i to na *S. aureus* pri 20 °C u vlažnoj sredini (Fisher i Phillips, 2006.).

2.2.6. Ostale primjene eteričnih ulja

Eterična se ulja sve više primjenjuju i kao sastavnice različitih jestivih filmova (Emiroğlu i sur., 2010.). Na taj se način smanjuje potreba za dodavanjem većih količina eteričnih ulja jer filmovi omogućuju zadržavanje aktivnih sastojaka tih ulja na površini proizvoda i tako povećavaju njihovu učinkovitost (Sánchez-González i sur., 2010.).

Emiroğlu i sur. (2010.) ispitali su antimikrobna svojstva eteričnih ulja timijana i origana koja su ugrađena u jestivi film od soje na svježe mljevenoj govedini jer se ti filmovi nalaze na površini. Uočili su da tako primjenjena eterična ulja, kad je meso čuvano na temperaturi hladnjaka, bolje antimikrobno djeluje na *Pseudomonas* spp. i koliformne bakterije nego na

Staphylococcus spp., ukupan broj bakterija i bakterije mliječne kiseline (Emiroglu i sur., 2010.).

Eugenol i timol (čistoće 99,5%) korišteni su u kombinaciji s pakiranjem u modificiranoj atmosferi grožđa, kao alternativa SO₂. Pakiranja su čuvana na temperaturi 1 °C pri RH 90% na tamnom mjestu 56 dana. Primjenom eugenola i timola uočeni su znatno manji gubici u organoleptičkim i nutritivnim svojstvima grožđa (Valero i Giner, 2006.).

2.2.7. Sigurnost uporabe eteričnih ulja i sastojaka

Europska komisija registrirala je kao aromatske tvari velik broj sastojaka eteričnih ulja za njihovu upotrebu u proizvodnji namirnica, te se smatra kako one nisu rizične za zdravlje potrošača. Među tim sastojcima ubrajaju se karvakrol, karvon, *p*-cimen, eugenol, timol, cinamaldehyd, mentol i citral (estragol i metil eugenol 2001. godine uklonjeni su s popisa zbog svoje genotoksičnosti).

Američka organizacija za hranu i lijekove (FDA) navedene je sastojke svrstala kao GRAS (*generally recognised as safe*, tj. uglavnom prepoznat kao siguran), odnosno kao dopuštene aditive u proizvodnji hrane (Burt, 2004.). Tako se npr. karvakrol koristi u proizvodnji pekarskih proizvoda, slatkiša i različitih napitaka (Martínez-Romero i sur., 2007.). U drugim zemljama, i kada se u proizvodnji hrane ne koriste samo kao aromatske tvari, ti se sastojci tretiraju kao novi prehrambeni aditivi koji, da bi se odobrili, moraju proći skupa metabolička istraživanja, kao i ispitivanje zdravstvene sigurnosti. Iako je velik broj sastojaka eteričnih ulja prepoznato kao GRAS i koriste se kao dopušteni prehrambeni aditivi, u nekim je istraživanjima otkriveno kako mogu izazvati alergijske reakcije, iritacije, a mogu djelovati čak i toksično (Burt, 2004.).

Tako neki podaci upućuju na potencijalnu razvojnu toksičnost, citotoksičnost (kod eukariotskog tipa stanice) ili kancerogenost (Bakkali i sur., 2008.). No ti su podaci utvrđeni samo kod unosa eteričnih ulja u velikim količinama, dok njihova genotoksičnost nije dokazana (Burt, 2004.; Bakkali i sur., 2008.). Problem može biti što se pri njihovoj upotrebi u proizvodnji hrane, kada se koriste u antifungalne svrhe, moraju koristiti u većim koncentracijama što može biti rizično za zdravlje. No istraživanjima je utvrđeno kako je moguće pronaći odgovarajuću količinu esencijalnih ulja ili njihovih sastojaka koja će pokazati antimikrobnu aktivnost, a istodobno će biti i sigurna za uporabu u prehrambenoj industriji (Martínez-Romero i sur., 2007.).

2.3. PLIJESNI

Plijesni su velika skupina gljiva široko rasprostranjena u prirodi, bilo u obliku aktivno živućih vegetativnih oblika ili latentnih spora. Tijelo im je građeno od gustog sustava cjevastih stanica bez klorofila, obično bezbojnih. Nitaste su građe, a niti (hife) rastu kao isprepletana masa koja se naziva micelij. Micelij se, kao prašnjava ili paučinasta (pahuljasta) prevlaka, rasprostire po podlozi. Svojim metabolizmom plijesni proizvode različite kemijske spojeve, od jednostavnih organskih kiselina do velikih i složenih molekula (Čvek i sur., 2010.).

Neke od produkata njihova metabolizma, poput antibiotika, limunske kiseline i dr., čovjek je uspio iskoristiti, ali ne i potpuno spriječiti negativni učinak plijesni, posebice nekih vrsta u kvarenju hrane i krmivu te njihovu toksičnost povezanu s izazivanjem bolesti u ljudi, biljaka i životinja. Većina plijesni opasnih za zdravlje ljudi potječe iz skladišta, iako su neki biološki aktivni produkti metabolizma plijesni s prirodnih staništa pokazali toksični učinak na zdravlje ljudi i životinja (Delaš, 2010.).

Mikotoksini (mykes - grč. gljiva, toxikon - grč. otrov) sekundarni su metaboliti, kemijski vrlo različite strukture, s različitim biološkim učincima. Uz neke plijesni koje sintetiziraju spojeve koji koriste ljudima u obrani od raznih bolesti postoje plijesni koje imaju svojstvo sinteze toksičnih spojeva (Jokić, 2013.).

Za svoj rast i razvoj plijesni sintetiziraju primarne metabolite, a sekundarne metabolite koriste kao obranu od drugih mikroorganizama. Ti sekundarni metaboliti (mikotoksini) mogu biti toksični i za ljude. Posebno su opasni zbog visoke toksičnosti u malim količinama i odsutnosti bilo kakvog senzorskog upozorenja pri konzumaciji hrane koja sadrži mikotoksine. Više vrsta pa i rodova plijesni može proizvoditi isti mikotoksin, ali isto tako jedna plijesan može proizvoditi više mikotoksina (Jokić, 2013.).

Povišena vlaga i temperatura te oštećenje biljke pogoduju rastu plijesni. Jedna od važnijih skupina metabolita plijesni su mikotoksini koji uzrokuju mnoge bolesti nazvane mikotoksikoze. Kontaminacija ljudske hrane i stočne hrane mikotoksinima rezultira ozbiljnim zdravstvenim i ekonomskim posljedicama (Čvek i sur., 2010.).

2.3.1. Plijesni koje uzrokuju bolesti

Do nastanka bolesti koje uzrokuju mikotoksini -mikotoksikoza- dolazi izravnim ili neizravnim stalnim unosom u manjim koncentracijama mikotoksina putem mikotoksinom onečišćene hrane (Delaš, 2010.). Mikotoksini imaju visoku akutnu toksičnost često povezanu uz maligne bolesti (kancerogenost, mutagenost, imunotoksičnost, hepatotoksičnost, nefrotoksičnost,

genotoksičnost, dermatotoksičnost, hematotoksičnost, teratogenost), a prema procjeni FAO-a, 25% hrane koja se proizvodi u svijetu kontaminirano je mikotoksinima. Mikotoksini su stabilni i, u pravilu, otporni na povišenu temperaturu. Njihova biosinteza ovisi o vrsti toksikotvorne plijesni, o klimatskim i okolišnim uvjetima i fizikalno-kemijskim čimbenicima temperaturi: od -5 do 60 °C, sadržaju vode u namirnici (13% i više a_w -vrijednosti, iznad 0,65; pH-vrijednosti: 3-9 te koncentraciji plinova u atmosferi i sastavu namirnice). Najopasniji su po svom toksičnom i kancerogenom učinku, ovi mikotoksini: aflatoksini (AFB₁, AFB₂), okratoksini (OTA), zearalenon (ZEA, F-2), fumonizini (FB₁, FB₂), trihoteceni (T-2 toksin), patulin (PAT), ali i drugi koji se navode u **Tablici 1**. Poznato je dvadesetak različitih plijesni koje su sposobne proizvoditi dva ili više različitih mikotoksina.

Tablica 1 Odabrani mikotoksini i plijesni odgovorne za njihovu sintezu (Delaš, 2010.)

MIKOTOKSIN	VRSTA PLIJESNI ODGOVORNA ZA SINTEZU MIKOTOKSINA
Aflatoksin B ₁	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>
Sterigmatocistin	<i>A. versicolor</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. sydowii</i> , <i>A. rugulosus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>Drechslera</i> sp., <i>Bioplaris</i> sp.
Zearalenon	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. roseum</i> , <i>F. nivale</i> , <i>F. tricinctum</i> , <i>F. sporotrichoides</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. verticillioides</i>
Patulin	<i>Penicillium patulum</i> , <i>P. roqueforti</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. variable</i> , <i>P. claviforme</i> , <i>P. lapidosum</i> , <i>P. melinii</i> , <i>P. rugulosus</i> , <i>P. equinum</i> , <i>P. novaezeelandiae</i> , <i>P. divergens</i> , <i>P. griseofulvum</i> , <i>P. leucopus</i> , <i>P. cyclopium</i>
T-2 toksin	<i>Fusarium tricinctum</i> , <i>F. roseum</i> , <i>F. lateritium</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. rigidlusculum</i> , <i>Trichoderma viride</i>
Rokefortin	<i>Penicillium roqueforti</i>
Penitrem A	<i>Penicillium palitans</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P. crustosum</i> , <i>P. spinulosum</i>
Fumitremorgen	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>A. caespitosus</i> , <i>Penicillium lanosum</i>

Roridin A	<i>Myrothecium roridum</i>
Okratoksin A	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>A. ostianus</i> , <i>A. melleus</i> , <i>A. alliaceus</i> , <i>A. petrakii</i> , <i>A. sclerotiorum</i> , <i>A. sulphureus</i> , <i>Penicillium viridicatum</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P. commune</i> , <i>P. palitans</i> , <i>P. purpurescens</i> , <i>P. variable</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>P. chrysogenum</i>
Citrinin	<i>Penicillium citrinum</i> , <i>P. viridicatum</i> , <i>P. implicatum</i> , <i>P. fellatanum</i> , <i>P. citreo-viride</i> , <i>P. velutinum</i> , <i>P. canascens</i> , <i>P. purpurescens</i> , <i>P. janseni</i> , <i>P. steckii</i> , <i>P. spinolosum</i> , <i>P. notatum</i> , <i>P. palitans</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. claviforme</i> , <i>P. roqueforti</i> , <i>Aspergillus niveus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. flavipes</i>
α -cikolpiazonička kiselina	<i>Penicillium cyclopium</i> , <i>P. viridicatum</i> , <i>P. crustosum</i> , <i>P. puberulum</i> , <i>P. viridicatum</i> , <i>P. patulum</i>
Penicilinska kiselina	<i>Penicillium puberulum</i> , <i>P. piscarium</i> , <i>P. stoloniferum</i> , <i>P. viridicatum</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P. martensii</i> , <i>P. thomii</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>P. suaveolens</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. palitans</i> , <i>P. baarnense</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. madriti</i> , <i>P. paraherquei</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>A. querinus</i> , <i>A. melleus</i> , <i>A. ostianus</i>

2.3.2. Rast plijesni

Plijesni su mikroskopske gljive, mogu im se pripisati neka opća svojstva gljiva npr. sve gljive su heterotrofi, odnosno dobivaju energiju iz ugljika organskog porijekla. Većina gljiva su saprofiti, što znači da koriste izvore ugljika iz mrtvih biljaka ili životinja te iz tla ili vode, odnosno to su gljive truljenja. Parazitske gljive kao izvor ugljika koriste žive domaćine, biljke ili životinje. Plijesni su aerobni organizmi i za rast im je potreban kisik. Proizvode mnoštvo različitih enzima tako što koriste ugljik iz supstrata te enzimima razgrađuju molekule supstrata u manje molekule koje stanica tada može apsorbirati. Mogu se nastaniti (kolonizirati) i rasti na različitim tipovima hrane (Nujić, 2011.). Žitarice malog zrna (pšenica, zob, raž, ječam i riža) i velikog zrna (kukuruz), zatim uljarice (kikiriki) te voće i povrće mogu biti podloge za rast plijesni tijekom uzgoja, prerade i skladištenja (Jokić, 2013.).

Postoje četiri kritična uvjeta za rast plijesni: dostupnost spora plijesni, dostupnost hrane, odgovarajuća temperatura i udio vlage. Uklanjanje bilo kojeg od navedenog, spriječit će rast plijesni. Većina plijesni raste pri sobnim temperaturama (Nujić, 2011.).

2.3.3. Kvarenje namirnica

Plijesni koje uzrokuju kvarenje i trovanje hrane velik su problem, posebno zemljama u razvoju. *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium* najznačajniji su rodovi plijesni koje uzrokuju kvarenje namirnica. Plijesni su također odgovorne za stvaranje nepoželjnog okusa te proizvode alergijske spojeve i mikotoksine, npr. *Aspergillus flavus* i *Aspergillus fumigatus* proizvode aflatoksin B₁ i B₂, što dovodi do kvalitativnih gubitaka (Nguefack i sur., 2004.).

Ustanovljeno je da oko 30% do 50% od ukupne količine povrća i voća za ljudsku prehranu propada zbog mikrobiološkog kvarenja. Kvarenje uzrokuju bakterije, zatim kvasci i plijesni. Broj i vrsta mikroorganizama na voću i povrću različiti su. To ovisi o udjelu vode, proteina, ugljikohidrata, kiselina, fenola, eteričnih ulja te biljnih antibiotika.

Voće i povrće sadržava mikroorganizme na površini, iako se i u unutrašnjosti može pronaći mali broj mikroorganizama. Kvarenje voća i povrća može biti organoleptički neprimjetno, u slučaju kada su procesi sporiji, ili može doći do znatne promjene organoleptičkih svojstava. Voće i povrće postaje neupotrebljivo za ljudsku prehranu, a u određenim slučajevima može postati i štetno po zdravlje potrošača. Kada su u velikom broju, mikroorganizmi koji izazivaju kvarenje hrane mogu se otkriti na osnovi promjene mirisa, okusa ili čak boje i teksture proizvoda.

Kvarenje namirnica može dovesti:

- do umanjivanja kakvoće namirnica,
- do smanjivanja njihove prehrambene vrijednosti,
- do pogoršanja njihova okusa, mirisa, boje, konzistencije i izgleda,
- do mijenjanja kemijskog sastava te do promjene fizikalnih svojstava (Magan i Aldred, 2010.).

Kvarenje se očituje u raznim oblicima i kombinacijama. Rast se mikroorganizama očituje kao:

- površinska sluzavost ili pojava kolonija mikroorganizama,
- razgradnja strukturnih sastojaka hrane što uzrokuje gubitak teksture (omekšavanje) i
- nastanak kemijskih spojeva kao posljedica metabolizma mikroorganizama (plinovi, pigmenti, polisaharidi, nepoželjni okus ili miris (Pavlović, 2011/12.).

Kada broj mikroorganizama dosegne prag kada se nepoželjne promjene primijete, u relativno kratkom vremenu dolazi do izraženog kvarenja.

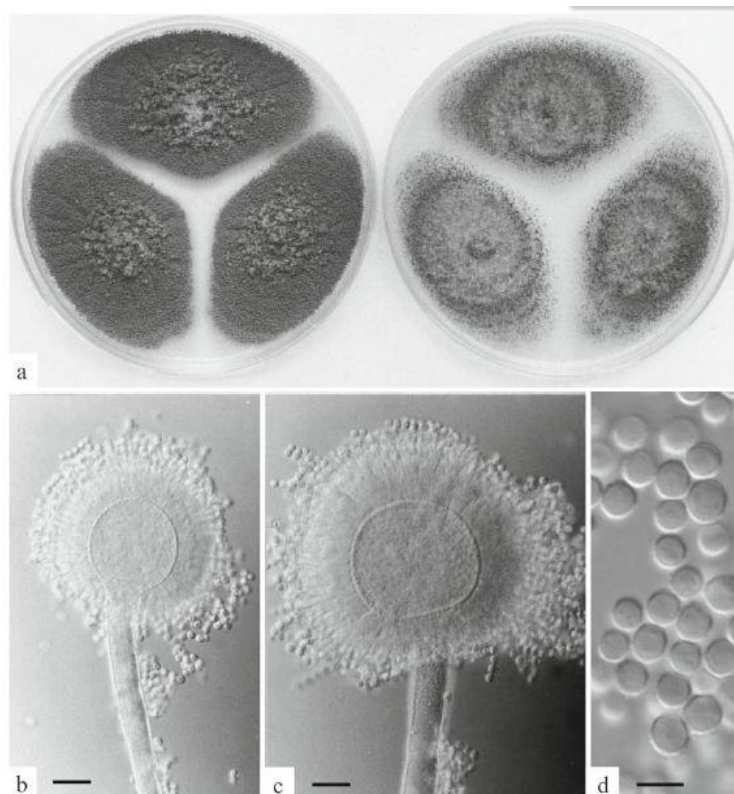
Predvidjeti kvarenje nije jednostavno jer su mehanizmi kojima se odvija najčešće kompleksni. Jednostavnije je identificirati kemijske promjene kvarenja nego identificirati odgovorne mikroorganizme. Ukupni broj mikroorganizama koji se u namirnicama određuje slab je pokazatelj potencijalnog kvarenja. Mnogi mikroorganizmi koji se prebroje na podlozi ne mogu se razmnožavati u hrani, a mnogi nisu ni odgovorni za kvarenje. Kada se budu otkrile tehnike detekcije mikroorganizama odgovornih za kvarenje, tada će se i lakše predvidjeti kvarenje namirnica (Pavlović, 2011/12.).

2.3.4. Plijesan *Aspergillus flavus*

Aspergillus flavus vrsta je plijesni iz porodice *Aspergillaceae*, podroda *Circumdati*, sekcija *Flavi*.

A. flavus rasprostranjen je po cijelom svijetu te nastanjuje vegetaciju, sjeme raznih usjeva i mnoge druge supstrate. Često je prisutan u kikirikiju, orašastim plodovima, sjemenu uljarica, žitaricama i, katkada, u sušenom voću, pogotovo u smokvama. Optimalna je temperatura za njegov rast 32 °C, a vlažnost zraka 15%. Konidijalne glave tipično su okrugle, žutozelene boje koje kasnije potamne. Na **Slici 13 (a)** može se vidjeti kako izgledaju kolonije plijesni *A. flavus* nakon 7 dana rasta pri temperaturi 25 °C na CYA i MEA podlozi.

Konidiospore plijesni *A. flavus* glatke su i fino zaobljene, promjera 5 µm (**Slika 13 d**). Konidiofore su dugačke, često grube, mjestimice lagano zaobljene, najčešće bezbojne, a katkad bljedosome boje. Vezikule su mu okrugle ili izdužene, široke, promjera 20 µm (**Slika 13 b,c**). Metule pokrivaju tri četvrtine cijele površine vezikule (Pitt i Hocking, 2009.).



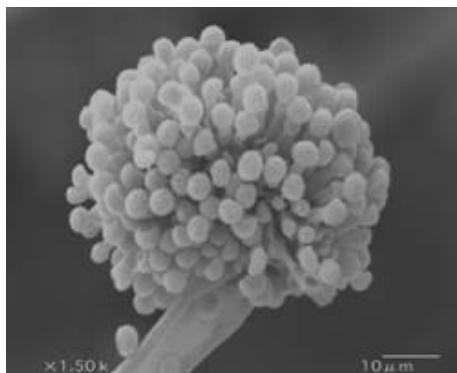
Slika 13 *Aspergillus flavus* (a) kolonije na CYA i MEA podlozi nakon 7 dana rasta pri 25 °C; (b,c) vezikule, promjera 20 μm; (d) konidiospore, promjera 5 μm (Pitt i Hocking, 2009.)

A. flavus može proizvesti aflatoksine B₁, B₂ i ciklopiazoničnu kiselinu (CPA). Proizvodnja aflatoksina je gotovo uvijek posljedica lošeg sušenja, rukovanja ili skladištenja žitarica i začina. CPA je indol tetramična kiselina koja se može pojaviti u kontaminiranim poljoprivrednim proizvodima i hrani za životinje. Ispitana je na štakorima i drugim životinjama i u akutnoj toksičnosti uzrokuje ozbiljne probavne i neurološke poremećaje (Pitt i Hocking, 2009.).

2.3.5. Plijesan *Aspergillus oryzae*

Plijesan *Aspergillus oryzae* (**Slika 14**) usko je povezana s plijesni *A. flavus* te stvara kolonije koje su joj slične, ali nešto manjih dimenzija na standardnim podlogama. Osim toga, kolonije su plijesni *Aspergillus oryzae* maslinastosmeđe boje, što se vidi na **Slici 15**, a plijesni *A. flavus* zelene. Kolonije plijesni *A. oryzae* mijenjaju boju od zelene prema maslinastosmeđoj tijekom inkubacije na 25 °C za 7 – 14 dana, dok kolonije plijesni *A. flavus* i *A. parasiticus* ostaju pod tim uvjetima žutozelene ili sivkastozelene. Konidije plijesni *Aspergillus oryzae* obično su veće od onih u plijesni *A. flavus*.

A. oryzae od velike je ekonomske važnosti za prehrambene industrije u Japanu i drugim dijelovima Azije. Na kuhanoj riži *A. oryzae* je izvor enzima koji se koriste u proizvodnji "shoyu" (sojina umaka) i drugih važnih orijentalnih proizvoda koji se uglavnom koriste za aromatizaciju hrane. *A. oryzae* ne proizvodi aflatoksine, ali neki sojevi mogu proizvesti ciklopiazoničku kiselinu (Pitt i Hocking, 2009.).



Slika 14 Mikroskopska slika plijesni *Aspergillus oryzae*
(<http://nrib.go.jp/English/annai/introduce/microorganism.htm>, 2013.)



Slika 15 Fotomikrografska slika plijesni *Aspergillus oryzae*
(<http://microfungi.truman.edu>, 2008.)

2.4. MINIMALNO PROCESIRANI POSTUPCI

Proizvodnja tzv. minimalno procesirane hrane glavni je trend u prehrambenoj industriji posljednjih 20-ak godina. Za proizvodnju te vrste hrane sve se više koriste moderne tehnologije i postupci koji ne narušavaju izvornu kakvoću, a povećavaju trajnost svježeg

proizvoda. Minimalno procesirana hrana tražena je zbog visoke kakvoće, prehrambene vrijednosti i jednostavne uporabe (Lovrić, 2003.; Piližota, 2010.).

Potrošači sve više zahtijevaju hranu (posebice voće i povrće) koja ima svojstva slična svježoj hrani (koja je u većoj mjeri zadržala svojstva i sastav sirovine te sadržava samo prirodne sastojke), koja se lako priprema za jelo (engl. *ready-to-use* i brza priprema obroka (engl. *ready-to-prepare*) (Piližota, 2010.).

U posljednje je vrijeme sve veća pozornost usmjerena na proizvode konzervirane hlađenjem s povećanom trajnosti. To su proizvodi na kojima je primijenjeno minimalno procesiranje (obrada) ili (pred) kuhanje i ograničene su trajnosti, koja se može povećati hlađenjem (tj. čuvanjem pri sniženim temperaturama). Uz tradicionalne proizvode (mesni doručak, salamureno, sušeno meso i sl.), to je nova generacija proizvoda djelomično obrađenih (procesiranih) i konzerviranih hlađenjem, kao što su neki mesni proizvodi, jaja, plodovi mora, salate, povrća, umaci, svježa tjestenina, neka gotova jela *sous-vide* proizvodi (toplinski obrađeni u hermetički zatvorenoj plastičnoj ambalaži pri sniženom tlaku ili u vakuumu).

Ako je kod takvih proizvoda primijenjena obrada toplinom, temperatura je niža od one potrebne za postizanje komercijalne sterilnosti. Zbog svoje prirode takvi proizvodi predstavljaju izazov u sprječavanju mikrobiološke aktivnosti, odnosno narušavanja kakvoće i zdravstvene ispravnosti proizvoda (Lovrić, 2003.).

2.4.1. Tehnike minimalnog procesiranja voća i povrća

Voće i povrće koje se namjerava obraditi u tzv. minimalno procesirane proizvode sa svim značajkama svježe sirovine mora biti najkvalitetnije. Pravilno čuvanje sirovine do procesiranja i pažljivo sortiranje i/ili kalibriranje vrlo je važno za proizvodnju minimalno procesiranog povrća.

Vrlo je važan i odabir pogodne sorte, a posebice pri procesiranju krumpira, mrkve i luka zbog njihove sklonosti promjeni boje i visokog udjela vode koja nakon procesiranja može biti bogat supstrat (otopljene hranjive tvari) za razvoj mikroorganizama.

Među važnim su čimbenicima pri odabiru pojedinih sirovina za minimalno procesiranje kvaliteta i vrsta tla za uzgoj voća i povrća, primijenjene agrotehničke mjere (obrada tla i prihrana), klimatski uvjeti i uvjeti berbe (Piližota, 2010.).

U postupcima minimalnog procesiranja primjenjuju se sljedeće tehnike:

- pakiranje u modificiranoj atmosferi (MA) (+ hlađenje),

- *sous vide* postupak i pakiranje u vakuumu,
- ionizirajuće zračenje ($E < 10 \text{ MeV}$; $D < 10 \text{ kGy}$),
- obrada zvukom (čujno područje $< 18 \text{ kHz}$ i ultrazvučno područje $> 18 \text{ kHz}$),
- obrada visokim tlakom ($p = 200 - 900 \text{ MPa}$),
- obrada oscilirajućim magnetskim poljem,
- obrada pulsirajućim električnim poljem ($5 - 50 \text{ kV/cm}$; $2 - 100 \mu\text{s}$),
- obrada svjetlosnim pulsovima i
- obrada elektromagnetskim valovima različite frekvencije (Lovrić, 2003.).

2.4.2. Promjene tijekom minimalnog procesiranja voća i povrća

Najčešća je promjena na voću i povrću tijekom njihova procesiranja je posmeđivanje. Posmeđivanje voća i povrća može se usporiti ili spriječiti, ovisno o brojnim čimbenicima, ponajprije o vrsti sirovine.

Do promjene okusa, mirisa i/ili arome voća i povrća može doći iz različitih razloga, bilo zbog naknadne kontaminacije ili istjecanja vremena trajanja proizvoda. Mikrobiološka kontaminacija i posmeđivanje voća mogu se spriječiti na isti način, poduzimanjem istih postupaka (dezinfekcijom). Prema važećim propisima, za mikrobiološku ispravnost svježeg voća i povrća nema točno propisanih granica mikrobiološke kontaminacije koje su opasne po ljudsko zdravlje, osim za patogene mikroorganizme. Kvaliteti i sigurnosti (higijenskoj ispravnosti) minimalno procesiranog voća i povrća treba dati prednost u odnosu na produženje vijeka trajanja (Piližota, 2010.).

Minimalno procesirano voće po svojim je organoleptičkim značajkama slično sirovom neprerađenom voću visoke kakvoće kod kojeg su sačuvane originalne organoleptičke i nutritivne značajke (Lelas, 2006.). Kao i kod svježeg voća, i na minimalno procesiranom voću nalaze se razne patogene bakterije kao što su *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *S. aureus* i *E. coli* (Lanciotti i sur., 2004.).

2.4.3. Pakiranje voća i povrća

Minimalno procesirano voće i povrće namijenjeno trgovinama za prodaju na malo mora biti upakirano u odgovarajuću ambalažu. Pakiranje je vrlo važna operacija u proizvodnji minimalno procesiranog voća i povrća, isto kao i sve ostale operacije. O pravilnom postupku

pakiranja i dobro odabranim plastičnim folijama za pakiranje jednako će ovisiti kvaliteta i trajnost proizvoda kao i o pravilno provedenim svim prethodnim operacijama.

Minimalno procesirano voće i povrće može se pakirati u vakuumu ili u modificiranoj atmosferi, a vrsta plastične folije u koju se pripremljeno voće i povrće treba upakirati ovisit će o svojstvima (kemijskim, fizikalnim) upotrijebljene sirovine. Polietilenski su filmovi propusni filmovi koji mogu produžiti vijek trajanja minimalno prerađenog voća i povrća, a razvijeni su i automatski sustavi za pakiranje. S razvojem automatskih sustava za pakiranja industrija plastičnih masa počela je dizajnirati materijale za pakiranje minimalno prerađenog voća i povrća. Početkom devedesetih godina prošlog stoljeća automatska oprema zajedno s novim filmovima (polimernim materijalima – folijama) omogućila je proizvođačima uvođenje pakiranja za minimalno procesirane proizvode (Piližota, 2010.).

2.4.4. Preporuke i standardi FAO i WHO

Voće, povrće i njihove prerađevine značajan su segment ljudske prehrane jer u kombinaciji s proizvodima od mesa, mlijeka, žitarica i plodova mora stvaraju preduvjete pravilne prehrane. S globalnog je stajališta voće i povrće prisutno u prehrani ljudi od Sjevernog do Južnog pola, ali je isto tako zanimljivo da su relativno veliki proizvođači voća i povrća zemlje u razvoju. U okviru organizacije UN-a prati se globalan razvoj proizvodnje i potrošnje hrane. Posebno je u tom pogledu značajna Komisija Codex Alimentarius sa sjedištem u Rimu koju su zajednički osnovale dvije organizacije Ujedinjenih naroda: FAO i WHO.

Cilj je Komisije Codex Alimentarius uspostaviti međunarodne standarde za hranu kao i davati preporuke i upute o zdravstvenoj sigurnosti prehrambenih proizvoda i pravednoj trgovini. Temeljni su ciljevi Komisije zaštita zdravlja potrošača, osiguranje jasnih pravila u trgovini hranom i usmjeravanje svjetske pozornosti na kvalitetu i sigurnost hrane. Navedena Komisija služi kao referentna institucija za standarde o sigurnosti hrane i propise o hrani, a također olakšava međunarodnu trgovinu hranom sprječavanjem neznanstvenih ograničenja zbog postojećih razlika u tradiciji, kulturi i zakonodavnom sustavu među državama (Lovrić, 2003.).

Povećanje konzumacije voća i povrća jedno je od globalnih prioriteta u svijetu. Jedan od najrasprostranjenijih nedostataka života suvremene civilizacije nepravilna je prehrana, nedostatak vitamina i minerala (mikronutrijenata) koji je uzrok mnogih bolesti kao što su različite malformacije tek rođene djece, mentalna i fizička retardacija, slabosti imunološkog sustava, sljepoća pa čak i smrti. Prema organizacijama FAO i WHO, dnevno je potrebno konzumirati 9-10 porcija voća i povrća.

Organizacije FAO i WHO utvrdile su kako se prosječno dnevno konzumira dvostruko manje voća i povrća od preporučene količine. Također je procijenjeno da oko tri milijuna ljudi umire zbog nedovoljnog konzumiranja voća i povrća (Lovrić, 2003.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK RADA

Zadatak rada bio je ispitati utjecaj eteričnih ulja kineskog češnjaka (*Allium tuberosum*) i kineskog cimeta (*Cinnamomum cassia*) i njihovih najzastupljenijih sastojaka dialil trisulfida i cinamaldehida na odabrane vrste plijesni *Aspergillus flavus* (soj 3.2758 i 3.4408) i *Aspergillus oryzae*. Zadatak je bio i ispitati učinkovitost eteričnog ulja kineskog cimeta i njegova najzastupljenijeg sastojka – cinamaldehida.

3.2. MATERIJAL I METODE

U radu su upotrijebljena eterična ulja kineskog češnjaka (*Allium tuberosum*) i kineskog cimeta (*Cinnamomum cassia*) proizvođača China Aroma Chemical Co., Ltd. (NR Kina) te sastojci dialil trisulfid (Chengdu Herbpurify Co., Ltd. (NR Kina) i cinamaldehyd (Kemika, Hrvatska). Eterična ulja i sastojci zajedno su pripremljeni otapanjem u 10%-tnoj otopini Tweenu 80 (Biolife, Italija), zatim u 96%-tnom etanolu (Kemika, Hrvatska) a potom demineraliziranoj vodi. Nakon otapanja otopina je sterilizirana filtriranjem kroz filtar veličine pora 0,22 µm i odmah upotrijebljena za eksperimentalni rad na grožđu.

U ovom su radu upotrijebljene i kulture plijesni vrste *Aspergillus flavus* (soj 3.2758 i 3.4408) i *A. oryzae* iz kineske kolekcije kultura mikroorganizama (Agricultural Culture Collection of China, Institute of Soil and Fertilization, Peking, NR Kina). Te su kulture plijesni održavane na kosom krumpirovu agaru s glukozom (PDA, Biolife, Italija) pri 4 °C u hladnjaku. Prije eksperimenta kulture plijesni precijepjene su na kosi PDA i inkubirane na 25 °C tijekom pet dana. Nakon inkubacije spore su prelivene 0,05%-tnom otopinom Tween 80 i prebrojene u Bürker–Türkovej komorici kako bi se dobila željena koncentracija spora od 1×10^4 ili 1×10^6 spora u 1 mL suspenzije.

3.2.1. Priprema podloge

Krumpirov agar s glukozom upotrijebljen je kao podloga za ispitivanje antifungalnog učinka navedenih plijesni. Nakon sterilizacije pri 121 °C tijekom 15 minuta i hlađenja na 50 °C u podlogu je dodan sterilni glicerol (Kemika, Hrvatska) kako bi se aktivitet vode podloge smanjio na željenu vrijednost 0,95 i 0,98. Aktivitet vode provjeren je pomoću Hygropalm aw1 (Rotronic Instrument Corp., SAD). Nakon hlađenja u podlogu su dodane željene koncentracije eteričnog ulja ili sastojka i, pomoću sterilne pipete, po 20 ml podloge preneseno je u sterilnu petrijevu zdjelicu. Nakon skrutnjavanja središte je nacijepjeno s 2 µl suspenzije spora koncentracije 1×10^6 spora/ml. Zdjelice su inkubirane pri 25 °C i izmjeren

je promjer kolonije plijesni u dva, međusobno okomita, smjera. Promjer kolonije plijesni mjeren je svaka 2 dana tijekom 28 dana. Iz dobivenih podataka određena je brzina rasta plijesni (u mm dan⁻¹). Analize su pripremljene u paralelama.

3.2.2. Ispitivanje utjecaja eteričnog ulja kineskog cimeta (*Cinnamomum cassia*) i cinamaldehida na odabrane vrste plijesni na grožđu sorte kardinal

Za *in situ* ispitivanje antifungalnog učinka eteričnog ulja kineskog cimeta i cinamaldehida odabrano je grožđe sorte kardinal (Erdutska vinarija, Hrvatska). Odmah nakon berbe pojedinačne su bobice (bez vidljivih oštećenja ili znakova infekcije) odvojene s grozdova i površinski sterilizirane potapanjem u 1%-tnu otopinu natrijeva hipoklorita (NaOCl) (v/v), potom 1 minutu u 70%-tnu otopinu etanola a zatim u sterilnu demineraliziranu vodu. Nakon ispiranja u sterilnoj demineraliziranoj vodi bobice su ocijeđene na sterilnim papirnatim ubrusima u laminaru, s uključenim uv svjetiljkama. Osušene bobice su ljepljivom trakom zalijepljene u sterilne plastične posude (po 8 u jednoj posudi). Svaka je bobica, na središnjem dijelu, ozlijeđena sterilnim čavličem od nehrđajućeg željeza do 2 mm dubine. U svaku je ozljedu preneseno po 10 µl suspenzije spora vrste *Aspergillus flavus* 3.2758 koncentracije 7 500 spora/ml i ostavljeno na sušenju tijekom 15 minuta u laminaru. Potom je na ozljedu preneseno po 10 µl otopine eteričnog ulja ili cinamaldehida u odabranim koncentracijama. Sterilne plastične posude u kojima su bobice grožđa bile zalijepljene i čuvane su pri 25 °C, a nakon 4. i 8. dana čuvanja prebrojene su bobice s vidljivom infekcijom. Iz dobivenih podataka određen je indeks učinkovitosti eteričnog ulja kineskog cimeta i cinamaldehida na grožđu kontaminirano plijesnima *A. flavus* 3.2758 i *A. oryzae* te izmjeren promjer kolonije plijesni vrste *A. flavus* 3.2758 i *A. oryzae* na grožđu tretiranom eteričnim uljem kineskog cimeta i cinamaldeiha.

3.2.3. Obrada podataka

Rezultati rada obrađeni su uz pomoć računalnih programa Microsoft® Office Excel 2003 za operacijski sustav Windows (Microsoft Corporation, Redmond, SAD) i GraphPad Prism verzija 5.00 za operacijski sustav Windows (GraphPad Software, San Diego, SAD). Utjecaj eteričnih ulja na rast plijesni obrađen je statističkom analizom varijance uz Bonferronijev post hoc test višestruke usporedbe pomoću programa GraphPad Prism.

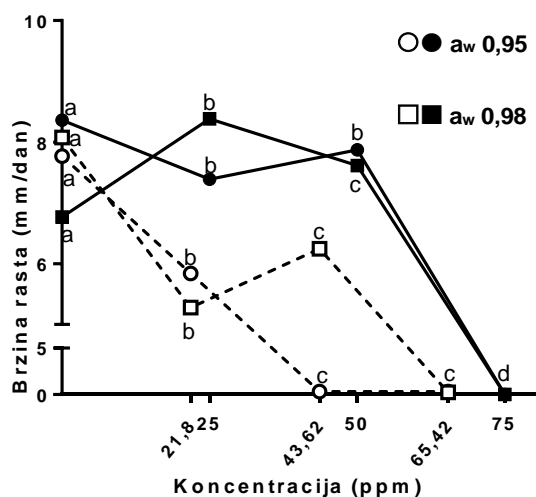
4. REZULTATI

4.1. SASTAV ETERIČNIH ULJA KINESKOG ČEŠNJAKA (*ALLIUM TUBEROSUM*) I KINESKOG CIMETA (*CINNAMOMUM CASSIA*)

Tablica 2 Sastav eteričnih ulja kineskog češnjaka (*Allium tuberosum*) i kineskog cimeta (*Cinnamomum cassia*)

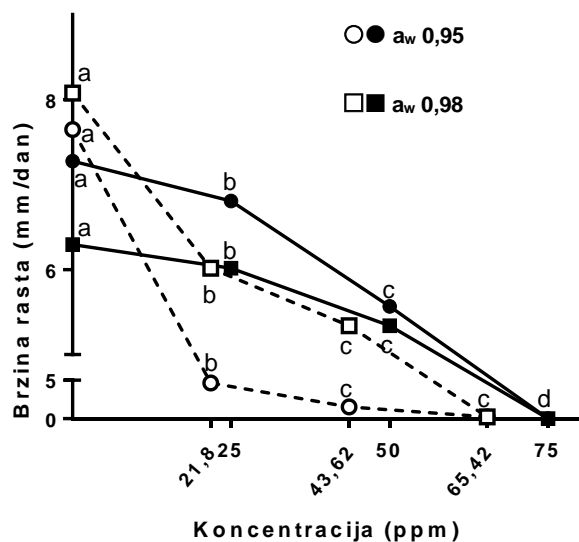
KINESKI ČEŠNJAK			KINESKI CIMET		
Sastojak	Retencijsko vrijeme (min)	Relativni udio (WT%)	Sastojak	Retencijsko vrijeme (min)	Relativni udio (WT%)
Alil klorid	1.6	-	Benzaldehis	2.20	0.75
Sulfid alil metil	2.58	0.80	Benzen propanal	3.67	1.69
Dialil sulfide	5.06	9.01	Cinamilalkol	4.53	1.36
Disulfid metil-2-propenil	6.33	1.63	Cinamaldehyd	6.09	87.23
Dialil disulfide	9.55	17.49	Kopaen	7.80	0.66
Metil-2-propenil-3-sulfid	10.25	7.68	δ -Kadinen	11.34	0.65
3-Vinil-1,2-ditiociklohex-5-ene	11.02	1.29	2-Propenal,3-(2-metoksifenil)-	11.77	0.96
Dialil trisulfid	11.88	40.05	α -Kadinol	15.15	0.62
Dialil tetrasulfid	14.09	7.19			
5-Etiltiazol	17.43	2.06			

4.2. UTJECAJ ETERIČNIH ULJA I SASTOJAKA NA LINEARNI RAST KOLONIJA PLIJESNI



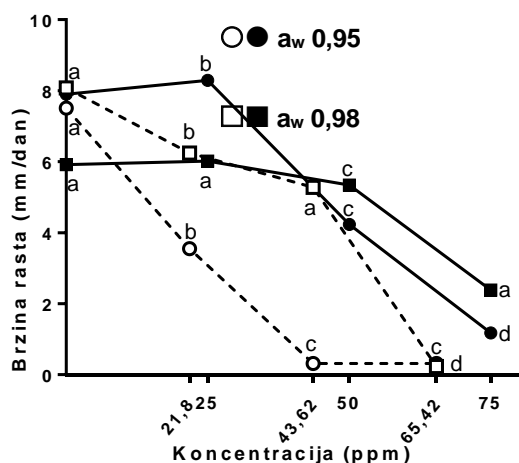
Slika 16 Utjecaj eteričnog ulja kineskog cimeta (*Cinnamomum cassia*) (●, ■) i cinamaldehida (○, □) na brzinu rasta plijesni vrste *Aspergillus flavus* 3.2758 pri aktivitetima vode 0,95 (●, ○) i 0,98 (■, □).

Rezultati označeni istim slovom za pripadajući a_w nisu statistički različiti ($p < 0,05$) prema Bonferronijevoj višestrukoj usporedbi.



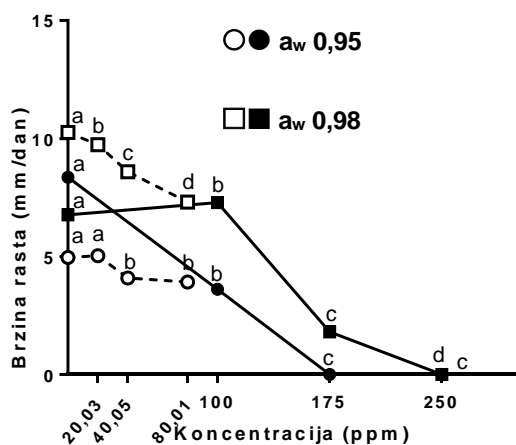
Slika 17 Utjecaj eteričnog ulja kineskog cimeta (*Cinnamomum cassia*) (●, ■) i cinamaldehida (○, □) na brzinu rasta plijesni vrste *Aspergillus flavus* 3.4408 pri aktivitetima vode 0,95 (●, ○) i 0,98 (■, □).

Rezultati označeni istim slovom za pripadajući a_w nisu statistički različiti ($p < 0,05$) prema Bonferronijevoj višestrukoj usporedbi.



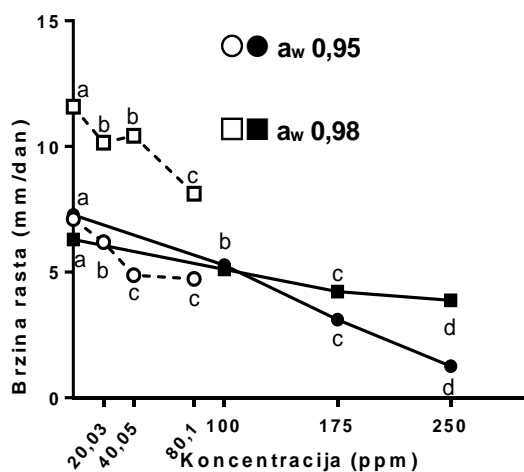
Slika 18 Utjecaj eteričnog ulja kineskog cimeta (*Cinnamomum cassia*) (●, ■) i cinamaldehida (○, □) na brzinu rasta plijesni vrste *Aspergillus oryzae* pri aktivitetima vode 0,95 (●, ○) i 0,98 (■, □).

Rezultati označeni istim slovom za pripadajući a_w nisu statistički različiti ($p < 0,05$) prema Bonferronijevoj višestrukoj usporedbi.



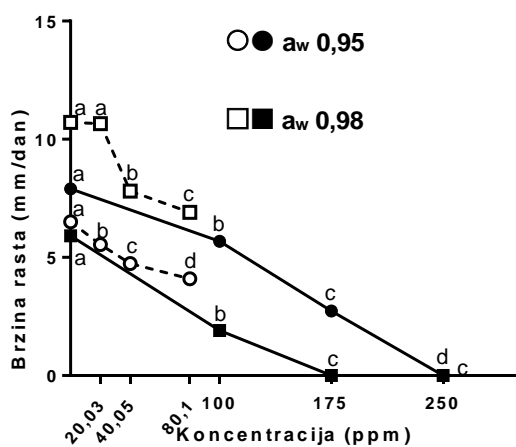
Slika 19 Utjecaj eteričnog ulja kineskog češnjaka (*Allium tuberosum*) (●, ■) i dialil trisulfida (○, □) na brzinu rasta plijesni vrste *Aspergillus flavus* 3.2758 pri aktivitetima vode 0,95 (●, ○) i 0,98 (■, □).

Rezultati označeni istim slovom za pripadajući a_w nisu statistički različiti ($p < 0,05$) prema Bonferronijevoj višestrukoj usporedbi.



Slika 20 Utjecaj eteričnog ulja kineskog češnjaka (*Allium tuberosum*) (●, ■) i dialil trisulfida (○, □) na brzinu rasta plijesni vrste *Aspergillus flavus* 3.4408 pri aktivitetima vode 0,95 (●, ○) i 0,98 (■, □).

Rezultati označeni istim slovom za pripadajući a_w nisu statistički različiti ($p < 0,05$) prema Bonferronijevoj višestrukoj usporedbi.

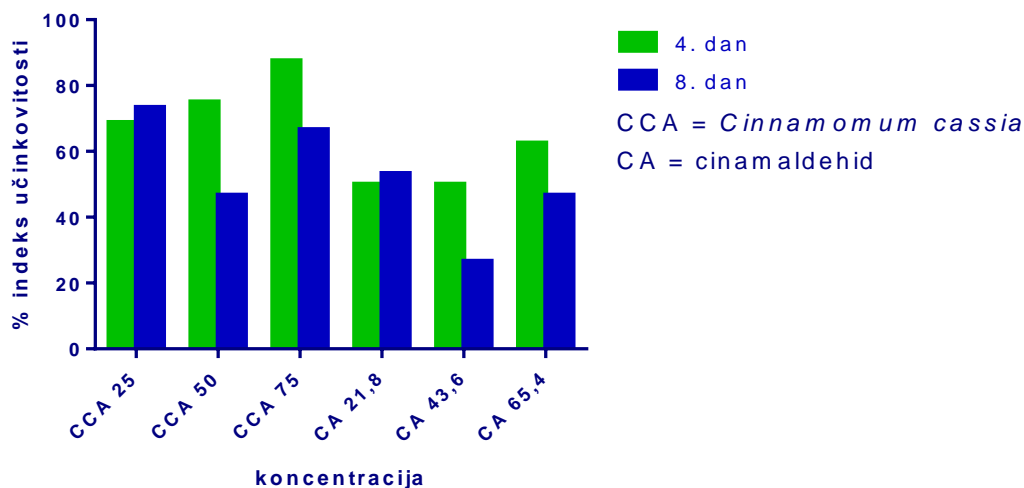


Slika 21 Utjecaj eteričnog ulja kineskog češnjaka (*Allium tuberosum*) (●, ■) i dialil trisulfida (○, □) na brzinu rasta plijesni vrste *Aspergillus oryzae* pri aktivitetima vode 0,95 (●, ○) i 0,98 (■, □).

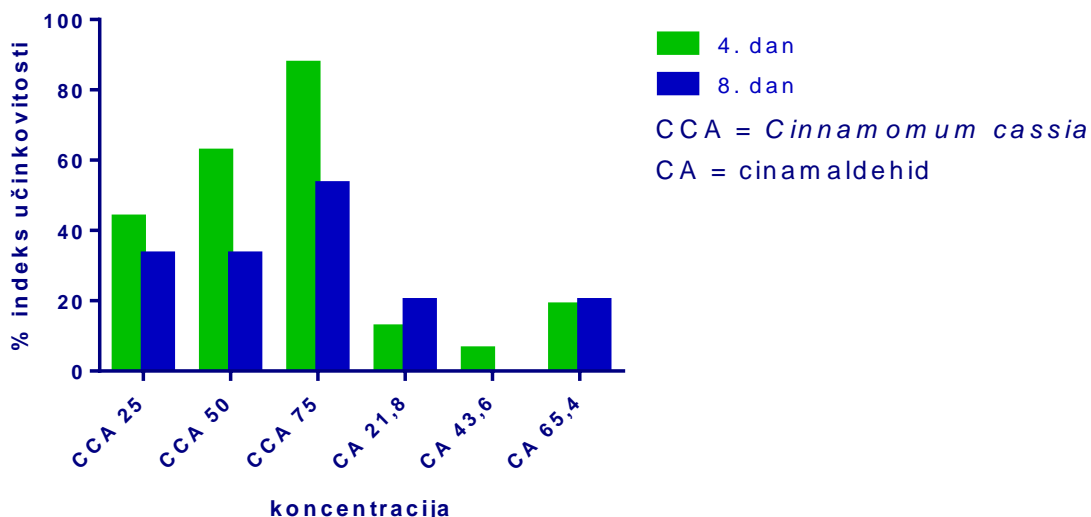
Rezultati označeni istim slovom za pripadajući a_w nisu statistički različiti ($p < 0,05$) prema Bonferronijevoj višestrukoj usporedbi.

4.3. UČINKOVITOST ETERIČNOG ULJA KINESKOG CIMETA (*CINNAMOMUM CASSIA*) I CINAMALDEHIDA NA GROŽĐU KONTAMINIRANO PLIJESNIMA

Indeks učinkovitosti eteričnog ulja kineskog cimeta i cinamaldehida

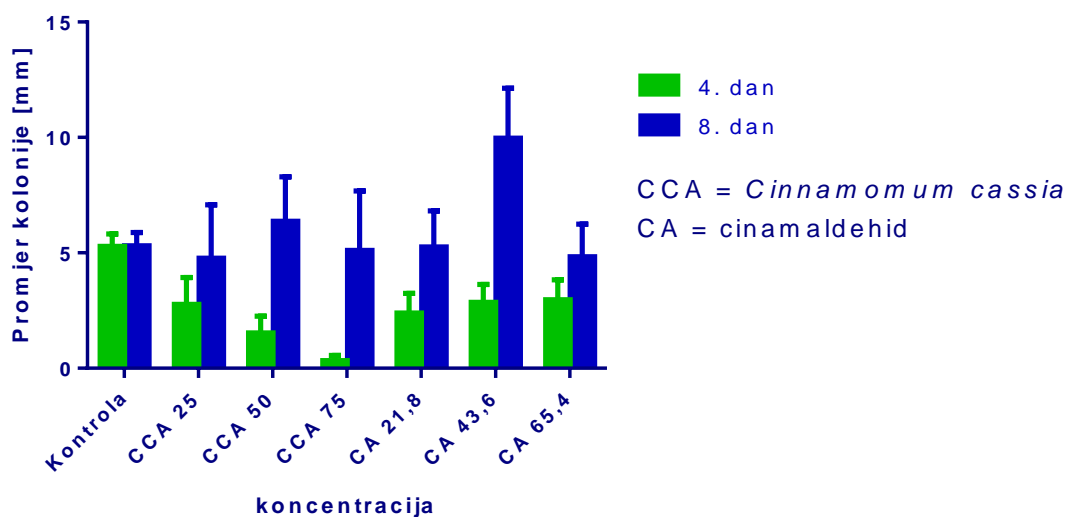


Slika 22 Indeks učinkovitosti eteričnog ulja kineskog cimeta i cinamaldehida na grožđu kontaminiranom vrstom *A. flavus* 3.2758

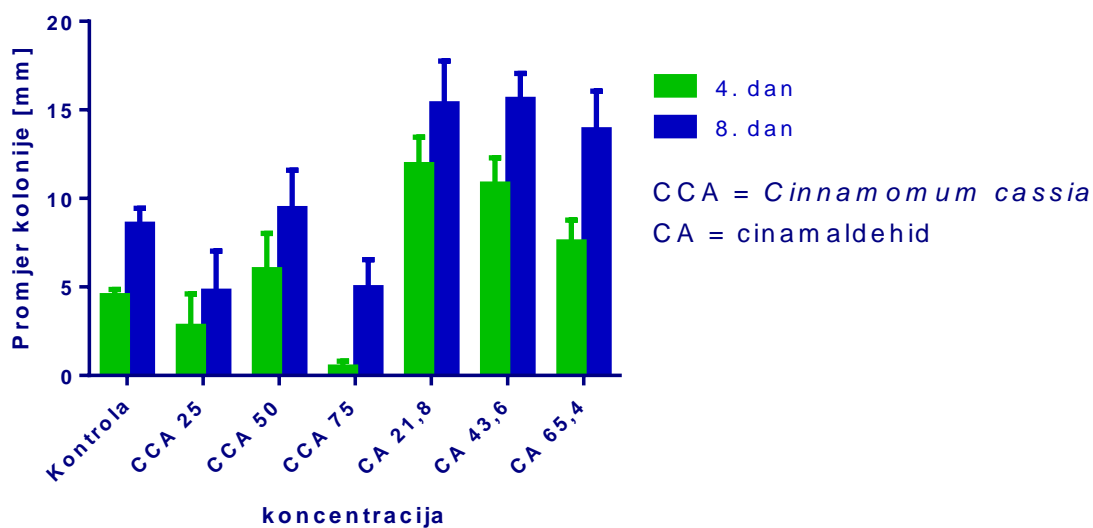


Slika 23 Indeks učinkovitosti eteričnog ulja kineskog cimeta i cinamaldehida na grožđu kontaminiranom vrstom *A. oryzae*

Promjer kolonije plijesni



Slika 24 Promjer kolonije plijesni vrste *A. flavus* 3.2758 na grožđu tretiranom eteričnim uljem kineskog cimeta i cinamaldehyda



Slika 25 Promjer kolonije plijesni vrste *A. oryzae* na grožđu tretiranom eteričnim uljem kineskog cimeta i cinamaldehyda

5. RASPRAVA

Eterično ulje kineskog češnjaka relativno je složenog sastava (**Tablica 2**). Od 10 spojeva prisutnih u analiziranom ulju najzastupljeniji je dialil trisulfid (40,05%), spoj koji je upotrijebljen i za nastavak istraživanja, tj. ispitivanje utjecaja na linearni rast kolonija plijesni. Drugi je spoj po zastupljenosti dialil disulfid čiji udjel iznosi 17,49%. U usporedbi s tim spojevima, ostali spojevi eteričnog ulja kineskog češnjaka čine manje od 10% pri čemu se, prema postotku, najviše ističu dialil sulfid (9,01%), metil – 2 propenil – 3 – sulfid (7,68%) i dialil tetrasulfid (7,19%). Ostali spojevi u eteričnom ulju prisutni su u nižim postotcima (do 2%).

S druge strane, eterično ulje kineskog cimeta nešto je jednostavnijeg sastava. U usporedbi s eteričnim uljem češnjaka, detektirano je 8 sastojaka eteričnog ulja kineskog cimeta. Najzastupljeniji je sastojak cinamaldehyd koji čini 87,27% svih sastojaka tog ulja. Stoga je i korišten za daljnja ispitivanja, inhibiciju linearnog rasta kolonije plijesni te antifungalni utjecaj na bobice grožđa. Od ostalih sastojaka mogu se izdvojiti benzenopropanal i cinalimalkohol s 1,69 i 1,36%, a ostali su sastojci prisutni u manjem postotku.

Ispitivanje antifungalnog učinka eteričnih ulja kineskog češnjaka i cimeta te njihovih najzastupljenijih sastojaka ispitan je u prvoj fazi. U prvoj je fazi ispitana inhibicija linearnog rasta kolonije svih ispitanih vrsta (i sojeva) plijesni, a u drugoj je fazi određen antifungalni učinak eteričnog ulja kineskog cimeta i cinamaldehyda na grožđu.

Iz **Slike 16** može se uočiti kako eterično ulje kineskog cimeta slabije od čistog sastojka cinamaldehyda inhibira plijesan *A. flavus* soja 3.2758. Nadalje, iz prikazanih se rezultata može uočiti kako porastom koncentracije eteričnog ulja kineskog cimeta ili sastojka cinamaldehyda brzina rasta plijesni opada ili je njezin rast potpuno zaustavljen (vrijeme inkubacije i praćenja rasta kolonije plijesni bilo je 28 dana, što ne isključuje mogućnost rasta i nakon tog razdoblja). Koncentracije cinamaldehyda upotrijebljene za ispitivanje antifungalnog učinka odabrane su na temelju rezultata zastupljenosti tog sastojka u eteričnom ulju kineskog cimeta. Između analiziranih uzoraka eteričnog ulja i sastojaka primijećena je statistički značajna razlika, a post hoc analizom utvrđeno je koje su koncentracije eteričnog ulja kineskog cimeta i sastojka cinamaldehyda statistički značajne (pri razini značajnosti $p < 0,05$) primjenom Graph Prism računalnog programa i interpretacija rezultata vezano uz aktivitet vode.

Na **Slici 17** na kojoj je prikazan utjecaj eteričnog ulja kineskog cimeta i cinamaldehyda na drugi soj vrste *A. flavus* (3.4408) može se primijetiti slabiji (ili sporiji) rast u usporedbi sa sojem 3.2758) rast što se očituje manjom brzinom rasta plijesni. Ispitani soj plijesni, iako pripada istoj vrsti, ima drukčije značajke što se očituje i njegovim sporijim rastom. Iz tog je razloga eksperiment s infekcijom grožđa proveden s vrstom koja brže raste – *A. flavus*

3.2758. I u tom je slučaju sastojak eteričnog ulja kineskog cimeta – cinamaldehyd djelovao inhibitorno na ispitani soj plijesni. Utvrđena je i statistički značajna razlika kao posljedica primjene različitih koncentracija eteričnog ulja kineskog cimeta i cinamaldehyda. I aktivitet vode važan je parametar koji utječe na aktivnost eteričnog ulja kineskog cimeta i cinamaldehyda. Može se uočiti kako je aktivnost cinamaldehyda pri nižem aktivitetu vode veća od aktivnosti cinamaldehyda iste koncentracije pri višem aktivitetu vode. Iako se razlika u aktivitetu vode od 0,3 jedinice ne čini velika (0,98 u odnosu na 0,95), u mikrobiologiji namirnica i prehrambenoj tehnologiji može biti vrlo značajna. Snižavanje aktiviteta vode, uz dodatak različitih spojeva (u ovom slučaju eteričnog ulja ili sastojka eteričnog ulja), može spriječiti ili značajno usporiti rast kontaminanata.

Vrsta plijesni *Aspergillus oryzae* slična je i morfološki i prema rastu vrsti *A. flavus*, posebno soju 3.2758, stoga je upotrijebljena i za daljnje eksperimente s groždem (**Slika 18**). Iz priloženih rezultata moguće je uočiti kako porastom koncentracije ispitanog eteričnog ulja kineskog cimeta, kao i cinamaldehyda, dolazi do sve snažnije inhibicije rasta plijesni. I ovdje se cinamaldehyd pokazao kao snažniji spoj u inhibiciji rasta plijesni, iako se taj njegov učinak smanjuje s povećanjem aktiviteta vode. Općenito se može reći kako je u uvjetima veće slobodne vode potrebna manja koncentracija antifungalnih spojeva u inhibiciji rasta plijesni, u usporedbi s okolišem gdje vlada niži aktivitet vode.

Djelovanje eteričnog ulja kineskog češnjaka kao i njegova sastojka dialil trisulfida na plijesan *A. flavus* 3.2758 (**Slika 19**) slabije je u usporedbi s djelovanjem eteričnog ulja kineskog cimeta kao i sastojka cinamaldehyda na istu plijesan. Koncentracije eteričnog ulja kineskog češnjaka kao i njegova sastojka dialil trisulfida koje djeluju inhibitorno veće su od onih koje su potrebne za inhibitorno djelovanje eteričnog ulja cimeta i sastojka cinamaldehyda. U ovom slučaju eterično ulje kineskog češnjaka djeluje snažnije od eteričnog ulja kineskog cimeta na inhibiciju rasta plijesni *A. flavus* 3.2758.

Sličan se utjecaj može uočiti i u rastu plijesni soja *A. flavus* 3.4408 (**Slika 20**). Iz rezultata se može uočiti kako je sastojak dialil trisulfid, posebno pri a_w 0,98, značajno slabije inhibirao rast plijesni u usporedbi s eteričnim uljem češnjaka i nižim aktivitetom vode od 0,95. I na vrstu plijesni *A. oryzae* eterično ulje češnjaka djeluje snažnije od sastojka dialil trisulfida (**Slika 21**). Za potrebe ispitivanja učinka eteričnih ulja i sastojaka na bobinama grožđa upotrijebljeno je eterično ulje kineskog cimeta (*Cinnamomum cassia*) i cinamaldehyd stoga što je, senzorski, kompatibilniji od ulja kineskog češnjaka. Ispitivao se i učinak eteričnog ulja i učinak vrsta plijesni: *A. flavus* soj 3.2758 koji posjeduje brži porast od soja 3.4408 i vrsta *A. oryzae*.

Za razliku od rezultata ispitivanja učinkovitosti eteričnog ulja kineskog cimeta i cinamaldehida na plijesan *A. flavus* (soj 3.2758) kojom je zaražena/nacijepljena umjetna hranjiva podloga (PDA agar), a koji pokazuju da je cinamaldehyd učinkovitiji od eteričnog ulja kineskog cimeta, rezultati ispitivanja učinkovitosti istih sastojaka na istu plijesan kojom su zaražene/nacijepjene bobice grožđa (prikazani na **Slici 22**) pokazuju kako je eterično ulje kineskog cimeta učinkovitije od cinamaldehida.

Razlog toj razlici može biti u drukčijem/različitom supstratu (grožđe je složeniji supstrat od homogene podloge s eteričnim uljem – PDA) i u samom eksperimentalnom postupku (eksperiment s bobicama grožđa koji uključuje probijanje opne grožđa, složeniji je od eksperimenta s izravnim naciepljivanjem u središte PDA). Nadalje, veća je učinkovitost pri 4. u usporedbi s 8. danom čuvanja. To je očekivano jer spore koje nisu proklijale nakon 4. dana mogu porasti i stvoriti koloniju koja se uočava kao porast micelija. Indeks učinkovitosti određen je u usporedbi s kontrolnim uzorcima bobica koje su naciepljene suspenzijom plijesni, a bez tretiranja eteričnim uljem ili sastojkom.

Vrsta plijesni *A. oryzae* pokazala se znatno otpornijom u usporedbi s plijesni *A. flavus* sojem 3.2758 (**Slika 23**). Najveća je koncentracija ulja i najvećeg indeksa učinkovitosti, dok su primijenjene koncentracije cinamaldehida pokazale vrlo nisku učinkovitost u inhibiciji rasta *A. oryzae*. Tomu može biti razlog povoljniji supstrat za rast, što svakako ulazi u razlike između dviju analiziranih vrsta plijesni.

Ova razlika još je uočljivija ako se promatraju promjeri kolonija plijesni *A. oryzae* i *A. flavus* soj 3.2758 oko mjesta uboda (**Slike 24 i 25**). Lako se može uočiti inhibitorni učinak eteričnog ulja cimeta na *A. flavus* 3.2758 u 4. danu, a koji prestaje nakon 4. dana, i plijesan u 8. danu, bez obzira na koncentraciju ulja, ima gotovo jednak promjer. Cinamaldehyd je na *A. flavus* 3.2758 u 4. danu djelovao podjednako (neovisno o koncentraciji) međutim 8. dana u uzorku koncentracije 43.6 ppm došlo je do stimulacije rasta plijesni što je rezultiralo najvećim promjerom kolonije plijesni na analiziranim bobicama. Kod plijesni vrste *A. oryzae* slična se stimulacija rasta može primijetiti kod srednje koncentracije eteričnog ulja kineskog cimeta (promjera 50 ppm) (**Slika 25**), iako se u ostalim rezultatima ove vrste može lakše uočiti očekivani rezultat – porast koncentracije znači i manji promjer plijesni. Istraživanja prirodnih antifungalnih smjesa i spojeva sve su važniji dio moderne prehrambene tehnologije. Minimalno procesirano voće često se može kontaminirati brojnim mikroorganizmima te im se, pomoću prirodnih sastojaka, može produžiti rok trajanja.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovi dobivenih rezultata iz ovog se rada može zaključiti sljedeće:

1. Eterično ulje kineskog cimeta je pokazao snažniji antifungalni učinak prema vrstama plijesni *Aspergillus flavus* i *Aspergillus oryzae* na krumpirovom agaru s glukozom u usporedbi s eteričnim uljem kineskog češnjaka.
2. Cinamaldehyd snažnije inhibira rast plijesni na krumpirovu agaru s glukozom od eteričnog ulja kineskog cimeta.
3. Dialil trisulfid slabije inhibira rast plijesni na krumpirovu agaru s glukozom od eteričnog ulja kineskog češnjaka.
4. Pri nižem aktivitetu vode (0,95) rast plijesni snažnije je inhibiran eteričnim uljima ili sastojcima nego pri višem aktivitetu vode (0,98).
5. Eterično ulje kineskog cimeta inhibira rast vrste plijesni *A. flavus* 3.2758 na grožđu snažnije nego rast vrste plijesni *A. oryzae*

7. LITERATURA

Alizadeh B, Royandazagh SD, Khawar KM, Özcan S: Micropropagation of garlic chives (*Allium tuberosum* Rottl. ex Sprang) using mesocotyl axis. *The Journal of Animal & Plant Sciences* 23:543-549, 2013.

Aphotoflora – slika biljke *Allium tuberosum*:

http://aphotoflora.com/mon_allium_tuberosum_chinese_chives.html [18.11.2013.]

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

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

Chien WY, Shioh WY, Chitsun C: Increasing antioxidant activity and reducing decay of blueberries by essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:3587-3592, 2008.

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

Del Nobile MA, Conte A, Scrocco C, Brescia I, Speranza B, Sinigaglia M, Perniola R, Antonacci D: A study on quality loss of minimally processed grapes as affected by film packaging. *Postharvest Biology and Technology* 51:21-26, 2009.

Delaš F: Mikrobni toksini. U *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani*. Hrvatska agencija za hranu, Osijek, 2010.

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

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

Hu G, Sheng C, Mao R, Ma Z, Lu Y, Wei D: Essential oil composition of *Allium tuberosum* seed from China. *Chemistry of Natural Compounds*, 48:1091-1092, 2013.

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

- Hoehn AN, Stockert AL: The effects of *Cinnamomum cassia* on blood glucose values are greater than those of dietary changes alone. *Nutrition and Metabolic Insights* 5:77-83, 2012.
- Jokić I: *Plijesni - mikotoksini*. Ministarstvo zdravlja, 2013.
http://www.zdravlje.hr/zdravlje/hrana_prehrana_i_zdravlje/plijesni_mikotoksini
[12.9.2013.]
- Lanciotti R, Gianotti A, Patrignani F, Belletti N, Guerzoni ME, Gardini F: Use of natural aroma compounds to improve shelflife and safety of minimally processed fruits. *Trends in Food Science & Technology* 15:201-208, 2004.
- Lelas V: Nove tehnike procesiranja hrane. *Mljekarstvo* 56:311-330, 2006.
- Lovrić T: *Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva*. Hinus, Zagreb, 2003.
- Magan N, Aldred D: Why the fungi produce mycotoxins. U *Food Mycology : a multifaceted approach to fungi and food*. CRC Press, New York, 2010.
- Martínez-Romero D, Guillén F, Valverde JM, Bailén G, Zapata P, Serrano M, Castillo S, Valero D: Influence of carvacrol on survival of *Botrytis cinerea* inoculated in table grapes. *International Journal of Food Microbiology* 115:144-148, 2007.
- Microbiology Division – slika Mikroskopska slika plijesni *Aspergillus oryzae*:
<http://www.nrib.go.jp/English/annai/introduce/microorganism.htm> [19.11.2013.]
- Nature's kiss products – slika eteričnog ulja *Cassia essential oil (Cinnamomum cassia)*:
<http://natureskissproducts.com/products/natures-kiss-cassia-essential-oil-10-ml>
[18.11.2013.]
- Nujčić M: Antifungalni učinak eteričnih ulja *Cinnamomum cassia* i *Litsea cubeba* na odabrane plijesni roda *Penicillium* pri a_w 1 i 0,95. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2011.
- Nguefack J, Leth V, Amvam Zollo PH, Mathur SB: Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology* 94:329-334, 2004.
- Pavlović H: *Mikrobiologija hrane*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2011/12.

Piližota V: *Minimalno procesirana hrana*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2010.

Pitt JI, Hocking AD: *Fungi and Food Spoilage*. Springer, New York, 2009.

Rodríguez A, Batlle R, Nerín C: The use of natural essential oils as antimicrobial solutions in paper packaging. Part II. *Progress in Organic Coatings* 60:33-38, 2007.

Sánchez-González L, González-Martínez C, Chiralt A, Cháfer M: Physical and antimicrobial properties of chitosan–tea tree essential oil composite films. *Journal of Food Engineering* 98:443-452, 2010.

Solomakos N, Govaris A, Koidis P, Botsoglou N: The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. *Meat Science* 80:159-166, 2008.

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

Toptropicals plant catalog – slika biljke *Cinnamomum cassia*:

<http://toptropicals.com/pics/garden/06/6/6025.jpg> [18.11.2013.]

Microfungi Research. Truman State University - slika plijesni *Aspergillus oryzae*:

<http://microfungi.truman.edu/showGallery.php?div=Anamorphic&gen=Aspergillus&spec=oryzae&id=137> [19.11.2013.]

Uyttendaele M, Neyts K, Vanderswalmen H, Notebaert E, Debevere J: Control of *Aeromonas* on minimally processed vegetables by decontamination with lactic acid, chlorinated water, or thyme essential oil solution. *International Journal of Food Microbiology* 90:263-71, 2004.

Valero M, Giner MJ: Effects of antimicrobial components of essential oils on growth of *Bacillus cereus* INRA L2104 in and the sensory qualities of carrot broth. *International Journal of Food Microbiology* 106:90-94, 2006.

Zdravlje - slika Začinski štapić *Cinnamomum cassia* (kineski cimeti):

<http://zdravlje.hzjz.hr/clanak.php?id=13322> [18.11.2013.]