Antifungalni učinak različitih spojeva na odabrane vrste kvasaca roda Candida

Martinović, Marijana

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:109:363637

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Marijana Martinović

ANTIFUNGALNI UČINAK RAZLIČITIH SPOJEVA NA ODABRANE VRSTE KVASACA RODA *Candida*

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 mikrobiologiju
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Mikrobiologija hrane
Tema rada je prihvaćena na VIII. sjednici Odbora za završne i diplomske ispite održanoj 28. 05. 2013. godine
Mentor: izv. prof. dr. sc. Hrvoje Pavlović
Pomoć pri izradi: Vedran Gradvol, dipl. ing.

Antifungalni učinak različitih spojeva na odabrane vrste kvasaca roda *Candida*

Marijana Martinović, 121-DI

Sažetak: U radu je ispitan antifungalni učinak natrij hidrogenkarbonata, vodikovog peroksida, eteričnog ulja čajevca i borne kiseline na odabrane vrste kvasaca roda *Candida*: *C. albicans, C. famata* i *C. krusei*. Najosjetljivija vrsta kvasca na odabrane antifungalne spojeve je vrsta *C. famata*, potom slijede *C. albicans* i, najotpornija vrsta, *C. krusei*. Najveće odumiranje stanica istraženih vrsta kvasaca uzrokuju veće koncentracije odabranih spojeva (1000 i 2500 ppm), što je posebno izraženo u 24. satu inkubacije, u usporedbi s kontrolnim uzorkom. Broj stanica se smanjuje s 10^4 na 10 ili 10^2 stanica u mL suspenzije, ovisno o osjetljivosti kvasca i primijenjenoj koncentraciji.

Ključne riječi: *Candida*, antifungalni učinak, $NaHCO_3$, H_2O_2, ulje čajevca, H_3BO_3

Rad sadrži:
47 stranica
26 slika
1 tablica
0 priloga
35 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:
1. doc. dr. sc Dajana Gašo Sokač – predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Hrvoje Pavlović – mentor
3. doc. dr. sc. Natalija Velić – član
4. doc. dr. sc. Lidija Lenart – zamjena člana

Datum obrane: 31. siječnja 2014. godine

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

graduate thesis

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Food Microbiology
Subdepartment of Microbiology
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Food microbiology
Thesis subject was approved by the Council of the Faculty of Food Technology Osijek at its session no II. held on November 28th, 2013.
Mentor: Hrvoje Pavlović, PhD, associate prof.
Technical assistance: Vedran Gradvol, MSc, assistant

Antifungal effect of selected compounds on species of *Candida* spp.
Marijana Martinović, 121-DI

Summary: Antifungal effect of sodium bicarbonate, hydrogen peroxide, tea tree essential oil and boric acid on selected yeasts species *Candida* genera: *C. albicans, C. famata* and *C. krusei* was tested. The most susceptible yeast species on tested antifungal compounds was *C. famata,* following *C. albicans* while *C. krusei* was the most resistant specie of tested yeasts. Higher concentrations of tested compounds (1000 and 2500 ppm) reduced cell counts of tested yeasts in higher extent, especially pronounced at 24th hour of incubation period, compared to control sample. Cell counts are reduced from 104 to 10 or 102 cells per mL suspension, depending on yeast susceptibility and applied concentration of antifungal compound.

Key words: *Candida*, antifungal effect, $NaHCO_3$, H_2O_2, tea tree oil, H_3BO_3

Thesis contains: 47 pages
26 figures
1 tables
0 supplements
35 citations

Original in: Croatian

Defense committee:
1. Dajana Gašo Sokač, PhD, assist. prof. – chair
2. Hrvoje Pavlović, PhD, assoc. prof. – supervisor
3. Natalija Velić, PhD, assist. prof. – member
4. Lidija Lenart, PhD, assist. prof. – stand in

Defense date: January 31st 2014.
Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 3

2.1. Opća svojstva i predstavnici kvasaca 4

2.1.1. Klasifikacija kvasaca 6

2.2. Stanište 10

2.3. Značaj kvasaca u životu ljudi 11

2.3.1. Patogeni kvasci 12

2.4. Opća svojstva odabranih kvasaca 13

2.4.1. *Candida albicans* 14

2.4.2. *Candida famata* 15

2.4.3. *Candida krusei* 16

2.5. Inhibicija i inaktivacija kvasaca 17

2.5.1. Utjecaj topline 17

2.5.2. Hlađenje i smrzavanje 17

2.5.3. Dehidratacija (sušenje) 17

2.5.4. Zračenje (iradijacija) 18

2.5.5. Alternativne i nove tehnologije konzerviranja 18

2.5.6. Inaktivacija kemijskim sredstvima 19

2.5.7. Sanitarna sredstva i dezinficijensi 19

2.5.8. Borna kiselina 20

2.5.9. Natrij hidrogenkarbonat 20

2.5.10. Ulje čajevca 22

2.5.11. Vodikov peroksid 22

3. EKSPERIMENTALNI DIO 24

3.1. Zadatak 25

3.2. Materijali i metode 25

3.2.1. Kulture mikroorganizama 25

3.2.2. Priprema antifungalnih spojeva/tvari 25

3.2.3. Određivanje antifungalnog učinka 26

3.2.3.1. Određivanje zone inhibicije 26

3.2.3.2. Određivanje promjene broja stanica kvasaca 26

3.3. Obrada rezultata 27

4. REZULTATI 28

5. RASPRAVA 37

6. ZAKLJUČCI 42

7. LITERATURA 44

1. Uvod

Istražujući svijet mikroorganizama jedna od mnogih stvari koja se može uočiti je njihova izuzetna raznolikost u strukturi, funkciji, staništu i upotrebi. Nastanjuju svaki kutak zemlje, prijeko su potrebni za život na Zemlji, osnova su za različite industrijske procese ali isto tako i odgovorni za neke od smrtonosnih bolesti. Kvasci su bez sumnje najvažnija skupina mikroorganizama koja se koristi u komercijalne svrhe. Imaju važnu ulogu u proizvodnji fermentirane hrane i pića ali isto tako služe kao izvor različitih spojeva koji se primjenjuju u biotehnologiji.

Kvasci pripadaju carstvu Fungi, zajedno sa plijesnima i mesnatim gljivama. To su jednostanične gljive čije se stanice nazivaju blastokondije, a mogu bit izdužene, ovalne ili okrugle te različite veličine od 2 do 50 μm ovisno o uvjetima rasta. U odnosu na gljive kao grupe mikroorganizama kojih ima više tisuća vrsta, kvasci su relativno mala grupa mikroorganizama. Ukupno je do sada poznato i priznato oko 800 vrsta kvasaca a najpoznatiji rodovi iz razreda *Ascomycetes* su: *Saccahromyces, Pichia, Hansenula*; iz razreda *Basidomycetis*: *Filobasidiela, Rhodotorula* te iz razreda *Deutermycetes*: *Candida*, *Cryptococcus* te *Torulopsis*.

Od kvasaca za industriju su od posebnog značaja vrste iz roda *Candida.* Pripadnici ovog roda imaju značajnu ulogu u proizvodnji hrane i piće (fermentacije u pivu, vinu i voćnim sokovima), ali također pojedini rodovi pokazuju i antifungalnu (što će omogućiti da budu iskorišteni kao lijekovi) i probiotičku aktivnost. No postoje i kvasci iz ovog roda koji mogu biti i nepoželjni zato što u industriji imaju štetnu ulogu kod kvarenja procesirane i uskladištene hrane. Ovi kvasci mogu biti patogeni i za ljude i životinje, te izazivaju bolesti poznate pod imenom kandidoze**.**

Cilj rada bio je ispitati antifungalni učinak različitih kemijskih spojeva: vodikova peroksida, borne kiseline, natrij hidrogenkarbonata i ulja čajevca na odabrane vrste *Candida*: *C. albicans, C. famata* i *C. krusei*.

2. Teorijski dio

2.1. Opća svojstva i predstavnici kvasaca

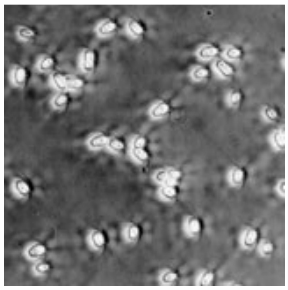
Pojam kvasac se ne može točno definirati iako se često upotrebljava taj termin u znanstvenoj literaturi. U engleskom jeziku kaže se yeast što je zapravo izvedeno iz njemačke riječi gist što predstavlja pjenu koja se stvara tijekom proizvodnje piva. Također se može povezati i s ostalim riječima koje dolaze npr. iz francuskog jezika poput riječi levure koja je povezana sa ulogom kvasca kod fermentacije odnosno dizanja tijesta (Deák, 2007.).

Kvasci su eukariotske jednostanične mikrogljivice široko rasprostranjene u prirodi. Poznato je oko 800 vrsta kvasaca, ali taj broj predstavlja samo mali djelić biološke raznolikosti kvasaca na Zemlji. Mogu se razvrstati i karakterizirati prema različitim kriterijima koji se temelje na staničnoj morfologiji (način diobe stanica, oblik spora), fiziologiji, imunologiji i molekularnoj biologiji. Već tisućljećima godina upotrebljavaju se u proizvodnji piva, vina i kruha. Najviše upotrebljavani i proučavani kvasac je *Saccharomyces cerevisiae*, poznatiji kao pekarski kvasac a pripada carstvu gljiva, razred *Ascomycetes*. Ostali rodovi kvasaca zastupljeni su u razredima *Basidomycetis* (*Filobasidiela, Rhodotorula)* te u razredu *Deutermycetes* (*Candida*, *Cryptococcus, Malassezia* te *Torulopsis)*. *Saccharomyces cerevisiae* se razmnožava pupanjem dok se druge vrste mogu razmnožavati dijeljenjem i formiranjem hifa i pseudohifa kao što je to kod dimorfnih kvasaca za čijeg predstavnika se može navesti patogeni kvasac *Candida albicans*. Značajke kvasaca kao što je jednostavan rast, podobnost za biokemijske, genetske, molekularno biološke analize čine kvasce dobrim modelom za proučavanje stanične biologije eukariota. Njihovim istraživanjem daje se uvid u ljudsku genetiku i razumijevanje ljudskih nasljednih poremećaja (Schaechter, 2004.).



Slika 1. Stanice kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (http://www.psmicrographs.co.uk, 2013.).

Veličina kvasca varira ovisno o vrsti i uvjetima rasta. Neki kvasci mogu biti duljine 2 do 3 µm dok drugi mogu postići i duljine između 20 i 50 µm. Širina stanica manje varira, između 1 i 10 µm. Oblici stanica mogu biti različiti poput elipse, okrugli, cilindrični, zakrivljeni, oblik limuna ili niti. Neke vrste kvasaca sadrže pigmente pa se na njihovim uzgojenim kolonijama mogu uočiti različite boje: kremasta (*Saccharomyces cerevisiae*), bijela (*Geotrichum* spp.), crna (*Aureobasidium pullulans)*, crvena (*Rhodotorula* spp.), narančasta (*Rhodosporidium* spp.) i žuta (*Bullera* spp.). Neki pigmenti kvasaca se koriste u biotehnologiji, kao npr. pigment astaksantin u *Phaffia rhodozyma*, koji se koristi za bojanje hrane za ribe i to posebno lososa, budući da uzgojeni losos ne može sintetizirati ružičasti pigment.

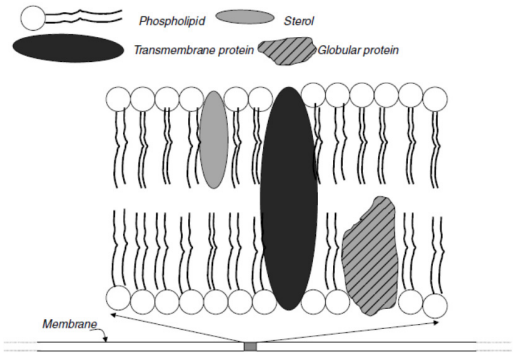


Slika 2. Ovalne stanice kvasca *Candida* (http://www.igb.fraunhofer.de, 2005.).

Za rast i razvoj kvasci zahtijevaju makroelemente (izvore ugljika, dušika, kisika, sumpora, fosfora, magnezija i kalija) u milimolarnim udjelima i elemente u tragovima (kalcij, bakar, željezo, mangan, cink) u mikromolarnim udjelima. Većina kvasaca raste vrlo dobro u podlogama koji sadrže ugljik i dušikove spojeve zajedno sa anorganskim ionima i nekoliko faktora rasta (Schaechter, 2004.). Od spojeva sa dušikom najviše koriste amonijeve soli jer ih mogu najbrže iskoristiti, ali isto tako mogu koristiti i različite organske dušikove spojeve, osobito aminokiseline i ureu (Bamforth, 2005). Kvasci se lako uzgajaju u laboratoriju na različitim hranjivim podlogama kao što je npr. ekstrakt slada (Schaechter, 2004.).

Kvasci su heterotrofni organizmi čije je prirodno stanište površinsko tkivo biljaka uključujući cvijeće i plodove. Uglavnom su obligatni aerobi iako postoje oni poput pivskog kvasca koji su fakultativni anaerobi. Kisik je potreban za reakcije sinteze lipida pa male količine moraju biti osigurane čak i kada rastu anaerobno kod fermentacija.

Površina stanične membrane kvasca je negativno nabijena zbog prisutnosti fosfatnih skupina koje su spojene na polisaharide koji se nalaze u strukturi stanične stjenke. To utječe na međustanični prostor u kojem dolazi do interakcija susjednih stanica, a kalcijevi ioni koji su prisutni služe kao mostovi kod ionskog transporta. Unutrašnji dio stanične stjenke, isto kao i membrane staničnih organela sastoji se od sterola, nezasićenih masnih kiselina i proteina.



Slika 3. Struktura membrane (Bamforth, 2005.).

Kontrolni mehanizmi koji upravljaju načinom rada metabolizma se temelje na koncentraciji šećera kojoj je kvasac izložen. Kod visokih koncentracija šećera metabolizam je takav da se provodi fermentacija tijekom koje se piruvat metabolizira preko acetaldehida do etanola. U niskim koncentracijama šećera, piruvat se transformira u acetil-CoA i dolazi do aerobne respiracije. To je posebno važno u prehrambenoj industriji kod proizvodnje piva, gdje je osnovno dobiti veće količine alkohola. Koncentracija šećera u sladu je velika, dok se kod proizvodnje pekarskih proizvoda gdje je potrebna veća koncentracija stanica kvasca, udio šećera održava niskim ali se šećer konstantno dodaje u fermentor (Bamforth, 2005.). Kvasci se obično ne vole natjecati s miješanim populacijama poput bakterija (Goldman, 2009.).

2.1.1. Klasifikacija kvasaca

Definicija kvasaca se značajno promijenila posljednjih nekoliko desetljeća. *Saccharomyces cerevisiae* i ostale askomicetne vrste su predstavljale tipične kvasce sve do otkrića životnog ciklusa vrsta *Rhodotorula* koje su bazidiomicetne. Daljnje studije molekularne evolucije proširile su i usavršile definiciju kvasaca (Kurtzman i Fell, 2004.). Kvasci su oblici jednostaničnih gljiva koji

se razmnožavaju pupanjem. Karakterizira ih brzi rast na specifičnoj hrani, posebno onoj koja sadrži šećere (glukozu i fruktozu), te uzrokuju kvarenje hrane. Relativno su otporni na toplinu i mogu se razmnožavati u širokom rasponu temperatura (Stranks, 2007.).

Promatraju se kao jednostanične gljive koje se razmnožavaju pupanjem ili dijeljenjem, međutim mnogi mikroorganizmi čije se zajedničko ime odnosi na kvasce mogu proizvoditi micelij u promjenjivim stupnjevima. Kvasci se od bakterija razlikuju prema većoj veličini stanice, obliku i načinu razmnožavanja (Jay i sur., 2005.)

Na temelju njihovog spolnog stanja (sporogeno i asporogeno) kvasci se razvrstavaju u dva velika razreda *Ascomycetes* i *Basidiomycetes*. Mnoge dimorfne gljive mogu u određenim fazama života ponašati kako kvasci ili živjeti kao kvasci u određenim uvjetima. Stvar je dogovora koje se gljive smatraju kvascima, te se povećanjem broja priznatih vrsta pomiču i granice skupine kvasaca. Među kvascima postoje i određene vrste koje su trajno filamentne (nitaste) i ne stvaraju pupove poput *Eremothecium* i *Ascodiea*. *Dipodascus* i *Geotrichum* su također filamentni kvasci koji dijeljenjem postaju jednostanični oblici. Filogenetske analize na temelju rDNK pokazuju da razredi *Ascomycota* i *Basidomycota* obuhvaćaju po tri skupine. Razred *Ascomycota* sadrži: *Hemmiascomycetes* (uključuju kvasce koji se razmnožavaju pupanjem), *Euascomycetes* (sadržavaju kvasce koji se razmnožavaju spolno pomoću spora) i *Archiascomycetes*. Razred *Basidiomycetes* sadrži: *Urediniomycetes*, *Ustilaginomycetes* i *Hymenomycetes* (Deák, 2007.).

Kurtzman i Fell 1998.g. otkrili su približno 100 rodova koji obuhvaćaju više od 700 vrsta. Trenutačni dokazi govore o tome da te vrste predstavljaju manje od 1% vrsta koje se nalaze u prirodi. U posljednjih nekoliko godina, istraživanja u genetici su pokazala da se mnoge karakteristike fenotipa razlikuju unutar vrsta istog roda, te je postalo jasno kako se moraju primjenjivati metode koje uključuju molekularnu genetiku za identifikaciju kvasaca kako bi se postigla točna procjena u njihovoj biorazličitosti. Isto tako biti će potrebno otkriti brže metode identifikacije jer broj kvasaca svakim danom sve više raste (Kurtzman i Fell, 2004.).

Morfološke strukture kvasaca koje se promatraju više služe kao potvrde nego za točnu identifikaciju. Postoje određeni oblici stanica koji su vrlo karakteristični za određene rodove i mogu suziti izbor tijekom identifikacije. Tako je oblik limuna karakterističan za rodove

Hansepiaspora, Nadsonia, Saccharmoycodes, Wickerhamia, dok je oblik trokuta karakterističan za *Trigonopsis.*

Oblici poput okruglog, eliptičnog, cilindričnog nisu od velike pomoći kod identifikaciju a druga morfološka karakteristika koja služi za identifikaciju je stvaranje blastokonidia. Te konidije se prisilno razvijaju iz stabljike koja se razvija iz hife. Prisutnost balstokonidija se može primijetiti formiranjem satelitskih kolonija. Prisutnost iglastih konidija na hifama je posebna karakteristika roda *Aciculoconidium*. Neki rodovi poput *Candida* i *Metschnikowia* proizvode klamidospore. Prisutnost klamidospora u klinički ispitivanim kvascima može sugerirati da se radi o kvascu *Candida albicans*. Endokonidije se proizvode vegetativno u drugim stanicama ili hifama i specifične su za rodove *Arxula, Cystofilobasidium, Geotrichum, Leucosporidium, Oosporidium* i *Trichosporon* (Goldman i sur. 2009.).

Rast i razmnožavanje kvasaca je povezano s mogućnošću da transportiraju i asimiliraju hranjive tvari, a zatim integriraju brojne komponente unutar stanice kako bi došlo do povećanja mase i na kraju diobe. Najčešći način vegetativnog razmnožavanja je pupanje koje je tipično za askomicetne kvasce poput *Saccharomyces cerevisiae* (Schaechter, 2004.). Postoji više vrsta pupanja: višestrano (pupovi se stvaraju na različitim mjestima na površini stanice), monopolarno (pupovi s stvaraju na jednom polu stanice) i bipolarno (pupovi se stvaraju na dva različita pola stanice) (Goldman i sur. 2009.). Dijeljenje je oblik vegetativnog razmnožavanja tipičan za vrstu *Schizosaccharomyces* koji se dijele isključivo tako da se iz jedne stanice formiraju dvije stanice iste veličine. (Schaechter, 2004.). Neki kvasci se mogu razmnožavati kombinacijom pupanja i dijeljenja dok drugi stvaraju hife (Deák, 2007.).

Mnogi kvasci se razmnožavaju formirajući blastokonidije odnosno pupove dok neke vrste nisu u mogućnosti stvarati pupove poput *Schizosaccharomyces* koji se razmnožava dijeljenjem i *Geotrichum* koji se razmnožava povezivanjem micelija koje proizvode artrokonidije. Vrste mnogih anamorfnih i telemorfnih rodova (*Candida* i *Rhodosporium*) su u mogućnosti stvarati pravi micelij. Postoje 4 različite grupe kvasaca:

1. telemorfni askomicetni kvasci: sposobni stvarati askospore (58 rodova)

2. anamorfni askomicetni kvasci: usko povezani s telemorfnim askomicetnim kvascima ali nisu u mogućnosti stvarati askospore (16 rodova)
3. telemorfni bazidiomicetni kvasci: sposobni stvarati bazidiospore (22 roda)
4. anamorfni bazidiomicetni kvasci: usko povezani s telemorfnim bazidiomicetnim kvascima, ali nisu u mogućnosti ili nije zapaženo da stvaraju bazidiospore (26 rodova) (Goldman i sur., 2009.).

Askomicetni kvasci stvaraju askospore koje mogu biti različitog oblika, te je to jedna od mogućnosti raspoznavanja kvasaca. Kapa je oblik askospora koji se može naći u manje od polovice askomicetnih rodova, dok se spore u obliku igle pojavljuju samo kod *Metschnikowia,* a *Eremothecium* formiraju poseban vretenasti oblik spora (Goldman i sur., 2009.).

Kolonije koje stvaraju ponekad su dovoljno specifične kako bi se omogućilo prepoznavanje pojedinih rodova. Npr. izgled tzv. satelitskih kolonija (manje kolonije koje se pojavljuju u slučajnom uzorku izvan crte linije) uzrokuje prisutnost blastokonidija i ograničava izbor na 14 mogućih rodova (primjerice *Bullera, Bulleromyces, Sporobolomyces, Sporidiobolus*). Isto tako kulture koje proizvode karotenoide ukazuju na malu grupu rodova od 30 kvasaca (*Rhodotorula, Sporobolomyces*). Nadalje kombinacija kareotenoida i satelitskih kolonija specifična je za ograničen skup od 8 rodova (*Sporobolomyces i Sporidiobolus*). Neke vrste iz samo tri roda (*Kluyveromyes, Metschnikowia* i *Trichosporiella*) mogu proizvesti crveni pigment zbog toga što sadrže spoj pulherimin. Osim oblika kolonija važna je i tekstura. Kolonije koje imaju vlaknast izgled upućuju na ograničen skup rodova (*Dipodascus, Galactomyces* i *Geotrichum*). Brašnaste kolonije tipične su za određene vrste kao što je *Pichia farinosa*, a i miris nekih vrsta je specifičan, te tako kiseli miris generira kolonija *Brettanomyces* i *Dekkera*. Budući ove kolonije proizvode octenu kiselinu kratkog su životnog vijeka, osim ako se ne uzgajaju na neutralizirajućem agaru koji sadrži kalcijev karbonat (Goldman, 2009.).

2.2. Stanište

Kvasci su široko rasprostranjeni u prirodi. Uspijevaju na lišću biljaka, cvijeću i plodovima a pojavljuju se i na koži, perju i u probavnom traktu preživača (Deák, 2007.). Zajednice kvasaca mogu se također naći udruženi s biljkama, životinjama i insektima. Najčešće stanište je tkivo biljaka, iako postoje neke vrste koje se mogu naći u parazitskim odnosima s životinjama. Kvasci mogu biti izolirani iz uzoraka tla, vode i zraka. Neke vrste kvasaca se mogu izolirati iz posebnih ili ekstremnih okoliša, poput onih sa niskim potencijalom vode (tj. Visoke koncentracije šećera ili soli), niskim temperaturama (neki kvasci su izolirani iz polarnih područja) i malom dostupnošću zraka (probavni trakt životinja) (Schaechter, 2004.).

Tlo je važno skladište za kvasce jer u njemu mogu preživjeti i tijekom nepovoljnih perioda. Neki kvasci su tipični naseljenici tla (autohtoni kvasci), dok nekima služi kao privremeno boravište. U tlu askomicetni kvasci uglavnom prevladavaju u odnosu na bazidiomicetne i to rodovi *Cryptococcus, Cystofilobasidium, Sporobolomyces, Rhodotorula, Trichsporon*. Ekološka uloga kvasaca je raznolika. Neki kvasci sprečavaju stanice od isušivanja i doprinose u agregaciji čestica tla. Isto tako ulaze u interakcije s drugim organizmima iz tla i služe kao hrana, a s druge strane smatraju se i kontaminantima. Osim tla uobičajeni su naseljenici slatkih i morskih voda, rijeka, jezera, ušća i oceana. Broj i gustoća ovisi o tipu i čistoći vode. Za ocean je tipično da sadrže oko 10 stanica/L, dok vode koje su zagađene povećavaju populaciju kvasaca od 500 do 1000 stanica/L (Goldman i sur., 2009.). Populacije vodenih kvasaca su obično najveće u svježoj vodi jer takva voda može biti zagađena ili vrlo bogata planktonom a povećanjem dubine i udaljenosti od kopna smanjuje se i broj kvasaca (Kurtzman i Fell, 2004.). Kućna prašina može sadržavati više od 10^4 $CFUg^{-1}$ stanica kvasaca koji u prašini mogu djelovati kao alergeni. Biljni svijet nastanjuju bazidiomicetni kvasci, no u fazi pune zrelosti tijekom zrenja prevladavaju askomicetni (Goldman i sur., 2009.). Površina lista na biljkama sadržava veliki broj kvasca koji se kreće od 10^5 do 10^6 održivih stanica/g. (Kurtzman i Fell, 2004.). Nekoliko tipova kvasaca je poznato kao paraziti ili patogeni iako postoji veliki broj kvasaca koji je udružen sa beskičmenjacima. U većini prirodnih staništa mikroorganizmi ne postoje individualno nego su udruženi jedan s drugim ili prilijepljeni za neku površinu. Pripajanje stanica do stanice kod

kvasaca rezultira formiranjem grupa koje predstavljaju biofilm na površini. Biofilmovi su građeni od bakterija i kvasca. Nalaze se u česticama tla, površini lista, živim i neživim površinama ispod vode a mogu se smjestiti i na membrane sluznica u šupljinama tijela i biti izvor infekcije. Stvaraju se i na hrani, prostorima za preradu hrane i izvor su kontaminacije hrane (Goldman i sur., 2009.).

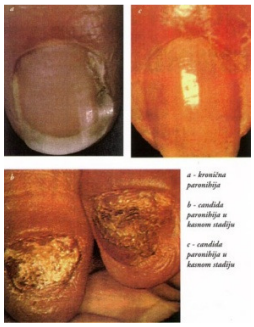
Osim tla, zraka, vode, životinja i biljaka, kvasac *Aurobasidium pullulans* ili crna plijesan se može naći i na vlažnim zidovima po kućama, a *Saccharomyces cerevisiae* na slavinama posuda po vinarijama (Schaechter, 2004.).

Većina kvasaca uspijeva u toplim, slatkim, kiselim i aerobnim uvjetima okoline. Veći dio kvasaca koji se uzgajaju u laboratoriju ili industriji rastu najbolje u temperaturnom rasponu od 20 – 30 °C. Kvasci zahtijevaju za rast i metabolizam velike količine vode iako postoje one vrste koje mogu izdržati uvjete s malim količinama vode i visokim koncentracijama šećera i soli (Schaechter, 2004.). Brojni kvasci rastu u prisutnosti od 55 do 60% saharoze (Jay i sur. 2005.). Najveći dio kvasaca raste vrlo dobro između pH 4,5 do 6,5. Podloge s organskim kiselinama (npr. octena i mliječna) djeluju u većoj mjeri kao inhibitori nego podloge s mineralnim kiselinama (npr. kloridna). To je zbog toga što nedisocirane organske kiseline mogu sniziti pH unutar stanice kvasca te se zato upotrebljavaju kao konzervansi za hranu koja je podložna kvarenju. U industriji kvasci mogu rasti na različitim proizvodima kao što je slad, melasa, sok od grožđa, sirutka, glukozni sirup (Schaechter, 2004.).

2.3. Značaj kvasaca u životu ljudi

Tijekom povijesti čovjek je imao koristi od biokemijskih proizvoda kvasaca. Kvasci sudjeluju u metaboličkim procesima za proizvodnju kruha, piva i drugih alkoholnih pića (Goldman i sur., 2009.). Zbog njihove metaboličke različitosti koriste se u mnogim industrijskim procesima. U prehrambenoj industriji koriste se za proizvodnju vina, piva, jakih alkoholnih pića poput viskija, konjaka, ruma, votke i gina. Osim proizvodnje pića sudjeluju i u proizvodnji octa, jogurta i fermentiranih mlijeka, kruha, mesa i fermentiranog povrća (kupus, masline) (Bamforth, 2005.). Mogu biti korisni jer razlažu otpadne tvari u netoksične i/ili korisne proizvode (Goldman i sur.

2009.). Osim u prehrambenoj industriji kvasci su zastupljeni u mnogim drugim sektorima uključujući kemikalije, enzime, lijekove, poljoprivredu (Schaechter, 2004.). Nedavna postignuća u molekularnoj biologiji predstavljaju kvasce kao novo sredstvo za sintezu proteina i ostalih spojeva koji se koriste u farmaciji (Kurtzman i Fell, 2004.). Najčešći kvasac opasan za zdravlje ljudi je *Candida albicans* koja uzrokuje mikoze. Pokazano je da infekcije *Candida albicans* jače ugrožavaju zdravlje ljudi s AIDS-om (Schaechter, 2004.).



Slika 4. Upalne promjene na noktima uzrokovane kvascem *Candida albicans* (http://www.valoviljepote.eu, 2005.).

2.3.1. Patogeni kvasci

Patogen je organizam koji je u mogućnosti stvarati oštećenja na stanici smještajući se na tkivo te tako uzrokuje kliničke znakove sa ishodom ili morbiditeta ili mortaliteta (smrti). Neki patogeni se opisuju kao primarni patogeni (oni koji uzrokuju bolesti) ili kao oportunistički patogeni (koji inficiraju pojedince sa oslabljenim imunitetom). Bez obzira na to obje vrste moraju ući i preživjeti u domaćinu, biti izdržljivi, moći izbjegavati obranu domaćina, moći se razmnožavati u velikom broju te moći se prenositi na ostale domaćine (Bhunia, 2008.).

Patogeneza se kreće od benigne, površinske infekcije pa sve do duboko ukorijenjene sustavne infekcije koja može napasti unutarnje organe. Često je izvor zaraze endogen i rezultat je neravnoteže nastale zbog prekomjernog rasta kvasaca kojeg kontroliraju druge mikrobne flore i/ili smanjenim imuniteti domaćina (Goldman i sur., 2009.).

2.4. Opća svojstva odabranih kvasaca

Tablica 1. Vrste *Candida* povezane s ljudskim bolestima (Kavanagh, 2005.).

Candida albicans
Candida dubliniensis
Candida famata
Candida glabrata
Candida guilliermondii
Candida inconspicua
Candida kefyr
Candida krusei
Candida lusitaniae
Candida norvegensis
Candida parapsilosis
Candida tropicalis

Rod *Candida* otkrio je Berkhout 1923.g. i od tada je bio podvrgnut mnogim promjenama u definiciji i sastavu. Promatra se kao nespojiva obitelj koja može biti podijeljena na 40 segmenata koji sadržavaju 3 glavne grupe. Generičko ime znači svjetleće bijeli, jer stanice ne sadrže karotenoidne pigmente (Jay i sur., 2005.). Porodica *Candidaceae* se koristila kao depozitar za sve anamorfne askomicetne kvasce i sadržavala je različite heterogene rodove kao što se *Brettanomyces, Candida, Geotrichum, Klockera* i ostale. Mnogi rodovi bili su izbačeni iz te porodice tako da porodica sadrži oko 200 rodova (Deák, 2007.).

Najbolje poznati rod iz ove porodice je *C. albicans* koja se povezuje s bolestima kod ljudi, no i druge vrste poput *C. glabrata, C. inconspicua* ili *C. krusei* su također uzročnici bolesti. *Candida* spp. može kontaminirati i masulj u ranim fazama proizvodnje vina (Webster i sur., 2005.).

Unatoč značajnim promjenama rod *Candida* može biti definiran kao široka grupa aseksualnih askomicetnih kvasaca koja je zajedno s nekoliko anamorfnih rodova karakterizirana tipičnom stanicom s dvostrukom membranom koja ne sadrži ksilozu, ramnozu ili fruktozu i nije pozitivna na DBB ili urea reakcije. Rod *Candida* se razlikuje od njemu sličnih rodova ponajviše u negativnim svojstvima: ne proizvode octenu kiselinu (*Brettanomyces*), ne pupaju bipolarno

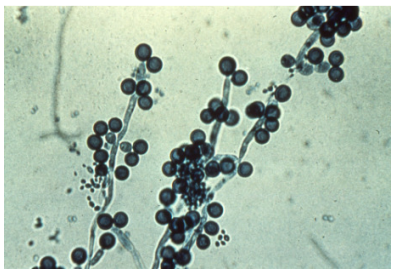
(*Klockera, Schizoblastosporion*), nemaju stanice trokutastog oblika (*Trigonopsis*), ne proizvode blastokonidije ili konidiofore (*Blastobotrys, Botryozyma, Sympodiomyces*, *Aciculoconidium*), ne proizvode artrokonidije (*Arxula, Geotrichum*) i ne proizvode sluz niti mukozne kolonije.

Temperaturni raspon za život *Candida* je od 0 do 40 °C. Većina *Candida* je mezoflina i najbolje rastu između 25 i 35 °C, iako postoje one koje rastu i iznad 45 °C (*C. albicans* i *C. glabrata*). S druge strane *C. famata, C. valida* i *C. lipolytica* mogu biti izolirane iz ohlađene hrane na temperaturi -1 do 4 °C. Što se tiče a_w, *C. famata, C. versatilis* i *C. halonitratophila* su značajni halotolerantni kvasci, a vrste *C. lactis-condensi, C. coliculosa* i *C. domerqiae* dobro rastu pri visokim koncentracijama šećera. Optimalni pH za rast je između 4,5 i 5,5, iako postoje vrste poput *C. krusei* i *C. valida* koje mogu rasti i pri pH 1,5. Kvasci su otporniji na kisele nego na lužnate uvijete. Mnogi od njih prestaju rasti pri pH 8,0 a oni koji rastu pri pH 10,0 – 10,5 smatraju se tolerantima na lužine. Slabe organske kiseline (sorbinska i benzojeva) inhibiraju rast kvasaca, ali nekoliko vrsta kao *C. krusei* i *C. valida* otporne su na spomenute kiseline. Što se tiče alkohola, ovi kvasci ne podnose velike koncentracije i alkohol ih lako uništava *osim C. stellata* i *C. pulcherrima* koji mogu živjeti duže od ostalih pri visokim koncentracijama alkohola. Rod *Candida* rasprostranjen je u svim vrstama hrane, pa tako *C. famata* dominira u mesnim proizvodima, *C. pelliculosa i C. krusei* u kiseloj hrani, *C. colliculosa* u hrani sa niskim a_w, *C. valida* u pićima (Blackburn, 2006.).

2.4.1. *Candida albicans*

Nešto atipična vrsta koja se ne pojavljuje široko rasprostranjena u okolišu. Uzrokuje infekcije kod ljudi i drugih toplokrvnih životinja (Webster i sur., 2005.). Može rasti kao stanica kvasca, kao prava hifa ili kao pseudohifa, što je, zapravo, prijelazni oblik između ta dva ekstrema. Prijelaz između kvasaca i hifa je povratni i ovisi o nekoliko čimbenika, npr. temperaturi (na 37 °C je u obliku hifa, a ispod te temperature je u obliku kvasca), pH (neutralni hife, kiseli kvasci), izobilje hranjivih tvari (kvasci) ili nedostatak (hife), prisutnost (rast hifa) ili odsutnost (rast kvasaca) krvnog seruma. *Candida albicans* uobičajeno nastanjuje kožu većine ljudi i povremeno stvara povrede na koži, ali pod određenim okolnostima pretvara se u ozbiljan patogen koji uzrokuje

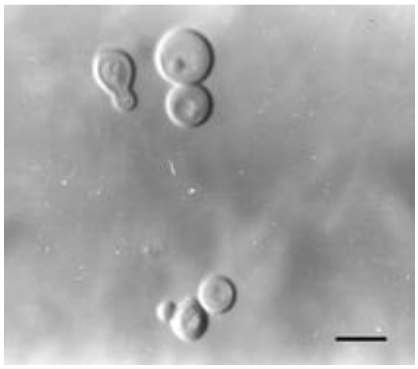
duboko ukorijenjene bolesti posebno kada je imunitet domaćina oslabljen (Webster i sur., 2007.).



Slika 5. Klamidospore kvasca *Candida albicans* (http://www.microbeworld.org, 2009.).

2.4.2. *Candida famata*

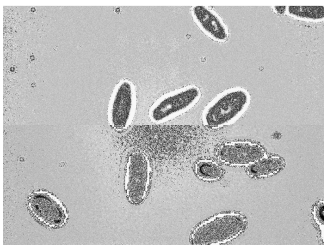
Candida famata (*Debaryomyces hansenii*) je osmotoleranti kvasac koji može rasti u prisutnosti visokih koncentracija NaCl. Za usporedbu *Saccharomyces* je inhibiran s 1,7 M NaCl dok *C. famata* tolerira i 4 M NaCl. Nalazi se na staništima s visokim salinitetom kao što je morska voda, rasol, slana hrana (sirevi, kobasice). *Candida famata* koristi se u proizvodnji riboflavina, sireva, fermentiranih mesnih proizvoda, enzima za prehrambenu industriju, a isto tako proučava se i potencijalna proizvodnja ksilitola i drugih kemikalija pomoću ovog kvasca. Za industrijsku proizvodnju koristi se posebni mutant *C. famata* dep8. Može se naći u svim vrstama sireva, a naročito u rasolima za polutvrde i tvrde sireve, zbog otpornosti na visoke koncentracije soli, može proizvoditi proteolitičke i lipolitičke enzime koji metaboliziraju mliječne proteine i masti i rasti na niskim temperaturama i niskom a_w. Isto tako, *C. famata* u rasolu inhibira rast drugih nepoželjnih mikroorganizama (*Clostridium butyricum* i *C. tyrobutyricum*) natječući se s njima za nutrijente i proizvodnji antimikrobnih metabolita. Sudjeluje u sintezi hlapljivih kiselina i tvari aroma, u stvaranju metionala i može tvoriti crveno-smeđe pigmente koji su karakteristični za portugalske sireve. Kod mesnih proizvoda, posebno kobasica, proizvodi hlapljive spojeve tijekom dozrijevanja, inhibirajući stvaranje spojeva koji oksidiraju lipide. *C. famata* je kvasac koji najbolje proizvodi ksilitol iz D-ksiloze, ali profitabilna tehnologija proizvodnje još nije razvijena (Satyanarayama i sur., 2009.).



Slika 6. Morfološka analiza stanica kvasca *Candida famata* (http://www.bcrc.firdi.org.tw, 2014.).

2.4.3. *Candida krusei*

Candida krusei (*Issatchenkia orientalis*) može rasti pri pH 1,5, te je otporna na djelovanje konzervansa sa slabim organskim kiselinama. Ima slabu ili nikakvu fermentativnu sposobnost, te dominira u zakiseljenoj hrani i sudjeluje u stvaranju biofilmova na površini hrane (Blackburm, 2006.). Zajedno s ostalim *Candida* spp., *Candida krusei* se može naći na sisavcima i pticama, posebno u njihovom probavnom traktu i koži, a rijetko su izolirane iz drugih izvora, osim kao kontaminanti fermentirane hrane i pica (Kurtzman i Fell, 2004.). Može proizvoditi velike koncentracije acetaldehida, fermentirati glukozu, asimilirati citrate te se razmnožavati stvaranjem pseudeohifa (Deák, 2007.). Iako se u proizvodnji pekarskih proizvoda najviše koristi *Saccharomyces cerevisiae*, još najmanje 25 vrsta kvasaca su pronađeni u sirovom tijestu među kojima je bila i *C. krusei*. Isto tako, sudjeluje u fermentaciji agavina soka iz kojeg se dobiva tekila (Schaechter, 2004.), a može se naći i na zrnu kakaovca (Jay i sur., 2005.).



Slika 7. Morfologija stanica *Candida krusei* (http://enologyaccess.org, 2010.).

2.5. Inhibicija i inaktivacija kvasaca

2.5.1. Utjecaj topline

Otpornost kvasaca na visoke temperature može se usporediti s vegetativnim oblicima bakterija, iako za razliku od bakterijskih endospora, askospore kvasaca su samo neznatno otpornije na toplinu u usporedbi s vegetativnim stanicama. Stanice kvasaca ugibaju unutar nekoliko minuta na 55 do 65 °C, a smrtnost kvasaca se povećava 10 puta povećanjem temperature za 4 do 5 °C. Ovo su prosječne vrijednosti, budući može doći do neznatnih promjena koje ovise o vrsti kvasca i sastavu podloge koja se zagrijava. Otpornost na toplinu se smanjuje u kiselom pH, a povećava sniženjem a_w. Mehanizam inaktivacije toplinom nije dovoljno razjašnjen, ali pretpostavlja se kako dolazi do promjena u staničnoj strukturi koje, potom, uzrokuju smrt stanice.

2.5.2. Hlađenje i zamrzavanje

Kvasci tijekom čuvanja na 4 °C polako odumiru. Hladno skladištenje uzrokuje propadanje fiziološkog stanja stanice, koje se očituje gubitkom ugljikohidrata. Zamrzavanje ne uzrokuje trenutačnu smrt, iako se broj preživjelih kvasaca smanjuje tijekom vremena. Stupanj smrtnosti tijekom zamrzavanja ovisi o nekoliko faktora, kao što je temperatura zamrzavanja, vrijeme provedeno u zamrznutom stanju i uvjeti odmrzavanja. Održivost kvasaca zamrznutih na -80°C je veća nego kod onih zamrznutih na –20°C i to zbog stvaranja mikrokristala leda koji uzrokuju manje razaranje stanica u usporedbi s kristalima nastalim pri nižim temperaturama. Najbolji način za čuvanje kultura je vrlo brzo duboko zamrzavanje s tekućim dušikom (- 196 °C).

2.5.3. Dehidratacija (sušenje)

Jedna od najstarijih metoda za očuvanje hrane je, upravo, sušenje, jer uspješno inhibira rast kvasaca na voću i povrću. Neki posebno tolerantni kvasci poput nekoliko vrsta iz roda *Zygosaccharomyces* mogu rasti vrlo sporo, pogotovo ako je površina izložena vlazi. Liofilizacijom se, također, postiže dehidratacija stanica, te se ova metoda koristi za proizvodnju aktivne sušene biomase za dobivanje starter kultura. Cilj tijekom sušenja je da se stanice kvasca mogu

održati što duže vrijeme. Na to utječe nekoliko parametara kao što su faza rasta stanice, uvjeti dehidratacije i rehidratacije kao i uvjeti skladištenja.

2.5.4. Zračenje (iradijacija)

Nekoliko vrsta zračenja poput elektronskih zraka, X zraka, γ zraka posjeduju visoku energiju i uzrokuju smrt stanica. U komercijalne svrhe primjenjuju se relativno srednje doze zračenja (1 – 3 kGy) koje značajno smanjuju kontaminaciju kvasaca u mesu i mesnim proizvodima, orašastim plodovima i povećavaju vrijeme skladištenja lako pokvarljive hrane. Zračenje je posebno prikladno za produženje roka trajanja voća poput jagoda i malina koje su osjetljive na ostale metode očuvanja.

2.5.5. Alternativne i nove tehnologije konzerviranja

Sve više raste potreba za sigurnijom i svježijom hranom stoga su se istraživanja usmjerila na alternativne tehnologije konzerviranja. Jedna od termičkih metoda koje se primjenjuje je zagrijavanje mikrovalovima. Osim tretmana toplinom, alternativne metode odnose se i na primjenu visokog tlaka, pulsirajućeg električnog polja, oscilirajućeg magnetskog polja, ultrazvuka, i to kao same metode ili u kombinaciji s pasterizacijom, hlađenjem ili zamrzavanjem. Postignuća u tehnologiji su omogućila primjenu toplinskih tretmana koji su smanjili vrijeme trajanje poput HTST pasterizacije i UHT sterilizacije. Visoki tlakovi između 400 i 600 MPa inaktiviraju stanice kvasaca utječući na propustljivost stanične membrane, međutim, neke stanice mogu preživjeti takvo oštećenje. Smrt stanica nastaje tvorbom pora na membrani i kidanjem staničnih organela, posebno ribosoma. Kvasci se ovom metodom bolje uništavaju nego bakterije. Tehnologija ultrazvuka primjenjuje visokoenergetske zvukove s 20 000 i više vibracija u sekundi te se može koristi u kombinaciji s toplinom, tlakom ili oboje, te se na taj način pojačava inaktivacija stanica kvasaca.

2.5.6. Inaktivacija kemijskim sredstvima

U proizvodnji hrane se primjenjuje veliki broj kemijskih konzervansa, od kojih su neki poznati stoljećima. Rast mikroorganizama u hrani može biti inhibiran zakiseljavanjem (smanjivanjem pH) dodavanjem kiseline ili proizvodnjom kiseline tijekom fermentacije. Kiseline koje se primjenjuju su jake anorganske poput HCl, H_3PO_4 ili slabe organske kiseline: octena, mliječna, limunska kiselina. U rasponu pH od 3 do 3,5 octena i mliječna kiselina djeluju inhibitorno u 0,8 - 1 % koncentraciji, iako postoje vrste koje podnose te uvjete poput *Z. bailii* i *P. membranifaciens.* Uspoređujući različite vrste kvasaca izolirane iz pokvarene hrane, otkrivena je velika razlika u njihovoj otpornosti na slabe kiseline. Neki kvasci, posebno oni iz roda *Zygosaccharomyces* pokazuju veliku otpornost i mogu tolerirati 800 – 1500 mg/L koncentracije konzervansa. Od kemijskih spojeva, koriste se i sumporni dioksid i ugljični dioksid. SO_2 se stoljećima koristi ako sredstvo za sterilizaciju vina, osim toga, služi I kao antioksidans za sprečavanje posmeđivanja hrane. Mehanizam djelovanja mu je sličan kao i konzervansima slabih kiselina. CO_2 koji nastaje tijekom fermentacije ili se može naknadno dodati, posjeduje širok antimikrobni učinak. U atmosferi pakiranja može zamijeniti kisik, te tako inhibirati rast aerobnih mikroorganizama. Glavni učinak CO_2 je da se otapa u vodenoj fazi hrane, te tako nastaje ugljična kiselina koja disocira na anione bikarbonata i karbonata i hidratne ione koji snižavaju pH. Osim u atmosferi, isti efekt se postiže i u stanici mikroorganizma u kojoj dolazi do acidifikacije citoplazme. Prirodni spojevi poput lizina, nizina i drugih bakteriocina djeluju inhibitorno na bakterije, ali nemaju učinak na kvasce. Antibakterijski i antifungalni učinak pokazuju i ekstrakti češnjaka, luka kao i začini (cimet, klinčić, gorušica, i drugi). Međutim ti začini, u velikoj količini, utječu na miris hrane pa se ne koriste kao konzervansi, ali vanillin, koji se dodaje u voćne sokove i sladolede, može se koristiti kao konzervans i pojačivač okusa istodobno.

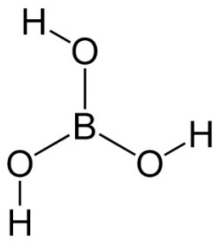
2.5.7. Sanitarna sredstva i dezinficijensi

Sigurnost hrane i kvaliteta mogu se osigurati kontrolom rasta patogenih i mikroorganizma koji kvare hranu. Stoga čišćenje, sanitacija i dezinfekcija su neizostavni i sastavni dijelovi proizvodnje hrane. Čišćenje površina i dezinfekcija se provode pomoću alkoholnih deterdženata, ozona, vodikovog peroksida, spojeva s klorom i mnogim drugim spojevima. Uništavanje vegetativnih

oblika bakterija, kvasaca i plijesni nije vrlo teško budući su osjetljivi na toplinu i kemikalije. Najučinkovitiji u uklanjaju kvasaca su dezinficijensi na osnovi alkohola i peroksidi, koji također djeluju na zaustavljanje rasta. Dezinficijensi koji sadrže kloride i persulfate su neučinkoviti u uklanjanju kvasaca (Deák, 2007.).

2.5.8. Borna kiselina

Borna kiselina se najčešće spominje kao sredstvo za otporne kvasce koji uzrokuju infekcije vagine, ali podaci o granicama i mehanizmu antifungalnog djelovanja nedostaju. Borna kiselina može biti fungistatična ili fungicidna, što ovisi o koncentraciji i temperaturi. Inhibicija oksidativnog metabolizma se čini kao ključnim antifungalnim mehanizmom (De Seta i sur., 2008.). Općenito, borna kiselina se smatra kao moguća terapija za komplicirane infekcije, iako je potencijalno toksična, posebno ako se proguta ili sustavno apsorbira. Ne smije se koristiti tijekom trudnoće jer može prouzrokovati anomalije. Malo se zna o antifungalnom mehanizmu djelovanja borne kiseline koja se klinički koristi za liječenje infekcija vagine uzrokovanih kvascima (De Seta i sur., 2008).

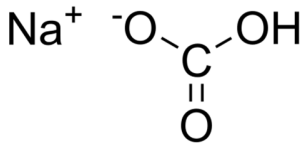


Slika 8. Strukturna formula borne kiseline (http://www.tehnologijahrane.com, 2011.).

2.5.9. Natrij hidrogenkarbonat

Natrij hidrogenkarbonat opće poznat kao soda bikarbona i sredstvo za pečenje je prirodni spoj koji u ljudskom tijelu koji pomaže, unutar krvotoka, u reguliranju pH i djeluje kao protuteža stvaranju kiseline, što je ključno za život. $NaHCO_3$ se može koristiti protiv širokog raspona

bolesti uključujući karcinom, gripu, dijabetes, bolesti bubrega, čak I uobičajene prehlade, te se stoga smatra jednim od najkorisnijih spojeva u svijetu medicine. Više od desetljeća radi se na istraživanjima na primjeni $NaHCO_3$ kao potencijalnog lijeka za karcinom. $NaHCO_3$ je, u svijetu, poznat kao fungicide, ali njegova primjena nije ograničena samo na to. Čvrste tumorne gljivične infekcije su snažne, otporne i brzo se prilagođuju na farmaceutske fungicide, te se zato uvijek mora koristiti s magnezijevim kloridom kako bi se postigao bolji učinak. To je bijeli, bez mirisa čvrsti sastojak, koji se može naći u mineralnim izvorima ili proizveden u laboratoriju. Iako $NaHCO_3$ ima preko 100 načina uporabe, njegova uporaba se može podijeliti na nekoliko kategorija: u medicini, slastičarstvu, čišćenju i kao sastojak sredstava za gašenje požara (Anter, 2012.).

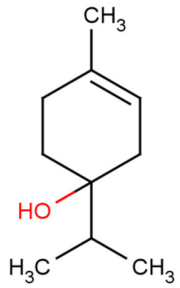


Slika 9. Strukturna formula natrij hidrogenkarbonata (http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/, 2011.).

2.5.10. Ulje čajevca

Ulje čajevca se koristi u medicinske svrhe u Australiji više od 80 godina. Ulje se dobiva parnom destilacijom izvorne australijske biljke *Melaleuca alternifolia* i sadrži više od 100 sastojaka koji su uglavnom monoterpeni, višeterpeni i alkoholi. Ulje čajevca pokazuje obećavajuća antifungalna svojstva. Nedavni klinički podaci upućuju na učinkovitost u tretmanu protiv peruti i oralnih kandidoza, a podaci iz testiranja na životinjama pokazuju da bi se moglo koristiti i protiv vaginalnih infekcija. Zajedno s terpenima može inhibirati respiraciju *Candida,* djeluju nepovoljno na mitohondrije. Također, ulje čajevca sadrži različite sastojke koji djeluju protiv kvasaca. Intenzivnija istraživanja o mehanizmu rada ulja čajevca protiv *C. albicans* i drugih kvasaca još nisu provedena (Hammer i sur., 2004.).

Uljem čajevca je moguće liječiti bakterijske i fungalne infekcije na koži, infekcija rana, infekcije desni, akne, uši, vaginalne infekcije uzrokovane kvascima, prehladu, upalu pluća i druge bolesti dišnog sustava. Iako nema dokaza kako ulje čajevca sprječava nastanak karcinoma, neki istraživači tvrde kako pojačava imunološki sustav. Na tržištu se nalazi u obliku masti, krema, losiona i sapuna, a često se prodaje u tamnim posudama kako bi se spriječio negativan utjecaj svjetlosti. U rijetkim slučajevima ulje čajevca može uzrokovati alergije u obliku osipa koji su blagi i svrbe, iako je bilo i slučajeva s pojavljivanjem mjehura. Osobe koji su alergične na druge vrste iz porodice *Mytraceae* kao što je eukaliptus, agava, klinčić vjerojatno su alergični i na ulje čajevca. Ulje nije preporučljivo za djecu, trudnice i dojilje, a toksično je kada se proguta, te je zabilježeno kako uzrokuje pospanost, zbunjenost, halucinacije, komu, nestabilnost, slabost, povraćanje, proljev, nadražaj želuca, nepravilnosti u krvnim stanicama i ozbiljan osip.



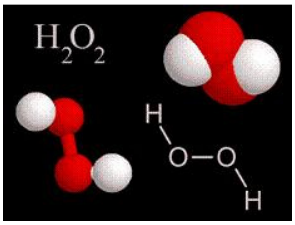
Slika 10. Strukturna formula *Melaleuca altemifolia* (http://www.akademon.cz, 2009.).

2.5.11. Vodikov peroksid

Vodikov peroksid se može opisati kao efektivno antivirusno, antibakterijsko i antifungalno sredstvo koje pokazuje veću inhibiciju na pH 4 nego na pH 7 (Larsen i White, 1995.).

Podklasa leukocita koja se zove neutrofili proizvode vodikov peroksid u našem tijelu i čine ga prvom linijom otpora protiv toksina, parazita, bakterija, virusa i kvasaca.

U cijelom svijetu vodikov peroksid se koristi umjesto klora kao sigurnije i ekonomičnije sredstvo za pročišćavanje gradske vode. Neki ga koriste u i bazenima i lječilištima (http://www.angelfire.com, 2013.).



Slika 11. Molekulski, strukturni i 3D prikaz vodikova peroksida (http://ccbolgroup.com, 2011.).

3. Eksperimentalni dio

3.1. Zadatak

Zadatak rada bio je ispitati antifungalni učinak natrij hidrogenkarbonata, vodikovog peroksida, eteričnog ulja čajevca i borne kiseline na odabrane vrste kvasaca roda *Candida* pomoću dvije metode: određivanjem zona inhibicije rasta na agarnoj ploči te promjenom broja stanica tijekom inkubacije kultura u prisutnosti različitih koncentracija spojeve, pri temperaturi od 25 °C.

3.2. Materijali i metode

3.2.1. Kulture mikroorganizama

Kulture mikroorganizama korištene u ovom radu su kvasci roda *Candida* iz kolekcije kultura mikroorganizama Katedre za biologiju i mikrobiologiju Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek.

Za izradu ovog rada, korištene su sljedeće vrste kvasaca roda *Candida*:

Candida albicans,

Candida famata i

Candida krusei.

Kulture kvasaca su regenerirane uzastopnim precjepljivanjem kroz tri dana, nakon inkubacije pri 25 °C na krumpirov glukozni agar (PDA agar, Biolife, Italija).

3.2.2. Priprema antifungalnih spojeva/tvari

Ispitan je antifungalni učinak sljedećih spojeva/tvari:

$NaHCO_3$ (Kemika, Zagreb),

H_2O_2 (Kemika, Zagreb),

eterično ulje čajevca (China Aroma chemical Co., Ltd. (Hangzhou, China) i

H_3BO_3 (Kemika, Zagreb).

Navedeni spojevi/tvari su pripremljeni u odgovarajućim koncentracijama otapanjem u sterilnoj demineraliziranoj vodi, osim eteričnog ulja čajevca koje je otopljeno u kombinaciji 70 % etanola

i 10 % Tween-a 80 (Biolife, Italija) uslijed njegove netopljivosti u vodi. Nakon otapanja, dobivena otopina je sterilizirana propuštanjem kroz HPLC filtere promjera otvora 0,22 μm i odmah upotrijebljena za eksperimentalni rad.

3.2.3. Određivanje antifungalnog učinka

3.2.3.1. Određivanje zone inhibicije

Određivanje zone inhibicije rasta odabranih spojeva/tvari na kulture kvasaca određeno je metodom difuzije spojeva u agaru. Od prethodno regenerirane kulture kvasca (precjepljivana kroz tri dana na PDA) pripremljena je standardizirana suspenzija stanica unošenjem mikrobiološke ušice s porastom u epruvetu sa sterilnom fiziološkom otopinom (0,85 % otopina NaCl). Usporedbom s McFarlandovim standardom 0,5 pripremljena je standardizirana suspenzija koncentracije 10^8 stanica/mL. Iz pripremljene suspenzije prenesen je uzgoj u sterilnu podlogu (PDA) ohlađenu na 48 °C kako bi dobili željenu koncentraciju stanica od 10^6 u 1 mL podloge. Nakon homogenizacije, u sterilnim uvjetima je preneseno po 20 mL nacijepljene podloge u sterilne prazne petrijeve zdjelice i ostavljeno na vodoravnoj podlozi do skrutnjavanja. Kada se nacijepljena podloga skrutnula, sterilnim bušačem za čepove su izrezane agarne rupice promjera 5 mm te je agar izvađen sterilnom pincetom. U svakoj zdjelici je pripremljeno po četiri agarne rupice. U svaku rupicu je, potom, otpipetirano po 100 μL sterilne otopine analiziranog spojeva/tvari. Nakon pipetiranja, podloge su čuvane u hladnjaku pri + 4 °C tijekom sat vremena, kako bi spojevi/tvari disocirale u podlogu. Poslije isteka sat vremena, zdjelice su inkubirane u termostatu pri 25 °C. Rezultati inhibicije rasta određeni su nakon 24 sata mjerenjem zone inhibicije oko agarnih rupica. Antifungalni učinak svakog spoja/tvari je ispitan u dva ponavljanja.

3.2.3.2. Određivanje promjene broja stanica kvasaca

Promjena broja stanica kvasaca tijekom inkubacije s odabranim spojevima/tvarima je određena Kochovom metodom agarnih ploča. Pripremljena je standardizirana suspenzija regeneriranih stanica kvasaca po McFarlandovom standardu 0,5 te razrijeđena do 10^{-4}. U ovo razrjeđenje je dodan ispitivani antifungalni spoj u odabranoj koncentraciji. Nakon homogenizacije suspenzije, prenesen0 je po 0,5 mL inokuluma u sterilne prazne petrijeve zdjelice, u koje je, nakon

sterilizacije i hlađenja, uliven PDA agar (ohlađen na 48 °C). Nakon inkubacije, prebrojane su porasle kolonije kvasaca i broj preračunat na 1 mL suspenzije. Antifungalni učinak je ispitan u 0., 2., 4., 6. i 24. satu inkubacije pri 25 °C. Analize su pripremljene u paralelama.

3.3.Obrada rezultata

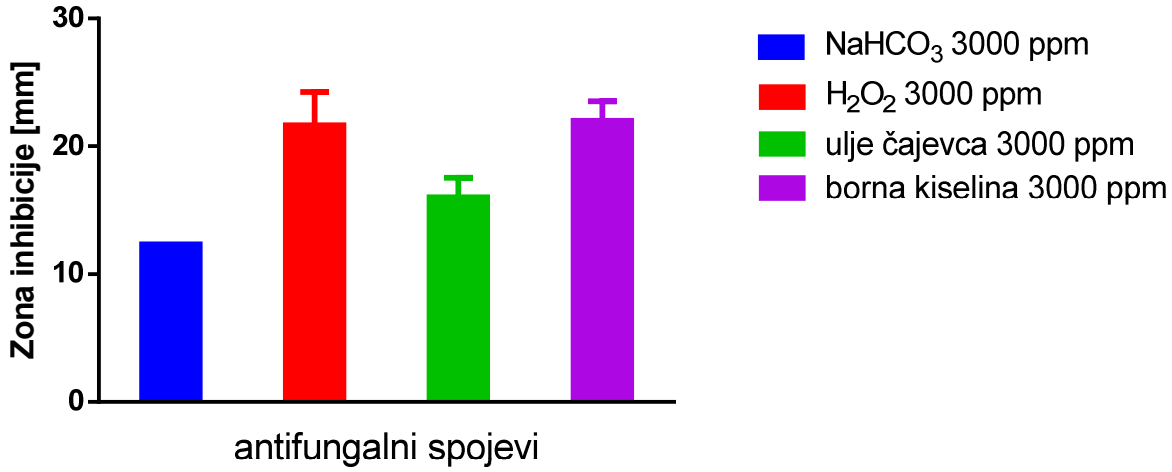
Rezultati rada su obrađeni uz pomoć računalnih programa Microsoft® Office Excel 2003 za Windows, Microsoft Corporation, Redmond, SAD i GraphPad Prism verzija 5.00 za Windows, GraphPad Software, San Diego, SAD.

4. Rezultati

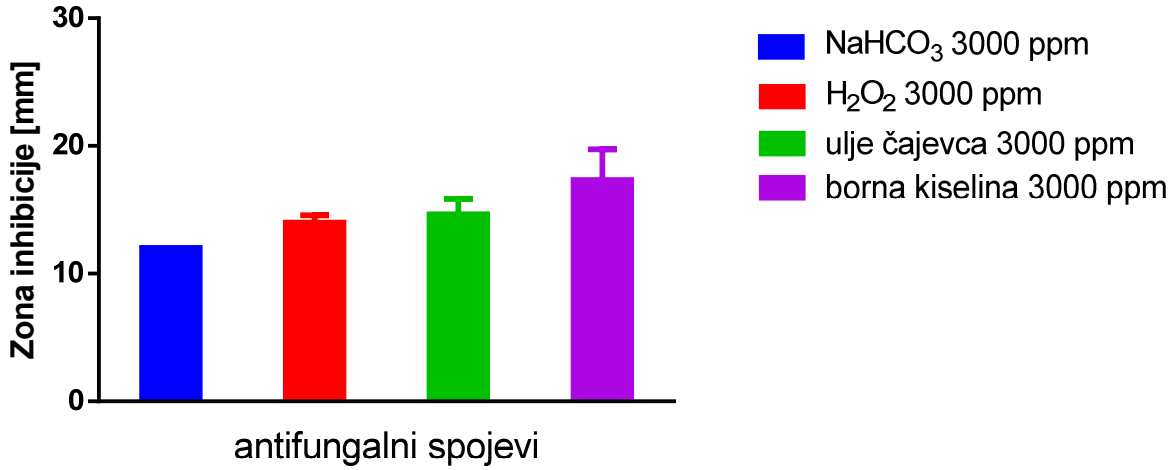
Rezultati zone inhibicije istraženih kvasaca su prikazani **Slikama 12 – 14**.



Slika 12. Antifungalni učinak odabranih spojeva na vrstu *Candida albicans*



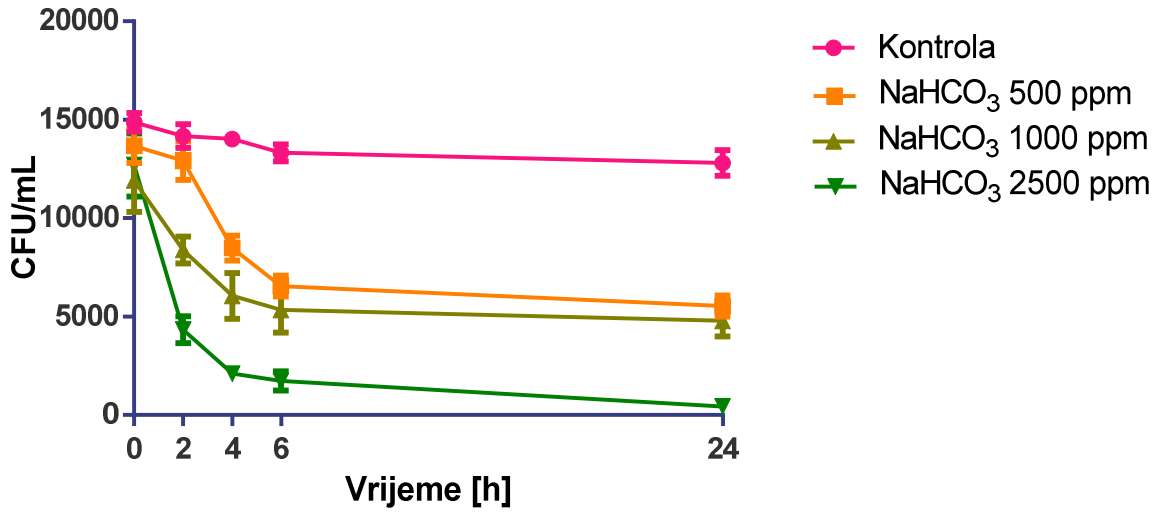
Slika 13. Antifungalni učinak odabranih spojeva na vrstu *Candida famata*



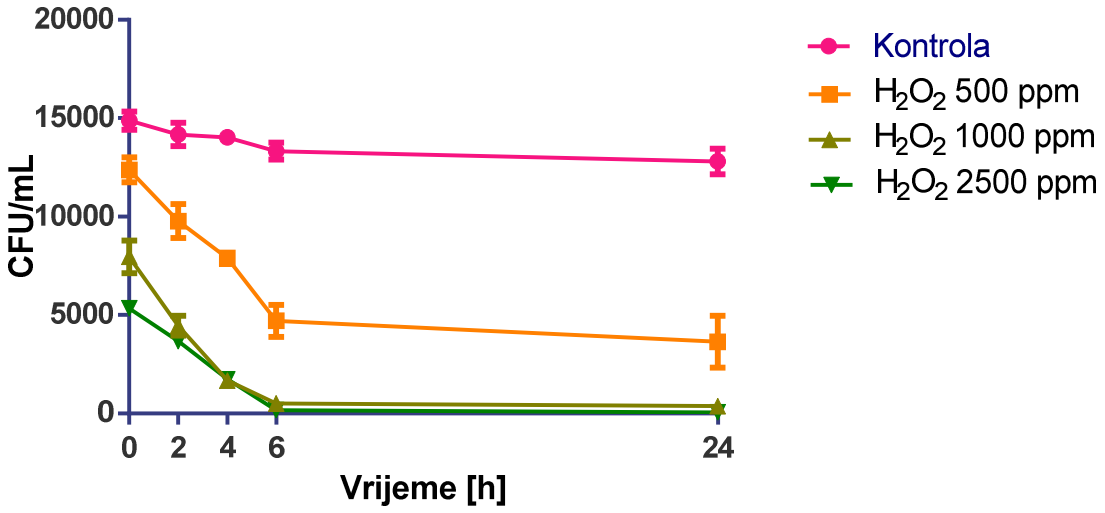
Slika 14. Antifungalni učinak odabranih spojeva na vrstu *Candida krusei*

Rezultati promjene broja stanica kvasaca tijekom inkubacije s antifungalnim spojevima su prikazani **Slikama 15 – 26**.

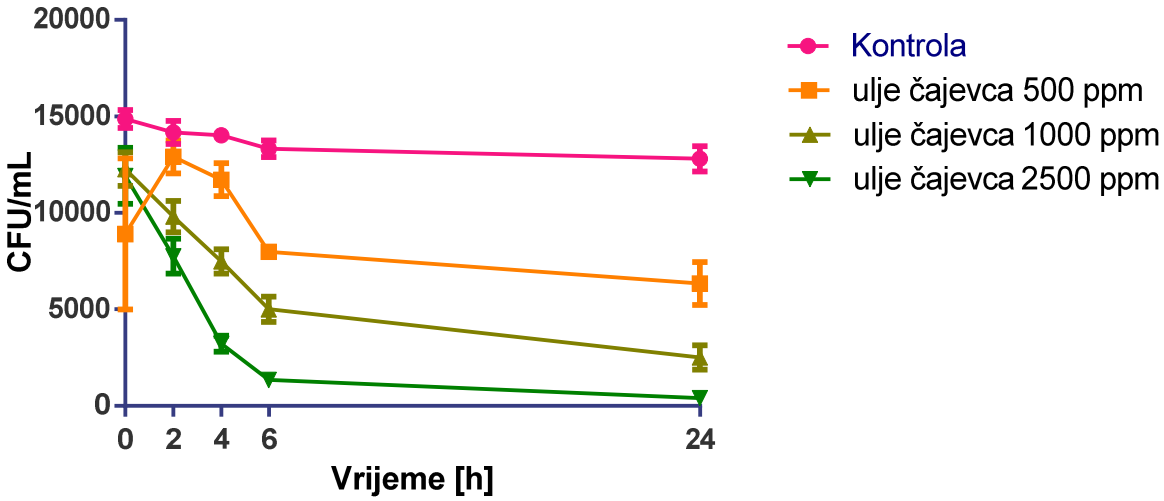
Candida albicans



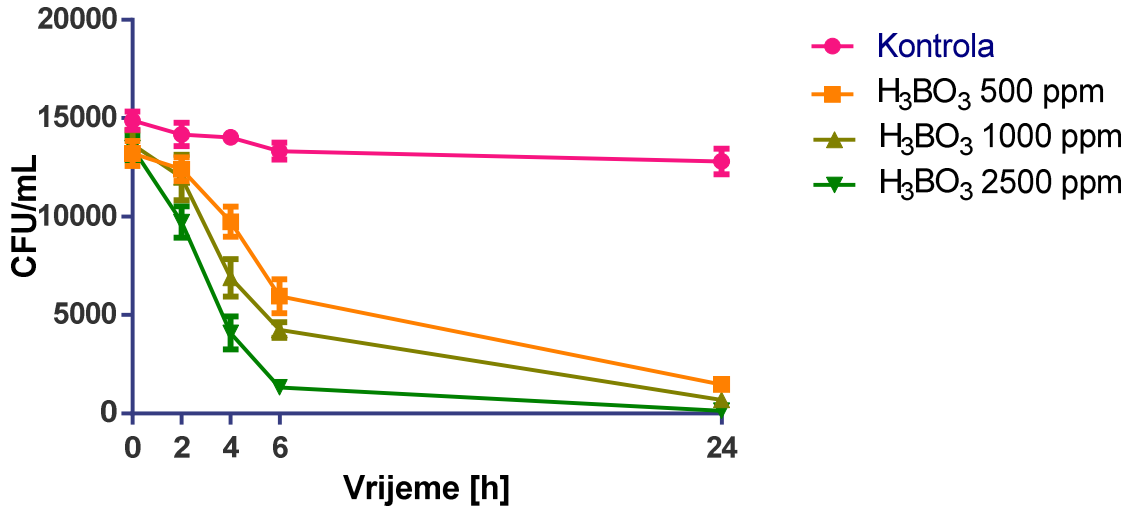
Slika 15. Promjena broja stanica kvasca *Candida albicans* tijekom inkubacije s $NaHCO_3$



Slika 16. Promjena broja stanica kvasca *Candida albicans* tijekom inkubacije s H_2O_2

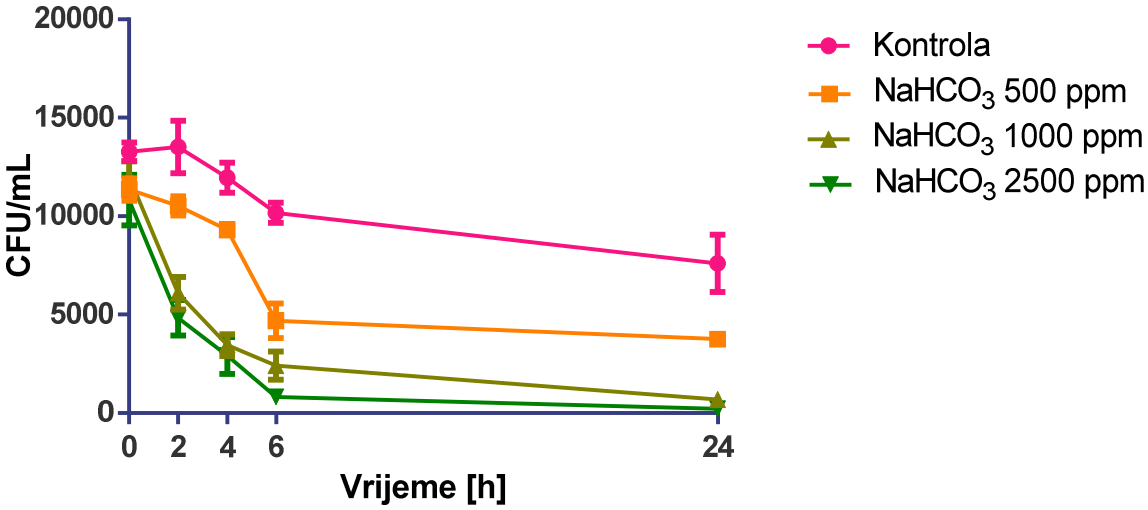


Slika 17. Promjena broja stanica kvasca *Candida albicans* tijekom inkubacije s uljem čajevca

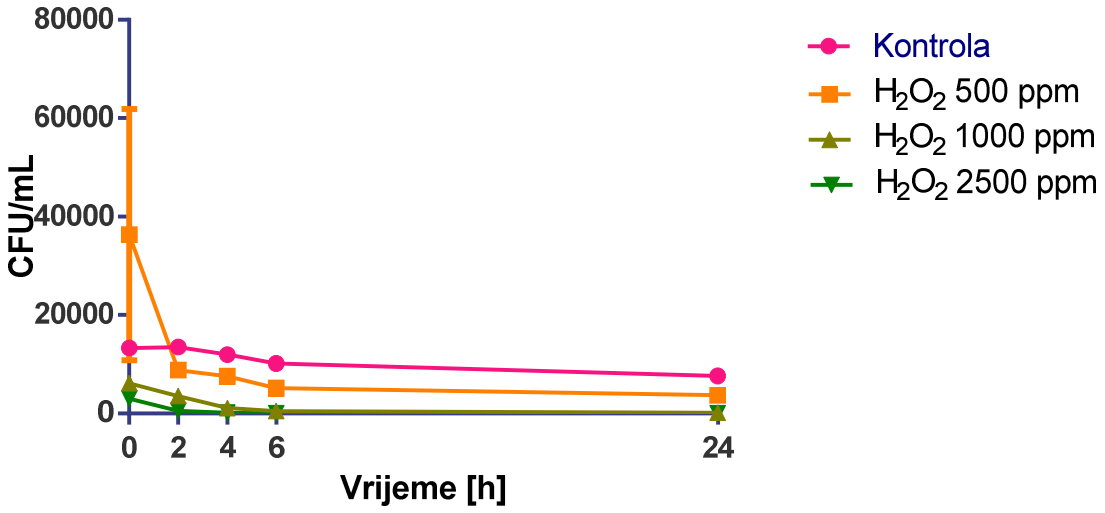


Slika 18. Promjena broja stanica kvasca *Candida albicans* tijekom inkubacije s H_3BO_3

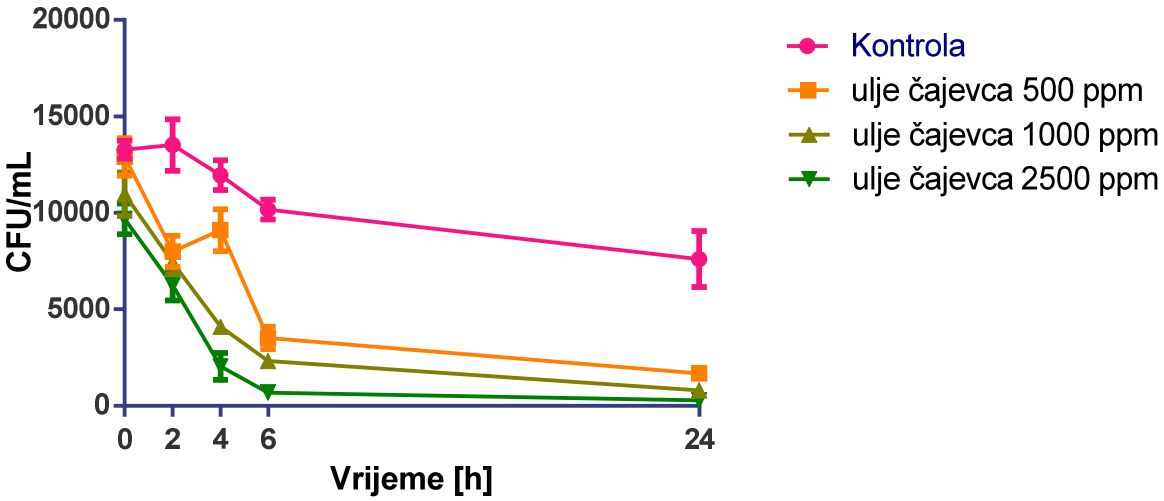
Candida famata



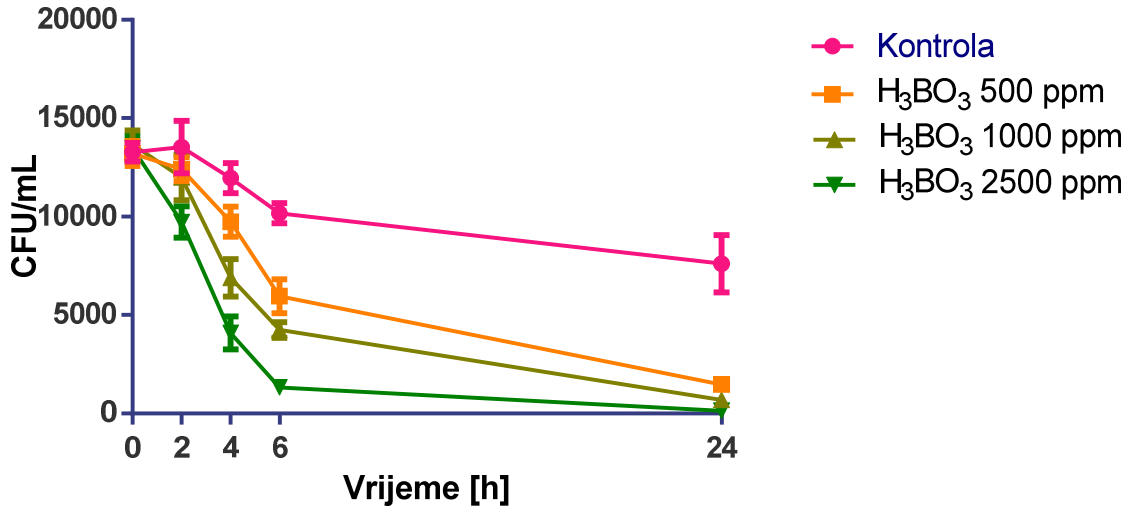
Slika 19. Promjena broja stanica kvasca *Candida famata* tijekom inkubacije s $NaHCO_3$



Slika 20. Promjena broja stanica kvasca *Candida famata* tijekom inkubacije s H_2O_2

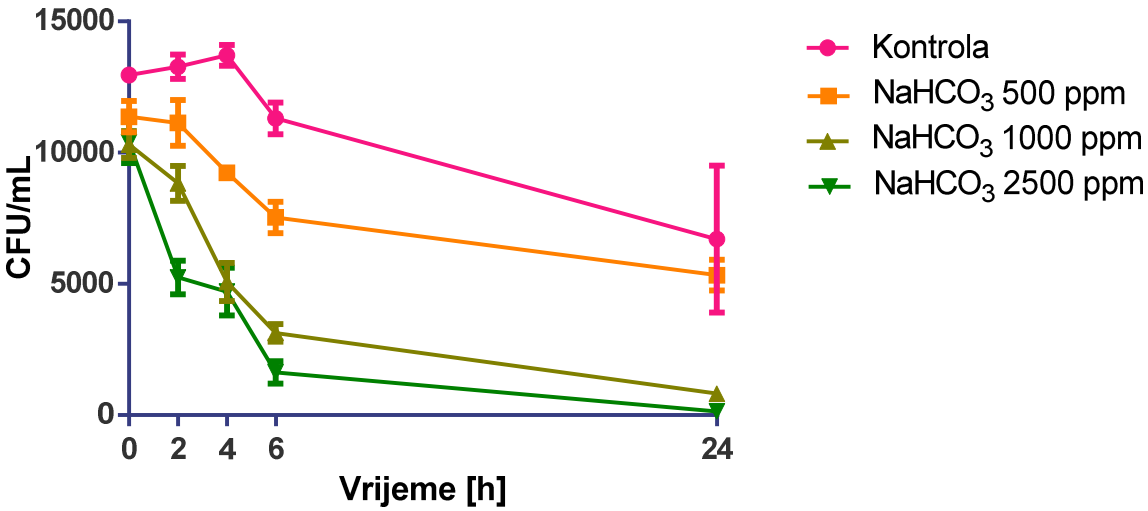


Slika 21. Promjena broja stanica kvasca *Candida famata* tijekom inkubacije s eteričnim uljem čajevca

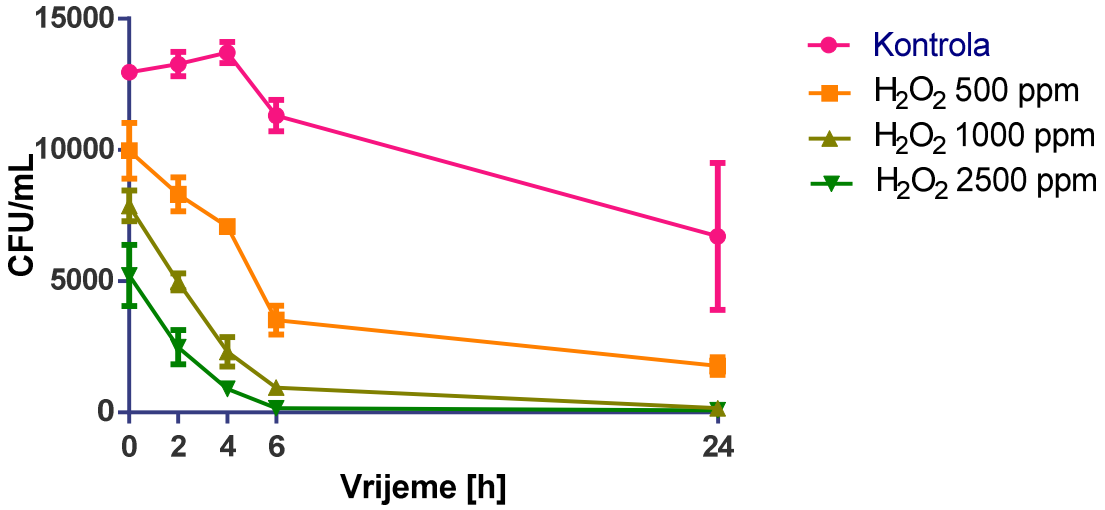


Slika 22. Promjena broja stanica kvasca *Candida famata* tijekom inkubacije s H_3BO_3

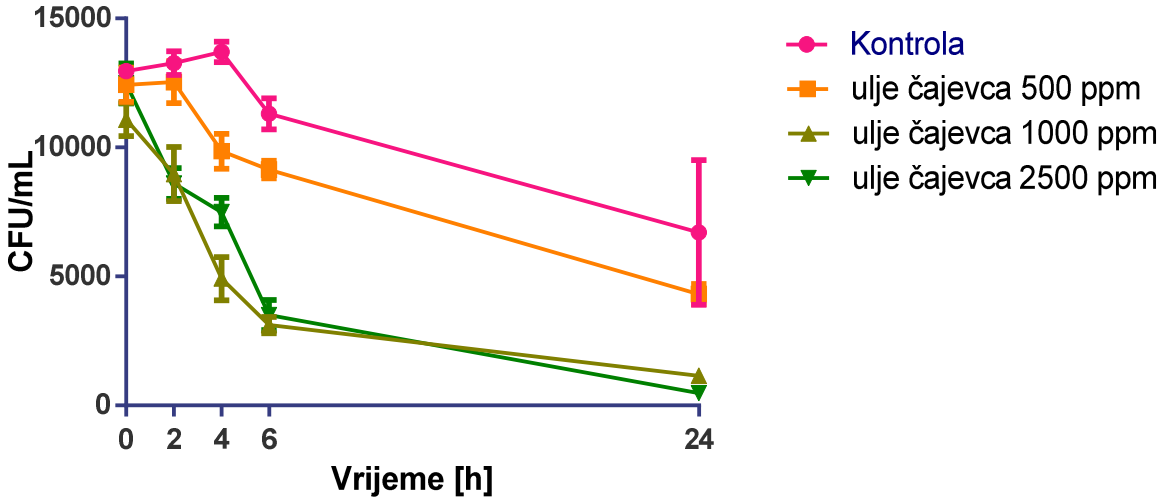
Candida krusei



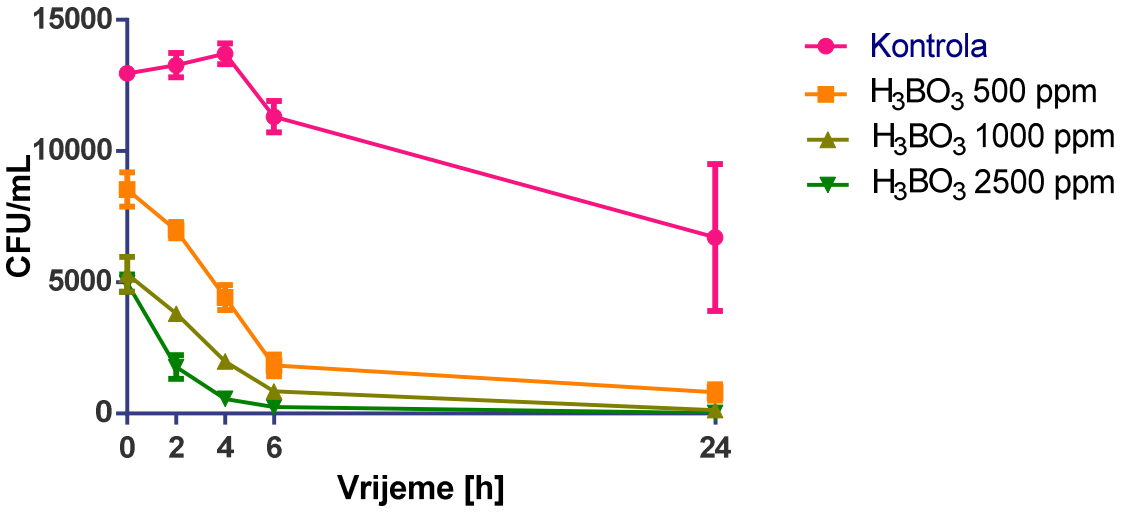
Slika 23. Promjena broja stanica kvasca *Candida krusei* tijekom inkubacije s $NaHCO_3$



Slika 24. Promjena broja stanica kvasca *Candida krusei* tijekom inkubacije s H_2O_2



Slika 25. Promjena broja stanica kvasca *Candida krusei* tijekom inkubacije s eteričnim uljem čajevca



Slika 26. Promjena broja stanica kvasca *Candida krusei* tijekom inkubacije s H_3BO_3

5. Rasprava

Antifungalni učinak spojeva prema odabranim vrstama kvasaca roda *Candida* istražen je pomoću dvije metode ispitivanja antimikrobnih spojeva. Prva metoda ili metoda agarne difuzije je vrlo raširena u ispitivanju antimikrobnih svojstava različitih tvari, posebno onih koji nisu lako topljive u vodi. U ovom radu, to se posebno odnosi na eterično ulje čajevca. Eterična ulja su kompleksne smjese različitih spojeva, i najčešće nisu dobro topljive u vodi. Iako se eterično ulje, za eksperimentalni dio ovog rada, otopilo u 70 % etanolu i 10 % Tween-u 80 u sterilnoj demineraliziranoj vodi, ipak tijekom inkubacije može doći do destabilizacije otopine i izdvajanja eteričnog ulja. Stoga su moguće i veće razlike u rezultatima, u usporedbi sa spojevima koji su dobro topljivi u vodi.

Slika 12 prikazuje rezultate zone inhibicije rasta kvasca vrste *Candida albicans* ispitanim spojevima. Upravo je eterično ulje čajevca uzrokovalo i najmanju zonu inhibicije rasta (16 mm), u usporedbi s bornom kiselinom (iste koncentracije 3000 ppm) koja iznosi 23 mm. Odmah nakon borne kiseline, vodikov peroksid je uzrokovao zonu inhibicije rasta kulture od 22 mm, potom slijedi natrij hidrogenkarbonat.

Nešto drugačiju otpornost vrste *C. famata* možemo uočiti iz rezultata prikazanih **Slikom 13** pri čemu se može uočiti slabija učinkovitost natrij hidrogenkarbonata, u usporedbi s učinkom istog spoja na *C. albicans.* Podjednaku zonu inhibicije rasta ove kulture kvasca uzrokovali su vodikov peroksid i borna kiselina. Pored toga, slično kao i *C. albicans,* vrsta *C. famata* je pokazala podjednaku zonu inhibicije prema eteričnom ulju čajevca. Ovi rezultati nisu iznenađujući, budući se radi o srodnim vrstama kvasaca, iako ovdje ne postoje stroga pravila, jer se otpornost/osjetljivost može značajno razlikovati među sojevima iste vrste mikroorganizama. Razlike su posljedica različitog genetičkog materijala, koji uvjetuje sposobnost oporavka kulture koja se nalazi u nepovoljnim uvjetima.

U usporedbi s ostalim istraženim vrstama, najotpornija se pokazala vrsta *C. krusei* (**Slika 14**) kojoj najmanju zonu inhibicije uzrokuje natrij hidrogenkarbonat, dok osjetljivost raste od vodikovog peroksida i ulja čajevca, sve do borne kiseline koja uzrokuje inhibiciju oko zone difuzije u iznosu od 18 mm. Kao slaba kiselina, borna kiselina disocira unutar stanice kvasca

mijenjajući fiziološku pH vrijednost što se očituje usporavanjem metabolizma stanica, te ugibanjem istih.

Druga primijenjena metoda u ovom istraživanju je Kochova metoda agarnih ploča. Ukratko, suspenzija određenog broja stanica se inkubira zajedno s određenom koncentracijom ispitivanog spoja/tvari. Budući se radi o uzgoju u tekućoj podlozi, i ovdje postoje razlike u aktivnosti spojeva koji su topljivi u vodi, u usporedbi sa spojevima čija je topljivost u vodi smanjena. Ovaj problem se, djelomično, može izbjeći kontinuiranim potresanjem kulture kako bi se osigurao najveći mogući kontakt netopljivog spoja sa stanicama mikroorganizama.

Rezultati istraživanja promjene broja stanica vrste *C. albicans* djelovanjem različitih koncentracija natrij hidrogenkarbonata upućuju na izražen utjecaj koncentracije spoja, budući broj stanica, pri višim koncentracijama spoja brže smanjuje (oštriji nagib krivulje u usporedbi s manjim koncentracijama) (**Slika 15**). Kontrolni uzorak (bez dodatka antifungalnog spoja) vrlo malo mijenja broja stanica u mL, međutim već 500 ppm NaHCO3 smanjuje broj stanica u 4 satu inkubacije, što je trend koji se nastavlja sve do kraja odabranog perioda inkubacije. Potentniji učinak u uništavanju stanica može se primijetiti iz djelovanja vodikovog peroksida (**Slika 16**) na istu vrstu gdje srednja i najveća koncentracija (1000 i 2500 ppm) uzrokuju ugibanje gotovo cijele populacije stanica u uzorku. Vodikov peroksid se često koristi kao dezinfekcijsko sredstvo kojim se uništava velik broj mikroorganizama, kako u prehrambenoj industriji, tako i šire. Djelovanje eteričnog ulja čajevca (**Slika 17**) pri najnižoj koncentraciji u 2. satu inkubacije je naizgled nelogično budući je veći broj stanica u uzorku u usporedbi s početnim inokulumom. Ovo može biti posljedica eksperimentalne pogreške, ali i činjenice kako eterična ulja uzrokuju oštećenja stanične membrane i curenje staničnog sadržaja koji služi kao dodatni izvor hranjivih tvari za žive stanice. Ukoliko je koncentracija ulja veća (1000 i 2500 ppm) stanice brzo odumiru, što je trend koji se nastavlja sve do kraja inkubacije. Brzo odumiranje stanica je uočljivo i djelovanjem borne kiseline, posebno pri višim koncentracijama (**Slika 18**) pri čemu na kraju inkubacije preživljava samo vrlo mali postotak stanica, u usporedbi s početnim brojem. U ovom slučaju sve primijenjene koncentracije djeluju fungicidno na test kulturu kvasca.

Candida famata pokazuje slične rezultate djelovanja $NaHCO_3$ tijekom inkubacije pri 25 °C (**Slika 19**). Za razliku od *C. albicans* srednja i najveća koncentracija uzrokuju gotovo potpuno odumiranje stanica do kraja inkubacije. Krivulje ugibanja stanica pri obje koncentracije su vrlo bliske što sugerira nisku osjetljivost istražene kulture kvasca. Izrazita učinkovitost u inhibiciji stanica vrste *C. famata* se može uočiti iz **Slike 20** budući je osjetljivost ove vrste upravo najveća, u usporedbi s ostale dvije vrste. Ova pojava se može uočiti iz rezultata primijenjene srednje i najveće koncentracije, posebno u 24. satu inkubacije. Za očekivati je kako se rezultati određivanja promjene broja stanica djelovanjem eteričnog ulja mogu razlikovati od ostalih rezultata (**Slika 21**) što se može primijetiti u 4. satu inkubacije pri 500 ppm eteričnog ulja jer su stanice iskoristile hranjive sastojke uginulih stanica i započele umnožavanje. Međutim, upravo su mlade stanice najosjetljivije na djelovanje antimikrobnih spojeva, što uočavamo kao oštar pad broja stanica od 4. prema 6. satu. Bez obzira na to, na kraju inkubacije svi uzorci (osim kontrolnog) su vrlo sličnog broja stanica, neovisno o koncentraciji ulja. Kontinuirani pad broja stanica se uočava i iz rezultata djelovanja borne kiseline na *C. famata* (**Slika 22**) gdje broj stanica, neovisno o koncentraciji, oštro pada do 6. sata, iako u 24. satu završavaju s gotovo istim brojem preživjelih stanica.

Vrsta *Candida krusei* se pokaza najotpornijim kvascem prema $NaHCO_3$ u određivanju metodom agarnih ploča (**Slika 23**). Posebno se to odnosi na najnižu koncentraciju od 500 ppm. Iako dolazi do kontinuiranog odumiranja stanica sve do kraja vremena inkubacije, broj stanica se značajno ne razlikuje od kontrolnog uzorka. Ipak, 1000 i 2500 ppm uništavaju stanice koje se više ne mogu oporaviti. Vodikov peroksid (**Slika 24**) snažnije uništava stanice jer se već pri 1000 ppm u 6. satu broj stanica približava nuli, što se i događa u 24. satu inkubacije. Ovo svojstvo se može korisno upotrijebiti u mnogim prehrambenim proizvodima ili površinama, posebno stoga što se vodikov peroksid vremenom raspada na vodu i kisik, neškodljive spojeve. Eterično ulja čajevca (**Slika 25**) pri višim koncentracijama brže reducira broj stanica *C. krusei*, u usporedbi s 500 ppm čija krivulja odumiranja stanica blisko prati kontrolni uzorak. Snažniji učinak u reduciranju broja živih stanica se može uočiti iz rezultata prikazanih **Slikom 26** gdje sve primijenjene koncentracije reduciraju broj živih stanica, što se posebno može uočiti nakon 6. sata inkubacije.

Metoda agarne difuzije se vrlo često koristi kao „screening“ metoda u ispitivanju antimikrobnog učinka spojeva budući se, u kratkom vremenskom periodu, može obraditi više spojeva/tvari i dobiti više rezultata. Istovremeno, metoda agarnih ploča je zahtjevnija uslijed veće količine materijala koji se koristi u istraživanju, ali daje potpunije podatke kako bi se mogao kretati broj stanica mikroorganizama u nekom materijalu, bez obzira što je u ovom istraživanju suspenzija stanica inkubirana u sterilnoj fiziološkoj otopini. Primjenom model otopina i stvarnih namirnica moguće je bolje pratiti promjenu broja stanica i učinkovitost antimikrobnih spojeva.

6. Zaključci

Iz rezultata istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. Najveću zonu inhibicije kvasca *Candida albicans* pri 3000 ppm uzrokuje borna kiselina (22 mm), potom vodikov peroksid (21 mm), natrij hidrogenkarbonat (18 mm) i, najslabije, ulje čajevca (16 mm).

2. Na vrstu kvasca *Candida famata* najsnažniju inhibiciju uzrokuje vodikov peroksid (23 mm) i borna kiselina (22 mm), dok slabiju zonu inhibicije uzrokuju eterično ulje čajevca (16 mm) i natrij hidrogenkarbonat (12 mm).

3. Borna kiselina pri 3000 ppm je uzrokovala inhibiciju *Candida krusei* s 18 mm, potom slijede ulje čajevca (14 mm), vodikov peroksid (13 mm) i, najslabiji, natrij hidrogenkarbonat s 11 mm.

4. Na odabrane spojeve najotporniji kvasac je vrsta *Candida krusei*, potom slijede *C. albicans* i *C. famata.*

5. Najveće odumiranje stanica kvasca *C. albicans* je primijećeno u 24. satu inkubacije u prisustvu 2500 ppm $NaHCO_3$, 2500 ppm H_2O_2, 2500 ppm eteričnog ulja čajevca te svih koncentracija borne kiseline.

6. Najveće odumiranje stanica kvasca *C. famata* je primijećeno u 24. satu inkubacije u prisustvu 1000 i 2500 ppm $NaHCO_3$, svim koncentracijama H_2O_2, eteričnog ulja čajevca i borne kiseline.

7. Od istraženih antifungalnih spojeva/tvari, $NaHCO_3$, H_2O_2 i eterično ulje čajevca pri 1000 i 2500 ppm, uzrokuju najveće odumiranje stanica kvasca *Candida krusei*, dok je borna kiselina učinkovita u svim primjenjenim koncentracijama.

8. Antifungalni spojevi/tvari primjenjeni u ovom istraživanju (natrij hidrogenkarbonat, vodikov peroksid, eterično ulje čajevca i borna kiselina) na odabrane vrste kvasaca djeluju snažnije na uništavanje stanice pri većim koncentracijama.

7. Literatura

Academon: *Léčivá Melaleuca altemifolia*. 2009. http://www.akademon.cz/clanekDetail.asp?name=Leciva%20Melaleuca%20altemifolia&source=0309 [14.9.2013.]

American cancer Society: *Tea Tree Oil*. 2008. http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/complementaryandalternativemedicine/herbsvitaminsandminerals/tea-tree-oil [14.9.2013.]

Anter T: *Best Articles on the Wonderful Sodium Bicarbonate*. 2012. http://tariganter.wordpress.com/2012/08/07/best-articles-on-the-wonderful-sodium-bicarbonate/ [19.8.2013.]

Bakočević I: *Borna kiselina.* Tehnologija hrane, 2011. http://www.tehnologijahrane.com/hemijahrane/prehrambeni-aditivi/konzervansi-e-280-297 [13.9.2013.]

Bamforth C: *Food, Fermentation and Microorganisms*. Blackwell, USA, 2005.

Bhunia A: *Foodborne Microbial Pathogens*. Springer, USA, 2008.

Blackburn C: *Food Spoilage microorganisms*. Woodhead, Cambridge, 2006.

Carrasco L, Rarnos M, Galisteo R, Pisa D, Fresno M, Gonzalez M: Isolation of *Candida famata* from a Patient with Acute Zonal Occult Outer Retinopathy. *Journal of Clinical Microbiology*, 43:635-640, 2004.

De Seta F, Schmidt M, Vu B, Larsen B: Antifungal mechanisms supporting boric acid therapy of Candida vaginitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy,* 63: 325-336, 2009.

Deak T: *Handbook of Food Spoilage Yeasts*. CRC Press, London, New York, 2007.

Fink D: Odziv fenolnega metabolzima v plodovih jablane sorte "Zlatni delišes" na škropljenje z natrijevim bikarbonatom. *Diplomski rad*. Biotehniška fakulteta, Ljubljana, 2011.

Goldamn E, Green L: *Practical Handbook of Microbiology*. CRC Press, London, New York, 2009.

Hammer KA, Carson CF, Riley TV: Antifungal effects of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil and its components on *Candida albicans, Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53: 1081–1085, 2004.

Hogg S: *Essential Microbiology*. John Wiley & Sons LTD, England, 2005.

Hull C, Parker J, Bader O, Weig M, Gross U, Warrilow A, Kelly D, Kelly S: Facultative Sterol Uptake in an Ergosterol-Deficient Clinical Isolate of *Candida glabrata* Harboring a Missense Mutation in ERG11 and Exhibiting Cross-Resistance to Azoles and Amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56:4223, 2012.

Jay J, Loessner M, Golden D: *Modern Food Microbiology*. Springer, USA, 2005.

Kavanagh K: *Fungi*. John Wilex & Sons LTD, Ireland, 2005.

Kurtzman C, Fell J: Yeasts. U *Biodiversity of Fungi*. Elsevier Inc, USA, 2004.

Larsen B, White S: Antifungal Effect of Hydrogen Peroxide on Catalase-Producing Strains of *Candida* spp. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 3:73-78, 1995.

Miloš Lj: *Gljivična oboljenja*. Valovi ljepote, 2005. http://www.valoviljepote.eu/strukovni-prilozi/gljivicna-ljec.htm [2.9.2013.]

Muter O, Patmalnieks A, Rapoprt A: Interrelations of the yeast Candida utilis and Cr(VI): metal reduction and its distribution in the cell and mediu. *Process Biochemistry*, 36:963-970, 2001.

Rupp S: *Where humans meet fungi*. Fraunhofer IGB, 2005. http://www.igb.fraunhofer.de/en/press-media/archive/2005/yeast-fungi.html [10.9.2013]

Satyanarayana T, Kunze G: *Yeast Biotehnology - Diversity and Applications*. Springer, USA, 2009.

Schaechter M: *The Desk Encyclopedia of Microbiology*. Elsevier, California, 2004.

Stranks J: *The A-Z of Food Safety*. Thorogood, London, 2007.

Webster J, Weber R: *Introduction to Fungi*. Cambridge University, New York, 2007.

Williams D: *Mnogostruke koristi vodikovog peroksida*. 2003. http://www.ivantic.net/Ostale_knjiige/Zdravlje/hidrogenperoksid.htm [21.10.2013.]

http://www.microbeworld.org/component/jlibrary/?view=article&id=1097 [2.9.2013.]

http://enologyaccess.org/EA2/index.php/winemicrobes/918-yeastid/186-candida-krusei.html [2.9.2013.]

http://www.psmicrographs.co.uk [10.9.2013]

http://ccbolgroup.com/chemical.html [13.9.2013.]

http://www.thecandidadiet.com/vitamin-c.htm [20.10.2013]

http://www.angelfire.com/az/sthurston/hydrogen_peroxide.html [4.8.2013.]

http://umm.edu/health/medical/altmed/condition/candidiasis [22.8.2013.]

http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp?id=FU200802060037 [11.01.2014.]