

Utjecaj jestivog omotača od pululana s dodatkom natamicina i eteričnog ulja bosiljka na kvalitetu cherry rajčice

Šiškić, Fabijan

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:821510>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-05**

REPOZITORIJ

PTFS

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**

Fabijan Šiškić

**Utjecaj jestivog omotača od pululana s dodatkom natamicina i
eteričnog ulja bosiljka na kvalitetu cherry rajčice**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

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

Zavod za ispitivanje hrane i prehrane/Zavod za prehrambene tehnologije
Katedra za biologiju i mikrobiologiju/Katedra za tehnologiju voća i povrća
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

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

Utjecaj jestivog omotača od pululana s dodatkom natamicina i eteričnog ulja bosiljka na kvalitetu cherry rajčice
Fabijan Šiškić, 0149220439

Sažetak:

U radu je istražen utjecaj jestivog omotača od pululana s dodatkom natamicina i eteričnog ulja bosiljka na kvalitetu cherry rajčice kontaminirane plijesnima vrste *Botrytis cinerea* i *Cladosporium cladosporioides* tijekom čuvanja pri 25°C. Kontrolni i tretirani uzorci su skladišteni tijekom 9 dana, a analizirani su u 3., 6. i 9. danu. Uzorcima su, pored mikrobioloških parametara, tijekom čuvanja određeni i fizikalno-kemijski: boja, čvrstoća, topljiva suha tvar, sadržaj kiselina, pH te koncentracije dušika, kisika i ugljikovog dioksida u pakiranjima. Određen je i postotak vidljivo pljesnivih uzoraka rajčica kontaminiranim s *B. cinerea* i *C. cladosporioides* tijekom skladištenja. Jestivi omotač je utjecao na smanjenje koncentracije kisika i dušika u pakiranjima (ispod 16%; do 42%), a povećao koncentracije ugljičnog dioksida tijekom 9. dana, smanjio promjene boje te gubitak čvrstoće. Natamicin je snažnije inhibirao *C. cladosporioides* od *B. cinerea* (6,25 ppm minimalna inhibitorna koncentracija tj. MIK; 12,5 ppm MIK), dok su obje vrste jednako osjetljive na eterično ulje bosiljka (400 ppm MIK). Rajčice tretirane pululanom i natamicinom su duže zadržale kakvoću uz manji postotak pljesnivih plodova.

Ključne riječi: cherry rajčica, pululan, natamicin, bosiljak, mikrobiologija

Rad sadrži: 56 stranica
16 slika
13 tablica
6 priloga
44 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

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

- | | |
|--|---------------|
| 1. prof. dr. sc. Lidija Jakobek Barron | predsjednik |
| 2. prof. dr. sc. Hrvoje Pavlović | član-mentor |
| 3. prof. dr. sc. Nela Nedić Tiban | član-komentor |
| 4. prof. dr. sc. Mirela Kopjar | zamjena člana |

Datum obrane: 24. rujna, 2024.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
University Graduate Study of Food Engineering
Department of Food and Nutrition Research/Department of Food Technologies
Subdepartment of Biology and Microbiology/Subdepartment of Fruits and Vegetables Technology
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

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

Mentor: Hrvoje Pavlović, PhD, prof.

Technical assistance: Nela Nedić Tiban, PhD, prof.

Effect of Edible Pullulan Coating with the Addition of Natamycin and Basil Essential Oil on Cherry Tomato Quality

Fabijan Šiškić, 0149220439

Summary:

The paper investigated the influence of an edible pullulan coating with the addition of natamycin and basil essential oil on the quality of cherry tomatoes contaminated with the molds *Botrytis cinerea* and *Cladosporium cladosporioides* during storage at 25°C. Control and treated samples were stored for 9 days, and were analyzed on the 3rd, 6th and 9th day. In addition to the microbiological parameters, the samples were also physico-chemically analysed during storage: color, firmness, soluble dry matter, acid content, pH, and concentrations of nitrogen, oxygen and carbon dioxide in the packages. The percentage of visibly moldy tomato samples contaminated with *B. cinerea* and *C. cladosporioides* during storage was also determined. The edible coating had the effect of reducing the concentration of oxygen and nitrogen in the packages (below 16%; up to 42%), and increased the concentration of carbon dioxide during the 9th day, reducing color changes and loss of firmness. Natamycin was more potent in inhibition of *C. cladosporioides* than *B. cinerea* (6.25 ppm minimum inhibitory concentration ie MIC; 12.5 ppm MIC), while both species are equally sensitive to basil essential oil (400 ppm MIC). Tomatoes treated with pullulan and natamycin kept their quality longer with a lower percentage of moldy fruits.

Keywords: cherry tomatoes, pullulan, natamycin, basil, microbiology

Thesis contains: 56 pages
16 figures
13 tables
6 supplements
44 references

Original in: Croatian

Defense committee:

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

Defense date: September 24, 2024.

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

DIPLOMSKI RAD JAVNO JE OBRANJEN DANA

24. rujna 2024.

TE OCIJENJEN USPJEHOM

izvostan (5)

Pred Povjerenstvom za obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc., Lidija Jakobek Barron predsjednik L. Jakobek Barron
(potpis)
2. prof. dr. sc., Nela Nedić Tiban član [signature]
(potpis)
3. prof. dr. sc., ^{Hruje Paulović} ~~Mirela Kopjar~~ član [signature]
(potpis)

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. RAJČICA	4
CHERRY RAJČICA	5
2.2. JESTIVI OMOTAČI	6
PULULAN	8
NATAMICIN	9
2.3. ETERIČNO ULJE BOSILJKA	11
METIL KAVIKOL	12
2.4. PLIJESNI	13
<i>Botrytis cinerea</i>	14
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. ZADATAK	19
3.2. MATERIJAL I METODE	19
3.2.1. MATERIJAL	19
RAJČICE	19
PRIPREMA RAJČICA	19
3.2.1. METODE	20
PLIJESNI	23
PULULAN	23
• <i>Priprema suspenzija spora i određivanje minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne fungicidne (MFK) koncentracije macrobroth metodom</i>	23
• <i>Određivanje MIK i MFK</i>	24
• <i>Priprema pululana za uranjanje rajčice</i>	25
• <i>Tretiranje rajčica</i>	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	26

4.1. KONCENTRACIJA PLINOVA UNUTAR PAKIRANJA TIJEKOM 9 DANA ČUVANJA UZORAKA PRI SOBNOJ TEMPERATURI	27
4.2. BOJA POKOŽICE PLODA TIJEKOM 9 DANA ČUVANJA UZORAKA PRI SOBNOJ TEMPERATURI	29
4.3. ČVRSTOĆA RAJČICA NA RAZLIČITIM DIJELOVIMA PLODA	32
4.4. FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETARI U ISPITIVANIM UZORCIMA.....	35
4.5. UČINAK ETERIČNOG ULJA BOSILJKA I NATAMICINA NA ODABRANE PLIJESNI.....	38
5. ZAKLJUČCI	45
6. LITERATURA	47
7. PRILOZI.....	52

Popis oznaka, kratica i simbola

AMB	Aerobne, mezofilne bakterije
a_w	Aktivitet vode
CFU	Colony – forming unit
CYA	Czapek Yeast Agar (Czapekov kvaščev agar)
G25N	25% Glicerol Nitratni Agar
MEA	Malt Extract Agar (Maltozni agar)
MFK	Minimalna fungicidna koncentracija
MIK	Minimalna inhibitorna koncentracija
PiK	Kvasci i plijesni

1. UVOD

Rajčica (*Solanum lycopersicum* L.) je jedno od najraširenijih povrća na svijetu, a proizvodi se na više od tri milijuna hektara (Borošić, 2016). Jedan je od najbogatijih prirodnih izvora vitamina C, a sadrži i velike količine vitamina B, E i K. Nadalje, rajčica je bogata kalijem, natrijem, magnezijem, kalcijem, željezom i elementima u tragovima (Benko, 2019.) Iako se veliki kultivari većinom uzgajaju za daljnju preradu, cherry rajčica najčešće na tržište dolazi u svježem stanju. Zbog toga, svježja rajčica je podložna kontaminaciji i kvarenju različitim mikroorganizmima. Upravo se zbog te činjenice u ovome radu htjela ispitati primjena jestivog omotača s dodatkom eteričnog ulja u produženju vremena čuvanja cherry rajčice u svježem stanju. Osnovna premisa je da se primjenom jestivog omotača s dodatkom eteričnog ulja može smanjiti problem mikrobiološke kontaminacije rajčice, uz očuvanje ili čak i poboljšanje senzorskih svojstava, produženje trajnosti cherry rajčice te smanjenje zagađenja okoliša zamjenom korištenja plastike u pakiranju prirodnim materijalima. U eksperimentalnom radu je istražen učinak dodatak natamicina te eteričnog ulja bosiljka na dvije vrste plijesni, uzročnike kvarenja rajčice, *Botrytis cinerea* i *Cladosporium cladosporioides*.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. RAJČICA

Rajčica (*Solanum lycopersicum* L.) je jednogodišnje povrće razgranate, zeljaste stabljike. Podrijetlom je iz suptropskih predjela Središnje i Južne Amerike. Starosjedioci su ju upotrebljavali za hranu i prije otkrića Amerike. Nakon otkrića Amerike, rajčica je donesena u Europu. U početku se uzgajala samo kao ukrasno bilje, a nakon polovine 18. stoljeća je započeo uzgoj za konzumaciju. Za konzumaciju se prvotno počela uzgajati u Španjolskoj i Portugalu, a nedugo zatim i u Francuskoj i Italiji. Fiziološki zreli plodovi su sočne i mesnate bobice, različitog oblika i veličine, s dvije ili više komora, koje mogu biti glatke ili rebraste. Plodovi su najčešće crvene boje, skupljeni u grozdove, iako postoje sorte i drugih boja, većinom narančaste i žute. Masa ploda varira od 10 do 500 g. Raznolikost plodova rajčice vidljiva je na **Slici 1**.



Slika 1 Plodovi rajčice (Web 1)

Suha tvar ploda (4,5 – 8,1%) sadrži ugljikohidrate (1,9 – 4,9%), bjelančevine (0,5 – 1,6%), organske kiseline (0,3 – 0,8%), vlakna (0,2 – 0,3%), minerale (0,5 – 0,6%) te vitamine A i C u najvećoj količini i vitamin B. Najzastupljenije organske kiseline u zreлом plodu rajčice su jabučna i limunska, a udio vitamina (izražen u mg/100 g sirovog ploda) iznosi: vitamin A (0,5 – 2,0 mg/100 g), vitamin C (20 – 43 mg/100 g), vitamin B₁ (0,05 – 0,07 mg/100 g) te vitamin B₂ (0,04 – 0,08 mg/100 g) (Josifović, 1973a). Rajčica i proizvodi od rajčice su najpoznatiji izvor karotenoida u svakodnevnoj prehrani. U rajčici se posebno ističu α – karoten, β – karoten, lutein, zeaksantin i likopen, kao jedan od najpoznatijih predstavnika. Likopen je biljni pigment

koji rajčici daje crvenu boju. Također, prepoznat je kao jaki antioksidans zbog čega ima sposobnost neutralizacije slobodnih radikala u ljudskom organizmu (Benko, 2019). Plodovi rajčice se rabe u prehrani svježi, npr. prilikom pripreme salata, za kuhanje itd. i za daljnju preradu za proizvodnju sokova, koncentrata, pelata, kečapa itd. Rajčica je jedno od najraširenijih povrća na svijetu, a uzgaja se na više od tri milijuna hektara na svim kontinentima (Borošić, 2016). Proizvodnja je 2022. godine iznosila 186 milijuna tona, a u proizvodnji su prednjačile Kina, Indija, Turska i Sjedinjene Američke Države (FAOSTAT, 2022).

CHERRY RAJČICA

Cherry rajčica je autohtona biljka u Peruu i Ekvadoru, a smatra se pretkom modernih sorti rajčice. Današnji status je dostigla dugom povijesti pripitomljavanja, koja je vrlo vjerojatno započela u središnjem Meksiku (González, Cid i Lobo, 2011). Uz kultivare velikih plodova, cherry rajčica je sve popularnija zbog svojih kvalitativnih svojstava. Hrvatski naziv za cherry rajčicu je trešnjasta ili trešnjolika rajčica. Kultivari cherry rajčice mogu razviti plodove koji mogu varirati od 10 do 30 g. Broj plodova u grozdu većinom se kreće u rasponu od 15 do 20, ali postoje i kultivari s više od 30 plodova u grozdu. Zreli plodovi mogu biti crvene, žute ili crveno – narančaste boje kao što je vidljivo na **Slici 2**.



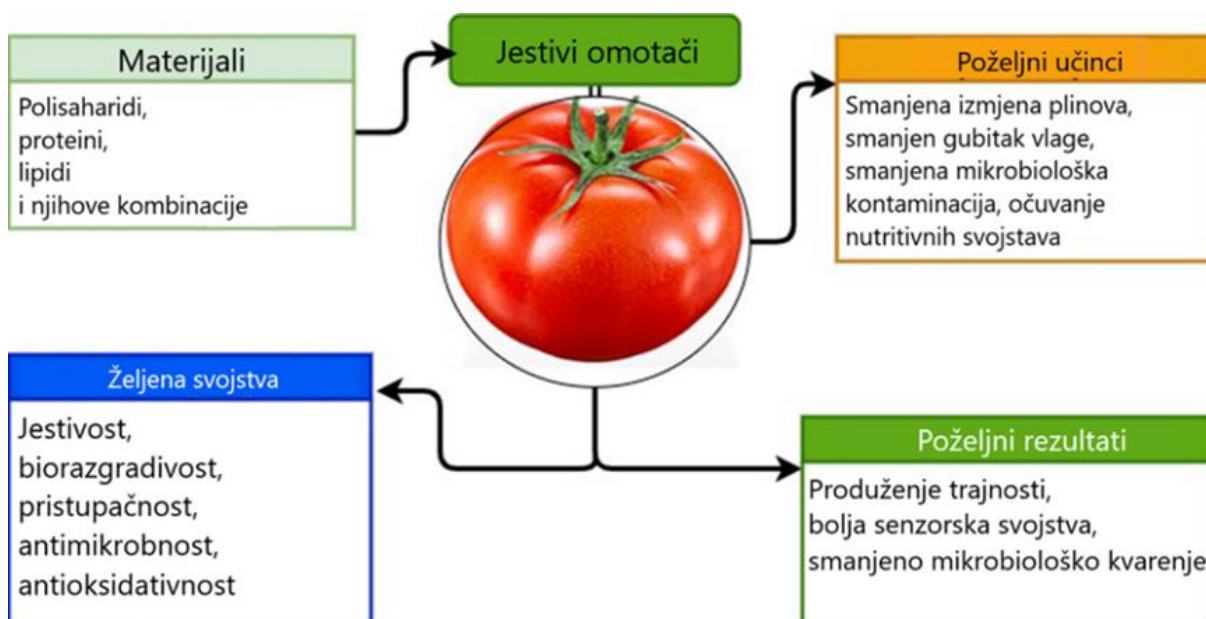
Slika 2 Plodovi cherry rajčice (Web 2)

Plodovi cherry rajčice sadrže više suhe tvari, odnosno topljive suhe tvari, askorbinske kiseline i drugih nutrijenata, pa prema tome i veću nutritivnu vrijednost nego kultivari većih plodova. Također, plodovi su aromatičnijeg okusa i slađi zbog povoljnijeg odnosa šećera i kiselina. Iako se zbog sitnih plodova cherry rajčica često ne koristi za daljnju preradu i na tržište dolazi u svježem stanju, brojni su proizvodi, u prvom redu minimalno procesirani (salate npr.), umaci od cherry rajčice, cijele cherry rajčice konzervirane u soku rajčice, pasteurizirane cherry rajčice u limenkama i staklenkama, pirei od cherry rajčice, djelomično osušena *cherry* rajčica marinirana u ulju, itd. Jedan je od najbogatijih prirodnih izvora vitamina C, a sadrži i velike količine vitamina B, E i K. Nadalje, cherry rajčica, kao i plodovi rajčice velikih kultivara, bogata je kalijem, natrijem, magnezijem, kalcijem, željezom i elementima u tragovima (Benko, 2019).

2.2. JESTIVI OMOTAČI

Jestivi omotač je tanak sloj napravljen od jestivih materijala, a koristi se za produženje trajnosti prehrambenih proizvoda. Jestivi omotači se najčešće proizvode od biorazgradivih polimera kao alternativa nerazgradivim materijalima koji se danas koriste i koji posljedično uzrokuju pojavu i nakupljanje velikih količina otpada. Prirodni polimeri kao što su polisaharidi, proteini, te lipidi, kao i njihove kombinacije, koriste se u proizvodnji jestivih omotača. Primjena jestivih omotača je relativno nova tehnologija koja ima mogućnost očuvanja kvalitete i sigurnosti prehrambenih proizvoda. Da bi u tome uspjeli, moraju zadovoljiti mnoge zahtjeve. Moraju biti organoleptički prikladni, imati dobra barijerna svojstva i dobru mehaničku čvrstoću. Također, moraju biti biokemijski, fizikalno – kemijski i mikrobiološki stabilni te sigurni za ljudsku

upotrebu. Dodatno, moraju biti cjenovno dostupni i ne smiju zagađivati okoliš.



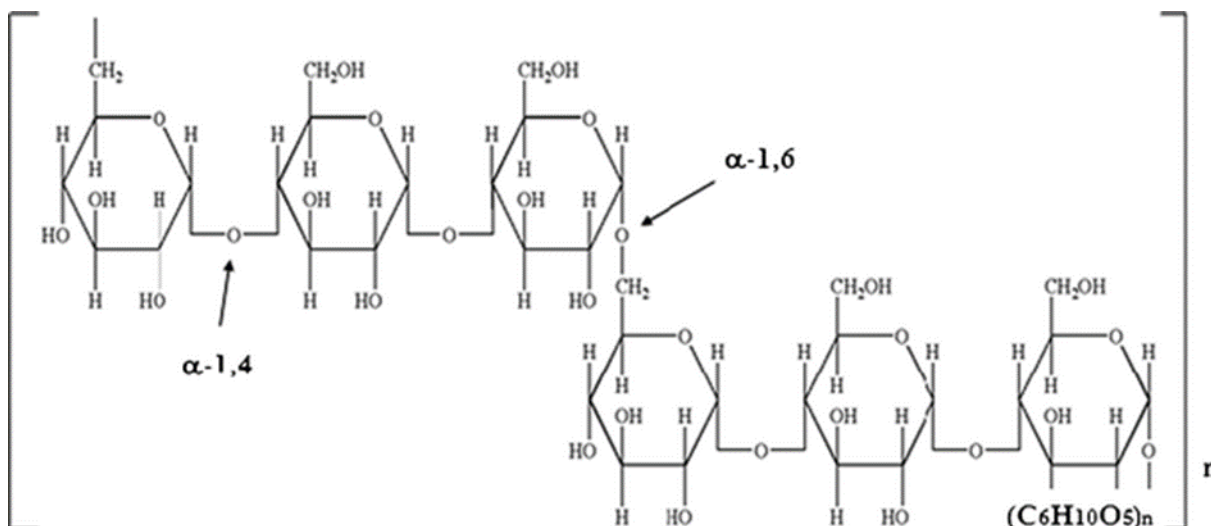
Slika 3 Princip jestivih omotača (Duguma, 2022.)

Jestivi omotači imaju sposobnost smanjivanja gubitka vlage iz proizvoda, kao i smanjenja izmjene plinova između proizvoda i okoliša. Isto tako, mogu smanjiti oksidaciju lipida, enzimsku aktivnost proizvoda kao i mikrobiološko kvarenje. Funkcionalnost omotača se može poboljšati dodatkom antioksidanasa, sladila i aroma koji za svrhu imaju produženje trajnosti proizvoda te poboljšanje senzorskih i nutritivnih svojstava. Jestivi omotači pridonose produženju trajnosti i organoleptičkih svojstava svježih proizvoda, kao što su voće i povrće, na način da modificiraju atmosferu oko proizvoda, smanjuju stupanj respiracije i nastanak etilena, pri čemu usporavaju fiziološku aktivnost proizvoda. Nadalje, mogu usporiti enzimsku aktivnost, usporiti reakcije posmeđivanja i omekšanja ploda te sačuvati prirodne hlapljive komponente. Dodatkom antimikrobnih agenasa, kao što su organske kiseline i eterična ulja iz biljaka, može se usporiti ili u potpunosti zaustaviti rast mikroorganizama. Usprkos mnogim prednostima primjene jestivih omotača, postoje i izazovi koji sprječavaju njihovu primjenu na široj razini. Na primjer, zbog svoje jake i karakteristične arome i okusa, primjena jestivih omotača s dodatkom propolisa je ograničena. Nadalje, u nekim istraživanjima (Peralta – Ruiz i sur., 2020; Tahir i sur., 2019) zaključeno je kako je primjenom jestivih omotača došlo do smanjenja senzorske kvalitete rajčice. Dodatno, smanjena propusnost za vlagu može imati i negativne posljedice kondenzacije vlage gdje se to želi izbjeći; cijena samoga materijala za

proizvodnju jestivih omotača predstavlja prepreku kao i manjak standardiziranih receptura proizvodnje jestivih omotača (Duguma, 2022).

PULULAN

Pululan je ekstracelularni, u vodi topljiv, neutralni polisaharid koji proizvodi *Aureobasidium pullulans*. Bijele je boje, bez okusa i mirisa (Rensink i sur., 2024). O pululanu je prvi izvijestio Bauer 1938. godine. Elementarna analiza je otkrila kemijsku formulu pululana: $(C_6H_{12}O_5)_n$ (Cheng, Demirci i Catchmark, 2011). Pululan se sastoji od ponavljajućih jedinica maltotrioze povezanih α -1,6 vezama (Sutherland, 1998; Catley, Ramsay i Servis, 1986), dok su unutarnje glukozne jedinice povezane α -1,4 glikozidnom vezom, što je vidljivo na **Slici 4**. Proizvodnja pululana pomoću *Aureobasidium pullulans* kreće se oko približno 125,7 g/L prilikom korištenja nusprodukata poljoprivredne proizvodnje (melasa, kokos, škrob iz krumpira, soja), dok je najveći prinos (162,3 g/L) dobiven korištenjem glukoze kao izvora ugljika (Rensink i sur., 2024). Molekulska masa pululana značajno se razlikuje, varirajući od $4,5 \times 10^4$ do 6×10^5 , a ovisna je o parametrima uzgoja (Lee i Yoo, 1993). Prosječna molekulska masa i distribucija molekulske mase ključni su za biološku aktivnost pululana. Zbog svojih veza, pululan pokazuje svojstva poput ljepljivosti, sposobnosti stvaranja vlakana i tankih biorazgradivih filmova koji su prozirni i nepropusni za zrak (Yuen, 1974).



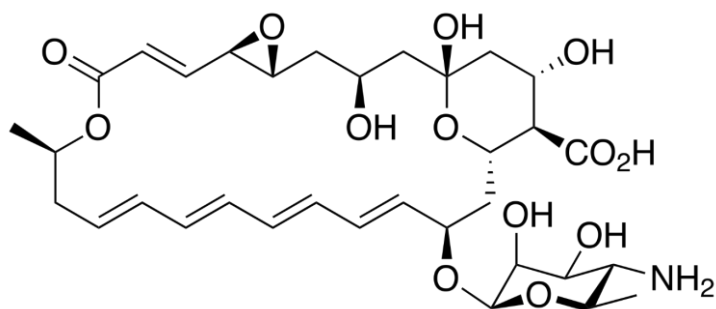
Slika 4 Kemijska struktura pululana (Web 3)

Zbog gore navedenog se pululan već dugo koristi u različite svrhe kao što je dodatak hrani, zgušnjivač, stabilizator, punilo, sredstvo za želiranje, zamjena za krvnu plazmu, u kozmetici te

kao ljepilo i flokulant (Leathers, 2003; Ramesan i Sharma, 2007; Rensink i sur., 2024). Iako je relativno visoka cijena u prošlosti ograničavala njegovu upotrebu, zbog povoljnog učinka za ljudsko zdravlje, primjena pululana je u porastu (Leathers, 2003). U prehrambenoj industriji, pululan se može koristiti u proizvodnji niskokalorične hrane i dodataka hrani zbog činjenice da je ugljikohidrat s malom kalorijskom vrijednošću. Također, može se koristiti kao zamjena za škrob pri pripremi hrane kao što su kolači, biskviti i krafne zbog navedene nisko kalorijske vrijednosti. Poznato je da je pululan otporan na enzime amilaze u sisavaca pri čemu se može koristiti kao prebiotik. Nadalje, pululan se može koristiti kao antifungalni agens pri čemu zaustavlja kvarenje hrane plijesnima. Također, zbog svojstva da ne mijenja svoju viskoznost u prisustvu natrijeva klorida, može se koristiti za očuvanje viskoznosti i sjaja umaka s visokim udjelom soli (Singh, Kaur i Kennedy, 2019).

NATAMICIN

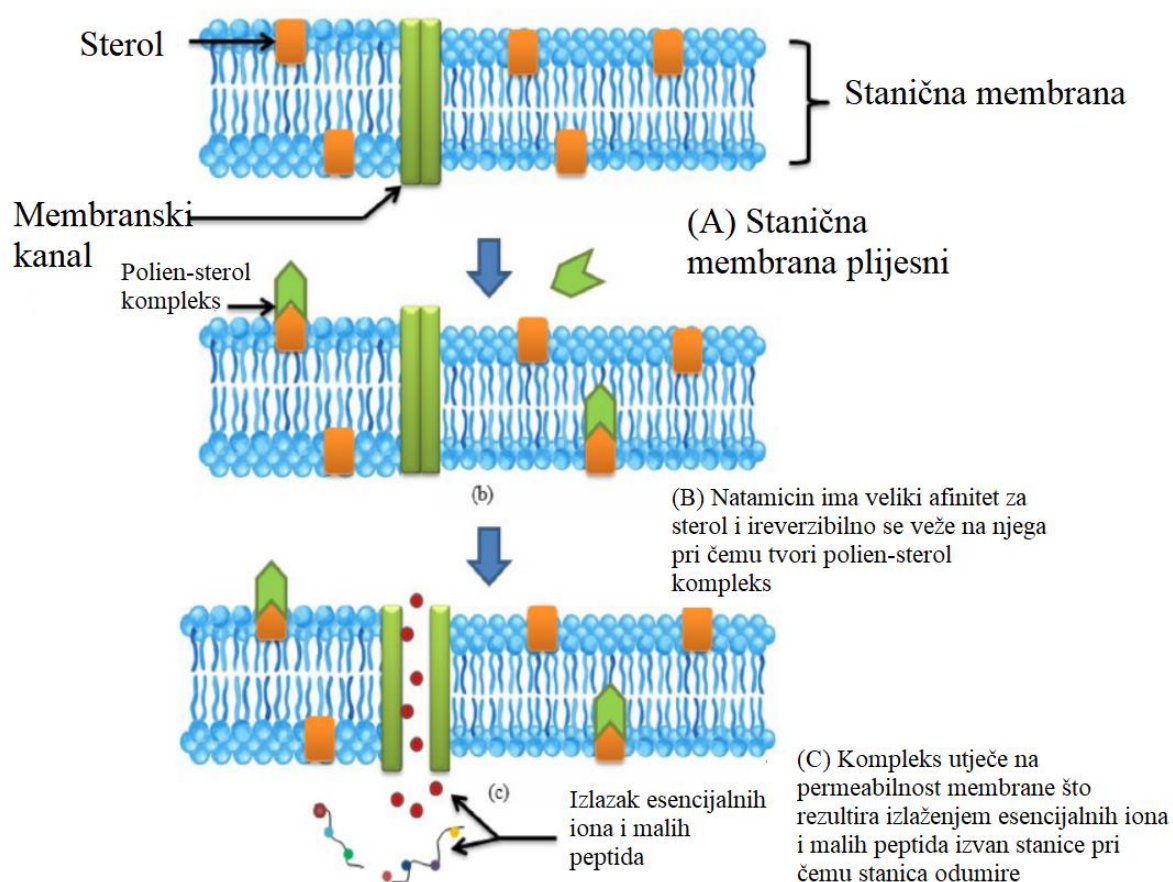
Natamicin (poznat i pod imenom pimaricin) je prirodni antimikrobni peptid koji proizvode *Streptomyces natalensis* i *Streptomyces gilvosporeus*. Koristi se kao antifungalni agens u različitim prehrambenim proizvodima kao što su jogurt, sirevi, fermentirane kobasice, sokovi, vino itd. Natamicin je prah bijele boje, molekularne težine 665,75 g/mol, a empirijska formula je $C_{33}H_{47}NO_{13}$, struktura molekule natamicina je vidljiva na **Slici 5**.



Slika 5 Kemijska struktura natamicina (Web 4)

Natamicin je slabo topiv u vodi, ali se dobro otapa u organskim otapalima. Stabilnost mu je ovisna o puno faktora kao što su temperatura, otapalo koje se koristi, tlak, pH, svjetlost, prisutnost oksidanasa, teških metala itd. Zbog svoje slabe topljivosti u vodi, natamicin se zadržava na površini proizvoda pri čemu njegov konzervirajući učinak ne opada. Komercijalno, natamicin se proizvodi fermentacijom pomoću navedenih kultura u mediju koji sadrži izvor ugljika i fermentabilni izvor dušika. Kao izvor ugljika mogu se koristiti škrob ili melasa dok se

soja i kazein mogu koristiti kao izvor dušika. Fermentacija se odvija na pH 6 – 8 i temperaturi 26 – 30°C. Zbog svoje slabe topljivosti, nakuplja se u obliku kristala (0,5 – 20 µm) pri čemu se može lako odvojiti od biomase. Natamicin dokazano djeluje protiv kvasaca i plijesni dok nema nikakav učinak na bakterije i viruse. Način na koji natamicin djeluje na kvasce i plijesni se bazira na njegovom afinitetu prema ergosterolu u staničnoj membrani. Naime, natamicin se veže ireverzibilno s ergosterolom pri čemu nastaje kompleks polien-sterol. Nastali kompleks utječe na permeabilnost membrane pri čemu omogućuje izlazak iona i malih peptida iz stanice što uzrokuje prestanak rasta plijesni (Mahima i sur., 2021). Navedeni proces je moguće vidjeti na **Slici 6**.



Slika 6 Princip utjecaja natamicina na stanice (Mahima i sur., 2021)

S druge strane, u istraživanju Welschera i sur. (2007), zaključeno je kako natamicin zapravo ne djeluje na staničnu membranu povećavajući permeabilnost membrane. Nadalje, zaključeno je kako se način djelovanja natamicina na membranu plijesni mora dodatno istražiti (Welscher i sur., 2007). Zbog navedenog antifungalnog svojstva i svoje slabe topljivosti u vodi, natamicin je pronašao široku primjenu unutar prehrambene industrije. Koristi se za očuvanje mliječnih

proizvoda kao što je sir, koristi se i na površini fermentiranih kobasica, voća i povrća te pekarskih proizvoda. Zbog navedenog svojstva se, u posljednje vrijeme, istražuje mogućnost primjene natamicina prilikom proizvodnje pakiranja za prehrambene proizvode. Obzirom da ne utječe na sensoriku proizvoda, postoji mogućnost primjene u jestivoj ambalaži kao i ambalaži koja bi zbog antifungalnog djelovanja natamicina produžila trajnost prehrambenih proizvoda (Mahima i sur., 2021).

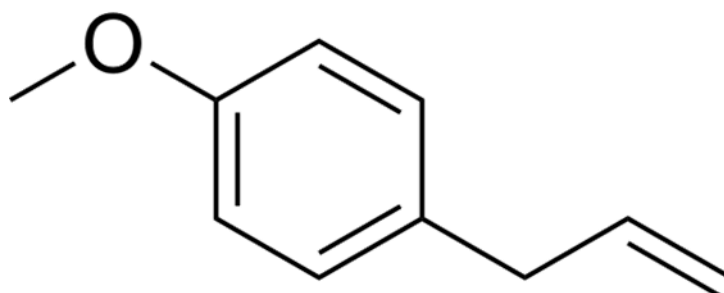
2.3. ETERIČNO ULJE BOSILJKA

Bosiljak (*Ocimum basilicum* L.) ili pitomi bosiljak jednogodišnja je zeljasta biljka porijeklom iz Azije i Afrike. Osim za korištenje u kulturnim i tradicijskim obredima u prošlosti, bosiljak je postao i jedna od najpopularnijih začinskih biljaka u kućanstvima širom svijeta, a pronašao je i široku primjenu u prehrambenoj industriji. Naziv bosiljka potječe od grčke riječi *basileus*, što znači kraljevski. Taksonomija bosiljka je vrlo komplicirana zbog interspecifične hibridizacije i poliplodije te zbog velike morfološke raznolikosti i varijacija kemotipa unutar vrste bosiljka. Bosiljak se uzgaja širom svijeta kao popularna vrtna biljka zbog toga što zahtjeva jako malo održavanja. Biljka obično cvjeta u rano ljeto i može se brati njegovom sredinom. Komercijalno se uzgaja u mnogim zemljama kao što su Egipat, Indija, Indonezija, Meksiko i Sjedinjene Američke Države (Li i Chang, 2016). Eterično ulje je biljno ulje koje sadrži hlapljive aromatične spojeve. Drugim riječima, eterično je ulje biljaka smjesa lako hlapljivih, biološki aktivnih kemijskih spojeva dobivenih iz različitih dijelova biljaka. Eterično ulje u svome sastavu sadrži alkaloidne, flavonoide, izoflavone, monoterpene, karotenoide, aldehide itd. (Sundararajan i sur., 2018). Eterično se ulje može ekstrahirati iz biljaka putem destilacije vodenom parom, tiještenjem ili ekstrakcijom različitim otapalima. Ekstrakcijom eteričnog ulja se dobije otprilike 0,1 – 0,7% produkta. Iako eterično ulje bosiljka sadrži preko 200 kemijskih spojeva, najveći udio zauzimaju tri najzastupljenije komponente, a to su linalool (7 – 59%), metil kavikol (5 – 29%) te eugenol (2 – 12%). Eterično ulje bosiljka djeluje antimikrobno te insekticidno, posjeduje veliku antioksidativnu aktivnost, dobar je antiprotozoik te ima i antikancerogeni učinak (Li i Chang, 2016). Zbog navedenih svojstava, eterično je ulje bosiljka vrlo popularno u kulinarstvu te proizvodnji i preradi hrane. Eterično ulje bosiljka se zbog svog ugodnog mirisa koristi kao aditiv u kobasicama, sirevima te alkoholnim i bezalkoholnim pićima. Također, eterično ulje bosiljka se, u kombinaciji s drugim začinima i biljkama, koristi u različitim prehrambenim proizvodima kao što su pekarski proizvodi, slastice, pudinzi,

sladoledi, senf i ukiseljeno povrće. Pored toga, upotreba eteričnog ulja bosiljka kao prirodne alternative konzervansima je u porastu. Koristi se kao prirodni antioksidativni aditiv u mesu, pri čemu poboljšava boju proizvoda i smanjuje oksidaciju lipida unutar njega. Također, koristi se kao antibakterijski agens u kobasicama pri čemu smanjuje broj bakterije *Staphylococcus aureus*. Nadalje, eterično ulje bosiljka se dodaje u mliječne proizvode zbog svojih antioksidativnih i antimikrobnih svojstava kako bi poboljšao okus proizvoda i produžio njihovu trajnost (Da Silva i sur., 2022).

METIL KAVIKOL

Metil kavikol, odnosno spoj poznatiji pod imenom estragol, ima slatki, biljni miris s aromom anisa i komorača. Sastoji se od benzenskog prstena koji je supstituiran alilnom i metoksi skupinom (Slika 7). Metil kavikol je izomer anetola od kojega se razlikuje po položaju dvostruke veze.



Slika 7 Metil kavikol (Web 5)

Metil kavikol je bezbojna tekućina, iako nečisti uzorci mogu biti žuto obojeni (Fahlbusch i sur., 2003). Postoji mišljenje kako je metil kavikol kancerogen i genotoksičan (EMA, 2023). Nekoliko je istraživanja (Drinkwater i sur., 1976; Miller i sur., 1983; Wiseman i sur., 1985) jasno utvrdilo da je toksičnost metil kavikola ovisna o dozi te da se štetno djelovanje znatno smanjuje pri niskim koncentracijama izloženosti. Istraživanja na glodavcima pokazuju da je štetni učinak malo vjerojatan u rasponu doza 1 – 10 mg/kg tjelesne težine, što iznosi 100 do 1000 puta veću izloženost nego su ljudi zaista izloženi toj tvari. Zbog navedenih se razloga može zaključiti kako trenutačna izloženost odraslih osoba ne predstavlja značajan rizik od nastajanja raka. Međutim, izloženost metil kavikolu osjetljivim skupinama, kao što su djeca, trudnice i dojilje, trebala bi se svesti na minimum (EMA, 2023). Znanstveni odbor za hranu

zauzeo je konzervativniju poziciju i zaključio da se prag djelovanja ne može pretpostaviti zbog činjenice da je metil kavikol genotoksičan i kancerogen (SCF, 2001). Kao i druga eterična ulja, metil kavikol ima svoju primjenu u prehrambenoj industriji. Metil kavikol se u prehrambenoj industriji koristi kao antimikrobni agens. Istraživanje Friedman i sur. (2002) je dokazalo antimikrobno djelovanje metil kavikola na *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* i *Salmonella enterica* koji su poznati patogeni koji se mogu pronaći u hrani (Jugreet i sur., 2020). Kao i eterično ulje bosiljka, metil kavikol se u prehrambenoj industriji koristi u industriji mesa, bezalkoholnih pića, za konzerviranje voća i povrća itd. U industriji mesa, metil kavikol, koristi se kao antimikrobni agens pri čemu produžuje trajnost svježih mesnih proizvoda. Metil kavikol se, uz antimikrobna svojstva, koristi i kao pojačivač okusa u industriji sokova. Također, koristi se kao konzervans prilikom pripreme proizvoda od voća i povrća (Smith i sur., 2002).

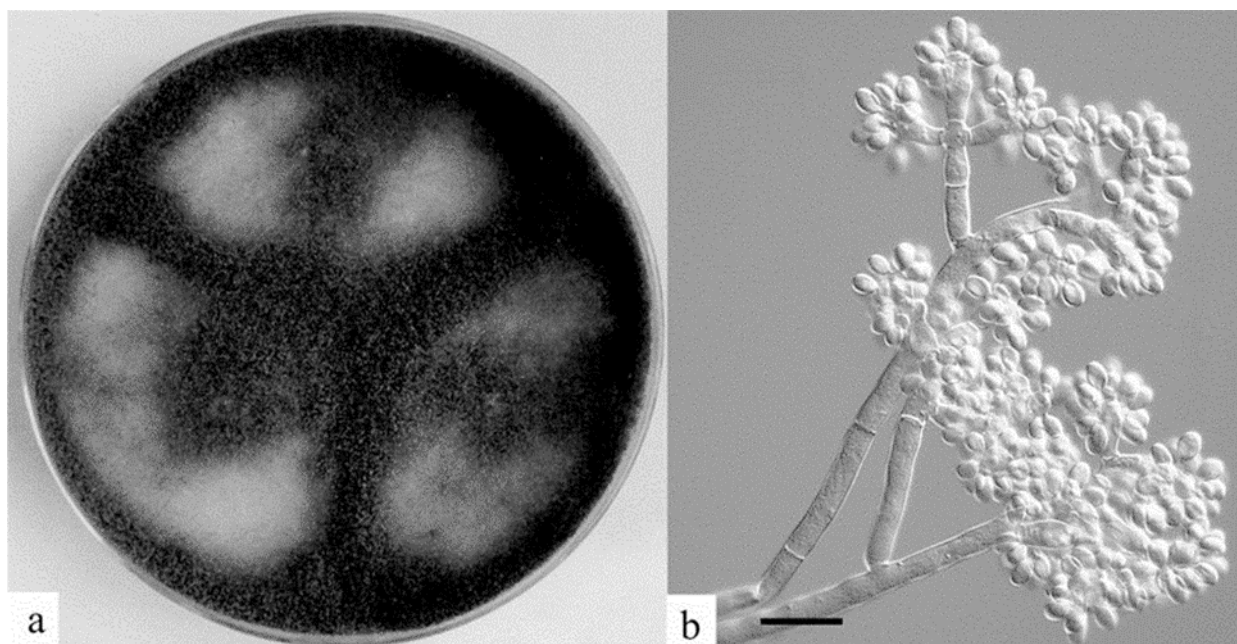
2.4. PLIJESNI

Plijesni su gljive čije se tijelo sastoji od razvijenog micelija koji prekriva površinu podloge. Plijesni obuhvaćaju vrlo veliki broj vrsta iz različitih skupina. Uglavnom žive kao saprofiti na različitim organskim tvarima. Neke vrste plijesni su korisne kao što je npr. *Penicillium notatum*, iz koje je izoliran penicilin, *P. roqueforti* koja se koristi prilikom proizvodnje sira Roqueforta, dok su druge vrste iznimno štetne za biljke i životinje kao npr. *Aspergillus flavus* koji proizvodi aflatoksine, *Botrytis cinerea*, poznat i kao siva plijesan koja napada više od 200 biljnih vrsta itd. (Web 6) Bolesti koje uzrokuju plijesni se nazivaju mikozama. Među biljnim bolestima one su najbrojnije, najopasnije i ekonomski najštetnije. Gotovo sve bolesti koje za posljedicu imaju velike gubitke, kako u prinosu, tako i u kvaliteti biljaka su uzrokovane plijesnima. Proširenost plijesni među biljkama kao i velika patogena sposobnost ovih mikroorganizama može se objasniti visokim stupnjem prilagođenosti parazitskom načinu života u i na biljkama. Ova prilagođenost se može objasniti dugim periodom evolucije te kratkim vremenom razmnožavanja. Plijesni su se, zahvaljujući svojim osobinama, mogle vrlo lako prilagoditi i prijeći sa saprofitnog na parazitski oblik ishrane. Mnoge od njih su u svojoj prilagodbi čak i postale obligatni paraziti. Kao posebne osobine parazitnih plijesni, koje im omogućavaju da izazovu bolesti širokih razmjera, ističe se njihova velika sposobnost širenja, infektivnost i brza kolonizacija biljnih tkiva kao i vrlo izražena brzina razmnožavanja (Josifović, 1973b). Plijesni se mogu pronaći u gotovo svim staništima, kako u zatvorenom prostoru, tako i na otvorenome.

Najviše im pogoduju topli i vlažni uvjeti, iako zbog svoje prilagodljivosti mogu rasti u različitim uvjetima. Šire se i razmnožavaju sporama koje mogu preživjeti različite pa čak i ekstremne okolišne uvjete. Plijesni kontaminiraju biljke i proizvode na puno različitih načina. Do kontaminacije može doći putem zraka, izravnim kontaktom, zaostajanjem u zemlji, zaostajanjem na zaraženim dijelovima biljaka, itd.

Botrytis cinerea

Botrytis cinerea (siva plijesan) je biljni patogen koji se javlja u umjerenom pojasu i koja se prenosi zrakom pri čemu napada preko 200 biljnih vrsta. Na CYA i MEA *Botrytis cinerea* prekriva cijelu Petrijevu zdjelicu, rast je ponekada točkast ili nepravilan, micelij je bijel, a postaje siv do tamnosiv sporulacijom. Na G25N kolonije su promjera 10 – 18 mm, nepravilnog oblika i sive boje. Pri 5°C stvara niske i prorijeđene kolonije promjera do 5 mm. Pri 37°C nema rasta. Konidiofore rastu iz zračnih hifa, stručaka neodređene duljine, svake na kraju nose nepravilnu skupinu kratkih ogranaka, dugih 10 – 30 µm, s nabreklih okruglim vrhovima promjera 8 – 10 µm. Konidije koje pojedinačno nastaju iz ovih vrhova na kratkim dijelovima su elipsoidne i duge 8 – 12 µm, glatkih stjenki i ne oslobađaju se u zrelosti. Za *B. cinerea* karakteristične su pojedinačne konidije koje se nalaze na zupcima krajnjih, nabreklih, ogranaka konidiofora. Raste pri $a_w = 0,93$ i $a_w = 0,9$. Također, rast nije uočen pri $a_w = 0,93$ u prisutnosti natrijeva klorida te pri $a_w = 0,89$ u prisutnosti neionske otopljene tvari. Raste u širokom temperaturnom rasponu s minimumom od -2°C do 5°C, maksimumom 28 – 35°C te optimumom 22 – 25°C. Raste pri pH 2 – 8 te može rasti i pri niskim koncentracijama kisika od 1%. Konidije *B. cinerea* se inaktiviraju pri temperaturi od 48°C za 1,4 min bilo u umjetnoj podlozi ili pireu od jagoda. *B. cinerea* ne proizvodi mikotoksine (Pitt i Hocking, 2022).

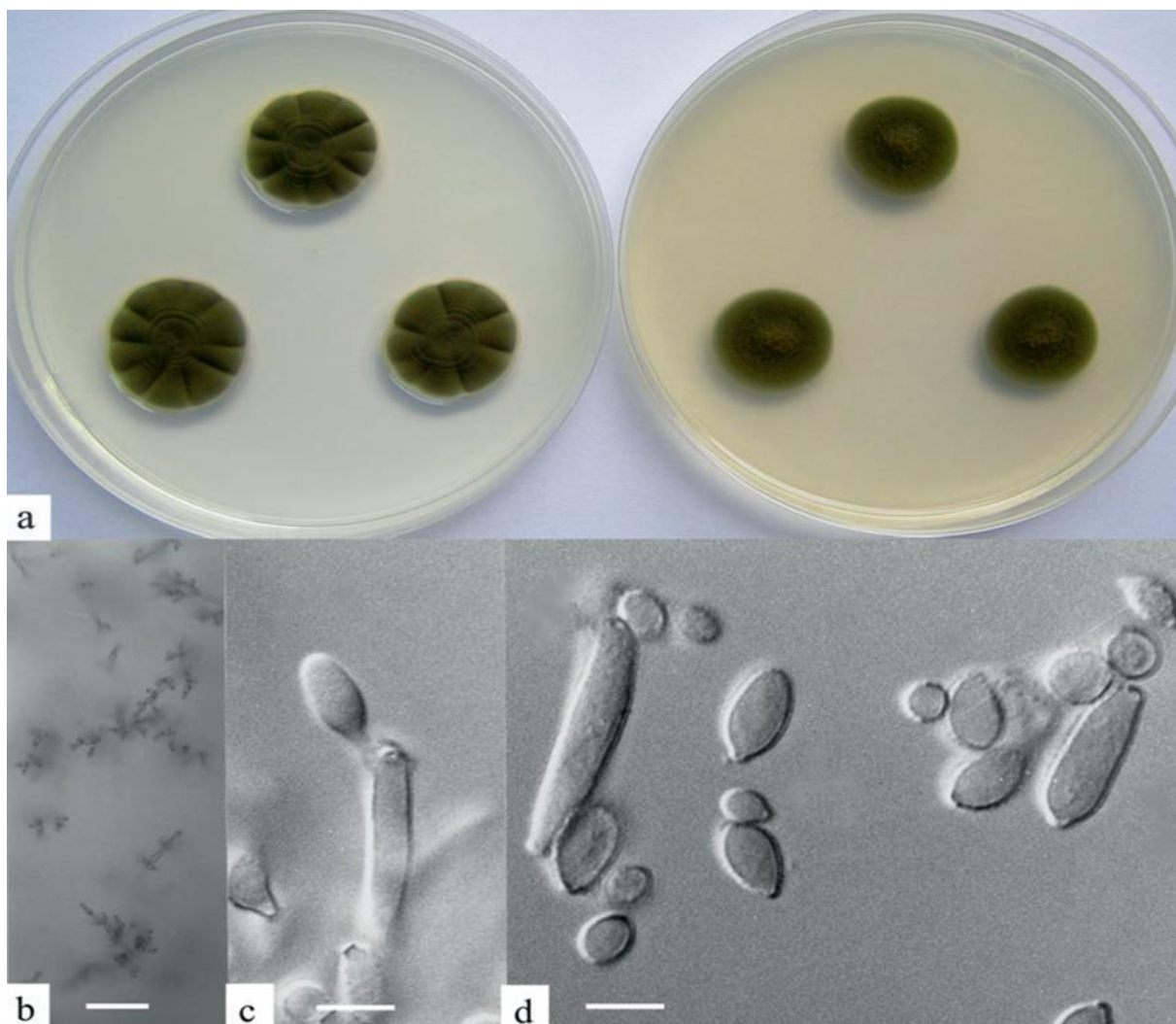


Slika 8 Kolonija *Botrytis cinerea* (a) na CYA, 7 dana pri 25°C; (b) konidiofori i konidije, crta = 25 μ m (Pitt i Hocking, 2022)

Iako postoje fungicidi za kontrolu ovog patogena, mnogi od njih nisu efikasni zbog njegove genetske prilagodljivosti, zbog čega je ova vrsta postala važan model za proučavanje patogenih plijesni. Najdestruktivnija je na zrelim ili starim tkivima domaćina, ali u njih obično ulazi u puno ranijoj fazi razvoja usjeva i ostaje u stanju mirovanja dok okolina ne postane pogodna ili se fiziologija domaćina ne krene mijenjati. To znači da ozbiljna šteta nastaje tek nakon branja naizgled zdravih plodova i otpreme na tržište, gdje se onda tek zapravo vidi nastala šteta i gubitci. *B. cinerea* je teško kontrolirati zbog toga što napada domaćina na više načina i više dijelova biljke te može dugo vremena preživjeti kao micelij i/ili konidija ili sklerocij na ostacima poljoprivrednih kultura. Zbog navedenih razloga, teško je postići da ijedna metoda sama uspije zaustaviti rast, razvoj i širenje *B. cinerea*. Navedena plijesan napada različite biljne organe kao što su cvjetovi, plodovi, lišće, izdanci pa čak i korijenje. Voće (grožđe, jagode, maline, borovnica) i povrće (kupus, zelena salata, rajčica, grah, brokula) najviše su zahvaćeni. Porastom međunarodne trgovine proizvodima koji se čuvaju na hladnom, ovoj plijesni se pridaje velika pažnja zbog činjenice kako može rasti pri vrlo niskim temperaturama. Simptomi kontaminacije s *B. cinerea* su raznovrsni, a uključuju mekšanje korijena, mekšanje i propadanje plodova te pojava sive plijesni na plodovima i listovima (Williamson i sur., 2007).

Cladosporium cladosporioides

Cladosporium je vrlo česta vrsta plijesni, dominantna u istraživanjima mikroorganizama u zraku. Vrsta se pojavljuje i kao saprofit i kao patogen na biljkama. Konidije *Cladosporium* su vrlo dobro prilagođene prijenosu zrakom, male su, suhe te izrazito otporne na sunčevu svjetlost. Kolonije na CYA i MEA su promjera 25 – 40 mm, niske i guste, plosnate ili slabo naborane; površina im je lagano baršunasta ili pahuljasta; micelij je teško vidljiv, konidije su obilne, maslinaste boje, a naličje je plavkasto sivo. Kolonije na G25N su promjera 5 – 12 mm, plosnate, a nekada centralno uzdignute, baršunaste; boje kao na CYA, a naličje plavkasto crno.



Slika 9 Kolonije *Cladosporium cladosporioides* (a) na CYA i MEA, 7 dana, pri 25°C; (b) plodne strukture *in situ*, crta = 50 μm; (c) konidiofori, crta = 5 μm; (d) konidije, crta = 5 μm (Pitt i Hocking, 2022)

Pri 5°C promjer kolonija je uobičajeno 1 – 2 mm, a pri 37°C nema rasta. Konidiofori *in situ* (na supstratu; na podlozi ili biljci) su nalik stablu, lako lomljivi, tijesno zbijeni sa stručcima koji

nose razgranate strukture na kojima nastaju konidije koje se u zrelosti odvajaju u velikim brojevima. Konidije su debelih stjenki, maslinasto smeđe boje; promjer većih se kreće $10 - 30 \times 2 - 5 \mu\text{m}$, glatkih stjenki; manje konidije su elipsoidne do šiljaste, promjera $3 - 7 \times 2 - 4 \mu\text{m}$ s glatkim do fino hrapavim stjenkama. Minimalna temperatura rasta je -5°C , a maksimalna je blizu 32°C . Može rasti pri $a_w = 0,86$ ili $a_w = 0,87$ pri 25°C . Relativno je otporna na mikrovalno zagrijavanje, a minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) sorbinske kiseline je 160 mg/kg pri pH 5 (Pitt i Hocking, 2022). *Cladosporium cladosporioides* je plijesan koja je raširena diljem svijeta. Pojavljuje se kako na otvorenom, tako i u zatvorenom prostoru. Iako ova vrsta rijetko uzrokuje bolesti kod životinja, važan je uzročnik bolesti biljaka, pri čemu napada lišće i plodove. Pronađena je u brojnim usjevima poput pšenice te u grožđu, jagodama, grašku, špinatu, rajčicama itd. (Bensch i sur., 2010). Kako je spomenuto, ova vrsta također raste u zatvorenim prostorima, a može ju se pronaći na vlažnim građevinskim materijalima, bojama, tapetama, tekstilu, kao i na papiru itd. Zahvaljujući svojoj toleranciji na niske temperature, *C. cladosporioides* može rasti na ohlađenoj hrani, kao i kolonizirati vlažne površine u hladnjacima (Bensch i sur., 2018). Simptomi zaraze obično se opažaju na zrelim plodovima, a karakterizira ih dehidracija ploda, mala površina truleži koja je čvrsta i maslinastozelene boje. Iako uklanjanje zaraženog lišća smanjuje pojavnost zaraze mnogim drugim vrstama plijesni, ono dovodi do povećana populacije *C. cladosporioides* na plodovima i povećanja broja pljesnivih plodova tijekom berbe. Uklanjanje zaraženog lišća stoga je kontraindicirano u kontroli ove plijesni stoga što biljni sok iz oštećenih dijelova služi kao hranjivo plijesni, a tamno obojene spore su otporne na sunčevu svjetlost (Latorre, Briceño i Torres, 2011).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak rada je istražiti učinak eteričnog ulja bosiljka i natamicina na cherry rajčice tretirane pululanom i kontaminirane plijesnima *Botrytis cinerea* i *Cladosporium cladosporioides* što podrazumijeva sljedeće: istražiti mikrobiološku sliku svježe, neobrađene rajčice; odrediti parametre boje i čvrstoće rajčice; odrediti fizikalno-kemijska svojstva rajčice (topljivu suhu tvar, ukupne kiseline i pH vrijednost); provesti obradu i pakiranje uzoraka rajčice te pratiti promjenu atmosfere (sadržaj kisika, ugljičnog dioksida i dušika) u pakiranjima tijekom 3., 6. i 9. dana skladištenja: pratiti promjenu boje, čvrstoće, topljive suhe tvari, ukupnih kiselina i pH vrijednosti nakon obrade i tijekom 9 dana čuvanja pri 25°C; odrediti mikrobiološku kvalitetu uzoraka nakon obrade te 3., 6., i 9. dan skladištenja neobrađenog i obrađenih uzoraka.

3.2. MATERIJAL I METODE

3.2.1. MATERIJAL

RAJČICE

Istraživanja su provedena s *cherry* rajčicom (*Solanum lycopersicum* L.), ubranom u okolici Vukovara. Obrada je obavljena nekoliko sati nakon branja. Rajčice su, isti dan nakon nabavke, u laboratoriju probrane kako bi se uklonile nedovoljno zreli ili oštećeni plodovi.

Sve kemikalije korištene za fizikalno-kemijske analize su od proizvođača Kemika (Hrvatska).

PRIPREMA RAJČICA

Nakon odvajanja otpada (peteljke) plodovi rajčice su oprani i posušeni ubrusima. Mase plodova kretale su se između 13,76 i 19,27 g.

Prije obrade sve su površine koje bi mogle doći u dodir s rajčicama dezinficirane 3%-tnom otopinom vodikovog peroksida (H₂O₂). Korišteni su neoštećeni i zdravi plodovi približno iste veličine. Plodovi su prije obrade potopljeni 3 minute u otopinu natrijevog hipoklorita (1000 mg/L) podešenog na pH 6,5 i isprani sterilnom demineraliziranom vodom. . Poslije ispiranja rajčice su ocijeđene i osušene u laminaru pod strujom sterilnog zraka tijekom 1 sata. Kontrolni uzorci (neobrađeni) pakirani su pojedinačno u sterilne PP posudice (30 mL), a potom su po tri

pakiranja stavljena u označene PP posudice volumena 200 mL. Rubovi poklopaca su zatim zatvoreni i uzorci skladišteni tijekom 9 dana..

U prvoj seriji su pripremljeni:

- neobrađeni kontrolni uzorak
- uzorak obrađen 10%-tnom otopinom pululana
- uzorak obrađen 10%-tnom otopinom pululana s 6,25 ppm natamicina
- uzorak obrađen 10%-tnom otopinom pululana s 12,5 ppm natamicina

Druga serija je obuhvatila:

- neobrađeni kontrolni uzorak
- uzorak obrađen 10%-tnom otopinom pululana
- uzorak obrađen 10%-tnom otopinom pululana s 6,25 ppm eteričnog ulja bosiljka
- uzorak obrađen 10%-tnom otopinom pululana s 12,5 ppm eteričnog ulja bosiljka

3.2.1. METODE

- *Mjerenje koncentracije plinova u pakiranjima*

Analize uzoraka (3., 6. i 9. dan) započinjale su mjerenjem atmosfere plinova, s tri ponavljanja. Sadržaj plinova u PP posudama mjeren je pomoću je uređaja Oxybaby 6.0 (Gasetechnik GmbH & Co, Njemačka), koji mjeri koncentracije N₂, CO₂ i O₂. Minimalni zahtjev za plin je 2 mL. Nakon apliciranja igle preko spužvice izravno u posudu automatski se očitava koncentracija plinova na display-u, u volumnim postotcima.



Slika 10 Ručni analizator plinova

Tablica 1 Veza između izračunate promjene boje (ΔE) i ljudske percepcije boje

ΔE	Vidljivost razlike ljudskim okom
< 0,2	Nije vidljiva razlika
0,2 – 1	Vrlo mala vidljivost razlike
1 – 3	Mala vidljivost razlike
3 – 6	Prosječna vidljivost razlike
> 6	Velika vidljivost razlike

- *Mjerenje čvrstoće uzoraka pomoću teksturometra*

Za određivanje teksture plodova, u cilju mjerenja čvrstoće plodova korišten je teksturometar TA.XT plus (Stable Micro System, Velika Britanija). Za svaki uzorak mjerenje je provedeno na 6 plodova.

Teksturometar mjeri silu penetracije mjernog tijela u uzorak. Uzorak se stavlja na podlogu instrumenta, a kao mjerno tijelo koristio se cilindrični nastavak promjera 2 mm, izrađen od nehrđajućeg čelika.

Parametri testa kompresije:

Brzina prije mjerenja: 1,5 mm/s

Brzina tijekom mjerenja: 1,5 mm/s

Brzina nakon mjerenja: 10 mm/s

Sila reagiranja: 25 g

Dubina mjerenja: 10 mm

Na svakom uzorku napravljeno je jedno mjerenje na donjem dijelu ploda (D), zatim na mjestu ožiljka od čaške (O) i dva mjerenja u sredini ploda, sa dvije suprotne strane (S). Rezultati mjerenja čvrstoće obrađeni su na računaru u programima Texture Expert Version 1.22 Software (Stable Micro System, Velika Britanija) i MS Excel.



Slika 12 Teksturometar

Metode koje su korištene za određivanje fizikalno-kemijskog sastava su:

- Određivanje topljive suhe tvari (refraktometrijski)
- Određivanje ukupnih kiselina (titrimetrijski, izražene kao limunska kiselina)
- Mjerenje pH vrijednosti pomoću pH metra (Mettler-Toledo)

PLIJESNI

Odabrane kulture plijesni (*B. cinerea* i *C. cladosporioides*) su nabavljene iz Češke kolekcije kultura mikroorganizama (The Czech Collection of Microorganisms – CCM) Instituta za eksperimentalnu biologiju Prirodoslovnog fakulteta Sveučilišta Masaryk. Kulture su čuvane, nakon oživljavanja na Malt Extract agaru (MEA, Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italija) pri 4°C u hladnjaku. Neposredno prije eksperimentalnog rada, precijepljene su na novi MEA i inkubirane pri 25°C tijekom 7 dana do dobre sporulacije.

PULULAN

Polisahard pululan je nabavljen od Avena Lab – Farmadria d.o.o., Vršac, Srbija

- *Priprema suspenzija spora i određivanje minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne fungicidne (MFK) koncentracije macrobroth metodom*

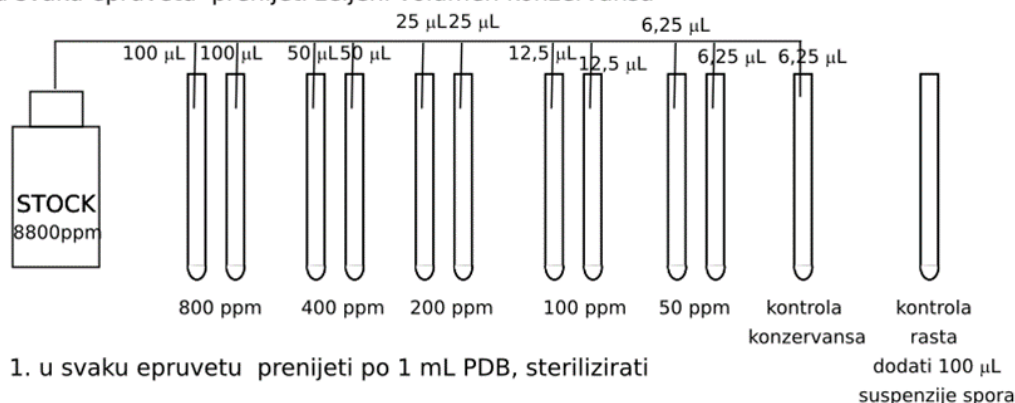
Suspenzije spora plijesni su pripremljene prelijevanjem porasta plijesni nakon 7 dana inkubacije s 5 mL otopine za pripremu spora (2% Tween 80 Liofilchem, Italija u

demineraliziranoj vodi). Nakon povlačenja ušicom, radna suspenzija spora koncentracije 1×10^6 spora/mL je pripravljena prenošenjem određenog volumena suspenzije s kosine agara u otopinu za suspenziju spora s dodatkom agara (1,5% agar Liofilchem, Italija i 2% Tween 80) i prebrojavanjem u Bürker - Türkovoj komorici.

- *Određivanje MIK i MFK*

Određivanje MIK i MFK eteričnog ulja bosiljka je prikazano na **Slici 13**. U sterilne epruvete s 1 mL krumpirovog glukoznog bujona (Potato dextrose broth, Lipfilchem, Italija) prenesena je stock otopina eteričnog ulja bosiljka pripravljena otapanjem u 10% DMSO (dimetilsulfoksid, Kemika, Zagreb, Hrvatska) i 10% Tween 80. U svaku epruvetu je preneseno po 100 μ L suspenzije spora. Dvije epruvete su postavljene kao kontrolne: kontrola konzervansa – nije nacijepljena suspenzijom spora; služi za provjeru kontaminacije stock otopine eteričnog ulja) i kontrola rasta (epruveta bez dodatka ulja, samo s podlogom i sporama koja služi za kontrolu rasta plijesni).

2. u svaku epruvetu prenijeti željeni volumen konzervansa



1. u svaku epruvetu prenijeti po 1 mL PDB, sterilizirati

3. u svaku epruvetu prenijeti po 100 μ L suspenzije spora

Slika 13 Određivanje MIK i MFK koncentracije eteričnog ulja bosiljka

Nakon inkubacije na orbitalnoj tresilici pri 120 o/min (IKA, Lab Logistics Group GmbH, LLG, Meckenheim, Njemačka) od 48 sati pri 25°C, zabilježene su epruvete u kojima nema porasta plijesni. Iz njih je preneseno po 100 μ L uzgoja u epruvete s 1 mL sterilnog krumpirovog glukoznog bujona i inkubirano 48 h pri 25°C u orbitalnoj tresilici. Koncentracija eteričnog ulja koja je inhibitorna (MIK) zabilježena je uočavanjem porasta plijesni u epruveti nakon inkubacije, dok je fungicidna koncentracija zabilježena u epruveti u kojoj i nakon prenošenja u

sterilnu podlogu bez eteričnog ulja nije došlo do pojave micelija plijesni. Svi eksperimenti su provedeni u paralelama.

- *Priprema pululana za uranjanje rajčice*

Otopina pululana je pripravljena otapanjem 10 g pululana u 88 g demineralizirane vode, s dodatkom 1 g glicerola (Kemika, Zagreb). Nakon zagrijavanja u vodenoj kupelji pri 80°C tijekom 15 minuta, uzorci otopljenog pululana su ohlađeni u vodenoj kupelji pri 40°C, nakon čega je u uzorak dodano 1 g Tween 80 i otopina eteričnog ulja u MIK koncentraciji.

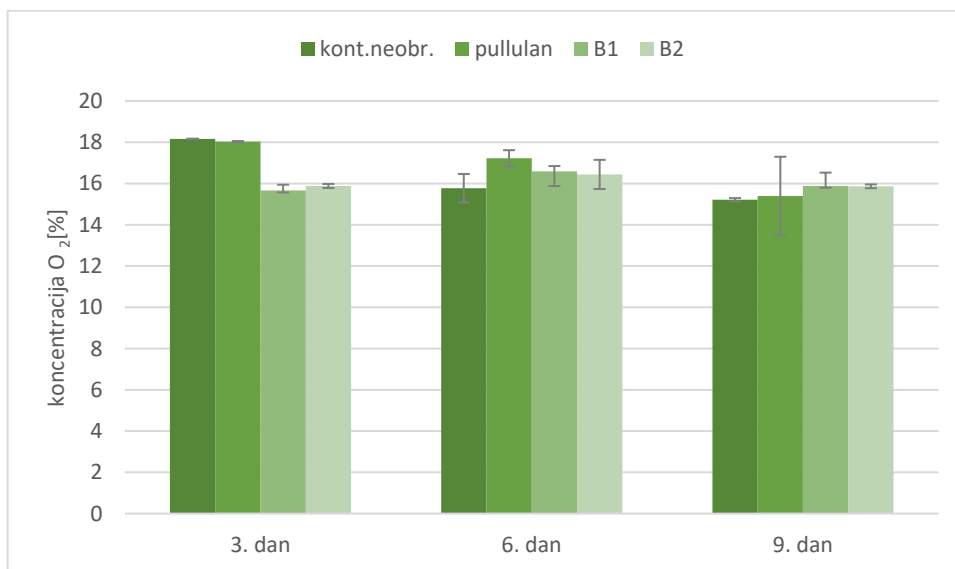
- *Tretiranje rajčica*

Rajčice, nakon dezinfekcije površine, pranja i sušenja su sterilnom lancetom ubodom ozlijeđene na mjestu peteljke (dubina uboda 2 mm) i kontaminirane suspenzijom spora koncentracije 1×10^4 spora/mL. Nakon sušenja na sterilnoj staničevini u laminaru 1 h, uronjene su u pululan tijekom 3 minute, ocijeđene i osušene pri sobnoj temperaturi. Pojedinačno su stavljane u plastične posudice. Tri posudice s rajčicama su kombinirane u veću plastičnu posudu, zatvorene i čuvane pri sobnoj temperaturi. U 0., 3., 6. i 9. danu je određen postotak pljesnivih plodova, boja, tekstura, sadržaj kiselina, pH, i mikrobiološki parametri.

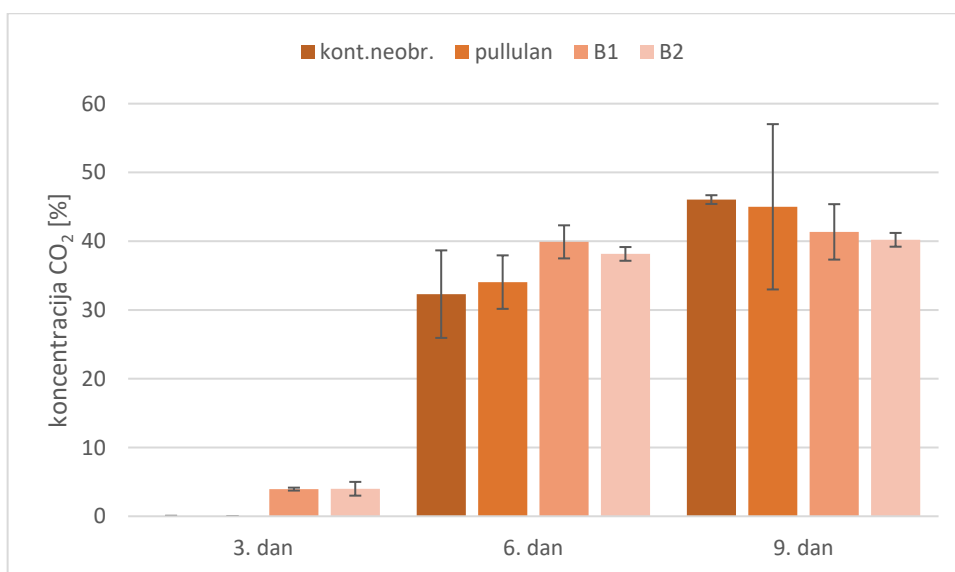
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. KONCENTRACIJA PLINOVA UNUTAR PAKIRANJA TIJEKOM 9 DANA ČUVANJA UZORAKA PRI SOBNOJ TEMPERATURI

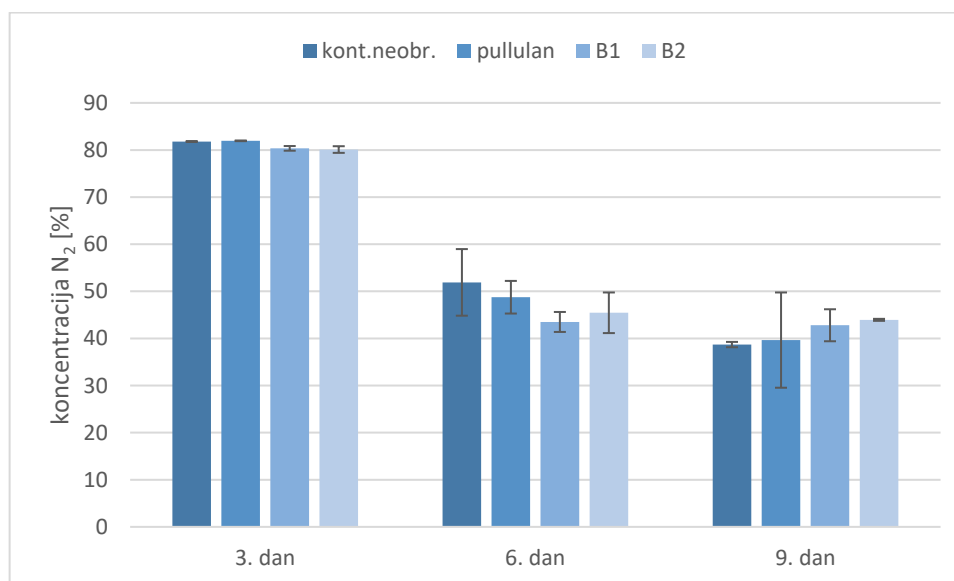
Koncentracije plinova unutar pakiranja mjerena su za seriju uzoraka obrađenih s eteričnim uljem bosiljka.



Slika 14 Koncentracija kisika u pakiranjima tijekom 9 dana čuvanja rajčice pri sobnoj temperaturi



Slika 15 Koncentracija ugljičnog dioksida u pakiranjima tijekom 9 dana čuvanja rajčice pri sobnoj temperaturi



Slika 16 Koncentracija dušika u pakiranjima tijekom 9 dana čuvanja rajčice pri sobnoj temperaturi

Jedan od zadataka rada bio je pratiti koncentracije plinova u pakiranjima tijekom 9 dana skladištenja rajčice pri sobnoj temperaturi. Budući je kisik potreban biljnim tkivima za respiraciju, a taj proces ubrzava potrošnju šećera i drugih spojeva, povećavajući produkciju etilena i uzrokujući senescenciju, vrlo je važno pratiti prisutnost kisika tijekom skladištenja plodova. Osim toga, kisik je odgovoran za mnoge degradativne procese koji limitiraju rok trajanja proizvoda.

Koncentracije plinova unutar pakiranja izmjerene su za drugu seriju uzoraka, koja je obuhvatila kontrolni (neobrađeni) uzorak, uzorak obrađen pululanom i uzorke obrađene kombinacijom pululana i eteričnog ulja bosiljka (*Slike 14, 15 i 16*). Kao što je i za očekivati, zbog potrošnje kisika smanjivale su se njegove koncentracije skladištenjem, dok su koncentracije ugljičnog dioksida rastle, s najvišom vrijednosti 46,05%, zabilježenom 9. dan u pakiranju kod neobrađenog uzorka. Najviše koncentracije kisika 9. dan čuvanja imali su uzorci obrađeni kombinacijom pululana i eteričnog ulja bosiljka (6,25 ppm i 12,5 ppm), a iznosile su 15,89% i 15,87%.

4.2. BOJA POKOŽICE PLODA TIJEKOM 9 DANA ČUVANJA UZORAKA PRI SOBNOJ TEMPERATURI

Tablica 2 Parametri boje i ukupna promjena boje (ΔE^{**}) neobrađenog i uzoraka obrađenih s pululanom sa/bez natamicina

uzorak/dan neobrađeni	parametri boje					ΔE
	L*	a*	b*	C*	h°	
„0“	35,71 ± 0,62	16,68 ± 1,10	13,40 ± 0,89	21,24 ± 1,69	39,37 ± 2,44	-
3.	35,44 ± 0,30	14,34 ± 0,56	11,84 ± 0,18	19,33 ± 1,49	38,70 ± 0,77	2,83
6.	34,59 ± 0,43	12,91 ± 1,97	11,07 ± 0,70	17,55 ± 1,54	39,17 ± 2,15	4,57
9.	33,71 ± 0,51	13,30 ± 1,19	11,86 ± 1,02	16,81 ± 0,41	42,38 ± 1,49	4,22
10% P	L*	a*	b*	C*	h°	ΔE
„0“	34,86 ± 0,60	14,00 ± 1,54	12,72 ± 0,96	21,32 ± 2,58	41,13 ± 2,64	2,89
3.	34,82 ± 0,59	14,96 ± 1,81	12,39 ± 0,95	19,09 ± 2,27	38,42 ± 3,04	2,18
6.	33,97 ± 2,02	13,32 ± 2,01	11,88 ± 1,62	17,19 ± 1,41	42,00 ± 1,01	4,08
9.	34,39 ± 1,25	13,37 ± 1,12	11,58 ± 1,24	17,13 ± 0,73	41,40 ± 1,65	4,00
P + 6,25 ppm N1	L*	a*	b*	C*	h°	ΔE
„0“	35,93 ± 0,30	15,69 ± 1,10	12,61 ± 0,55	19,86 ± 1,42	38,62 ± 1,94	1,29
3.	34,69 ± 0,92	14,26 ± 2,01	11,32 ± 0,78	18,90 ± 1,89	38,22 ± 1,94	3,35
6.	34,37 ± 0,90	13,79 ± 1,76	12,09 ± 0,89	18,16 ± 2,49	41,43 ± 3,05	3,44
9.	34,31 ± 0,44	12,79 ± 0,74	10,80 ± 0,60	16,90 ± 0,40	41,33 ± 1,62	4,88
P + 12,5 ppm N2	L*	a*	b*	C*	h°	ΔE
„0“	34,97 ± 0,37	15,31 ± 1,27	12,93 ± 0,97	21,04 ± 1,77	39,32 ± 1,66	1,63
3.	34,22 ± 0,75	13,54 ± 0,88	11,51 ± 0,74	16,81 ± 0,74	40,03 ± 1,60	3,96
6.	33,88 ± 0,46	12,57 ± 0,61	10,99 ± 0,51	17,01 ± 1,40	41,15 ± 2,36	5,10
9.	34,84 ± 1,25	15,03 ± 1,31	12,14 ± 1,18	18,86 ± 2,96	39,28 ± 2,01	2,25

**ukupna promjena boje izračunata je u odnosu na nulte vrijednosti kontrolnog, neobrađenog uzorka

Tablica 3 Parametri boje i ukupna promjena boje (ΔE^{**}) neobrađenog i uzoraka obrađenih s pululanom sa/bez eteričnog ulja bosiljka

uzorak/dan	parametri boje					ΔE
neobrađeni	L*	a*	b*	C*	h°	
„0“	37,38 ± 0,23	21,42 ± 1,49	16,75 ± 0,33	28,15 ± 1,85	37,90 ± 2,16	-
3.	37,53 ± 1,07	21,33 ± 0,88	17,15 ± 0,88	27,37 ± 1,79	39,02 ± 0,68	0,44
6.	37,48 ± 0,32	20,61 ± 0,53	17,16 ± 1,10	27,22 ± 0,98	38,70 ± 1,73	0,91
9.	37,99 ± 0,79	21,69 ± 1,68	17,99 ± 0,64	28,49 ± 2,07	39,63 ± 1,00	1,41
10% P	L*	a*	b*	C*	h°	ΔE
„0“	37,06 ± 0,69	21,05 ± 1,01	17,22 ± 0,51	28,12 ± 1,40	37,11 ± 1,29	0,68
3.	37,36 ± 0,71	21,63 ± 1,51	17,35 ± 0,38	28,19 ± 2,72	37,65 ± 2,19	0,64
6.	37,81 ± 0,91	22,33 ± 1,63	18,66 ± 1,04	28,99 ± 0,77	37,72 ± 0,48	2,16
9.	37,85 ± 0,64	21,82 ± 1,28	18,06 ± 0,41	28,78 ± 2,55	39,00 ± 0,95	1,45
P + 6,25 ppm B1	L*	a*	b*	C*	h°	ΔE
„0“	37,23 ± 0,88	22,09 ± 1,02	17,41 ± 0,99	29,06 ± 1,05	37,21 ± 0,55	0,95
3.	37,58 ± 0,83	22,11 ± 0,78	17,87 ± 1,15	29,05 ± 1,85	37,43 ± 1,49	1,33
6.	38,15 ± 0,93	22,62 ± 2,10	18,78 ± 0,79	28,53 ± 1,71	38,35 ± 1,16	2,48
9.	37,59 ± 0,67	22,56 ± 1,15	19,28 ± 1,11	29,44 ± 1,36	38,95 ± 0,95	2,78
P + 12,5 ppm B2	L*	a*	b*	C*	h°	ΔE
„0“	37,23 ± 0,66	21,39 ± 1,60	17,33 ± 1,42	28,49 ± 1,09	39,09 ± 1,09	0,60
3.	37,75 ± 0,64	21,47 ± 1,71	17,41 ± 0,99	28,71 ± 1,33	38,45 ± 1,02	0,76
6.	37,19 ± 1,08	21,12 ± 2,64	17,22 ± 0,92	28,65 ± 2,21	40,05 ± 0,90	0,59
9.	36,90 ± 1,39	22,81 ± 1,93	18,58 ± 1,39	28,21 ± 1,59	38,50 ± 0,61	2,35

**ukupna promjena boje izračunata je u odnosu na nulte vrijednosti kontrolnog, neobrađenog uzorka

Rezultati mjerenja boje pokožice plodova kolorimetrom prikazani su u **Tablicama 2 i 3**. Jedan od osnovnih zahtjeva u pogledu primjene jestivih omotača je da ne utječe na organoleptička svojstva namirnice. S obzirom na boju koja je vrlo važan parametar kvalitete rajčice, dobiveni rezultati opravdavaju primjenu pululana. Uspoređujući izračunate vrijednosti ukupne promjene boje i ljudsku percepciju boje (**Tablica 1**) to znači da rezultati prve serije uzoraka (**Tablica 2**) pokazuju malu ($\Delta E < 3$), odnosno prosječnu vidljivost razlike boje (ΔE 3-6), dok svi uzorci iz druge serije pokazuju malu vidljivost razlike boje (**Tablica 3**). Razlike su zabilježene s obzirom na polaznu kvalitetu rajčice (neravnomjerno dozrijevanje), tako da je prva serija uzoraka (**Tablica 2**) općenito imala više vrijednosti ukupne promjene boje u odnosu na drugu seriju obrađenu s eteričnim uljem bosiljka (**Tablica 3**). Najveću promjenu boje tijekom skladištenja imao je neobrađeni uzorak, a zatim uzorci obrađeni kombinacijom pululana i natamicina.

Uspoređujući izračunate vrijednosti ukupne promjene boje nulti dan, odnosno neposredno nakon obrade (u odnosu na neobrađeni uzorak), promjena boje kretala se u granicama od 1,29 do 2,89 (**Tablica 2**), odnosno u drugoj seriji od 0,6 do 0,95 (**Tablica 3**). Promjena boje povećavala se tijekom čuvanja, ali 9. dan skladištenja nije bilo razlike između kontrolnog i uzorka obrađenog pululanom. Parametar a^* , odgovoran za crvenu boju, razlikovao se između dvije serije uzoraka. U prvoj seriji a^* parametar za neobrađeni uzorak nulti dan je imao vrijednost višu nego ijedan obrađeni uzorak nakon obrade, ali i tijekom skladištenja (16,68). Ganduri (2020) je zabilježio isti trend za neobrađenu rajčicu, a to je pripisao činjenici kako je atmosfera s rajčicom obložena formulacijama pululana utjecala na brzinu disanja i produljila razvoj boje tijekom skladištenja. Vrijednosti drugih parametara koji ulaze u izračun ΔE : L^* parametra odgovornog za svjetlinu i b^* parametra koji označava žutu boju, nisu se značajnije mijenjale. C^* parametar odgovoran za intenzitet boje bilježio je sniženje vrijednosti tijekom skladištenja, ali samo kod prve serije uzoraka, dok su vrijednosti u drugoj seriji ostale nepromijenjene, kao i vrijednosti h° parametra. Više vrijednosti C^* parametra (*chroma*) u drugoj u odnosu na prvu seriju ukazuju na veću zasićenost boje u kasnije ubranim uzorcima. h° (*hue angle*) vrijednosti su iznosile oko 40° , što odgovara kutu promjene boje u odnosu na a^* parametar (prijelaz od crvene 0° , prema žutoj nijansi, 90°).

4.3. ČVRSTOĆA RAJČICA NA RAZLIČITIM DIJELOVIMA PLODA

Čvrstoća je jedan od najvažnijih parametara u ocjeni kvalitete plodova od strane potrošača. Omekšavanje i dozrijevanje rajčice rezultat je degradativnih promjena u sastavu stanične stijenke, a to je biokemijski proces koji uključuje i enzimsku hidrolizu polisaharida, hemiceluloze, pektina i škroba (Das, 2013; Ganduri, 2020). Razgradnja pektina tijekom dozrijevanja i čuvanja rajčice može rezultirati drastičnim promjenama teksture s evidentnim omekšavanjem tkiva, a najodgovorniji za to su enzimi pektinesteraza i poligalakturonaza. Međutim, ovi degradativni enzimi osjetljivi su na kisik, stoga povišene razine CO₂ smanjuju njihovu aktivnost i održavaju u određenoj mjeri čvrstoću mezokarpa tijekom skladištenja (Mekonnen, 2017).

Tablica 4 Čvrstoća neobrađenog i uzoraka obrađenih 10%-tnom otopinom pululana (P) i kombinacijom s 6,25 ppm i 12,5 ppm natamicina tijekom 9 dana čuvanja pri sobnoj temperaturi

uzorak	dan	FF (g)		
		D	O	S
neobrađeni	„0“	179,77±29,01	399,12±31,17	199,00±22,93
	3.	156,25±22,18	353,65±43,81	155,33±27,77
	6.	100,39±10,82	336,86±41,72	155,50±29,81
	9.	91,66±25,31	324,72±88,39	109,96±23,52
10% P	„0“	128,23±28,96	405,45±47,60	178,00±22,31
	3.	83,81±10,14	358,84±2,04	147,31±40,03
	6.	87,43±26,95	334,06±29,14	133,47±16,89
	9.	72,30±24,91	262,38±62,23	122,59±11,41
P + 6,25 ppm N1	„0“	139,35±34,76	400,09±39,83	185,25±12,43
	3.	113,70±10,08	351,27±58,53	165,44±24,97
	6.	80,37±16,26	317,05±54,69	141,54±13,17
	9.	78,04±28,25	234,34±12,30	128,04±22,92

uzorak	dan	FF (g)		
		D	O	S
P + 12,5 ppm N2	„0“	181,56±52,31	392,20±33,99	188,96±30,54
	3.	113,43±23,06	389,66±35,64	145,85±27,69
	6.	102,06±1,14	299,23±29,11	129,72±23,88
	9.	109,16±35,81	284,98±22,82	121,32±19,07

$\bar{x} \pm SD$ srednja vrijednost \pm standardna devijacija

FF - flesh firmness - čvrstoća mezokarpa

O - ožiljak od stabljike

D - donji dio ploda

S - sredina ploda

Tablica 5 Čvrstoća neobrađenog i uzoraka obrađenih 10%-tnom otopinom pululana (P) i kombinacijom s 6,25 ppm i 12,5 ppm eteričnog ulja bosiljka tijekom 9 dana čuvanja pri sobnoj temperaturi

uzorak	dan	FF (g)		
		D	O	S
neobrađeni	„0“	162,81±20,67	351,19±8,34	183,56±22,40
	3.	155,56±34,50	352,34±17,69	178,88±12,29
	6.	155,50±25,92	347,81±54,08	180,54±21,65
	9.	152,68±13,24	346,94±36,30	172,97±15,89
10% P	„0“	170,23±30,96	335,45±22,69	198,04±20,33
	3.	156,63±15,67	315,79±11,70	187,95±17,94
	6.	153,93±27,91	298,98±46,72	183,69±13,91
	9.	151,23±25,41	218,60±17,07	162,35±26,97
P + 6,25 ppm B1	„0“	179,99±34,79	341,05±39,83	195,25±32,99
	3.	169,86±18,04	333,23±14,39	183,23±23,42
	6.	162,11±40,86	279,23±11,18	185,62±15,77

uzorak	dan	FF (g)		
		D	O	S
	9.	165,30±7,68	276,49±64,05	185,14±28,12
P + 12,5 ppm B2	„0“	180,55±40,01	322,20±34,07	198,99±29,50
	3.	161,58±35,67	299,99±39,18	190,24±22,69
	6.	160,28±21,18	289,83±42,67	184,65±14,49
	9.	161,79±25,55	283,66±56,03	182,92±28,23

$\bar{x} \pm SD$ srednja vrijednost \pm standardna devijacija

FF - flesh firmness - čvrstoća mezokarpa

O - ožiljak od stabljike

D - donji dio ploda

S - sredina ploda

Kako bi se što cjelovitije obradilo mjerenje čvrstoće cijelog ploda, mjerenja su provedena na tri različita mjesta na plodu: u središnjoj točki donjeg dijela ploda, na mjestu ožiljka od čaške i na bočnim suprotnim stranama središnjeg dijela ploda (**Tablice 4 i 5**). Vrijednosti čvrstoće, neovisno o dijelu ploda koji je mjereno kontinuirano su se smanjivale s vremenom skladištenja u neobrađenom i obrađenim plodovima, što je u skladu s rezultatima drugih istraživanja (Adjouman i sur., 2018; Kondle i sur., 2019; Ganduri, 2020). Zabilježene su značajne razlike između serija uzoraka, s tim da je druga serija imala manje razlike u čvrstoći, kako tijekom skladištenja neobrađenog, tako i obrađenih uzoraka. Čvrstoća mezokarpa (*flesh firmness*) kod svih uzoraka bila je najviša na mjestu ožiljka od čaške, međutim na tom dijelu zabilježen je i najveći pad čvrstoće, s obzirom da je to mjesto mikrobiološke kontaminacije u obrađenim uzorcima. Stoga ti podaci nisu uspoređivani. Više vrijednosti čvrstoće zabilježene su na bočnim suprotnim stranama ploda (središnji dio) u odnosu na donji dio ploda kod svih ispitanih uzoraka. Nadalje, tijekom 9 dana čuvanja uzoraka, na donjem dijelu ploda omekšavanje (gubitak čvrstoće) bilo je više izraženo u odnosu na središnji dio ploda. Najmanji gubitak čvrstoće u prvoj seriji zabilježen je kod uzorka obrađenog pululanom (oko 56 g), kod svih pozicija mjerenja, a najveći kod neobrađenog uzorka (oko 89 g), što je u skladu sa rezultatima Gandurija (2020). U drugoj seriji razlike u čvrstoći bile su približne, a najveći gubitak čvrstoće zabilježen

je kod uzorka obrađenog pululanom, mjereno na stranama ploda (središnjem dijelu), i to 36 g, što je zanemarivo s obzirom na slične rezultate ostalih obrada (10-19 g).

4.4. FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETARI U ISPITIVANIM UZORCIMA

Rezultati fizikalno-kemijskih parametara kao što su topljiva suha tvar, ukupna kiseline i pH vrijednost prikazani su u **Tablicama 6 i 7**. Vrijednosti topljive suhe tvari nisu se mijenjale tijekom skladištenja u neobrađenom uzorku. U uzorcima obrađenim pululanom i natamicinom vrijednosti su bile između 7,4 i 7,5%. Međutim, kod druge serije uzoraka, obrađenim sa kombinacijom pululana i eteričnog ulja bosiljka tijekom čuvanja došlo je do neznatnog sniženja vrijednosti topljive suhe tvari. Taj trend zabilježili su i drugi autori (Adjouman i sur., 2018., Kondle i sur., 2019; Ganduri, 2020). Pretpostavka je da je smanjenje brzine disanja u obloženim plodovima usporilo metaboličke aktivnosti, između ostalog, i hidrolizu polisaharida u šećere. U prvoj seriji uzoraka, vjerojatno zbog neravnomjerne zrelosti, sadržaj ukupnih kiselina bio je viši, a osim toga, s vremenom čuvanja vrijednosti su se povećavale, od 0,46 do 0,53%. pH vrijednosti uzoraka su se kretale između 4,3 i 4,4. U drugoj seriji pH rajčice se povećao tijekom skladištenja od 4,4 do 4,6 za kontrolni, neobrađeni, odnosno od 4,5 do 4,7 za obrađene uzorke, dok se kiselost smanjila. Smanjenje kiselosti tijekom vremena pokazalo se nešto izraženijim kod neobrađenih rajčica u usporedbi s obrađenim, odnosno obloženim rajčicama i može biti povezano s visokom proizvodnjom etilena i intenzitetom disanja (Das i sur., 2013). Manje izraženo smanjenje kiselosti u obloženim rajčicama ukazuje na učinkovitost jestivih filmova u smanjenju proizvodnje etilena. Neki autori takve suprotne promjene pripisuju i gubitku limunske kiseline u rajčici (Das i sur., 2013; Adjouman i sur., 2018).

Tablica 6 Topljiva suha tvar (TST), sadržaj ukupnih kiselina (UK) i pH vrijednost rajčice i uzoraka obrađenih pululanom u kombinaciji s natamicinom tijekom 9 dana čuvanja pri sobnoj temperaturi

uzorak	dan	parametri		
		TST (%)	UK (%)	pH
neobrađeni	„0“	7,5	0,46	4,3
	3.	7,5	0,52	4,4
	6.	7,5	0,53	4,4

uzorak	dan	parametri		
		TST (%)	UK (%)	pH
	9.	7,4	0,53	4,3
10% P	„0“	7,5	0,50	4,4
	3.	7,5	0,52	4,4
	6.	7,5	0,53	4,4
	9.	7,4	0,53	4,3
P + 6,25 ppm N1	„0“	7,5	0,50	4,4
	3.	7,5	0,52	4,4
	6.	7,4	0,52	4,4
	9.	7,4	0,52	4,4
P + 12,5 ppm N2	„0“	7,5	0,50	4,4
	3.	7,5	0,52	4,4
	6.	7,4	0,52	4,4
	9.	7,4	0,52	4,4

10% P - uzorak obrađen 10%-tnom otopinom pululana

P + 6,25 ppm N1 - uzorak obrađen 10%-tnom otopinom pululana s 6,25 ppm natamicina

P + 12,5 ppm N2 - uzorak obrađen 10%-tnom otopinom pululana s 12,5 ppm natamicina

Tablica 7 Topljiva suha tvar (TST), sadržaj ukupnih kiselina (UK) i pH vrijednost rajčice i uzoraka obrađenih pululanom u kombinaciji s eteričnim uljem bosiljka tijekom 9 dana čuvanja pri sobnoj temperaturi

uzorak	dan	parametri		
		TST (%)	UK (%)	pH
neobrađeni	„0“	6,0	0,37	4,4
	3.	5,6	0,35	4,4
	6.	5,7	0,35	4,4
	9.	5,9	0,32	4,6
10% P	„0“	5,7	0,35	4,5
	3.	5,6	0,35	4,5
	6.	5,9	0,32	4,5
	9.	6,1	0,30	4,7
P + 6,25 ppm B1	„0“	5,9	0,33	4,5
	3.	5,9	0,33	4,5
	6.	5,9	0,32	4,6
	9.	5,3	0,30	4,7
P + 12,5 ppm B2	„0“	5,9	0,33	4,5
	3.	5,8	0,32	4,5
	6.	5,4	0,30	4,5
	9.	5,3	0,30	4,6

10% P - uzorak obrađen 10%-tnom otopinom pululana

P + 6,25 ppm B1 - uzorak obrađen 10%-tnom otopinom pululana s 6,25 ppm eteričnog ulja bosiljka

P + 12,5 ppm B2 - uzorak obrađen 10%-tnom otopinom pululana s 12,5 ppm eteričnog ulja bosiljka

4.5. UČINAK ETERIČNOG ULJA BOSILJKA I NATAMICINA NA ODABRANE PLIJESNI

Tablica 8 Minimalna inhibitorna i fungicidna koncentracija (MIK i MFK) eteričnog ulja bosiljka i natamicina na plijesni *Botrytis cinerea* i *Cladosporium cladosporioides*

Vrsta plijesni	Eterično ulje bosiljka		Natamicin	
	MIK	MFK	MIK	MFK
<i>Botrytis cinerea</i>	400	>800	12,5	25
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	400	>800	6,25	12,5

Iz **Tablice 8** vidljivo je kako je natamicin učinkovitiji antifungalni spoj od eteričnog ulja bosiljka stoga što su vrijednosti za MIK za 32 niže za *B. cinerea* (i 64 puta niže za *C. cladosporioides*). Nadalje, za eterično ulje bosiljka nije (u ovom eksperimentalnom planu) određena minimalna fungicidna koncentracija, ali budući je veća od 800 ppm, takva visoka koncentracija izrazito djeluje na promjenu senzorskih svojstava rajčice što je i najveći problem primjene eteričnih ulja u praksi. Svakako se eterična ulja mogu primijeniti u slučajevima kada su kompatibilna s tretiranom namirnicom ili sirovinom, ali ukoliko je njihova koncentracija prevelika, nepovoljno utječu na potrošače. Od istraživanih vrsta plijesni, *C. cladosporioides* je osjetljivija plijesan na natamicin, ali se prema eteričnom ulju bosiljka osjetljivost ne razlikuje u usporedbi s *B. cinerea*.

Tablica 9 Mikrobiološki parametri* uzoraka tretiranih pululanom i eteričnim uljem bosiljka

	0. dan		3. dan		6. dan		9. dan	
	AMB	PiK	AMB	PiK	AMB	PiK	AMB	PiK
Kontrola	20**	65	90	20	0	580	0	37000
Kontrola + pululan	10	20	10	3200	0	20	0	81500
Eterično ulje bosiljka 12,5 ppm	10	35	0	0	0	10	0	0
Eterično ulje bosiljka 6,25 ppm	10	35	4000	0	0	10	0	0

* koliformne bakterije, sulfitoreducirajuće klostridije i bakterije roda *Salmonella* nisu dokazane niti u jednom uzorku

** vrijednosti izražene kao broj živih stanica/g (CFU/g)

AMB = aerobne, mezofilne bakterije; PiK = plijesni i kvasci

Od svakog uzorka cherry rajčice (kontrola – tj. bez posebnog tretiranja, samo pranje i ispiranje te kontrola tretirane s pululanom ili natamicinom) određen je broj ili prisutnost važnih mikrobioloških skupina za čuvanje/skladištenje, ali i zdravstvenu ispravnost uzoraka. Niti u jednom uzorku nije utvrđena prisutnost koliformnih bakterija, sulfitoreducirajućih klostridija i bakterija roda *Salmonella*, kako u trenutku nakon obrade, tako i tijekom čuvanja u 3., 6. i 9. danu; mijenjao se samo broj aerobnih mezofilnih bakterija (AMB) i plijesni i kvasaca (PiK) što

je prikazano **Tablicom 9**. Kao što se može uočiti, broj mikroorganizama se značajno razlikuje između pojedinih uzoraka. Naime, pululan koji je upotrijebljen kako jestivi omotač, uzrokovao je povećanje broja PiK u uzorku bez dodatka eteričnog ulja bosiljka/natamicina. Taj broj se s 20 PiK/g uzorka u trenutku tretiranja povećao na 3200 u 3. danu, a u 9. danu je porastao do 81500 plijesni/g. Iznimka je 6. dan inkubacije gdje je utvrđena prisutnost od samo 20 PiK/g uzorka. Kada se radi o uzorkovanju i mikrobiološkim analizama ovakvog tipa, odstupanja, kao u ovom radu, mogu biti velika. Bez obzira što su svi plodovi rajčice prošli jednak tretman pranja, tretiranja aktivnim klorom i ispiranja, ne znači da su svi mikroorganizmi na njima jednako uništeni. U ovisnosti o tome koliko su pričvršćeni ili koliko su duboko prodrli u samo tkivo ploda rajčice i koliko su zaštićeni od djelovanja klora, preživjeli mikroorganizmi se umnožavaju tijekom čuvanja. Nadalje, od 9 tretiranih rajčica, samo je jedna (nasumična) odabrana za mikrobiološku analizu, stoga su razlike u rezultatima između odabranih točaka (dana) inkubacije vrlo moguće.

Tablica 10 Postotak vidljivo pljesnivih plodova rajčica tretiranih natamicinom i plijesni *Botrytis cinerea*

Tretiranje	3. dan	6. dan	9. dan
Kontrola	0 %	33,33 %	100 %
Kontrola + pululan	0 %	66,67 %	100 %
Natamicin 6,25 ppm	0 %	50 %	50 %
Natamicin 12,5 ppm	16,67 %	100 %	66,67 %

Tablica 11 Postotak vidljivo pljesnivih plodova rajčica tretiranih eteričnim uljem bosiljka i plijesni *Botrytis cinerea*

Tretiranje	3. dan	6. dan	9. dan
Kontrola	0 %	0 %	11,11 %
Kontrola + pululan	55,55 %	100 %	100 %
Eterično ulje bosiljka 6,25 ppm	77,77 %	88,89 %	77,78 %
Eterično ulje bosiljka 12,5 ppm	55,55 %	100 %	33,33 %

Postotak vidljivo pljesnivih plodova rajčice tretiranih s natamicinom i eteričnim uljem bosiljka i plijesni *B. cinerea* može se uočiti iz **Tablica 10 i 11**. I ovdje su vidljivi veliki rasipi rezultata, kao npr, **Tablica 10 i 11** u 6. danu gdje je uočena plijesan *B. cinerea* na svim tretiranim plodovima, dok je taj broj smanjen u 9. danu inkubacije. U svim slučajevima tretiranja plijesnima, napravljene su dvije paralele sa po tri ploda (tj. ukupno 6 plodova). Ovakav eksperimentalni protokol je trebao omogućiti ravnomjerniju raspodjelu rezultata, međutim, bez obzira što se radi o 6 plodova, rezultati se i ovdje prilično razlikuju. Biološki uzorci ovakve vrste su prilično složeni za analizu (i interpretaciju), što se može riješiti povećanjem broja uzoraka (tj. paralela), no to istovremeno značajno poskupljuje i čini eksperimentalni rad daleko složenijim.

Tablica 12 Postotak vidljivo pljesnivih plodova rajčica tretiranih natamicinom i plijesni *Cladosporium cladosporioides*

Tretiranje	3. dan	6. dan	9. dan
Kontrola	0 %	33,33 %	100 %
Kontrola + pululan	0 %	16,67 %	33,33 %
Natamicin 6,25 ppm	0 %	0%	33,33 %
Natamicin 12,5 ppm	0 %	0%	0 %

Tablica 13 Postotak vidljivo pljesnivih plodova rajčica tretiranih eteričnim uljem bosiljka i plijesni *Cladosporium cladosporioides*

Tretiranje	3. dan	6. dan	9. dan
Kontrola	0 %	33,33%	100 %
Kontrola + pululan	0 %	33,33 %	66,67 %
Eterično ulje bosiljka 6,25 ppm	16,67 %	16,67 %	77,78 %
Eterično ulje bosiljka 12,5 ppm	0 %	0 %	33,33 %

Bolji mikrobiološki rezultati djelovanja natamicina i eteričnog ulja bosiljka na plijesan *C. cladosporioides* mogu se uočiti iz **Tablica 12 i 13** gdje se može primijetiti kako se povećanjem koncentracije natamicina ili eteričnog ulja bosiljka smanjuje postotak vidljivo pljesnivih plodova. Čak je i u kontroli s pululanom postotak pljesnivih plodova manji u usporedbi s kontrolom, dok je samo 1/3 istraženih uzoraka tretiranih s eteričnim uljem bosiljka u 9. danu bila pozitivna na pojavu plijesni. Pri višoj primijenjenoj koncentraciji od 12,5 ppm, natamicin je u potpunosti inhibirao rast *C. cladosporioides*. U usporedbi s eteričnim uljem bosiljka, *C. cladosporioides* je daleko osjetljivija na natamicin, što je, sigurno, jedan od razloga potpunog izostanka rasta.

Sličan pozitivni učinak pululana na kvalitetu i održivost rajčice su istraživali Pobiega i sur., (2020) koji ističu kako uporaba pululana može produžiti kvalitetu rajčice, a dodatak antimikrobnih tvari (u njihovom slučaju propolisa) pojačava antimikrobni učinak i smanjuje pojavnost i umnožavanje uzročnika kvarenja i patogenih mikroorganizama (uključujući i *Botrytis cinerea*).

Produženje roka trajanja i sprječavanje kvarenja ili inhibicija patogenih mikroorganizama predstavljaju veliki izazov za prehrambenu industriju i potrošače. Prirodni spojevi, poput jestivih omotača (pululana) i prirodnih sastojaka mogu doprinijeti smanjenju ekonomskih gubitaka, sprječavanju infekcija ili trovanja potrošača, ali i smanjiti ovisnost o plastičnoj ambalaži te doprinijeti pozitivnom ekološkom učinku.

5. ZAKLJUČCI

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

1. Koncentracije kisika i dušika u pakiranim rajčicama tretiranih pululanom se smanjuju tijekom skladištenja (ispod 16% za kisik, do 42% za dušik u 9. danu), dok se koncentracije ugljičnog dioksida povećavaju
2. Najveća promjena boje tijekom skladištenja utvrđena je u kontrolnom uzorku, potom slijede rajčice tretirane pululanom i natamicinom. Promjena boje rajčice se povećavala tijekom čuvanja, ali u 9. danu skladištenja nije bilo razlike između kontrolnog i uzorka tretiranog pululanom.
3. Najmanji gubitak čvrstoće rajčice utvrđen je u uzorku tretiranom pululanom dok je najveći ustanovljen kod neobrađenog uzorka (kontrolne).
4. Topljiva suha tvar se neznatno smanjila u uzorcima tretiranim pululanom i eteričnim uljem bosiljka.
5. pH vrijednost cherry rajčice se povećala za 0,2 jedinice s 4,4 na 4,6 za kontrolni, a za uzorke tretirane pululanom s 4,5 na 4,7.
6. Natamicin je snažnije inhibirao vrstu *Cladosporium cladosporioides* (6,25 ppm MIK; 12,5 ppm MFK), od vrste *Botrytis cinerea* (12,5 ppm MIK; 25 ppm MFK). Eterično ulje bosiljka je djelovalo jednako na obje vrste plijesni (400 ppm MIK; >800 ppm MFK).
7. Mikrobiološkom analizom netretiranih i tretiranih uzoraka rajčice nije utvrđena prisutnost koliformnih bakterija, bakterija roda *Salmonella* i sulfireducirajućih klostridija. Uzorak tretiran pululanom i neobrađeni uzorak su sadržavali najveći broj plijesni i kvasaca (81500 i 37000 CFU/g u 9. danu skladištenja) dok je broj aerobnih mezofilnih bakterija i plijesni i kvasaca uzoraka tretiranih pululanom i eteričnim uljem bosiljka bio < 10 CFU/g.
8. Natamicin je, u obje koncentracije od 12,5 i 6,25 ppm smanjio postotak pljesnivih plodova tretiranih pululanom i kontaminiranih s *B. cinerea*. Eterično ulje bosiljka je u 9. danu smanjilo postotak pljesnivih plodova na 33,33% pri koncentraciji od 12,5 ppm.
9. Natamicin je, pri koncentraciji od 6,25 ppm smanjio postotak pljesnivih plodova tretiranih pululanom i kontaminiranih s *C. cladosporioides* na 33 % dok je pri 12,5 ppm plijesan potpuno inhibirana. Eterično ulje bosiljka je u 9. danu smanjilo postotak pljesnivih plodova na 33,33% pri koncentraciji od 12,5 ppm.

6. LITERATURA

- Benko B (2019) „Cherry“ rajčica – iznimno zdrava!, *Gospodarski list* [online]. Dostupno na: <https://gospodarski.hr/rubrike/povrcarstvo-rubrike/cherry-rajcica-iznimno-zdrava/> (Pristupljeno: 19.4.2024.)
- Bensch K., Groenewald J.Z., Dijksterhuis J., Starink-Willemse M., Andersen B., Summerell B.A. i Shin H.D. (2010) „Species and Ecological Diversity within the *Cladosporium cladosporioides* Complex (Davidiellaceae, Capnodiales)“, *Studies in Mycology*, 67, str. 1-94.
- Bensch K., Groenewald J.Z., Meijer M., Dijksterhuis J., Jurjević Ž., Andersen B., Houbraeken J., Crous P.W. i Samson R.A. (2018) „*Cladosporium* Species in Indoor Environments“, *Studies in Mycology*, 89, str. 177-301.
- Borošić J. (2016) „Uvjeti proizvodnje rajčice“, *Glasiló biljne zaštite*, 16, str. 423-427.
- Catley B.J., Ramsay A. i Servis C. (1986) „Observations on the Structure of the Fungal Extracellular Polysaccharide, Pullulan“, *Carbohydrate Research*, 153, str. 79-86.
- Cheng K.C., Demirci A. i Catchmark J.M. (2011) „Pullulan: Biosynthesis, Production, and Applications“, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92, str. 29-44.
- Da Silva W.M.F., Kringel D.H., De Souza E.J.D., Da Rosa Zavareze E. i Dias A.R.G. (2022) „Basil Essential Oil: Methods of Extraction, Chemical Composition, Biological Activities, and Food Applications“, *Food and Bioprocess Technology*, 15, str. 1-27.
- Drinkwater N.R., Miller E.C., Miller J.A. i Pitot H.C. (1976) „Hepatocarcinogenicity of Estragole (1-Allyl-4-Methoxybenzene) and 1'-Hydroxyestragole in the Mouse and Mutagenicity of 1'-Acetoxyestragole in Bacteria“, 2. *Journal of the National Cancer Institute*, 57, str. 1323-1331.
- Duguma H.T. (2022) „Potential Applications and Limitations of Edible Coatings for Maintaining Tomato Quality and Shelf Life“, *International Journal of Food Science & Technology*, 57, str. 1353-1366.
- EMA, European Medicines Agency: *Public statement on the use of herbal medicinal products containig estragole*. EMA, 2023.
- Fahlbusch K., Hammerschmidt F., Panten J., Pickenhagen W., Schatkowski D., Bauer K., Garbe D., Surburg H. (2003) „Flavors and Fragrances“ u *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH, Wiley.
- FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations: *Agricultural production statistics*. FAOSTAT, 2022.
- Friedman M., Henika P.R. i Mandrell R.E. (2002) „Bactericidal Activities of Plant Essential Oils and Some of Their Isolated Constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia*

- coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*“, *Journal of Food Protection*, 65, str. 1545-1560.
- González M., Cid M.C., Lobo M.G. (2011) „Usage of Tomato (*Lycopersicum Esculentum* Mill.) Seeds in Health“ u *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*. Amsterdam: Elsevier, str. 1123-1132.
- Josifović M. (1973a) „Patlidžan crveni“ u *Poljoprivredna enciklopedija II*. Zagreb: Jugoslavenski leksikografski zavod, str. 482-485.
- Josifović M. (1973b) „Mikoze“ u *Poljoprivredna enciklopedija II*. Zagreb: Jugoslavenski leksikografski zavod, str. 190-192.
- Jugreet B.S., Suroowan S., Rengasamy R.R.K., Mahomoodally M.F. (2020) „Chemistry, Bioactivities, Mode of Action and Industrial Applications of Essential Oils“, *Trends in Food Science & Technology*, 101, str. 89-105.
- Latorre B.A., Briceño E.X. i Torres R. (2011) „Increase in *Cladosporium* Spp. Populations and Rot of Wine Grapes Associated with Leaf Removal“, *Crop Protection*, 30, str. 52-56.
- Leathers T.D. (2003) „Biotechnological Production and Applications of Pullulan“, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62, str. 468-473.
- Lee K.Y. i Yoo Y.J. (1993) „Optimization of pH for High Molecular Weight Pullulan“, *Biotechnology Letters*, 15, str. 1021-1024.
- Li Q.X. i Chang C.L. (2016) „Basil (*Ocimum Basilicum* L.) Oils“ u *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Amsterdam: Elsevier, str. 231-238
- Mahima M., Priyanka P., Chandrakala R. i Rachna S. (2021) „Natamycin: a natural preservative for food applications – a review“, *Food Science and Biotechnology*, 30 (12), str. 1481 – 1496.
- Miller E.C., Swanson A.B., Phillips D.H., Fletcher T.L., Liem A. i Miller J.A. (1983) „Structure Activity Studies of the Carcinogenicities in the Mouse and Rat of Some Naturally Occurring and Synthetic Alkenylbenzene Derivatives Related to Safrole and Estragole“, *Cancer Research*, 43, str. 1124-1134.
- Peralta-Ruiz Y., Tovar C.D.G., Sinning-Mangonez A., Coronell E.A., Marino M.F. i Chaves-Lopez C. (2020) „Reduction of Postharvest Quality Loss and Microbiological Decay of Tomato „Chonto“ (*Solanum Lycopersicum* L.) Using Chitosan-E Essential Oil-Based Edible Coatings under Low-Temperature Storage“, *Polymers*, 12, str. 1822.
- Pitt J.I. i Hocking A.D. (2022) *Fungi and Food Spoilage*. 4. Cham, Švicarska: Springer International Publishing.

- Pobiega K., Przybył J.L., Żubernik J. i Gniewosz M. (2020) „Prolonging the Shelf Life of Cherry Tomatoes by Pullulan Coating with Ethanol Extract of Propolis During Refrigerated Storage“, *Food and Bioprocess Technology*, 13, str. 1447–1461.
- Ramesan R. i Sharma C.P. (2007) „Pullulan as a Promising Biomaterial for Biomedical Applications: A perspective“, *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, 20, str. 111-116.
- Rensink S., Nieuwenhuijzen E.J., Sailer M.F., Struck C. i Wösten H.A.B. (2024) „Use of *Aureobasidium* in a Sustainable Economy“, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108, str. 1-19.
- SCF, Scientific Committee on Food: *Opinion of the Scientific Committee on Food on Estragole (1-Allyl-4-methoxybenzene)*. SCF, 2001.
- Singh R.S., Kaur N. i Kennedy J.F. (2019) „Pullulan Production from Agro-Industrial Waste and Its Applications in Food Industry: A Review“, *Carbohydrate polymers*, 217, str. 46-57.
- Smith R.L., Adams T.B., Doull J., Feron V.J., Goodman J.I., Marnett L.J., Portoghese P.S., Waddell W.J., Wagner B.M., Rogers A.E., Caldwell J. i Sipes I.G. (2002) „Safety Assessment of Allylalkoxybenzene Derivatives Used as Flavouring Substances – Methyl Eugenol and Estragole“, *Food and Chemical Toxicology*, 40, str. 851-870.
- Sundararajan B., Moola A.K., Vivek K. i Kumari B.D.R. (2018) „Formulation of Nanoemulsion from Leaves Essential Oil of *Ocimum Basilicum* L. and Its Antibacterial, Antioxidant and Larvicidal Activities (*Culex Quinquefasciatus*)“, *Microbial Pathogenesis*, 125, str. 475-485.
- Sutherland I.W. (1998) „Novel and Established Applications of Microbial Polysaccharides“, *Trends in Biotechnology*, 16.
- Tahir H.E., Xiaobo Z., Mahunu G.K., Arslan M., Abdalhai M. i Zhihua L. (2019) „Recent Developments in Gum Edible Coating Applications for Fruits and Vegetables Preservation: A Review“, *Carbohydrate Polymers*, 224, str. 115141.
- Web 1: <https://www.simplyrecipes.com/your-guide-to-tomatoes-5199402> (Pristupljeno: 20. svibnja, 2024.)
- Web 2: <https://www.southernliving.com/how-to/cook/cherry-tomatoes-vs-grape-tomatoes> (Pristupljeno: 24. travnja, 2024.)
- Web 3: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-011-3477-y> (Pristupljeno: 24. travnja, 2024.)
- Web 4: <https://en.wikipedia.org/wiki/Natamycin#/media/File:Natamycin.svg> (Pristupljeno: 17. rujna, 2024.)

Web 5: <https://www.medchemexpress.com/estragole.html> (Pristupljeno: 24. travnja, 2024.)

Web 6: <https://www.enciklopedija.hr/clanak/plijesni> (Pristupljeno: 20. svibnja, 2024.)

te Welscher Y. M., ten Napel H. H., Balague M.M., Souza C. M., Riezman H., de Kruijff B. i Breukink E. (2007) „Natamycin Blocks Fungal Growth by Binding Specifically to Ergosterol without Permeabilizing the Membrane“, *The Journal of Biological Chemistry*, 283 (10), str. 6393 – 6401.

Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P. i Van Kan J.A.L. (2007) „*Botrytis cinerea*: The Cause of Grey Mould Disease“, *Molecular Plant Pathology*, 8, str. 561-580.

Wiseman R.W., Fennell T.R., Miller J.A. i Miller E.C. (1985) „Further Characterization of the DNA Adducts Formed by Electrophilic Esters of the Hepatocarcinogens 1'-Hydroxysafrole and 1'-Hydroxyestragole in Vitro and in Mouse Live in Vivo, Including New Adducts at c-8 and N-7 of Guanine Residues“, *Cancer Research*, 45, str. 3096-3105.

Yuen S. (1974) „Pullulan and Its Application“, *Process Biochemistry*, 9, str. 7-9.

7. PRILOZI



Prilog 1 Cherry rajčice korištene u radu



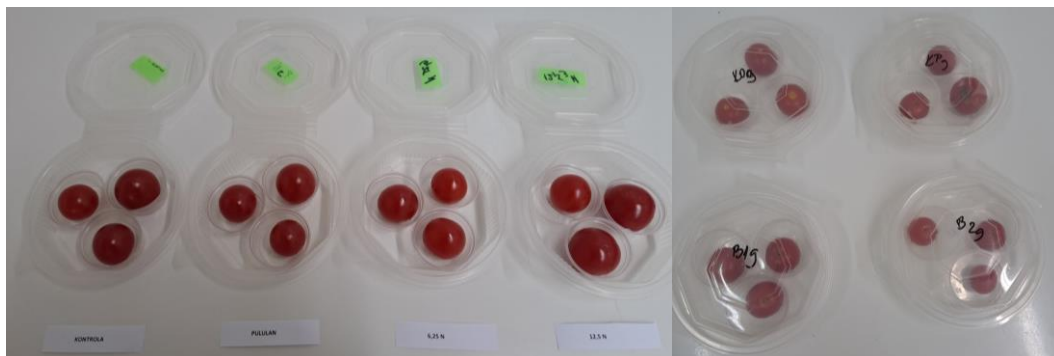
Prilog 2 Dezinfekcija cherry rajčice



Prilog 3 Ocjeđivanje cherry rajčica nakon tretiranja pululanom



Prilog 4 Pakiranje cherry rajčice



Prilog 5 Pakirani uzorci cherry rajčice



Prilog 6 Uzorci nakon određivanja koncentracije plinova u 9. danu čuvanja

DIPLOMSKI RAD JAVNO JE OBRANJEN DANA

TE OCIJENJEN USPJEHOM

Pred Povjerenstvom za obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc., Lidija Jakobek Barron predsjednik _____
(potpis)

2. prof. dr. sc., Nela Nedić Tiban član _____
(potpis)

3. prof. dr. sc., Mirela Kopjar član _____
(potpis)