

Utjecaj jestivog omotača kitozana na kvalitetu ploda jagode

Gavranić, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:204556>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**UTJECAJ JESTIVOG OMOTAČA KITOZANA NA
KVALITETU PLODA JAGODE**

DIPLOMSKI RAD

Dora Gavranić

Zagreb, rujan, 2024.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:

Agroekologija-usmjerenje Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

**UTJECAJ JESTIVOG OMOTAČA KITOZANA NA
KVALITETU PLODA JAGODE**

DIPLOMSKI RAD

Dora Gavranić

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Luna Maslov Bandić

Zagreb, rujan, 2024.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Dora Gavranić**, JMBAG 0178119675, rođena 26.12.1999. u Dubrovniku, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

UTJECAJ JESTIVOG OMOTAČA KITOZANA NA KVALITETU PLODA JAGODE

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Dora Gavranić**, JMBAG 0178119675, naslova

UTJECAJ JESTIVOG OMOTAČA KITOZANA NA KVALITETU PLODA JAGODE

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

- | | | | |
|----|---------------------------------------|--------|-------|
| 1. | izv. prof. dr. sc. Luna Maslov Bandić | mentor | _____ |
| 2. | prof. dr. sc. Boris Duralija | član | _____ |
| 3. | prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka | član | _____ |

Zahvala

Posebno zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Luni Maslov Bandić na predloženoj temi za stjecanje iskustva, ukazanom povjerenju i pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se dr.sc. Slavenu Juriću na stručnoj pomoći, uloženom vremenu i trudu, kao i na prenesenom znanju tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Veliko hvala dr. sc. Irini Tanuwidjaja na svim korisnim savjetima i velikoj pomoći prilikom izrade i pisanja mikrobiološkog dijela ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se djelatnicama analitičkog laboratorija, Zavoda za kemiju na korisnim savjetima i ugodnoj suradnji tijekom provedbe analiza.

Hvala svim mojim dragim ljudima koji su mi bili podrška i moje studentsko putovanje napravili ljepšim.

Na zadnjoj stanici ovog studentskog putovanja,
HVALA mojoj OBITELJI kao najvećem osloncu i podršci!

Posebno hvala mojim RODITELJIMA koji su mi omogućili da poletim.
Hvala Vam na beskrajnoj ljubavi i razumijevanju tijekom ovog leta!

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1 Cilj rada.....	2
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1 Jagode (lat. <i>Fragraria x ananassa</i> Duch.).....	3
2.2. Kemijski sastav.....	4
2.2.1. Polifenoli.....	5
2.2.2. Ukupna antioksidacijska aktivnost.....	9
2.3. Mikrobiota jagoda.....	11
2.3.1. <i>Botrytis cinerea</i>	13
2.3.2. Meka trulež.....	15
2.3.3. Porodica <i>Enterobacteriaceae</i>	16
2.4. Jestivi omotači i filmovi.....	18
2.4.1. Materijali za jestive filmove i omotače.....	18
2.4.2. Kitozan.....	20
3. MATERIJALI I METODE.....	25
3.1 Materijali.....	25
3.1.1. Biljni materijal.....	25
3.1.2. Popis korištenih kemikalija.....	25
3.1.3. Priprema jestivih omotača.....	26
3.1.4. Puferi i hranjive podloge za mikrobiološke analize.....	29
3.2. Metode.....	30
3.2.1. Priprema uzoraka za analizu.....	30
3.2.2. Određivanje ukupnog sadržaja polifenola.....	31
3.2.3. Određivanje ukupnih antocijana.....	32
3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom.....	32
3.2.5. Određivanje ukupnih proteina.....	33
3.2.6. Mikrobiološke analize.....	34
3.2.7. Statistička analiza.....	35
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	36
4.1. Optimizacija ekstrakcije polifenola iz jabučne komine.....	36
4.2. Bioaktivne komponente.....	37
4.2.1. Ukupni polifenoli.....	37
4.2.2. Ukupni antocijani.....	38
4.2.3. Antioksidacijska aktivnost.....	39

4.2.4. Ukupni proteini.....	40
4.3. Utjecaj jestivih omotača na mikrobiološku kvalitetu ploda.....	41
4.3.1. Mikrobiološka čistoća jestivih omotača.....	41
4.3.2. Utjecaj jestivih omotača na bakterije.....	42
4.3.3. Utjecaj jestivih omotača na kvasce i plijesni.....	44
5. ZAKLJUČAK.....	47
6. POPIS LITERATURE.....	48
7. PRILOG.....	55
Životopis.....	56

Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Dore Gavranić**, naslova

UTJECAJ JESTIVOG OMOTAČA KITOZANA NA KVALITETU PLODA JAGODE

Jestivi omotači predstavljaju ekološki prihvatljivi materijal za očuvanje kvalitete i produljenja roka trajanja svježeg voća. Jagoda je popularno voće i važan dio suvremene prehrane koje brzo propada nakon berbe. U ovom radu ispitan je utjecaj jestivog omotača kitozana na sadržaj bioaktivnih tvari (polifenola, antioksidacijska aktivnost, antocijani), ukupnih proteina i brojnost odabranih grupa mikroorganizama (aerobni mezofili, aerobnih psihrotrofi, enterobakterije, kvasaca i plijesni) na plodu jagode. Provedbom testa analize varijance (ANOVA) na razini značajnosti od 5 % utvrđeno je da postoji razlika među skupinama. Provedbom post-hoc t-testova uz Bonferronijevu korekciju ($p < 0,05$) na razini značajnosti utvrđeno je da se ukupni sadržaj polifenola i antocijanina te antioksidacijska aktivnost nakon 4. dana statistički značajno razlikuju između kontrolne skupine i skupine s jestivim omotačem kitozansom s dodatkom jabučne komine. Oba jestiva omotača značajno inhibiraju rast aerobnih mezofilnih bakterija, plijesni i kvasaca, dok psihrotrofne bakterije i enterobakterije nisu uopće detektirane. Stoga, kitozan se pokazao kao bolji omotač za produženje roka trajanja jagoda.

Ključne riječi: jagoda, jestivi omotač, kitozan, jabučna komina, bioaktivne tvari

Summary

Of the master's thesis– student **Dora Gavranić**, entitled

INFLUENCE OF EDIBLE CHITOSAN COATING ON STRAWBERRY FRUIT QUALITY

Edible coatings represent an environmentally friendly material for preserving the quality and extending the shelf life of fresh fruit. The strawberry is a popular fruit and an important part of the modern diet, which quickly deteriorates after harvesting. In this paper, the influence of the edible chitosan coating on the content of bioactive substances (polyphenols, antioxidant activity, anthocyanins), total proteins and the number of selected groups of microorganisms (aerobic mesophiles, aerobic psychrotrophs, enterobacteria, yeasts and molds) on strawberry fruit was examined. By performing an analysis of variance (ANOVA) test at a significance level of 5 %, it was determined that there was a difference between the groups. By performing post-hoc t-tests with Bonferroni's correction ($p < 0.05$) at the level of significance, it was determined that the total content of polyphenols and anthocyanins and the antioxidant activity after the 4th day were statistically significantly different between the control group and the group with the edible chitosan coating with the addition apple pomace. Both edible casings significantly inhibit the growth of aerobic mesophilic bacteria, molds and yeasts, while psychrotrophic bacteria and enterobacteria were not detected at all. Therefore, chitosan proved to be a better coating for extending the shelf life of strawberry.

Keywords: strawberry, edible coatings, chitosan, apple pomace, bioactive compound

1. UVOD

Proizvodnja i potrošnja voća raste zbog svijesti potrošača o zdravoj prehrani. Kvaliteta i sigurnost voća važni su budući da je voće zbog svog nutritivnog sastava podložnije kvarenju. Gubitak kvalitete voća i povrća nakon berbe i tijekom skladištenja globalni su problemi (Zhao i sur., 2020).

Jagoda (lat. *Fragaria × ananassa* Duch.) je vrlo popularno voće posebnog okusa, boje i nutritivne vrijednosti, sadrži veliki broj vitamina, aminokiselina, minerala, fenola i antocijana. Međutim, rok trajanja jagode je vrlo kratak (4-5 dana na 4 °C), uglavnom zbog fizioloških poremećaja, gljivične kontaminacije i osjetljivog tkiva ploda. Percepcija potrošača o svježim jagodama može se povezati s unutarnjim i vanjskim svojstvima. Ti se atributi mogu klasificirati kao „*atributi pretraživanja*“ što znači boja, izgled i cijena te „*atributi iskustva*“ što znači okus, miris i ljekoviti čimbenici i „*atributi vjerodostojnosti*“ što znači zdravstvena prednost, nutritivna vrijednost i mikrobiološka sigurnost (KLU Coaching, 2017).

Zbog mekog mesa i izrazito tankog vanjskog sloja, jagode se lako kvare i vrlo su osjetljive na mehanička oštećenja i patogene infekcije, što sve uzrokuje velike gubitke u proizvodnji jagoda (Wang i sur., 2021). Stoga je smanjenje stope propadanja vrlo važan izazov iz tehnološke i ekonomske perspektive (Khodaei, Hamidi-Esfahani i Rahmati, 2021).

Kako bi usporili stopu propadanja ubranih jagoda i produžili njihov vijek trajanja, znanstvenici su proveli znatnu količinu istraživanja o mehanizmima sazrijevanja i starenja jagoda, kao i bolestima kojima su ubrane jagode osjetljive, te povoljnim strategijama skladištenja (Wang i sur., 2021).

Predlažu se različite metode za produljenje roka trajanja jagoda, kao što je obrada vrućom vodom, pakiranje u modificiranoj atmosferi, UV zračenje i kemijska obrada. Međutim, ove tehnike mogu povećati troškove proizvodnje i također imati negativan učinak na boju, okus, aromu i teksturu voća (Khodaei, Hamidi-Esfahani i Rahmati, 2021).

Jestivi filmovi i omotači su nove tehnike predložene za produljenje roka trajanja i kvalitete svježeg voća i povrća. Jestivi omotači štite voće i povrće od propadanja usporavanjem gubitka vlage, smanjenjem brzine disanja, očuvanjem hlapljivih spojeva, poboljšanjem kvalitete, teksture i smanjenjem rasta mikroorganizama. Zbog svoje neutralne boje i okusa, polisaharidi, proteini i lipidi smatraju se glavnim komponentama za formulaciju jestivih omotača koji se mogu koristiti sami ili pomiješani. Jestivi filmovi i omotači također se mogu koristiti kao nosači različitih aditiva kao što su vitamini, minerali, bojila, antimikrobna sredstva i probiotici. Mnoga su istraživanja potvrdila učinkovitost jestivih omotača s obzirom na različite izvore za produljenje roka trajanja jagoda. Trenutačno nema dostupnih studija koje uspoređuju jestive omotače i rangiraju ih prema različitim fizikalno-kemijskim svojstvima kako bi se pronašao najprikladniji omotač za jagode (Khodaei, Hamidi-Esfahani i Rahmati, 2021).

1.1 Cilj rada

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj jestivog omotača kitozana te jestivog omotača kitozana s dodatkom ekstrakta jabučne komine na kvalitetu ploda jagode.

Specifični ciljevi rada

- Određivanje mikrobiološke čistoće jestivih omotača (kitozan i kitozan s dodatkom jabučne komine).
- Određivanje ukupnog broja odabranih mikrobnih grupa (aerobne mezofilne bakterije, aerobne psihrotrofne bakterije, enterobakterija, plijesni i kvasci) u kontrolnim jagodama, jagodama tretiranim kitozansom i jagodama tretiranim kitozansom s dodatkom ekstrakta jabučne komine tijekom skladištenja pri 4 °C
- Usporedba inhibitornog učinka kitozana i kitozana s dodatkom ekstrakta jabučne komine prema odabranim mikrobnim grupama (aerobne mezofilne bakterije, aerobne psihrotrofne bakterije, enterobakterija, plijesni i kvasci) tijekom skladištenja pri 4 °C.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 Jagode (lat. *Fragaria x ananassa* Duch.)

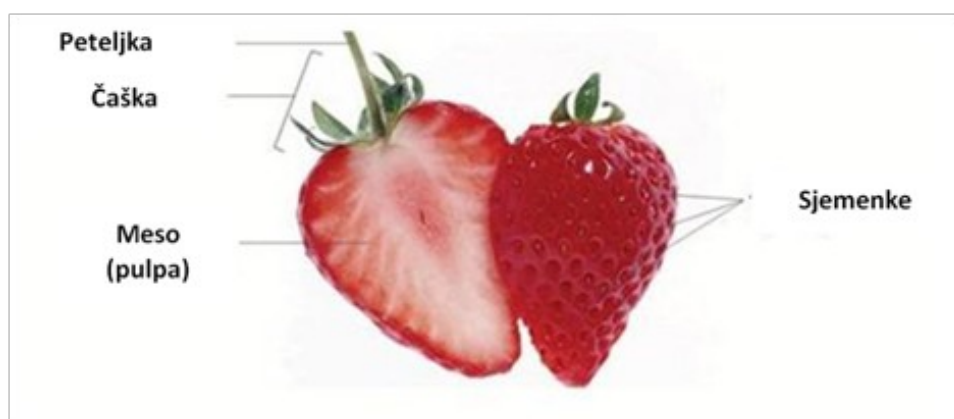
Jagode pripadaju porodici Rosaceae i rodu *Fragaria* (Tablica 1.). Botanički, plodovi jagode nisu bobičasto voće i rastu na višegodišnjoj biljci. Zeljasti zimzeleni grm koji raste uz tlo, a sastoji se od korijena, korijenovog vrata i stabljike iz koje izviru prizemni listovi. Kod jagode list je trodijelan i nazubljen. S gornje strane su sjajni, glatki i tamnozeleni, a s donje svjetlozeleni s malim bjelkastim dlakama. Jagode imaju cvat s obično do 15 cvjetova (uglavnom 7-10 cvjetova). Cvijet jagode ima čašku s 5 čašičnih listića koji okružuju bijele latice. Hermafroditni cvjetovi su bjelkasti, promjera 4-6 mm i nalaze se u pazušcima listova. Kako biljka sazrijeva i stari postaje drvenasta te lišće odumire (Hussain i sur., 2021).

Tablica 1. Botanička klasifikacija

Red	Rosales
Porodica	Rosaceae
Rod	<i>Fragaria</i>
Vrsta	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.

Izvor: Hussain i sur., 2021

Plod jagode je jarko crvene boje, srcolikog oblika hrapave površine i promjera 1-2 cm (Slika 1.). Botanički, crveni plod u obliku srca je odebljala cvjetna loža s mnogo sjemenki usađenih na površinu. Ove žute sjemenke su zapravo pravo voće poznato kao oraščići (achenes). Jagode srednje veličine sadrže oko 200 sjemenki. Ono što je vrijedno pažnje kod jagoda je da potomstvo svojstva matične jagode i zato se za uzgoj ne razmnožava sjemenom. Glavno meso jagode, poznato pod nazivom *cortex* je sočno, crvenkasto bijele boje i slatkog okusa (Hussain i sur., 2021).



Slika 1. Presjek ploda jagode

Izvor: Muthukumarani i sur., 2017

Jagode su klasificirane kao neklimakterijsko voće, koje ne pokazuje povećanje stope disanja niti proizvodnju etilena tijekom zrenja. Provedena istraživanja pokazala su da plodovi jagode

ubrani u bijelom stadiju razvoja i održavane in vitro doživljaju promjene tijekom 8 dana kontinuirane izloženosti propilenu u smislu boje ili autokatalitičke proizvodnje etilena. Neklimakterijsko voće općenito se bere potpuno zrelo jer se smatralo, posebno za jagode, da se sazrijevanje ne nastavlja normalno nakon branja. Međutim, nekoliko studija je pokazalo da, čak i kada su ubrane u ranoj fazi razvoja boje, jagode mogu promijeniti boju tijekom skladištenja. Iako bijele jagode pocrvene tijekom skladištenja, ne podliježu dovoljnim promjenama u sadržaju šećera i kiseline da bi bile prikladne za svježiju potrošnju (Nunes i sur., 2005).

Jagode rastu u umjerenim područjima svijeta od Sjeverne Amerike do cijele Europe. Vrtna jagoda ili *Fragaria x ananasi* nastala je križanjem između dvije vrste i to *Fragaria virginiana* i *Fragaria chiloensis*, porijeklom iz Amerike, odnosno Čilea. Međutim, populaciji jagoda najviše odgovara brdovito područje na nadmorskoj visini od 750-1500 m. Suptropski klimatski uvjeti idealni su za uzgoj jagoda, ali mogu dobro preživjeti i u umjerenim uvjetima. Jagode zahtijevaju toplu klimu i nisku vlažnost. Dnevne temperature od 22–25 °C i noćne od 7 do 13 °C idealne su za uspješnu proizvodnju ploda jagode. Najpogodnija tla za uzgoj jagoda su tla bogata humusom i pjeskovito-ilovasta tla koja moraju biti dovoljno duboka i drenirana. Najpovoljnija kiselost (pH) se kreće između 5-6,5. Tlo ispod 300 mm od površine ne bi trebalo sadržavati tešku glinu i kamenja jer teška glinena tla djeluju na vodu nakon kiše, povećavajući rizik od bolesti i smanjujući prinose. Šumske jagode mogu rasti u raznim staništima od otvorenih šuma i livada do pješćanih dina i plaža (Hussain i sur., 2021).

2.2. Kemijski sastav

Jagode su vrlo traženo voće zbog svoje ugodne arome, sjajne boje i izvrsnog okusa. Također su dobar izvor prirodnih antioksidansa, vitamina i minerala što je prikazano u Tablici 2. Sadrže značajne količine antocijana, flavonoida i fenola. Plodovi se beru u punoj zrelosti kako bi se zadržale senzorne (vizualni izgled, čvrstoća, boja) i nutritivne (fitonutrijenti, minerali i vitamini) kvalitete. Jedan od najvažnijih pokazatelja kvalitete u jagodama je omjer šećera i kiseline, koji karakterizira stupanj slatkoće i ovisi o zrelosti, sorti i vremenskim uvjetima ploda. Omjer šećera i kiseline u zrelih jagodama varira ovisno o sorti, obično u rasponu od 7:1 za voće koje se smatra slatkim i 6:1 za voće koje se smatra kiselim okusom. Zbog visoke stope disanja, meke teksture i osjetljivosti na temperaturu i mehaničke udare i vibracije, jagode su osjetljive na nekoliko patogena, što uzrokuje promjene u pH, ukupnoj kiselosti, ukupnoj suhoj tvari, gubitku boje, čvrstoće i mase što rezultira kvarenje i skraćivanjem roka trajanja (Dhital i sur., 2017).

Vrijednost pH jagoda se kreće između 3,27 i 3,80 što pomaže u stabilizaciji boje. Kiselost se kreće između 0,58 % i 1,35 %. Primarne organske kiseline su limunska i jabučna kiselina koje izvrsno pridonose okusu. Glavne karakteristike vezane uz kvalitetu zrelih jagoda su tekstura, okus (topljivi šećer i organske kiseline) i boja (sadržaj antocijana). Tijekom zrenja škrob se pretvara u šećere, uglavnom saharozu, glukozu i fruktozu. Ukupna koncentracija šećera je 4 % u soku od jagoda (Saddozai i sur., 2012).

Jagode sadrže 80-90 % vode, 0,9-1,2 % vlakana, 4,5-10 % šećera, 0,17-0,25 % tanina, vitamine B1, B6, K, karoten, folna kiselina, željezo, kalij, kalcij. Jagode su poznate kao dobar izvor vitamina C, folata (folne kiseline), a u novije vrijeme i kao proizvod s visokim udjelom raznih fenola, od kojih većina pokazuje antioksidacijski kapacitet. Kvalitetu jagode opisuje i sadržaj minerala, ugljikohidrata, organskih kiselina-jabučne kiseline, vinske kiseline, limunske kiseline. Limunska kiselina čini oko 90 % organskih kiselina prisutnih u jagodama (Galoburda i sur., 2014).

Tablica 2. Kemijski sastav plodova jagode izražen na 100 g svježeg ploda

Sastojak	Količina
Voda	91 g / 100 g
Ugljikohidrati	5,1 g/100 g
Od toga/od kojih šećeri	6,2 g/ 100 g
• Fruktosa	2,3 g / 100 g
• Glukoza	2,6 g / 100 g
• Saharoza	1,3 g/ 100 g
Proteini	0,7 g/100 g
Masti	0,3 g/100 g
Dijetalna vlakna	2,2 g/ 100 g
Vitamin C	58,8 mg/ 100 g
Vitamin E	0,29 mg/ 100 g
Vitamin A	1 µg / 100 g
Tiamin	0,024 mg/ 100 g
Riboflavin	0,022 mg/100 g
Niacin	0,386 mg/ 100 g
Piridoksin	0,047 mg/100 g
Folat	24 µg/ 100 g

Izvor: A. Kalia i Gupta, 2006

2.2.1. Polifenoli

Polifenoli čine jednu od najbrojnijih i najrasprostranjenijih skupina tvari u biljnom carstvu, s više od 8000 polifenolnih spojeva (Bravo, 2009). Polifenoli su sekundarni metaboliti koje proizvode biljke kako bi se zaštitile od biljnih bolesti i insekata, ali igraju važnu ulogu u ljudskom zdravlju u zaštiti od brojnih bolesti povezanih s oksidativnim stresom i oštećenjima izazvanim slobodnim radikalima (Geremu i sur., 2016).

S kemijskog gledišta, to je skupina spojeva koji posjeduju fenolne strukturne elemente, koji se sastoje od aromatskih prstenova kojima jedan ili više hidroksil skupine su priložene. Podjela polifenola po kemijskoj strukturi je na temelju broja fenolnih prstenova koji određeni spoj posjeduje i način na koji su prstenovi povezani. Polifenoli pokazuju širok raspon svojstava kao što su topljivost u organskim otapalima, apsorpcija ultraljubičastog zračenja, zaštita biljaka od patogena i stresa, te pigmentacija kod biljaka. Postoji nekoliko različitih

pristupa klasifikaciji polifenole na ovaj način, što rezultira malim razlikama u broju razreda. Međutim, najčešća korištena klasifikacija polifenola je u 5 glavnih klasa: fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni, lignani i drugi. Općenito možemo ih podijeliti na flavonoide (flavonoli, flavan-3-oli, flavoni, izoflavoni, flavanoni i antocijanini) i neflavonoidi (Ištuk i sur., 2020).

Polifenoli su djelomično odgovorni za senzorsku i nutritivnu kvalitetu biljne hrane. Oporost i gorčina hrane i pića ovisi o sadržaju polifenolnih spojeva. Oksidacija polifenola tijekom obrade ili skladištenja rezultirat će ili korisnim ili nepoželjnim karakteristikama prehrambenih proizvoda. Na primjer, oksidativne promjene poput posmeđivanja kakaovca tijekom obrade ili oksidativna polimerizacija polifenola čaja tijekom proizvodnje crnog čaja rezultiraju razvojem karakterističnih i poželjnih organoleptičkih svojstava. Nasuprot tome, enzimaska reakcija posmeđivanja fenolnih spojeva i neenzimatske reakcije posmeđivanja odgovorne su za stvaranje nepoželjne boje i okusa u jelima i povrću (Candrawinata i sur., 2014).

Konsumacija jagoda ubraja se među najbogatije prehrambene izvore fitokemijskih antioksidansa poput vitamina C, karotenoida i polifenolnih spojeva. Polifenoli kod jagoda najpoznatiji su, naravno, po svojim antioksidativnim i protuupalnim svojstvima. Također imaju antimikrobna, antialergijska i antihipertenzivna svojstva, kao i sposobnost inhibicije aktivnosti nekih fizioloških enzima i receptora, što pomaže u prevenciji bolesti uzrokovanih oksidacijskim stresom. Glavna skupina polifenola kod jagoda su flavonoidi i to uglavnom antocijanini, kvantitativno najvažniji polifenolni spojevi prisutni u jagodama u obliku pelargonidina i derivata cijanidina što je prikazano u Tablici 3. (Hyrije Koraqi i sur., 2023).

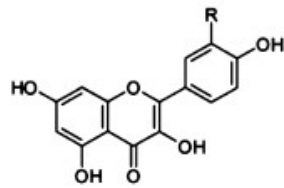
Tablica 3. Maseni udjeli (mg/100 g svježe tvari) glavnih polifenolnih spojeva u jagodama

Skupina	Spoj	Koncentracija (mg/100 g svježe tvari)
Antocijanini	Cijanidin-3-glukozid	1,10
	Pelargonidin-3-glukozid	25,30
	Pelargonidin-3-rutinozid	1,10
	Cijanidin-3-malonilglukozid	0,40
	Pelargonidin-3-malonilglukozid	6,00
Flavonoli	Kvercetinglikozidi	1,81
	Kempferolglukozidi	0,84
Flavan-3-oli	(+)-Katehin	4,50
	Dimeriprocijanidina	9,10
	Trimeri procijanidina	7,90
Elagitanin	Agrimoniin	8,80
	Elaginska kiselina	0,52
Glikozidielaginske kiseline	Elaginska kiselina O-pentozid, elaginska kiselina, metilelagična kiselina, deoksiheksozid	0,58
Konjugati cimetine kiseline	Kumarilneheksoze	5,40
	Cinamoilna glukoza	5,00

Izvor: Giampieri i sur., 2014

2.2.1.1. Flavonoidi

Flavonoidi su široko rasprostranjeni bioaktivni spojevi koji se nalaze u hrani biljnog podrijetla i mogu se grupirati u nekoliko strukturnih klasa uključujući antocijanine, flavone, flavan-3-ole, flavanone, flavonole i tanine. Na Slici 2 prikazan je kemijska struktura flavonoida prisutnih u jagodama. Osim što su usko povezani sa senzornim svojstvima voća, flavonoidi i fenolne kiseline su dobili povećanu pozornost zbog svojih potencijalnih antioksidativnih aktivnosti, koje također mogu imati kardiozaštitni učinak kod ljudi (Rabab i sur., 2017).



R= OH, Quercetin
R= H, Kaempferol

Slika 2. Kemijska struktura flavonoida prisutnih u jagodama

Izvor: Giampieri i sur., 2014

2.2.1.2. Antocijanini

Antocijanini u jagodama su najpoznatiji i kvantitativno najvažniji flavonoidi. Mnoga istraživanja odredila su ukupni sadržaj antocijana te se vrijednosti kreću od 150 do 600 mg/kg svježe mase, dok su pojedina istraživanja odredila vrijednosti i do 800 mg/kg svježe mase. Više od 25 različitih pigmenata antocijana opisano je u jagodama različitih sorti (Tablica 4.) Pelargonidin-3-glukozid je glavni antocijanin u jagodama (Rabab i sur., 2017, Giampieri i sur., 2012) neovisno o genetskim i okolišnim čimbenicima, dok je prisutnost cijanidin-3-glukozida konstantna u jagodama, iako samo u manjim udjelima (Giampieri i sur., 2012). Cijanidin-3-glukozid doprinosi crvenoj boji, dok pelargonidin doprinosi crveno-narančastoj boji (Galoburda i sur., 2014).

Količina antocijanina važna je za ocjenu zrelosti jagoda. Indeks zrelosti koji se koristi za berbu je crvena boja koja je rezultat sinteze antocijana koja odgovara polovici ili tri četvrtine ploda (Rabab i sur., 2017). Također se vjeruje da su ukupna koncentracija antocijanina i askorbinske kiseline glavni čimbenici koji utječu na stabilnost antocijana (Garzon i Wrolstad, 2002).

Tablica 4. Antocijanini zastupljeni u jagodama

Cijanidin-3-glukozid
Cijanidin-3-rutinozid
Cijanidin-3-malonilglukozid
Cijanidin-3-malonilglukozil-5-glukozid
Pelargonidin-3-galaktozid
Pelargonidin-3-glukozid
Pelargonidin-3-rutinozid
Pelargonidin-3-arabinozid
Pelargonidin-3,5-diglukozid
Pelargonidin-3-malilglukozid
Pelargonidin-3-acetilglukozid
Pelargonidin-disaharid (heksoza+pentoza) acilirana octenom kiselinom
5-piranopelargonidin-3-glukozid

Izvor: Giampieri i sur., 2012

Antocijanini se brzo akumulira u voću u kasnim fazama sazrijevanja, počevši kada voće postane bijelo crveno i povećava se više od 10 puta u crvenim, zrelim bobicama. Oni se praktično mogu koristiti kao biomarkeri u kontroli kvalitete proizvoda dobivenih od ovog voća jer nepravilna proizvodna praksa često uključuje dodavanje drugog, jeftinijeg voća proizvodima kao što su džemovi i sokovi. Antocijanini su skupina s iznimno dobrim antioksidacijskim i protuupalnim svojstvima (Newerli-Guz i sur., 2023).

2.2.2. Ukupna antioksidacijska aktivnost

Antioksidansi su spojevi koji mogu odgoditi ili inhibirati oksidacijske procese koji se odvijaju pod utjecajem atmosferskog kisika ili reaktivnih kisikovih spojeva. Koriste se za stabilizaciju polimernih proizvoda, petrokemijskih proizvoda, prehrambenih proizvoda, kozmetike i lijekova. Endogeni antioksidansi su enzimi, poput superoksid dismutaze, katalaze, glutation peroksidaze ili neenzimatski spojeva, kao što su mokraćna kiselina, bilirubin, albumin, metalotioneini. Kada endogeni čimbenici ne mogu osigurati potpunu kontrolu i zaštitu organizma od reaktivnih spojeva kisika javlja se potreba za egzogenim antioksidansima, kao dodacima prehrani ili farmaceutskim proizvodima, koji kao aktivni sastojak sadrže antioksidativni spoj. Od najvažnijih egzogenih antioksidansa poznati su vitamin E, vitamin C, β -karoten, vitamin E, flavonoidi, od minerala selenij, ali i vitamin D i vitamin K. Poznato je da antioksidansi igraju ključnu ulogu u zaštitnom učinku hrane biljnog podrijetla. Brojni su antioksidansi u prehrambenim biljkama: karotenoidi, fenolni spojevi, derivati benzojeve kiseline, flavonoidi, proantocijanidini, stilbeni, kumarini, lignani i lignini (Pisoschi i Negulescu, 2012).

Procjena ukupnog antioksidacijskog kapaciteta (eng. *Total Antioxidant Capacity*, TAC) može biti prikladan alat za određivanje dodatnih antioksidativnih svojstava hrane biljnog podrijetla. U Tablici 5 prikazane su metode procjene ukupnog antioksidativnog kapaciteta. Važnost ukupne antioksidacijske aktivnosti kao novog instrumenta za procjenu odnosa između prehrane i bolesti izazvanih oksidacijskim stresom prikazana je u novijim studijama pokazujući negativnu povezanost između TAC-a u prehrani i incidencije raka želuca ili razine C-reaktivnog proteina. Među voćem najveću antioksidacijsku aktivnost ima bobičasto voće, među napitcima najveći TAC ima kava, a zatim slijede sokovi od agruma, koji su pokazali najveću vrijednost među bezalkoholnim pićima. U hrani bogatoj vlaknima gdje su fenoli prisutni u slobodnom ili vezanom obliku, kao što su žitarice, mahunarke i orašasti plodovi, procijenjen je doprinos vezanih antioksidativnih spojeva vrijednosti TAC (Pisoschi i Negulescu, 2012).

Tablica 5. Metode procjene ukupnog antioksidativnog kapaciteta

Vrsta metode	Princip metode	Određivanje završne točke
Spektrometrija		
DPPH	Antioksidacijska reakcija s organskim radikalom	Kolorimetrija
ABTS	Antioksidacijska reakcija s kationskim radikalom	Kolorimetrija
FRAP	Antioksidacijska reakcija s kompleksom Fe(III)	Kolorimetrija
PFRAP	Redukcija kalijevog fericijanida s pomoću antioksidansa i naknadna reakcija kalijevog ferocijanida s Fe ³⁺	Kolorimetrija
CUPRAC	Redukcija Cu (II) u Cu (I) s pomoću antioksidansa	Kolorimetrija
ORAC	Antioksidacijska reakcija s peroksidnim radikalom, induciranih AAPH (2,2'-azobis-2-amidino-propan)	Gubitak fluorescencije fluorescein
Fluorimetrija	Emisija svjetlosti koja apsorbira svjetlost ili drugo elektromagnetsko zračenje različite valne duljine	Snimanje spektrom ekscitacije/emisije fluorescencije

Izvor: Pisoschi i Negulescu, 2012

Utvrđeno je da se ukupni antioksidacijski kapacitet koristi za procjenu botaničkog podrijetla meda budući da se med dobiva od raznih cvjetova te se razlikuje u vrijednostima TAC. Također se koristi i kao mjera kvalitete i svježine hrane. Može biti pomoćni parametar za procjenu kvalitete mlijeka tijekom skladištenja. Tijekom 15-dnevnog skladištenja različitih uzoraka voća i povrća na 4 °C je dovelo je do smanjenja TAC-a, što je u korelaciji s gubitkom glavnih antioksidacijskih komponenti. TAC je uglavnom održan tijekom 8 tjedana skladištenja kivijsa na 1 °C, potvrđujući prikladnost ove metode skladištenja. Međutim, u mnogim slučajevima TAC se povećava tijekom skladištenja, posebno kod voća, možda zbog njihovog sazrijevanja tijekom skladištenja. Prolazno povećanje TAC-a, uvjetovano kontinuiranom sintezom antioksidacijskih spojeva ili transformacijom postojećih spojeva u derivate veće antioksidacijske aktivnosti, što je uočeno i tijekom skladištenja jagoda (Sadowska-Bartosz i Bartosz, 2022).

Antioksidacijska aktivnost jagoda u in vitro testovima oksidacije povezana je sa sadržajem antocijana u voću. Provedena istraživanja izvijestila su da proantocijanidini jagode mogu

djelovati i kao antifungalni spojevi za produljenje roka trajanja i kao antioksidansi za poboljšanje očuvanja kvalitete (Fossen i sur., 2004).

Iako se jagode obično konzumiraju kao svježe voće, na tržištu su dostupne mnoge prerađevine poput sokova, nektara, pirea, džema i želea. Uobičajeni koraci obrade su koncentriranje voćnog soka, skladištenje u spremnicima, ponovno razrjeđivanje ili proizvodnja džema od jagoda zagrijavanjem pod vakuumom, punjenjem u boce, zatvaranjem pod vakuumom i hlađenje. Dokazano je da prerada voća utječe na antioksidacijske tvari. Općenito, studije su pokazale da je sastav proizvoda od jagoda smanjen u usporedbi sa svježim voćem, a stupanj smanjenja je strogo povezan s vremenom proizvodnje i koracima obrade, kao što je toplinska obrada. Ovi kriteriji mogu biti korisni za voćarsku industriju kako bi se izbjegli koraci prerade i tretmani proizvoda koji uvelike smanjuju kvalitetu izvornog voća (Giampieri i sur., 2012).

2.3. Mikrobiota jagoda

Mikrobiota prisutna na zdravim jagodama je složena i često uključuje nepoželjne mikroorganizme, kao što su mikroorganizmi koji mogu uzrokovati kvarenje, potencijalni biljni i humani patogeni i plijesni koje proizvode mikotoksine (Drobek i sur., 2021). Prisutnost, brojnost i raznolikost mikroorganizama ovisi o brojnim parametrima, uključujući ekofiziološke uvjete, geografski položaj, vremenske i klimatske uvjete, žetvu, transport i preradu i sl. Neke vrste plijesni i bakterija koje uzrokuju kvarenje češće nalazimo na jagodama, pa se mogu smatrati glavnim mikroorganizmima odgovornim za kvarenje. Među njima se ističe plijesan *Botrytis cinerea* koja se smatra glavnim fungalnim uzročnikom kvarenja jagoda u posliježetvenom razdoblju. Ostali važni fitopatogeni koje nalazimo na jagodama uključuju plijesni iz rodova *Mucor*, *Rhizomucor* (Lafarga i sur., 2019), *Verticillium*, *Phytophthora*, *Colletotrichum*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Aureobasidium* i *Cryptococcus* (Lafarga i sur., 2019).

Stanična stijenka ploda jagode sastoji se od visokog postotka polisaharida, otprilike 90 %, a najznačajniji su celuloza, hemiceluloza i tri skupine pektina. Gljivično kvarenje zasniva se na lučenju izvanstaničnih litičkih enzima kao što su celulaze, hemicelulaze i pektinaze, koji razgrađuju te polimere. Pri tom se oslobađaju voda i druge unutarstanične komponente biljke koje gljive koriste kao hranjive tvari za vlastiti metabolizam i rast, a enzimatska razgradnja dovodi do truljenja ploda (Hussein i sur., 2020). Skala za procjenu indeksa propadanja jagoda je prikazana u Tablici 6.

Tablica 6. Indeks propadanja jagoda

STUPANJ	0	1	2	3	4
Vizualne fotografije u različitim fazama					
Kvaliteta voća	Izvršno	Dobro	Prihvatljivo	Loše	Jako loše
Postotak raspadanja	0 %	0 %	<10 %	10 %-40 %	>40 %
Karpopodij	Zelena	Malo uvenuće	Suh i uvenuo	Suh i uvenuo	Suh i uvenuo
Čašica s peteljkom	Zelena	Zelena	Malo uvenuo	Suh i uvenuo	Suh i uvenuo
Plod	Svježe	Blago smežurano	Početak propadanja	Područje propadanja postaje veće	Ekstenzivno propadanje

Izvor: Wang i sur., 2021.

Stupanj 0: površina ploda bez mrlja od kvarenja i bolesti, jarko obojena čašica s peteljkom bez venuća; Stupanj 1: nema jasne truleži na površini ploda, mutna boja čaške s peteljkom i početak venuća; Stupanj 2: blago trula površina ploda, pri čemu trula površina čini manje od 10 % ukupne površine ploda; čaška s peteljkom mutne boje i očito venuće; Stupanj 3: jasno trula površina ploda, s trulom površinom koja čini 10 % do 40 % ukupne površine ploda; čaška s peteljkom mutne boje i očito venuće; Stupanj 4: jako trula površina ploda, s trulom površinom koja čini više od 40 % ukupne površine ploda; čaška s peteljkom mutne boje i jako venuće (Wang i sur., 2021).

Nadalje, Lafarga i sur. (2019) su dokazali da najzastupljeniji kvasci na površini jagoda koji mogu izazvati kvarenje pripadaju rodovima *Candida*, *Cryptococcus* i *Rhodotorula*. Drobek i sur. (2021) su pokazali da na samoj biljci jagode prevladavaju bakterijske populacije koje pripadaju rodovima *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus* i *Arthrobacter* te također mogu izazvati kvarenje.

S druge strane, na jagodama je dokazana i prisutnost oportunističkih patogenih bakterija kao što su *Rahnella aquatilis*, *Hafnia alvei*, *Chromobacterium violaceum* i neke vrste roda *Staphylococcus* koje ponekad uzrokuju bolesti kod ljudi, međutim većinom u imunosuprimiranih pojedinaca. Također, otkrivene su i gljive koje mogu uzrokovati bolesti u imunosuprimiranih ljudi, a uključuju *Cryptococcus neoformans*, *Candida famata* i *Candida inconspicua*. Osim potencijalno patogenih bakterija i gljiva, virusi su također veliki problem u svježim i prerađenim jagodama (uglavnom u smrznutim jagodama). Norovirus i virus hepatitisa A glavni su virusi koji se prenose hranom, a koji su povezani s konzumacijom

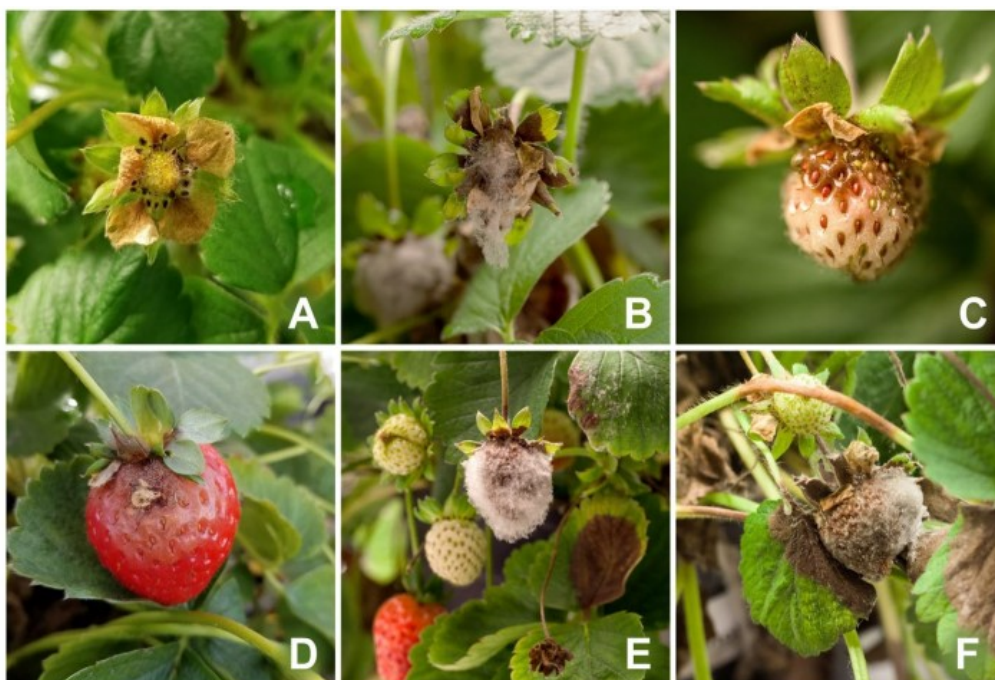
svježeg i smrznutog bobičastog voća diljem svijeta. Razno bobičasto voće sve se više prepoznaje kao prijenosnik crijevnih virusa.

Neke plijesni izoliranih iz jagoda, kao npr. *Penicillium* spp., *Alternaria* spp. i *Rhizopus* spp. poznati su kao potencijalni proizvođači mikotoksina. Međutim, malo je podataka poznato o prisutnosti mikotoksina u jagodama (Lafarga i sur., 2019).

2.3.1. *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea je fitopatogena gljiva koja pripada redu Ascomycota, porodici *Sclerotiniaceae* (Rhouma i sur., 2022). Uzročnik je sive plijesni i jedan od najvažnijih biljnih patogena u svijetu zbog štete koju uzrokuje na voću i povrću. Posebno, *B. cinerea* može lako zaraziti bobičasto voće, kao što su jagode, borovnice, maline, brusnice i borovnice, uzrokujući drastične gubitke nakon berbe (Santoyo i sur., 2023).

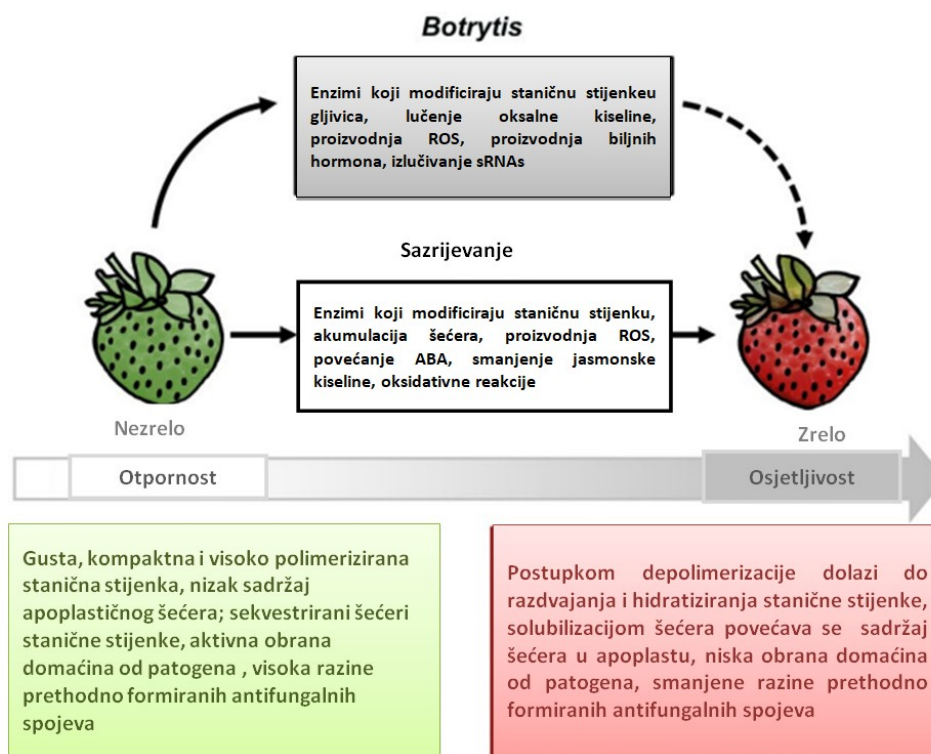
Plijesan *B. cinerea* ne pokazuje specifičnost prema domaćinu i klasificirana je kao nekrotrof, što znači da inficira biljku domaćina, raste na oštećenom mjestu ili starom tkivu i uzrokuje smrt tkiva, a hrani se isključivo mrtvim tkivom (Petrasch i sur., 2019). Ova plijesan može inficirati jagode u svim fazama razvoja što je prikazano na Slici 3. Mlado lišće koje tek raste može biti zaraženo ovim patogenom, ali ne pokazuje simptome jer gljivica ostaje u stanju mirovanja. Kada lišće sazri i počne starjeti i opadati, plijesan *B. cinerea* može postati aktivna i stvoriti karakterističnu sivu, baršunastu izraslinu na mrtvim dijelovima lista. Također, može kontaminirati cvijeće i uzrokovati bolest paleži cvjetova. Simptomatično cvijeće je smeđe s obojenim lezijama na laticama. Ako se bolest nastavi širiti kroz cvijet, *B. cinerea* uništiti će peteljku, uzrokujući da uvenuće cijelog cvijeta. U nekim slučajevima inficirani cvijet ne pokazuje simptome jer plijesan napada unutarnje tkivo cvijeta ili ostaje u stanju mirovanja. Nakon što se plodovi počnu razvijati, plijesan *B. cinerea* postaje aktivna i uzrokuje svjetlosmeđu trulež na kraju čaške mladog ploda. Zreli crveni plodovi su posebno osjetljivi na infekciju nakon fizičkog oštećenja, budući da se patogen prenosi zrakom, brzo ulazi u oštećeno tkivo i širi se cijelim plodom (Rhouma i sur., 2022).



Slika 3. Simptomi infekcije *Botrytis cinerea* (Slika A Ostarjeli cvijet uslijed rasta micelija *B. cinerea*. Slika B prikazuje uznapredovalu cvjetnu infekciju. Slike C i D prikazuju infekcije voća u različitim fazama. Slika D Zaražena latica može se vidjeti kao izvor zaraze ploda Slika E i F prikazuje posmeđivanje lišća uslijed infekcije *B. cinerea*)

Izvor: Petrasch i sur., 2019

Mehanizmi koji dovode do infekcije ploda i faktori koji utječu na infekciju još nisu u potpunosti razjašnjeni. Na Slici 4 prikazan je utjecaj procesa zrenja jagoda na infekciju *B. cinerea*. Proantocijanini (PA) induciraju mirovanje plijesni *B. cinerea* u nezrelom voću ograničavanjem aktivnosti gljivičnih enzima poput poligalakturonaze (PG) koji su neophodni za infekciju domaćina. Iako sadržaj proantocijanina u voću ostaje konstantan tijekom zrenja, pojačana polimerizacija proantocijanina smanjuje inhibiciju PG u zreloom voću. Također, antocijanini mogu odgoditi infekciju ili uzrokovati mirovanje *B. cinerea*. Na primjer, u jagodama osvijetljenim bijelim fluorescentnim svjetlom pronađen je povećani sadržaj antocijana i spriječen je razvoj sive plijesni (Petrasch i sur., 2019).



Slika 4. Utjecaj procesa zrenja na infekciju jagoda s plijesni *Botrytis cinerea*. Nezrelo voće predstavlja neprikladne uvjete za infekciju *B. cinerea*, dok zrelo voće pruža povoljno okruženje za rast patogena.

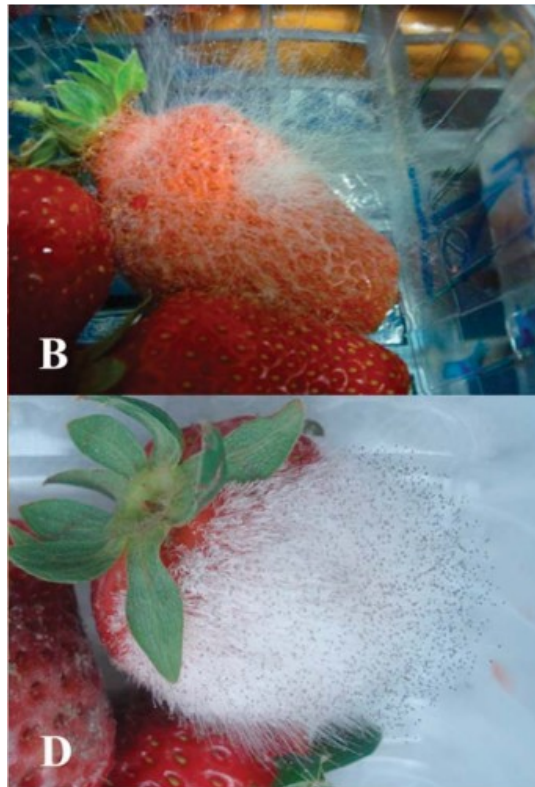
Izvor: Petrasch i sur., 2019

2.3.2. Meka trulež

Bolest poznata kao meka trulež, crna trulež ili curenje uzrokovana je rodom *Rhizopus* ili rodom *Mucor*. Ovakva vrsta truleži može biti razorna, budući da se gljivice mogu brzo širiti s jednog zaraženog voća na zdravo voće, što može rezultirati opsežnim kvarenjem. Vrsta *Rhizopus stolonifer* se smatra jednom od najbrže rastućih gljiva i ima široku lepezu domaćina koji je čine jednom od najdestruktivnijih gljiva (Feliziani i Romanazzi, 2016).

Rodovi *Mucor* i *Rhizopus* izgledaju vrlo slično i teško ih je razlikovati u polju (Slika 5). Međutim, pri promatranju zaraženog ploda povećalom, površina sporangija roda *Mucor* obložena je filmovima viskozne tekućine zbog čega izgleda ljepljivo, dok sporangiji roda *Rhizopus* djeluju suho (Feliziani i Romanazzi, 2016).

Rhizopus spp. i *Mucor spp.* prirodno se nalaze u tlu, biljnim ostacima i zraku. Njihovi mehanizmi širenja spora uključuju vjetar, zrak i neke beskralježnjake. Obično su plodovi jagode koji su bliže tlu podložniji mekoj truleži. Uzročnici meke truleži su saprofiti koji žive na ostacima usjeva i u tlu između sezona (Feliziani i Romanazzi, 2016).



Slika 5. Propadanje plodova jagode nakon berbe uzrokovano gljivicama *Rhizopus stolonifer* (B) i *Mucor* spp.(D)

Izvor: Feliziani i Romanazzi, 2016

Da bi došlo do infekcije vrstom *Rhizopus stolonifer* i *Mucor* spp., površina ploda obično mora biti oštećena. Nakon što je patogen ušao u ozlijeđeno tkivo, njegov se micelij vrlo brzo širi oko mjesta infekcije. Širenje *R. stolonifer* olakšavaju stoloni koji se s pomoću rizoida mogu pričvrstiti za površine obližnjeg zdravog ploda. Tijekom prvog dana infekcije mekom truležom, površina jagode može biti prekrivena tankom, pahuljastom gljivičnom strukturom poput pamuka. Na kraju sporulacije se formira tamna masa s crnim sporangijima na njihovim vrhovima, koja mogu prekriti cijelu površinu ploda. Međutim, glavni simptomi meke truleži su topljenje tkiva jagode, gubitak konzistencije i cijeđenje vode.

Simptomi infekcije uzrokovani su enzimskom aktivnošću različitih enzima, kao što su poligalakturonaza koja razgrađuje srednju lamelu stanične stijenke biljnih stanica i tzv. macerirajući enzimi (poligalakturonaza, ksilanaze, celulaze i amilaze) koji omekšavaju tkivo voća (Feliziani i Romanazzi, 2016).

2.3.3. Porodica *Enterobacteriaceae*

Porodica *Enterobacteriaceae* vrlo je heterogena i velika te obuhvaća više od 30 rodova i 120 različitih bakterijskih vrsta. Pripada redu *Enterobacterales* i razredu Gammaproteobacteria (Dahal, 2022). Bakterije iz ove porodice su gram negativne, asporogene, ravne štapićaste bakterije koje dobro rastu na umjetnim podlogama. Stanice su u prosjeku duge 2 - 4 μm u i široke 0,4 - 0,6 μm , sa zaobljenim krajevima. In vitro vrijeme razmnožavanja im je između 20 i 30 minuta. Neke vrste su nepokretne, a pokretne vrste pokreću se s pomoću peritrihnih

flagela (Ewing, 1966). S obzirom na potrebe prema kisiku su fakultativni anaerobi koji reduciraju nitrate u nitrite i fermentiraju glukozu uz nastanak kiseline ili kiseline i plina. Članovi porodice *Enterobacteriaceae* su široko rasprostranjeni u prirodi i često ih nalazimo u tlu, vodi i na biljkama. Također, mnoge žive u gastrointestinalnom traktu ljudi i životinja, uključujući i kukce, gdje mogu uzrokovati crijevne bolesti ili živjeti kao komenzalni organizmi. Zhang i sur. (2020) svojim istraživanjem su potvrdili da određeni rodovi iz porodice *Enterobacteriaceae* su dominantni u mikrobiomu jagode. Najzastupljenije vrste su pripadale rodu *Pantoea* sp., a među njima su se posebno isticale vrste *P. agglomerans* i *P. ananatis* koje mogu djelovati fitopatogeno, odnosno mogu uzrokovati truljenje biljaka, plamenjaču i odumiranje. S druge strane, posjeduje i pozitivne karakteristike kao što su sposobnost bioremedijacije, fiksacije dušika i poticanje rasta biljaka te antagonističko djelovanje prema drugim mikroorganizmima. Rabasco-Vílchez i sur. (2024) su također dokazali prisutnost roda *Pantoea* na plodu, nadzemnim dijelovima biljke, tlu, rizosferi i korijenu, a najzastupljenije vrste bile su *P. ananatis*, *P. punctata* i *P. agglomerans*. Drugi članovi porodice *Enterobacteriaceae* koji su zastupljeni u mikrobiomu jagoda pripadaju rodovima *Citrobacter*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Raoultella*, *Cronobacter* i *Rahnella*. Kod jagode navedeni rodovi uglavnom su smješteni na plodu i u nadzemnim dijelovima biljke, dok su rod *Citrobacter* i vrste *Leclercia Decarboxylate* i *Escherichia fergusonii* pronađene i u rizosferi. Bakterije iz porodice *Enterobacteriaceae* mogu biti obligatni ili oportunistički humani patogeni, a mnoge vrste su otporne na antibiotike koji se obično koriste u medicini. Kilonzo Nthenge i sur. (2018) su dokazali prisutnost sojeva *E. coli*, *Serratia liquefacians*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* i *Rahnella aquatilis* koji mogu izazvati teške infekcije, na svježem voću i povrću. Primjerice, *K. pneumoniae* je izolirana iz zelene salate, špinata, cilantra, rajčice i jagoda, *Shigella* spp. je pronađena u špinatu, a *Salmonella* spp. na rajčicama, jagodama i špinatu. S obzirom na to da se svježe voće i povrće često konzumira sirovo, kontaminacija svježeg voća i povrća enterobakterijama koje mogu izazvati bolesti kod ljudi predstavlja veliki zdravstveni problem. Rizik od kontaminacije je najveći tijekom tri razdoblja: u polju; tijekom početne obrade i u završnoj fazi pripreme u kuhinji. Na primjer, u polju prisutni stajski gnoj ili izmet divljih životinja mogu predstavljati izvor potencijalno patogenih enterobakterija, pa otjecanje kontaminirane vode tijekom kiša ili navodnjavanja može kontaminirati proizvode koji se uzgajaju na zemlji kao što su salata i jagode (Bhullar i sur., 2021). Također, Bhullar i sur. (2021) su pokazali da je *E. coli* zastupljenija na listu jagode nego na plodu. Ovo istraživanje ukazuje na važnost higijene ruku tijekom berbe, kao i uklanjanja lišća prije konzumacije jagoda i drugog voća s kojeg se lišće inače ne uklanja radi produženja roka trajanja. Nadalje, na jagodama se mogu razmnožavati patogene bakterije kao što su *Salmonella enterica*, *E. coli* O157:H7 i *Listeria monocytogenes*, a koje su uzrokovale nekoliko epidemija trovanja hranom (Rabasco-Vílchez i sur., 2024). Zbog svega navedenog nužno je pratiti prisutnost enterobakterija u svježim namirnicama.

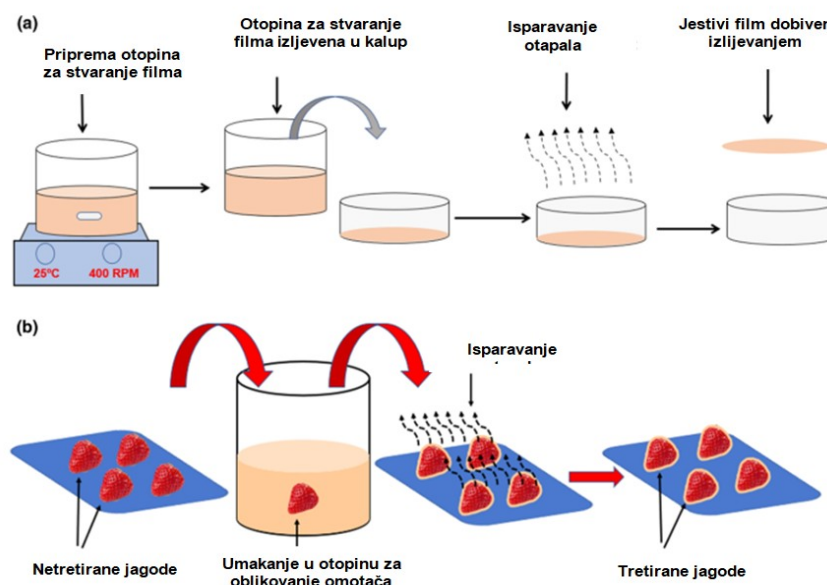
2.4. Jestivi omotači i filmovi

Jestivi film ili omotač je svaki materijal debljine manje od 0,3 mm koji je nastao kombinacijom biopolimera i različitih aditiva dispergirani u vodenom mediju. Jestivi omotač se formira direktno na hrani, dok se jestivi film prethodno napravi i zalijepi na proizvod. Unatoč tome, u oba slučaja formiraju se krute matrice sličnih karakteristika (Díaz-Montes i Castro-Muñoz, 2021).

Glavne karakteristike koje mogu imati jestivi filmovi i omotači: (i) zaštita od UV, (ii) prijenos otopljenih tvari (npr. soli, aditiva i pigmentata), vodene pare, organskih para (npr. aroma i otapala) i plinova (npr. kisika, ugljičnog dioksida, dušika i etilena) između hrane i atmosfere; (iii) barijera protiv mehaničkih oštećenja (npr. udubljenja ili posjekotine); (iv) povećani rok trajanja proizvoda, (v) bioaktivne komponente (npr. antioksidansi); (vi) antimikrobni učinak protiv razmnožavanja bakterija i gljivične kontaminacije (npr. nanočestice srebra); (vii) potaknuti rast poželjnih mikroorganizama (npr. probiotici) koji donose dobrobiti potrošaču; i (viii) biorazgradivi prirodni materijali (Díaz-Montes i Castro-Muñoz, 2021).

2.4.1. Materijali za jestive filmove i omotače

Jestivi filmovi i omotači koriste se kao materijal za pakiranje kako bi se smanjio učinak konvencionalnog materijala za pakiranje koji nije biorazgradiv na okoliš. Potražnja potrošača također pokazuje sve veći trend prema obnovljivim i ekološkim materijalima za pakiranje. Na Slici 6 prikazane su koraci pripreme jestivih filmova i omotača.



Slika 6. Različite metode koje se koriste za pripremu jestivih filmova i omotača; a) više koraka uključenih u metodu izlijevanja za stvaranje jestivog filma; b) metoda uranjanja za nanošenje jestivog omotača na plodove jagoda

Izvor: Kumar i sur., 2021

Jestivi filmovi izrađuju se izlivanjem, a proces ekstruzije i oblaganja jestive otopine vrši se uranjanjem i raspršivanjem. Razlika je u tome što je u jestivoj foliji čvrsti jestivi laminat omotan oko prehrambenih proizvoda. Nasuprot tome, jestiva otopina za oblikovanje omotača se nanosi na prehrambeni proizvod. Ovi materijali za pakiranje trebaju biti jestivi i trebaju imati sposobnost stvaranja filma i omotača. Polisaharidi, proteini i lipidi su takvi materijali koji mogu formirati kontinuirane filmove i omotač se nanosi izravno na površinu prehrambenog proizvoda. Jestivi omotači izrađeni su od biorazgradivih materijala kao što su polisaharidi, proteini ili lipidi (Kumar i sur., 2021).

2.4.1.1. Metode izrade jestivih filmova

Jestive folije omotane su oko površine hrane i služe kao primarna jestiva ambalaža. Topljivost aditiva s biopolimerom je presudan faktor kako bi aditivi mogli služiti svojoj svrsi. Kohezijske sile između biopolimera utječu na ukupna mehanička svojstva filma. Jestive folije mogu se dobiti uglavnom dvama procesima – metodom mlijevanja (mokrom) i metodom ekstruzije (suhom) (Kumar i sur., 2021).

2.4.1.2. Metode nanošenja jestivih omotača

Jestivi omotač kao primarna jestiva ambalaža nanosi se izravno na površinu voća, povrća i drugih prehrambenih proizvoda. Postoje četiri primarne tehnike nanošenja omotača – uranjanje, raspršivanje, fluidizirani sloj i panning za nanošenje. Odabir metode premazivanja ovisi o nekoliko čimbenika, uključujući svojstva površine prehrambenog proizvoda i namjenu sloja omotača. Prilikom stvaranja omotača, prvo se materijali rasprše po površini hrane, a nakon toga dolazi do prijanjanja između materijala za omotač i površine hrane (Kumar i sur., 2021).

- ✚ **Metoda uranjanja** najčešće se koristi kod voća i povrća. Ova metoda se može podijeliti u tri faze. Prva je potpuno uranjanje prehrambenog proizvoda u otopinu za stvaranje omotača. Nakon toga, materijal za oblaganje se taloži na površini prehrambenog proizvoda. U posljednjem koraku, otapalo isparava iz omotača, stvarajući otopinu, ostavljajući tanki sloj na površini proizvoda. Isparavanje otapala može se dogoditi na sobnoj temperaturi ili uz pomoć topline. Svježe rezano voće umočeno u vodenu ovojnicu, stvara otopinu s antimikrobnom aktivnosti. Metodom uranjanja vrši se premazivanje kitozonom smrznute ribe lososa. Ovaj omotač sprječava rast patogenih mikroorganizama i produljuje rok trajanja ribe. Oblaganje alginatom s uranjanjem u jabučnu kiselinu izvodi se na svježe narezanom mangu. Ovaj omotač povećava čvrstoću premazanih prehrambenih proizvoda i smanjuje pogoršanje kvalitete tijekom skladištenja (Kumar i sur., 2021).
- ✚ **Metoda prskanja** u njoj se tekuća otopina raspršuje na prehrambeni proizvod. Prskanje tekućine pretvara tekuću otopinu u sitne kapljice. Za istu količinu tekuće otopine, te će kapljice imati veću površinu. Stoga će kapljice prekriti više područja proizvoda. Na temelju formiranja kapljica, ova se metoda može podijeliti na raspršivanje zrakom i raspršivanje pod pritiskom. Kod raspršivanja zračnim

raspršivačem, zrak velike brzine se koristi za pretvaranje tekućine u kapljice, a kod raspršivanja pod pritiskom, visoki tlak se koristi za pretvaranje tekućine u kapljice. Ova metoda ima veliki nedostatak jer se visoko viskozni biopolimer ne može raspršiti. Za biopolimer visoke viskoznosti poželjna je metoda uranjanja (Kumar i sur., 2021).

- ✚ **Metoda pomicanja** je pogodna za stvaranje omotača kod konditorskih proizvoda. Mnoštvo prehrambenih proizvoda okruglog ili ovalnog oblika može se obložiti u jednoj seriji ovom metodom. Velika okrugla lopta poznata kao tava se okreće, a unutar nje se okreću prehrambeni proizvodi. Otopina koja stvara omotač raspršuje se po površini prehrambenog proizvoda, dok se tava vrti. Količina raspršene otopine određuje debljinu završnog omotača na prehrambenom proizvodu. Uz pomoć cirkulacije zraka, otapalo isparava, a omotač se suši (Kumar i sur., 2021).
- ✚ **Metoda obrade** u fluidiziranom sloju pomaže u nanošenju tankog sloja omotača na vrlo malu površinu suhog prehrambenog proizvoda poput pšenice ili orašastih plodova. Otopina za stvaranje omotača raspršuje se uz pomoć mlaznica, a to pomaže da hrana manje veličine teče raspršenom otopinom. Otopina počinje stvarati ljusku na hrani koja se polako pretvara u ovojnica. Nakon toga se vrši sušenje. Ova metoda je skuplja od drugih metoda stvaranja omotača. Ovaj proces smanjuje mogućnost aglomeracije i pomaže u smanjenju brzine otpuštanja aktivnih spojeva (Kumar i sur., 2021).

2.4.2. Kitozan

Hitin je biološki materijal koji je jedan od najprisutnijih prirodnih spojeva u prirodi. To je linearni homopolisaharid visoke molekularne težine, sastavljen od ponavljajućih jedinica ostataka N-acetil-D-glukoamina, koji se drže zajedno s pomoću β -(1-4) veze. Hitin se može naći u beskralježnjacima poput insekata, račića, rakova (Reshadi sur., 2021) i stanične stijenke gljiva (*Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, *Phycomycetes*, *Aspergillus niger*, *Mucor rouxii*, *Penicillium notatum*, *Trichoderma reesi*) (Pellis i sur., 2022).

U školjkarstvu, dijelovi glave i kože (egzoskelet) školjkaša odvajaju se od mesa i uzima se samo meso. Egzoskelet se tretira kao biološki otpad. Otprilike 45-55 % sirovih račića odbacuje se kao otpadni proizvod tijekom postupka obrade. Prema istraživanja, rakovi mogu sadržavati vrlo značajan udio ukupne težine oklopa ili egzoskeleta. Zbog toga se svake godine gube znatne količine školjaka i hitinskih spojeva (Reshadi sur., 2021).

Kitozan, jedini prirodni alkalni polisaharid, biorazgradiva je makromolekula. Ima izvrsne izgleda za primjenu u poljoprivrednoj proizvodnji zahvaljujući svojoj netoksičnosti, niskoj cijeni i visokoj učinkovitosti među ostalim prednostima. Tretman egzogenim kitozonom povećava antioksidativni kapacitet ubranog voća (npr. borovnice, jagode i kivi) pomažući u održavanju njihove kvalitete (Wang i sur., 2021).

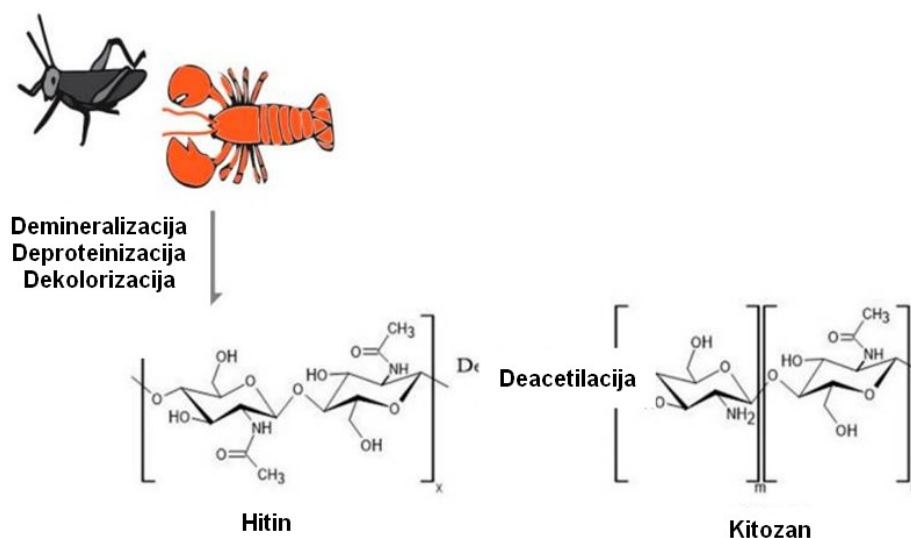
Kitozan nije poput biljnih vlakana (kao celuloza). Kitozan sadrži pozitivan ionski naboj i iz tog razloga, može se vezati s negativno nabijenim tvarima kao što su negativno nabijene masti, ioni, lipidi, kolesterol, proteini itd. (Reshad i sur., 2021).

Kitozan je derivat hitina koji se može dobiti djelomičnom deacetilacijom. Za proizvodnju kitozana mogu se primijeniti kemijske ili biološke metode. Biološki proces proizvodnje hitina

je ekološki prihvatljiviji, isplativiji (ovisno o mikroorganizmu koji se koristi), ima izvrsnu učinkovitost dekalifikacije (do 86 %) i visoku viskoznost od kemijske metode. Prirodni način također smanjuje zaostale proteine u ljusci rakova. Studije su potvrdile da se biološkim procesom dobiva kitozan veće kvalitete od onog dobivenog kemijskim procesom (Reshadi sur., 2021).

2.4.2.1. Proizvodnja kitozana kemijskom metodom

Glavni koraci uključeni u proizvodnju kitozana su ekstrakcija i pročišćavanje hitina iz egzoskeleta rakova. Glavne faze proizvodnje kitozana su demineralizacija, deproteinizacija i deacetilacija (Slika 7). Za proizvodnju kitozana iz ljuski račića, otpaci rakova isprva se uzimaju iz industrije prerade račića, a obavljaju se pranje i sušenje kako bi se dobio otpadni prah račića. Zatim se nekoliko sati provodi predtretman salicilnom kiselinom. Nakon predtretmana slijedi postupak demineralizacije koji se provodi s pomoću klorovodične kiseline. Ovaj korak se izvodi za pretvorbu netopljivog kalcijevog karbonata u topljivi kalcijev klorid, koji se lako može ukloniti vodom u kasnijim fazama. Nakon koraka demineralizacije, provodi se korak deproteinizacije, gdje se koristi natrijev hidroksid (NaOH). Koncentracije NaOH također mogu varirati ovisno o vrsti rakova. Ovaj korak uklanja sadržaj proteina iz otpada od škampi, a proizvodi se hidrolizat proteina, odvojen filtracijom. Ovaj proteinski hidrolizat može se koristiti kao proteinski dodatak. Nakon demineralizacije i deproteinizacije ostaje hitin i minimalna količina proteina i drugih tvari. Deacetilacijom se hitin pretvara u kitozan. Proces uključuje uklanjanje acetilnih skupina vezanih za amino skupinu kako bi se izložio $-NH_2$ skupine. Stupanj acetilacije hitina značajan je parametar koji utječe na biološka, fizikalno-kemijska i mehanička svojstva te važan parametar koji određuje njegovu klasifikaciju u hitin ili kitozan. Proces deacetilacije rezultira polimerom koji sadrži N-acetilglukozamin i jedinice glukozamina. Ako se deacetilacijom dobije polimer s $>50\%$ N-acetilglukozaminske jedinice, još uvijek se naziva hitin ako je niža vrijednost naziva se kitozan. Dakle, deacetilacija ne utječe samo na kiselo-bazno ponašanje, elektrostatske karakteristike, biorazgradivost, samoagregaciju, topljivost, sorpcijska svojstva, sposobnost keliranja metalnih iona među mnogim drugim svojstvima, već također određuje njegovu klasifikaciju i utječe na njegovu prikladnost za specifične primjene (Reshad i sur., 2021).



Slika 7. Proces proizvodnje kitozana počevši od različitih izvora.

Izvor: Bandara i sur., 2020

2.4.2.2. Proizvodnja kitozana biološkom metodom

Biološki proces proizvodnje kitozana je superiorniji od kemijskog procesa jer je proces ekološki prihvatljiv, isplativ i idealan za kemijsku metodu. U biološkom procesu mogu se koristiti dva načina. Jedan način je enzimska metoda, a drugi je fermentacija. Enzimski proces se provodi na isti način kao i kemijska metoda. Međutim, jedina razlika je u tome što se enzimi poput papaina, tripsina, alkalaze i pepsina koriste umjesto raznih kemikalija u koracima deproteinizacije i demineralizacije. Međutim, potrebno je provesti dodatne korake, poput inaktivacije enzima, nakon čega slijedi centrifugiranje. Centrifugiranjem se odvoje protein u supernatantu i hitin u talogu. Kuglica se ispiri vodom, etanolom i acetonom, redom, kako bi se dobio čisti hitin. S druge strane, supernatant se prvo obezboji upotrebom drvenog ugljena, zatim se filtrira, neutralizira natrijevom lužinom i liofilizira, čime se dobiva proteinski hidrolizat. Nakon inkubacije od 2-3 dana, filtrat se odvaja filtratom koji sadrži proteine. S druge strane, ostatak se skuplja, a ostatak sadrži uglavnom hitin. Zatim, nakon pranja, hitin se deacetilira da bi se dobio kitozan (Reshad i sur., 2021).

2.4.2.3. Primjena kitozana

Kitozan pokazuje niz fizikalno-kemijskih i bioloških svojstava koja mu omogućuju širok raspon primjene u hrani. Može se primijeniti u svom izvornom obliku ili modificiranom obliku dobivenom fizički ili kemijskim postupkom kako bi se stvorila nova svojstva i funkcije (Cheba, 2020).

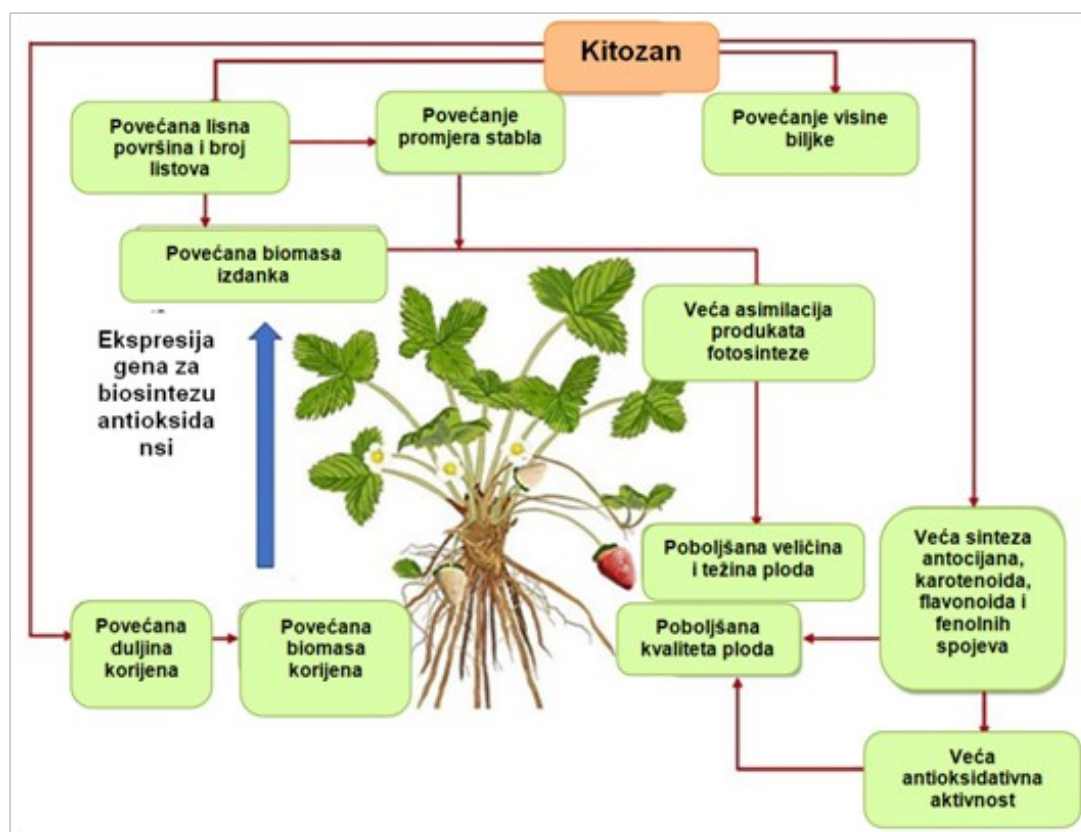
Kitozan je naširoko korišten kao sredstvo za oblaganje raznog voća i to uglavnom za zaštitu od mikrobne infekcije nakon berbe (Rahman i sur., 2018). Iz nekoliko je studija objavljeno da kitozan ima dobro antimikrobno djelovanje. Antibakterijske aktivnosti uočene su kod raznih vrsta bakterija poput *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*,

Bacillus megatherium, *Lactobacillus bulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio parahaemolyticus* (Reshad i sur., 2021).

Mehanizmi antimikrobnog djelovanja kitozana kao i hitina još uvijek su uglavnom nepoznati. Jedna od najprihvaćenijih pretpostavki opisuje da je pozitivno nabijena amino skupina odgovorna za pružanje antimikrobnih aktivnosti kitozana. Pozitivno nabijena amino skupina stupa u interakciju s negativno nabijenom staničnom membranom mikroorganizama. Ova interakcija uzrokuje istjecanje raznih proteina i drugih staničnih komponenti mikroorganizama. Djelovanje kitozana protiv plijesni uočeno je na *Botrytis cinerea*, *Pyricularia oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *Trichophyton equinum* i kod drugih vrsta plijesni. Kitozan može pokazati različite mehanizme u inhibiciji gljivica. Na primjer, kitozan može inhibirati sintezu proteina *Saccharomyces cerevisiae* te utječe na unutarstanične ultrastrukture i integritet membrane *Candida albicans*, čime se inhibiraju dvije vrste kvasaca. Na antimikrobno svojstvo utječu pH i molekularna težina. pH ima obrnuti učinak na antimikrobna svojstva kitozana (Reshad i sur., 2021).

Kitozan ima primjenu u raznim područjima, od poljoprivrede do biotehnoloških i nanotehnoloških disciplina (Pellis i sur., 2022). Malo je studija o pozitivnim učincima prskanja kitozana u reproduktivnom stadiju jagode što značajno povećava (do 2,5 puta) sadržaja antioksidansa u svježe ubranim plodovima jagoda.

Rahman i sur. (2018) dokazali su da je folijarna primjena kitozana značajno povećala rast i prinos ploda s poboljšanjem svojstava ploda korisnih za ljudsko zdravlje induciranjem veće proizvodnje ukupnih antioksidansa, flavonoida, fenola, karotenoida i antocijana. Predlažu daljnje studije o razjašnjavanju mehanizama kitozana uključenog u rast, prinos i povećanje biokemijskog sadržaja u jagodama (Slika 8). Međutim, rezultati iz trenutne studije pokazuju da kitozan kao biostimulans dobiven iz prirodno bogatog hitina rakova i staničnih stijenki gljiva se može koristiti kao ekološki prihvatljivo sredstvo za održivu proizvodnju visokokvalitetnih jagoda bez ili malo dodatne upotrebe skupih sintetičkih sredstava.



Slika 8. Hipotetski put stimulacije uroda i nakupljanja antioksidansi u plodu jagode folijarnom primjenom kitozana

Izvor: Rahman i sur., 2018

Kitozan i njegovi derivati mogu se koristiti za uklanjanje raznih zagađivača iz okoliša. Zagađivači mogu biti anorganskog i organskog podrijetla. Na primjer, nitratne zagađivače moguće je eliminirati polietilen glikolom i polivinil-acetatom u kombinaciji s kitozonom. Dok je fosfate moguće ukloniti kitozonom na kojem je imobiliziran Cu(II) itd. Kod onečišćenja bojama poput metilen plavog i metil ljubičastog također se mogu ukloniti s pomoću kitozana. Pesticidi poput glifosata mogu se eliminirati iz okoliša s pomoću kompleksa kitozan-alginat. Studije su potvrdile da kitozan ima sposobnost uklanjanja iona teških metala iz okoliša (Reshad i sur., 2021).

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1. Biljni materijal

Za potrebe istraživanja korištene su jagode sorte 'Albion' (lat. *Fragaria × ananassa* Duch.) ubrane (22. svibnja 2023.) iz plastenika privatne tvrtke Jagodar-HB u Donjoj Lomnici, Zagrebačka županija, Hrvatska. To je hibridna sorta uzgojena u Kaliforniji križanjem sorte 'Diamante' i Cal 94.16-1 (Strawberry, 2022). Sorta je neutralnog dana. Oblik ploda 'Albion' može varirati, ali je obično dugačak i simetrično stožast. Prosječna težina bobica je 33 g (Shaw i Larson, 2005). Albion ima savršeno crvenu boju i prihvatljivo je dobrog okus pri potpunoj zrelosti. Otporna je na verticilozno uvenuće, a umjereno je osjetljiva na pepelnicu i antraknozu (Lantz i Swartz, 2010). Plodovi su odmah prebačeni u laboratorij (Slika 9). Komina jabuke prikupljena je od različitih lokalnih proizvođača u Zagrebačkoj županiji.



Slika 9. Jagoda sorte 'Albion'

3.1.2. Popis korištenih kemikalija

- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)
- Folin-Ciocalteu reagens, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)
- Galna kiselina, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)
- Kitozan (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Klorovodična kiselina (Kemika, Zagreb)
- Limunska kiselina (Kemika, Zagreb)
- Metanol, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

3.1.3. Priprema jestivih omotača

✚ Priprema vodenog ekstrakta jabučne komine

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom je svestrana, fleksibilna i učinkovita tehnika koja se koristi za ekstrakciju bioaktivnih spojeva zbog svoje visoke ponovljivosti, a vrlo je cijenjena zbog smanjenje potrošnje otapala. Primjena ultrazvuka uzrokuje imploziju kavitacijskih mjehurića otapala, što dovodi do poremećaja membrana biljnih stanica. Ovim postupkom olakšava se prodiranje otapala u stanice, čime se poboljšava prijenos mase i povećava otpuštanje bioaktivnih spojeva (Quintana i sur., 2020).

Za pripremu otopine jabučne komine koristila se liofilizirana jabučna komina (Slika 10). Prije početka analize liofilizirani uzorak potrebno je usitniti u prah s pomoću mlinca za mljevenje, a nakon usitnjavanja slijedi postupak prosijavanja (Slika 11). Za prosijavanje koristi se sito promjera 450 μm .



Slika 10. Liofilizirana jabučna komina



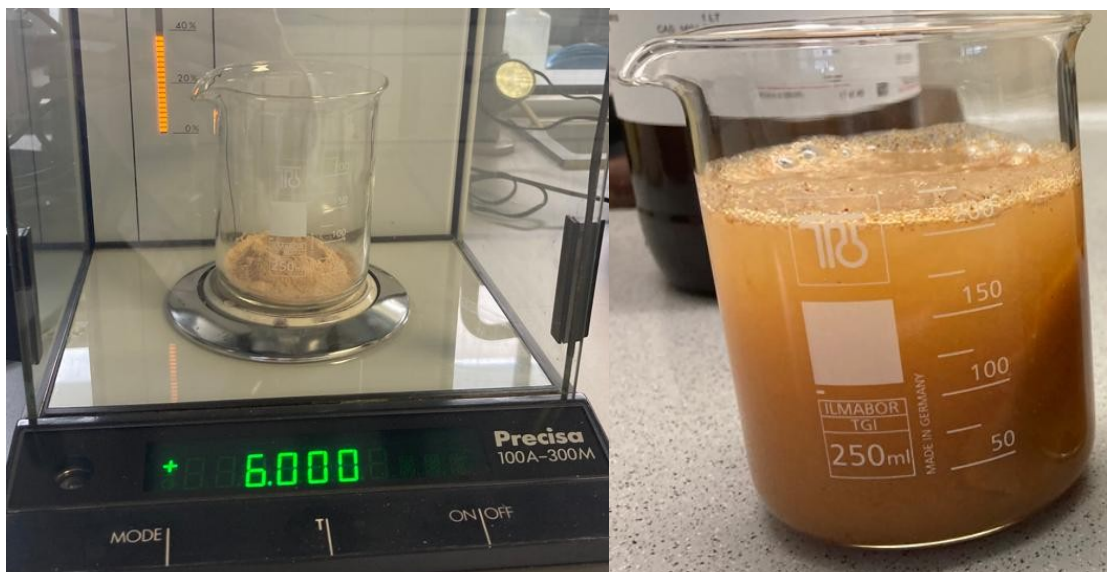
Slika 11. Samljeveni uzorak liofilizirane jabučne komine

Za izradu otopine jabučne komine koristi se prosijani dio čestica promjera <450 nm. Uzorci se prebace u prozirnu vrećicu i stavljaju se na čuvanje u tamni prostor (Slika 12).



Slika 12. Prosijani dio čestica promjera <450 μm (desno) i dio čestica promjera >450 nm (lijevo)

Otopina jabučne komine pripravljena je otapanjem 6 g samljevene liofilizirane jabučne komine u 200 mL destilirane vode (Slika 13).



Slika 13. Priprema otopine jabučne komine

Homogeniziranje otopine provodi se s Ultrasonic homogenizatorom UP200St pri amplitudi 75 % u trajanju od 15 minuta (Slika 14). Nakon što se otopina ohladi, slijedi postupak vakuum filtracije s obzirom na to da se upotrebom vakuuma ubrzava filtracija.



Slika 14. Postupak homogeniziranja

Za vakuum filtraciju koristi se tikvica od 1000 mL od borosilikatnog stakla za skupljanje filtriranog uzorka, Buchnerov lijevak, filter papir, vakuum pumpa Rocker 300-680 mmHg (106 mbar) što je prikazano na Slici 15.



Slika 15. Postupak vakuum filtracije

✚ Priprema otopina kitozana i jabučne komine

U čašu se odvaže 4 g limunske kiseline te se doda 200 mL pripremljene otopine jabučne komine (6 g uzorka mljevene liofilizirane jabučne komine+ 200 mL destilirane vode) te se stavlja na zagrijavanje. Nakon što se limunska kiselina otopi doda se 2 g kitozana uz stalno miješanje na miješalici oko 1 h. Nakon toga, dobivene otopine su ostavljene da se ohlade na sobnoj temperaturi.

3.1.4. Puferi i hranjive podloge za mikrobiološke analize

✚ Puferirana peptonska voda

U ovom istraživanju puferirana peptonska voda (0,1 % m/V) korištena je za pripremu serije razrjeđenja za određivanje ukupnog broja aerobnih mezofila i psihrotrofa, enterobakterija te kvasaca i plijesni. Pripremljena je suspendiranjem 1,0 g peptona (Biolife, Italija) i 0,5 g natrij klorida (NaCl, VWR Chemicals, Belgija) u 1000 mL destilirane vode i sterilizirana autoklaviranjem na 121 °C/15 min. Nakon sterilizacije otpipetirano je točno 9 mL sterilne peptonske vode u sterilne epruvete.

✚ PCA čvrsta podloga (eng. *Plate Count Agar*)

PCA čvrsta podloga (Biolife, Italija) je neselektivna podloga koja je korištena za određivanje ukupnog broja aerobnih mezofilnih i psihotrofnih bakterija. Pripremljena je suspendiranjem 23,5 g podloge u 1000 mL destilirane vode. Suspenzija je zagrijavana uz često miješanje do potpunog otapanja podloge. Po 15 mL PCA podloge otpipetirano je u epruvete i sterilizirano autoklaviranjem na 121 °C/15 minuta. Do analize, PCA podloge su držane u vodenoj kupelji na 45 °C kako bi se spriječila prijevremena polimerizacija.

✚ VRBG čvrsta podloga (eng. *Violet Red Bile Glucose Agar*)

VRBG čvrsta podloga (Biolife, Italija) je selektivna podloga koja je korištena za određivanje brojnosti bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae*. Pripremljena je otapanjem 41,5 g podloge u 1000 mL destilirane vode. Zagrijana je do vrenja uz povremeno miješanje do potpunog otapanja podloge. Nakon toga, po 10 ili 5 mL je sterilno otpipetirano u sterilne epruvete. VRBG podloge su čuvane u vodenoj kupelji na 45 °C kako bi se spriječila prijevremena polimerizacija.

✚ DRBC čvrsta podloga (eng. *Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar*)

DRBC čvrsta podloga (Biolife, Italija) je selektivna podloga koja je korištena za određivanje brojnosti kvasaca i plijesni. Pripremljena je otapanjem 15,8 g podloge u 500 mL destilirane vode te zagrijavana do potpunog otapanja podloge. Zatim je podlozi dodan kloramfenikol otopljen u mješavini destilirane vode i etanola u omjeru 1:1. Konačna koncentracija kloramfenikola u podlozi je iznosila 100 mg/mL. Podloga je sterilizirana autoklaviranjem na 121 °C/15 min te ohlađena na 45 °C u vodenoj kupelji. Nakon hlađenja po 15 mL podloge je

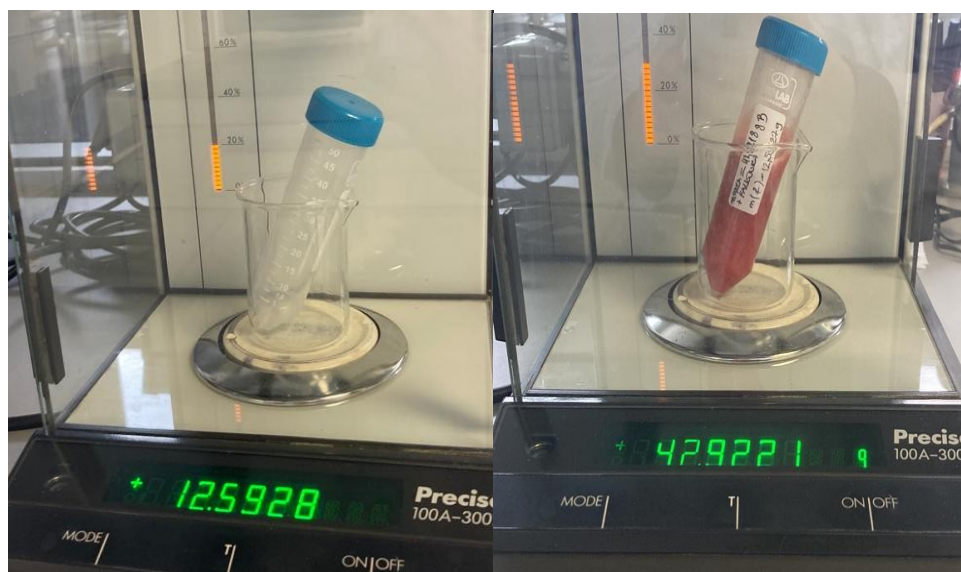
sterilno otpipetirano u prazne Petrijeve zdjelice i ostavljeno da polimerizira na sobnoj temperaturi.

3.2. Metode

3.2.1. Priprema uzoraka za analizu

Plodovi jagode nasumično su podijeljeni u tri skupine (kontrola, kitozan i kitozan+ ekstrakt jabučne komine) po 3 poduzorka za svaku skupinu, ukupno devet uzoraka. Plodovi su vizualno pregledani te su za tretmane odabrani plodovi bez fizičkih oštećenja uzimajući u obzir sličnost u obliku, boji i veličini. Prije nanošenja omotača, odabrane jagode isprane su u vodi i zatim pohranjene 1 sat na sobnoj temperaturi kako bi se osiguralo potpuno isparavanje vode. Kontrolni uzorci sastojali su se od plodova bez omotača. Jestivi omotači primijenjeni su na plodove jagoda metodom uranjanja. Plodovi jagoda umočeni su u otopinu, a zatim su sušeni na sobnoj temperaturi 1 h kako bi se uklonio višak otopine s površine ploda. Nakon sušenja, svi uzorci plodova jagode pohranjeni su u hladnjaku na 4 °C. U periodu od devet dana provodili su se kemijske i mikrobiološke analize.

Prije provedbe analize uzorke jagoda potrebno je usitniti. Iz jedne skupine odabrana su po 3 reprezentativna uzorka u tri ponavljanja te su štapićnim mikserom usitnjeni. Dobiveni pire prebaci se u prethodno izvaganu plastičnu falkonicu volumena 50 mL te se izvaže na analitičkoj vagi (Slika 16).



Slika 16. Vaganje prazne i pune plastične falkonice

Potom se stavljaju na centrifugiranje 20 minuta na 9000 rpm. Nakon centrifugiranja dobiveni ekstrakt potrebno je filtrirati. Na slici 17 prikazan je pire prije i poslije centrifuge. Dobiveni filtrat, to jest sok prebaci se u prethodnu izvaganu falkonicu volumena 14 mL (Slika 18). Na analitičkoj vagi izvaže se masa soka i masa pirea nakon centrifugiranja. Sok se razrijedi po potrebni za daljnju analizu.



Slika 17. Pire prije (lijevo) i nakon centrifuge (desno)

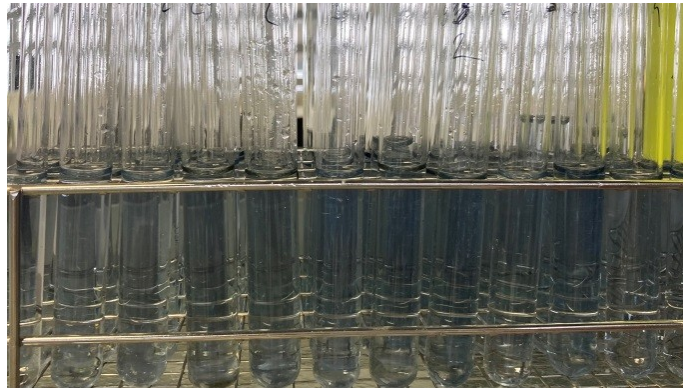


Slika 18. Dobiveni sok nakon filtriranja

3.2.2. Određivanje ukupnog sadržaja polifenola

Ukupni sadržaj polifenola (eng. *Total Polyphenolic Content*, TPC) ekstrakta jagode određen je Folin–Ciocalteu metodom. Folin–Ciocalteuov reagens, mješavina je fosfovolfram ($H_3PW_{12}O_{40}$) i fosfomolibdenske ($H_3PMo_{12}O_{40}$) kiseline, reducira se u plave okside volframa (W_8O_{23}) i molibdena (Mo_8O_{23}) tijekom oksidacije fenola. Ova se reakcija odvija u alkalnim uvjetima koje osigurava natrijev karbonat. Intenzitet plave boje odražava količinu polifenolnih spojeva, koja se može mjeriti pomoću spektrofotometra (Slika 19). U epruvetu se otpipetira 100 μ L uzorka i 7,9 mL destilirane vode. Zatim je 0,5 mL svakog uzorka uneseno u epruvete i pomiješano s 500 μ L razrijeđenog Folin- Ciocalteu reagensa u omjeru s vodom 1:2 i 1,5 mL 20 % natrijevog karbonata. Sadržaj u epruveti se vorteksira i ostavi stajati 2h na

sobnoj temperaturi prije očitavanja apsorbancija na 765 nm s pomoću UV/Vis spektrofotometra (Shimadzu, UV-1700, Japan). Za izradu standardne krivulje korištena je galna kiselina (0-100 mg/L), a rezultati su izraženi kao mg GAE/L soka jagode.



Slika 19. Dokazivanje prisutnosti polifenola u uzorcima

3.2.3. Određivanje ukupnih antocijana

Antocijani su određeni mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini 525 nm na UV-Vis spektrofotometru (Shimadzu, UV-1700, Japan). Ekstrakt soka jagode se razrijedi vodenom otopinom etanola i klorovodične kiseline (etanol:voda:HCl, 70:30:1, v/v). Dokaz prisutnosti antocijana u uzorcima je pojava narančaste boje (Slika 20). Ukupni antocijanini (eng. *Total Anthocyanin Content*, TAC) izraženi su mg cijanidin-3-glukozida/L soka jagode.

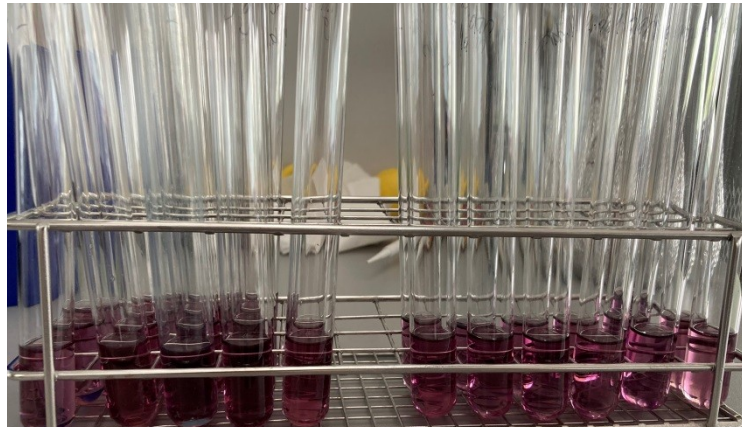


Slika 20. Dokazivanje prisutnosti antocijana u uzorcima soka od jagode

3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Antioksidacijski kapacitet jagode određen je s pomoću 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) prema poznatim postupcima. Napravi se smjesa tako da se otopi 0,0037 g DPPH u 100 mL metanola. Smjesa se snažno protrese i ostavlja preko noći u hladnjaku zamotano folijom te se izmjeri A_{515} . U epruvetu se doda 100 μ L uzorka ekstrakta soka jagode i volumen od 3,9 mL metanolne otopine DPPH (0,094 mmol/dm³). Kapacitet uzorka za hvatanje slobodnih radikala određen je mjerenjem na 515 nm korištenjem UV-Vis spektrofotometru (Shimadzu, UV-

1700, Japan) nakon 30 minuta u odnosu na slijepu probu. Antioksidacijski kapacitet izražen je kao mmol TE/L soka jagode.



Slika 21. Reakcijska smjesa uzorka i otopine DPPH

3.2.5. Određivanje ukupnih proteina

Ukupna količina proteina (eng. *Total proteins*, TP) određena je metodom po Lowry-u koja se najčešće koristi za određivanje količine proteina sadržanih u biološkim ili kromatografskim otopinama (Niamke i sur., 2006). Određivanje proteina provodi se mjerenjem s 5 uzoraka različite koncentracije u rasponu od 0,02 do 0,1 mg/mL. Za svaki uzorak potrebno je napraviti 3 paralelne probe, a za cijelu seriju mjerenja slijepu probu koja umjesto otopine proteina sadrži 0,4 mL destilirane vode. Za pripremu reagensa C potrebno je napraviti prethodno reagens A (otopina 2 % Na_2CO_3 u 0,1 M NaOH) i reagens B (0,5 % $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ u 1% $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4\text{H}_2\text{O}$). U epruvetu se doda volumen od 0,4 mL otopine proteina i 2 ml reagensa C. Sadržaj u epruveti promiješa se i ostavi na sobnoj temperaturi 10 do 15 minuta. Zatim se naglo doda 200 μl Folin-Ciocalteu reagensa (komercijalni reagens razrijeđen destiliranom vodom u omjeru 1:2) uz snažno miješanje vortexom. Smjesa je još jednom protresena i ostavljena da odstoji na sobnoj temperaturi 40 do 60 minuta da se omogući razvoj plavoljubičastog obojenja. Apsorbancija smjesa mjerena je pri 740 nm na UV-Vis spektrofotometru (Shimadzu, UV-1700, Japan). Ove apsorbancije su dalje pretvorene u postotak varijacije količine proteina u odnosu na apsorbanciju smjese.

3.2.6. Mikrobiološke analize

Mikrobiološke analize obuhvaćale su određivanje ukupnog broja aerobnih mezofila (AOAC officialmethod 990.12), aerobnih psihotrofa (Brasil i sur., 2012), enterobakterija (AOAC officialmethod 991.14) i kvasaca i plijesni (AOAC officialmethod 997.02) prisutnih na netretiranim i tretiranim jagodama i u jestivim omotačima. Ukupna brojnost navedenih grupa mikroorganizama određena je u 0., 2., 4. i 9 danu nakon tretiranja jagoda. Mikrobiološka čistoća jestivih omotača, kitozana i kitozana s dodatkom komine jabuke, određena je samo na početku eksperimenta.

Prije analiza, jagodama su pažljivo odstranjene peteljke i čaške u sterilnim uvjetima. Tri jagode iz svakog tretmana i kontrole su samljevene i dobro homogenizirane u zasebnim sterilnim plastičnim vrećicama. Alikvot od 10 g uzorka pažljivo je prebačen u novu sterilnu plastičnu vrećicu, pomiješan s 90 mL puferirane peptonske vode (0,1 % m/V) te homogeniziran pri 250 rpm/1 min na sobnoj temperaturi (Stomacher®400 Circulator, Seward, Ujedinjeno Kraljevstvo). Ovako pripremljena suspenzija predstavlja razrjeđenje 10^{-1} te je korištena za pripremu serije decimalnih razrjeđenja u rasponu od 10^{-2} do 10^{-6} . Jestivi omotači serijski su razrijeđeni u peptonskoj vodi (0,1 % m/V) u omjeru 1:10, pri čemu je pripremljen raspon razrjeđenja od 10^{-1} do 10^{-3} . Ukupan broj aerobnih mezofilnih i psihotrofnih bakterija određen je na PCA podlozi (Biolife, Italija). Ukratko, 1 mL odgovarajućih razrjeđenja sterilno je otpipetiran u prazne, sterilne Petrijeve zdjelice i preliven s 15 mL nepolimerizirane PCA podloge temperirane na 45 °C. Korištena razrjeđenja i hranjiva podloga su pomiješane i ravnomjerno raspoređene u Petrijevim zdjelicama kružnim pokretima i ostavljene da polimeriziraju na sobnoj temperaturi. Nakon polimerizacije, ploče za određivanje ukupnog broja aerobnih mezofilnih bakterija inkubirane su na 37 °C/48 h, a ploče za određivanje ukupnog broja psihotrofnih bakterija na 4 °C/ 7 dana.

Za određivanje brojnosti enterobakterija korišten je VRBG agar (Biolife, Italija). Prvo, 1 mL odgovarajućih razrjeđenja sterilno je otpipetiran u prazne, sterilne Petrijeve zdjelice, preliven s 10 mL nepolimerizirane VRBG podloge temperirane na 45 °C, kružnim pokretima suspenzija razrjeđenja i podloge ravnomjerno je raspoređena po Petrijevim zdjelicama i ostavljena da polimerizira na sobnoj temperaturi. Nakon što je podloga polimerizirala, sve ploče su prelivene s dodatnih 5 mL nepolimerizirane VRBG podloge. Konačno, ovako pripremljene ploče su inkubirane u anaerobnim uvjetima na 35 °C/24 h.

Ukupan broj kvasaca i plijesni određen je na DRBC agaru (Biolife, Italija) gdje je 100 µL odgovarajućeg razrjeđenja inokulirano na prethodno polimerizirane DRBC ploče i ravnomjerno razmazano L-štapićem. Inokulirane ploče inkubirane su na 20 °C/7 dana.

Nakon inkubacije, narasle kolonije su izbrojane te je za svaku grupu mikroorganizama izračunat CFU (eng. *Colony forming units*) prema formuli:

$$\text{CFU} = \frac{\text{broj kolonija}}{\text{volumen korištenog uzorka}} \times \text{recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja}$$

Ukupan broj aerobnih mezofilnih i psihrotrofnih bakterija, enterobakterija i kvasaca i plijesni izraženi su kao logaritamske vrijednosti srednjih vrijednosti jedinica koje formiraju kolonije s pripadajućim standardnim devijacijama ($\log \text{CFU/g} \pm \text{sd}$).

3.2.7. Statistička analiza

Dobiveni kemijski rezultati analizirani su korištenjem IBM SPSS Statistics 22 i XLSTAT Microsoft Office 2016. Podaci su predstavljeni kao srednje vrijednosti sa standardnim odstupanjima dobivenih iz duplikata. Korištena je ANOVA s ponovljenim mjerenjem (analiza varijance) razlikuju prema post-hoc t-testu s Bonferronijevom korekcijom na razini pouzdanosti od 95 %.

Rezultati mikrobioloških analiza (ukupan broj aerobnih mezofila, aerobnih psihotrofa, enterobakterija te kvasaca i plijesni) prikazani su kao srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama. Prije statističke analize, s pomoću Shapiro-Wilk testa provjereno je pokazuju li rezultati mikrobioloških analiza normalnu distribuciju, dok je homogenost varijance provjerena s pomoću Levene testa. S obzirom na to da rezultati mikrobioloških analiza ne pokazuju normalnu distribuciju niti je varijanca homogena, statistički značajne razlike za mikrobiološku čistoću jestivih omotača određene su Kruskal-Wallisovim testom, a za brojnost različitih mikrobnih grupa na jagodama Scheirer-Ray-Hare testom. Kako bi se odredile statistički značajne razlike između grupa, njihove srednje vrijednosti međusobno su višestruko uspoređene pomoću post-hoc Dunn testa uz Bonferroni korekciju p-vrijednosti. Statistički značajnim smatraju se razlike kod kojih je $p < 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Optimizacija ekstrakcije polifenola iz jabučne komine

Za ekstrakciju polifenola iz jabučne komine odabrana je voda kao ekološki prihvatljiviji način, s obzirom na to da je dobro otapalo za ekstrakciju polifenola iz komine. Ekstrakcija ultrazvukom provodila se korištenjem otapala pri različitom vremenom u kojima je ispitan ukupni sadržaj polifenola.

Jabučna komina predstavlja otprilike 20 – 35 % izvornog voća i uglavnom se sastoji od preostalih ugljikohidrata, vlakana i manje količina proteina. U jabukama se polifenolni spojevi nalaze u cijelom plodu (kora, meso i sjemenke), gdje su njihove koncentracije puno niže u mesu u usporedbi s korom. Tijekom tehnološkog postupka prerade jabuke većina polifenolnih spojeva zadržava se u jabučnoj komini, koja je kruti ostatak koji se filtrira tijekom cijedenja soka. Komina jabuke sadrži polifenolne spojeve koji se lako ekstrahiraju vodom (Candrawinata i sur., 2014).

Polifenolni spojevi imaju različita kemijska svojstva zbog varijacija u vrsti, broju i položaju funkcionalnih skupina. Kao rezultat toga, različite otopine mogu utjecati na topljivost određenih molekula. Također je objavljeno da polaritet otapala ima presudnu ulogu u topljivosti polifenolnih spojeva. Budući da utječe na vrstu i količinu dobivene polifenolne otopine, izbor otapala za ekstrakciju je ključan (Hyrije Koraqi i sur., 2023). Utvrđeno je da svi ekstrakti imaju ukupni sadržaj polifenola u rasponu od $86,78 \pm 3,89$ mg do $181,22 \pm 6,11$ mg GAE/L (Tablica 7). Najveće količine polifenola pronađene su u ekstraktu čije je vrijeme ekstrakcije trajalo 15 minuta ($181,22 \pm 6,11$ mg GAE/L), dok su najmanje količine pronađene u ekstraktu čije je vrijeme ekstrakcije trajalo 1 minutu ($86,78 \pm 3,89$ mg GAE/L). Rezultati pokazuju da je ekstrakcija provedena tijekom 15 i 18 minuta rezultirala ekstraktima s najvećim ukupnim sadržajem polifenola.

Tablica 7. Sadržaj ukupnih polifenola s pripadajućim standardnim devijacijama u soku jagode tijekom različitih vremena ekstrakcije

Vrijeme ekstrakcije	TPC [mg GAE/L \pm sd]
1	$86,78 \pm 3,89$
3	$115,67 \pm 5,00$
6	$140,67 \pm 5,56$
9	$159,56 \pm 6,67$
12	$172,33 \pm 3,89$
15	$181,22 \pm 6,11$
18	$180,67 \pm 5,56$

Vrijednosti označene istim slovom se značajno razlikuju prema post-hoc t-testu s Bonferronijevom korekcijom ($p < 0,05$)

Candrawinata i sur. (2014) proveli su istraživanje kako bi procijenili učinak vremena ekstrakcije, temperature ekstrakcije i omjera vode i komine na ukupni sadržaj polifenola i

antioksidativno djelovanje vodenog ekstrakata jabučne komine. Utvrđeno je da su omjer vode i komine ($p < 0,001$), temperatura ekstrakcije ($p < 0,001$) i vrijeme ($p < 0,001$) značajni čimbenici u ekstrakciji polifenola iz komine jabuke, s optimalnim uvjetima ekstrakcije koji koriste omjer vode i komine od 20:1 na 90 °C tijekom 15 minuta dajući najviše polifenolnih spojeva. Rezultati su pokazali da što je vrijeme ekstrakcije dulje, to je više polifenola ekstrahirano iz komine. To nije bilo neočekivano, međutim nakon postizanja vremena ekstrakcije od 45 minuta (za 50 - 80 °C) i 30 minuta (za 90 °C), sadržaj polifenola i razina antioksidativne aktivnosti počeli su opadati. Ovo istraživanje sugerira da je nakon kritičnog vremena brzina raspadanja i oksidacije polifenola (zbog izlaganja visokoj temperaturi) veća od brzine ekstrakcije, što uzrokuje smanjenje konačnog sadržaja fenola i razine antioksidativne aktivnosti. Stoga je pri najvišoj temperaturi ekstrakcije potrebno samo relativno kratko vrijeme ekstrakcije od 15 minuta da bi se dobio najveći ukupni sadržaj polifenola i antioksidativna aktivnost za vodene ekstrakte komine.

4.2. Bioaktivne komponente

4.2.1. Ukupni polifenoli

Povećanje udjela polifenola u jagodama poboljšava kvalitetu ploda iz perspektive zdravlja potrošača (Koyama i sur., 2022). U Tablici 8 prikazan je ukupni sadržaj polifenola koji se kretao od $671,13 \pm 24,48$ do $1302,70 \pm 85,74$ mg GAE/L u soku od jagode u periodu od devet dana. Tijekom 2.dana skladištenja došlo je do smanjenja TPC-a u kontrolnom uzorku. Kod tretmana bez omotača značajno ($p < 0,05$) je došlo do smanjenja razgradnje TPC-a u usporedbi s plodovima u omotaču. Uzrok bi mogao biti zbog raspada stanične strukture uslijed starenja ploda (Ha i Duyen H.H. Nguyen, 2020), a smanjenje TPC-a tijekom duljeg razdoblja skladištenja može biti posljedica razgradnje stanične strukture koju oslobađaju polifenoli zbog izloženosti oksidacije enzima (Khalifa i sur., 2016). Ekstrakt jabučne komine u kombinaciji s kitozonom pridonio je očuvanju polifenolnih spojeva u uzorku ($1302,70 \pm 85,74$ mg GAE/L soka od jagode).

Tablica 8. Sadržaja ukupnih polifenola s pripadajućim standardnim devijacijama u soku jagode

TPC [mg GAE/L soka ± sd]	Kontrola	Kitozan	Kitozan+ekstrakt jabučne komine
0.dan	$797,13^a \pm 63,28$	$701,62^a \pm 50,18$	$825,03^a \pm 45,93$
2.dan	$671,13^a \pm 24,48$	$806,17^{ab} \pm 95,54$	$1022,64^b \pm 85,78$
4.dan	$776,17^a \pm 35,96$	$1060,90^b \pm 17,50$	$1099,07^b \pm 106,79$
9.dan	$895,76^a \pm 43,11$	$1290,64^b \pm 134,74$	$1302,70^b \pm 85,74$

Vrijednosti označene istim slovom se značajno razlikuju prema post-hoc t-testu s Bonferronijevom korekcijom ($p < 0,05$)

Provedenim istraživanjem Khalifa i sur. (2016) najveće smanjenje polifenola bilo je u plodovima bez omotača koji su dosegli 0,22 mg GAE/g na kraju razdoblja skladištenja, dok je najmanje smanjenje polifenola se pokazalo u plodovima jagoda s kitozonom dodatkom komine masline 2 % i iznosilo je 0,63 mg GAE/g. Provedenim istraživanjem dokazano je da kitozan u kombinaciji s ostatkom maslinovog ulja može djelovati kao zaštitna barijera na površini voća i smanjiti opskrbu kisikom. Ha i Duyen H. H. Nguyen (2020) su također istražili učinak omotača kitozana s različitim koncentracijama (1 %, 1,5 % i 2 %) i nano-kitozan (0,2 %, 0,4 % i 0,8 %) tijekom 21 dana. Koncentracija polifenola u uzorcima bez tretmana rasla je sve do 12.dana, dok kod uzoraka s tretmanima koncentracije su varirale tijekom skladištenja. Quintana i sur. (2020) svojim istraživanjem dokazali da izbor omotača ima značajan utjecaj na smanjenje TPC-a pa je kitozan u kombinaciji s ekstraktom korijena sladića (13,3 mg GAE/g) nakon 10 dana skladištenja značajno pridonio očuvanju polifenolnih spojeva u odnosu na kontrolne uzorke (30,93 mg GAE/g) s najvećim postotkom gubitka i uzorke s kitozonom (22,65 mg GAE/g).

4.2.2. Ukupni antocijani

Učinak tretmana na ukupnu količinu antocijanina u soku jagode tijekom skladištenja prikazan je u Tablici 9. Iz rezultata je moguće vidjeti da je masena koncentracija antocijanina u ispitivanom uzorku bila od $201,35 \pm 5,76$ do $292,07 \pm 5,81$ mg cijanidin-3-glukozid /L soka od jagode.

Tablica 9. Sadržaj ukupnih antocijanina s pripadajućim standardnim devijacijama u soku jagode

TAC [mg cijanidin-3-glukozid /L soka \pm sd]	Kontrola	Kitozan	Kitozan+ekstrakt jabučne komine
0.dan	$217,80^a \pm 7,13$	$213,13^a \pm 8,41$	$215,04^a \pm 5,93$
2.dan	$219,60^a \pm 21,06$	$221,12^a \pm 17,62$	$224,69^a \pm 8,54$
4.dan	$201,35^a \pm 5,76$	$244,62^b \pm 8,84$	$239,01^b \pm 1,04$
9.dan	$207,20^a \pm 3,13$	$292,07^b \pm 5,81$	$259,35^b \pm 21,34$

Vrijednosti označene istim slovom se značajno razlikuju prema post-hoc t-testu s Bonferronijevom korekcijom ($p < 0,05$)

Nakon drugog dana skladištenja došlo je do povećanja ukupnog sadržaja antocijanina u kontroli ($219,60 \pm 21,06$ mg cijanidin-3-glukozid /L soka jagode) i tretmanima (kitozan: $221,12 \pm 17,62$ mg cijanidin-3-glukozid /L soka jagode; kitozan s dodatkom ekstrakta jabučne komine: $224,69 \pm 8,54$ mg cijanidin-3-glukozid /L soka jagode). Pad antocijana u našem istraživanju zabilježen je u kontroli četvrtog dana skladištenja ($201,35 \pm 5,76$ mg cijanidin-3-glukozid /L soka jagode). Povećanje antocijanina u tretmanima tijekom razdoblja skladištenja bilo je veće nego u kontrolnim uzorcima. Ranija istraživanja dokazala su da tijekom skladištenja plodovi postaju crveniji i tamniji zbog otpuštanja antocijana iz stanice kao posljedice razgradnje stanične stijenke. Provedenim istraživanjima nakon 12 dana

skladištenja uočen je postupni pad antocijana u plodovima jagode (Khalifa i sur., 2016). U ovom radu, pad sadržaja antocijana u plodovima jagode uočen je tijekom 4.dana u kontrolnom uzorku ($201,35 \pm 5,76$ mg cijanidin-3-glukozid /L soka jagode). Značajna razlika ($p < 0,05$) uočena je između tretiranih plodova i kontrole. Najveći udio sadržaja antocijana zabilježen je u plodovima tretiranih s kitozanom ($292,07 \pm 5,81$ mg cijanidin-3-glukozid /L soka jagode) tijekom perioda od devet dana. Nasuprot tome, jagode bez omotača imaju najniži sadržaj antocijana ($207,20 \pm 3,13$ mg cijanidin-3-glukozid /L soka jagode) zadnjeg dana skladištenja.

Prema Cayo i sur., (2016) sadržaj antocijana u plodu jagode je u korelaciji s bojom ploda. Boja se smatra dobrim alatom za izbor jagoda s visokim sadržajem antocijana, iako je tamna boja često nepoželjna u trgovini zbog percepcije da su tamni plodovi prezreli. Stoga se može reći da postoji veza između sazrijevanja ploda i povećanja sadržaja antocijana (Sareh i Masoud, 2023).

Veći porast antocijana u tretmanima može biti posljedica mikrobne kontaminacije, uslijed biokemijskih promjena koje se događaju u biljkama kada su suočene sa stresom nakupljanjem reaktivnih kisikovih vrsta. Biljke s antioksidacijskim sustavom koji uključuje enzime (superoksid dismutaza, katalaza i dr.) i poliamidske spojeve, održavaju razinu ravnoteže reaktivnih vrsta kisika u stanici i štiti biljku od stresa iz okoliša (Sareh i Masoud, 2023).

4.2.3. Antioksidacijska aktivnost

Istraživanja su pokazala da neke reakcije između antioksidacijskih spojeva kao što su antocijanini, flavonoidi i polifenoli mogu biti sinergističke, te stoga analiza ukupne antioksidativne aktivnosti potencijalno podržava bolju procjenu ukupnog doprinosa antioksidativnih komponenti. Jagode sadrže visoke razine antioksidansa, koji su povezani sa smanjenim rizikom od kroničnih bolesti. Potencijal jagoda za promicanje zdravlja može potjecati od fitokemikalija, bioaktivnih spojeva koji nisu označeni kao standardne hranjive tvari (Kim i Shin, 2015).

Tablica 10. Antioksidacijska aktivnost u uzorcima jagode određene metodom DPPH s pripadajućim standardnim devijacijama

DPPH [mmol TE/L soka \pm sd]	Kontrola	Kitozan	Kitozan+ekstrakt jabučne komine
0.dan	$5,05^a \pm 0,37$	$5,02^a \pm 0,31$	$5,02^a \pm 0,18$
2.dan	$4,94^a \pm 0,19$	$5,51^{ab} \pm 0,42$	$5,52^b \pm 0,27$
4.dan	$5,06^a \pm 0,37$	$5,90^b \pm 0,13$	$6,18^{ab} \pm 0,47$
9.dan	$5,27^a \pm 0,49$	$6,40^b \pm 0,23$	$6,37^b \pm 0,17$

Vrijednosti označene istim slovom se značajno razlikuju prema post-hoc t-testu s Bonferronijevom korekcijom ($p < 0,05$)

Ukupna antioksidacijska aktivnost uzoraka jagoda izmjerena je DPPH metodom. U Tablici 13 izmjerene vrijednosti bile su od $4,94 \pm 0,19$ do $6,40 \pm 0,23$ mmol TE/L soka od jagode

tijekom devet dana skladištenja. Tijekom cijelog perioda skladištenja u oba tretmana možemo uočiti značajno veće vrijednosti u usporedbi s kontrolnim uzorcima. Na kraju čuvanja, to jest 9. dana najveća antioksidacijska aktivnost utvrđena je kod tretmana kitozanom i kitozana u kombinaciji s ekstraktom jabučne komine ($6,40 \pm 0,23$ mmol TE/L soka od jagode i $6,37 \pm 0,17$ mmol TE/L soka od jagode) i međusobno se statistički značajno razlikuju. Dobivene vrijednosti su također povezane s višim sadržajem polifenola. Najveći antioksidacijski kapacitet koji se značajno razlikuje od kontrolnih uzoraka primijećen je za jagode tretirane kitozanom u kombinaciji s ekstraktom jabučne komine nakon 4 dana skladištenja na sobnoj temperaturi ($6,18 \pm 0,47$ mmol TE/L soka od jagode).

Prema istraživanjima Petriccione i sur. (2015), DPPH je porastao u plodu jagode unutar prvih šest dana i nakon toga se smanjio. Njihovim istraživanjem jagode s omotačem kitozanom (1 i 2%) pokazale su više vrijednosti u usporedbi s jagodama bez omotača. Korištenjem kitozana, kao jestivog omotača za jagode, daje korisne učinke u smislu održavanja nutritivnih spojeva i antioksidacijskog djelovanja ovisno o dozi. Martínez i sur. (2018) opisali su zaštitni učinak eteričnog ulja timijana s jestivim omotač kitozanom na plod jagode. Tijekom istraživanja došlo je do produljenja roka trajanja jagode na 15 dana te smanjenja antioksidacijskih svojstava uslijed posljedica starenja.

4.2.4. Ukupni proteini

U Tablici 11. prikazan je sadržaj proteina u uzorcima jagoda u periodu od 9. dana skladištenja kretale od $2,56 \pm 0,14$ do $4,15 \pm 0,26$ g kimožina/L. S produženjem vremena skladištenja, povećao se sadržaj ukupnih proteina u svim uzorcima te se povećanje statistički značajno razlikovalo između oba tretmana i kontrole. Najveće povećanje sadržaja ukupnih proteina tijekom razdoblja skladištenja nakon 9. dana bilo je u tretmanu s kitozanom ($4,15 \pm 0,26$ g kimožina/L), najmanje u kontroli ($3,75 \pm 0,25$ g kimožina/L). Postoje dokazi o povećanju nekih proteina koji su uključeni u metabolizam šećera, proizvodnju etilena, oksidativnog stresa, obrambeni mehanizam itd., tako da se povećanje sadržaja proteina može se pripisati metaboličkim procesima u plodu jagode tijekom skladištenja (Sareh i Masoud, 2023).

Prema dobivenim rezultatima može se utvrditi da u plodovima s jestivim omotačem kitozanom i kitozanom u kombinaciji s ekstraktom jabučne komine, uslijed povećane respiracije i drugih metaboličkih aktivnosti dolazi do povećanja ukupnih topljivih proteina u odnosu na kontrolu.

Tablica 11. Sadržaj ukupnih proteina s pripadajućim standardnim devijacijama u soku jagode

TP [g kimoziina/L ± sd]	Kontrola	Kitozan	Kitozan+ekstrakt jabučne komine
0.dan	2,56 ^a ± 0,14	2,59 ^a ± 0,22	2,58 ^a ± 0,11
2.dan	2,81 ^a ± 0,07	3,11 ^a ± 0,16	3,37 ^a ± 0,39
4.dan	3,33 ^a ± 0,34	3,60 ^a ± 0,14	3,51 ^a ± 0,14
9.dan	3,75 ^a ± 0,25	4,15 ^a ± 0,26	4,04 ^a ± 0,07

Vrijednosti označene istim slovom se značajno razlikuju prema post-hoc t-testu s Bonferronijevom korekcijom ($p < 0,05$)

4.3. Utjecaj jestivih omotača na mikrobiološku kvalitetu ploda

4.3.1. Mikrobiološka čistoća jestivih omotača

Na početku eksperimenta (0.dan) određena je mikrobiološka čistoća jestivih omotača, kitozana i kitozana s dodatkom ekstrakta jabučne komine. Rezultati analize prikazani su u Tablici 12.

Tablica 12. Mikrobiološka čistoća jestivih omotača. Brojnost mikrobni grupa prikazana je kao logaritamska vrijednost srednje CFU vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom ($\log \text{CFU/g} \pm \text{sd}$).

Mikrobna grupa	Kitozan [$\log \text{CFU/g} \pm \text{sd}$]	Kitozan + ekstrakt jabučne komine [$\log \text{CFU/g} \pm \text{sd}$]
Aerobne mezofilne bakterije	3,97 ± 0,03	4,27 ± 0,01
Aerobne psihrotrofne bakterije	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Enterobakterije	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Plijesni i kvasci	1,36 ± 0,10	1,30 ± 0,00

U oba jestiva omotača detektirane su aerobne mezofilne bakterije te plijesni i kvasci. U kitozana pronađeno je manje aerobnih mezofilnih bakterija ($3,97 \pm 0,03 \log \text{CFU/g}$) nego u kitozana s dodatkom jabučne komine ($4,27 \pm 0,01 \log \text{CFU/g}$). S druge strane, u kitozana ($1,36 \pm 0,10 \log \text{CFU/g}$) i kitozana s dodatkom jabučne komine ($1,30 \pm 0,00 \log \text{CFU/g}$) brojnost plijesni i kvasaca je slična. Konačno, nijedan jestivi omotač korišten u ovom istraživanju nije bio kontaminiran aerobnim psihrotrofnim bakterijama, niti enterobakterijama. Detektirane razlike nisu statistički značajne.

Iako je antimikrobna aktivnost jestivih omotača na bazi kitozana prema različitim grupama mikroorganizama detaljno istražena i dokazana (Alves i sur., 2018; Reshad i sur., 2021), rijetka istraživanja uključuju i analizu mikrobiološke čistoće samih jestivih omotača (Borges i sur., 2023). Slično istraživanju koje su proveli Borges i sur. (2023), u jestivim omotačima korištenim u ovom istraživanju dokazana je prisutnost aerobnih mezofilnih bakterija, kvasaca

i plijesni. Prisutnost navedenih grupa mikroorganizama u jestivim omotačima može se pripisati korištenju nesterilnih materijala i pripremi omotača u nesterilnim uvjetima. U pripremi omotača kitozan s dodatkom ekstrakta jabučne komine, korištena je nesterilna jabučna komina i vjerojatno je dio prirodne mikrobiote jabučne komine ekstraktom unesen u omotač, zbog čega je u kitozana s ekstraktom jabučne komine pronađeno više aerobnih mezofilnih bakterija nego u kitozana.

Priprema jestivih omotača u sterilnim uvjetima mogla bi minimalizirati rizik od kontaminacije konačnog proizvoda mikroorganizmima kvarenja i/ili potencijalnim patogenima i smanjiti rast mikroorganizma u konačnom proizvodu što bi doprinijelo očuvanju kvalitete i sigurnosti samog proizvoda kroz dulje razdoblje. Međutim, uvođenje dodatnih koraka koji bi osigurali sterilnost jestivih omotača može dovesti do povećanja troškova i vremena proizvodnje, čineći krajnji proizvod neisplativim.

4.3.2. Utjecaj jestivih omotača na bakterije

Kako bi se utvrdio utjecaj jestivih omotača na brojnost bakterija u uzorcima jagoda, pratila se brojnost aerobnih mezofilnih bakterija, aerobnih psihrotrofnih bakterija i enterobakterija kroz 9 dana. Općenito, u netretiranim jagodama i jagodama tretiranim jestivim omotačima detektirane su samo aerobne mezofilne bakterije, dok aerobne psihrotrofne bakterije i enterobakterije uopće nisu bile prisutne (Tablica 13).

Tablica 13. Utjecaj jestivih omotača na aerobne mezofilne bakterije. Rezultati su prikazani kao logaritamska vrijednost srednje CFU vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom ($\log \text{CFU/g} \pm \text{sd}$).

Aerobne mezofilne bakterije	Kontrola [$\log \text{CFU/g} \pm \text{sd}$]	Kitozan [$\log \text{CFU/g} \pm \text{sd}$]	Kitozan+ekstrakt jabučne komine [$\log \text{CFU/g} \pm \text{sd}$]
0.dan	4,45± 0,03 ^a	5,37±0,02 ^a	4,51± 0,01 ^a
2.dan	4,44± 0,02 ^a	4,22± 0,02 ^b	3,97± 0,04 ^b
4.dan	4,46± 0,01 ^a	3,43 ± 0,01 ^c	3,31± 0,01 ^c
9.dan	4,47± 0,01 ^a	3,54 ± 0,02 ^c	4,12± 0,02 ^b

Vrijednosti označene različiti slovima (a-c) unutar redaka i stupaca predstavljaju statistički značajne razlike prema post-hoc Dunn testu s Bonferroni korekcijom p-vrijednosti ($p < 0,05$).

U pravilu, u kontrolnim uzorcima jagoda prisutno je više aerobnih mezofilnih bakterija nego u jagodama tretiranim jestivim omotačima, bez obzira na vrstu primijenjenog omotača. Iznimno, na 0. dan na jagodama tretiranim kitozanom ($5,37 \pm 0,02 \log \text{CFU/g}$) i kitozanom s dodatkom ekstrakta jabučne komine ($4,51 \pm 0,01 \log \text{CFU/g}$) prisutno je više aerobnih mezofilnih bakterija u usporedbi s kontrolnim uzorcima ($4,45 \pm 0,03 \log \text{CFU/g}$). Međutim, detektirane razlike u brojnosti nisu statistički značajne (Dunn test s Bonferroni korekcijom, $p = 0,15$). Veća brojnost aerobnih mezofilnih bakterija u jagodama tretiranim jestivim omotačima u usporedbi s kontrolnim uzorcima na 0. dan može se objasniti kontaminacijom jestivih omotača aerobnim mezofilnim bakterijama (Tablica 12). Iako je dokazano da kitozan

(Alves i sur., 2018; Reshad i sur., 2021), kao i fenoli u ekstraktu jabučne komine (Wang i sur., 2015.; Riaz i sur., 2018; Muñoz-Tebar i sur., 2023) pokazuju snažan antibakterijski učinak prema Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama, inhibitorni učinak, vjerojatno zbog visoke početne brojnosti aerobnih mezofilnih bakterija, nije odmah uočen u ovom istraživanju.

Općenito, ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija na kontrolnim jagodama je sličan tijekom devetodnevnog skladištenja pri 4 °C. Broj aerobnih mezofilnih bakterija na kontrolnim jagodama se smanjuje do 2. dana ($4,44 \pm 0,02 \log \text{CFU/g}$), nakon čega broj bakterija konstantno raste tijekom skladištenja i 9. dan doseže najvišu vrijednost ($4,47 \pm 0,01 \log \text{CFU/g}$). Međutim, uočene razlike nisu statistički značajne.

S druge strane, oba jestiva omotača, kitozan i kitozan+ekstrakt jabučne komine, pokazali su slično djelovanje. Prva četiri dana oba omotača su značajno inhibirala rast aerobnih mezofilnih bakterija (Dunn test s Bonferroni korekcijom, $p < 0,01$), što se očituje stalnim smanjenjem broja bakterija na tretiranim jagodama. Najniže vrijednosti uočene su 4. dan (kitozan: $3,43 \pm 0,01 \log \text{CFU/g}$; kitozan+ekstrakt jabučne komine: $3,31 \pm 0,01 \log \text{CFU/g}$). Kitozan se pokazao efikasnijim u suzbijanju rasta aerobnih mezofilnih bakterija od kitozana s dodatkom ekstrakta jabučne komine. Naime, 4. dan vidljivo je da je kitozan smanjio broja aerobnih mezofilnih bakterija za 1,94 log jedinica, a kitozan s ekstraktom jabučne komine za 1,20 log jedinica u odnosu na 0. dan. Međutim, uočene razlike u inhibitornom djelovanju omotača nisu statistički značajne (Dunn test s Bonferroni korekcijom, $p = 0,74$).

U kasnijoj fazi skladištenja (9. dan) inhibitorni učinak jestivih omotača slabi što se očituje porastom broja aerobnih mezofilnih bakterija (kitozan: $3,54 \pm 0,02 \log \text{CFU/g}$; kitozan+ekstrakt jabučne komine: $4,12 \pm 0,02 \log \text{CFU/g}$), pri čemu je slabljenje inhibitornog učinka izraženije kod kitozana s dodatkom ekstrakta jabučne komine nego kod kitozana (Dunn test s Bonferroni korekcijom, $p < 0,01$).

Prema Pravilniku o mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 74/08, 156/08, 89/10, 153/11) i Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu (Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, 2011.) uzorci plodova jagoda u ovom istraživanju su bili zadovoljavajuće ili prihvatljive mikrobiološke kvalitete s obzirom na detektiranu brojnost aerobnih mezofilnih bakterija. Točnije, primjenom kitozana i čuvanjem jagoda na 4 °C u kasnijim fazama skladištenja (4.-9.dan), broj aerobnih mezofila na jagodama smanjen je na vrijednosti $< 4 \log \text{CFU/g}$, što ukazuje na njihovu zadovoljavajuću mikrobiološku kvalitetu. S druge strane, primjenom kitozana s ekstraktom jabučne komine i čuvanjem pri 4 °C, zadovoljavajuća mikrobiološka kvaliteta ostaje očuvana između 2. i 4. dana, dok se 9. dan mikrobiološka kvaliteta smatra prihvatljivom zbog porasta broja aerobnih mezofila na vrijednosti unutar dopuštenih graničnih vrijednosti ($> 4 \log \text{CFU/g}$ i $< 5 \log \text{CFU/g}$).

Uz aerobne mezofilne bakterije, kvarenju i negativnom utjecaju na mikrobiološku kvalitetu i sigurnost jagoda mogu doprinijeti i psihrotrofne bakterije i enterobakterije (Lafarga i sur., 2019). Međutim, u ovom istraživanju psihrotrofne bakterije i enterobakterije nisu detektirane ni u kontrolnim ni u tretiranim jagodama, pa nije bilo moguće ocijeniti antimikrobni učinak korištenih jestivih omotača na navedene grupe bakterija iako je dokazan

antibakterijski učinak omotača na bazi kitozana na psihrotrofne bakterije i enterobakterije (Campaniello i sur., 2008).

Antibakterijski učinak jestivih omotača prema aerobnim mezofilnim bakterijama uočen u ovom istraživanju je u skladu s rezultatima drugih istraživanjima provedenim na jagodama i na drugim svježim proizvodima tretiranim kitozanom, modificiranim kitozanom i kitozanom u kombinaciji s različitim uljima i ekstraktima (Adetunji i sur., 2019.; Khan i sur., 2019; Martínez i sur., 2018). Na primjer, Khan i sur. (2019) su dokazali da jestivi omotači na bazi kitozana i kitozana modificiranog monometil fumarnom kiselinom značajno inhibiraju ukupne aerobne mezofile tijekom skladištenja pri 10 °C. U navedenim tretmanima, brojnost aerobnih mezofila na kraju skladištenja (8. dan) iznosila je 3,83 log CFU/jagoda za kitozan i 3,32 log CFU/jagoda za kitozan modificiran monometil fumarnom kiselinom. Nadalje, dokazali su da primjena jestivih omotača poboljšava mikrobiološke karakteristike te produžuje rok trajanja jagoda do 8 dana u odnosu na kontrolu. Martínez i sur. (2018) su pak utvrdili da primjena kitozana i kitozana s različitim koncentracijama eteričnog ulja timijana značajno inhibira rast aerobnih mezofila na jagodama tijekom skladištenja pri 5 °C i da produžuje rok trajanja jagoda do 15 dana u usporedbi s netretiranim jagodama. Pritom se kitozan s eteričnim uljem timijana pokazao efikasnijim od čistog kitozana. Adetunji i sur. (2019) su pak dokazali efikasnost kitozana u produženju roka trajanja zelene paprike, gdje je primjenom kitozana broj aerobnih mezofilnih bakterija od 12,3 log CFU/g tijekom prvog tjedna skladištenja smanjen na 2,5 log CFU/g u 5. tjednu skladištenja. Suprotno tome, broj aerobnih mezofilnih bakterija na kontrolnim uzorcima je iznosio 26,3 log CFU/g u 5. tjednu skladištenja.

Iako postoje određene razlike između navedenih istraživanja i ovog istraživanja koje se mogu objasniti primjenom različitih formulacija omotača na bazi kitozana, temperaturom i trajanjem skladištenja te tipom proizvoda, vidljivo je da su, zbog antibakterijskog učinka, jestivi omotači na bazi kitozana odličan tretman koji može očuvati mikrobiološku kvalitetu različitih svježih proizvoda te produžiti njihov rok trajanja.

4.3.3. Utjecaj jestivih omotača na kvasce i plijesni

Utjecaj jestivih omotača na brojnost kvasaca i plijesni u uzorcima jagoda praćen je 9 dana, a rezultati su prikazani u tablici 14.

Plijesni i kvasci detektirani su samo u kontrolnim uzorcima na 0. ($2,82 \pm 0,11$ log CFU/g) i 2. dan ($2,93 \pm 0,08$ log CFU/g). Nakon početnog porasta broja plijesni i kvasaca (2. dan) u kasnijim fazama skladištenja (4. do 9. dan) više ih nije bilo moguće detektirati u kontrolnim jagodama.

Tablica 14. Utjecaj jestivih omotača na plijesni i kvasce. Rezultati su prikazani kao logaritamska vrijednost srednje CFU vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom (log CFU/g ± sd).

Aerobne mezofilne bakterije	Kontrola [log CFU/g ± sd]	Kitozan [log CFU/g ± sd]	Kitozan+ekstrakt jabučne komine [log CFU/g ± sd]
0. dan	2,82 ± 0,11 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b
2. dan	2,93 ± 0,08 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b
4. dan	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b
9. dan	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b

Vrijednosti označene različiti slovima (a-b) unutar redaka i stupaca predstavljaju statistički značajne razlike prema post-hoc Dunn testu s Bonferroni korekcijom p-vrijednosti (p<0,05).

Iako je dokazano da plijesni i kvasci rastu na svježim namirnicama te da obično dobro preživljavaju različite uvjete skladištenja kao što je niska temperatura (Hernández i sur. 2018), izostanak rasta u kasnijim fazama skladištenja mogao bi se pripisati prirodnom odumiranju usred nepovoljnih okolišnih uvjeta za njihov rast.

Nadalje, oba jestiva omotača, kitozan i kitozan s dodatkom ekstrakta jabučne komine, odmah su inhibirali rast plijesni i kvasaca. Iako su jestivi omotači bili kontaminirani (Tablica 12), početna brojnost plijesni i kvasaca je bila dovoljno niska te je odmah uočen antifungalni učinak. Konačno, oba jestiva omotača pokazuju značajan antifungalni učinak u odnosu na kontrolu (Dunn test s Bonferroni korekcijom, p< 0,01), međutim, ne postoje značajne razlike u njihovoj efikasnosti u suzbijanju i kontroli rasta plijesni i kvasaca (Dunn test s Bonferroni korekcijom, p = 1,00).

Prema Pravilniku o mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 74/08, 156/08, 89/10, 153/11) i Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu (Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, 2011.) uzorci plodova jagoda u ovom istraživanju su bili zadovoljavajuće mikrobiološke kvalitete s obzirom na detektiranu brojnost plijesni i kvasaca tijekom cijelog trajanja skladištenja.

Istraživanja antifungalnog učinka omotača na bazi kitozana pokazala su oprečne rezultate. Na primjer, Quintana i sur. (2020) su proveli istraživanje na jagodama tretiranim kitozonom i kitozonom u kombinaciji s korijenom sladića i uskladištenima na 4 °C te su pokazali da čisti kitozan ne djeluje antifungalno, dok kitozan s dodatkom korijenom sladića potpuno inhibira rast plijesni i kvasaca 6. dan skladištenja. Suprotno ovom istraživanju, Valenzuela i sur. (2015) su dokazali da je čisti kitozan efikasniji u supresiji rasta plijesni i kvasaca na jagodama, u usporedbi s omotačima kvinoja-kitozan i protein u kombinaciji s kvinoja-kitozan-suncokretovo ulje tijekom cijelog perioda skladištenja (15 dana) na 0 °C. Također su dokazali da je antifungalni učinak kitozana najizraženiji tijekom prvih 5 dana i da je u tom razdoblju spriječio gljivičnu infekciju, a time i sva oštećenja i kvarenja jagoda. Popescu i sur. (2022) su pak dokazali da sve kombinacije kitozana, tj. kitozan različitih molekularnih masa i koncentracija s različitim spojevima (octena kiselina, eterična ulja pasjeg trna i eterična ulja sjemenki grožđa), inhibiraju rast plijesni i kvasaca na tretiranim jagoda tijekom skladištenja (7 dana) pri različitim temperaturama (4 i 8 °C).

Rezultati ovog istraživanja, s rezultatima drugih istraživanja potvrđuju da čisti kitozan, odnosno u kombinaciji s određenim spojevima i ekstraktima djeluje i antifungalno. Konačno, kombinacija upotrebe jestivih omotača i hlađenja mogla bi riješiti glavne izazove koji se javljaju tijekom skladištenja jagoda, tj. mogla bi spriječiti gubitak vode i kontrolirati rast neželjene mikrobiote te posljedično, produžiti rok trajanja jagoda nakon berbe uz zadržavanje organoleptička svojstava tijekom skladištenja.

5. ZAKLJUČAK

Za optimalnu ekstrakciju polifenola iz ekstrakta jabučne komine odabrano je vrijeme ekstrakcije od 15 minuta kako bi dobili što točnije i preciznije rezultate. Na temelju dobivenih rezultata u ovom radu može se zaključiti da je sadržaj ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet se kod tretmana značajno razlikovao u odnosu na kontrolu na kraju perioda skladištenja. Najveća količina polifenola bila je kod ekstrakta jabučne komine u kombinaciji s kitozonom ($1302,70 \pm 85,74$ mg GAE/L soka od jagode) dok je kod tretmana bez omotača značajno je došlo do smanjenja razgradnje polifenola ($895,76 \pm 43,11$ mg GAE/L soka od jagode) u usporedbi s plodovima u omotaču kod kojih su tijekom cijelom perioda skladištenja veće vrijednosti polifenola. Najveća antioksidacijska aktivnost koja je povezana s višim sadržajem polifenola utvrđena je kod tretmana s kitozonom ($6,40 \pm 0,23$ mmol TE/L soka od jagode) i kitozana u kombinaciji s ekstraktom jabučne komine ($6,37 \pm 0,17$ mmol TE/L soka od jagode). Primjena jestivih omotača utjecala je na sadržaj ukupnih antocijana. Najveći udio sadržaja antocijana bio je kod plodova tretiranih s kitozonom ($292,07 \pm 5,81$ mg cijanidin-3-glukozid/L soka od jagode), dok je kod kontrolnih uzoraka ($207,20 \pm 3,13$ mg cijanidin-3-glukozid/L soka od jagode) zabilježen pad vrijednosti antocijana na kraju perioda skladištenja. Ukupan sadržaj proteina povećao se u svim uzorcima te se povećanje statistički značajno razlikovalo između oba tretmana (kitozan: $4,15 \pm 0,26$ g kimoza/L; kitozan s dodatkom ekstrakta jabučne komine $4,04 \pm 0,07$ g kimoza/L) i kontrole ($3,75 \pm 0,25$ g kimoza/L).

Mikrobiološki rezultati ukazuju da su oba jestiva omotača kontaminirana aerobnim mezofilnim bakterijama (kitozan: $3,97 \pm 0,03$ log CFU/g; kitozan s dodatkom ekstrakta jabučne komine: $4,27 \pm 0,01$ log CFU/g), plijesnima i kvascima (kitozan: $1,36 \pm 0,10$ log CFU/g; kitozan s dodatkom jabučne komine: $1,30 \pm 0,00$ log CFU/g). Unatoč tome, antimikrobno djelovanje oba omotača je dostatno za efikasnu kontrolu i suzbijanje rasta nepoželjne mikrobiote tijekom skladištenja pri 4 °C. Psihrotrofne bakterije i enterobakterije nisu detektirane niti u jestivim omotačima, niti na tretiranim i kontrolnim jagodama. Brojnost aerobnih mezofilnih bakterija značajno je manja na jagodama s jestivim omotačima u odnosu na kontrolni uzorak između 2. i 9. dana skladištenja. Oba jestiva omotača su potpuno inhibirala rast plijesni i kvasaca tijekom cijelog perioda skladištenja. Primjenom kitozana i čuvanjem jagoda na 4 °C očuvana je zadovoljavajuća mikrobiološka kvaliteta u kasnijim fazama skladištenja, odnosno produžen je rok trajanja jagoda. Primjenom kitozana s ekstraktom jabučne komine i čuvanjem jagoda na 4 °C zadovoljavajuća mikrobiološka kvaliteta ostaje očuvana do 4. dana skladištenja. Zbog rasta broja aerobnih mezofilnih bakterija do kraja skladištenja (9. dan) narušena je mikrobiološka kvaliteta jagoda. Iako ne postoje značajne razlike u antimikrobnoj efikasnosti između kitozana i kitozana s dodatkom ekstrakta jabučne komine, kitozan se pokazao kao bolji omotač u očuvanju mikrobiološke kvalitete i produženju roka trajanja jagoda.

6. POPIS LITERATURE

1. Alves V. L., Rico B. P., Cruz R. M., Vicente A. A., Khmelinskii I., Vieira M. C. (2018). Preparation and characterization of a chitosan film with grape seed extract-carvacrol microcapsules and its effect on the shelf-life of refrigerated Salmon (*Salmo salar*). *LWT - Food Science and Technology*. 89: 525-534.
2. AOAC Official method 990.12. (1998). Aerobic plate count in foods. Official methods of analysis (16th ed.). Washington DC: AOAC International.
3. AOAC Official method 991.14. (1998). Coliform and *Escherichia coli* counts in foods. Official methods of analysis (16th ed.). Washington DC: AOAC International
4. AOAC Official method 997.02. (1998). Yeast and mold counts in foods. Official methods of analysis (16th ed.). Washington DC: AOAC International.
5. Bandara, S., Du, H., Carson, L., Bradford, D. and Kommalapati, R. (2020). Agricultural and Biomedical Applications of Chitosan-Based Nanomaterials. *Nanomaterials*, 10(10), p.1903. doi:<https://doi.org/10.3390/nano10101903>.
6. Bhullar, M., Perry, B., Monge, A., Nabwiire, L. and Shaw, A. (2021). *Escherichia coli* Survival on Strawberries and Unpacked Romaine Lettuce Washed Using Contaminated Water. *Foods*, 10(6), p.1390. doi:<https://doi.org/10.3390/foods10061390>.
7. Borges M.M., Simões A.S., Miranda C., Sales H., Pontes R., Nunes J. (2023). Microbiological Assessment of White Button Mushrooms with an Edible Film Coating. *Foods*. 12(16):3061. <https://doi.org/10.3390/foods12163061>
8. Brasil, I. M., Gomes, C., Puerta-Gomez, A., Castell-Perez, M. E., & Moreira, R. G. (2012). Polysaccharide-based multilayered antimicrobial edible coating enhances quality of fresh-cut papaya. *LWT Food Science and Technology*, 47(1), 39e45.
9. Bravo, L.G. (2009). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*. [online] Dostupno na: https://www.academia.edu/11384957/Polyphenols_Chemistry_Dietary_Sources_Metabolism_and_Nutritional_Significance Datum pristupa: 27.07.2023.
10. Candrawinata, V., Golding, J., Roach, P. and Stathopoulos, C. (2014). Total phenolic content and antioxidant activity of apple pomace aqueous extract: effect of time, temperature and water to pomace ratio. *International Food Research Journal*, [online] 21(6), pp.2337–2344. Dostupno na: [http://www.ifrj.upm.edu.my/21%20\(06\)%202014/40%20IFRJ%2021%20\(06\)%202014%20Candrawinata%20143.pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/21%20(06)%202014/40%20IFRJ%2021%20(06)%202014%20Candrawinata%20143.pdf) Datum pristupa: 27.07.2023.
11. Cayo, Y.P., Sargent, S., Nunes, C. do N. and Whitaker, V. (2016). Composition of Commercial Strawberry Cultivars and Advanced Selections as Affected by Season, Harvest, and Postharvest Storage. *HortScience*, 51(9), pp.1134–1143. doi:<https://doi.org/10.21273/hortsci10996-16>.
12. Charles Oluwaseun Adetunji, Ojediran, J.O., Juliana Bunmi Adetunji and S.O. Owa (2019). Influence of chitosan edible coating on postharvest qualities of *Capsicum annum* L. during storage in evaporative cooling system. 11(1), pp.59–66. doi:<https://doi.org/10.17508/cjfst.2019.11.1.09>.

13. Cheba, B. amar (2020). Chitosan: Properties, Modifications and Food Nanobiotechnology. *Procedia Manufacturing*, 46, pp.652–658. doi:<https://doi.org/10.1016/j.promfg.2020.03.093>.
14. Dahal, P. (2022). *Enterobacteriaceae- Definition, Characteristics, Identification*. [online] *Microbe Notes*. Available at: <https://microbenotes.com/enterobacteriaceae/>.
15. Dhital, R., Joshi, P., Becerra-Mora, N., Umagiliyage, A., Chai, T., Kohli, P. and Choudhary, R. (2017). Integrity of edible nano-coatings and its effects on quality of strawberries subjected to simulated in-transit vibrations. *LWT*, 80, pp.257–264. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.02.033>. Dostupno na: https://www.academia.edu/15736647/Fruit_Microbiology Datum pristupa: 06.05.2023.
16. Drobek, M., Cybulska, J., Gałazka, A., Feledyn-Szewczyk, B., Marzec-Grządziel, A., Sas-Paszt, L., Gryta, A., Trzciński, P., Zdunek, A. and Frąc, M. (2021). The Use of Interactions Between Microorganisms in Strawberry Cultivation (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Frontiers in Plant Science*, 12. doi:<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.780099>.
17. Ewing, W.H. (1966). *Enterobacteriaceae* taxonomy and nomenclature. U.S. Department of health, education and welfare; Public health service Bureau of disease prevention and environmental control national communicable disease center.
18. Feliziani, E. and Romanazzi, G. (2016). Postharvest decay of strawberry fruit: Etiology, epidemiology, and disease management. *Journal of Berry Research*, 6(1), pp.47–63. doi:<https://doi.org/10.3233/jbr-150113>.
19. Fossen, T., Rayyan, S. and Andersen, Ø.M. (2004). Dimeric anthocyanins from strawberry (*Fragaria ananassa*) consisting of pelargonidin 3-glucoside covalently linked to four flavan-3-ols. *Phytochemistry*, 65(10), pp.1421–1428. doi:<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.05.003>.
20. Galoburda, R., Boca, S., Skrupskis, I. and Seglina, D. (2014). *FOODBALT 2014 Physical And Chemical Parameters Of Strawberry Puree*. [online] Dostupno na: https://lufb.llu.lv/conference/foodbalt/2014/FoodBalt_Proceedings_2014-172-177.pdf Datum pristupa: 05.05.2023.
21. Garzon, G.A. and Wrolstad, R.E. (2002). Comparison of the Stability of Pelargonidin-based Anthocyanins in Strawberry Juice and Concentrate. *Journal of Food Science*, 67(4), pp.1288–1299. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10277.x>.
22. Geremu, M., Tola, Y.B. and Sualeh, A. (2016). Extraction and determination of total polyphenols and antioxidant capacity of red coffee (*Coffea arabica* L.) pulp of wet processing plants. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, [online] 3(1). doi:<https://doi.org/10.1186/s40538-016-0077-1>.
23. Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J.M. and Battino, M. (2014). Strawberry and Human Health: Effects beyond Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(18), pp.3867–3876. doi:<https://doi.org/10.1021/jf405455n>.
24. Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J.M., Quiles, J.L., Mezzetti, B. and Battino, M. (2012). The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition*, 28(1), pp.9–19. doi:<https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.009>.

25. Ha and Duyen H.H. Nguyen (2020). Effects of nano-chitosan and chitosan coating on the postharvest quality, polyphenol oxidase activity and malondialdehyde content of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). DOAJ (DOAJ: Directory of Open Access Journals). doi:<https://doi.org/10.22077/jhpr.2019.2698.1082>.
26. Hernández, A., Pérez-Navado, F., Ruiz-Moyano, S., Serradilla, M. J., Villalobos, M. C., Martín, A., & Córdoba, M. G. (2018). Spoilage yeasts: What are the sources of contamination of foods and beverages?. *International journal of food microbiology*, 286, 98-110
27. Hussain, S.Z., Naseer, B., Qadri, T., Fatima, T. and Bhat, T.A. (2021). Strawberry (*F. x ananassa*)—Morphology, Taxonomy, Composition and Health Benefits. *Fruits Grown in Highland Regions of the Himalayas*, pp.219–228. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-030-75502-7_17.
28. Hussein, M.A., El-Said, A.H.M. and Yassein, A.S. (2020). Mycobiota associated with strawberry fruits, their mycotoxin potential and pectinase activity. *Mycology*, [online] 11(2), pp.158–166. doi: <https://doi.org/10.1080/21501203.2020.1759719>
29. Hyrije Koraqi, Anka Trajkovska Petkoska, Khalid, W., Aqeela Sehrish, Saadia Ambreen and Lorenzo, J.M. (2023). Optimization of the Extraction Conditions of Antioxidant Phenolic Compounds from Strawberry Fruits (*Fragaria x ananassa* Duch.) Using Response Surface Methodology. 16(6), pp.1030–1042. doi:<https://doi.org/10.1007/s12161-023-02469-6>.
30. Ištuk, J., Šubarić, D. and Jakobek, L. (2020). Methodology for the determination of polyphenol bioaccessibility. *Croatian journal of food science and technology*, 12(2), pp.268–279. doi:<https://doi.org/10.17508/cjfst.2020.12.2.16>.
31. Kalia, A. and Gupta, R.P. (2006). Fruit Microbiology. *Handbook of Fruits and Fruit Processing*, [online] p.1
32. Khalifa, I., Barakat, H., El-Mansy, H.A. and Soliman, S.A. (2016). Effect of Chitosan-Olive Oil Processing Residues Coatings on Keeping Quality of Cold-Storage Strawberry (*Fragaria ananassa*. Var. Festival). *Journal of Food Quality*, 39(5), pp.504–515. doi:<https://doi.org/10.1111/jfq.12213>.
33. Khodaei, D., Hamidi-Esfahani, Z. I Rahmati, E. (2021). Effect of edible coatings on the shelf-life of fresh strawberries: A comparative study using TOPSIS-Shannon entropy method. *NFS Journal*, 23, pp.17–23. doi:<https://doi.org/10.1016/j.nfs.2021.02.003>.
34. Kilonzo-Nthenge, A., Liu, S., Hashem, F., Millner, P. and Githua, S. (2018). Prevalence of Enterobacteriaceae on fresh produce and food safety practices in small-acreage farms in Tennessee, USA. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 13(3), pp.279–287. doi:<https://doi.org/10.1007/s00003-018-1172-y>.
35. Kim, Y.-J. and Shin, Y. (2015). Antioxidant profile, antioxidant activity, and physicochemical characteristics of strawberries from different cultivars and harvest locations. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 58(4), pp.587–595. doi:<https://doi.org/10.1007/s13765-015-0085-z>.
36. KLU Coaching (2017). Strawberries: Nutritional Content, Spoilage and Preservation Methods. [online] Medium. Dostupno na:

https://medium.com/@Klusch_Nutri/strawberries-nutritional-content-spoilage-and-preservation-methods-a4b2e24b48a0. Datum pristupa: 06.05.2023.

37. Koyama, R., Ishibashi, M., Fukuda, I., Okino, A., Osawa, R. and Uno, Y. (2022). Pre- and Post-Harvest Conditions Affect Polyphenol Content in Strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Plants*, 11(17), p.2220. doi:<https://doi.org/10.3390/plants11172220>.
38. Kumar, L., Ramakanth, D., Akhila, K. and Gaikwad, K.K. (2021). Edible films and coatings for food packaging applications: a review. *Environmental Chemistry Letters*. doi:<https://doi.org/10.1007/s10311-021-01339-z>.
39. Lafarga, T., Colás-Medà, P., Abadías, M., Aguiló-Aguayo, I., Bobo, G. and Viñas, I. (2019). Strategies to reduce microbial risk and improve quality of fresh and processed strawberries: A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, [online] 52, pp.197–212. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.12.012>.
40. Lantz, W. and Swartz, H. (2010). Season-Long Strawberry Production with Everbearers. [online] Dostupno na: <https://www.sare.org/wp-content/uploads/Everbearing-Strawberry-Guide.pdf>. Datum pristupa: 12.02.2024.
41. Martínez, K., Ortiz, M., Albis, A., Gilma Gutiérrez Castañeda, C., Valencia, M. and Grande Tovar, C. (2018). The Effect of Edible Chitosan Coatings Incorporated with *Thymus capitatus* Essential Oil on the Shelf-Life of Strawberry (*Fragaria x ananassa*) during Cold Storage. *Biomolecules*, 8(4), p.155. doi:<https://doi.org/10.3390/biom8040155>.
42. Muñoz-Tebar N., Pérez-Álvarez J. A., Fernández-López J., Viuda-Martos M. (2023). Chitosan edible films and coatings with added bioactive compounds: antibacterial and antioxidant properties and their application to food products: a review. *Polymers*. 15(2): 396.
43. Muthukumar, S., Tranchant, C., Shi, J., Ye, X. and Xue, S.J. (2017). Ellagic acid in strawberry (*Fragaria* spp.): Biological, technological, stability, and human health aspects. *Food Quality and Safety*, 1(4), pp.227–252. doi:<https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx023>.
44. Newerli-Guz, J., Śmiechowska, M., Drzewiecka, A. and Tylingo, R. (2023). Bioactive Ingredients with Health-Promoting Properties of Strawberry Fruit (*Fragaria x ananassa* Duchesne). *Molecules* (Basel, Switzerland), [online] 28(6), p.2711. doi:<https://doi.org/10.3390/molecules28062711>.
45. Niamke, S., Kouame, L.P., Kouadio, J.P., Koffi, D., Faulet, B.M. and Dabonne, S. (2006). Effect of some chemicals on the accuracy of protein estimation by the Lowry method. *Biokemistri*, [online] 17(2). Dostupno na: https://www.academia.edu/98181633/Effect_of_some_chemicals_on_the_accuracy_of_protein_estimation_by_the_Lowry_method Datum pristupa: 14.08.2023.
46. Nunes, M.C.N., Brecht, J.K., Morais, A.M. and Sargent, S.A. (2005). Physicochemical changes during strawberry development in the field compared with those that occur in harvested fruit during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, [online] 86(2), pp.180–190. doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.2314>.

47. Pellis, A., Guebitz, G.M. and Nyanhongo, G.S. (2022). Chitosan: Sources, Processing and Modification Techniques. *Gels*, [online] 8(7), p.393. doi: <https://doi.org/10.3390/gels8070393>.
48. Petrasch, S., Knapp, S.J., van Kan, J.A.L. and Blanco-Ulate, B. (2019). Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, 20(6), pp.877–892. doi:<https://doi.org/10.1111/mpp.12794>.
49. Petriccione, M., Mastrobuoni, F., Pasquariello, M., Zampella, L., Nobis, E., Capriolo, G. and Scortichini, M. (2015). Effect of Chitosan Coating on the Postharvest Quality and Antioxidant Enzyme System Response of Strawberry Fruit during Cold Storage. *Foods*, 4(4), pp.501–523. doi:<https://doi.org/10.3390/foods4040501>.
50. Pisoschi, A.M. and Negulescu, G.P. (2012). Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 01(01). doi:<https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000106>.
51. Popescu, P.-A., Palade, L.M., Nicolae, I.-C., Popa, E.E., Miteluț, A.C., Drăghici, M.C., Matei, F. and Popa, M.E. (2022). Chitosan-Based Edible Coatings Containing Essential Oils to Preserve the Shelf Life and Postharvest Quality Parameters of Organic Strawberries and Apples during Cold Storage. *Foods*, 11(21), p.3317. doi:<https://doi.org/10.3390/foods11213317>.
52. Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 74/08, 156/08, 89/10, 153/11). Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja.
53. Quintana, S.E., Llalla, O., García-Zapateiro, L.A., García-Risco, M.R. and Fornari, T. (2020). Preparation and Characterization of Licorice-Chitosan Coatings for Postharvest Treatment of Fresh Strawberries. *Applied Sciences*, 10(23), p.8431. doi:<https://doi.org/10.3390/app10238431>.
54. Rabab W. Maraiei, and Khaled M. Elsayy. (2017). “Chemical Quality and Nutrient Composition of Strawberry Fruits Treated by γ -Irradiation.” *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, vol. 10, no. 1, 1 Jan. 2017, pp. 80–87, www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1687850716300711, <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2016.12.004>. Datum pristupa: 23.06.2023.
55. Rabasco-Vílchez, L., Bolívar, A., Ramón Morcillo-Martín and Pérez-Rodríguez, F. (2024). Exploring the microbiota of tomato and strawberry plants as sources of bio-protective cultures for fruits and vegetables preservation. *Future Foods*, 9, pp.100344–100344. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fufo.2024.100344>.
56. Rahman, M., Julakha Akter Mukta, Abdullah As Sabir, Dipali Rani Gupta, Mohi-Ud-Din, M., Mirza Hasanuzzaman, Md. Giashuddin Miah, Rahman, M. and Islam, T. (2018). Chitosan biopolymer promotes yield and stimulates accumulation of antioxidants in strawberry fruit. 13(9), pp.e0203769–e0203769. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203769>. Datum pristupa: 26.06.2023.

57. Reshad, R.A.I., Jishan, T.A. and Chowdhury, N.N. (2021). Chitosan and its Broad Applications: A Brief Review. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 12(4), p.em00779. doi:<https://doi.org/10.29333/jcei/11268>.
58. Rhouma, A., Hajji-Hedfi, L., Ben Othmen, S., Kumari Shah, K., Matrood, A.A.A., Okon, O.G. and Pant, D. (2022). Strawberry Grey Mould, a Devastating Disease Caused by the Airborne Fungal Pathogen *Botrytis cinerea*. *Egyptian Journal of Phytopathology*, [online] 50(2), pp.44–50. doi:<https://doi.org/10.21608/ejp.2022.161763.1070>.
59. Riaz A., Lei S., Akhtar H.M.S., Wan P., Chen D., Jabbar S., Abid M., Hashim M.M, Zeng, X. (2018). Preparation and characterization of chitosan-based antimicrobial active food packaging film incorporated with apple peel polyphenols. *International Journal of Biological Macromolecules*. 114: 547-555.
60. Saddozai, A., Raza, S. and Saleem, S. (2012). *Pakistan J. Agric. Res*, [online] 25(3). Dostupno na: <https://www.cabi.org/gara/FullTextPDF/2013/20133358776.pdf>. Datum pristupa: 06.05.2023.
61. Sadowska-Bartosz, I. and Bartosz, G. (2022). Evaluation of The Antioxidant Capacity of Food Products: Methods, Applications and Limitations. *Processes*, 10(10), p.2031. doi:<https://doi.org/10.3390/pr10102031>.
62. Santoyo, G., Kumar, A., Ayomide Emmanuel Fadiji, Olubukola Oluranti Babalola, Puopolo, G. and Santoyo, G. (2023). Agroecological Management of the Grey Mould Fungus *Botrytis cinerea* by Plant Growth-Promoting Bacteria. [online] 12(3), pp.637–637. doi:<https://doi.org/10.3390/plants12030637>.
63. Sareh, H. and Masoud, A. (2023). The Effect of Zinc Oxide, Copper, and Silver Nanoparticles Synthesized by the Green Method for Controlling Strawberry Gray Mold Fungus, *B. Cinerea Pers.* *Journal of Plant Science and Phytopathology*, [online] 7(2), pp.050–065. doi:<https://doi.org/10.29328/journal.jpssp.1001106>.
64. Shaw, D.V. and Larson, K.D. (2005). Strawberry plant named 'Albion'. [online] Dostupno na <https://patents.google.com/patent/USPP16228P3/en>. Datum pristupa: 12.02.2024.
65. Strawberry, M. (2022). Albion Strawberry Variety Info And Grow Guide (*Fragaria x ananassa*). [online] Strawberry Plants. Dostupno na: <https://strawberrypants.org/albion-strawberry-variety-info/>. Datum pristupa: 12.02.2024.
66. Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu (3. izmijenjeno izdanje). (2011). Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja
67. Wang X., Li C., Liang D., Zou Y., Li P., Ma F. (2015). Phenolic compounds and antioxidant activity in red-fleshed apples. *Journal of functional foods*. 18: 1086-1094.
68. Wang, Y., Yan, Z., Tang, W., Zhang, Q., Lu, B., Li, Q. and Zhang, G. (2021). Impact of Chitosan, Sucrose, Glucose, and Fructose on the Postharvest Decay, Quality, Enzyme Activity, and Defense-Related Gene Expression of Strawberries. *Horticulturae*, [online] 7(12), p.518. doi:<https://doi.org/10.3390/horticulturae7120518>.
69. Zhang, H., Zhang, Q., Chen, S., Zhang, Z., Song, J., Long, Z., Yu, Y. and Fang, H. (2020). Enterobacteriaceae predominate in the endophytic microbiome and contribute to the

resistome of strawberry. *Science of The Total Environment*, 727, p.138708.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138708>.

70. Zhao, P., Ndayambaje, J.P., Liu, X. and Xia, X. (2020). Microbial Spoilage of Fruits: A Review on Causes and Prevention Methods. *Food Reviews International*, pp.1–22.
doi:<https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1858859>.

7. PRILOG

7.1. Popis kratica

°C	stupanj Celzijev
m	metar
mm	milimetar
nm	nanometar
g	gram
mg	miligram
µg	mikrogram
mL	mililitar
µL	mikrolitar
min	minuta
mmHg	milimetar živina stupca
mbar	milibar
mmol	milimol
mmol/ dm ³	milimol po decimetru kubnom
rpm	okretaji po minuti (eng. <i>revolutions per minute</i>)
CFU	broj formiranih kolonija (eng. <i>Colony Forming Units</i>)
PCA	eng. <i>Plate count agar</i>
DRBC	eng. <i>Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol</i>
VRBG	eng. <i>Violet Red Bile Glukoza Agar</i>
TPC	eng. <i>Total Polyphenolic Content</i>
TAC	eng. <i>Total Anthocyanin Content</i>
TP	eng. <i>Total Proteins</i>

Životopis

Dora Gavrančić rođena je 26.12.1999. u Dubrovniku. Pohađala je Osnovnu školu Blatu u Blatu na otoku Korčuli od 2006. do 2014.godine. Po završetku osnovne škole, 2014. upisuje Prehrambeno-tehnološku školu u Zagrebu, smjer tehničarka nutricionistkinja koju završava 2018.godine s odličnim uspjehom. Iste godine upisuje preddiplomski studij „Agroekologije“ na Agronomskom fakultetu u Zagrebu kojeg završava 2021 s temom završnog rada „*Određivanje karakterističnih aroma sira*“ pod mentorstvom izv.prof.dr.sc. Lune Maslov Bandić. Diplomski studij Sveučilišta u Zagrebu Agronomski fakultet, studij Agroekologija, usmjerenje Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi upisuje 2021. godine. Tijekom diplomskog studija praksu je odradila u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“.

U akademskoj godini 2018./2019. i 2023./2024. dobitnica je stipendije za darovite studente Dubrovačko-neretvanske županije, a u akademskoj godini 2020./2021. dobitnica je stipendije u STEM područjima znanosti.

Aktivno se služi engleskim jezikom te se izvrsno snalazi u radu na računalu.