

# Određivanje antimikrobne aktivnosti jestive ambalaže

---

Kukec, Valerija

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University North / Sveučilište Sjever**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:122:250349>

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

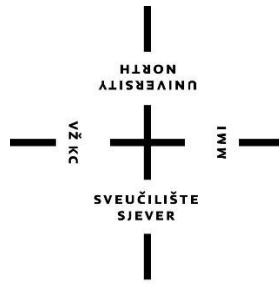
Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-10**



Repository / Repozitorij:

[University North Digital Repository](#)





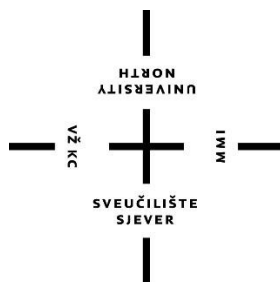
**Sveučilište  
Sjever**

**Završni rad br. 79/ARZO/2024**

## **Određivanje antimikrobne aktivnosti jestive ambalaže**

**Valerija Kukec, 0336038925**

Koprivnica, rujan 2024.



# Sveučilište Sjever

Odjel za Ambalažu, recikliranje i zaštitu okoliša

Završni rad br. 79/ARZO/2024

## Određivanje antimikrobne aktivnosti jestive ambalaže

### Student

Valerija Kukec, 0336038925

### Mentor

Bojan Šarkanj, izv. prof. dr. sc.

Koprivnica, rujan 2024.

# Prijava diplomskog rada

## Definiranje teme diplomskog rada i povjerenstva

ODJEL Odjel za ambalažu, recikiranje i zaštitu okoliša

STUDIJ diplomski sveu ilišni studij Ambalaža, recikiranje i zaštita okoliša

PRESTUPNIK Valerija Kukec

MATIČNI BROJ 0336038925

DATUM 12.6.2023

KOLEGIJ Ekotoksikologija

NASLOV RADA Određivanje antimikrobne aktivnosti jestive ambalaže

NASLOV RADA NA ENGL. JEZIKU Determination of the antimicrobial activity of edible packaging

MENTOR Bojan Šarkanj

ZVANJE izv. prof. dr. sc.

ČLANOVI POVJERENSTVA

1. izv. prof. dr. sc. Krunoslav Hajdek, predsjednik
2. prof. dr. sc. Božo Smoljan, član
3. izv. prof. dr. sc. Bojan Šarkanj, mentor
4. izv. prof. dr. sc. Dean Valdec, zamjena člana
- 5.

## Zadatak diplomskog rada

BAZI 79/ARZO/2024

OPIS

Cilj ovog rada bio je ispitati antimikrobna svojstva čaja osušenog korijena maslačka kao potencijalnog ambalažnog materijala za izradu antimikrobnih jestivih filmova. Ispitivala su se njegova antimikrobna svojstva na odabrane vrste kvasaca i plijesni. Priprema ekstrakta je pogodna za pripremu jestive ambalaže, te će se provesti priprema iste nakon što se ispituju kombinacije s najboljim antimikrobnim djelovanjem.

ZADATAK UBUČEN 12.6.2024

POTPIS MENTORA

SVEUČILIŠTE  
SJEVER



Očisti obrazac

## **Predgovor**

Ovim putem zahvaljujem se mojoj obitelji, prijateljima i dečku na motivaciji i podršci kroz sve godine studiranja i što su uvijek vjerovali i vjeruju u mene.

Posebno hvala mom mentoru, izv. prof. dr. sc. Bojanu Šarkanju na mentoriranju i ukazanom povjerenju prilikom provođenja laboratorijskih analiza te na velikodušnoj pomoći i susretljivosti prilikom izrade ovog diplomskog rada. Zahvaljujem se na suradnji i pomoći oko praktičnog dijela te na svom znanju koje ste mi prenijeli i usadili kroz sve godine mojeg akademskog obrazovanja na svim Vašim kolegijima.

## Sažetak

Pakiranje hrane jedan je od najvažnijih procesa u proizvodnom lancu hrane koji osigurava njenu kvalitetu i trajnost. Kako je hrana često izložena mikrobiološkoj kontaminaciji koja narušava njenu zdravstvenu ispravnost, novije tehnologije pakiranja sve više okreću ekološki prihvatljivijim i biorazgradivim ambalažnim materijalima koji sprječavaju kvarenje hrane i čuvaju njezina nutritivna svojstva. Tako antimikrobni jestivi filmovi postaju sve više prepoznati kao ambalaža budućnosti za pakiranje hrane. Osim što osiguravaju kvalitetu i mikrobiološku ispravnost proizvoda, jestivi ambalažni materijali svojim svojstvima produljuju trajnost hrane te ne stvaraju otpad.

Cilj ovog rada bio je ispitati antimikrobna svojstva čaja osušenog korijena maslačka kao potencijalnog ambalažnog materijala za izradu antimikrobnih jestivih filmova. Ispitivala su se njegova antimikrobna svojstva na odabrane vrste kvasaca i plijesni. Rezultati su pokazali da korijen maslačka, iako bogatog biokemijskog sastava, ne pokazuje inhibitorna svojstva na testirane vrste kvasaca i plijesni.

**Ključne riječi:** jestiva ambalaža, korijen maslačka, antimikrobna aktivnost

## Summary

Food packaging is one of the most important processes in the food production chain that ensures its quality and durability. As food is often exposed to microbiological contamination that impairs its healthiness, newer packaging technologies increasingly turn to more environmentally friendly and biodegradable packaging materials that prevent food spoilage and preserve its nutritional properties. Thus, antimicrobial edible films are increasingly recognized as the packaging of the future for food packaging. In addition to ensuring the quality and microbiological correctness of the product, edible packaging materials extend the shelf life of food and do not create waste.

The aim of this work was to examine the antimicrobial properties of dried dandelion root tea as a potential packaging material for the production of antimicrobial edible films. Its antimicrobial properties against selected types of yeasts and molds were tested. The results showed that the dandelion root, although rich in biochemical composition, does not show inhibitory properties on the tested types of yeasts and molds.

**Key words:** edible packaging, Dandelion Root, antimicrobial properites

## Popis korištenih kratica

<b>MOPS</b>	3-(N-morfolino)propansulfonska kiselina
<b>CFU</b>	jedinica koja stvara kolonije ( <i>eng. Colony Forming Unit</i> )
<b>MBA</b>	agar od mungo graha, ( <i>eng. Mung Bean Agar</i> )
<b>RPMI 1640</b>	medij za rast različitih mikroorganizama, ( <i>eng. Roswell Park Memorial Institute</i> )
<b>CLSI</b>	Institut za kliničke i laboratorijske standarde, ( <i>eng. Clinical &amp; Laboratory Standards Institute</i> )
<b>MIC</b>	minimalna inhibitorna koncentracija, ( <i>eng. Minimal Inhibitory Concentration</i> )



# Sadržaj

1.	Uvod (stil – Naslov 1)	9
2.	Jestiva ambalaža	11
3.	Materijali za izradu jestive ambalaže	16
3.1.	Polisaharidi	16
3.2.	Proteini	19
3.3.	Lipidi	20
3.4.	Fizikalno-kemijska svojstva jestivih ambalažnih materijala	21
3.4.1.	<i>Debljina jestivih filmova i folija</i>	21
3.4.2.	<i>Topljivost jestivih ambalažnih materijala</i>	22
3.5.	Mehanička svojstva	22
3.6.	Barijerna svojstva	23
3.7.	Optička svojstva	24
4.	Antimikrobni jestivi filmovi	25
4.1.	Vrste antimikrobnih sredstava	26
4.2.	Primjena antimikrobnih jestivih filmova	29
5.	MASLAČAK	36
5.1.	Fitokemijski sastav maslačka	37
5.2.	Svojstva maslačka	40
6.	ISTRAŽIVAČKI DIO	41
6.1.	Materijali	41
6.2.	Kemikalije	41
6.3.	Kontrola kvalitete	41
6.4.	Hranjive podloge	42
6.5.	Kvasci i plijesni	42
6.6.	Metode rada	44
6.6.1.	<i>Priprema čaja od sušenog korijena maslačka</i>	44
6.6.2.	<i>CLSI metoda mikrorazrijeđenja hranjive podloge</i>	45
6.6.3.	<i>Metode određivanja antimikrobne aktivnosti korijena maslačka</i>	53
6.6.4.	<i>Metoda određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)</i>	53
6.6.5.	<i>Čitač mikrotitarskih pločica</i>	53
7.	REZULTATI	54
7.1.	Antimikrobno djelovanje uzorka čaja sušenog korijena maslačka na kvasce	54
7.2.	Antimikrobno djelovanje uzorka čaja sušenog korijena maslačka na plijesni	59
8.	ZAKLJUČAK	66
9.	LITERATURA	67

## 1. Uvod (stil – Naslov 1)

Ambalažna industrija i načini pakiranja hrane neprestano se razvijaju te se pronalaze novi, ekološki prihvatljiviji načini pakiranja hrane. Jestiva ambalaža predstavlja novitete u tehnologiji pakiranja hrane koja omogućava personaliziraniji pristup proizvodu. Pod pojmom jestiva ambalaža podrazumijevamo filmove i premaze koji se konzumiraju zajedno sa proizvodom. Dok se jestive folije koriste u obliku vrećica, premazi se najčešće upotrebljavaju kao zaštita na voću i povrću te mesu i drugim prehrambenim proizvodima. Jestiva ambalaža sigurna je za konzumaciju jer je proizvedena od prirodnih materijala.

Da bi se neki materijal koristio za izradu jestive ambalaže on prvenstveno mora biti jestiv te siguran za ljudsku konzumaciju. Materijali koji se koriste za izradu jestive ambalaže su polisaharidi, proteini i lipidi. Polisaharidi su ugljikohidrati nastali polimerizacijom monosaharida i disaharida, a razlikujemo one biljnog, životinjskog i morskog podrijetla. Jako su zastupljeni u prirodi, a neki od najpoznatijih polisaharida su škrob, celuloza, glikogen i pektini. Polisaharidni filmovi dobra su barijera za kisik i aromu, a nastaju prekidom interakcija između dugolančanih polimernih segmenata tijekom procesa koacervacije. Polisaharidni jestivi filmovi poznati su po svojoj čvrstoći i učinkovitoj barijeri za ulja i lipide. Negativna strana ovih filmova je slaba barijera za vlagu, no to je moguće modificirati dodavanjem lipofilnih tvari prilikom izrade filma. Proteini su složeni polimeri, a razlikujemo vlaknaste i globularne. Vlaknasti su topivi u vodi, dok se globularni moraju denaturirati prije stvaranje filma. Jestivi filmovi na bazi proteina odlična su barijera za hidrofobne spojeve te plinove poput CO<sub>2</sub> i O<sub>2</sub>. Razlikujemo proteine biljnog i životinjskog podrijetla, a neki od najčešće korištenih su keratin, kolagen i želatina. Lipidi su hidrofobni spojevi zbog čega njihovi filmovi imaju odličnu barijeru za vlagu i kisik, dijele se na polarne i nepolarne, a neke od njihovi prednosti su: čvrstoća, očuvanje hranjivih tvari i drugo. Često se koriste kao premazi na voću i povrću kako bi očuvali njihovu svježinu.

Pod fizikalno-kemijska svojstva jestivih ambalažnih materijala spadaju debljina, topljivost, mehanička, barijerna i optička svojstva. Debljina je povezana sa mehaničkim i barijernim svojstvima, a utječe na trajnost proizvoda. Najviše ovisi o viskoznosti otopine od koje se izrađuje film. Tako one vrlo viskozne otopine stvaraju vrlo debele filmove, dok one nisko viskozne stvaraju tanje filmove. Debljina filmova može se mjeriti kontaktnom i nekontaktnom metodom. Topljivost je svojstvo koje govori o stabilnosti filmova u vodenom mediju, a ispitivanjem mehaničkih svojstava određuje se čvrstoća jestivog filma. Na mehanička svojstva utječu udio vode i fizički integritet proizvoda. Mehanička svojstva filmova moguće je ispitati određivanjem vučne čvrstoće, čvrstoće na kidanje, istezanje na lomnoj točki i otpornosti na habanje. Sjaj, transparentnost i boja filma pripadaju optičkim svojstvima. Jedno od važnijih svojstava je sjaj filma, a njegove

karakteristike određuju se sastavom i koncentracijom tekućine za smanjenje površinske napetosti vode i drugim parametrima. Optička svojstva vrlo su osjetljiva na temperaturu i vlagu.

Jedna od glavnih uloga jestivih filmova zaštita je proizvoda od mikrobiološke kontaminacije kako bi se sačuvala njezina kvaliteta. Antimikrobni jestivi filmovi odlična su alternativa za sprječavanje rasta mikroorganizama na prehrambenim proizvodima. Smanjuju mogućnost kvarenja hrane te održavaju njenu kvalitetu i nutritivni sastav, a utječu i na produljenje roka trajanja proizvoda. Jestivi filmovi i premazi u potpunosti prekrivaju neki prehrambeni proizvod bez da utječu na senzorska i nutritivna svojstva istog. Antimikrobni jestivi filmovi i premazi izrađuju se od raznih materijala, a najčešće tvari za njihovu izradu su organske kiseline, kitozan, biljni ekstrakti i drugo. Antimikrobni jestivi filmovi imaju široku primjenu na brojnim prehrambenim proizvodima. Tako se upotrebljavaju za zaštitu raznih vrsta voća i povrća, poput jagoda, rajčica, manga i ostalih. Često su ispitivani i korišteni premazi na bazi kitozana koji se mogu koristiti za premazivanje grožđe, ali i brokule. Kako je meso prehrambeni proizvod koji ima ograničen vijek trajanja i lako se kontaminira raznim mikroorganizmima, brojni jestivi antimikrobni filmovi našli su upotrebu i u njegovom pakiranju. Tako se među najčešće korištenim filmovima koriste oni na bazi natrijevog alginata. Premazi na bazi alginata koriste se i za premazivanje raznih vrsta riba. Mliječni proizvodi također su lako kvarljivi, a jedan od najpoznatijih svakako je sladoled. Njegovu kvalitetu i ispravnost moguće je zaštititi filmovima na bazi aloe vere.

Maslačak je biljka široko rasprostranjena te je se može naći gotov svugdje u svijetu. Svi dijelovi ove biljke sadrže mliječni sok, a od davnina je zabilježena njena upotreba u razne medicinske svrhe. Korijen maslačka je njegov najljekovitiji dio te se smatra jednom od najjačih biljnih tvari za eliminaciju toksina. Ima bogat kemijski sastav, a ističe se svojim protuupalnim, antioksidativnim i antimikrobnim svojstvima.

U ovom radu predstavljene su glavne prednosti i svojstva jestive ambalaže te je detaljno opisana antimikrobna jestiva ambalaža. Navedeni su brojni primjeri njene upotrebe te su prikazane glavne značajke biljke maslačak. Iako još nije dovoljno istražen, maslačak zbog svog bogatog kemijskog sastava postaje sve važnija biljka u daljnjim istraživanjima za potencijalnu upotrebu u izradi jestivih filmova.

Cilj rada bio je odrediti antimikrobnu aktivnost čaja od osušenog korijena maslačka kako bi se utvrdilo pruža li inhibitorno djelovanje na odabrane vrste kvasaca i plijesni.

## 2. Jestiva ambalaža

Jestivom ambalažom nazivamo razne filmove, folije i premaze koji se mogu sigurno konzumirati zajedno sa proizvodom koji je u njih upakiran. Filmovi se uglavnom koriste u obliku obloga i vrećica, a premazi se najčešće upotrebljavaju kao zaštita na prehrambenim proizvodima. Jestiva ambalaža osigurava kvalitetu hrane, produžuje rok trajanja te u određenoj mjeri smanjuje otpad [1]. Ova vrsta ambalaže sigurna je za konzumaciju jer je proizvedena od biljnih i životinjskih ekstrakata ili dobivena od prirodnih polimera. U tablici 1. prikazani su materijali od kojih je moguće izraditi jestivu ambalažu [2].

Tablica 1 Materijali za izradu jestive ambalaže [2]

VRSTA MATERIJALA	POLISAHARIDI	LIPIDI	PROTEINI
IZVORI	<ul style="list-style-type: none"><li>● Škrob</li><li>● Alginat</li><li>● Karagenan</li><li>● Derivati celuloze</li><li>● Pektin</li><li>● Agar</li><li>● Kitozan/hitin</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>● Vosak</li><li>● Mineralna ulja</li><li>● Biljno ulje</li><li>● Surfaktanti</li><li>● Acetilirani monogliceridi</li><li>● Parafinski vosak</li><li>● Karnauba vosak</li><li>● Esteri glicerola</li><li>● smola</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>● Želatina</li><li>● Kukuruz zein</li><li>● Pšenični gluten</li><li>● Proteini soje</li><li>● Kazein</li><li>● Proteini mung graha</li></ul>

Materijali koji se koriste za izradu jestive ambalaže napravljeni su od spojeva koji ne predstavljaju opasnost za ljudsko zdravlje. Kod izrade jestivih filmova i premaza primjenjuje se promjena debljine materijala te minimalna promjena materijalnog sastava i strukture. Tako je optimalna debljina uglavnom manja od 0,3 mm. Debljina je vrlo važna kod izrade filmova te je

obavezno testiranje istih na gutanje kako bi se provjerilo jesu li sigurni i zadovoljavaju li sve zahtjeve kvalitete. Također, velika pažnja posvećena je i provjeri mikrobiološke ispravnosti filmova obzirom da se većina koristi za pakiranje prehrambenih proizvoda [3].

Jestiva ambalaža ima razne funkcije. Prvenstveno, uloga joj je omogućiti selektivnu barijeru za plinove, masti, ulja i vlagu. Također, bitno je da očuva senzorska svojstva hrane kako tijekom skladištenja ne bi došlo do promjene mirisa, boje i okusa proizvoda. Iako su navedene funkcije identične sintetskim ambalažnim materijalima, jestivi ambalažni materijali ističu se od sintetskih svojim brojnim prednostima. Prvenstveno, otporni su na migraciju vodene pare te su biorazgradivi. Mogu se konzumirati zajedno sa proizvodom pri čemu ne nastaje otpad te se proizvode isključivo iz biorazgradivih materijala [4]. Također, sve više ljudi postaje ekološki osviješteno i obraćaju pažnju na to koliko otpada stvaraju te u kakvoj ambalaži kupuju proizvod. Specifičnost jestive ambalaže leži upravo u tome što nema stvaranja otpada i tipičnog ciklusa otpada. Isto tako, nema potrebe za recikliranjem čime se još na jedan način čuvaju izvori energije te voda, ali i sam okoliš. Većina jestive ambalaže je jestiva i/ili se može kompostirati zbog čega se lako razgrađuje i ne puni odlagališta i reciklažna dvorišta [5]. Na slici 1. je primjer jestive ambalaže za vodu koja je u potpunosti biorazgradiva, s sve s ciljem smanjenja proizvodnje plastičnih PET boca za vodu [6].

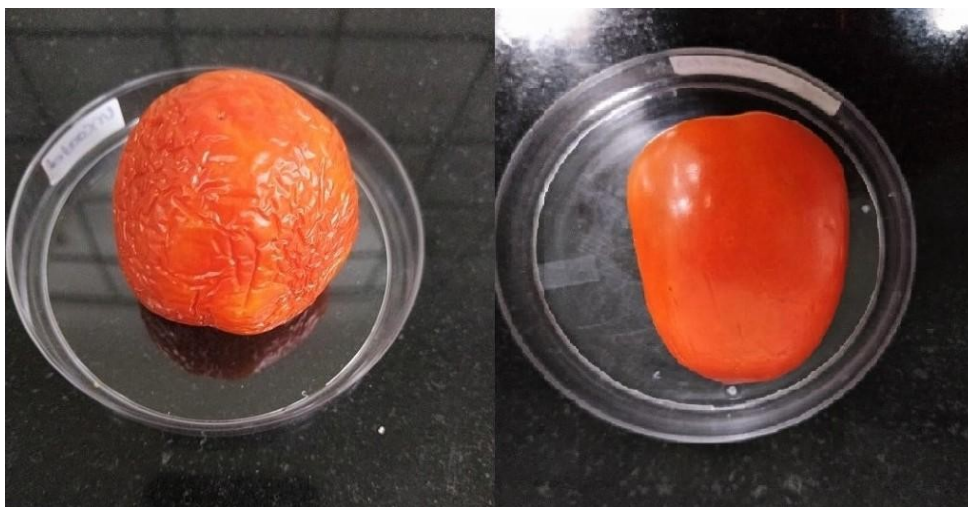


*Slika 1 Primjer jestive ambalaže za vodu [6]*

Iako se konzumira zajedno s proizvodom, prirodna jestiva ambalaža ne mijenja njegov okus već je jednako hranjiva i ukusna. Također, neka se jestiva ambalaža dodaje s ciljem kako bi proizvodu poboljšala organoleptička svojstva, poput boje, mirisa pa i okusa.

Iako se jestiva ambalaža smatra inovacijom u ambalažnoj industriji, zastupljena je već stoljećima kao metoda konzerviranja hrane. Najstariji primjer upotrebe jestive ambalaže u ljudskoj povijesti zasigurno je onaj koji datira još iz vremena Mezopotamije. Naime, Sumerani su osmislili izradu kobasica tako što su koristili životinjska crijeva koja su punili mesom i time dobili prvi jestivi ambalažni materijal koji čuva proizvod te je ujedno siguran za konzumaciju. Jedan od najstarijih primjera upotrebe jestive ambalaže svakako je premazivanje voća voskom kako bi se

spriječio gubitak vode tijekom transporta [4]. Slika 2. prikazuje primjer voća bez i sa jestivim premazom [7].



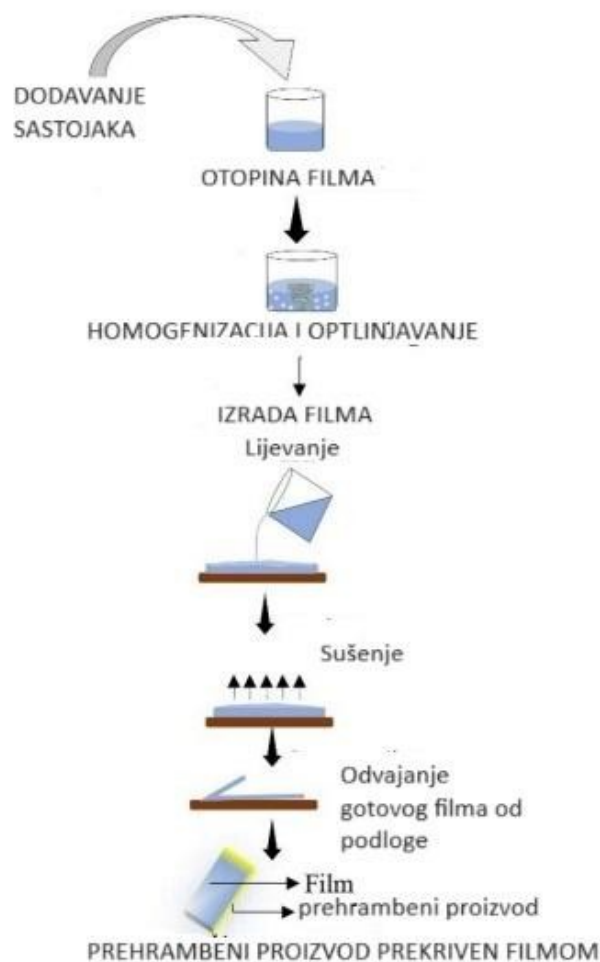
*Slika 2 Voće sa i bez jestivog premaza [7]*

Nadalje, jedna od često korištenih metoda bila je i „uljenje“, na engleskom poznato kao „larding“, voća, povrća i mesa kako bi se spriječio gubitak vlage. Svježina orašastih plodova osiguravala se prevlakom saharoze i šećernih derivata. 1930-ih godina prošloga stoljeća sve su više postajali zastupljeni lipidni premazi i premazi od voska. Osim za sprječavanje dehidracije, premazi su služili i za postizanje visokog sjaja na voću i povrću. Krajem 20. stoljeća, odnosno razvojem plastike i plastičnih ambalažnih materijala upotreba jestive ambalaže jedno je vrijeme stagnirala. No, zahvaljujući podizanju svijesti o zaštiti okoliša i održivoj i ekološki prihvatljivoj ambalaži jestivi ambalažni materijali ponovo su dobili na važnosti i krenuli se intenzivno razvijati [3].

Glavni predstavnici jestivih ambalažnih materijala su jestivi filmovi i premazi. Iako zvuče isto, razlikuju se uvelike po fizikalnim svojstvima te načinu izrade. Dok se jestivi filmovi dobivaju u obliku čvrstih laminiranih ploča, premazi dolaze u tekućem obliku. Najvažniji materijali za njihovu izradu su: materijal koji stvara film, otapalo i razni aditivi. Filmovi se apliciraju na proizvod te se prilikom konzumacije mogu skinuti ili konzumirati zajedno s proizvodom. S druge strane, premazi se prskaju, premazuju ili uranjanjem nanose na proizvod. Osušeni sloj premaza također je moguće prije upotrebe proizvoda isprati ili konzumirati zajedno s njim.

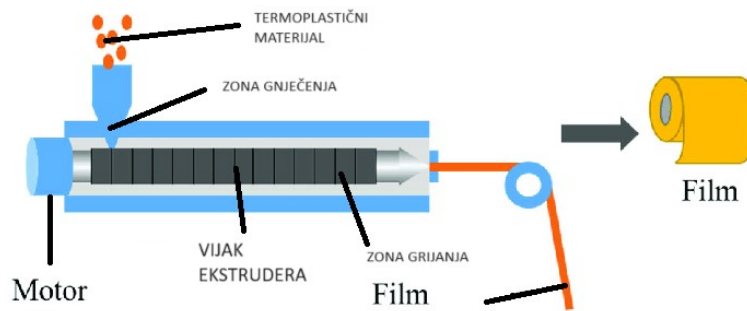
Za jestive filmove je bitno da imaju dobra barijerna svojstva za vodenu paru. Naime, trebali bi imati nisko ili nikakvo propuštanje vodene pare koje se ne bi smjelo povećati značajno s povećanjem relativnog tlaka. Također, filmovi bi trebali biti izdržljivi i na mehanička opterećenja i naprezanja [8]. To je vrlo bitno kako prilikom transporta proizvoda, a uslijed primjene određene sile na istog ne bi došlo do oštećenja filma koje bi posljedično dovelo do kontaminacije ili kvarenja proizvoda. Općenito, postoje dva procesa za izradu jestivih filmova: mokri i suhi proces. Mokri postupak najčešće se koristi kao metoda izrade filma u laboratoriju, a sastoji se od 3 glavna koraka: otapanje, lijevanje i sušenje. Najprije je potrebno dispergirati biopolimer u otapalo. U otopinu

moguće je dodati razne aditive poput antimikrobnih supstanci ili plastifikatora. Nastala otopina zatim se izlije na ravnu površinu kako bi se osušila na odgovarajućoj temperaturi i relativnoj vlažnosti. Lijeva se u ravnu posudu ili staklenu ploču obloženu teflonom, a sušenje se može odvijati u vakuumskim pećnicama, mikrovalnima ili pećnicama na vrući zrak Slika 3. pokazuje shematski prikaz izradu jestivog filma mokrim postupkom [3].



Slika 3 Shematski prikaz izrade jestivog filma mokrim postupkom [3]

Suhi postupak podrazumijeva izradu filma prateći termoplastično ponašanje tvari pri niskim razinama vlage. Obuhvaća nekoliko različitih metoda, a to su ekstruzija, kompresijsko kalupljenje i injekcijsko kalupljenje. Metoda koja se najčešće upotrebljava u komercijalnoj izradi filmova je ekstruzija, a obuhvaća tri faze: napajanje, gnječenje i grijanje. U prvoj fazi se miješaju sastojci za izradu filma i to pod kompresijom zraka kako bi se smanjio sadržaj vlage. Sastojci se dalje usitnjavaju i gnječe prilikom čega se povisuje temperatura. To dovodi do stvaranja taline od koje se istiskivanje kroz mlaznicu stvara tekući tanki sloj iz koje hlađenjem dobivamo film. Na slici 4. prikazano je shematski dobivanje filma suhim postupkom [3].



*Slika 4 Shematski prikaz ekstruzije za izradu jestivog filma suhim postupkom [3]*

Što se tiče jestivih premaza, postoji također nekoliko načina za njihovo apliciranje na proizvod. Uranjanje proizvoda u premaz definitivno je najstarija metoda koja se koristi kod voća, povrća i ostalih prehrambenih proizvoda, a idealna je za one proizvode koji imaju neravnu površinu. Kada je potrebno tankim slojem obložiti samo jednu stranu proizvoda, najčešće se koristi metoda špricanja. Ova metoda jedna je od preciznijih te se uglavnom koristi kod proizvoda velike površine. S druge strane, za proizvode male veličine primjenjuje se obrada u fluidiziranom stanju. Jestivi premaz dodaje se na način da se proizvod dodaje u rotirajući fluidizirani stroj [3].

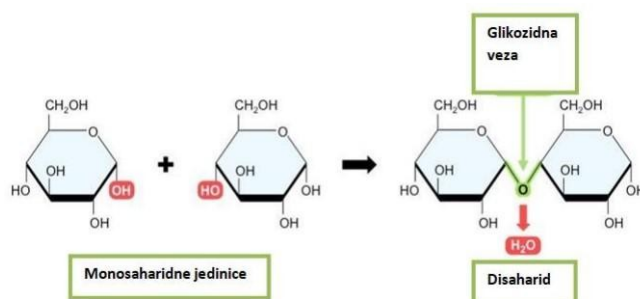


### 3. Materijali za izradu jestive ambalaže

Glavna komponenta za izradu jestive ambalaže je neka jestiva biomakromolekula sposobna za stvaranje kontinuiranog i kohezivnog sloja [9]. Da bi se neki materijal koristio za izradu jestivih filmova i premaza, mora prvenstveno biti jestiv, siguran za ljudsku konzumaciju te mora imati sposobnost stvaranja filma, odnosno premaza. Tvari koje zadovoljavaju ta svojstva su polisaharidi, lipidi i proteini.

#### 3.1. Polisaharidi

Polisaharidi su složeni ugljikohidrati koji nastaju polimerizacijom monosaharida i disaharida formirajući specifičnu strukturu vezanu glikozidnom vezom. Slika 5. prikazuje shematski prikaz nastajanja polisaharida [5].



Slika 5 Nastajanje polisaharida [5]

Ako su sastavljeni samo od jedne vrste monosaharida nazivaju se homopolisaharidi, a oni od sastavljeni od više različitih vrsta monosaharida heteropolisaharidi [10]. Ovisno o porijeklu, polisaharide možemo podijeliti na one biljnog, životinjskog, morskog i mikrobnog porijekla. Netoksični su, jestivi te ih ima u izobilju u prirodi, a neki od primjera polisaharida su: škrob, celuloza, pektini, glikogen te hitin. U tablici 2. prikazane su neke vrste polisaharida, aditivi te način primjene kao ambalažnog materijala [5].

Tablica 2 Vrste polisaharida te njihova primjena kao jestivog ambalažnog materijala [5]

IZVOR MATERIJALA	ADITIVI	PRIMJENA
Biljni škrob kasave	Nanokristali škroba	Premaz na Huannguan kruški skladištenoj pri temperaturi od 20°C
Aloe vera	Esencijalno ulje limuna	Premaz na Hayward kiwiju
Biljni škrob krumpira	Thy me esencijalno ulje	Premaz na škampima pri rashlađenim uvjetima

Nanoemulzija kitozana	Thy me esencijalno ulje	Premaz za svinjsko meso skladišteno pri 4°C
životnjskog porijekla		

U molekuli polisaharida prisutne su slobodne hidroksilne skupine koje iniciraju vezanje vodika sa dodanim aktivnim tvarima. Upravo ovo svojstvo omogućuje da su jestivi premazi od polisaharida dobra barijera za kisik i aromu. Generalno, polisaharidni jestivi filmovi nastaju prekidom interakcija između dugolančanih polimernih segmenata tijekom procesa koacervacije. Naime, tijekom navedenog procesa dolazi do razdvajanja koloidne suspenzije u dvije tekuće faze te isparavanja otapala pri čemu se stvara nova međumolekularna hidrofilna i vodikova veza te u konačnici nastaje matrica filma. Također, jestivi filmovi od polisaharida poznati su po svojoj velikoj čvrstoći koja se prepisuje zbijenoj strukturi molekule. Jedna od prednosti im je i što pružaju učinkovitu barijeru uljima i lipidima. S druge strane, polisaharidni filmovi imaju hidrofilna svojstva zbog čega predstavljaju slabu barijeru za vlagu što dosta utječe na njihova fizikalna svojstva. Međutim, moguće je reducirati hidrofilna svojstva materijala dodavanjem lipofilnih tvari (npr. vosak) prilikom izrade filma. Tako se polisaharidi mogu lako modificirati kako bi se poboljšala njihova fizikalno-kemijska svojstva, a najčešće metode su: dodavanje soli, promjena otapala, toplinska želatinizacija, promjena pH, kemijska modifikacija hidroksilnih grupa i druge [5]. Kako bi se usporio proces zrenja prehrambenih proizvoda i produžio rok trajanja, na polisaharidne ambalažne materijale mogu se dodati razna antimikrobna sredstva i antioksidansi. Polisaharidni ambalažni materijal također imaju veliku sposobnost sorpcije. Razlog tomu je njihova hidrofilnost, a ovo svojstvo omogućuje da, kada se konzumiraju, na sebe vežu radionuklide, ione metala te druge toksične spojeve koje na taj način izbacuju van iz tijela.

Škrob kao prirodni polimer predstavlja obećavajuću biorazgradivu sirovinu za proizvodnju ambalaže [11]. Obzirom da je visoko zastupljen u prirodi, jeftin te jestiv, često je proučavan i testiran za izradu jestivih filmova i premaza. Općenito, sastoji se od amiloze i amilopektina. Upravo je amiloza tvar koja je zaslužna za stvaranje jestivog filma. Amiloza je linearni polimer izgrađen od stotinjak ostataka glukoze koji su povezani  $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -glikozidnim vezama, a amilopektin je razgranati polimer koji se sastoji od dugih lanaca ostataka glukoze. Kod prirodnog škroba molekule su raspoređene u obliku škrobnih granula koje su netopljive u hladnoj vodi. Međutim, kada se zagrijavaju u vodi, kristalna struktura se poremeti što dovodi do interakcije vode s hidroksilnim skupinama amiloze i amilopektina te se granule djelomično otape. Da bi dobili film iz škroba potrebno je provesti želatinizaciju, a za to se najčešće koriste amiloza, škrob s visokim udjelom amiloze i hidroksipropilni škrob s visokim udjelom amiloze. Filmovi jestivog škroba najčešće se upotrebljavaju u pekarstvu i slastičarstvu. Slika 6. prikazuje primjer jestivog filma napravljenog od pektina iz pirea od papaje [9].



*Slika 6 Jestivi film od pektina [9]*

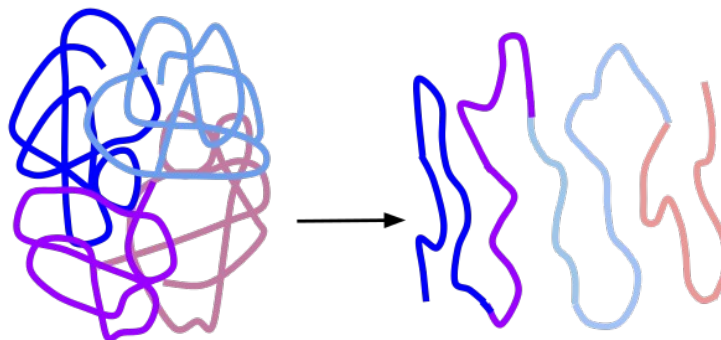
Celuloza je linearni homopolisahrid koji se također primjenjuje u izradi jestivih filmova. Sastoji se od tisuća ponavljajućih jedinica D-glukoze koje su povezane  $\beta$ -1,4 glikozidnim vezama, a odlikuje se svojom hidrofilnošću i sposobnošću kemijske modifikacije [12]. Izvrstan je odabir materijala za izradu filma zbog svoje čvrstoće, mehaničke otpornosti te trajnosti. Također, nema toksična svojstva, blokira UV zračenje, ima sposobnost prenosa antioksidativnih i antibakterijskih tvari te je biorazgradiva. Od celuloze je moguće lako izraditi razne kemijske derivate te omogućuje lako formiranje filmova. Iako naizgled savršen ambalažni materijal, proizvodnja celuloznih jestivih filmova vrlo je ograničena zbog njezine nerazgradivosti u vodi. Razlog njene netopljivosti u organskim otapalima su čvrsto zbijene vodikove veze u njejoj strukturi te kristalnost [13]. Međutim, raznim procesima derivatizacije moguće je dobiti iskoristive celulozne derivate za izradu jestivih filmova. Tako se celulozni filmovi često upotrebljavaju za pakiranje voća i povrća, a primjer takvog pakiranja prikazan je na slici 7 [14].



*Slika 7 Celulozni jestivi film za pakiranje hrane [14]*

## 3.2. Proteini

Proteini su složeni polimeri, a sastoje se od aminokiselina povezanih kovalentnom peptidnom vezom. Razlikujemo vlaknaste i globularne proteine, odnosno one topive i netopive u vodi. Globularni se, zbog svoje specifične strukture, moraju denaturirati prije stvaranja filma, a primjer kako izgleda denaturacija prikazan je na Slici 8 [16].



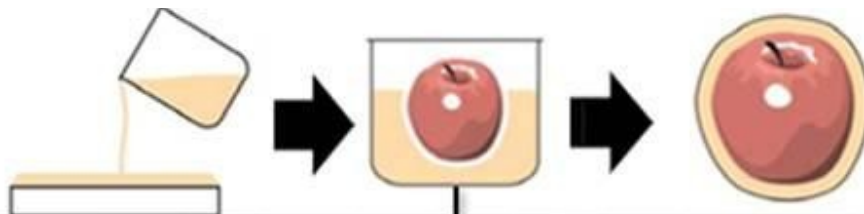
*Slika 8 Denaturacija globularnog proteina [16]*

Jestivi filmovi na bazi proteina imaju razne mehaničke i fizikalne karakteristike. Hidrofilni su što znači da pružaju slabu do umjereno barijeru za vodu. No, zato su odlična barijera za hidrofobne spojeve, poput ulja. Odlična su barijera za plinove poput CO<sub>2</sub> i O<sub>2</sub>, lipide te arome, a koriste se na raznim prehrambenim proizvodima kako bi smanjili gubitak vode, ograničili unos kisika, ali i pružili fizičku zaštitu. Postoje različite vrste proteina, poput proteina biljnog podrijetla iz kukuruza, pšenice i soje, te proteina životinjskog podrijetla kao što su kolagen, keratin, kazein i želatina [14].

Jestivi filmovi na bazi proteina također se mogu koristiti i u višeslojnom pakiranju. Naime, kod višeslojne ambalaže jestivi film na bazi proteina je unutarnji sloj ambalaže koji je u direktnom kontaktu s prehrambenim proizvodom. Obzirom na dobra mehanička i barijerna svojstva, vrlo je moguće i teži se ka tome da ovi filmovi jednog dana u potpunosti zamjene sintetičke polimerne filmove. Proteinske filmove moguće je koristiti kao premaze na mesnim proizvodima, no tada često dolazi do njihove reakcije sa proteolitičkim enzimima iz mesa.

Filmovi izrađeni od proteina mlijeka sadrže razne antimikrobne i antioksidativne tvari kojima poboljšavaju kvalitetu hrane. Prozirni su i fleksibilni bez mirisa, a sadrže proteine sirutke i kazein. Većina proteina mlijeka zapravo se nalazi u obliku proteina kazeina [1]. Od kazeina se mogu izraditi filmovi koji su stabilni pri različitim pH vrijednostima, temperaturama i koncentracijama soli. Također, kazeinski filmovi testiraju se za izradu vodotopivih vrećica, ali i kao premazi za svježere proizvode, sušeno voće te smrznutu hranu.

Kolagen je najzastupljeniji protein u tijelu, a nalazi se u mišićima i tkivima. Njegovom razgradnjom pomoću vode nastaje želatina. U suhom obliku, želatina je tvar bez boje i okusa. Kako bismo dobili film od želatine, potrebno ju je otopiti u vrućoj vodi. Nastala otopina oblikuje se metodom lijevanja te se suši u pećnici. Na slici 9. prikazana je primjena filma od želatine na premazivanje jabuke [16].



Slika 9 Premaz od želatine na jabuci [16]

### 3.3. Lipidi

Za razliku od polisaharida i proteina, lipidi nisu polimeri te nemaju samoodrživu strukturu. Zbog toga su dosta krhki te ne tvore kohezivne strukture. Hidrofobni su što im omogućava odličnu barijeru za vodu i vodenu paru. Naime, molekula lipida u vodi dolazi u četiri različite strukture koje stvaraju različite vrste micela obzirom da voda posjeduje jaki kohezivni samoprivlačni odbijajući hidrofobni učinak [17]. Postoje dvije grupe i četiri podgrupe lipida koji se koriste u proizvodnji jestivih filmova, a prikazani su u tablici 3 [17].

Općenito, lipide možemo podijeliti na nepolarne i polarne. Imaju brojne prednosti za izradu jestivih filmova, a neke od njih su: čvrstoća, barijera za vlagu i zrak, očuvanje hranjivih tvari, nosači aktivnih tvari i drugo. Od svih vrsta lipida, vosak se ističe najvećom barijerom za vlagu. Nepolaran je te je u potpunosti netopiv u vodi, a razlikujemo prirodne i sintetske voskove. Zbog toga su voskovi najučinkovitija lipidna barijera za vodu te imaju široku primjenu u izradi jestivih filmova. Tako se često koriste kao premazi na voću i povrću kako bi očuvali njihovu svježinu i spriječili isparavanje vode. Negativna strana primjene voskova u jestivoj ambalaži je njihov neugodan okus i tekstura te masna površina. Nadalje, esencijalna ulja sadrže visoka antimikrobna i antioksidativna svojstva zbog čega reduciraju lipidnu oksidaciju. Tako se eterično ulje timijana, klinčića i limuna dodaje biopolimernoj matrici kako bi se poboljšala antimikrobna svojstva folije za pakiranje hrane. Neutralni esteri glicerola i masnih kiselina mogu se koristiti također, sami ili u kombinaciji sa drugim tvarima, kao jestivi premazi na prehrambenim proizvodima. Primjerice, premaz od suncokretovog ulja koristio se za svinjsko meso zaštitu od oksidacije i barijera za vodu [1]. S druge strane, trigliceridi su vrsta polarnih lipida kod kojih su kratkolančani trigliceridi topivi

u vodi, a dugolančani netopivi. Njihova otpornost na vodu može se ojačati dodavanjem palmitinske, stearinske ili laurinske kiseline.

Tablica 3 Podjela lipida [17]

NEPOLARNI netopivi	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Parafinsko ulje</li> <li>● Voskovi sa dugolančanim masnim kiselinama</li> </ul>
POLARNI	
1. Grupa NETOPIVI U VODI AMFIFILI	<ul style="list-style-type: none"> <li>● trigliceridi, digliceridi</li> <li>● kolesterol</li> <li>● vitamini A, D, E i K</li> </ul>
2. grupa NETOPIVI U VODI AMFIFILI	<ul style="list-style-type: none"> <li>● fosfolipidi</li> <li>● monogliceridi</li> </ul>
3. grupa TOPIVI AMFIFILI	<ul style="list-style-type: none"> <li>● deterdženti</li> <li>● soli i dugolančane masne kiseline</li> </ul>
4. grupa TOPIVI AMFIFILI	<ul style="list-style-type: none"> <li>● soli žučnih kiselina</li> <li>● sapuni smole</li> </ul>

### 3.4. Fizikalno-kemijska svojstva jestivih ambalažnih materijala

#### 3.4.1. Debljina jestivih filmova i folija

Debljina je vrlo bitno svojstvo filmova koje je usko povezano sa mehaničkim i barijernim svojstvima. Ona utječe na trajnost proizvoda, ali i na njegova biološka svojstva. Debljina prvenstveno ovisi o viskoznosti otopine od koje se izrađuje film. Naime, ukoliko je otopina jako

viskozna ostane skupljena te nastane debeli film. S druge strane, ukoliko imamo tekućinu niske viskoznosti, ona je vrlo tekuća i moguće ju je razliti u tanki sloj čime dobivamo tanji film. O debljini filma ovisi i propusnost vode i vodene pare. Naravno, kod debljih filmova teže dolazi do propuštanja vodene pare, nego kod onih tanjih. Općenito, postoje dvije metode mjerenja debljine filma, a to su kontaktna i ne kontaktna metoda. Kod kontaktnog mjerenja, kao što i samo ime govori, debljina se mjeri mikrometrom koji je u direktnom dodiru sa filmom (Slika 10). Iako je ova metoda vrlo pouzdana, postoji velika opasnost od oštećenja filma prilikom pritiska. S druge strane, ne kontaktna metoda je također vrlo pouzdana i točna, no sigurnija i bez rizika da se film ošteti.



*Slika 10 Mikrometar [16]*

### **3.4.2. Topljivost jestivih ambalažnih materijala**

Obzirom da se radi o jestivim ambalažnim materijalima, jedno od bitnijih svojstava svakako je i topljivost filma. Pošto filmovi mogu biti izrađeni od raznih vrsta materijala, možemo ih podijeliti na hidrofobne i hidrofilne. Ovo svojstvo govori nam o stabilnosti filma u vodenom okruženju. Tako je prehrambene proizvode osjetljive na migraciju vode potrebno kombinirati sa hidrofobnim filmovima i premazima kako bi se očuvala voda u proizvodu, ali i zadržala njegova kvaliteta i svježina. S druge strane, hidrofilne jestive ambalažne materijale poželjno je koristiti kada je cilj da se film otopi tijekom konzumacije proizvoda [19].

### **3.5. Mehanička svojstva**

Ispitivanjem mehaničkih svojstava određuje se čvrstoća jestivog filma. Mehanička svojstva uvelike ovise o udjelu vode i fizičkom integritetu proizvoda. Nekolicina znanstvenika dokazala je u svojim istraživanjima kako jestivi filmovi utječu na očuvanje tvrdoće svježeg voća i povrća [20]. Testovi kojima se ispituju mehanička svojstva su: vučna čvrstoća, čvrstoća na kidanje, istezanje na lomnoj točki i otpornost na habanje. Općenito, jestive folije imaju manju vučnu čvrstoću od folija

za pakiranje izrađenih od plastike. Također, jestivi filmovi imaju dobro svojstvo istezanje u usporedbi s onim plastičnima. Premaz kod jestivih filmova omogućuje barijeru za vlagu te smanjuje gubitak hranjivih tvari iz proizvoda u okoliš. Isto tako, filmovi stvaraju barijeru za zrak čime se minimalizira prijenos kisika u hranu i iz nje. Na taj način sprječava se oksidacija prehrambenog proizvoda te produljuje njegova trajnost. Vлага u atmosferi mnogo utječe na mehanička svojstva jestivog filma. Kako vлага reagira s polimernom jestivom matricom, narušava se vučna čvrstoća te cjelovitost filma. Iako polisaharidi i proteini mogu stvarati snažne međumolekulske veze čime nastaju filmovi odličnih mehaničkih svojstava, ista im opada u prisutnosti visoke koncentracije vlage. Razlog tome je što su navedeni filmovi po prirodi hidrofilni te vežu vodu na sebe. Iz tog razloga, u takve vrste filmova dodaju se razni voskovi koji su hidrofobne naravi te uspješno stvaraju barijeru vodi i zadržavaju mehanička svojstva filma [1].

### **3.6. Barijerna svojstva**

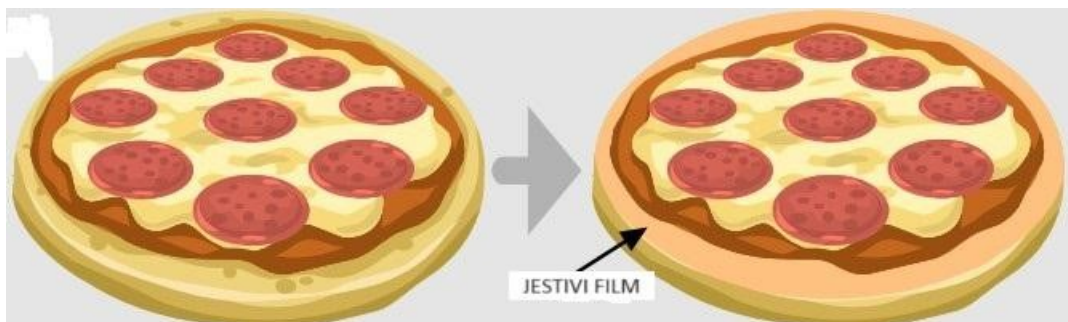
Jedno od bitnijih svojstava jestivih filmova svakako je barijerno svojstvo jer se stvaranjem zaštitne barijere pomoću filma produžuje rok trajanja nekog prehrambenog proizvoda. Općenito, jestiva ambalaža predstavlja barijeru između hrane i okoliša za kontrolu izmjene plinova, migraciju plinova ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{N}_2$ , etilen), difuzije, migracije vlage, prijenos otopljenih tvari (soli, aditivi, pigmenti), prijenos organskih tvari (arome, otapala), prolaz lipida u tkivima proizvoda [21]. Dakle, ona kontrolira prijenos mase između hrane i okoliša. Obzirom da postoje različite vrste prehrambenih proizvoda sa različitim svojstvima te da zahtijevaju različite koncentracije vlage, plinova i ostalog, bitno je odrediti sve parametre kako bi se odabrala ispravna vrsta filma za određeni prehrambeni proizvod. Jedan od najbitnijih parametara koji je potrebno odrediti je propusnost materijala na vodu kisik i ugljični dioksid.

Kisik je uključen u mnoge reakcije razgradnje u hrani, kao što su užglost masti i ulja, rast mikroorganizama, enzimsko tamnjenje i gubitak vitamina [22]. Zbog toga je, na primjer, bitno da se filmovi i folije za pakiranje mesa i mliječnih proizvoda izrađuju od materijala nepropusnih za kisik. S druge strane, kod voća i povrća propusnost za kisik i ugljični dioksid neophodna je kako bi ono ostalo svježije i ne bi došlo do njegovog propadanja. Zato se za ove proizvode odabiru filmovi sa odgovarajućom propusnošću. Primjerice, filmovi na bazi škroba zbog svoje strukture vodikovodik imaju imaju dobra barijerna svojstva za kisik. Park i sur. (1993.) [22] mjerili su propusnost kisika jestivih filmova na bazi metilceluloze i hidroksipropilmetilceluloze te su ustanovili da se propusnost kisika povećava s molekularnom težinom metilceluloze i hidroksipropilmetilceluloze.

Propusnost vodene pare također je bitno barijerno svojstvo jestivih filmova te je ono najopsežnije proučavano. Pretjerana migracija vlage u prehrambeni proizvod može dovesti razvoja mikroorganizama, pogoršanja kemijskih i enzimskih interakcija, ali i do nepoželjnih promjena



teksture proizvoda. Pizza je odličan primjer proizvoda koji ima visoki aktivitet vode između hrskave kore i sočnog nadjeva [9]. tako tijekom skladištenja molekule vode prelaze iz nadjeva u koru koja na taj način postaje vlažna. Dodavanjem jestivog premaza između tijesta pizze i njenog nadjeva možemo smanjiti migraciju vode i održati heterogenu strukturu. Na slici 10. shematski je prikazan jestivi film umetnut između tijesta i nadjeva pizze [9].



Slika 11 Jestivi film na pizzi [9]

Premazi sa uljnim barijernim svojstvima sve se više koriste u proizvodnji prženih prehrambenih proizvoda. Tako se, primjerice, čips premazuje hidrofилnim premazima kako bi se smanjilo upijanje ulja tijekom prženja.

### 3.7. Optička svojstva

Optičkim svojstvima jestivog filma pripadaju sjaj, transparentnost i boja filma. Obzirom da su to karakteristike koje prve primjećujemo na proizvodu i koje kupce privlače na kupnju istih, smatraju se jako bitnim parametrom. Veliku važnost ima sjaj filma, a njegove se karakteristike određuju sastavom i koncentracijom tekućine za smanjenje površinske napetosti vode, veličinom čestica i drugim parametrima. Optička svojstva vrlo su osjetljiva na temperaturu, relativnu vlažnost, ali i proces proizvodnje i sastav. Kod dugotrajnog skladištenja često može doći do narušavanja kvalitete optičkih svojstava, posebice boje. Boja je vrlo bitno optičko svojstvo koje nam daje informaciju o kvaliteti proizvoda, njegovoj svježini, ali i ono što nas prvo privuče na nekoj hrani. Postoje razni filmovi kojima se premazuje prehrambeni proizvod kako bi se očuvala njegova boja tijekom transporta i skladištenja. Primjerice, za jagode i neke vrste banane koriste se sluzavi premazi ekstrahirani iz kladodija biljke *Opuntia ficus indica*. Ovi premazi omogućili su očuvanje boje inhibicijom ili redukcijom enzima polifenol oksidaze. Osim sprječavanja pogoršanja boje jagoda, sluzavi premaz spriječio je i oksidaciju antocijana [23]. Nadalje, transparentnost jestivog filma odnosi se na njegovu sposobnost da rasprši svjetlost. Bitno je da jestivi filmovi nisu previše mutni kako bi potrošač mogao prepoznati sadržaj hrane te njegovo stanje kvalitete.

## 4. Antimikrobni jestivi filmovi

Jedan od najvećih izazova u lancu opskrbe hranom zasigurno je sprječavanje kontaminacije hrane mikroorganizmima. To je posebno zahtjevno kod lako kvarljivih vrsta hrane, poput mesa, mlijeka i mliječnih proizvoda te voća i povrća. Obzirom da navedene namirnice sadrže velike količine vode, ukoliko su neadekvatno zapakirane i uskladištene pri neprilagođenim uvjetima zraka i temperature, brzo dolazi do razvoja raznih vrsta plijesni i bakterija. Provedena su razna istraživanja kojima je dokazano da se čak 25% hrane pokvari prije upotrebe zbog kontaminacije mikroorganizmima [24]. Općenito, prilikom kvarenja nekog prehrambenog proizvoda dolazi do raspadanje teksture, promjene boje i nutritivne vrijednosti. Navedeno je popraćeno i rastom patogenih mikroorganizama koji svojim metabolitima narušavaju zdravstvenu ispravnost hrane. Ovisno o vrsti hrane, razvijaju se razne bakterije, plijesni i kvasci, a mehanizam organizma kvarenja ovisi o aktivnosti vode, pH, temperaturi i parcijalnim tlakovima kisika i ugljičnog dioksida [25]. Obzirom da trenutni sintetski materijali za pakiranje hrane loše utječu na okoliš, stvaraju toksične emisije u atmosferi te nisu biorazgradivi, javlja se sve veća potreba za alternativnim načinima pakiranja hrane koja bi pružila odgovarajuću antimikrobnu zaštitu.

Antimikrobni jestivi filmovi i premazi odlična su alternativa za smanjenje ili sprječavanje rasta mikroorganizama u prehrambenim proizvodima, a zbog svojih brojnih pozitivnih učinaka na hranu sve više dobivaju na značaju u ambalažnoj industriji. Naime, svojim djelovanjem antimikrobni filmovi/premazi ograničavaju rast mikroorganizama na hrani čime smanjuju mogućnost kvarenja nekog prehrambenog proizvoda. Također, održavaju kvalitetu hrane te njen nutritivni sastav čime dolazi i do produljenja roka trajnosti. Jestivi filmovi i premazi u potpunosti prekrivaju površinu prehrambenog proizvoda produžujući mu rok trajanja na taj način, a bez utjecaja na senzorska i nutritivna svojstva proizvoda. Ovi filmovi zapravo djeluju kao mikroorganska barijera za inhibiciju rasta mikroorganizama. Također, smanjuju proces dehidracije, prijenos vodene pare te usporavaju proces zrenja. U jednom je znanstvenom istraživanju (Galus i sur. 2020.) [24] dokazano kako jagode bez premaza imaju trajnost tek 14 dana. Međutim, ukoliko ih se premaže otopinom škroba, životni vijek im se produži na 21 dan. Antimikrobni filmovi se izrađuju na način da se antimikrobna sredstva amalgamiraju u polimernoj matrici. Takvi sustavi svoje antimikrobno djelovanje temelje na produženju faze kašnjenja te smanjenju broja živih stanica mikroorganizama. Na taj način utječe se na smanjenje i inhibiciju njihovog rasta na hrani. Kada se antimikrobno sredstvo nađe u kontaktu sa određenim mikroorganizmom oštećuje gradivni blok njegove stanice čime dolazi do inhibicije njegovog rasta i u konačnici umiranja. Kod antimikrobnih filmova koji djeluju na različite mikroorganizme inhibicijska aktivnost dosta ovisi o njihovoj fiziologiji. Stoga je bitno znati specifične antimikrobne funkcije i djelovanja

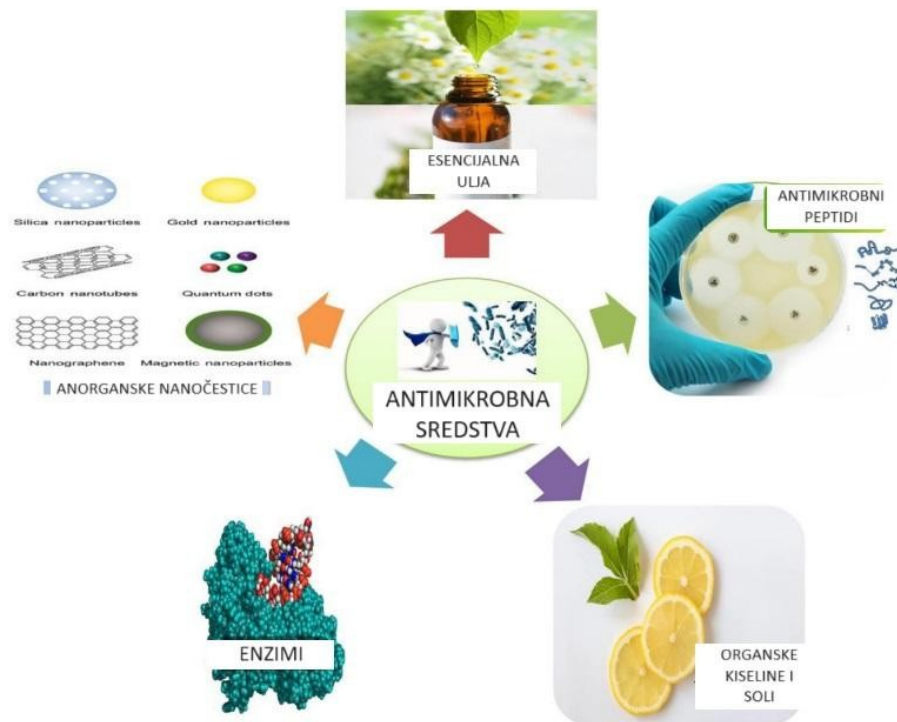
antimikrobnih materijala kako bi ispunili sve ciljeve antimikrobnog pakiranja: održanje kvalitete, osiguranje sigurnosti i produljenje roka trajanja proizvoda [24].

Antimikrobni filmovi i premazi zamijenili su konvencionalan način prskanja hrane kemikalijama s antimikrobnim djelovanjem. Iako takvo prskanje inhibira rast mikroorganizama, postoje velike šanse da će doći do njegovog raspršivanja. Također, ovakva vrsta kemikalija difundira unutar proizvoda, čime utječe na njegov sastav i kvalitetu. S druge strane, antimikrobni filmovi ili premazi kontrolirano otpuštaju antimikrobna sredstva u hranu. Isto tako, većina antimikrobnih sredstava kod ove vrste filmova prirodnog je podrijetla te neće narušiti kvalitetu prehrambenog proizvoda ni njegovu zdravstvenu ispravnost.

Provođenjem brojnih istraživanja otkrivene su i definirane različite metode za proizvodnju sigurnog, biorazgradivog jestivog antimikrobnog filma. Ističu se dvije najčešće korištene metode, a to su korištenje prirodnog polimera s inherentnim antimikrobnim svojstvima te ugradnja odabranih antimikrobnih sredstava u biopolimernu matricu. Ovakvi sustavi za pakiranje hrane sastoje se od nekoliko dijelova: prehrambenog proizvoda, atmosfere za pakiranje i materijala za pakiranje. Atmosfera za pakiranje ima važnu ulogu u cijelom procesu. Naime, eliminira ili smanjuje rast patogenih mikroorganizama i tako osigurava da se antimikrobni film ili premaz sigurno aplicira na proizvod.

#### **4.1. Vrste antimikrobnih sredstava**

Postoji mnogo vrsta antimikrobnih sredstava koja se koriste za izradu jestivih filmova i premaza. Na slici 12. prikazano je koje sve tvari imaju antimikrobno djelovanje [24]. Tvari koje se najčešće koriste za izradu antimikrobnih jestivih filmova su organske kiseline, kitozan, enzimi, eterična ulja, biljni ekstrakti i drugo.



Slika 12 Vrste antimikrobnih sredstava [24]

Od organskih kiselina ističu se benzojeva i sorbinska kiselina. Benzojeva kiselina svoja antimikrobna svojstva najučinkovitije pokazuje u nedisociranom obliku pri pH 2,5-4,0. koristi se kao konzervans, a pruža zaštitu protiv kvasaca i plijesni. Sorbinska kiselina je najučinkovitija pri rasponu pH 3,0-6,5 te djeluje antimikrobno na većinu vrsta kvasaca i plijesni te na bakterije mliječne kiseline. Od ostalih vrsta organskih kiselina, antimikrobno djelovanje dokazano je i kod mliječne, octene te propionske kiseline.

Bakteriocini su ribosomski sintetizirani proteini ili peptidi koje proizvode vrste iz domene *Bacteria* i *Archea*, a sadrže proteine makromolekule koji imaju razna antibakterijska svojstva. Stabilni su pri višim temperaturama, te se lako razgrađuju proteolitičkim enzimima u crijevima ljudi. Bakteriocini mogu djelovati kao antimikrobni peptidi, izravno inhibirajući konkurentne sojeve [26]. neke od glavnih prednosti bakteriocina su efikasnost, otpornost na različite vrijednosti pH, mogućnost kemijske modifikacije i drugo. Također, ova vrsta proteina ima uzak inhibicijski spektar, odnosno može učinkovito antimikrobno djelovati na određeni patogen bez da utječe na poželjne mikroorganizme prirodno prisutne u nekom prehrambenom proizvodu. Bakteriocini su pokazali inhibitorno djelovanje na više vrsta patogenih mikroorganizama, pa je tako dokazano njihovo djelovanje na Shiga toksin producirajuću *Escherichia coli*, enterotoksikogenu *Escherichia coli*, enterokok i druge. Jedan od najvažnijih i najsigurnijih bakteriocina je nizin. On se već dugi niz godina komercijalno upotrebljava protiv gram pozitivnih patogenih bakterija i bakterija kvarenja. Djeluje na način da reagira sa spojevima koji sadrže sumpor, a koji se nalaze u bakterijskim

membranama. Pomoću tih interakcija membrana gubi svoju funkciju čime dolazi do lize stanica [5].

Kitozan je derivat hitina, glavnog strukturnog polisaharida beskralježnjaka i nižih biljaka, koji je uz celulozu najzastupljeniji u prirodi [27]. Topiv je u kiselim do neutralnim otopinama, a pokazuje pozitivan naboj. Upravo prisutnost, gustoća i lokacija kationskih naboja u polimernoj okosnici pridonose njegovoj antimikrobnoj aktivnosti. Ima dokazano antimikrobno djelovanje protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija te nekih vrsta kvasaca i plijesni. Na debljinu kitozanskih filmova te njegova fizikalna i antimikrobna svojstva utječe postotak deacetilacije, određene vrste kiselinskih spojeva te molekularna masa. Mehanizam antimikrobnog djelovanja kitozana je slijedeći: dolazi do interakcije između pozitivno nabijenog kitozana i negativno nabijene stanične membrane mikroorganizma. Posljedica te interakcije istjecanje je proteina i međustaničnih komponenti iz mikroorganizma što u konačnici dovodi do njegove inaktivacije, odnosno smrti. Premazi na bazi kitozana mogu se nanositi u jednom sloju ili kao višeslojni premazi na prehrambeni proizvod. Kod višeslojnog premazivanja koristi se tehnika elektrostatskog taloženja sloj po sloj. Takvo premazivanje postiže se na način da se proizvod višestruko uranja u dvije otopine sa suprotno nabijenim polielektrolitima, a na sklapanje slojeva jednih na druge utječe elektrostatička sila. Premazi od kitozana uglavnom se upotrebljavaju na voću i povrću, a nanose se sprejanjem ili umakanjem u otopinu. Višeslojni premazi na bazi kitozana valjani su alati za produljenje roka trajanja u cijelom voću i voću spremnom za konzumaciju, a iskorištavaju prednosti svakog jednoslojnog premaza s potpunom strukturom i stabilnom izvedbom [28].

Od enzima najviše su proučavani lizozim i laktoperoksidaza koji se prirodno nalaze u mlijeku. Lizozim je jednolančani protein koji ima antimikrobno djelovanje na Gram-pozitivne bakterije. Na Gram-negativne bakterije nema znatno djelovanje zbog vanjske membrane.

Antimikrobno djelovanje pokazuju i brojni ekstrakti eteričnih ulja na biljnoj bazi koji se sve više upotrebljavaju u izradi jestivih filmova. Tako su eterična ulja cimeta, klinčića, češnjaka i brojnih drugih biljaka bogati fenolnim spojevima te pokazuju antimikrobno i antioksidativno djelovanje. Obzirom da su ova ulja na prirodnoj bazi, mogu se ugrađivati u hranu i premazivati je bez opasnosti za ljudsko zdravlje te bez narušavanje kvalitete prehrambenog proizvoda. Brojni znanstvenici dokazali su pozitivan učinak eteričnih biljnih ulja na svojstva mesa, ribe te voća i povrća. Osim sprječavanja razvoja mikroorganizama, eterična biljna ulja djeluju i na očuvanje senzorskih karakteristika hrane, poput mirisa, boje i okusa. Naime, imaju mogućnost kontrole pogoršanja senzorske kvalitete, čime osiguravaju da proizvod ostane zadovoljavajućih organoleptičkih svojstava tijekom pakiranja i skladištenja. Kvaliteta i učinkovitost filmova na bazi biljnih eteričnih ulja ovisi o njihovoj koncentraciji, temperaturi, pH te polimeru odabranom za izradu filma. Obzirom da može doći do slabljenja njihove učinkovitosti tijekom vremena, potrebno

je provesti dodatna istraživanja na filmovima na bazi eteričnih ulja o njihovoj stabilnosti tijekom obrade i vremena skladištenja, kako bi omogućili da maksimalno štite hranu od mikroorganizama tijekom cijelog životnog ciklusa proizvoda.

## 4.2. Primjena antimikrobnih jestivih filmova

Iako jestivi filmovi nisu novost u svijetu pakiranja hrane, zbog specifičnosti ovakve vrste ambalaže još uvijek se provode brojna istraživanja o njihovoj potencijalnoj primjeni te o kombinacijama materijala i tvari sa antimikrobnim svojstvima. U tablici 4. prikazane su neke zanimljive kombinacije materijala za izradu antimikrobnih filmova i njihova primjena za različite skupine mikroorganizama [24].

Tablica 4 Različite vrste antimikrobnih filmova i njihovo djelovanje [24]

POLIMERNA OSNOVA	TVARI ANTIMIKROBNIM DJELOVANJEM	CILJANI ORGANIZAM	UČINAK
<ul style="list-style-type: none"> <li>● filmovi na bazi škroba</li> <li>● Cheddar sir</li> <li>● agar</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● linalol</li> <li>● karvakrol</li> <li>● timol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● <i>Staphylococcus aureus</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● inhibitorni učinak timol &gt; karvakrol &gt; linalol</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>● antimikrobni filmovi na bazi riblje želatine</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● nusprodukt soka sjemenki nara</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● <i>S. aureus</i> i <i>Salmonella enterica</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● dodatak nusprodukta soka nara povećao je krutost filmova i smanjio njihovo istezanje</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>● filmovi na bazi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● kora nara u</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● <i>S. aureus</i> i</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● dobra</li> </ul>

škroba testirani na agaru	različitim koncentracija ma	<i>Salmonella</i>	antibakterijs ka svojstva
------------------------------	-----------------------------------	-------------------	------------------------------

## ■ Voće i povrće

Voće i povrće je hrana koja ima bogat nutritivni sastav, a obiluje vlaknima, vitamina i mineralima. Također, ima visok sadržaj vode što ga čini savršenim medijem za razvoj mikroorganizama. Upravo visok sadržaj vlage i velika aktivnost vode stvaraju brojne probleme u održavanju voća svježim i nepokvarenim prilikom skladištenja i distribucije do potrošača. Kada voće nastane mikroorganizmi, poput plijesni, dolazi do njegovog postepenog propadanja te razvoja neugodnih mirisa, arome ali i raspadanja tkiva. Obzirom da potrošači žele kupovati i konzumirati voće bez pesticida, dobre kvalitete te velike dugotrajnosti, ambalažna industrija bavi se sve više upotrebom antimikrobnih jestivih filmova i istražuje njihove mogućnosti kako bi se voće na prirodan i zdrav način maksimalno zaštitilo od antimikrobne kontaminacije. Tako se za voće i povrće upotrebljavaju filmovi i premazi na bazi kitozana, nizina, natamicina, laktoperoksidaze, esencijalnih ulja i drugih [29].

Filmovi i premazi na bazi kitozana mogu očuvati kvalitetu voća i povrća na način da smanjuju stopu disanja te inhibiraju razvoj mikroba. Također, utječu na produljenje roka trajanja odgodom zrenja proizvoda. Njihova upotreba na voću i povrću pokazala je dobro antimikrobno djelovanje na slijedeće vrste: *Bacillus cereus*, *Brochothrix thermosphacta*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakey*, *Listeria mono-cytogenes*, *Pediococcus acidilactici*, *Photobacterium phosphoreum*, *Pseudomona fluorescens*, *Candidalambica*, *Cryptococcus humiculus* i *Botrytis cinerea* [29]. Premazi na bazi kitozana našli su svoju upotrebu i za hladno skladištenje grožđa. Naime, Sánchez-González i suradnici (2013) [30] u svojem su istraživanju razvili premaze na bazi hidroksipropilmetilceluloze i kitozana aktivirane eteričnim uljem bergamonta. Kombinacijom ovih triju sastojaka postignuto je jako inhibitorno djelovanje premaza na mikroorganizme uz minimalan gubitak mase prilikom skladištenja grožđa. Međutim, filmovi i premazi na bazi kitozana ne djeluju isključivo kao inhibitori rasta mikroorganizama, već pozitivno utječu i na senzorska svojstva hrane. Tako su Alvarez, Ponce i Moleira testirali filmove kitozana sa ekstraktima čajevca, ružmarina, nara, rezervatola i propolisa na blago termički obrađenoj brokuli. Cilj istraživanja bio je saznati učinak navedenih filmova na *Listeriu Monocytogenes* i *Escherichiu Coli*, a osim pozitivnog učinka na sprječavanje rasta navedenog bakterija otkriven je i pozitivan učinak filmova na okus, boju i teksturu brokule [31].

Gel od popularne biljke aloe vere također je našao svoju upotrebu za izradu jestivih filmova za voće i povrće. Općenito, gel ekstrahiran iz lišća aloe vere sadrži brojne bioaktivne spojeve, minerale i fenole [32]. Gel, zbog svoje teksture, djeluje kao polupropusna membrana za prijenos vode i kisika. Stoga, kada se nanese na voće i povrće uklanja kisik potreban za njihov metabolizam. Filmovi na bazi aloe vere uglavnom se upotrebljavaju za svježe voće i povrće te za svježe rezano voće i povrće. Tako aloeverin premaz kod svježe narezanih papaja reducira gubitak težine voća, dok se za premazivanje manga koristi zajedno s karnauba voskom i glicerolom. Što se tiče povrća, premazi na bazi aloe vere upotrebljavani su na rajčicama te su pokazali očuvanje svježine do 14 dana nakon skladištenja [1]. Slika 13. prikazuje stanje rajčica bez premaza, samo sa premazom od aloe vere te sa premazom i pakiranjem [33].



Slika 13 Izgled i trajnost rajčica ovisno o vrsti ambalaže [33]

Esencijalna ulja pokazuju svoje antimikrobno djelovanje na način da povećavaju propusnost staničnih stijenka bakterija. Također, smanjuju ili ograničavaju oksidaciju zbog čega su poželjan sastojak u filmovima za voće i povrće. Tako se, primjerice, eterično ulje anđelike upotrebljava za premazivanje bresaka, čime se smanjuje oksidacija te produžuje njihov rok trajanja [34].

Filmovi na bazi gume arabike smanjuju mikrobno propadanje u voću i povrću hortikulture. Osim toga, održavaju čvrstoću proizvoda te usporavaju respiraciju i proces sušenja. Tako se guma arabika u kombinaciji sa kalcijevim kloridom koristi za premazivanje manga čime smanjuje mogućnost kvarenja proizvoda za vrijeme skladištenja. Na zelenim zrelim rajčicama proveden je eksperiment sa vodenim otopinama gume arabike. Cilj istraživanja bio je otkriti utječu li i u kojim koncentracijama, navedene otopine na odgodu kvarenja proizvoda. Koristile su se otopine sa 5, 10, 15 i 20% gume arabike, a najučinkovitijom se pokazala ona od 10% [35].

#### ■ Meso

Meso je proizvod koji se lako kvari te ima ograničen životni vijek pri rashladnim uvjetima skladištenja. Njegovo kvarenje uglavnom je uzrokovano mikrobiološkom kontaminacijom pri



čemu dolazi do promjene boje, okusa te raspadanje teksture. Zbog navedenog, industrije proizvodnje mesa imaju najviše problema sa mikrobnim kontaminacijama proizvoda i njihovim kvarenjem. Razlog tome je veliki sadržaj vode. Stoga je bitno da se antimikrobni filmovi za ovu vrstu proizvoda rade od kvalitetnih materijala koji imaju visok stupanj antimikrobne zaštite kako se smanjila stopa kvarenja i osigurala dugotrajna kvaliteta mesa i ribe.

Alginati su prirodni polimeri izolirani iz stanične stijenke smeđih algi, a pronalazimo ih u obliku natrijevih, kalcijevih ili magnezijevih soli. Topivi su u vodi te stvaraju čvrsti gel koji ima nisku topljivost. Natrijev alginat je biorazgradiv i jeftin hidrokolid koji se često upotrebljava u ambalažnoj industriji za pakiranje porcioniranih proizvoda. Njegovi filmovi ističu se brojnim pozitivnim svojstvima poput čvrstoće, fleksibilnosti, niske propusnosti za kisik i ulja te ostalo [36]. u kombinaciji sa antimikrobnim i aktivnim tvarima, natrijev alginat uz sprječavanje mikrobne kontaminacije, utječe i na produljenje roka trajanja mesa. Koristi se pileća prsa, filete riba te govedinu. Moguće ga je kombinirati i sa eteričnim uljima origana, cimeta ili ružmarina pri čemu dobivamo filmove koji inhibiraju rast *E. coli* i *Salmonelle typhimurium*. Eterično ulje crnog kima također se može kombinirati sa alginatom. Takvi filmovi koriste se kao jestive folije za pakiranje pilećih prsa, a inhibiraju rast *E.coli* [37].

Karagenan je polisaharid također ekstrahiran iz različitih crvenih morskih algi. Njegovi čvrsti filmovi i folije koriste se za izradu crijeva za kobasice, za sprječavanje površinske dehidracije čvrste hrane, masne hrane te ribe i peradi. Filmovi i premazi na bazi  $\kappa$ -karagenana koriste se za svježa pileća prsa, a sprječavaju rast bakterija *Escherichie coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* i *Candida albicans* [37]. Nadalje, filmovi na bazi  $\kappa$ -karagenana sa dodatkom pčelinjeg peluda i ekstrakta meda pokazali su dobra fizička, antioksidativna i antimikrobna svojstva za upotrebu na govedini. Dokazano je kako su se dodatkom peludi i ekstrakta meda povećala fizikalna svojstva te hidrofilitnost filmova. Također, dodatkom navedenih tvari poraslo je antibakterijsko djelovanje filmova na *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* te *Pseudomonas spp.* [38].

Mljeveno meso zbog svoje je strukture vrlo osjetljivo te predstavlja odličan medij za rast mikroorganizama. Također, ovakvo meso uglavnom ima kratki rok trajanja te ga nije moguće dugo skladištiti zbog brzog razvoja patogenih bakterija. Tako su Lima i sur. (2021.) [39] eksperimentalno proizveli film polimljične kiseline s eteričnim uljem klinčića, naranče i cimeta kako bi sinergijom svojstava navedenih sastojaka poboljšali antimikrobno djelovanje filmova za mljeveno meso. Rezultati su pokazali intenzivno baktericidno djelovanje filmova bez pogoršanja ili gubljenja njihovih svojstava. Nadalje, psihrofilne, psihrotrofne i mezofilne bakterije mogu preživjeti i ostati u hrani i nakon termičke obrade čime predstavljaju veliku opasnost za zdravstvenu sigurnost proizvod te zdravlje potrošača. Ipak, njihova prisutnost u mesu može se

smanjiti upotrebom prirodnih antioksidansa, poput onih iz eteričnih biljnih ulja i ekstrakata. Tako se za goveđe, svinjsko i meso peradi upotrebljavaju filmovi sa organskim kiselinama i eteričnim uljima koji dokazano djeluju protiv razvoja *Salmonelle* [39].

Kod svježeg pilećeg mesa, *Pseudomonas spp.* su glavna skupina mikroorganizama koja uzrokuje njegovo kvarenje. Za smanjenje ili sprječavanje njihovog rasta, koriste se razni filmovi s različitim aktivnim ekstraktima koji potiču antimikrobno djelovanje filma. Tako su, primjerice, Mehdizadeh i Langroodi u svojem istraživanju upotrebom filmova kitozana sa ekstraktom propolisa i ekstraktom biljke *Zataria multiflora Boiss* dokazali znatno smanjenje razvoja bakterije iz skupine *Pseudomonas*. Premazivanjem pilećeg mesa smanjuje se i razvoj patogenih bakterija. To je dokazano na primjeru premaza na bazi karboksimetil celuloze s ekstraktom biljaka *Ziziphora clinopodioides* i *Menta spicata*, koji su se koristili na pilećim prsima uronjenim u suspenziju *Listerie monocytogenes* [40]. Nouri Ala i Shahbazi (2019.) [41] uočili su znatno smanjenje razvoja bakterija nakon 14 dana pri temperaturi od 4°C u usporedbi sa 0. danom. Za filete pilećih prsa skladištene pri temperaturi od 4°C upotrebljavaju se također premazi na bazi kitozana sa dodanim ekstraktom sjemenki grožđa. Naime, ovi filmovi utječu na produljenje roka trajnosti fileta na 15 dana te usporavaju rast mikroorganizama. Za zaštitu svinjskog mesa također se istražuju i upotrebljavaju razni filmovi sa antimikrobnim sastojcima. Primjerice, Zhao i sur. (2023.) [41] testirali su antimikrobnu aktivnost filmova na bazi krumpirovog škroba sa polivinil alkoholom i Pickering emulzijom koja sadrži eterično ulje klinčića za konzerviranje svinjskog mesa. Rezultati su pokazali učinkovitu antimikrobnu aktivnost eteričnog ulja klinčića [41].

## ■ Riba

Riba i morski proizvodi podliježu brzom razgradnji tkiva zbog visokog sadržaja lipida čime vrlo brzo dolazi do gubitka vlage. To posljedično utječe na razgradnju tkiva i na negativne promjene organoleptičkih svojstava. Također dolazi i do razvoja patogenih mikroorganizama koji stvaraju toksične metabolite te proizvod čine nesigurnim za konzumaciju. Kako bi se održala kvaliteta ribe i morskih proizvoda i zaštitili od mikrobne kontaminacije, nužno je korištenje antimikrobnih filmova i premaza.

Hladno dimljeni losos proizvod je koji ne iziskuje nikakvu dodatnu termičku obradu već se konzumira u takvom, dimljenom obliku. To često stvara opasnost za zdravstvenu ispravnost lososa obzirom da njegovo meso lako može biti kontaminirano bakterijom *Listeria monocytogenes*. Kako trenutno ne postoje naknadne kontrole ovog patogena prilikom proizvodnje dimljenog lososa, grupa znanstvenika odlučila je istražiti učinkovitost anitmikrobnih jestivih premaza za kontrolu rasta navedene bakterije. Naime, Neeto, Ye i Chen (2010.) [42] testirali su premaze na bazi alginata, κ-karagenana, pektina, želatine i škroba. U svakom od navedenih filmova nalazile su se

organske soli te je utvrđeno kako su premazi na bazi alginata najučinkovitiji za inhibiciju rasta *L. monocytogenes* [42]. Isto tako, provodilo se i istraživanje za očuvanje kvalitete hladno dimljene sardine. Gómez-Estaca i sur. (2007.) [43] koristili su jestive filmove na bazi želatine uz dodatak ekstrakta ružmarina, origana i kitozana. Filmovi sa dodatkom ružmarina i origana povećali su sadržaj fenola, smanjili oksidaciju lipida te neznatno smanjili rast mikroba, dok su filmovi sa dodatkom kitozana smanjili ukupan broj mikroba te bakterija koje reduciraju sulfide [43].

Slatkovodne riba također se štiti raznim premazima od mikrobiološke kontaminacije i oksidacije. Wang i sur. (2024.) [44] pripremili su filmove na bazi kitozana sa dodanim ekstraktom bora za pakiranje odrezaka šarana skladištenih u hladnjaku pri temperaturi od  $4 \pm 1$  °C. detaljnom analizom ustanovljeno je da su filmovi koji sadrže 30% ekstrakta bora najučinkovitiji u inhibiciji rasta bakterija te se njihovom upotrebom rok trajnosti odrezaka šarana može produžiti za 50 % [43]. Slika 14. Prikazuje proces izrade filmova te izgled pakiranja odrezaka šarana [44].



Slika 14 Izrada i izgled filmova na bazi kitozana za pakiranje odrezaka šarana [44]

Kako industrija akvakulture često ima problema sa mikrobiološkim kontaminacijama proizvoda, a antibiotici nisu najbolji i najzdraviji odabir u suzbijanju infekcija, antimikrobni filmovi preuzimaju alternativnu ulogu za rješavanje problema. Tako se upotrebljavaju antimikrobni filmovi za pelete za ribe, i to na bazi bakteriofaga. Huang i Nitin (2019.) [45] testirali su premaze od jestivog izolata proteina sirutke koji su se pokazali učinkovitima u povećanju koncentracije faga na paletima za ribe te u smanjenju gubitka aktivnosti faga tijekom skladištenja paleta. Rezultati su bili demonstrirani upotrebom modela bakterije *E. coli* i ribljeg patogena *Vibrio* spp. te se dokazalo da ovakve vrste filmova smanjuju infekcije riba te poboljšavaju sigurnost akvakulture [45].

Na filetima ribe glavaš istraživani je antimikrobni učinak premaza na bazi natrijevog alginata obogaćenog eteričnim uljem konjske metvice. Fileti su bili obloženi čistim natrijevim alginatom te natrijevim alginatom kombiniranim sa 0,5 i 1 % v/v eteričnog ulja konjske metvice te skladišteni

na temperaturi od  $4 \pm 1$  °C. Nakon provedenog istraživanja ustanovljeno je kako filmovi sa 1 % eteričnog ulja konjske metvice pokazuju znatno smanjenje mikrobiološke razgradnje glavaša [46]. U inhibiciji rasta mikroba na svježim filetima glavaša učinkoviti su i metilcelulozni premazi kombinirani sa eteričnim uljem biljke *Pimpinella affinis*. Pomoću ovih biorazgradivih premaza fileti zadržavaju svoju kvalitetu i nutritivni sastav do 12 dana skladištenja u hladnjaku.

#### ■ Mliječni proizvodi

Pod pojmom mliječni proizvodi podrazumijevamo mlijeko te ostale produkte mlijeka: sir, fermentirano mlijeko, sladoled itd. Obzirom da vlaga, kisik te brojni mikroorganizmi potiču vrlo brzo kvarenje mliječnih proizvoda, jestivi filmovi i kod ove vrste hrane mogu se koristiti za antimikrobno djelovanje te produženje roka trajanja navedenih proizvoda.

Osim bakterija, mliječne proizvode mogu nastaniti i razne vrste plijesni, poput *Aspergillus* spp. i *Penicillium* spp.. Torrijos i sur. (2022.) [47] za inhibiranje rasta plijesni *P. commune* na mozarelli koristili su hidroskimetilcelulozne filmove kombinirane sa natamicinom u koncentracijama od 0, 0,25, 0,5 i 1 mg/dm<sup>2</sup>. dokazano je antifungalno djelovanje natamicina pri svim koncentracijama što je utjecalo i na produljenje roka trajanja kriški mozzarelle [47].

Sladoled je omiljeni mliječni proizvod tijekom ljetnih mjeseci, kada ga se najviše konzumira. Upravo u ljetnim mjesecima za vrijeme visokih temperatura postoji i najveća opasnost za njegovu mikrobnu kontaminaciju. Kako bi se to spriječilo provode se brojna istraživanja sa antimikrobnim filmovima za poboljšanje mikrobne stabilnosti sladoleda. *Kulfi* je popularan indijski sladoled koji se je koristio kao model za istraživanje antimikrobne aktivnosti filmova na bazi aloe vere. Filmovi su bili standardizirani različitim razinama karagenana, glicerola i ekstrakta aloe vere, a oni sa 1,5 % karagenana, 14 % glicerola i 15 % aloe vere pokazali su najučinkovitiji antimikrobni učinak protiv *E. coli* [48].

## 5. MASLAČAK

Maslačak (*Taraxacum officinale* L.) je višegodišnja biljka iz porodice glavočika Asteraceae, a broji više od tri stotine vrsta u svojoj složenoj klasifikaciji. Široko je rasprostranjen te ga se može naći svugdje u svijetu. Raste pored mora, na visokim alpskim predjelima te je prilagođen svim vrstama tla. Podržava rasti uz mjesta gdje su ljudi ostavili svoj trag, poput zgarišta, cesti, napuštenih polja i livada. Njegov izgled varira ovisno o staništu i ekološkim uvjetima. Općenito, maslačak ima zadebljan korijen koji može biti dugačak i do 140 cm što mu omogućuje crpljenje vode i hranjivih tvari iz dubokih slojeva zemlje. Stabljika je visoka 15-25 cm te nosi po jednu cvjetnu glavicu, dok su cvjetovi zlatno žute boje te promjera 3-5 cm [49]. Zanimljivo je da svi dijelovi biljke sadrže mliječni sok zbog čega ga se još naziva i mljekačom. Obzirom da su svi dijelovi biljke jestivi, od davnina je zabilježena njegova upotreba u razne medicinske svrhe zbog njegovih brojnih ljekovitih svojstava. Slika 15. prikazuje morfologiju maslačka [50].



Slika 15 Morfologija maslačka [50]

Uvjeti okoliša, periodi čupanja, različiti načini čupanja i načini sušenja značajno utječu na kemijski sastav samih materijala [50]. Prvi put maslačak je korišten kao lijek u arapskoj medicini protiv bolesti jetre i slezene. Dokazano je kako ova biljka posjeduje diuretičko djelovanje, djeluje kao antioksidans, analgetik te protuupalno sredstvo. Bogat je izvor vitamina i minerala, a sadrži više željeza od nekog povrća, primjerice špinata. Cijela biljka bogata je brojnim raznim tvarima,

poput bjelančevina, škroba, voska i ostalog. Također obiluje i raznim fitospojevima poput flavonoida, fenolnih kiselina i polifenolnih spojeva [50].

### ■ **Korijen maslačka**

Korijen maslačka mesnat je i lomljiv, vanjsko područje ima smeđu boju, dok je iznutra bijel. Vadi se u rano proljeće ili jesen, ovisno o tome za što se planira koristiti. Njegov sastav nije jednak tijekom svih mjeseci pa ga se preporuča brati tek na jesen, kada je bogatiji aktivnim tvarima. On je najljekovitiji dio maslačka te se smatra jednom od najjačih biljnih tvari za eliminaciju toksina. Razlog tome njegov je bogat kemijski sastav u kojem između ostalog pronalazimo i brojne spojeve na bazi fenola koji mu daju antioksidativno djelovanje. Također, sadrži i neke fitokemikalije zbog kojih dominira i svojom antimikrobnom aktivnosti, poput seskviterpenskog laktona i kumarina [51]. Može ga se sušiti te koristiti kao čaj, raditi tinkturu, ali i jesti sirovog kao povrće i dodatak juhi. Također, korijenje biljke mlađe od dvije godine zbog svoje gorčine i okusa moguće je pržiti i koristiti kao zamjenu za kavu (Slika 16). Nisko je kaloričan te je bogat vlaknima i brojnim vitaminima, poput vitamina C, K i A.



Slika 16 Priprema kave od korijena maslačka [52]

## **5.1. Fitokemijski sastav maslačka**

Maslačak je biljka koja spada u ljekovito bilje zbog svog bogatog kemijskog sastava i prisutnosti brojnih biološki aktivnih tvari. Zbog izvrsnih kemijskih svojstava, znanstvenici su počeli izolirati njegove aktivne sastojke i koristiti ih u brojne medicinske svrhe. Biološka aktivnost maslačka definirana je spojevima poput seskviterpenoida, fenolnih spojeva, eteričnih ulja itd. Također, provedenim *in vivo* i *in vitro* istraživanjima, dokazana su i antibakterijska, antioksidacijska te čak i antikancerogena aktivnost maslačka. U listovima je detektirano najviše biološki aktivnih tvari čiji se sastav ne mijenja povišenjem temperature, tj. zagrijavanjem ekstraktata lišća. Navedeno nam dokazuje toplinsku stabilnost spojeva koji, između ostalog,

inhibiraju rast tumorskih stanica. Neupitno je kako kemijski sastav maslačka daje odlična farmakološka svojstva. Tablica 5. prikazuje fitokemijski sastav cvijeta, listova i stabljike te korijena maslačka [53].

Seskviterpenski laktoni zaslužni su za gorak okus maslačka te su najrelevantniji sastojci ove biljke. Njihov sastav razlikuje se u različitim dijelovima biljke. U cvjetovima maslačka ih ne nalazimo, dok ih u korijenu biljke ima najviše. To je i jedan od razloga zašto korijen biljke ima iznimna protuupalna i antikancerogena svojstva. Najviše zastupljeni seskviterpenski laktoni su taraksinska kiselina i taraksakolidi. Neki znanstvenici detektirali su i brojne vitamine i minerale u maslačku. Tako brojna istraživanja pokazuju kako je maslačak bogat vitaminima A, B, C, D, i E, a od minerala su pronađeni kalcij, natrij, magnezij, željezo, bakar, fosfor, cink i drugi. Od minerala, maslačak također sadrži i značajan udio kalija. Kao što je već i navedeno, fitokemijski sastav maslačka varira ovisno o dijelu biljke, ali i o brojnim vanjskim čimbenicima: vremenu berbe, klimi, tlu na kojem raste te ostalom. Fenolne kiseline također su zastupljene u biljci, a ističu se kafeinska, klorogenična i cirkočna kiselina. Kafeinska kiselina u velikom se udjelu nalazi u korijenu maslačka, a to je i jedan od razlog zašto se korijen upotrebljava kao alternativa kavi.

Tablica 5 Fitokemijski sastav maslačka [53]

CVIJET MASLAČKA				
Fenolne kiseline			Flavonoidi	
kafeinska kiselina	klorogenična kiselina	monokafeoil tartarična kiselina	lutelion 7-O-diglukozid lutelion 7-O-glukozid	slobodni krizoeriol
				slobodni luteolin
LISTOVI I STABLJICA				
Seskviterpensi laktoni	Triterpeni/fitosteroli	Fenolne kiseline	Kumarini	Flavonoidi
$\beta$ -D-glukopiranozid	$\beta$ -sitosterol	kafeinska kiselina	cimarin	kvercetin 7-O-glukozid
11,13-dihidrotaraksinična kiselina $\beta$ -glukopiranozid	B-amirin	klorogenična kiselina	eskolin	apigenin 7-O-glukozid
	arnidiol	cikorična kiselina		luteolin 7-O-glukozid luteolin 7-O-rutinozid
		P-hidroksifenilacetična kiselina		
KORIJEV MASLAČKA				
Seskviterpensi laktoni	Terpeni/fitosteroli	Fenolne kiseline	Kumarini	Inulin



taraksakolid-O- $\beta$ -glukopiranozid	taraksasterol	kafeinska kiselina	umbeliferon	inulin
11,13-dihidrolaktucin	arnidiol	cikorična kiselina	eskuletin	
taraksinicna kiselina – glukopiranozid	stigmasterol	klorogenična kiselina	skopoletin	
taraksakozid	faradiol	ferulična kiselina		
ikserin D	$\beta$ -sitosterol	vanilinska kiselina		
acilirani $\gamma$ -butirolakton glikozid	$\alpha$ -amirin	$\rho$ -kumarična kiselina		

Iz tablice je vidljivo kako je korijen maslačka najbogatiji bioaktivnim spojevima, posebice seskviterpenskim laktonima. Osim spojeva navedenih u tablici, korijen sadrži i dihidrokoniferin, siringin i dihidrosiringin. Bogat je i fenolnim spojevima, od kojih se ističe cikorična kiselina te derivati kafeinske kiseline. Korijen maslačka jedini je dio biljke koji sadrži ugljikohidrate, odnosno inulin [53].

## 5.2. Svojstva maslačka

Obzirom na bogati kemijski sastav, maslačak ima brojna ljekovita svojstva te široku upotrebu u razne medicinske, ali i druge svrhe. Iako je većina spojeva izolirana, zbog složenog kemijskog sastava još uvijek nisu istražena sva blagotvorna svojstva ove biljke.

### ■ Antioksidativna svojstva

Pod pojmom antioksidansi podrazumijevamo spojeve koji neutraliziraju ili pomažu neutralizirati slobodne radikale. Kako slobodni radikali utječu na starenje, rak i brojne druge poremećaje, bitno je unositi antioksidanse u organizam u optimalnim mjerama. Maslačak u svom sastavu sadrži polifenole i beta karoten zbog kojih je poznat po svojem antioksidativnom djelovanju. Tako su Samanth i Rana (2006.) ekstraktom korijena i lišća maslačka ojačali profil endogenih antioksidansa štakora, na kojima su provodili istraživanje [54]. Slično istraživanje provodilo se i na miševima gdje se koristila mješavina lisnatog povrća uključujući i maslačak.

Mjerenjem koncentracije antioksidansa utvrđeno je povećanje razine glutationa i beta karotena u usporedbi s onima mjerenim prije davanja pripravka životinjama [55]. Obzirom na veliki sadržaj fenola, cvjetovi maslačka mogu se koristiti kao prirodni izvori antioksidansa. Tu se posebice misli na flavonoide i derivate kumarinske kiseline. Ekstrakti lišća sadrže tri puta više fenola nego korijenje maslačka, zbog čega se često koriste za liječenje bolesti jetre i kod problema sa žučem.

#### ■ **Protuupalna svojstva**

Ekstrakt maslačka može utjecati na smanjenje raznih upala, uglavnom zahvaljujuću djelovanju polifenola. Tako su pojedine studije dokazale značajno smanjenje upale u stanicama koje su bile tretirane ekstraktom maslačka. Tako je, primjerice, u jednom istraživanju dokazano protuupalno djelovanje ekstrakta lišća maslačka (0,1 i 1,0 µg/mL) na središnji živčani sustav. Nadalje, Mascoro i sur. (1987.) [56] bili su prvi znanstvenici koji su provodili istraživanje o protuupalnom djelovanju ekstrakta korijena maslačka. Naime, htjeli su istražiti utjecaj etanolnog ekstrakta korijena na edem šape štakora te dokazali njegovo pozitivno djelovanje [56].

#### ■ **Antimikrobna svojstva**

Iako još nedovoljno istražena, maslačak pokazuje i antimikrobno djelovanje. tako je u jednoj eksperimentalnoj studiji testirano antivirusno djelovanje od 472 tradicionalne biljke na humani virus herpesa tipa 1. nakon provedenog istraživanja utvrđeno je visoko antivirusno djelovanje 10 biljaka, među kojima je i maslačak [57]. Pretpostavlja se kako su za antimikrobna svojstva maslačka odgovorni flavoni, no potrebno je provesti još istraživanja kako bi se potvrdila ta hipoteza.

## 6. ISTRAŽIVAČKI DIO

U istraživačkom dijelu ovog rada određivala se antimikrobna aktivnost jestivih filmova na bazi čaja od sušenog korijena maslačka. Na samom početku bilo je potrebno pripremiti hranjive podloge za kvasce i plijesni te pripremiti čaj. U daljnjem tekstu navedeni su materijali i kemikalije potrebne za analizu te metode rada.

### 6.1. Materijali

- Magnetna miješalica
- pH metar
- filter papir
- laboratorijska čaša
- odmjerna tikvica
- sterilne mikrotitarske pločice
- mikropipete
- sterilni vrhovi od 100  $\mu$ L
- čitač mikrotitarske pločice
- jednokratne sterilne Petrijeve zdjelice
- epruvete
- vorteks mješalica

### 6.2. Kemikalije

- Testni medij RPMI 1640
- Sterilna fiziološka otopina

- MOPS
- Osušeni korijen maslačka
- McFarlandov standard

### 6.3. Kontrola kvalitete

Za kontrolu kvalitete korišteni su sojevi *C. parapsilosis* ATCC 22019 i *C. krusei* ATCC 6258 kako bi se provjerila ispravnost pripremljene antifungalne tvari, tj. ekstrakta čaja osušenog korijena maslačka.

### 6.4. Hranjive podloge

- MBA agar – za sporuliranje *Fusarium* plijesni
- Agar: Sabouraud dekstroza agar (SAB) ploče – za određivanje održivog broja CFU po mililitru
  - Epruvete sa kosim krumpir dekstroza agrarom – za induciranje stvaranja konidija i sporangiospora

### 6.5. Kvasci i plijesni

- *Fusarium graminearum*

*Fusarium graminearum* je askomicetna vrsta plijesni koja dovodi do nastanka Fusarium plemenjače u usjevima brojnih žitarica poput pšenice, ječma, riže itd. također, uzrokuje trulež klipa i stabljike kukuruza te se smatra jednim od najvećih patogena žitarica. Osim što dovodi do kvarenja žitarica, *F. garminearum* proizvodi mikotoksine koji su iznimno opasni za zdravlje stoke i ljudi. Problem je što se miktoksini lako prenose u krmne smjese što za posljedicu ima narušavanje kvalitete zrna te njegove zdravstvene ispačnosti, a u konačnici to dovodi do velikih poljoprivrednih gubitaka. Ova vrsta plijesni vrlo je otporna i izdržljiva na sve vremenske uvijete zahvaljujući aksosporama i konidijama. Ove spore omogućuju joj otpornost na nepovoljne uvjete okoliša zbog čega ,primjerice, može preživjeti i zimu unutar biljnog tkiva [58].

- *Aspergillus flavus*

*Aspergillus flavus* je je saprofitna plijesan koja proizvodi aflatoksine te često kontaminira sjemenske usjeve prije i nakon žetve. Štetna je i za životinje i ljude te se stoga naziva oportunističkim patogenom. Aflatoksin koje *A. flavus* proizvodi kancerogen je sekundarni metabolit ove plijesni koji uzrokuje razne bolesti. Vodeći je uzročnik invazivne aspergiloze i najčešći uzročnik površinske infekcije brojnih žitarica. Najčešće kolonizira žitarice, mahunarke i orašaste plodove te zadaje velike probleme proizvođačima hrane [59].

- *Alternaria alternata*

*Alternaria alternata* plijesan je koja proizvodi mikotoksine te spada među najčešće patogene koji kontaminiraju brojne prirodne prehrambene proizvode: voće i povrće, žitarice, sjemenke i drugo. Zbog velikog sadržaja vode, *Alternariu* se često može pronaći u rajčicama, jagodama, narančama, mandarinama i dr. kako bi se spriječilo kontaminiranje navedenog voća i povrća, potrebno ga je skladištiti na niskim temperaturama te ograničiti vrijeme skladištenja do 10 dana. Također, hranu je moguće zaštititi raznim kemijskim, fizikalnim i biološkim metodama od razvoja ove plijesni [60].

- *Aspergillus ochraceus*

*Aspergillus ochraceus* je plijesan koja spada u skupinu *Aspergillus* koja proizvodi ohratoksin A i citrinin. Važan je prehrambeni patogen koji zagađuje hranu, a uz navedene toksine proizvodi i penicilne kiseline te vinomelein. Ova plijesan uzrokuje bolest poznatu kao *Balkanska endemska nefropatija*, a koja nastaje kao posljedica konzumacije prehrambenih proizvoda kontaminiranih sa ohratoksinom A i penicilinskom kiselinom, citrininom te aristolohičnom kiselinom [61].

- *Penicilium expansum*

*Penicilium expansum*, poznatija kao plava plijesan, čest je uzročnika kvarenja voća i povrća. Negativno utječe na kvalitetu plodova te pridonosi gubitku hrane. Ova plijesan proizvodi brojne mikotoksine, a neki od njih su patulin, citrinin, ohratoksin A. najviše štete prouzročava na jabučastom voću zbog čega godišnji gubici nekih voćara znaju dosegnuti i do milijun dolara [62].

- *Candida albicans*

*Candida albicans* je visoko patogeni oportunistički kvasac te je dio normalne flore gastrointestinalnog trakta, usne šupljine i vagine. Oportunističkim patogenom postaje kod imunokompromitiranih ljudi kao što su onkološki bolesnici i osobe zaražene HIV-om. Do zaraze ovom vrstom kvasca često dolazi u bolnicama, a posebice je opasna za pacijente koji su bili podvrgnuti nekim kirurškim zahvatima te transplantaciji. Iako danas postoje brojne antifungalne terapije, mortalitet uzrokovan ovom gljivicom jako je visok, odnosno, više od 75% ljudi sustavno inficiranih *C. albicans* umre (kod sepse odnosno infekcije vitalnih sterilnih sustava kod ljudi [63]).

- *Candida krusei*

*Candida crusei* je vrsta kvasca koja prirodno nastanjuje sluznicu zdravih sisavaca. Kod osoba s oslabljenim imunitetom može uzrokovati opasne infekcije, koje ukoliko se ne liječe na vrijeme, dovode do smrti. Posebnost ovog kvasca je što je rezistentan na veliku većinu antifungalnih lijekova zbog čega stvara velike probleme kod liječenja [64]. također, ova vrsta kvasca koristi se u proizvodnji čokolade. Naime, pomaže u fermentaciji zrna kakaovca proizvodeći enzime koji nizom procesa uklanjaju gorčinu iz zrna.

- *Candida parapsilosis*

*Candida parapsilosis* je vrsta kvasca koja se prirodno nalazi u domaćim životinjama, kukcima i tlu. Također, komenzal je ljudske kože, ali može biti vrlo opasna za ljudski organizam. Jedan je od češćih uzročnika sepse te uzrokuje infekcije rana i tkiva kod osoba sa slabijim imunitetom [65].

## 6.6. Metode rada

### 6.6.1. Priprema čaja od sušenog korijena maslačka

Za pripremu čaja koristio se korijen maslačka roda *Taraxacum* i destilirana voda. Za potrebnu otopinu odvagano je 1,620 g osušenog korijena maslačka te dodano 250 mL destilirane vode. Otopina se zagrijavala na magnetnoj miješalici do vrenja. Kada je čaj zavreo ostavljen je da vrije 2 minute. Nakon završenog vrenja, čaj je ostavljen da se hladi 15-ak minuta. Slika 17. prikazuje kuhanje čaja.



*Slika 17 Kuhanje čaja od korijena maslačka [vlastiti izvor]*

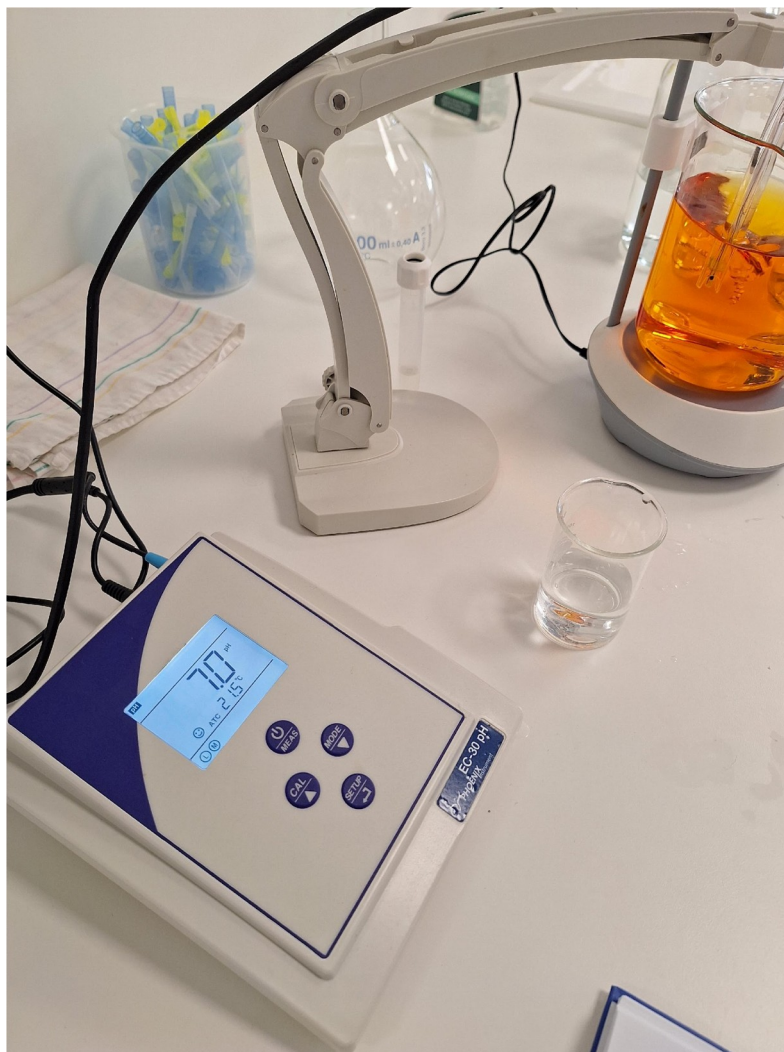
### **6.6.2. CLSI metoda mikrorazrijeđenja hranjive podloge**

Institut za kliničke i laboratorijske standarde (CLSI) odobrio je standardne metode razrjeđivanja hranjive podloge za testiranje osjetljivosti kvasaca i plijesni. Navedena metoda korištena je u ovom radu. Metoda uključuje mikrotitarsku pločicu koja sadrži niz razrijeđenja u kojima se nalazi određena koncentracija antifungalnog sredstva koje se inokuliraju standardiziranim suspenzijama kvasaca i plijesni [66]. U ovom radu antifungalno sredstvo koje se koristilo je čaj od sušenog korijena maslačka, a plijesni i kvasci kojima se određivala osjetljivost navedeni su ranije. CLSI metoda mikrorazrijeđenja provodi se u nekoliko koraka opisanih u nastavku.

#### ■ **Priprema RPMI-1640 hranjive podloge**

Za pripremu otopine hranjive podloge izvagano je 10,4 g RPMI-1640 hranjive podloge te rastopljeno u 900 mL destilirane vode. Zatim je odvagano 34,53 g MOPS-a kojeg se zatim dodalo u otopinu i miješalo sve do homogenizacije. Neprestano miješajući na magnetnoj miješalici bilo je potrebno izmjeriti pH u vrijednosti od točno 7,00. pH otopine podešavao se koristeći 10 ili 1 mol/L

otopinom natrijeva hidroksida (Slika 18.). Kada smo postigli traženu pH vrijednost dodana je potrebna količina destilirane vode kako bi ukupan volumen otopine iznosio 1L. Hranjiva podloga sterilizirana je u laminaru pomoću 0,22  $\mu\text{m}$  filtera te dozirana u sterilnu staklenu bočicu od 500 mL. Prije nego li se upotrijebila, podloga je bila čuvana u hladnjaku pri temperaturi od 4°C.

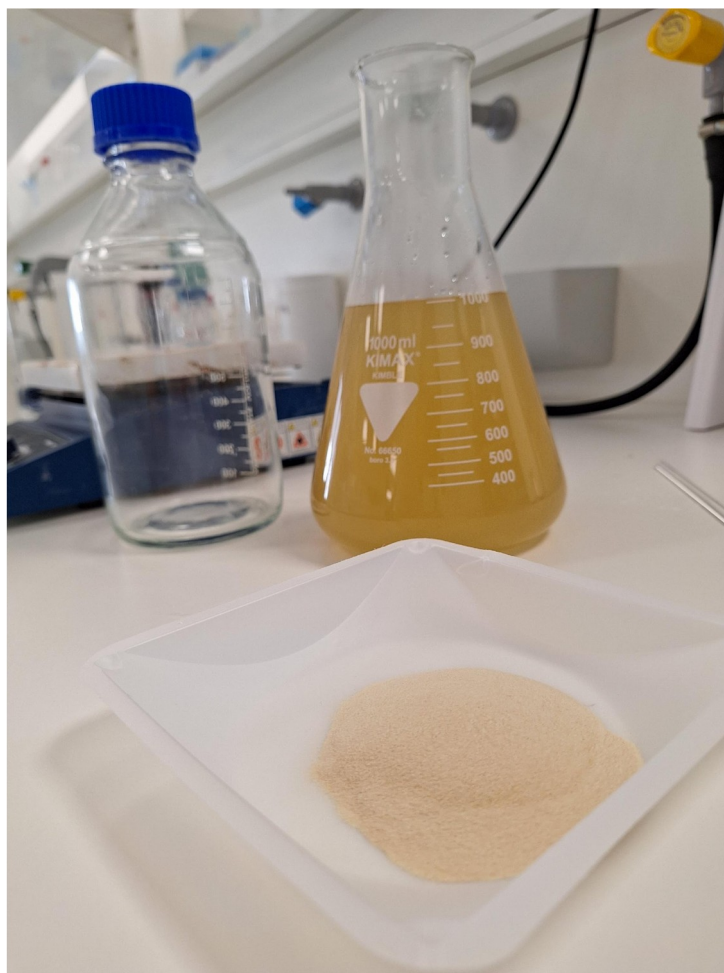


Slika 18 Podešavanje pH otopine na vrijednost od 7,00 [vlastiti izvor]

#### ■ Priprema MBA hranjive podloge

MBA hranjiva podloga sastoji se od Mungo graha, a pripremljena je na slijedeći način: 40 g Mungo graha dodano je u 1 L destilirane vode te je stavljeno zagrijavati na magnetnu miješalicu do vrenja. Kada je otopina zavrela, ostavljena je da vrije 23 minute. Nakon vrenja, otopina se filtrirala kroz filter papir u odmjernu tikvicu u koju se naknadno dodala destilirana voda kako bi volumen otopine bio 1 L. Zatim se odvagalo 15 g agara te dodalo u otopinu graha neprestano miješajući dok se nije postigla homogena otopina (Slika 19.). Novonastali agar prije upotrebe sterilizirao se u autoklavu pri 121 °C tijekom 15 min.





Slika 19 Dodavanje agara u otopinu Mungo graha [vlastiti izvor]

#### ■ Priprema antifungalnog sredstva – čaj od sušenog korijena maslačka

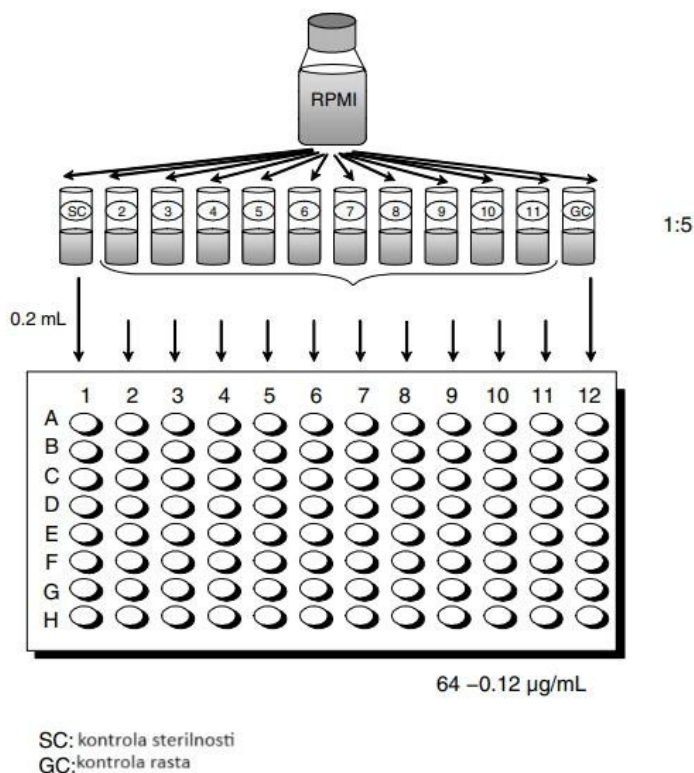
Od pripremljenog čaja bilo je potrebno napraviti 4 različita razrjeđenja, odnosno antifungalno sredstvo sa 100%, 75%, 50% i 25% udjela čaja. Razrjeđenja su napravljena pomoću destilirane vode, a u tablici su prikazani volumeni čaja i destilirane vode za svako razrjeđenje (Tablica 8). Uz razrjeđenja pripremljen je i kontrolni uzorak, odnosno čista destilirana voda.

Tablica 8 Priprema razrjeđenja otopine čaja [vlastiti izvor]

RAZRJEĐENJA	VOLUMENI ČAJA I DESTILIRANE VODE
KONTROLNI UZORAK	200 mL destilirane vode
RAZRJEĐENJE 100%	200 mL čaja osušenog korijena maslačka
RAZRJEĐENJE 75%	150 mL čaja + 50 mL destilirane vode
RAZRJEĐENJE 50%	100 mL čaja + 100 mL destilirane vode
RAZRJEĐENJE 25%	50 mL čaja + 150 mL destilirane vode

#### ■ Priprema jažica mikrotitarske pločice za antifungalno sredstvo

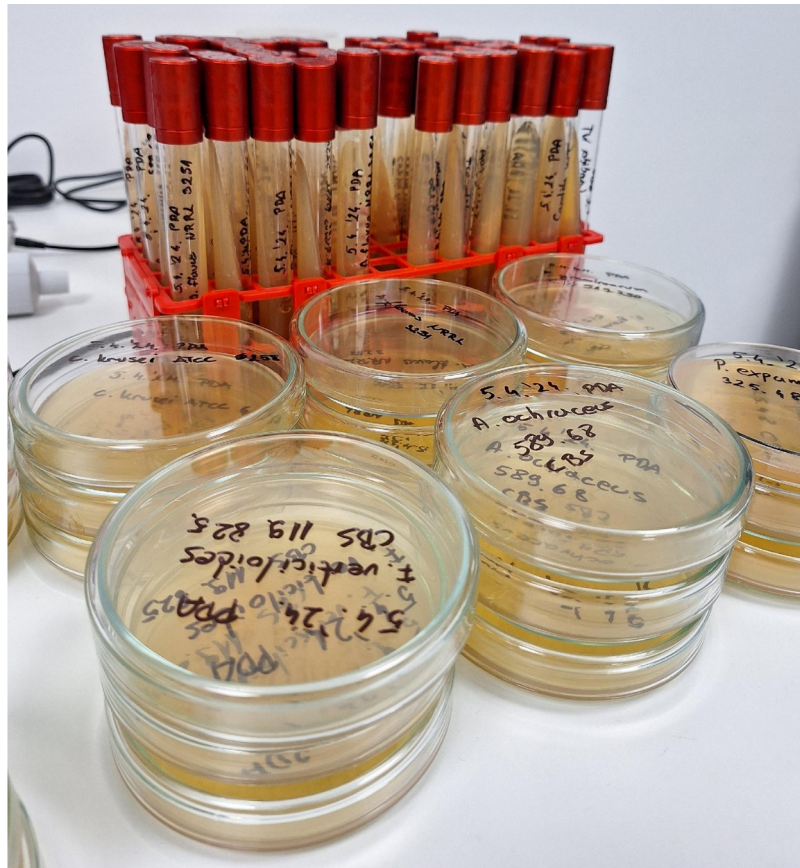
Otopina antifungalnog sredstva i RPIM-a aplicirala se u jažice tako da se dodalo 4 mL RPIM-a u pripremljene epruvete sa antifungalnim sredstvom te se svaka dobro promiješala na vorteksu. Pomoću mikropipetora preneseno je 0,1 mL iz svake epruvete u odgovarajuću jažicu (Slika 21). Zatim se dodalo 0,2 mL RPIM-a u kolonu 1 i 0,1 mL u kolonu 12 na mikrotitarskoj pločici. Te kolone služile su kao kontrolne kolone, odnosno kolona je je tzv. *sterilnost* (pozitiv), a kolona 12 *kontrola rasta* (negativ).



Slika 20 Shema pripreme mikrorazrjeđenja za antifungalno sredstvo [66]

#### ■ Priprema inokuluma

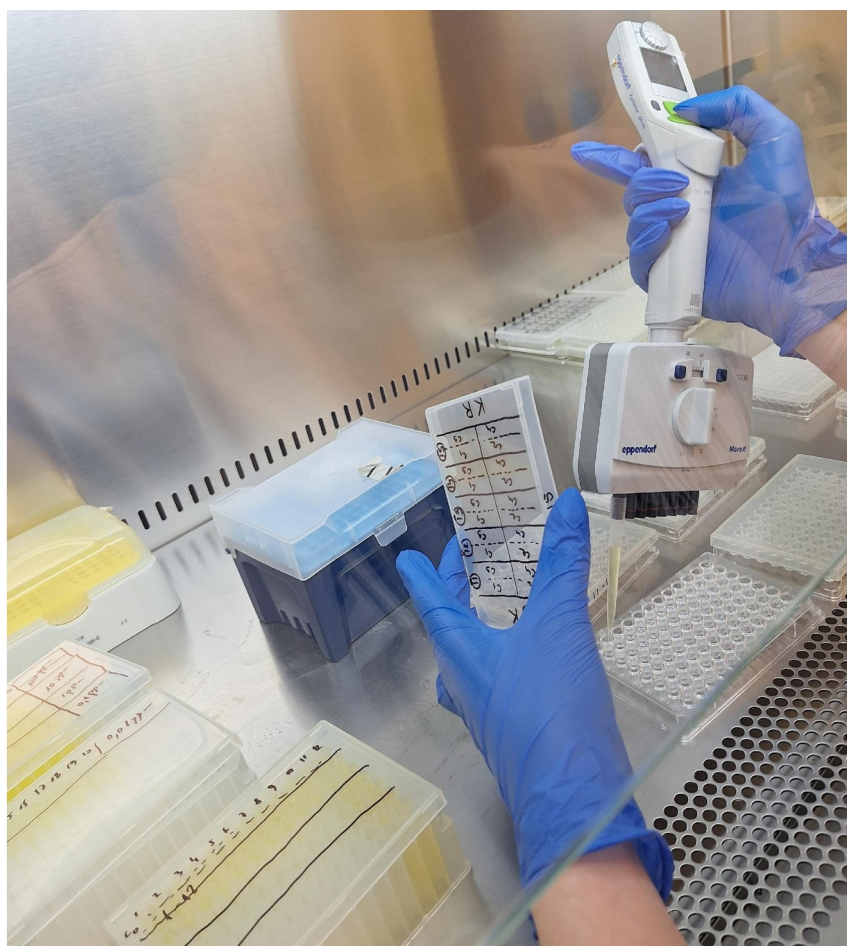
Inokulum je pripremljen iz čistih kultura kvasaca uzgojenih na SAB-u i plijesni uzgojenih na krumpir dekstroza kosom agru (Slika 22.). Stanice kvasca suspendirale su se u 5 mL sterilne 0,85% otopine natrijeva klorida. Zamućenost inokuluma podešena je na gustoću 0,5 McFarlandovog standarda pri valnoj duljini od 530 nm. Radna suspenzija pripremljena je tako da su napravljena 1:100 razrjeđenja osnovne suspenzije pa zatim razrjeđenja 1:20 sa RPIM-om čime se dobila koncentracija od  $5 \times 10^2$  do  $2,5 \times 10^3$  CFU/mL. Kod inokuluma pripremljenog iz čistih kultura plijesni radna suspenzija pripremljena je razrjeđivanjem osnovne suspenzije u omjeru 1:50 u standardnom mediju .



Slika 21 Pripremljene kulture kvasaca i plijesni za pripremu inokuluma [vlastiti izvor]

#### ■ Inokulacija mikrotitarske pločice

Svaka jažica mikrotitarske pločice inokulirana je sa 0,1 mL radne suspenzije inokuluma pomoću višekanalnog mikropipetora. Slika 23. prikazuje proces inokulacije.

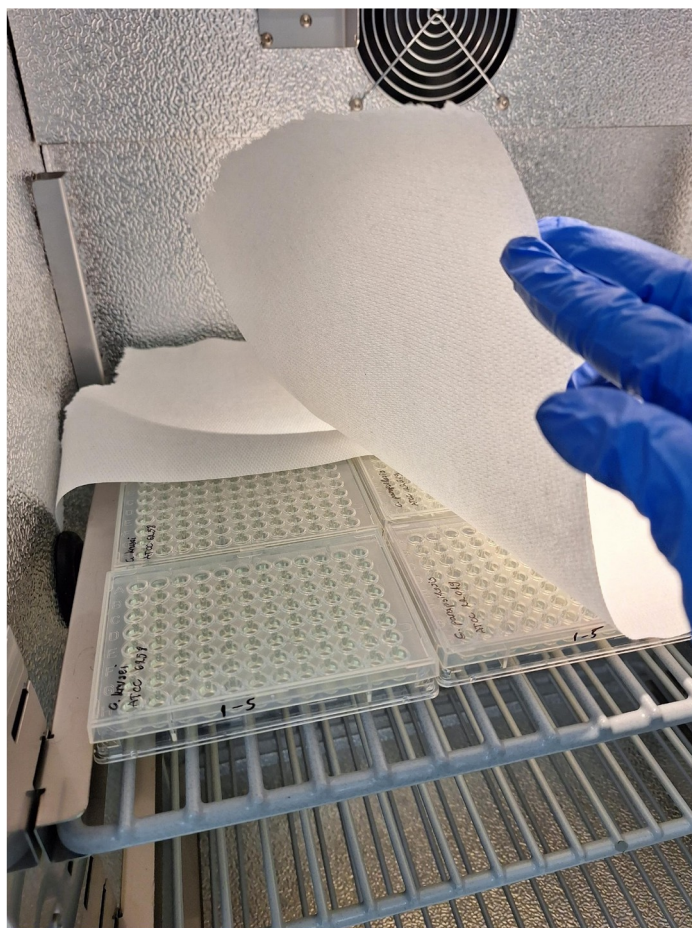


*Slika 22 Inokuliranje jažica mikrotitarske pločice [vlastiti izvor]*

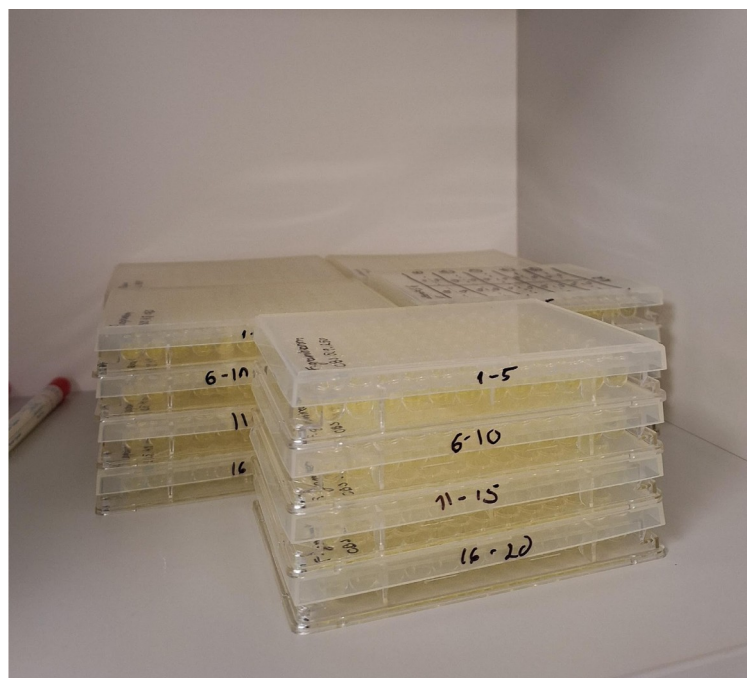
## ■ Inkubacija

Mikrotitarske pločice inokulirane inokulumom plijesni bile su inkubirane u aerobnom inkubatoru pri temperaturi od 35°C tijekom 24 sata (slika 24.), a one inokulirane kvascima bile su inkubirane u mračnoj prostoriji tijekom 24 sata (Slika 25.).





Slika 23 Inkubacija plijesni u inkubatoru [vlastiti izvor]



Slika 24 Inkubacija kvasaca [vlastiti izvor]

### **6.6.3. Metode određivanja antimikrobne aktivnosti korijena maslačka**

Antimikrobna učinkovitost korijena maslačka izražena je MIC metodom, odnosno metodom određivanja minimalne inhibitorne koncentracije. MIC je, dakle, najniža koncentracija antifungalnog sredstva koja inhibira rast mikroorganizma barem 50% u odnosu na kontrolu koje je otkriveno spektrofotometrijski nakon 48 h ili 72 h inkubacije [66].

Otopine, pribor i posuđe korišteno za određivanje antimikrobnih svojstava prethodno je sterilizirano. Svi postupci provedeni u ovom radu urađeni su pri sterilnim uvjetima.

### **6.6.4. Metoda određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)**

Prilikom izvođenja metode minimalne inhibitorne koncentracije korištene su sterilne mikrotitarske pločice sa 96 otvora. Prethodno pripremljen čaj od osušenog korijena maslačka serijski se razrjeđivao CLSI metodom mikrorazrjeđenja opisanom ranije u radu. Ovakvim načinom razrjeđivanja početna koncentracija testiranog uzorka razrijedila se duž pločice tako da je svaka sljedeća koncentracija upola niža od prethodne. Konačni volumen u svakoj jažici nakon razrjeđivanja iznosio je 50  $\mu$ L. U svrhu kontrole rezultata na svakoj se pločici pripremila slijepa proba i pozitivna kontrola (kontrola rasta). U sve otvore, osim u slijepu probu dodane su ispitivane kulture kvasaca i plijesni nakon čega su se uzorci inkubirali 48-72 sata prije očitavanja rezultata.

### **6.6.5. Čitač mikrotitarskih pločica**

Čitač mikrotitarskih pločica uređaj je koji se koristi za mjerenje optičke gustoće uzoraka smještenih u mikrotitarskoj pločici. Čitač se temelji na spektrofotometriji, odnosno na interakciji uzroka s elektromagnetskim zračenjem, pri čemu ispitivani uzorak apsorbira ili emitira određenu količinu zračenja koja se potom mjeri i interpretira [67]. Uzorci se stavljaju u čitač prilikom čega se očitava apsorbanacija pri određenoj valnoj duljini. Prilikom ovog istraživanja uzrocima se mjerila apsorbanacija pri dvjema vrijednostima valnih duljina: 405 i 450 nm.

## 7. REZULTATI

### 7.1. Antimikrobno djelovanje uzorka čaja sušenog korijena maslačka na kvasce

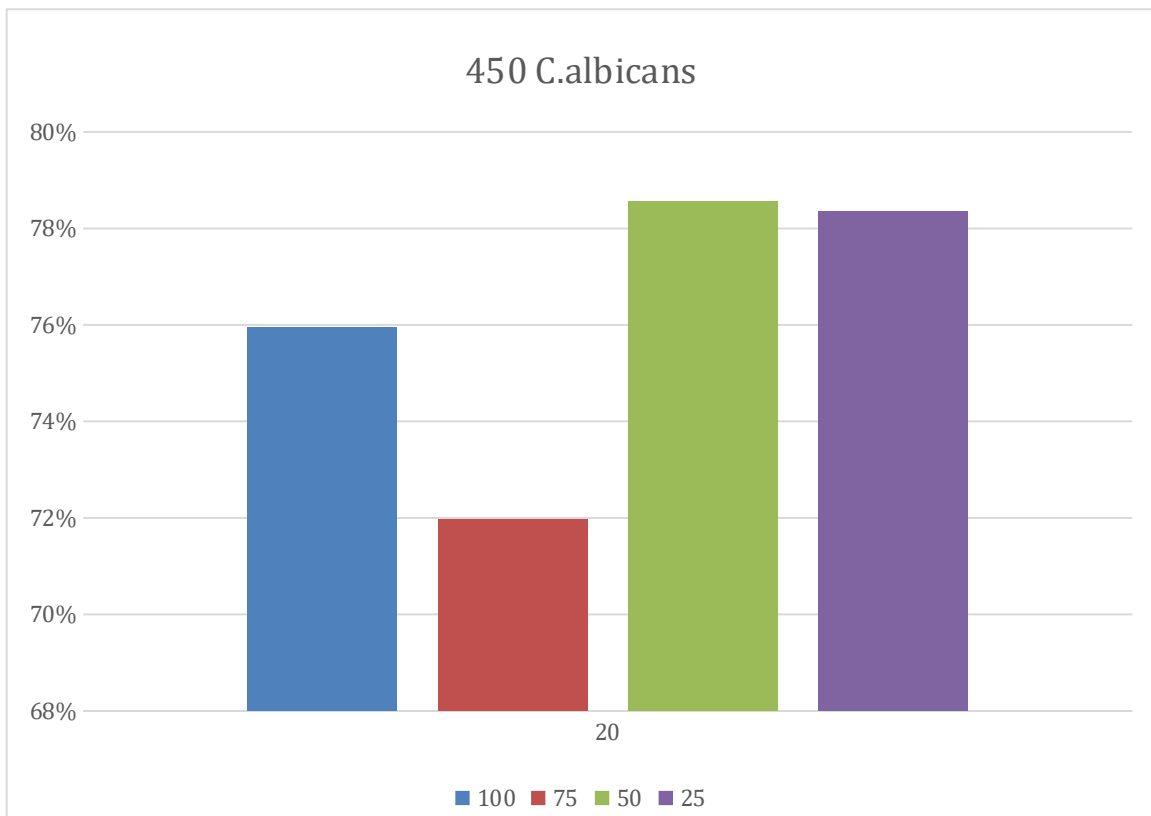
Prilikom učitavanja mikrotitarske pločice pri valnoj duljini od 450 nm utvrđene su visoke vrijednosti rasta kvasaca, a svi rezultati prikazani su u tablici 8.

Tablica 8 Rast kvasaca pri 450 nm

VRSTA KVASCA	KONCENTRACIJA ČAJA/%			
	100	75	50	25
450 nm	RAST KVASACA/%			
<i>C. albicans</i>	76	72	79	78
<i>C. krusei</i>	3	84	80	81
<i>C. parapsilosis</i>	76	87	82	91

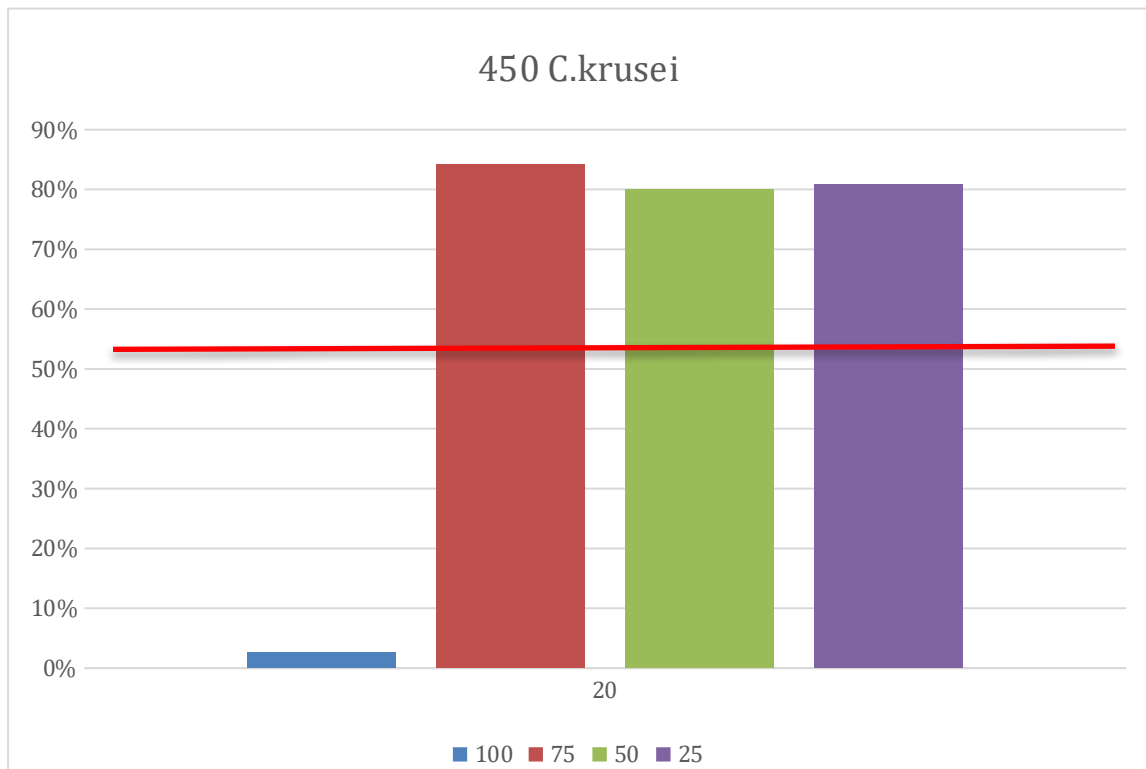
Iz prikazanih podataka vidljivo je kako vrijednosti inhibicije variraju ovisno o vrsti kvasaca, no sve se kreću u visokim vrijednostima. Gledajući dobivene vrijednosti, ne može se utvrditi da koncentracija čaja znatno utječe na njegovo antifungalno djelovanje. Ipak, pri 100%-tnoj koncentraciji čaja zabilježen je niski postotak rasta vrste *C. crusei*. Obzirom da je rezistentna na skoro sve antifungalne tvari, 100%-tnom otopinom čaja postignut je vrlo visok inhibitorni učinak od 97% odnosno samo 3% rasta u odnosu na kontrolu. S druge strane, pri većim razrjeđenjima čaja zabilježene su i nešto veće vrijednosti rasta kvasaca. Tako *C. crusei* pri 75%-tnoj otopini čaja pokazuje veliki skok u rastu te isti iznosi visokih 84%. Najviša vrijednost od 91% izmjerena je kod vrste *C. parapsilosis* pri 25%-tnoj koncentraciji čaja. Vrijednosti rasta izmjerene kod kvasca *C. albicans* također su više od 70% pri svim koncentracijama. Zaključujemo kako čaj korijena maslačka ima slab učinak na oštećenje stanične membrane te loša antimikrobna svojstva čime pokazuje slab antifungalni učinak na testirane vrste kvasaca.

#### *C. albicans*



Slika 25 Grafički prikaz rasta *C. albicans* pri 450 nm

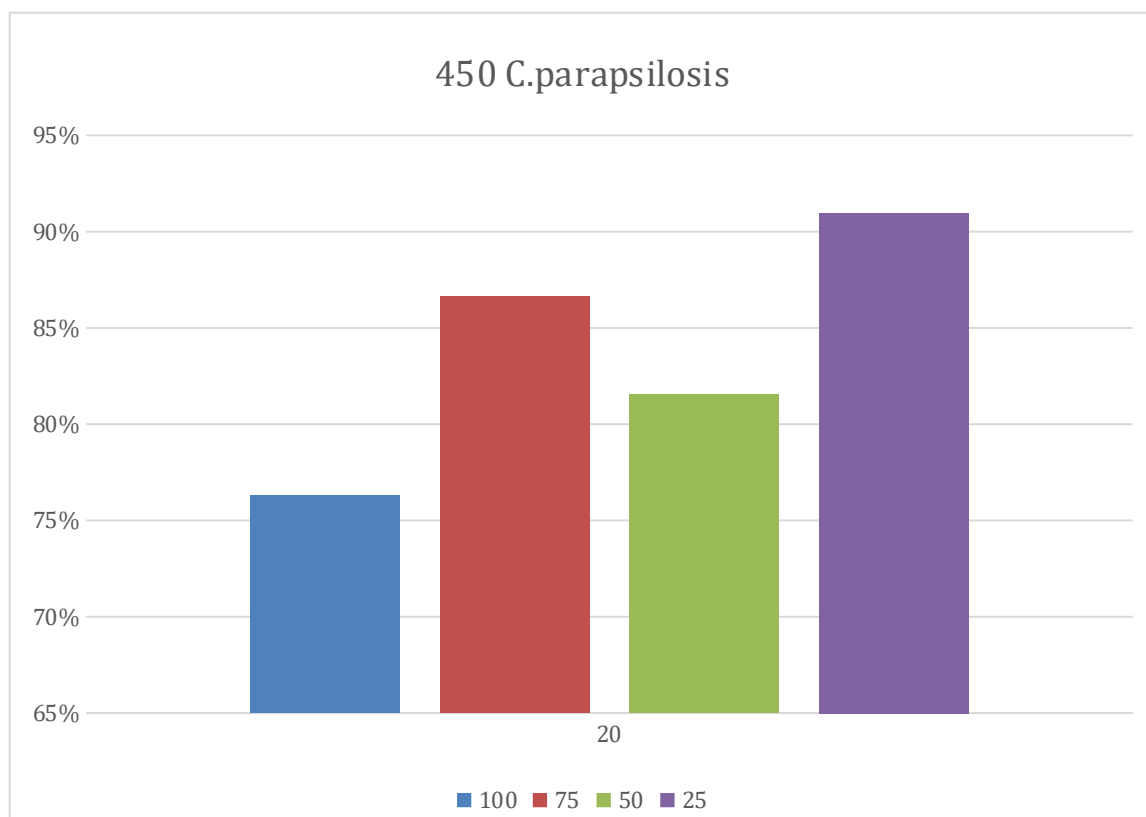
***C. krusei***



Slika 26 Grafički prikaz rasta *C.krusei* pri 450 nm



### ***C. parapsilosis***



Slika 27 Grafički prikaz rasta *C.parapsilosis* pri 450 nm

## **7.2. Antimikrobno djelovanje uzorka čaja sušenog korijena maslačka na plijesni**

Dobiveni rezultati rasta plijesni u odnosu na kontrolni uzorak također su se pokazali vrlo visokima, a u tablici 10. prikazane su sve vrijednosti izmjerene pri određenim koncentracijama.

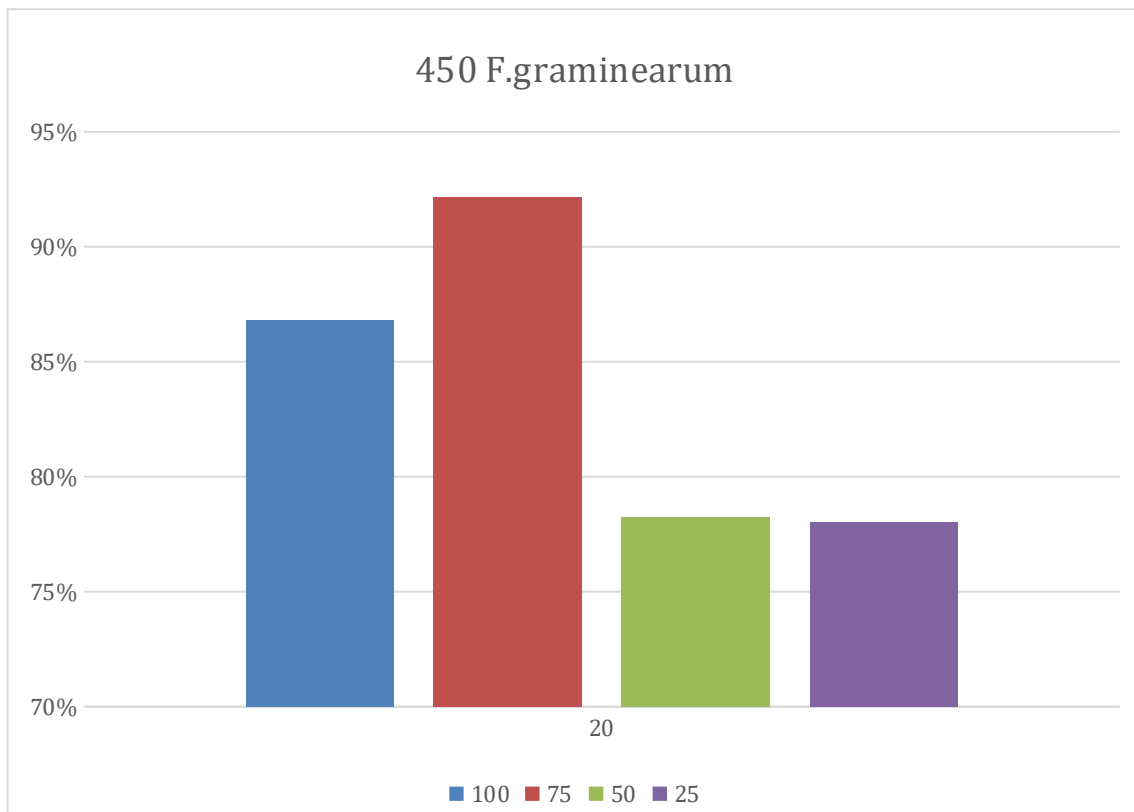
Tablica 10 Rast plijesni pri 450 nm

VRSTA PLIJESNI	KONCENTRACIJA ČAJA/ %			
	100	75	50	25
<b>450 nm</b>	<b>RAST PLIJESNI/%</b>			
F. graminearum	87	92	78	78
A. alternata	63	64	62	56
A. flavus	70	4	151	147

A. ochraceus	89	84	85	77
P. expansum	114	104	77	84

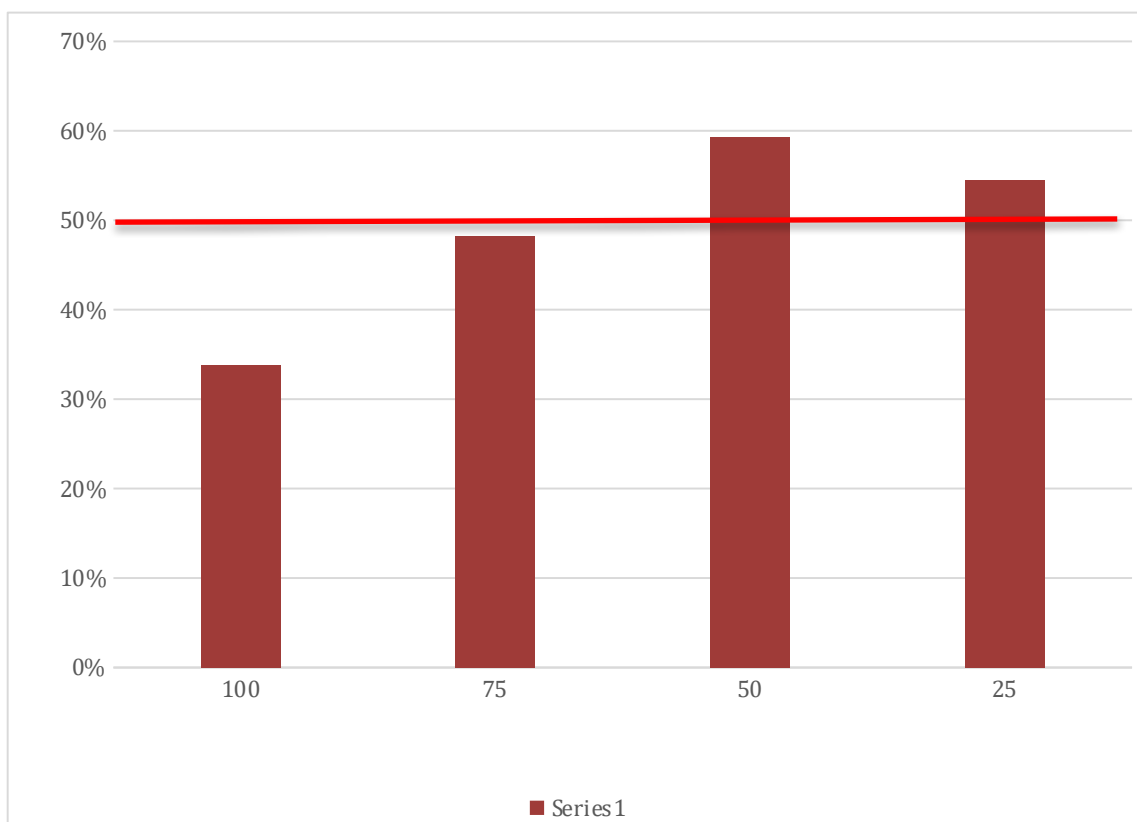
Vrijednosti rasta se, kao i kod kvasaca, razlikuju ovisno o vrsti plijesni te o razrjeđenju otopine čaja. Štoviše, nema velikih varijacija između koncentracija čaja te se skoro sve vrijednosti kreću u malim intervalima. Međutim, zabilježena su i neka odstupanja od navedenog. Tako je, primjerice, kod plijesni *A. flavus* zabilježen vrlo visok rast pri dvjema najnižim koncentracijama čaja. Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako čaj korijena maslačka pri 50%-tnoj i 25%-tnoj otopini potiče spomenutu plijesan na rast. S druge strane, 75% otopina čaja pokazuje visok inhibitorni učinak na *A. flavus*, odnosno najbolji antifungalni učinak izmjeren u ovom istraživanju. Vrijednosti rasta veće od 100% izmjerene su i kod vrste *P. expansum*, pri dvjema najvišim koncentracijama otopine čaja. Kod ove plijesni najmanji postotak rasta izmjeren je pri 50%-tnoj otopini čaja, međutim i dalje u previsokim vrijednostima da bi mogli govoriti o jakom antifungalnom djelovanju. Najniže vrijednosti rasta plijesni izmjerene su kod vrste *A. alternata*, a najniža je izmjerena pri 25%-tnoj otopini čaja. Obzirom da je vrlo otporna te stvara konidije, *F. graminearum* pokazuje vrlo visoke vrijednosti rasta pri svim razrjeđenjima čaja korijena maslačka. Prema dobivenim rezultatima vidljivo je kako čaj korijena maslačka pokazuje vrlo slab antifungalni učinak na testirane plijesni te neke od ispitanih potiče na dodatni rast i razvoj.

### ***F. graminearum***



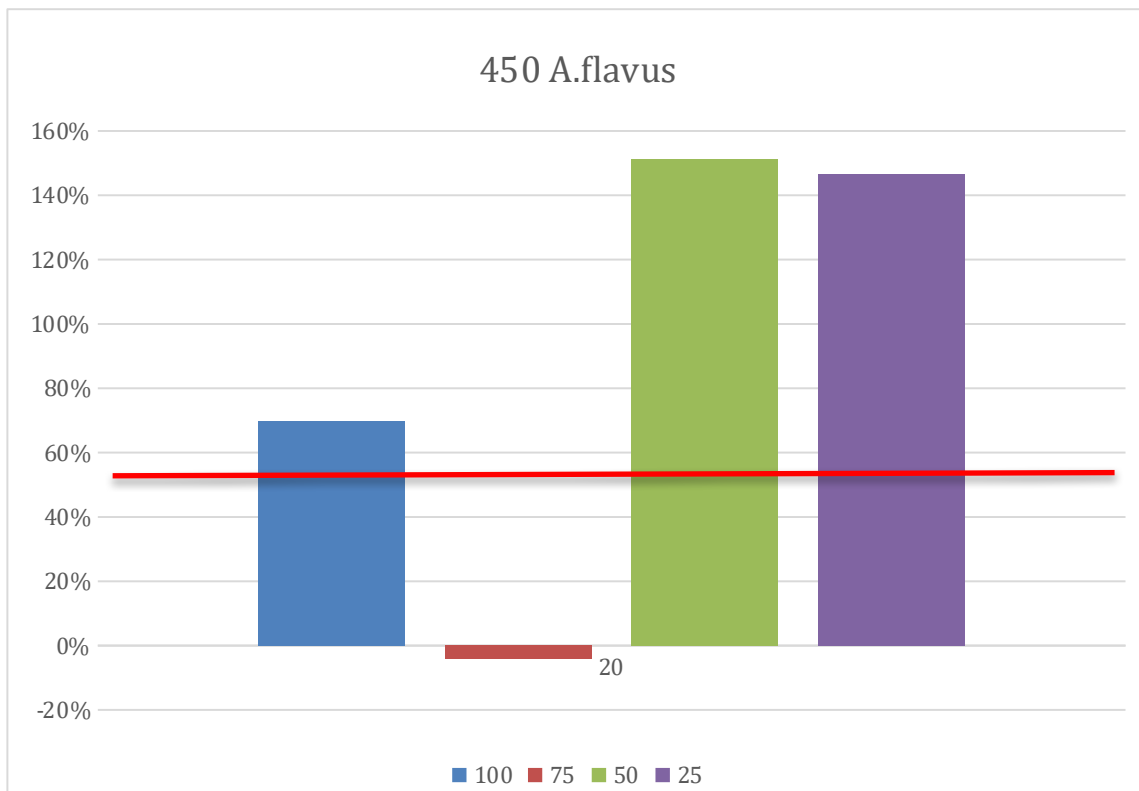
Slika 28 Grafički prikaz rasta *F.graminearum* pri 450 nm

***A. alternata***



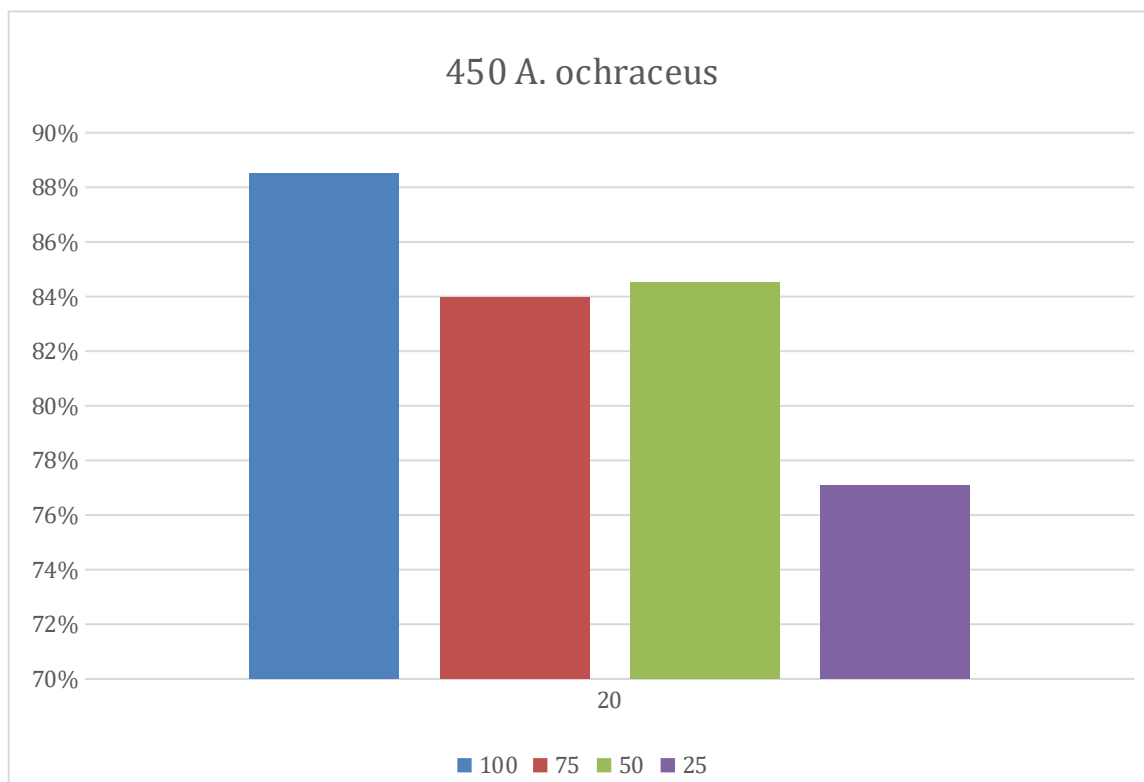
Slika 29 Grafički prikaz rasta *A.alternata* pri 450 nm

***A. flavus***



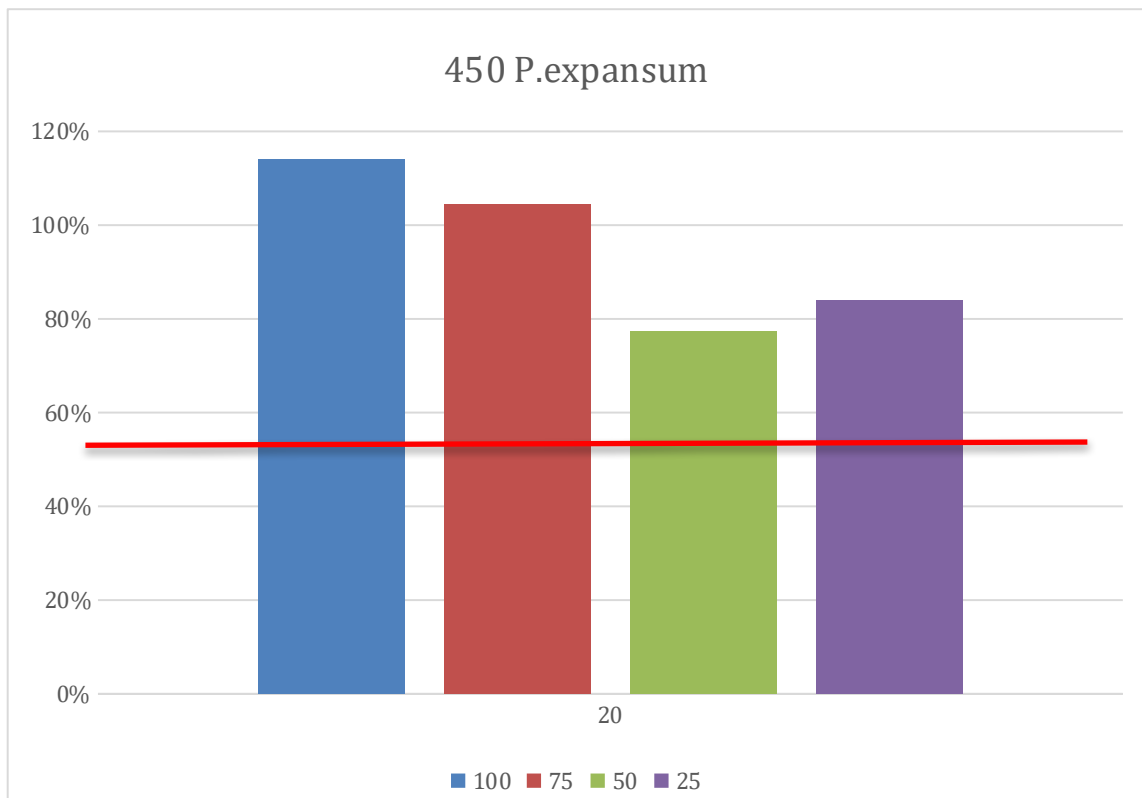
Slika 30 Grafički prikaz rasta *A.flavus* pri 450 nm

***A. ochraceus***



Slika 31 Grafički prikaz rasta *A. ochraceus* pri 450 nm

***P. expansum***



Slika 32 Grafički prikaz rasta *P.expansum* pri 450 nm

## 8. ZAKLJUČAK

Posljednjih godina dolazi do sve većeg razvoja novih ambalažnih materijala za pakiranje hrane koji omogućuju sigurnost i trajnost proizvodu bez narušavanja njegove kvalitete, a koji su izrađeni od održivih, biorazgradivih materijala. Jestiva ambalaža sa antimikrobnim svojstvima definitivno je budućnost u sigurnom pakiranju koja će uz sprječavanje mikrobne kontaminacije proizvoda pozitivno utjecati i na poboljšanje njegove kvalitete te produljenje trajnosti.

U eksperimentalnom dijelu rada određena je antimikrobna aktivnost ekstrakta čaja sušenog korijena maslačka na kvasce i plijesni pomoću spektrofotometra. Rezultati su nam pokazali kako ekstrakt ima slabo inhibitorno djelovanje na skoro sve vrste kvasaca i plijesni. Najveće antimikrobno djelovanje čaja korijena maslačka izmjereno je jedino kod kvasca vrste *C. krusei* pri 100%-tnoj otopini čaja i kod plijesni vrste *A. flavus* pri istoj koncentraciji ekstrakta čaja. Također, kod plijesni su zabilježene mnogo više vrijednosti rasta u odnosu na one izmjerene kod kvasaca. Štoviše, kod plijesni vrste *A. flavus* i *P. expansum* zabilježene su vrijednosti rasta veće od 100% što ukazuje na to kako su 50%-tna i 25%-tna otopina čaja navedene plijesni dodatno potaknule na rast.

Iako dobiveni rezultati ukazuju na loša inhibitorna svojstva korijena maslačka, potrebno je provesti još dodatnih istraživanja sa istim kako bi se utvrdile mogućnosti njegove primjene u izradi jestivih filmova.

## 9. LITERATURA

- [1] L. Kumar, D. Ramakanth, K. Akhila, i sur.: Edible films and coatings for food packaging applications, *Environ Chem Lett* 20, 2022., 875-900 str.
- [2] Saklani, Pooja i Kumar, Siddhnath i Das, Sambit i Singh, Shiv.: A Review of Edible Packaging for Foods, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 8, 2019., 2885-2895 str.
- [3] S, Nair, J. Trafialek, W. Kolanowski: edible Packaging: A Technological Update for the Sustainable Future of the Food Industry, *Appl. Sci*, 13, 2023.
- [4] M. Gujinović: Jestivi ambalažni materijali, Završni rad, FKIT, Split, 2021.
- [5] G. Prakash, R.K. Mishra: Edible and bio-based food packaging, *The Pharma Inovation Journal*; SP 12 (7), 1497-1505 str., 2023.
- [6] <https://www.greenoptimistic.com/ooho-water-bottle-20170429/> , dostupno 24.6.2024.
- [7] <https://www.nature.com/articles/d44151-022-00097-3> , dostupno 17.6.2024.
- [8] K. Lovedeep, S. Jaspreet: *Advances in Potato Chemistry and Tecnology (Second Edition)*, ACADEMIC PRESS, 627-649 str., 2016.
- [9] H.M.C. Azeredo, C.G. Otoni, L.H.C. Mattoso: Edible films and coatings – Not just packaging materials , *Food Science* 5 , 1590-1595 str., 2022.
- [10] M. Vukomanović: Prirodni polimeri, Završni rad, UNIOS, Osijek, 2015.
- [11] K. Galušić: Aktivni materijal na bazi biopolimera škroba s dodanim polifenolima aronije, Diplomski rad, UNIOS, Osijek, 2023.
- [12] S. Romão, A. Betencourt, I.A.C. Ribeiro: Novel Features of Cellulose-Based Films as Sustainable Alternatives for Food Packaging, *Polymers (Basel)*, 14(22), 2022.
- [13] E. Maurizzi, F. Bigi, A. Quartieri, i sur: The Green Era of Food Packaging: General Considerations and New Trends, *Polymers* 2022.
- [14] <https://www.sino-cmc.com/sodium-carboxymethyl-cellulose-applied-in-edible-packaging-film-2/> , dostupno 8.7.2024.
- [15] V. Mihalca, A.D. Kereszi i sur.: Protein-Based Films and Coatings for Food Industry Applications, *Polymers (Basel)*, 13(5):769, 2021.
- [16] <https://www.scielo.br/j/cr/a/Qh9sc8JYTsPLxRc5XG8cMJt/> , dostupno 8.7.2024.
- [17] F. Aydin, H. I. Kahve, M. Ardic: Lipid- based edible films, *The Jorunal of Scientific and Engineering Research*, 2017.
- [18] <https://tokic-alati.hr/mikrometar-723511/> , dostupno 8.7.2024.
- [19] J. Buljan: Barijerna i mehanička svojstva jestivih filmova od kitozana s ekstraktom sjemenki grožđa, Diplomski rad, PBF, Zagreb, 2020.
- [20] C. Han, Y. Zhao, S. Leonard i sur.: Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries and raspberries, *Posthaw.Biol.Technol.*, 33(1), 67-78 str., 2004.
- [21] S. Sharma, K. Nakano, S. Kumar i V. Katiyar: Edible packaging to prolong postharvest shelf-life of fruits and vegetables, *Food Chemistry Advances* 4, Elsevier, 2024.
- [22] E. Ayranci, S. Tunc: A method for the measurement of the oxygen permeability and the development of edible films to reduce the rate of oxidative reactions in fresh foods, *Food Chemistry*, 80(3), 423-431 str., 2003.
- [23] A. López-Ortiz, I. Y. Pacheco Pineda i sur.: Optical and thermal properties of edible coatings for application in solar drying, *Scientific Reports* ,11, 2021.

- [24] R. Chawla, S. Sivakumar, H. Kaur: Antimicrobial edible film in food packaging; current scenario and recent nanotechnological advancements – a review, *Carbohydr Polym Technol Appl*
- [25] G. López-Carballo, J. Gomez-Estaca, R. Catala, P. Hernández-Muñoz, R. Gavara: Active antimicrobial food and beverage packaging, K.L. Yam, D.S. Lee (Eds.), *Emerging food packaging technologies*, Woodhead Publishing, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo, 27-54 str., 2012.
- [26] V.L. Santos, R. M. Drummond Nardi, M. V. Diaz Souza: Bacteriocins as Antimicrobial and Antibiofilm Agents, *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, Universidade federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 2017.
- [27] A. Martinac, J. Filipović- Grčić: Kitozan, biopolimer 21. stoljeća, *Stručni Rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb*, 2002.
- [28] G. Adiletta, M. Di Matteo, M. Petriccione: Multifunctional Role of Chitosan Edible Coatings on Antioxidant Systems in Fruit Crops: A Review, *Int. J. Mol. Sci.* 2021.
- [29] A. Poonia: Antimicrobial Edible Films and Coatings for Fruits and Vegetables, *Food Science and Nutrition*, 10.4018/978-1-5225-5207-9, 2018.
- [30] M.Z. Elsabee, E.S. Abdou: Chitosan based edible films and coatings, *Materials Science Engineering: C*, Elsevier, 33(4), 1819-1841 str., 2013.
- [31] M.V. Alvarez, A.G. Ponce, M.D.R. Moreira: Antimicrobial efficiency of chitosan coating enriched with bioactive compounds to improve the safety of fresh cut broccoli, *LWT-Food Sci. Technol.*, 50 (1), 78-87str, 2013.
- [32] A. Aslam Maan, Z.F.R. Ahmed i sur.: Aloe vera gel, an excellent base material for edible films and coatings, *Trend sin Food Science and Technology*, Elsevier, 116, 329-341 str., 2021.
- [33] <https://www.semanticscholar.org/paper/EFFECT-OF-Aloe-Vera-GEL-COATING-AND-BAGGING-OF-IN/97231ef9ee67688e62dd564b562b45aed7c446dd> , dostupno 11.7. 2024.
- [34] A. Anis, K. Pal, S.M. Al-Zahrani: Essential Oil-Containing Polysaccharide-Based Edible Films and Coatings for Food Security Applications, *Polymers*, 13, 2021.
- [35] Q.O. Tiamiyu, S.E. Adebayo, A.A. Yusuf: Gum Arabic edible coating and its application in preservation of fresh fruits and vegetables, *Food Chemistry Advances*, Elsevier, 2023.
- [36] R. Gheorghita, G. Gutt, S. Amariei: The Use of Edible Films Based on Sodium Alginate in Meat Product Packaging: An Eco-Friendly Alternative to Conventional Plastic Materials, *Novel Advance in Food Contact Materials, Coatings*, 10(2), 2020.
- [37] D.H. Song, H. Van Ba, H.W.Kim i sur.: Edible Films on Meat and Meat Products, *Coatings* 11, 2021.
- [38] P. Velásquez, G. Montenegro, L.M. Valenzuela i sur.: k-carrageenan edible films for beef: Honey and bee pollen phenolic compounds improve their antioxidant capacity, *Food Hydrocolloids*, 124(A), Elsevier, 2022.
- [39] D. Hamann, B.M. Saorin Puton, R. Colet i sur.: Active edible films for application in meat products, *research Society and Development* 10(7), 2021.
- [40] M. Moura Alves, A. Esteves, M. Ciríaco i sur.: Antimicrobial and Antioxidant Edible Films and Coatings in the Shelf-Life Improvement of Chicken Meat, *Foods* 12, 2023.
- [41] Z. Zhao, H. Liu, J. Tang i sur.: Pork preservation by antimicrobial films based on potato starch (PS) and polyvinyl alcohol (PVA) and incorporated with clove essential oil (CLO) Pickering emulsion, *Food Control*, 154, Elsevier, 2023.



- [42] H. Neetoo, M. Ye, H. Chen: Bioactive alginate coatings to control *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon slices and fillets, *International Journal of Food Microbiology*, 136(3), 326-331 str., 2010.
- [43] J. Gómez-Estaca, P. Montero, B. Giménez, M.C. Gómez-Guillén: Effect of functional edible films and high pressure processing on microbial and oxidative spoilage in cold-smoked sardine (*Sardina pilchardus*), *Food Chemistry*, 105(2), 511-520 str., 2007.
- [44] L. Wang, J. Yin, M. Cong i sur.: Characterization of chitosan film incorporated pine bark extract and application in carp slices packaging, *International Journal of Biological Macromolecules*, 271(2), Elsevier, 2024.
- [45] K. Huang, N. Nitin: Edible bacteriophage based antimicrobial coating on fish feed for enhanced treatment of bacterial infections in aquaculture industry, *Aquaculture*, Elsevier, 502, 18-25 str., 2019.
- [46] R. Heydari, S. Bavandi, S.R. Javadian: Effect of sodium alginate coating enriched with horsemint (*Mentha longifolia*) essential oil on the quality of bighead carp fillets during storage at 4°C, *Food Science & Nutrition*, 3(3), 188-194 str., 2015.
- [47] R. Torrijos, T.M. Nazareth, J. Calpe i sur.: Antifungal activity of natamycin and development of an edible film based on hydroxyethylcellulose to avoid *Penicillium* spp. growth on low-moisture mozzarella cheese, *LWT*, 154, Elsevier, 2022.
- [48] K. Mahajan, S. Kumar, Z.F. Bhat i sur.: Functionalization of carrageenan based edible film using Aloe vera for improved lipid oxidative and microbial stability of frozen dairy products, *Food Bioscience*, 43, Elsevier, 2021.
- [49] <https://www.plantea.com.hr/maslacak/> , dostupno 16.7.2024.
- [50] K. Radoman, V. Živkovic, N. Zdravković i sur.: Effects of dandelion root on rat heart function and oxidative status, *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 23(1), 2023.
- [51] B. Lis, B. Olas: Pro-health activity of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) and its food products – history and present, *Journal of Functional Food*, 59, 40-48 str., Elsevier, 2019.
- [52] <https://practicalselfreliance.com/dandelion-coffee/> , dostupno 17.7.2024.
- [53] M. González-Castejón, F. Visioli, A. Rodriguez-Casado: Diverse biological activities of dandelion, *Nutr. Rev.* 70(9), 534–547 str., 2020.
- [54] M. Samanth, A. C. Rana: In vivo antioxidant activity of hydroalcoholic extract of *Taraxacum officinale* roots in rats, *Indian Journal of Pharmacology*, 38(1), Wolters Kluwer, 2006.
- [55] M.Y. Kim, S.H. Cheong, M.H. Kim i sur.: Leafy vegetable mix supplementation improves lipid profiles and antioxidant status in C57BL/6J mice fed a high fat and high cholesterol diet, *J Med Food*, 12(4), 2009.
- [56] N. Macolo, G. Autore, F. Capasso i sur.: Biological screening of Italian medicinal plants for anti-inflammatory activity, *Phytoterapy research*, Wiley Online Library, 1987.
- [57] M. Zheng: Experimental study of 472 herbs with antiviral action against the herpes simplex virus, *Chinese Journal of Modern Developments in Traditional Medicine*, 10(1), 39-41 str. 1990.
- [58] Z. Geng, W. Zhu, H. Su i sur.: Recent advances in genes involved in secondary metabolite synthesis, hyphal development, energy metabolism and pathogenicity in *Fusarium graminearum* (teleomorph *Gibberella zeae*), *Biotechnology Advances*, 32(2), 390-402 str., Elsevier, 2014.
- [59] S.A. Jackson, A.D.W. Dobson: Yeasts and Molds: *Aspergillus flavus*, Reference Module in Food Science, Elsevier, 2016.

- [60] R. Barkai Golan, P.A. Follett: Chapter 4 - Irradiation Effects on Mycotoxin Accumulation, Irradiation for Quality Improvement, Microbial Safety and Phytosanitation of Fresh Produce, 41-46 str., Academic Press, 2017.
- [61] R.H. Hareeri, M.M. Aldurdunji, H.M. Abdallah i sur.: *Aspergillus ochraceus*: Metabolites, Bioactivities, Biosynthesis, and Biotechnological Potential, *Molecules*, 27(19), 2022.
- [62] L.R. Dianiris, N.P. Keller, W.M. Jurick: *Penicillium expansum*: biology, omics, and management tools for a global postharvest pathogen causing blue mould of pome fruit, *Molecular Plant Pathology*, 21(11), 1389-1526 str., 2020.
- [63] P.F. Zipfel, C. Skerka, D. Kupka, S. Luo: Immune escape of the human facultative pathogenic yeast *Candida albicans*: The many faces of the *Candida* Pra1 protein, *International Journal of Medical Microbiology*, 301(5), 423-430 str., Elsevier, 2011.
- [64] A.T. Jamiu, . Albertyn, O.M. Sebolai, C.H. Pohl: Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen, *Medical Mycology*, 59(1), 14–30 str., 2021.
- [65] D. Trofa, A. Gácsér, J.D. Nosanchuk: *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen, *Clinical Microbiology Review*, 21(4), 606-625 str., 2008.
- [66] R. Schwalbe, L. Steele-Moore, A.C. Goodwin: *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*, CRC, 2007.
- [67] <https://objasnjeno.com/sto-je-spektrofotometar/> , dostupno 21.7. 2024.

## Popis slika

Slika 1 Primjer jestive ambalaže za vodu	4
Slika 2 Voće sa i bez jestivog premaza	4
Slika 3 Shematski prikaz izrade jestivog filma mokrim postupkom	6
Slika 4 Shematski prikaz ekstruzije za izradu jestivog filma suhim postupkom	6
Slika 5 Nastajanje polisaharida	10
Slika 6 Jestivi film od pektina	10
Slika 7 Celulozni jestivi film za pakiranje hrane	10
Slika 8 Denaturacija globularnog proteina	11
Slika 9 Premaz od želatine na jabuci	12
Slika 10 Mikrometar [16]	14
Slika 11 Jestivi film na pizzi	16
Slika 12 Vrste antimikrobnih sredstava	19
Slika 13 Izgled i trajnost rajčica ovisno o vrsti ambalaže	23
Slika 14 Izrada i izgled filmova na bazi kitozana za pakiranje odrezaka šarana	26
Slika 15 Morfologija maslačka	28
Slika 16 Priprema kave od korijena maslačka [51]	29
Slika 17 Kuhanje čaja od korijena maslačka	36
Slika 18 Podešavanje pH otopine na vrijednost od 7,00	38
Slika 19 Dodavanje agara u otopinu Mungo graha	39
Slika 20 Shema pripreme mikrorazrjeđenja za antifungalno sredstvo	40
Slika 21 Pripremljene kulture kvasaca i plijesni za pripremu inokuluma	41
Slika 22 Inokuliranje jažica mikrotitarske pločice	42
Slika 23 Inkubacija plijesni u inkubatoru	43
Slika 24 Inkubacija kvasaca	43
Slika 25 Grafički prikaz rasta <i>C.albicans</i> pri 450 nm	46
Slika 26 Grafički prikaz rasta <i>C.krusei</i> pri 450 nm	46
Slika 27 Grafički prikaz rasta <i>C.parapsilosis</i> pri 450 nm	47
Slika 28 Grafički prikaz rasta <i>F. graminearum</i> pri 450 nm	48
Slika 29 Grafički prikaz rasta <i>A. alternata</i> pri 450 nm	49
Slika 30 Grafički prikaz rasta <i>A. flavus</i> pri 450 nm	49
Slika 31 Grafički prikaz rasta <i>A. ochraceus</i> pri 450 nm	50
Slika 32 Grafički prikaz rasta <i>P. expansum</i> pri 450 nm	50



**IZJAVA O AUTORSTVU  
I  
SUGLASNOST ZA JAVNU OBJAVU**

Završni/diplomski rad isključivo je autorsko djelo studenta koji je isti izradio te student odgovara za istinitost, izvornost i ispravnost teksta rada. U radu se ne smiju koristiti dijelovi tuđih radova (knjiga, članaka, doktorskih disertacija, magistarskih radova, izvora s interneta, i drugih izvora) bez navođenja izvora i autora navedenih radova. Svi dijelovi tuđih radova moraju biti pravilno navedeni i citirani. Dijelovi tuđih radova koji nisu pravilno citirani, smatraju se plagijatom, odnosno nezakonitim prisvajanjem tuđeg znanstvenog ili stručnoga rada. Sukladno navedenom studenti su dužni potpisati izjavu o autorstvu rada.

Ja, Valerija Kukec (*ime i prezime*) pod punom moralnom, materijalnom i kaznenom odgovornošću, izjavljujem da sam isključivi autor/ica ~~završnog~~/diplomskog (*obrisati nepotrebno*) rada pod naslovom Određivanje antimikrobne aktivnosti jestive ambalaže (*upisati naslov*) te da u navedenom radu nisu na nedozvoljeni način (bez pravilnog citiranja) korišteni dijelovi tuđih radova.

Student/ica:  
(*upisati ime i prezime*)

V. Kukec  
(vlastoručni potpis)

Sukladno Zakonu o znanstvenoj djelatnosti i visokom obrazovanju završne/diplomske radove sveučilišta su dužna trajno objaviti na javnoj internetskoj bazi sveučilišne knjižnice u sastavu sveučilišta te kopirati u javnu internetsku bazu završnih/diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice. Završni radovi istovrsnih umjetničkih studija koji se realiziraju kroz umjetnička ostvarenja objavljuju se na odgovarajući način.

Ja, Valerija Kukec (*ime i prezime*) neopozivo izjavljujem da sam suglasan/na s javnom objavom ~~završnog~~/diplomskog (*obrisati nepotrebno*) rada pod naslovom Određivanje antimikrobne aktivnosti jestive ambalaže (*upisati naslov*) čiji sam autor/ica.

Student/ica:  
(*upisati ime i prezime*)

V. Kukec  
(vlastoručni potpis)

Similarity Index  
4%

Similarity by Source  
Internet Sources: 4%  
Publications: 0%  
Student Papers: 1%

1% match (Internet from 14-Nov-2020)

<https://repositorij.svkst.unist.hr/islandora/object/ktfst%3A472/datastream/PDF/view>

< 1% match (Internet from 29-Nov-2020)

<https://repositorij.svkst.unist.hr/islandora/object/ktfst:470/datastream/PDF>

< 1% match (Internet from 09-Mar-2023)

<https://repositorij.pbf.unizg.hr/islandora/object/pbf.4406/datastream/PDF/download>

< 1% match (Internet from 01-Oct-2022)

<https://repositorij.pbf.unizg.hr/islandora/object/pbf.4013/datastream/PDF/view>

< 1% match (Internet from 27-Sep-2022)

<https://repositorij.pbf.unizg.hr/islandora/object/pbf.4087/datastream/PDF/view>

< 1% match (Internet from 30-Nov-2021)

<https://repositorij.pbf.unizg.hr/islandora/object/pbf.3858/datastream/PDF/download>

< 1% match (Internet from 29-May-2021)

<https://repositorij.unizg.hr/islandora/object/pbf.3471/datastream/PDF>

< 1% match (Internet from 25-Aug-2021)

<https://repositorij.unizg.hr/islandora/object/pbf%3A3835/datastream/PDF/view>

< 1% match (Internet from 24-Aug-2021)

<https://repositorij.unizg.hr/islandora/object/mef%3A3387/datastream/PDF/view>

< 1% match (Internet from 19-Jan-2024)

<https://repositorij.unizg.hr/islandora/object/fkit:2586/datastream/PDF>

< 1% match (Internet from 02-Feb-2023)

<https://repositorij.unios.hr/islandora/object/ptfos:2575/datastream/PDF>

< 1% match (Internet from 09-Dec-2021)

<https://repozitorij.agr.unizg.hr/islandora/object/agr%3A2306/datastream/PDF/view>

< 1% match (Internet from 26-Feb-2010)

<http://aac.asm.org/cgi/content/full/52/6/2196>

< 1% match (Internet from 22-Aug-2013)

<http://diadermatologa.pl/artykuly/naukowe/1/20.html>

< 1% match (Internet from 14-Jul-2016) in optimism, health locus of control students' health

<https://es.scribd.com/doc/249560843/Zbornik-MNSS2014>, Faculty of Humanities and Social Sciences, Department of Psychology, 2013

< 1% match (Internet from 12-Jan-2023)

< 1% match (Internet from 31-Jan-2020)

<https://vdocuments.site/proteini-558465850/8fe.html>

<https://repozitorij.unios.hr/islandora/object/eitos.1279/datastream/PDF>

< 1% match (Internet from 19-Sep-2022)

< 1% match (Internet from 03-Dec-2020)

<https://core.ac.uk/download/pdf/197864676.pdf>

<https://repozitorij.unios.hr/islandora/object/kemos%3A213/datastream/PDF/view>

< 1% match (Internet from 23-Mar-2022)

< 1% match (Internet from 30-Jan-2021)

<https://hrcak.srce.hr/en/clanak/52807>

<https://repozitorij.unios.hr/islandora/object/gfos.168/datastream/PDF>

< 1% match ( )

< 1% match (Submitted to Sveučilište Sjever - University North)

Dvornjak, Dunja K., "Selenium accumulation in submerged and industrial cultivated *Coriolus versicolor* mushroom", Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет, 2017

< 1% match (Internet from 23-Sep-2022)

[https://nf.unmo.ba/resources/site1/General/Educa/educa\\_11.pdf](https://nf.unmo.ba/resources/site1/General/Educa/educa_11.pdf) datastream/PDF/view

< 1% match (Internet from 05-Nov-2020)

<https://repozitorij.fazos.hr/islandora/object/pfos.1107/datastream/PDF>

< 1% match (Internet from 14-Apr-2022)

<https://repozitorij.vuka.hr/islandora/object/vuka.1944/datastream/PDF>

< 1% match (Internet from 26-Apr-2023)

<https://www.unirepository.svkri.uniri.hr/islandora/object/efri.940/datastream/PDF/download?ot=funcional-Food.pdf>

< 1% match (Internet from 16-Sep-2021)

<https://repozitorij.ktf-split.hr/en/islandora/object/ktfst%3A907/datastream/PDF/view>

< 1% match (Submitted to Rudarsko-geološko-naftni fakultet / Faculty of Mining, Geology and Petroleum Engineering)

Submitted to Rudarsko-geološko-naftni fakultet / Faculty of Mining, Geology and Petroleum Engineering

< 1% match (Internet from 18-Nov-2020)

<https://repozitorij.ptfos.hr/islandora/object/ptfos.2082/datastream/PDF>

< 1% match ( )

Živanović, Vladimir, "Influence of differences in prescribing antimicrobial drugs on isolation rate of multidrug resistant pathogens on surgical and medical wards", Универзитет у Београду, Медицински факултет, 2018