

Univerza v Ljubljani
Zdravstvena fakulteta



Raziskovalna naloga
Zaščita jabolk pred plesnijo
Raziskovalno področje: biologija

Avtorica: **Zala Kralj**

Mentorja: izr. prof. dr. **Karmen Godič Torkar** in **Livija Komel Konjedic**, predmetna učiteljica biologije in kemije

Lektorica: mag. **Mateja Hočevar Gregorič**

Šempas, šol. l. 2021/22

KAZALO VSEBINE

Vsebina

ZAHVALA.....	4
POVZETEK.....	5
ABSTRACT.....	6
1 UVOD.....	7
1.1 Raziskovalni vprašanji.....	7
1.2 Hipotezi.....	8
2 TEORETIČNI DEL.....	9
2.1 Jabolka – najpomembnejše sadje za Slovenijo.....	9
2.2 Skladiščenje jabolk.....	9
2.3 Plesen rodu <i>Penicillium expansum</i>	10
2.4 Patulin.....	10
2.5 Naravni – jedilni premazi (užitna embalaža) za živila.....	11
Hitozan.....	11
3 EKSPERIMENTALNI DEL.....	14
3.1 Mikrobiološke preiskave.....	14
3.2 Priprava gojišč.....	14
3.3 Priprava različnih raztopin hitozana in različnih raztopin očetne in citronske kisline.....	15
3.4 Nanos spor plesni <i>Penicillium expansum</i> v petrijevke.....	18
3.5 Meritev velikosti premera plesni.....	18
4 REZULTATI.....	20
4.1 Meritev velikosti premera plesni v petrijevkah z različnimi koncentracijami hitozana in 1 % raztopino kislin.....	21
4.2 Meritev velikosti premera plesni v petrijevkah z različnimi koncentracijami kislin in 1 % raztopino hitozana.....	24
5 RAZPRAVA.....	27
6 ZAKLJUČEK.....	31
7 LITERATURA.....	32

KAZALO SLIK

- Slika 1: Razrast plesni rodu *Penicillium expansum* na jabolkah (Zala Kralj: program Biorender), **10**
- Slika 10: Primerjava rasti plesni v raztopinah hitozana in očetne kisline., **29**
- Slika 11: Primerjava rasti plesni v raztopinah hitozana in citronske kisline., **30**
- Slika 2: Shematski prikaz pretvorbe hitozana iz živalskega hitina (Zala Kralj: program Biorender, povzeto po Mavrič, 2021), **13**
- Slika 3: Pripravljeno gojišče PDA združeno z preiskovanimi raztopinami (levo), prelito v petrijevke, pripravljene za nanos plesni – inokulacijo (foto: Zala Kralj), **15**
- Slika 4: Prikaz priprave gojišč in mešanja raztopin hitozana v raztopinah kislin z gojiščem v razmerju 1:1 pod sterilnimi pogoji (Zala Kralj: program Biorender), **15**
- Slika 5: Cepljenje plesni, štetje spor z mikroskopom in nanos plesni na gojišče (foto: Zala Kralj), **18**
- Slika 6: Shematski prikaz celotnega poskusa v mikrobiološkem laboratoriju (Zala Kralj: program Biorender), **19**
- Slika 7: Fotografija petrijevok 1. poskusa z očetno kislino (levo) in 2. poskusa s citronsko kislino (desno) (Foto: Zala Kralj), **23**
- Slika 8: Fotografija petrijevok 3. poskusa z očetno kislino (desno) in 4. poskusa s citronsko kislino (levo) (Foto: Zala Kralj), **26**
- Slika 9: Rast zelene plesni v odvisnosti od koncentracije hitozana je obratno sorazmerna (A: Control, B: 2, c: 4, D: 6, E: 8, F: 10 g.L⁻¹) (povzeto El Guili, 2016), **27**

ZAHVALA

Vedno sem si želela, da bi lahko izkusila delo v laboratoriju. To mi je v tem šolskem letu uspelo. Hvaležna sem za izkušnjo, ki so mi jo omogočili na Zdravstveni fakulteti v Ljubljani, kjer sem pod vodstvom prof. dr. Karmen Godič Torkar prav zares delala z raziskovalci in v čisto pravem mikrobiološkem laboratoriju. Spoznala sem ogromno novih stvari, pojmov, laboratorijskega inventarja, način dela in ljudi, ki v laboratorijih delajo. Ti so mi omogočili, da se preizkusim v novem okolju ter da v praksi spoznam, kaj pomeni raziskovanje.

POVZETEK

Jabolka so za Slovenijo eden glavnih sadežev. Jeseni obrana se prodajajo čez celotno leto. Pri tem je pomembno, da so jabolka pravilno skladiščena. Tako sadež ne izgublja vode in ne propade prehitro. Najpogosteje jabolka gnijejo in plesnijo. Zanimal nas je premaz, ki bi učinkovito zmanjšal rast plesni. Plesen rodu *Penicillium expansum* je za jabolka najnevarnejša, saj v njih proizvede strupeno snov patulin. Številni premazi nam omogočajo, da sadež zaščitimo. V zadnjem času testiramo številne jedilne premaze, ki jih lahko dobimo v naravi. Najboljši so pripravki, ki jih lahko pridobimo iz zavrženih živil. Tak primer je hitozan, ki ga proizvedejo iz hitina rakov, školjk in drugih živali z oklepom. Za raztapljanje hitozana se najpogosteje uporabljajo organske kisline, metanojska in etanojska kislina. Citronske kisline za raztapljanje hitozana še niso testirali, je pa to kislina, ki se v živilski industriji zelo veliko uporablja. V naši raziskavi smo želeli ugotoviti, katera kombinacija kisline (ocetna ali citronska) s hitozanom najbolj zavira rast plesni. V ta namen smo pripravili krompirjeva gojišča, združena z raztopino hitozana (od 1 % do 0,025 %) v očetni ali citronski kislini (tako citronske kot očetne; od 1 % do 0,025 %) v razmerju 1 : 1. Na ta gojišča smo s cepilno zanko nanegli plesen *Penicillium expansum* in spremljali rast plesni, ki se je razvijala v komori 7 dni. Nato smo z ravnilom izmerili premer plesni. Očetna kislina se je izkazala kot boljša izbira, saj se pri 1 % raztopini očetne kisline z različnimi koncentracijami hitozana plesen sploh ni razvila.

Ključne besede: plesen *Penicillium expansum*, hitozan, očetna kislina, citronska kislina, jabolka

ABSTRACT

Apples are one of the main fruits growing in Slovenia. In autumn harvested are sold throughout the year. To extend the shelflife of fruits, proper storage is important. The fruit should not lose water and fruits should be protected from decaying. Most often, apples in storage rooms get rot and gain mold. In our research, we were mainly interested in the development of the proper edible coating that would effectively reduce the growth of the blue mold, *Penicillium expansum*, which produces the toxic substance named patulin. Many coatings allow us to protect from the fruit decay. Recently, they have been testing many edible coatings that can be obtained in nature, especially from discarded foods, such as chitosan, which is produced from the chitin of crustaceans, shellfish and other animals. Organic acids, methanoic and ethanoic acids are most commonly used to dissolve chitosan. Citric acid has not yet been tested for dissolving chitosan, but it is an acid that is widely used in the food industry. In our study, we wanted to determine which combination of acid (acetic or citric) with chitosan inhibits mold growth the most. For this purpose, we prepared potato agar combined with a solution of chitosan (from 1% to 0.025%) in acetic or citric acid (both citric and acetic; from 1% to 0.025%) in a mixing ratio of 1: 1. *Penicillium expansum* was applied to tested media with a grafting loop. The growth of the mold, was left to develop at the room temperature in the chamber for 7 days. We measured then the diameter of the mold with a ruler. Acetic acid proved to be the best choice, as 1% acetic acid solution with different concentrations of chitosan did not develop mold at all.

Keywords: mold *Penicillium expansum*, chitosan, acetic and citric acid, apples

1 UVOD

Vsi vemo, da je jabolko eden izmed najpomembnejših sadežev v Sloveniji in prav zaradi tega sem se odločila, da bom raziskovala na tem področju. Ker se je pridelava jabolk začela že v 19. stoletju, je imela možnost, da se je skozi vsa leta še bolj modernizirala. V Sloveniji se lahko z gostoto sajenja postavimo ob vrh vseh evropskih držav, ki jabolka pridelujejo same. Največ prostora za sadovnjake je v vzhodni Sloveniji.

Ker je jabolko sadež, ki ga jemo vse leto, ga moramo tudi pravilno skladiščiti. V skladiščih prihaja do velikih sprememb, ki manjšajo kakovost jabolk (Gričnik, 2018). Zato zorenje jabolk zavirajo z voskom ali z drugimi sredstvi. Ker vse to ni zagotovilo za preprečitev plesni, plesen še vedno nastaja. Najnevarnejša je modra plesen, rodu *Penicillium expansum*, ki proizvaja strupeno snov (ali toksin), imenovano patulin. Posledice zastrupitve s patulinom so mogoče tako pri človeku kot pri živalih. Patulin so nekoč uporabljali v medicini, vendar se je njegovo uporabo kasneje prepovedalo zaradi negativnih učinkov.

Jabolka, ki se skladiščijo, izgubljajo vodo ter so podvržena različnim procesom razpadanja. To vključuje gnitje in plesnivost. V ta namen ščitimo sadeže z različnimi premazi, ki se zlahka odstranijo ali pa so jedilni. Tako na jabolkih proti razvoju plesni uporabljamo tudi naravne premaze. Večinoma so izdelani iz surovin, pridobljenih iz obnovljivih virov, sem sodijo: beljakovine, maščobe, voski in polisaharidi (Mavrič, 2021).

Za našo raziskavo je pomemben jedilni premaz na osnovi polisaharida – hitozan. Hitozan najdemo predvsem v skeletu rakov in žuželk. To je glavna sestavina premaza, ki ga preučujemo za širšo uporabo pri skladiščenju jabolk. Do sedaj se je uporabljal za zaščito nekaterih jedi, za jabolka pa še ne. Za raztapljanje hitozana se najpogosteje uporabljata metanojska in etanojska kislina. V naši raziskavi smo želeli ugotoviti, katera kombinacija kisline s hitozanom bo najbolj zavirala rast plesni. Testirali smo dve organski kislini: očetno in citronsko.

1.1 Raziskovalni vprašanji

Raziskovalna naloga temelji na raziskovalnem delu raziskovalcev z Zdravstvene fakultete, ki skupaj z Biotehnično fakulteto raziskujejo načine za boljšo, učinkovitejšo in varno zaščito jabolk. Zaščito iščejo med jedilnimi premazi na osnovi hitozana.

Fizikalne lastnosti jedilnega premaza na osnovi hitozana so odvisne od dodatka kisline. Učinkovitost premaza pred plesnijo (vrste *Penicillium expansum*) ter njegov zaviralen učinek je najverjetneje odvisen od dodatka in vrste kisline. Izbrali smo hitozan z dodatkom dveh kislin: očetne in citronske.

Zastavili smo si dve raziskovalni vprašanji:

- a) Ali rast plesni zavira hitozan ali dodatek kisline?
- b) Katera od kislin, očetna ali citronska kislina, bolj zavira rast plesni?

1.2 Hipotezi

Glede na raziskovalni vprašnji smo skupaj z raziskovalci oblikovali dve trditvi, ki ju imenujemo raziskovalni hipotezi.

1. Na rast plesni vpliva dodatek kisline, večji, kot je, bolj zavira.
2. Ocetna kislina je v zaviranju rasti plesni učinkovitejša.

2 TEORETIČNI DEL

2.1 Jabolka - najpomembnejše sadje za Slovenijo

Pridelava jabolk za prodajo se je v Sloveniji začela razvijati že v 19. stoletju. Skozi leta pa se je tržišče moderniziralo. Že v 70-ih letih smo med prvimi v Evropi postavili moderne nasade ter s tehnologijo in pridelki sledili najbolj naprednim sadjarskim deželam v svetu (Popis intenzivnih sadovnjakov, Slovenija, 2017 (stat.si)).

Gostota sajenja v Sloveniji je od 3000 do 4000 dreves na hektar, kar je primerljiva količina, ki jo najdemo v ostalih sadjarskih državah EU. Gostota sajenja in osnovne tehnologije vzgoje dreves so podobne tehnologijam v Italiji, Avstriji in Nemčiji. V Sloveniji je večina nasadov modernih predvsem zaradi znanja ter tehnologije, ki se uporablja pri vzgoji jablan in se je nabirala v več kot 200-letni tradiciji. Povprečni slovenski pridelki jabolk po hektarju v zadnjih letih rastejo. Povprečni pridelek jabolk v letih od 2003 do 2010 se je gibal med 22 in 30 t/ha, kasneje pa se je ta številka povečala. V letih od 2011 do 2018 je segala od 26 do 37 t/ha intenzivnega sadovnjaka (leta pozeb 2012, 2016 in 2017 so izpuščena). Po zadnjih podatkih imamo od leta 2018 kar 50 % slovenskih nasadov zaščitene s protitočno mrežo, 13 % nasadov jablan pa se namaka in je odporno na poletno sušo (Popis intenzivnih sadovnjakov, Slovenija, 2017 (stat.si)).

Večina prostora, ki je namenjena zasajevanju jablan v intenzivnih sadovnjakih, leži v vzhodni Sloveniji, predvsem v Podravju, kjer je skoraj 30 % vse površine v Sloveniji, zasajene z intenzivnimi sadovnjaki. Velik del sadovnjakov je tudi v Posavju in savinjski regiji. V zahodni Sloveniji je največ nasadov v goriški regiji, sledi ji obalno-kraška (Popis intenzivnih sadovnjakov, Slovenija, 2017 (stat.si)). Sadjarstvo ima v Sloveniji zelo pomembno vlogo in velik potencial za nadaljnji razvoj. Jabolka so pri nas še vedno najpomembnejša sadna vrsta, zato sem se odločila, da bom raziskovala na tem področju.

2.2 Skladiščenje jabolk

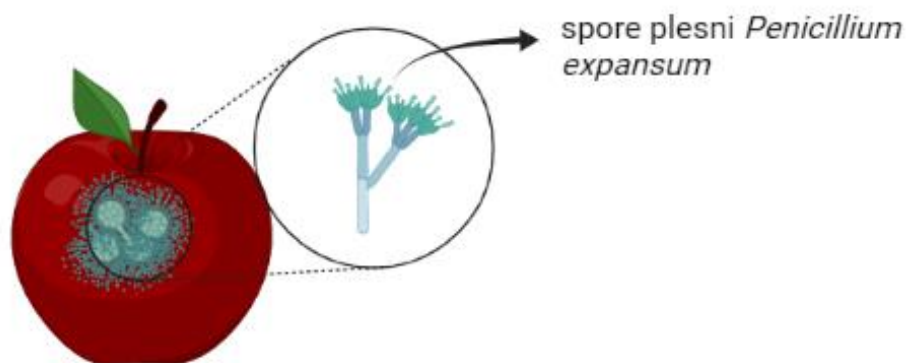
Jabolko je sadež, ki ga jemo vse leto. To pomeni, da se konec poletja do začetka jeseni obrana jabolka hranijo v skladiščih do nove sezone. V skladiščih pa sčasoma v jabolkih prihaja do številnih sprememb, ki spreminjajo kakovost in posledično možnost prodaje končnemu kupcu. Zato v živilski industriji uporabljajo različne pristope za ohranjanje kakovosti plodov in podaljševanje njihove življenjske dobe.

Zorenje jabolk v skladiščih predvsem zavirajo. To dosežejo z zniževanjem vsebnosti kisika in z nizkimi temperaturami. Poleg tega pa uporabljajo še različna sredstva za zaviranje dozorevanja, kot so vosek in drugi jedilni premazi. V skladišču je pomembna temperatura, ki se za jabolka giblje med 0–3 °C. Nizka temperatura in nizka vsebnost kisika vplivata na zmanjšanje etilena, to je plin dozorevanja, ki ga proizvajajo jabolka. Če je etilena manj, je manj tudi zorenja jabolk v skladišču (Raztresen, 2017).

Po obiranju jabolk je treba plodove čim hitreje ohladiti, saj na ta način obrana jabolka ohrani trdoto in kakovost. Pri skladiščenju temperatura ne sme pasti močno pod ledišče, saj bi odtaljena jabolka začela na policah propadati. Sme se spustiti le od $-2,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ pa do $-1,4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pomembno je tudi uravnavati vlago (relativna vlažnost; relative humidity – RH %), ki naj bi bila v območju med 90 in 95 %. Vlago je treba vzdrževati, da se jabolka ne izsušijo in kožica ne naguba. Temperature v skladišču in drugje ne smejo nihati, kar pa je preko leta težko vzdrževati. Do nihanj temperature pride največkrat pri sortiranju, pakiranju, prodaji in nameščanju plodov na trgovske police (Raztresen, 2017).

2.3 Plesen rodu *Penicillium expansum*

Plesni rodu *Penicillium expansum* (*P. expansum*) hitro rastejo in so zelene, sivozelene, modrozeleno, rumnozeleno ali bele barve. Glavna težava je, da te plesni tvorijo mikotoksine, med katerimi je najbolj strupen patulin. Plesni vrste *P. expansum* ali modra plesen (Slika 1) so najpomembnejša poobiralna bolezen sadja in zelenjave, ki je nočemo v skladiščih. Ta se na sadju razvija tako, da vstopi skozi rano, ki je prisotna na površini sadja in je nastala kot posledica neustreznih razmer med obiranjem ali transportom. Plesni vrste *P. expansum* lahko rastejo tako pri optimalni temperaturi $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, sicer pa do največ $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zanimiva je še njihova lastnost, da lahko rastejo tudi pri nizki temperaturi, kar jim omogoča preživetje med skladiščenjem in transportom pri nizkih temperaturah (Zlatevska, 2021).



Slika 1: Razrast plesni rodu *Penicillium expansum* na jabolkah (Zala Kralj: program Biorender)

2.4 Patulin

Patulin je organska spojina, ki spada med poliketide. V osnovi je bel prašek, topen v kisli vodi in v organskih topilih. Toplotno je stabilen, zato ga ne moremo uničiti s pasterizacijo ali toplotno denaturacijo. Vendar se njegova stabilnost po fermentaciji manjša. Patulin proizvajajo različne bakterije, kot so *Penicillium*, *Aspergillus* in *Byssoschlamys*. Najdemo ga v poškodovanih sadežih, najpogosteje v jabolkih (Wikipedia, Patulin). Če se jabolka, ki imajo v sebi patulin, uporabljajo za izdelovanje sokov, se visoke ravni patulina lahko prenašajo do

končnega izdelka. Količina patulina v izdelkih iz jabolk se uporablja za merilo kakovosti jabolk, ki se uporabljajo v proizvodnji. Poleg tega so patulin našli tudi v drugih živilih, kot so zrna, sadje in zelenjava (Patulin in zdravje ljudi, 2021, fooffocus.co).

Pogoste posledice zastrupitve s patulinom so izguba telesne mase, razjede prebavil, povečanje krvavitev, črevesne motnje, bruhanje ... Raziskave so dokazale, da patulin škoduje tudi moškimi reproduktivnim sistemom, ker zmanjšuje število moških spolnih celic spermijev. Poleg tega je pri podganah in miših povzročil splav (Raztresen, 2017). Ti negativni učinki na zdravje segajo od akutnega zastrupljanja do dolgoročnih posledic, kot je imunološko slabšanje. V številnih poskusih na živalih se je izkazalo, da je patulin imunotoksik in genotoksik. Patulin ima antibakterijske učinke proti različnim mikroorganizmom. Nekoč so ga uporabljali kot antibiotik proti grampozitivnim in gramnegativnim bakterijam, vendar se v medicini ne uporablja več zaradi pomislekov glede toksičnosti (Raztresen, 2017). Študije na živalih so pokazale, da izpostavljenost visokim koncentracijam patulina v kratkem času povzroči povečanje pretoka krvi, lahko pride do krvavitev in odprte bolečine v sluznici v prebavnem sistemu. Pokazalo se je, da patulin povzroča tudi škodljive učinke na imunskih in živčnih sistemih pri ljudeh (Patulin in zdravje ljudi, 2021, fooffocus.co)

2.5 Naravni – jedilni premazi (užitna embalaža) za živila

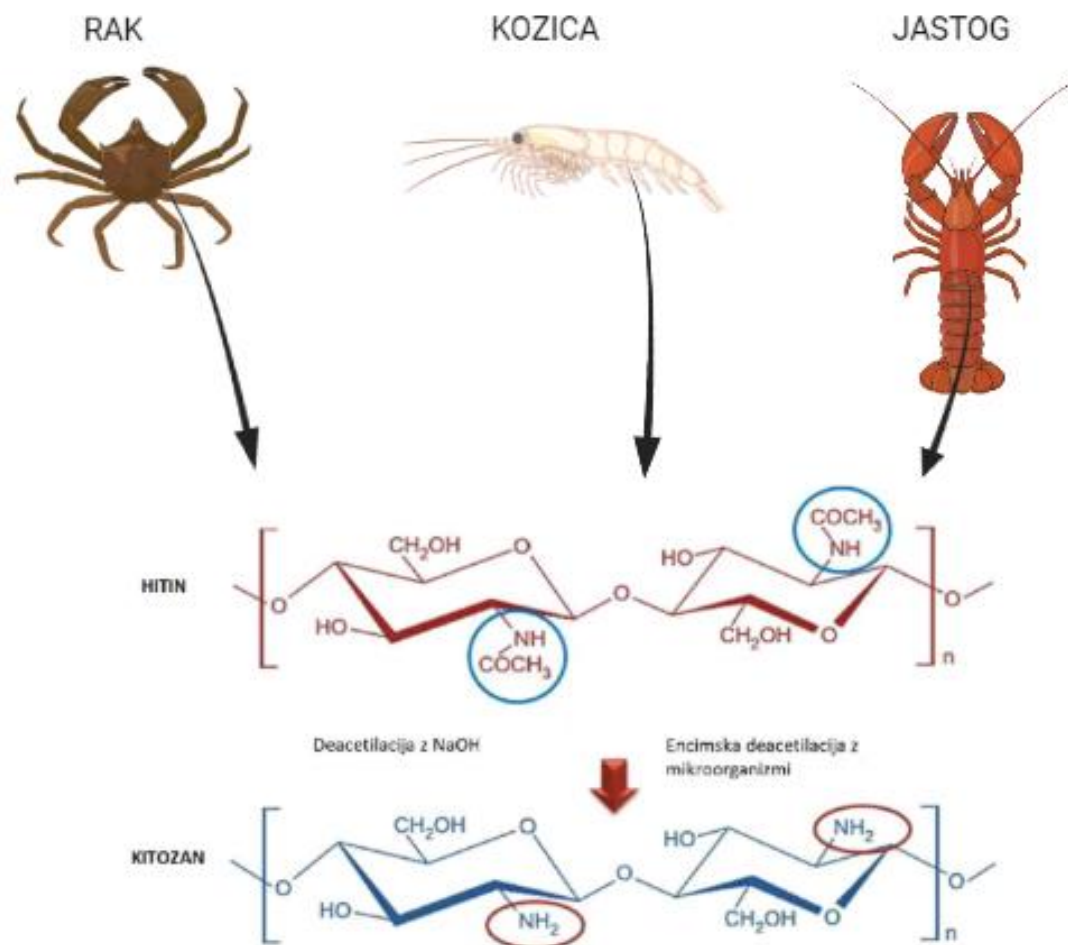
Užitni ali jedilni premazi so zelo tanek užitni sloj na površini živila, ki mu nudijo zaščito pred izgubo vode, zorenjem in poškodbami. Za posledico imajo razvoj plesni. Izdelani so iz surovin, pridobljenih iz obnovljivih virov, večinoma so to beljakovine, maščobe, voski in polisaharidi (izpeljanke škroba) ter njihove kombinacije. Osnovno sestavino jedilnega premaza običajno raztopimo v ustrezno topilo, nato pa izbrano živilo potopimo v to raztopino ali pa živilo s to raztopino poškopimo (Mavrič, 2021).

Med naravne jedilne premaze sodijo tudi polisaharidi rastlinskega izvora (celuloza, škrob, pektini), morskega (polisaharidi iz alg) in živalskega izvora (hitin, hitozan) (Mavrič, 2021). Polisaharidni premazi so obetavni, ker jih pridobivamo iz odpadkov, niso strupeni ter široko razširjeni v naravi, to so »sorodniki« škroba, ki ga uporabljamo vsakodnevno v kuhinji. V naši raziskavi smo iz te skupine uporabili hitozan.

Hitozan

Hitozan, katerega sinonimi so tudi poliglusam, deacetilhitin idr., je derivat hitina, ki ga v naravi najdemo v skeletu rakov in žuželk (členonožcev), v celičnih stenah gliv in v drugih bioloških materialih (Mavrič, 2021). Ker hitozan pridobivamo iz obnovljivih virov, ni drag, je komercialno dostopen in izredno zanimiv za živilsko industrijo. Pri sobni temperaturi je v trdnem agregatnem stanju, raztapljamo ga v kislih raztopinah. Za raztapljanje hitozana najpogosteje uporabljamo metanojsko in etanojsko kislino. Hitin in hitozan sta šibki kislini in zato sta podvržena reakcijam nevtralizacije v alkalnih medijih, to pa na zunaj opazimo kot »sesirjenje« premaza.

Od odkritja hitina pa vse do danes se je uporaba hitina in hitozana razširila skoraj na vsa področja raziskav. V zadnjem času pa se uveljavlja tudi kot zaščita sadja (Wang in sod., 2014). Iz hitozana je mogoče s kemičnimi modifikacijami pridobiti širok spekter različnih izpeljanih spojin hitozana, ki jih uporabimo kot baktericid in fungicid. Poleg tega pa se hitozan na široko uporablja za ekološko čiščenje vod ter na prehrabnem, medicinskem in farmacevtskem področju. Kakovost in lastnosti hitozanskih produktov, kot so čistost, viskoznost, molekulska masa in polimorfna struktura, so zelo spremenljive. Nanje vplivajo pogoji obdelave, predvsem temperatura, pH, koncentracija hitozana, deacetilacija (odstranitev skupine COCH_3 ; Slika 1), čas trajanja postopka ipd. (Strnad, 2008).



Slika 2: Shematski prikaz pretvorbe hitozana iz živalskega hitina (Zala Kralj: program Biorender, povzeto po Mavrič, 2021)

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 Mikrobiološke preiskave

Pri delu smo uporabili naslednje naprave, pripomočke in potrošni material:

- analitsko tehtnico (Mettler),
- avtoklav Tuttnauer autoclave – steam sterilizer (model 2840ELVP-WR-D; SemLab d. o. o.),
- inkubator Kambič I-50,
- hladilnik,
- mešalnik za epruvete,
- avtomatske pipete z nastavki,
- petrijevke, posodice, kjer gojimo mikroorganizme.

V mikrobiološkem laboratoriju moramo biti previdni. Z živimi mikroorganizmi delamo previdno (ne odpiramo petrijevk, v katerih so zrasle morda nevarne, za nas strupene bakterije) in aseptično. To pomeni, da preprečimo okužbo gojišč in raztopin tako, da vso to posodo odpiramo ob plamenu plinskega gorilnika. Na ta način onemogočimo dostop neželenim mikroorganizmom, ki bi kontaminirali – »umazali« naše kulture in zaradi katerih bi bili rezultati poskusov napačni. Poleg tega pa hkrati pazimo, da mikroorganizmov ne razširjamo, ker s tem ogrožamo sebe in druge (Petrič, 2010).

Sterilne pogoje moramo vzdrževati ves čas dela v mikrobiološkem laboratoriju. Zmeraj delamo ob plamenu – aseptično. Vsi predmeti in steklovina morajo biti sterilni, to dosežemo z obžiganjem s plamenom ali z uporabo 70 % alkoholne raztopine. Po končanem delu previdno odlagamo uporabljeni material, saj je onesnažen. Vse je treba sterilizirati, šele nato lahko neuporaben material zavržemo, preostalo pa pripravimo za uporabo (Petrič, 2010).

3.2 Priprava gojišč

Plesen vrste penicilina (*Penicillium expansum*), katere stranski produkt je strupena snov ali toksin patulin, smo namnožili iz seva, pridobljenega na Biotehnični fakulteti v Ljubljani. Rast micelij in sporulacijo plesni smo izvedli pri 22 in 27 °C v gojiščih krompirjev/dekstroza/agar (PDA – potatoe dextrose agar) v petrijevkah po postopku predhodnih raziskav na področju limon (El Guilini in sod., 2016).

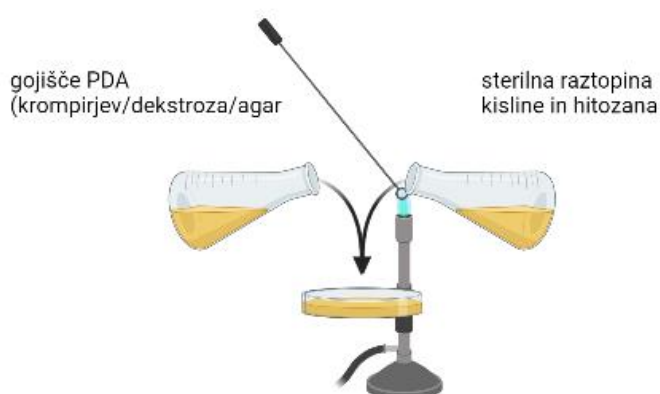
Gojišča smo pripravili tako, da smo združili aseptično (ob ognju) raztopino gojišča PDA in raztopino hitozana v očetni ali citronski kislini v razmerju 1 : 1.



Slika 3: Pripravljeno gojišče PDA, združeno s preiskovanimi raztopinami (levo), prelito v petrijevke, pripravljene za nanos plesni – inokulacijo (foto: Zala Kralj)

3.3 Priprava različnih raztopin hitozana in različnih raztopin očetne in citronske kisline

Iskali smo, katera kombinacija kisline (očetna ali citronska) bo najbolj zavrla rast plesni ob souporabi premaza na osnovi hitozana. Ker je treba gojišča pripraviti pod sterilnimi pogoji, je najlažje, če gojišča na osnovi krompirjevega ekstrakta (PDA) steriliziramo posebej, različne raztopine kislin in hitozana pa posebej, nato pa jih v razmerju 1 : 1 združimo skupaj pod sterilnimi pogoji (nad ognjem), kot je prikazano na Sliki 4.



Slika 4: Prikaz priprave gojišč in mešanja raztopin hitozana v raztopinah kislin z gojiščem v razmerju 1 : 1 pod sterilnimi pogoji (Zala Kralj: program Biorender)

V ta namen smo pripravili štiri različne poskuse. Opisali smo jih spodaj.

1. poskus, ki temelji na dodatku očetne kisline enake koncentracije (1 %) in različnih koncentracij hitozana:

a) 2 % hitozan v 2 % očetni kislini (50 mL) + 8,4 g PDA/100 mL (50 mL) => to je 1 % hitozan v 1 % očetni, ker se razredči 2 x;

b) 1 % hitozan v 2 % očetni kislini (50 mL) + 8,4 g PDA/100 mL (50 mL) => to je 0,5 % hitozan v 1 % očetni, ker se razredči 2 x;

c) 0,2 % hitozan v 2 % očetni kislini (50 mL) + 8,4 g PDA/100 mL (50 mL) => to je 0,1 % hitozan v 1 % očetni, ker se razredči 2 x;

č) 0,1 % hitozan v 2 % očetni kislini (50 mL) + 8,4 g PDA/100 mL (50 mL) => to je 0,05 % hitozan v 1 % očetni, ker se razredči 2 x;

d) 0,05 % hitozan v 2 % očetni kislini (50 mL) + 8,4 g PDA/100 mL (50 mL) => to je 0,025 % hitozan v 1 % očetni, ker se razredči 2 x.

2. poskus, ki temelji na dodatku citronske kisline enake koncentracije (1 %) in različnih koncentracij hitozana:

a) 2 % hitozan v 2 % citrinski kislini (50 mL) + 8,4 g PDA/100 mL (50 mL) => to je 1 % hitozan v 1 % citrinski kislini, ker se razredči 2 x;

b) 1 % hitozan v 2 % citrinski kislini (50 mL) + 8,4 g PDA/100 mL (50 mL) => to je 0,5 % hitozan v 1 % citrinski, ker se razredči 2 x;

c) 0,2 % hitozan v 2 % citrinski kislini (50 mL) + 8,4 g PDA/100 mL (50 mL) => to je 0,1 % hitozan v 1 % citrinski, ker se razredči 2 x;

č) 0,1 % hitozan v 2 % citrinski kislini (50 mL) + 8,4 g PDA/100 mL (50 mL) => to je 0,05 % hitozan v 1 % citrinski, ker se razredči 2 x;

d) 0,05 % hitozan v 2 % citrinski kislini (50 mL) + 8,4 g PDA/100 mL (50 mL) => to je 0,025 % hitozan v 1 % citrinski, ker se razredči 2 x.

3. poskus, ki temelji na dodatku hitozana enake koncentracije (1 %) in različnih koncentracij očetne kisline:

a) 2 % hitozan v 2 % očetni kislini (50 mL) + 8,4 g PDA/100 mL (50 mL) => to je 1 % hitozan v 1 % očetni, ker se razredči 2 x;

b) 2 % hitozan v 1 % očetni kislini (50 mL) + 8,4 g PDA/100 mL (50 mL) => to je 1 % hitozan v 0,5 % očetni, ker se razredči 2 x;

c) 2 % hitozan v 0,2 % očetni kislini (50 mL) + 8,4 g PDA/100 mL (50 mL) => to je 1 % hitozan v 0,1 % očetni, ker se razredči 2 x;

č) 2 % hitozan v 0,1 % očetni kislini (50 mL) + 8,4 g PDA/100 mL (50 mL) => to je 1 % hitozan v 0,05 % očetni, ker se razredči 2 x;

d) 2 % hitozan v 0,05 % očetni kislini (50 mL) + 8,4 g PDA/100 mL (50 mL) => to je 1 % hitozan v 0,025 % očetni, ker se razredči 2 x.

4. poskus, ki temelji na dodatku hitozana enake koncentracije (1 %) in različnih koncentracij citrinske kisline:

a) 2 % hitozan v 2 % citrinski kislini (50 mL) + 8,4 g PDA/100 mL (50 mL) => to je 1 % hitozan v 1 % citrinski kislini, ker se razredči 2 x;

b) 2 % hitozan v 1 % citrinski kislini (50 mL) + 8,4 g PDA/100 mL (50 mL) => to je 1 % hitozan v 0,5 % citrinski kislini, ker se razredči 2 x;

c) 2 % hitozan v 0,2 % citrinski kislini (50 mL) + 8,4 g PDA/100 mL (50 mL) => to je 1 % hitozan v 0,1 % citrinski kislini, ker se razredči 2 x;

č) 2 % hitozan v 0,1 % citrinski kislini (50 mL) + 8,4 g PDA/100 mL (50 mL) => to je 1 % hitozan v 0,05 % citrinski kislini, ker se razredči 2 x;

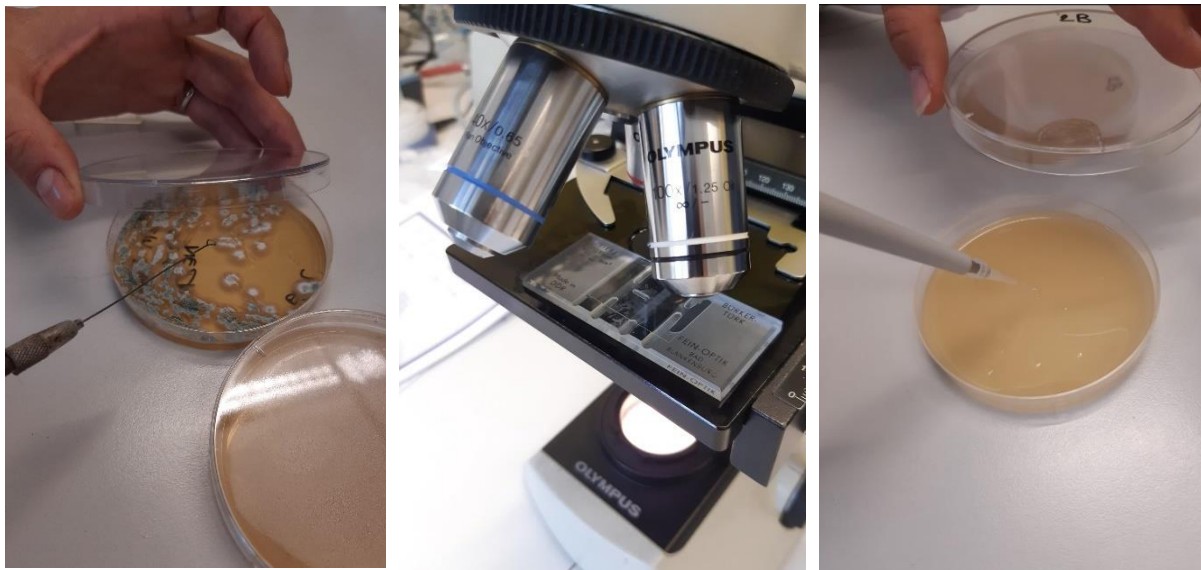
d) 2 % hitozan v 0,05 % citronski kislini (50 mL) + 8,4 g PDA/100 mL (50 mL) => to je 1 % hitozan v 0,025 % citronski kislini, ker se razredči 2 x.

5. poskus: meritev kontrol, to je čistih posameznih raztopin. Preverimo, koliko plesni se razmnoži v čisti 1 % očetni kislini, 1 % citronski kislini in 1 % raztopini hitozana.

*3.4 Nanos spor plesni *Penicillium expansum* v petrijevke*

Pred začetkom poskusa smo ob ognju razkužili cepilno zanko za nanos plesni *Penicillium expansum*, da ni vsebovala drugih mikroorganizmov, ki bi naš poizkus zavirali. Iz matične petrijevke, v kateri je bila predhodno namnožena plesen, smo s cepilno zanko odvzeli čim večje število spor plesni *Penicillium expansum*, ki smo jih kasneje raztopili v fiziološki raztopini (4,5 mL z 0,01 % detergentom (Tween 80)).

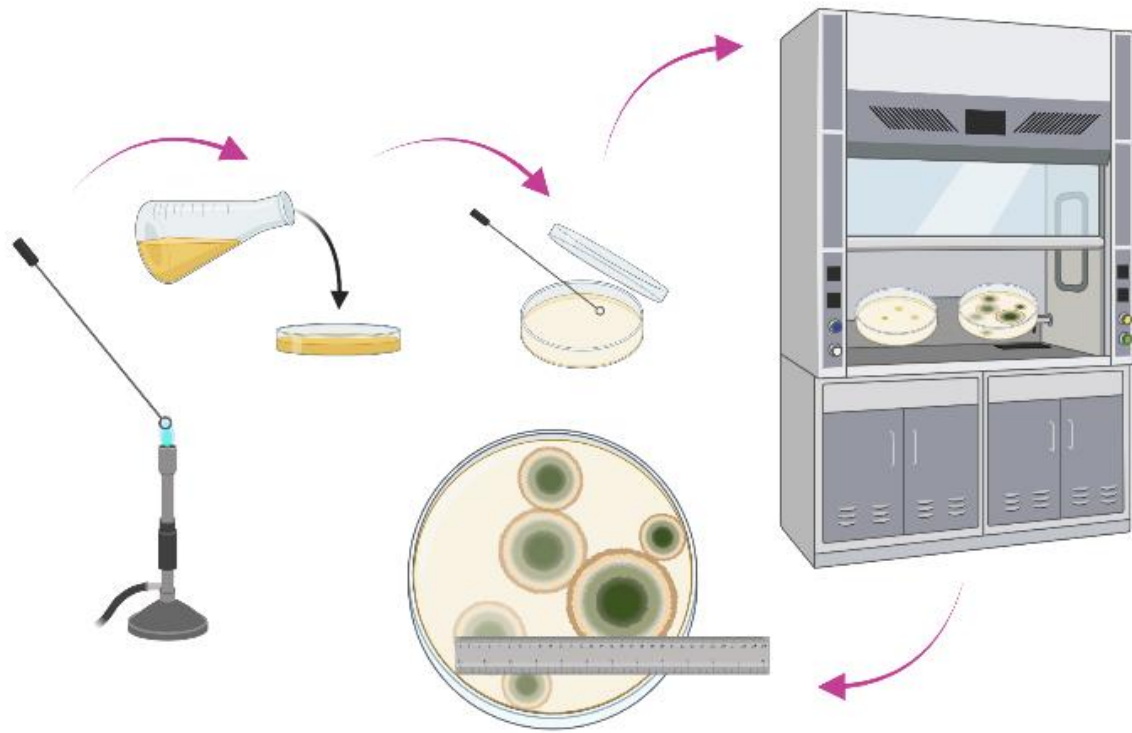
Nato smo pripravili raztopino, ki je vsebovala točno število spor, ki smo jih uporabili v poskusu. To smo izvedli s štetjem spor v števni komori, kjer smo določili koncentracijo spor v suspenziji (10^8 spor/mL suspenzije). Nato smo odvzeli 10 μ L suspenzije in jo s cepilno zanko nanесли na sredino petrijevke z gojišči. Petrijevke smo opazovali 7 dni in pustili, da se je plesen razvijala.



Slika 5: Cepljenje plesni, štetje spor z mikroskopom in nanos plesni na gojišče (foto: Zala Kralj)

3.5 Meritev velikosti premera plesni

Petrijevke, ki so vsebovale različne koncentracije hitozana in kislin (očetne in citronske), smo pustili 7 dni v komori pri sobni temperaturi, da se je plesen razvila. Nato smo izmerili premer plesni. Tam, kjer se je plesen močno razvila, so bili prisotni pogoji, ki stimulirajo rast; tam, kjer se plesen ni razvila, pa smo uspeli njeno rast zavreti, kar pomeni, da smo našli premaz, ki bo jabolko ščitil pred plesnijo in pred strupenim patulinom. Velikost premera plesni smo izmerili z ravnilom in rezultat podali v mm (Slika 6).



Slika 6: Shematski prikaz celotnega poskusa v mikrobiološkem laboratoriju (Zala Kralj; program Biorender)

4 REZULTATI

V petrijevkah smo po enem tednu izmerili velikosti plesnivega kroga. Večji, kot je krog, manj učinkovita je raztopina, ki jo testiramo. Manjši, kot je krog, bolj učinkovita je raztopina. Če plesni sploh ni, pravimo, da je raztopina popolnoma zavrla rast plesni, temu pojavu pravimo popolna inhibicija.

Pred začetkom mikrobiološkega poskusa smo testirali samo čiste raztopine vode, raztopine 1 % očetne kisline in 1 % citronske kisline. Temu testu pravimo test kontrol, kjer ugotavljamo, ali nam osnovna raztopina sama po sebi zavira rast plesni. Ugotovili smo, da je plesen zrasla v vodi in v raztopini 1 % citronske kisline; 1 % očetna kislina pa ni imela plesni:

KONTROLA – K1 – 1 % citronska kislina – PLESEN: 21 mm, 21 mm, 22 mm

KONTROLA – K2 – 1 % očetna kislina – POPOLNA INHIBICIJA, NI PLESNI

KONTROLA – K3 – destilirana voda – PLESEN: 25 mm, 26 mm, 26 mm

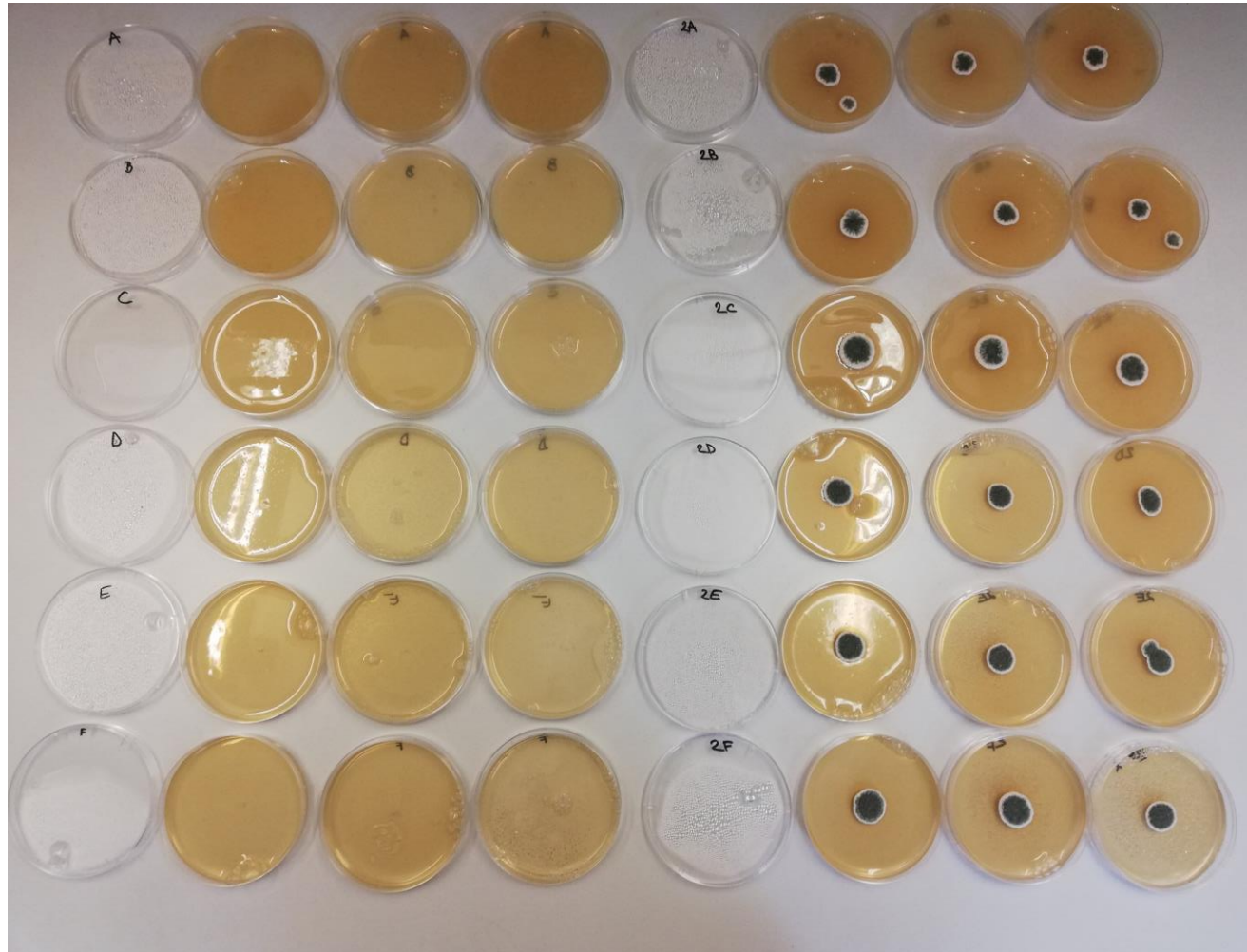
4.1 Meritev velikosti premera plesni v petrijevkah z različnimi koncentracijami hitozana in 1 % raztopino kislin

1. Rezultati poskusa, ki temelji na dodatku **ocetne kisline** enake koncentracije (1 %) in različnih koncentracij hitozana (Slika 7 – levo):

Raztopina hitozana v kislinski raztopini	Gojišče PDA (krompirjev ekstrakt)	Končna koncentracija hitozana v kislinski raztopini	Premer plesni [mm]		
2 % hitozan v 2 % očetni kislini (50 mL)	8,4 g PDA/100 mL (50 mL)	1 % hitozan v 1 % očetni (100 mL)	0	0	0
1 % hitozan v 2 % očetni kislini (50 mL)	8,4 g PDA/100 mL (50 mL)	0,5 % hitozan v 1 % očetni (100 mL)	0	0	0
0,2 % hitozan v 2 % očetni kislini (50 mL)	8,4 g PDA/100 mL (50 mL)	0,1 % hitozan v 1 % očetni (100 mL)	0	0	0
0,1 % hitozan v 2 % očetni kislini (50 mL)	8,4 g PDA/100 mL (50 mL)	0,05 % hitozan v 1 % očetni (100 mL)	0	0	0
0,05 % hitozan v 2 % očetni kislini (50 mL)	8,4 g PDA/100 mL (50 mL)	0,025 % hitozan v 1 % očetni (100 mL)	0	0	0

2. Rezultati poskusa, ki temelji na dodatku **citronske** kisline enake koncentracije (1 %) in različnih koncentracij hitozana (Slika 7 – desno):

Raztopina hitozana v kisli raztopini	Gojišče PDA (krompirjev ekstrakt)	Končna koncentracija hitozana v kisli raztopini	Premer plesni [mm]		
2 % hitozan v 2 % citrinski kislini (50 mL)	8,4 g PDA/100 mL (50 mL)	1 % hitozan v 1 % citrinski (100 mL)	19	18	19
1 % hitozan v 2 % citrinski kislini (50 mL)	8,4 g PDA/100 mL (50 mL)	0,5 % hitozan v 1 % citrinski (100 mL)	21	19	18
0,2 % hitozan v 2 % citrinski kislini (50 mL)	8,4 g PDA/100 mL (50 mL)	0,1 % hitozan v 1 % citrinski (100 mL)	25	25	23
0,1 % hitozan v 2 % citrinski kislini (50 mL)	8,4 g PDA/100 mL (50 mL)	0,05 % hitozan v 1 % citrinski (100 mL)	21	19	18
0,05 % hitozan v 2 % citrinski kislini (50 mL)	8,4 g PDA/100 mL (50 mL)	0,025 % hitozan v 1 % citrinski (100 mL)	20	20	21
0,02 % hitozan v 2 % citrinski kislini (50 mL)	8,4 g PDA/100 mL (50 mL)	0,01 % hitozan v 1 % citrinski (100 mL)	22	22	20



Slika 7: Fotografija petrijevk 1. poskusa z očetno kislino (levo) in 2. poskusa s citronsko kislino (desno) (Foto: Zala Kralj)

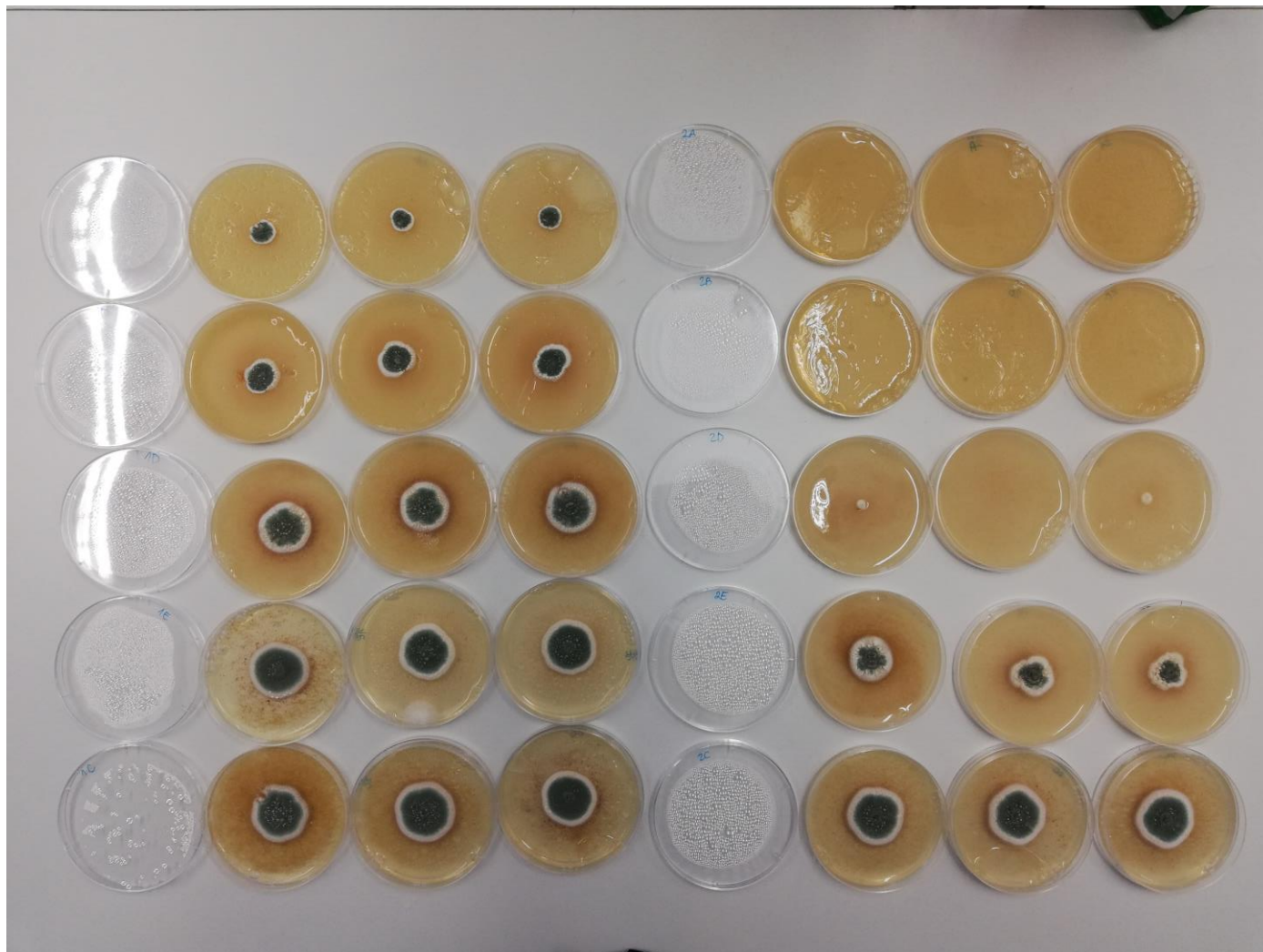
4.2 Meritev velikosti premera plesni v petrijevkah z različnimi koncentracijami kislin in 1 % raztopino hitozana

3. Rezultati poskusa, ki temelji na dodatku hitozana enake koncentracije (1 %) in različnih koncentracij očetne kisline (Slika 8 – desno):

Raztopina hitozana v kisli raztopini	Gojišče PDA (krompirjev ekstrakt)	Končna koncentracija hitozana v kisli raztopini	Premer plesni [mm]		
2 % očetna v 2 % raztopini hitozana (50 mL)	8,4 g PDA/100 mL (50 mL)	1 % očetna v 1 % raztopini hitozana (100 mL)	0	0	0
1 % očetna v 2 % raztopini hitozana (50 mL)	8,4 g PDA/100 mL (50 mL)	0,5 % očetna v 1 % raztopini hitozana (100 mL)	0	0	0
0,2 % očetna v 2 % raztopini hitozana (50 mL)	8,4 g PDA/100 mL (50 mL)	0,1 % očetna v 1 % raztopini hitozana (100 mL)	5	2	7
0,1 % očetna v 2 % raztopini hitozana (50 mL)	8,4 g PDA/100 mL (50 mL)	0,05 % očetna v 1 % raztopini hitozana (100 mL)	26	26	23
0,05 % očetna v 2 % raztopini hitozana (50 mL)	8,4 g PDA/100 mL (50 mL)	0,025 % očetna v 1 % raztopini hitozana (100 mL)	38	37	40

4. Rezultati poskusa, ki temelji na dodatku hitozana enake koncentracije (1%) in različnih koncentracij citronske kisline (Slika 8 – levo):

Raztopina hitozana v kisli raztopini	Gojišče PDA (krompirjev ekstrakt)	Končna koncentracija hitozana v kisli raztopini	Premer plesni [mm]		
			16	14	15
2 % citronska v 2 % raztopini hitozana (50 mL)	8,4 g PDA/100 mL (50 mL)	1 % citronska v 1 % raztopini hitozana (100 mL)	16	14	15
1 % citronska v 2 % raztopini hitozana (50 mL)	8,4 g PDA/100 mL (50 mL)	0,5 % citronska v 1 % raztopini hitozana (100 mL)	22	23	21
0,2 % citronska v 2 % raztopini hitozana (50 mL)	8,4 g PDA/100 mL (50 mL)	0,1 % citronska v 1 % raztopini hitozana (100 mL)	32	30	32
0,1 % citronska v 2 % raztopini hitozana (50 mL)	8,4 g PDA/100 mL (50 mL)	0,05 % citronska v 1 % raztopini hitozana (100 mL)	35	33	33
0,05 % citronska v 2 % raztopini hitozana (50 mL)	8,4 g PDA/100 mL (50 mL)	0,025 % citronska v 1 % raztopini hitozana (100 mL)	35	39	35

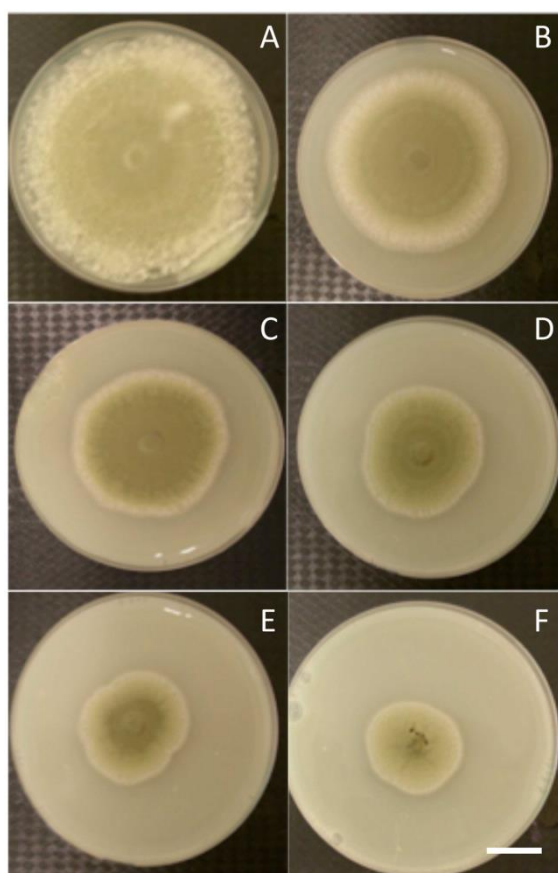


Slika 8: Fotografija petrijevok 3. poskusa z očetno kislino (desno) in 4. poskusa s citronsko kislino (levo) (Foto: Zala Kralj)

5 RAZPRAVA

Hitozan deluje protimikrobno na širok spekter bakterij (Mavrič, 2021), medtem ko je njegova učinkovitost pri zaviranju rasti gliv in plesni še predmet raziskav. V raziskavi, kjer so uporabili jedilni premaz na osnovi hitozana za zaščito limon pred zeleno plesnijo (rodu *Penicillium digitatum*) (El Guili in sod., 2016), ugotavljajo, da se je premer plesni z naraščanjem koncentracije hitozana manjšal (Slika 9).

V omenjeni raziskavi niso študirali vpliva vrste kisline, v katero so raztopili hitozan. Za raztapljanje hitozana so uporabili raztopino očetne kisline (1,5 % raztopina očetne kisline), ki se je v našem primeru izkazala kot popolni zaviralec rasti. Primerjali so le, kako vpliva naraščajoča koncentracija hitozana na rast plesni. Torej so v tem primeru morda spregledali, da rast pravzaprav zavira izbira kisline, v tem primeru očetna kislina.



Slika 9: Rast zelene plesni v odvisnosti od koncentracije hitozana je obratno sorazmerna (A: Control, B: 2, c: 4, D: 6, E: 8, F: 10 g.L⁻¹) (povzeto El Guili, 2016)

Naši rezultati kažejo namreč prav to. **Na rast plesni vpliva vrsta izbrane kisline, v kateri je hitozan raztopljen.** To lahko vidimo na spodnji sliki, kjer smo primerjali različne koncentracije očetne kisline in vedno enako koncentracijo hitozana 1 % ter različne koncentracije hitozana v vedno enaki začetni raztopini, 1 % raztopini očetne kisline. Ugotovimo, da s padanjem koncentracije kisline ob enaki koncentraciji 1 % raztopine hitozana rast plesni narašča (Slika 10, levo). Hkrati pa opazimo, da ob vedno enaki koncentraciji očetne kisline 1 % in različnimi koncentracijami hitozana plesen sploh ne raste (Slika 10, desno). Plesen pa ni rasla tudi že v

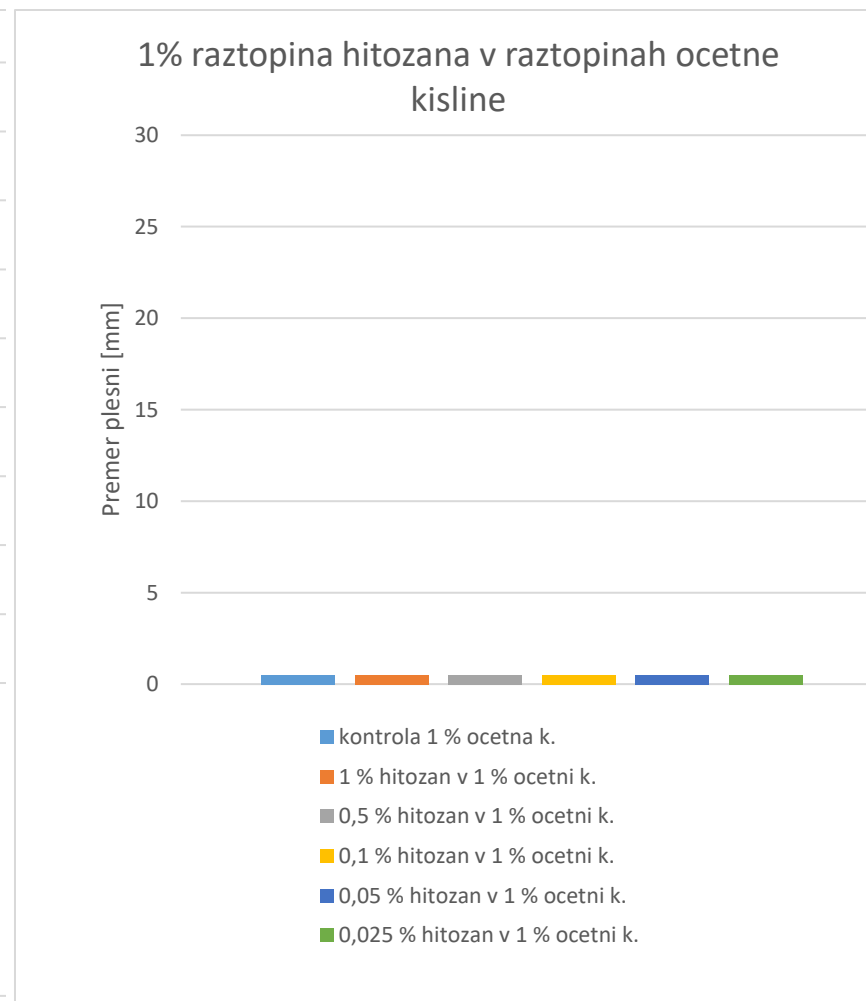
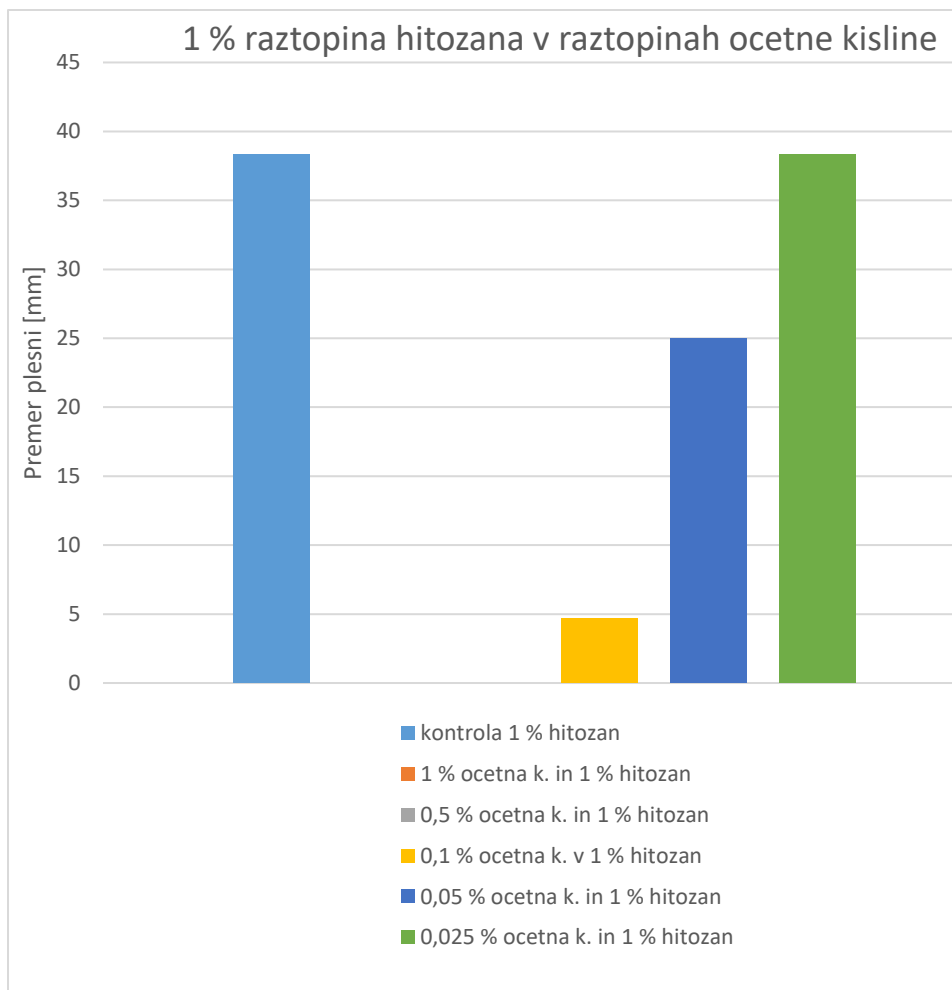
kontroli, torej zgolj v raztopini 1 % očetne kisline. **To nas vodi k ugotovitvi, da rast plesni zavira pravzaprav očetna kislina in ne hitozan.**

Ko smo ponovili poskus in namesto očetne kisline uporabili citronsko kislino, smo ugotovili, da je bila v vseh gojiščih prisotna plesen. Iz tega lahko zaključimo, da je očetna kislina boljši zaviralec rasti kot citronska kislina, saj v zgornjem primeru v seriji z 1 % očetno kislino plesni sploh nismo opazili. Očetna kislina je zavirala rast plesni do 0,1 %, nato pa se je plesen začela razvijati. **Očetna kislina mnogo bolj zavira plesen kot citronska kislina v enakih koncentracijah.**

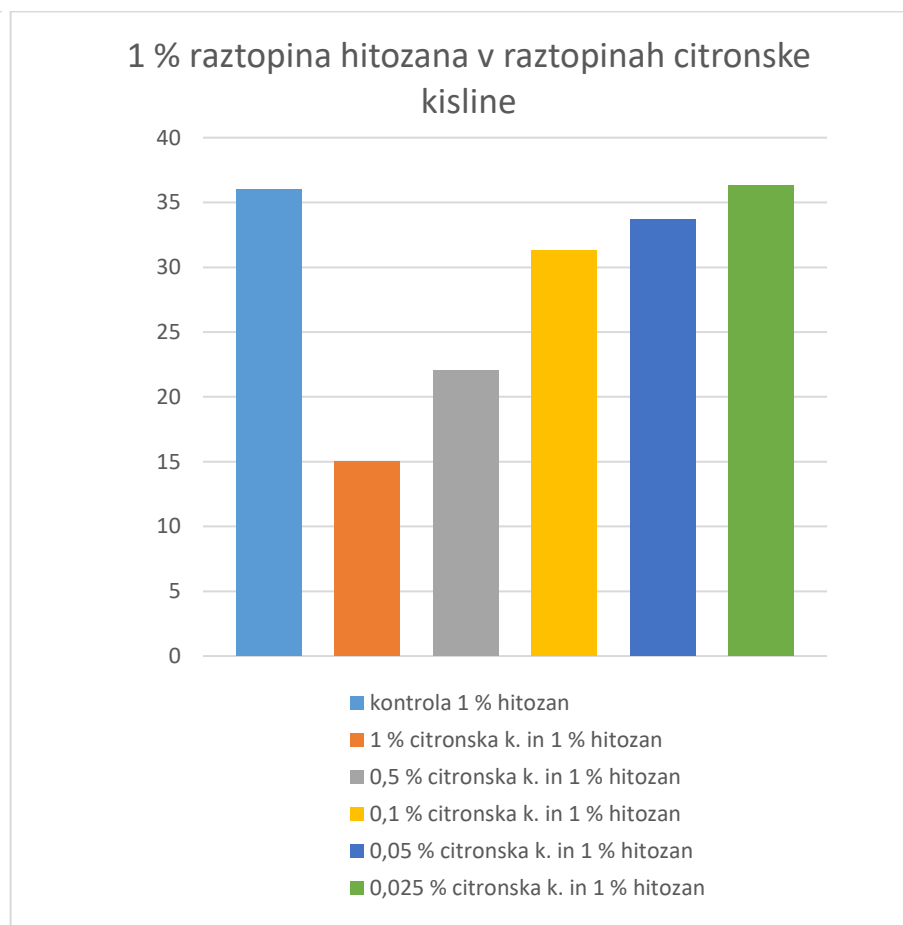
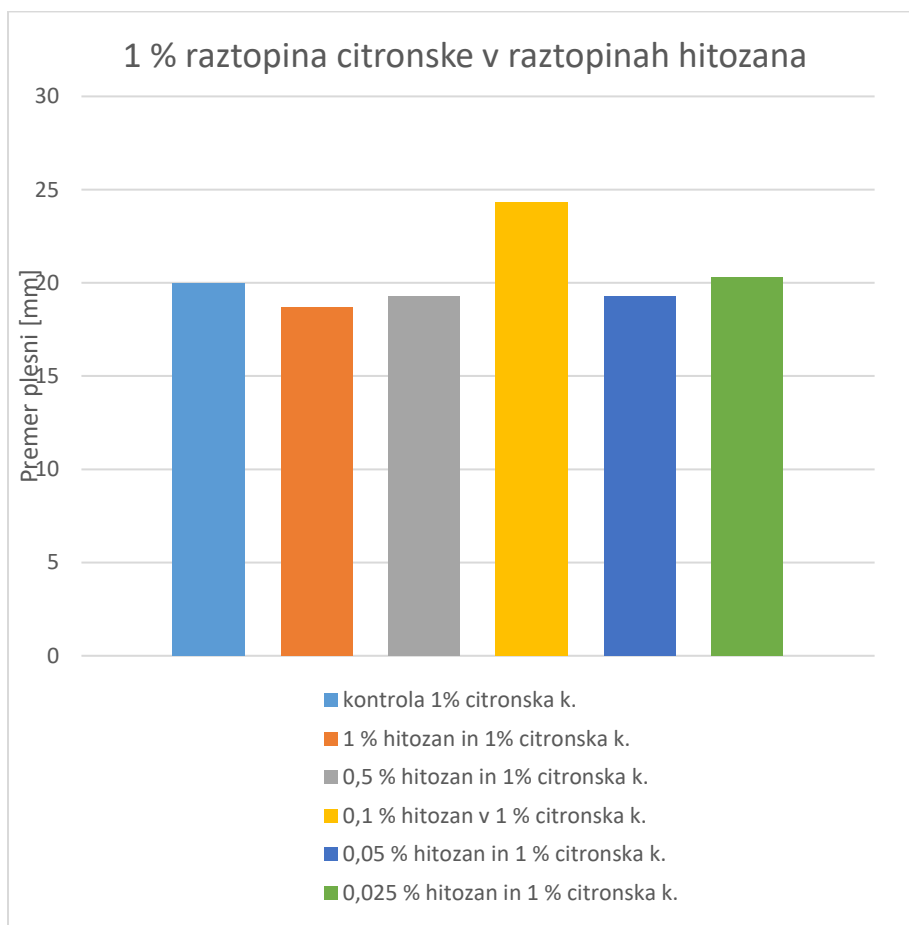
Poskus s citronsko kislino pa nas vodi še do drugega zaključka. S padajočo koncentracijo citronske kisline ob 1 % hitozanu je premer plesni naraščal, kar pomeni, **da je tudi citronska kislina zaviralec rasti, ampak veliko slabši kot raztopina očetne kisline.** Sama raztopina hitozana, ne glede na njegovo koncentracijo v raztopini, pa rasti plesni ne zmanjšuje (Slika 11, levo), kar potrjujejo tudi kontrole.

Naša raziskava torej raziskavo na limonah dopolni (El Guili in sod., 2016), saj potrdi, da je izjemno pomembno, v kateri kislini raztapljamo hitozan, da lahko zavira rast plesni. Prav tako, lahko potrdimo obe raziskovalni hipotezi:

Na rast plesni vpliva dodatek kisline, večji, kot je, bolj zavira (Slika 10) ter očetna kislina je v zaviranju rasti plesni učinkovitejša (Slika 11). Primerjava s tovrstnimi raziskavami na jabolkih ni bila mogoča, ker hitozana na jabolkih še niso testirali.



Slika 10: Primerjava rasti plesni v raztopinah hitozana in očetne kisline



Slika 11: Primerjava rasti plesni v raztopinah hitozana in citronske kisline

6 ZAKLJUČEK

Jabolka so eden glavnih sadežev v naši državi, zato je nujno, da raziščemo možne jedilne premaze, ki bi podaljšali njihov čas uporabe in skladiščenja. Raziskovalna naloga je bila usmerjena v preučevanje učinkovitosti jedilnega premaza na osnovi hitozana (raztopljenega v dveh kislinah, očetni in citronski) za zaviranje rasti plesni (vrste *Penicillium expansum*), ki je nevarna, saj v jabolkih povzroči nastanek strupene snovi patulin. Ugotovili smo, da je rast plesni in s tem proizvodnjo strupenega patulina najbolj zavirala raztopina hitozana v raztopini očetne kisline. Zaviralni učinek je dosežen že s koncentracijo 0,1 %. Očetna kislina se je izkazala tudi kot boljša izbira v primerjavi z raztopino citronske kisline, saj je plesen mnogo učinkoviteje zavirala. Naša raziskava je pokazala še, da sama raztopina hitozana, ne glede na njegovo koncentracijo v raztopini, rasti plesni ne zmanjšuje sama po sebi. Za to potrebuje kisline. Je pa jedilni premaz na osnovi hitozana neke vrste »naravni vosek«, ki omogoči zadrževanje 0,1 % očetne kisline, ki bi sicer izhlapela. Poleg tega pa vpliva na zadrževanje in manjše izgube vode med skladiščenjem jabolk.

7 LITERATURA

El Guilli, M., Hamza, A., Clément, C., Ibriz, M., & Ait Barka, E. (2016). Effectiveness of postharvest treatment with chitosan to control citrus green mold. *Agriculture*, 6(2), 12.

Gričnik, N. (2018). Vpliv aplikacije taninov na pojav skladiščnih boleznih jabolk sort 'Fuji' in 'Pinova'.

Mavrič, N. (2021). Ugotavljanje antioksidativnih in protimikrobnih lastnosti ekstrakta jabolčnih olupkov, ki ga lahko dodajamo hitozanskemu premazu za živila.

Strnad, S., Šauperl, O., Fras Zemljič, L., & Jazbec, A. (2007). Hitozan-vsestransko uporaben biopolimer. *Tekstilec*, 50(10/12), 243-261.

Petrič, N. (2010). Živilska mikrobiologija z biotehnologijo [Elektronski vir] : laboratorijske vaje / Nada Petrič. - El. knjiga. - Ljubljana : Biotehniški izobraževalni center, 2010. -

Raztresen, L. (2017). Kontaminiranost fig, grozdja in jabolk z mikotoksini (Doctoral dissertation, [L. Raztresen]).

Wang, L., Wu, H., Qin, G., & Meng, X. (2014). Chitosan disrupts *Penicillium expansum* and controls postharvest blue mold of jujube fruit. *Food Control*, 41, 56-62.

Patulin, Wikipedia, <https://en.wikipedia.org/wiki/Patulin>, (dostopala, 4.3.2022)

Patulin in zdravje ljudi, 2021. <https://www.foodfocus.co.za/home/Industry-Topics/food-safety/Patulin-and-Human-Health>, (dostopala, 4.3.2022)

Popis intenzivnih sadovnjakov, Slovenija, 2017 (stat.si)
(Microsoft Word - PRILOGA 1 vsebinska poročila, Analiza stanja, Matej, Slavko.docx)
(javneslužbe.si); <https://sadjarstvo.javneslužbe.si/wp-content/uploads/2020/01/1.Analiza-stanja-pridelave-jabolk-v-Sloveniji.pdf>, (dostopala, 4.3.2022)