Primjena biopolimernih mikrokapsula u hidroponskom uzgoju salate

Mamić, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:407170

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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



Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

PRIMJENA BIOPOLIMERNIH MIKROKAPSULA U HIDROPONSKOM UZGOJU SALATE

DIPLOMSKI RAD

Katarina Mamić

Zagreb, rujan, 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:
Hortikultura-Povrćarstvo

PRIMJENA BIOPOLIMEMIH MIKOKAPSULA U HIDROPONSKOM UZGOJU SALATE

DIPLOMSKI RAD

Katarina Mamić

Mentor: izv. prof. dr. sc. Marko Vinceković

Zagreb, rujan, 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Katarina Mamić**, (JMBAG 0018108487), rođena dana 22.12.1990. u Sarajevu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

PRIMJENA BIOPOLIMEMIH MIKOKAPSULA U HIDROPONSKOM UZGOJU SALATE

Svojim potpisom jamčim:

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

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studenta / studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Katarine Mamić**, JMBAG 0018108487, naslova

PRIMJENA BIOPOLIMEMIH MIKOKAPSULA U HIDROPONSKOM UZGOJU SALATE

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo: potpisi:

1. izv. prof. dr. sc. Marko Vinceković mentor _____
2. izv. prof. dr. sc. Božidar Benko član _____
3. izv. prof. dr. sc. Ivanka Žutić član _____

Zahvale

Zahvaljujem se svom mentoru, prof.dr.sc. Marku Vincekoviću na izrazitoj susretljivosti tokom školovanja i prilikom izrade diplomskog rada.
Veliko hvala i svim djelatnicima Zavoda za kemiju na korisnim savjetima i tehničkoj podršci.

Želim se zahvaliti i svojim kolegicama Romani, Ivi, Dariji i Puljiz s kojima je studiranje bilo nezaboravno i koje ću nositi u sjećanju.

Najveće hvala mojoj obitelji, najvećim kritičarima i najiskrenijim prijateljima - roditeljima Mariji i Nikoli koji su me podržavali u svakom mogućem smislu svih godina školovanja, bez kojih danas nebi bila to što jesam.

I na kraju, hvala mojem Domagoju i kćeri Niki, koji su me uz roditelje naučili da je potrebno završiti započeto i koji su mi svakodnevna motivacija i vjetar u leđa.

Sadržaj

1. Uvod 2
1.1. Cilj istraživanja 2
2. Pregled literature 3
2.1. Hranidbena vrijednost 3
2.2. Morfološka svojstva salate 4
2.3. Biološka svojstva salate 5
2.4. Hidroponski uzgoj 5
2.5.Biopolimerne mikročestice 7
3. Materijali i metode 10
3.1.Priprema mikročestica 10
3.2. Postavljanje i provedba pokusa 10
3.3. Određivanje morfoloških svojstava i prinosa 12
3.4.Kemijske analize 12
3.4.1. Priprema uzorka salate 12
3.4.2. Određivanje udjela suhe tvari 13
3.4.3. Određivanje udjela ukupnih klorofila 14
3.4.4. Određivanje udjela ukupnih polifenola 14
3.4.5. Određivanje udjela ukupnih flavonoida 15
3.4.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ABTS metodom 15
4. Rezultati istraživanja i rasprava 16
4.1. Morfološka svojstva 16
4.2. Prinos salate 17
4.3. Udjel vlage 18
4.4. Ukupni klorofil 18
4.5. Ukupni polifenoli 20
4.6. Ukupni flavonoidi 20
4.7. Antioksidacijska aktivnost 21
5. Zaključak 23
6. Popis literature 24

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Katarina Mamić,** naslova

PRIMJENA BIOPOLIMEMIH MIKOKAPSULA U HIDROPONSKOM UZGOJU SALATE

Salata (*Lactuca sativa* L.) sadrži bioaktivne spojeve koji su korisni za zdravlje ljudi, a povećanje njihove koncentracije postalo je cilj uzgojnih programa. Biopolimerne mikročestice jedan su od načina kako poboljšati morfološka (visina i promjer, biomasa i tržna masa rozete) i nutritivna svojstva (udio suhe tvari, ukupni klorofil, ukupni polifenoli i flavonoidi i antioksidacijska aktivnost) salate. U ovom istraživanju postavljen je jednofaktorijalni pokus sa salatom sorte 'Melina' u tipu batavie. Prilikom sadnje presadnica, u tlo je inkorporirano osam vrsta biopolimernih mikročestica sastavljenih od nosača alginata s ili bez dodatnog kitozan omotača, s aktivnim tvarima: Ca^{2+}, Cu^{2+}, Ca^{2+}/*T. viride*, Cu^{2+}/*T. viride*. Primijenjena je i fiziološka otopina *T. viride* spora dok je kontrolna varijanta bila bez aplikacije mikročestica. Aplikacija mikročestica nije rezultirala značajnim razlikama u morfološkim svojstvima salate. Primjena biopolimernih mikrosfera s aktivnom tvari Ca^{2+} dovela je do značajnog povećanja ukupnog klorofila (1349,7 $\mu g \cdot g^{-1} \cdot$s.tv.). Primjena mikokapsula s Ca^{2+} i *T. viride* rezultirala je značajnim povećanjem ukupnih polifenola (4,2 mg EGK$\cdot g^{-1}$ s.tv.) i flavonoida (9,7 mg EK$\cdot g^{-1}$ s.tv.) te antioksidacijske aktivnosti (22,1 µmol ET g^{-1} s.tv.) u odnosu na kontrolnu varijantu.

Ključne riječi: *Lactuca sativa* L., biopolimerne mikročestice, morfološka svojstva, prinos, nutritivna svojstva, antioksidacijska aktivnost

Summary

Of the master's thesis – student **Katarina Mamić** entitled

APPLICATION OF BIOPOLYMERIC MICROCAPSULES IN HYDROPONIC LETTUCE GROWING

Lettuce (*Lactuca sativa* L) contains several compounds that are useful in human health. Increasing concentrations of key healing compounds have become the goal of breeding programs. Biopolymeric microcapsules are one of the ways that we can improve morphologic characteristics (height, diameter, biomass, market weight rosette) and nutritive characteristics (dry matter content, total chlorophyll, total polyphenols and flavonoids, and antioxidant activity) of lettuce. In this research, we have set up one factorial experiment with the salad of Melina variety, which we include in Batavia. When planting seedlings, eight types of biopolymer microcapsules made of alginate carrier with or without chitosan wrap were incorporated into the soil with active ingredients Ca^{2+}, Cu^{2+}, Ca^{2+}/*T. viride*, Cu^{2+}/*T. viride*. The physiological solution of *T. viride* spore was also applied while control was without applications of the microparticle. There was no significant difference in the morphological properties of the lettuce using the microparticles. The application of a biopolymer microsphere with the Ca^{2+} activator resulted in a significant increase in total chlorophyll (1349,7 μg·g^{-1}). Application of microcapsules loaded with Ca2+ and *T. viride* resulted in a significant increase in total polyphenols (4,2 mg EGK·g^{-1}) and flavonoids (9,7 mg EK·g^{-1}) antioxidant activity (22,1 μmol ET g^{-1} s.tv.) in comparison to the control variant.

Key words: *Lactuca sativa* L., biopolymeric microcapsules, morphologic characteristic, yield, nutritive characteristic, antioxidant activity

1. Uvod

Salata se ubraja u porodicu glavočika (*Asteraceae* syn. *Compositae*). Zbog svoje kratke vegetacije jedna je od najrasprostranjenijih vrsta lisnatog povrća, pa je tijekom sezone moguće obaviti više od jedne berbe. Sadrži hranjive tvari, kao i bioaktivne spojeve koji imaju pozitivan učinak na zdravlje ljudi. Kao najvažniji to su: spojevi s antioksidacijskom aktivnošću, flavonoidi, polifenoli, klorofil i vitamin C. Minerali su isto tako zastupljeni u salati, posebice željezo i kalcij (tablica 2.1.1.). Prevencija i liječenje raznih bolesti (kardiovaskularne, karcinomi) zasniva se u jednom dijelu i na povećavanju njihovih koncetracija u organizmu, što je uzrokovalo povećan broj oplemenjivačkih programa na salati (Fan, 2013). Salata je kao namirnica jako dobar izvor vlakana, a sadrži niski udio masti i kalorija, zbog čega nema posebnih ograničenja u konzumaciji (Slamet, 2017).

Upotreba biopolimernih mikročestica koje sadrže biološku i kemijsku komponentu u hidroponskom uzgoju salate mogla bi imati pozitivne učinke; skraćenje vegetacije, povećanje tržne mase (prinosa) salate.

Inkapsulacijom se aktivni sastojci (čvrsti, tekući ili plinoviti), imobiliziraju u čestice koje kontrolirano otpuštaju aktivne sastojke koje su biljci u određenom trenutku potrebne. To je inovativan i koristan postupa kojim se aktivni sastojci zaštićuju od neželjenog djelovanja unutar kapsula. Postupak je prepoznat kao koristan u ekološkoj i održivoj poljoprivredi (Hack i sur., 2012; Bedek, 2018). Iako su mikročestice s jednom aktivnom tvari poznate i u širokoj uporabi, novije spoznaje o istovremenoj inkapsulacijii kako kemijskog tako i biološkog sredstva i dalje su nedovoljno istražene i ograničene (Vinceković i sur., 2017).

1.1. Cilj istraživanja

Cilj provedenog istraživanja bio je utvrditi utjecaj biopolimernih mikročestica s primarnim nosačem aktivnih tvari (Ca^{2+}, Cu^{2+}, Ca^{2+}/*T. viride*, Cu^{2+}/*T. viride*) – alginatom, odnosno, mikrokapsula s dodatnim omotačem kitozanom, na morfološka svojstva, prinos i sadržaj biološki aktivnih spojeva u salati u hidroponskom uzgoju salate.

2. Pregled literature

2.1. Hranidbena vrijednost

Salata se kao namirnica najčešće koristi kao svježa, jer se tako najbolje iskorištavaju svi njeni hranjivi sastojci. Ovisno o podneblju, koristi se na različite načine, pa se tako može servirati kao predjelo, u sklopu glavnog jela ili nakon njega, a danas su sve više postale popularne nutritivno ˝bogate˝ kombinacije sa salatom, orašastim plodovima i raznim začinima i preljevima među kojima prednjače maslinovo ulje i balzamični ocat. Vanjski, zeleniji listovi bogatiji su vitaminima od unutarnjih listova u glavici, pa ih ne treba odstranjivati prilikom čišćenja. Sadržaj vode u biljci kreće se 91-96 %. Jabučna i limunska kiselina daju joj prepoznatljivi okus, dok su laktucinska kiselina, laktopirin, laktocerol i neolaktucin zaslužni za gorak okus (Parađiković, 2009). Cijeli je niz blagodati salate na zdravlje čovjeka, među kojima se ističe rad bubrega, kardiovaskularni sustav, živčani sustav. Poboljšava probavu te ubrzava metabolizam, a korisna je i u ublažavanju simptoma astme i nesanice.

Tablica 2.1.1.Energetska i nutritivna vrijednost na 100 g.

Nutrijent	Mjerna jedinica	Količina
Masti	g	0,11
- zasićene masne kiseline	g	0,01
- višestruko nezasićene masne kiseline	g	0,06
Ugljikohidrati	g	2,09
Vlakna	g	1,00
Bjelančevine	g	0,81
Sol	g	0,01
Vitamin A	µg	322,00
Vitamin E	mg	0,03
Vitamin K	µg	24,10
Vitamin C	mg	3,90
Vitamin B6	mg	0,05
Tiamin	mg	0,04
Riboflavin	mg	0,02

Nutrijent	Mjerna jedinica	Količina
Niacin	mg	0,12
Pantotenska kiselina	mg	0,12
Kalij	mg	152,00
Kalcij	mg	20,00
Fosfor	mg	22,00
Magnezij	mg	8,00
Željezo	mg	0,35
Cink	mg	0,16
Bakar	mg	0,03
Mangan	mg	0,13
Selen	µg	0,50

Izvor: USDA National Nutrient Database for standard Reference, Release 16 (July 2003)

Salata je bogat izvor prirodnog klorofila koji pomaže u obnavljanju crvenih krvnih stanica - eritrocita, podiže energiju, a pozitivne učinke ostavlja i u borbi protiv raznih infekcija i kod cirkulacije. Razgradnja klorofila odvija se prilikom obrade hrane, ali i tijekom skladištenja proizvoda.
U skupinu polifenola spadaju flavonoidi. Oni su zaslužni za razne boje povrća (plava, crvena, ljubičasta, narančasta) te imaju antimikrobno djelovanje. Sudjeluju u prijenosu energije, djeluju na regulatore rasta kao i na hormone. Povrh svega, moćni su antioksidansi. ali nemaju direktan utjecaj na razvoj biljke (Jatoi i sur., 2017).

2.2. Morfološka svojstva salate

Salata je jednogodišnja zeljasta biljka. Korijen joj je smješten pri površini tla, vretenast je i razgranat, a iz glavnog korijena izbijaju korijenove dlačice prvog i drugog reda. Promjer korijena duljinom je približan promjeru rozete.

Stabljika se sastoji od nodija i internodija. U prvoj godini vegetacije oni su skraćeni a u generativnoj fazi se izdužuju pa tada stabljika može doseći visinu i do 1,5 m. Cvjetovi su

zbijeni u glavice koje su obavijene pricvjetnim listovima. S vanjske strane cvjetovi su obavijeni ljuskama koji čine sterilni ovoj glavice salate. U svakom cvatu nalaze se dvospolni jezičasti žuti cvjetovi, oko 15 komada. Kod salate prevladava samooplodnja, a posjećuju je i kukci pa je moguća i stranooplodnja što u hidroponskim sustavima i općenito u plasteničkom uzgoju nije od velikog značaja.

Listovi su različitog oblika, ovisno o sorti, pa tako mogu biti okrugli, ovalni, nazubljeni ili obli. Sjedeći su i imaju kratke internodije. Aktivni centralni pup konstantno proizvodi novo lišće i tako tvori glavicu, gdje su unutarnji listovi svjetlije boje (svijetložute), a vanjski listovi su znatno veći i imaju tamno zelenu boju. Prema strukturi i obliku lista razlikujemo iduće tipove salate:

-Lisnata salata (*L. sativa* var. *crispa*)
-Salata glavatica (*L. sativa* var. *capitata*)
-Salata stablašica (*L. sativa* var. *angustana*)
-Salata romana (*L. sativa* var. *romana*)
-Dugolisna salata (*L. sativa* var. *longifolia*)

Jednosjemeni plod salate zove se roška (ahenij) s papusom koji pri doradi otpada. Najčešće je sive, smeđe ili crne boje. Masa 1000 sjemenki iznosi 0,8-1,3 g. Sjemenke su ovalnog ili izduženog oblika (Krmpotić, 2012; Parađiković, 2009; Lešić i sur., 2016).

2.3. Biološka svojstva salate

Salata je biljka blage klime i dugog dana. Optimalne temperature u vegetativnoj fazi razvoja za razvoj glavice ili rozete su od 12-20°C. Za klijanje minimalne temperature su od 2-5°C, a optimalne 15-20°C pri kojim salata niče za otprilike 3-5 dana. Temperature iznad 25°C izazivaju sekundarnu dormantnost koja smanjuje klijanje normalno klijavog sjemena za više 50% (ovisno o kultivaru) te dolazi do smanjenog prinosa i kvalitete. Iznad 30°C većina kultivara neće niknuti, a klijanje i nicanje je brže na svijetlu. Mlade biljke salate mogu podnijeti temperature i do -5°C, a dobro ukorijenjene biljke sa 5-7 listova mogu podnijeti uvjete kontinentalne zime. Što je salata bliže tehnološkoj zrelosti to je osjetljivija na niske temperature, što je kod hidroponskog uzgoja u zaštićenom od manje važnosti, nego kod konvecionalnog uzgoja na otvorenom.

2.4. Hidroponski uzgoj

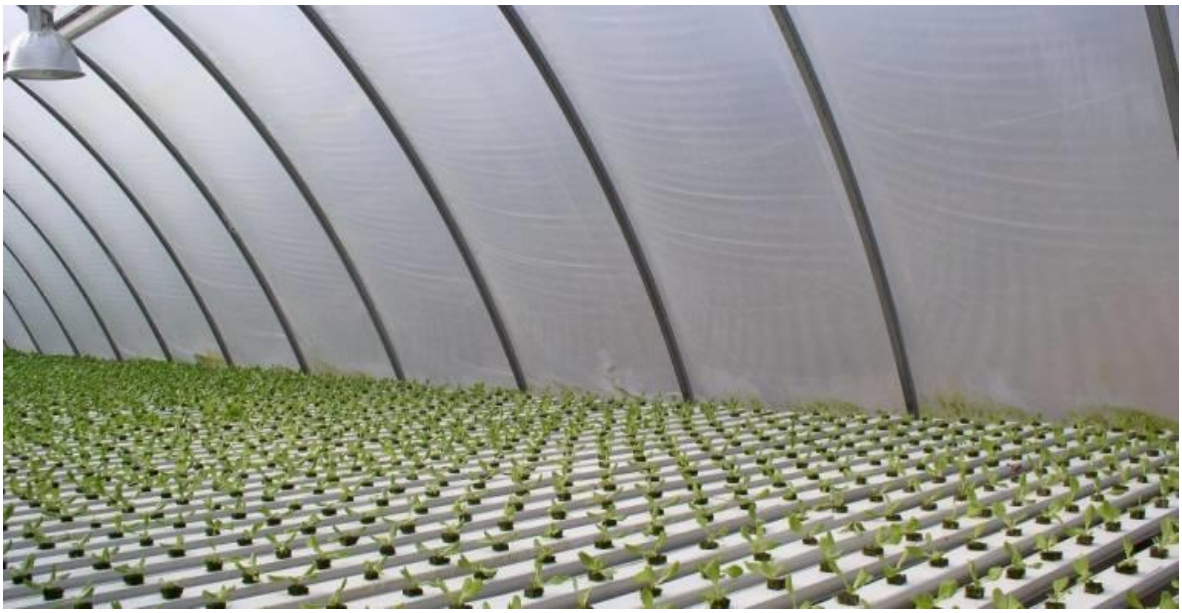
Mikroklimatski uvjeti u zaštićenom prostoru, kao i visoka razina higijene su najveći čimbenici za ekonomski opravdanu i kvalitetnu proizvodnju. Direktno utječu na rast i razvoj biljaka, pojavu štetnika i bolesti, kao i na prinos.

Prvi korak u proizvodnji je odabir certificiranog, kvalitetnog sjemena za proizvodnju presadnica.

Kako bi se izbjegli problemi višegodišnjeg intezivnog uzgoja salate na tlu, koje je uzrokovalo poremećaje fizikalnih i kemijskih osobina, kao i bolesti koje je teško suzbiti, prije tridesetak godina počeo je uzgoj biljnih kultura bez tla. Uzgoj bez tla podrazumijeva uzgoj u hranjivoj otopini sa supstratom (kokos, kamena vuna ili drugo), te bez supstrata.
Uzgoj se vrši u čistoj hranjivoj otopini tehnikom kontinuirane cirkulacije hranjive otopine (ovisno o potrebama kulture).
Postoji 6 osnovnih tipova hidroponskog uzgoja bilja, osnovna podjela je na hidroponske sustave sa ili bez internog supstrata (kapilarni hidroponski uzgoj, vodena kultura, sistem oseke i plime, kapajući ili drip sistem, tehnika hranjivog filma ili NTF i aeroponski uzgoj). U hidroponski uzgoj bez supstrata svrstava se tehnika hranjivog filma, aeroponija (horizontalna i vertikalna), vodena kulturu i sustavi plutajućih kontejnera. Tehnologiju plutajućih kontejnera su razvili u Izraelu te ona 8 podrazumijeva tehniku uzgoja u horizontalnim bazenima unutar kojih se nalaze zračne pumpe, čiji je zadatak miješanje i prozračivanje hranjive otopine. Na taj se način omogućava prozračivanje i brži razvoj korjenovog sustava. Ta tehnika se naziva i plutajuća metoda hidropona. Osnovna tehnika ovog uzgoja bazira se na plitkim bazenima (visina otopine 15- 20 cm) u kojima se nalazi hranjiva otopina i na čijoj površinama plutaju polistirenske ploče zasijane s kulturom. Ova tehnika pogodna je za uzgoj kultura male mase po jedinici površine. Uzgoj biljaka u velikim hidroponskim sustavima nadziran je automatskim uređajima za analizu i prilagođavanje koncentracije hranjivih elemenata, pH, uvođenje kisika u otopinu (prozračivanje) te je većina hidropona smještena je u zaštićene prostore u kojima je nadzor temperature, svjetlosti, vlažnosti zraka i razine ugljikovog dioksida potpuno automatiziran i kontroliran. Na ovaj način može se brati više puta u sezoni jer je ovo najintenzivniji oblik proizvodnje (moguće je planiranje proizvodnje u najboljem trenutku), te se smatra da je na ovaj način količina nitrata smanjena na svega 1500 mg/kg, a recikliranjem vode rješava se pitanje ekološke prihvatljivosti (Parađiković, 2009).

Prednosti hidroponskog uzgoja:

- nema plodoreda,
- smanjena pojava patogena,
- manja upotreba sredstava za zaštitu bilja,
- smanjeno onečišćenje okoliša,
- uzgoj na površinama na kojima nije bilo uvjeta za uzgoj,
- visoki intenzitet proizvodnje,
- visok stupanj automatizacije,
- manje rada pri obradi, kultiviranju, dezinfekciji,
- mala potrošnja vode i hranjiva.



Slika 2.4.1. Hidroponski uzgoj salate u zaštićenom prostoru (Izvor: www.pinova.hr)

2.5.Biopolimerne mikročestice

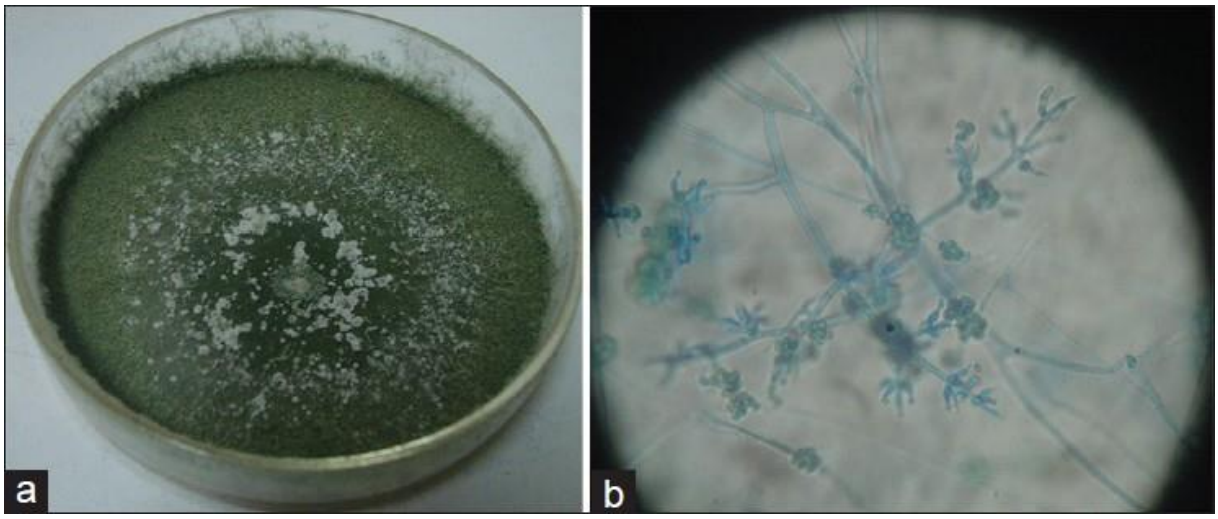
Tehnologija inkapsulacije na salati inovativan je pristup kojim se stimulira proizvodnja sekundarnih metabolita koji povećavaju njenu nutritivnu vrijednost. Kao i sve nove metode, zahtijeva iscrpna i ponavljajuća istraživanja, kako bi se sa sigurnošću i većom preciznošću utvrdio utjecaj biopolimernih mikročestica na rast i razvoj biljaka.
Veliki problem današnje konvecionalne proizvodnje jest količina raznih sredstava zaštitu bilja koja direktno utječu na njenu sigurnost, a samim time i na zdravlje ljudi i na okoliš. Iako još ne možemo potpuno odbaciti korištenje agrokemikalija, tendencija je svesti njihovu potrošnju na minimum, kako bi se smanjili nepotrebni štetni utjecaji (Vinceković i sur., 2016).

Biopolimeri se nalaze u prirodi, biorazgradivi su, nisu toksični, obnovljivi su, i cjenovno su prihvatljivi. Svojim svojstvima su slični sintetičkim spojevima, ali s poboljšanjima iz prirodnih sustava. Kitozan i alginat su biopolimeri dobri po sposobnosti formiranja mikročestica ionskim geliranjem. Ionsko geliranje je svojstvo geliranja polisaharida u vodenim otopinama kada su pristuni dvovalentni i trovalentni ioni. Prilikom upotrebe ove metode zadržava se aktivnost molekula tijekom inkapsulacije (Usmiati i sur., 2014).
Kitozan i alginat dobivaju se iz poljoprivrednih sirovina ili iz ljuski rakova.

Inkapsulacija se koristi kod primjene gnojiva i pesticida zbog poboljšanog optuštanja tvari, a samim time i smanjene količine pesticida. To u konačnici rezultira smanjenim brojem

potrebnih tretmana na kulturi koja se uzgaja i manjim brojem sati rada na polju (Oakley, 2015). Kod primjene kapsula važno je znati rukovati njima, te koristiti biorazgradive i netoksične polimere (Bedek, 2018). Puno je prednosti korišenja biopolimernih mikrokapsula; oslobađanje inkapsuliranog pesticida traje dulje vrijeme i primjenjuje se rijeđe, bolje se iskorištava sam pesticid. Ovaj način uporebe pesticida onemogućava ispiranje i degradaciju.

Prvi opis gljive naziva Trichoderma datira još iz 1794. godine (Persoon 1794), a prvo spominjanje vrste *Trichoderma viride* datira iz 1796. od kada se ubraja u rod Trichoderma uz vrste *T. auram, T. nigrescens i T. roseum.*
Gljiva *T. viride* filamentozna je gljiva koju je moguće naći u gotovo svim vrstama i tipovima tla. Prisutna je i u rizosferi i biljnim dijelovima. Ova vrsta stimulira biljni rast jer utječe na korištenje i i unos hranjiva te jača otpornost na abiotičke čimbenike. Ona stvara promjene u sastavu proteina i metabolizmu biljaka što biljku štiti od patogena (Harman, 2006).
Ova vrsta ima mogućnost preživljavanja u nepovoljnim uvjeti i visok reproduktivni kapacitet.
Micelij uzgajan na optimalnoj temperaturi rasta od 25 °C ima karakterističnu zelenu boju (Samuels, 2007, Rifai, 1969). Vrsta *T. viride* spada u diuralne vrste jer s režimom izmjene dana i noći (osvjetljenja) u koloniji se formiraju koncentrični krugovi zelene i žute boje što je posljedica sporulacije (Slika 2.5).



Slika 2.5. *Trichoderma spp.* (Izvor: http://www.ijem.in/viewimage.asp?img)

Kalcij je netoksičan element koji se u biljci transportira ksilemom, dok je kretanje floemom vrlo slabo. Njegovo usvajanje teče znatno sporije nego usvajanje drugih minerala. Utječe na kemijska i fiziološka svojstva tla, održava funkcije stanične membrane, kontrolira razinu enzima i sudjeluje u regulaciji i transportu iona (Vinceković i sur., 2016; 2017).
Korištenje kalcija i gljiva roda *Trichoderma viride* pogodne su za simultanu inkapsulaciju zbog kompatibilnosti i niza povoljnih učinaka na biljku. Njena primjerina se povećala zbog

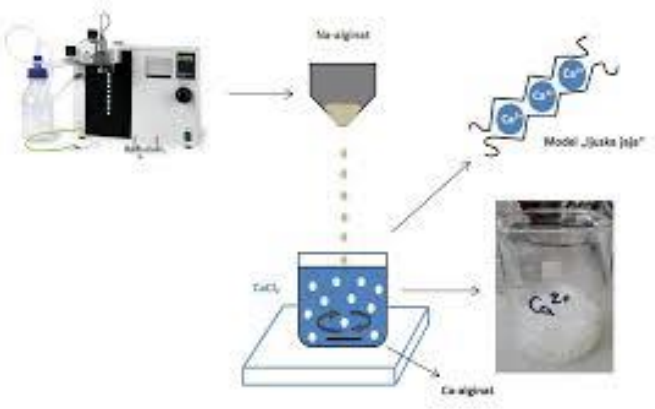
sposobnosti da mikroparazitira patogene gljive, stimulira proizvodnju fitohormona i razgrađaje biljne ostatke u tlu (Vinceković i sur., 2016).

Kalcijev alginat je siguran za okoliš, gel se izrađuje vrlo jednostavno i cjenovno je prihvatljiv i pristupačan. Negativne karakteristike su visoka poroznost i niska stabilnost te smanjena čvrstoća i viskoznost. Unatoč manama, njegova upotreba je popularna zbog mogućnosti kontroliranog i usporenog otpuštanja aktivnog sastojka te duljeg učinka gnojidbe i jednostavne aplikacije. Koliko je gel kalcijevog alginata dobar govori i činjenica da se samo jednom njegovom primjenom smanjuje broj prohoda kroz parcele što rezultira boljim uvjetima za rast i razvoj korijena i korjenovog sustava (Vinceković i sur., 2016). Inkapsulacija kalcija i spora gljive *Trichoderma viride* omogućuje biljci lakšu dostupnost ionu kalcije zbog pozitivnog učinka gljive što u konačnici rezultira bržim porastom biljke (Topolovec-Pintarić i sur., 2017).

3. Materijali i metode

3.1.Priprema mikročestica

Uzgoj sojeva spora gljive *Trichoderma viride* vrši se u Petrijevim zdjelicama promjera 10 cm koje su obložene krumpirovim dekstroznim agarom. Inkubacija zdjelica vrši se u inkubatoru na temperarturi od 25 stupnjeva celzijusa kroz se dana dok se ne pojave konidije (Bedek, 2018). Po završetku inkubacije biomasa hifa i konidija se ostruže špatulom te homogenizira s otopinom natrijevog alginata štapnim mikserom. Otopina se na poslijetlku profiltrira kroz muslin kako bi se izdvojile spore (Vinceković i sur., 2017).
Izrada mikročestica odvija se postupkom ionskog geliranja pri sobnoj temperaturi. Prvi korak je dokapavanje otopine natrijevog alginata u otopinu kalcijevog klorida (1% w/v)(Slika 3.1.1.). Smjesa natrijevog alginata i spora gljive *Trichoderma viride* ili otopina natrijevog alginata propuštaju se kroz mlaznicu veličine 1000 mikrometara uz frekvenciju vibracije 40 Hz pri tlaku od 20 mbar. Mikrosfere se stvaraju gotovo odmah i miješaju se magnetnom miješalicom 30 minuta kako bi se učvrstile. Potrebno ih je naknadno isprati destiliranom vodom kako bi se odstranio višak kalcijevog klorida.



Slika 3.1.1. Shematski prikaz priprave mikrosfera kalcijevog karbonata (Bedek, 2018)

3.2. Postavljanje i provedba pokusa

Pokus je proveden u plasteniku na pokušalištu Agronomskog fakulteta u Zagrebu tijekom 2018. godine. Presadnice salate sorte Melina presađene su 30. svibnja u uzgojne posude inertnim supstratom perlitom kad su razvile 4 prava lista. Prilikom sadnje, mikročestice su aplicirane u zoni korijenovog sustava. Tri presadnice po posudi položene su na udaljenost od

30 cm, te se koristilo 4 uzgojne posude po tretiranju. Položene su u hranjivu otopinu bogatu nutrijentima u omjeru koji je preporučen za lisnato povrće (Pimpini i sur., 2005). Tijekom razdoblja vegetacije, svakog dana svaki pratili su se svi bitni parametri; temperatura, pH vrijednost, elektrokonduktivnost kao i minimalna i maksimalna temperatura te vlažnost zraka. Berba je obavljena 09. srpnja te su se mjerile masa rozete, visina i promjer rozete te prinos po kvadratnom metru.



Slika 3.2.1. Prikaz aplikacije mikrokapsula i dozrijevanje salata u dva načina uzgoja (konvecionalni i hidroponski) Izvor: Jurić i sur., 2018

U istraživanju je testirana primjena različitih formulacija biopolimernih mikročestica:

a) Alginat mikrosfere koje sadrže Ca^{2+} ione - Ca
b) Alginat mikrosfere koje sadrže Cu^{2+} ione - Cu
c) Alginat mikrosfere koje sadrže Ca^{2+} ione i spore *Trichoderma viride* - CaTv
d) Alginat mikrosfere koje sadrže Cu^{2+} ione i spore *Trichoderma viride* - CuTv
e) Alginat/kitozan mikrokapsule koje sadrže Ca^{2+} ione – Ca-c
f) Alginat/kitozan mikrokapsule koje sadrže Cu^{2+} ione – Cu-c
g) Alginat/kitozan mikrokapsule koje sadrže Ca^{2+} ione i spore *Trichoderma viride* - CaTv-c
h) Alginat/kitozan mikrokapsule koje sadrže Cu^{2+} ione i spore *Trichoderma viride* - CuTv-c
j) spore *Trichoderma viride* suspendirane u fiziološkoj otopini u koncetraciji 0,9% - Tv
k)) Kontrola – bez primjene mikrosfera ili mikrokapsula - K

Kontrola služi kako bi se rezultati ostvareni primjenom mikročestica mogli usporediti s rezultatima uzgoja salate bez primjene tehnologije inkapsulacije.

3.3. Određivanje morfoloških svojstava i prinosa

Berba salate obavljena je 41 dan nakon uzgoja u hidroponu i odmah po završetku berbe poslana je na Zavod za kemiju radi daljnje analize i obrade. Izmjereni su svi morfološki podaci, kao i masa rozete prije dorade i nakon dorade. Mjereni su promjer rozete i visina. Izračunat je randman koji predstavlja postotak tržnog dijela rozete u ukupnoj biomasi. Na poslijetku je izračunat i prinos salate po jedinici površine, ovisno o primjenjenoj formulaciji biopolimernih mikročestica.
Statistička analiza i obrada rezultata provedena je pomoću statističkog programa IBM SPSS Statistics. ANOVA-om su analizirane razlike između prosječnih vrijednosti promatranih svojstava, a značajne razlike između prosječnih vrijednosti testirane su posthoc Turkey HSD testom, na razini značajnosti $p<0,05$.

3.4.Kemijske analize

Sve kemijske analize kako bi se utvrdio antioksidacijski kapacitet i udjel bioaktivnih tvari napravljene su u laboratoriju Zavoda za kemiju na Agronomskom fakultetu u Zagrebu. Određeni su udjeli suhe tvari, ukupnog klorofila, ukupnih polifenola i ukupnih flavonoida uz i bez primjene mikročestica. Antioksidacijska aktivnost analizirala se ABTS metodom.

3.4.1. Priprema uzorka salate

Od svake repeticije tri glavice salate su narezane poprečno na četvrtine. Tri četvrtine jedne glavice su na 60 sekundi homogenizirane u laboratorijskom homogenizatoru nakon čega je iz istih uzoraka analiziran udjel suhe tvari i udjel ukupnih klorofila. Sljedeći korak je homogenizacija 30 g uzorka u laboratorijskom mlinu sa 100 mL 96%-tnog etanola u periodu od 30 sekundi. Uzorci su se dalje profiltrirali kroz Whatman broj 4 filter papir te su dopunjeni do oznake s otapalom (Slika 3.4.1). Takvi pripremljeni uzorci korišteni su za buduće kemijske analize (Haramija, 2019).



Slika 3.4.1. Prikaz kemijske analize uzoraka (Haramija, 2019)

3.4.2. Određivanje udjela suhe tvari

Suha tvar se mjeri u posebnom uređaju - halogenom vlagomjeru (Slika 3.4.2). Listovi salate odabrani iz pojedine uzgojne posude oprani su prvo vodom iz slavine, zatim destiliranom vodom te osušeni uz pomoć papirnatih ručnika. Usitnjeni su mikserom i po 5 g dobivene smjere stavljeno je na sušenje u halogeni vlagomjer do konstantne mase. Dobiveni rezultati analiza izraženi su u postotcima (Haramija, 2019).



Slika 3.4.1. Halogeni vlagomjer za mjerenje udjela suhe tvari (Haramija, 2019)

3.4.3. Određivanje udjela ukupnih klorofila

Udjel ukupnih klorofila određuje se ekstrakcijom 1000 g pigmenta sa 25 mL 80%-tnog acetona. Spektrofotometrijski se pri 663 i 645 nm mjeri intezitet nastalog obojenja, a kvantifikacija se vrši prema jednadžbama od Huang i sur. (2007). Od homogenizirane tvari odvaže se 0,1 g te doda 25 mL 80%-tnog acetona. Otopina se vorteksira 2 minute, a dobiveni ekstrakt se filtrira kroz Whatman broj 4 filter papir i nadopuni s otapalom do oznake. Priprema ekstrakata i sva mjerenja provode se tri puta, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost $\mu g \cdot g^{-1}$ suhe tvari (Haramija, 2019).



Slika 3.4.1. Spektrofotometar

Izvor: https://skveranka.com/kemijski-laboratorij-spektrofotometar/

3.4.4. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Kako bi odredili ukupne polifenole korištena je Folin Ciocalteu metoda (Singleton i sur., 1999). Ekstrakt salate od 0,1 mL pomiješan je sa 0,5 mL Folin Ciocalteu reaginsa, 7,9 mL destilirane vode i 1,5 mL 20%-tnog natrijevog karbonata. Otopina se vorteksirala nakon čega je ostavljena na 2 sata na sobnoj temperaturi kako bi se reakcija dovršila. Folin Ciocalteu reagens je razrijeđen s vodom u omjeru 1:2. Spektrofotometrom na 765 nm mjerena je optička gustoća, a ostali rezultati izraženi su kao ekvivalenti galne kiseline (mg EGK g^{-1} s.tv.) (Jatoi i sur. 2017).

3.4.5. Određivanje udjela ukupnih flavonoida

Kako bi se odredili ukupni flavonoidi u tikvicu od 10 mL dodani su 1 mL uzrorka, 4 mL vode i 300 µL otopine natrijevog nitrata (0,5g dm^{-3}). Otopina se vorteksira i ostavi 5 minuta, nakon čega se dodaje 300 µL otopine aluminijevog klorida (1g dm^{-3}). Poslije 6 minuta, doda se 2 mL NaOH (1 mol dm^{-3}) i do oznake se nadopuni destiliranom vodom. Rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenata kvercetina (mg KE g^{-1} s.tv.) (Haramija, 2019).

3.4.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ABTS metodom

Za mjerenje antioksidacijske aktivnosti upotrebljavala se ABTS metoda. Ona se koristi i kod određivanja sposobnosti uklanjanja radikala (Pregiban, 2017). Antioksidacijska aktivnost određena je pomoću ABTS (2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) reagensa (Brand-Williams Cuvelier, 1995). Rezultati analiza izraženi su u µmol ekvivalenta troloksa (ET) po gramu suhe tvari (µmol ET·g^{-1} s.tv.) .

4. Rezultati istraživanja i rasprava

4.1. Morfološka svojstva

U tablici 4.1.1. prikazan je utjecaj tretmana mikrokapsula na visinu i promjer rozete salate. Prema posthoc Turkey HSD testu ($p<0,05$) nisu zabilježene značajne razlike u ovim parametrima. Upotreba alginat/kitozan mikrokapsula sa bakrovim ionima rezultirala je nešto nižim rezultatima u oba morfološka svojstva u odnosu na kontrolni usjev.

Tablica 4.1.1. Utjecaj biopolimernih mikrokapsula na visinu (cm) i promjer (cm) salate

Tretman	**Visina (cm)**	**Promjer (cm)**
Ca	15,2± 2,7	19,5± 5,0
Cu	14,1± 0,8	19,2± 2,9
CaTv	14,4± 2,7	18,0± 3,8
CuTv	14,1± 2,1	15,4± 3,9
Ca-c	15,0± 2,5	16,8± 2,2
Cu-c	14,0± 2,1	17,3± 1,3
CaTv-c	14,0± 2,8	16,0± 4,4
CuTv-c	12,1± 1,9	13,9± 0,7
Tv	13,6 ±1,6	17,1± 3,3
K	12,3± 1,5	15,2 ±2,2

Ca – alginat mikrosfere sa Ca^{2+}; Cu – alginat mikrosfere sa Cu^{2+}; CaTv – alginat mikrosfere sa Ca^{2+}i *T. viride*; CuTv – alginat mikrosfere sa Cu^{2+} i *T. viride*; Ca-c – alginat/kitozan mikrokapsule sa Ca^{2+}; Cu-c – alginat/kitozan mikrokapsule sa Cu^{2+}; CaTv-c – alginat/kitozan mikrokapsule sa Ca^{2+} i *T. viride*; CuTv-c – alginat/kitozan mikrokapsule sa Cu^{2+} i *T.viride*; Tv - spore T. Viride; K – kontrola bez primjene mikrosfera ili mikrokapsula

Prema istraživanju međusobnog utjecaja gnojidbe dušikom i rasta i razvoja salate Ali i sur. (2017) utvrdili su maksimalnu visinu biljke od 30 cm, a uzgajana je s dodatnim unosom dušika, dok je maksimalna visina rozete iznosila 30,46 cm.

4.2. Prinos salate

Statističkom analizom nisu zabilježene značajne razlike u prinosu biomase salate prema Turkey HSD testu ($p<0,05$). Relativno najveći prinos biomase salate (tablica 4.2.1.) utvrđen je kod tretmana Ca (241,8 g) i CaTv-c (224 g). Relativno najmanju biomasu imao je tretman CuTv-c (127,1 g). Nadalje, primjenom biopolimernih mikročestica nisu izmjerene značajne razlike u tržnoj masi salate. Relativno najveća tržna masa utvrđena je kod tretmana Ca (206,8 g), a najmanja kod tretmana CuTv-c (108,0 g). U randmanu (%) koji prikazuje udio tržnog dijela rozete u ukupnoj biomasi uzgojene salate, nisu utvrđene statistički značajne razlike pri primjeni biopolimernih mikročestica. Relativno najveći randman utvrđen je je kod tretmana Cu-c (87,0 %), dok je najmanji izmjeren kod tretmana Cu (83,3%).

Tablica 4.2.1. Utjecaj biopolimernih kapsula na biomasu (g), tržnu masu (g) i randman salate (%)

Tretman	Biomasa (g)	Tržna masa (g)	Randman (%)
Ca	241,8 ± 95,5	206,8 ± 82,7	85,5 ± 1,5
Cu	205,0 ± 79,5	175,5 ± 77,7	83,3 ± 5,1
CaTv	206,5 ± 78,8	177,5 ± 70,9	85,3 ± 2,0
CuTv	181,8 ± 107,3	153,1 ± 93,6	83,6 ± 8,0
Ca-c	196,0 ± 62,7	170,0 ± 61,6	85,7 ± 3,5
Cu-c	192,0 ± 65,8	168,3 ± 59,7	87,0 ± 1,8
CaTv-c	224,0± 125,8	192,8 ± 113,1	84,1 ± 4,4
CuTv-c	127,1 ± 47,4	108,0 ± 40,8	84,9 ± 0,7
Tv	187,3 ± 66,6	158,5 ± 63,0	83,6 ± 3,1
K	135,0 ± 45,5	117,0 ± 41,9	85,9 ± 2,4

Ca – alginat mikrosfere sa Ca^{2+}; Cu – alginat mikrosfere sa Cu^{2+}; CaTv – alginat mikrosfere sa Ca^{2+}i *T. viride*; CuTv – alginat mikrosfere sa Cu^{2+} i *T. viride*; Ca-c – alginat/kitozan mikrokapsule sa Ca^{2+}; Cu-c – alginat/kitozan mikrokapsule sa Cu^{2+}; CaTv-c – alginat/kitozan mikrokapsule sa Ca^{2+} i *T. viride*; CuTv-c – alginat/kitozan mikrokapsule sa Cu^{2+} i *T.viride*; Tv - spore *T. viride*; K – kontrola bez primjene mikrosfera ili mikrokapsula

4.3. Udjel vlage

Statističkim analizama nisu utvrđene značajne razlike udjela vlage u uzorcima tretiranim mikrokapsulama. U nekim uzorcima izmjereni su i niži postotci vlažnosti u odnosu na kontrolni usjev, a najmanji u uzorcima tretiranim Cu-c sa 92,1%. Najveći postotak vlažnosti izmjeren je u uzorcima tretiranim Cu tretmanom (Tablica 4.3.1). Rezultati su u skladu s literaturom gdje se postotak vlažnosti za sorte batavia tipa kreće oko 93% (Heimler i sur, 2012).

Tretman	Udjel vlage (%)
Ca	92,8 ± 0,7
Cu	92,9 ± 0,1
CaTv	92,9 ± 0,1
CuTv	92,1 ± 0,8
Ca-c	92,4 ± 0,6
Cu-c	92,1 ± 0,1
CaTv-c	92,2 ± 0,4
CuTv-c	92,7 ± 0,1
Tv	92,5 ± 0,2
Kontrola	92,6 ± 0,1

Tablica 4.3.1. Utjecaj biopolimernih mikrokapsula na udjel vlage salate salate (%)

Ca – alginat mikrosfere sa Ca^{2+}; Cu – alginat mikrosfere sa Cu^{2+}; CaTv – alginat mikrosfere sa Ca^{2+}i *T. viride;* CuTv – alginat mikrosfere sa Cu^{2+} i *T. viride*; Ca-c – alginat/kitozan mikrokapsule sa Ca^{2+}; Cu-c – alginat/kitozan mikrokapsule sa Cu^{2+}; CaTv-c – alginat/kitozan mikrokapsule sa Ca^{2+} i T. viride; CuTv-c – alginat/kitozan mikrokapsule sa Cu^{2+} i *T.viride*; Tv - spore *T. viride*; K – kontrola bez primjene mikrosfera ili mikrokapsula

4.4. Ukupni klorofil

Kemijskim analizama uzoraka salate utvrđene su značajne razlike u udjelu klorofila u uzorcima koji su tretirani mikrokapsulama u odnosu na kontrolni usjev. Iako su udjeli klorofila u paralelnom pokusu sa salatom uzgojenom na konvecionalan način (Haramija, 2019), bili veći, moramo uzeti u obzir kako je hidroponski uzgoj u zaštićenom prostoru te je salata bila izložena manjoj količini svjetla pa se samim time stvaralo i manje klorofila (Latasa, 1995).

Tablica 4.4.1. Utjecaj biopolimernih mikrokapsula na ukupni klorofil

Tretman	**Ukupni klorofil (µmol ET g^{-1}·s.tv.)**
Ca	$1349,7 \pm 79,4^{a-i}$
Cu	$1009,6 \pm 118,0^{a,j,k}$
CaTv	$999,4 \pm 26,4^{b,l,m}$
CuTv	$980,6 \pm 99.6^{c,n}$
Ca-c	$1121,9 \pm 83,8^{d,o-s}$
Cu-c	$938,1 \pm 140,3^{e}$
CaTv-c	$845,0 \pm 80,3^{f,o}$
CuTv-c	$875,3 \pm 65,2^{g,p}$
Tv	$723,0 \pm 49,5^{h,j,l,n,r}$
Kontrola	$767,7 \pm 79,8^{i,k,m,s}$

Ca – alginat mikrosfere sa Ca^{2+}; Cu – alginat mikrosfere sa Cu^{2+}; CaTv – alginat mikrosfere sa Ca^{2+}i *T. viride*; CuTv – alginat mikrosfere sa Cu^{2+} i *T. viride*; Ca-c – alginat/kitozan mikrokapsule sa Ca^{2+}; Cu-c – alginat/kitozan mikrokapsule sa Cu^{2+}; CaTv-c – alginat/kitozan mikrokapsule sa Ca^{2+} i *T. viride*; CuTv-c – alginat/kitozan mikrokapsule sa Cu^{2+} i *T.viride*; Tv - spore *T. viride*; K – kontrola bez primjene mikrosfera ili mikrokapsula

**Vrijednosti koje u eksponentu imaju ista slova značajno se razlikuju prema posthoc Turkey HSD testu ($p<0,05$)

Statistički, najveći i značajan utjecaj na sintezu ukupnih klorofila u salati imala je primjena mikrosfera s kalcijevim ionima, bez prisutnosti spora *T. viride* (1349,7), kao i primjena alginat/kitozan mikrokapsula sa kalcijevim ionima (1121,9). Najmanji utjecaj na ukupni klorofil imali su uzorci salate sa primjenom spora *T. viride* (723,0). Tu pojavu možemo objasniti činjenicom da spore koje nisu inkapsulirane imaju nižu stopu preživljenja kao i time da usvajaju dio hranjiva u okolnom mediju (Vinceković i sur., 2017).

Relativna promjena (%) u ukupnom klorofilu sa tretmanom kalcijevim ionima veća je i od koncevionalnog uzgoja, i za hidiroponski uzgoj iznosi 75,8% što znači da ove mikročestice mogu stimulirati veću proizvodnju klorofila čak i u uvjetima smanjene izloženosti direktnom svjetlu. Sposobnost biljke da usvoji kalcij je olakšana jer je inkapsuliran i ostaje u ionskom obliku pri čemu ga biljka pasivno usvaja korijenovim sustavom (Wallace, 1980).

Ova istraživanja su skladu sa istraživanjem od Ahmad i sur., 2016, gdje su uočene povećane vrijednosti klorofila a i b te ukupnog klorofila u lišću slanutka tretiranog kalcijevim ionima. Koncetracija kalcija u biljci je od iznimne važnosti jer smanjene vrijednosti uzrokuju fitotoksičnost nekih mikroelemenata u tragovima (Haynes, 1980).

4.5. Ukupni polifenoli

Polifenoli su se u prošlosti smatrali nevažnim nus-produktima primarnog metabolizma biljke koji se nagomilavaju u stanicama zbog nedovoljno razvijenog sustava sekrecije (Kliebenstein, 2004).

Danas znamo kako su sekundarni metaboliti od iznimne važnosti u borbi protiv mikroba i virusa (Swain, 1977).

Kemijskom analizom utvrđene su značajne razlike u udjelu ukupnih polifenola kod salate tretirane alginat mikrosferama sa kalcijevim ionima i sporama *T. viride*. Relativna promjena je 47,6% u odnosu na kontrolu (Tablica 4.6.1). Općenito, sve mikročestice sa kalcijem imale su veće vrijednosti sinteze polifenola u odnosu na one s bakrom.

Tablica 4.6.1. Utjecaj biopolimernih mikrokapsula na ukupne polifenole

Tretman	**Ukupni polifenoli (mg EGK·g^{-1})**
Ca	4,2 ± 0,4
Cu	4,0 ± 0,8
CaTv	3,9 ± 0,2
CuTv	3,7 ± 0,6
Ca-c	4,1 ± 0,2
Cu-c	3,5 ± 0,1^{a}
CaTv-c	4,9 ± 0,6^{a-c}
CuTv-c	3,4 ± 0,6^{b}
Tv	4,3 ± 0,2
Kontrola	3,3 ± 0,1^{c}

Ca – alginat mikrosfere sa Ca^{2+}; Cu – alginat mikrosfere sa Cu^{2+}; CaTv – alginat mikrosfere sa Ca^{2+}i *T. viride*; CuTv – alginat mikrosfere sa Cu^{2+} i *T. viride*; Ca-c – alginat/kitozan mikrokapsule sa Ca^{2+}; Cu-c – alginat/kitozan mikrokapsule sa Cu^{2+}; CaTv-c – alginat/kitozan mikrokapsule sa Ca^{2+} i *T. viride*; CuTv-c – alginat/kitozan mikrokapsule sa Cu^{2+} i *T.viride*; Tv - spore *T. viride*; K – kontrola bez primjene mikrosfera ili mikrokapsula

**Vrijednosti koje u eksponentu imaju ista slova značajno se razlikuju prema posthoc Turkey HSD testu ($p<0,05$)

4.6. Ukupni flavonoidi

Značajni utjecaj na udio flavonoida imali su uzorci tretirani alginat/kitozan mikrokapsulama s kalcijem kod kojih je relativna promjena iznosila 42,2% i mikrosferama sa kalcijem s relativnom promjenom od 39% (Tablica 4.7.1).

Tablica 4.7.1. Utjecaj biopolimernih mikročestica na ukupne flavonoide

Tretman	**Ukupni flavonoidi (mg EK·g^{-1})**
Ca	9,7 ± 0,2^{ab}
Cu	8,6 ± 0,3^{c}
CaTv	8,4 ± 0,1^{d}
CuTv	8,3 ± 0,7^{e}
Ca-c	8,9 ± 0,9^{f}
Cu-c	8,0 ± 0,1^{ag}
CaTv-c	10,0 ±0,7^{d,e,g,h}
CuTv-c	8,9 ± 0,1^{i}
Tv	9,0 ± 0,8^{j}
Kontrola	7,0 ± 0,9$^{b,c,f,h-j}$

Ca – alginat mikrosfere sa Ca^{2+}; Cu – alginat mikrosfere sa Cu^{2+}; CaTv – alginat mikrosfere sa Ca^{2+}i *T. viride*; CuTv – alginat mikrosfere sa Cu^{2+} i *T. viride*; Ca-c – alginat/kitozan mikrokapsule sa Ca^{2+}; Cu-c – alginat/kitozan mikrokapsule sa Cu2+; CaTv-c – alginat/kitozan mikrokapsule sa Ca^{2+} i *T. viride*; CuTv-c – alginat/kitozan mikrokapsule sa Cu^{2+} i *T.viride*; Tv - spore *T. viride*; K – kontrola bez primjene mikrosfera ili mikrokapsula

**Vrijednosti koje u eksponentu imaju ista slova značajno se razlikuju prema posthoc Turkey HSD testu ($p<0,05$)

Omotač s kitozanom djeluje tako da sprječava naglo otpuštanje kalcijevih iona što je sukladno prethodnim *in vitro* istraživanjima provedenim na Zavodu za kemiju Agronomskog fakulteta pa je njihovo usvajanje bilo sporije nego kod uzoraka tretiranih mikrosferama (Jurić i sur., 2019).

Prema nekim istraživanjima, niska koncentracija pH doprinosi sintezi ukupnih flavonoida, pa tako pH okolnog medija značajno utječe na sintezu sekundarnih metabolita biljke (Radić i sur., 2016).

4.7. Antioksidacijska aktivnost

Ahmad i sur., 2016, dokazali su da dodatna opskrba kalcijem povećava antioksidacijsku aktivnost. Prema ABTS testu, najveću antioksidacijsku aktivnost imali su upravo uzorci tretirani kalcijem, među kojima prednjače oni uzorci sa alginat/kitozan mikrokapsulama i sporama T. viride sa relativnim porastom od 63,9% (Tablica 4.8.1).

Kao i kod ukupnih polifenola i flavonoida, spore T. viride imale su značajnu ulogu u povećanju antioksidacijske aktivnosti, pa su samim time ovi čimbenici u korelaciji, što dokazuje da prisutnost *T. viride* u pravim uvjetima uvelike pospješuje sintezu sekundarnih metabolita (Pascale, 2017).

Tablica 4.8.1. Utjecaj biopolimernih mikrokapsula na antioksidacijsku aktvnost prema ABTS testu

Tretman	**Antioksidacijska aktivnost (µmol ET g^{-1}·s.tv.)**
Ca	$18,5 \pm 1,7^{a}$
Cu	$17,3 \pm 1,1$
CaTv	$18,0 \pm 0,7$
CuTv	$18,1 \pm 0,1$
Ca-c	$19,8 \pm 1,9^{b}$
Cu-c	$16,7 \pm 0,1^{c}$
CaTv-c	$22,1 \pm 2,3^{c,d,e}$
CuTv-c	$15,8 \pm 2,7^{d}$
Tv	$19,0 \pm 1,7^{f}$
Kontrola	$13,4 \pm 2,3^{a,b,e,f}$

Ca – alginat mikrosfere sa Ca^{2+}; Cu – alginat mikrosfere sa Cu^{2+}; CaTv – alginat mikrosfere sa Ca^{2+}i *T. viride*; CuTv – alginat mikrosfere sa Cu^{2+} i *T. viride*; Ca-c – alginat/kitozan mikrokapsule sa Ca^{2+}; Cu-c – alginat/kitozan mikrokapsule sa Cu^{2+}; CaTv-c – alginat/kitozan mikrokapsule sa Ca^{2+} i *T. viride*; CuTv-c – alginat/kitozan mikrokapsule sa Cu^{2+} i *T. viride*; Tv - spore *T. viride*; K – kontrola bez primjene mikrosfera ili mikrokapsula

**Vrijednosti koje u eksponentu imaju ista slova značajno se razlikuju prema Turkey HSD testu ($p<0,05$)

5. Zaključak

Inkapsulacija aktivnih sastojaka predstavlja inovativan pristup kojim se stimulira proizvodnja sekundarnih biljnih metabolita s ciljem povećanja nutritivne vrijednosti i kvalitete hrane. Ovim postupkom može se ojačati obrambeni sustav biljke, kao i povećati otpornost na negativne vanjske uvjete.

Prema istraživanjima provedenim na uzorcima salate uzgojenim u hidroponu, možemo zaključiti da primjena biopolimernih čestica nije imala značajan utjecaj na morfološka svojstva kao što su visina i promjer rozete. Nisu utvrđene značajne razlike ni u biomasi, tržnoj masi kao ni u udjelu suhe tvari.

Tretman biopolimernim mikročesticama imao je značajan utjecaj na udio ukupnih klorofila, ukupnih polifenola i flavonoida, kao i na antioksidacijsku aktivnost. Mikrosfere sa kalcijem pokazale su najbolje rezultate bilo da su sa ili bez spora *T. viride*, u odnosu na mikrosfere s bakrom.

Spore *T. viride* nisu značajno povećale udio klorofila, ali su značajno povećale sintezu ukupnih polifenola i flavonoida. To možemo objasniti i pogodnim uvjetima uzgoja u hidroponu koji omogućavaju sporama neometano razmnožavanje.

Temeljem navedenih podataka možemo zaključiti kako je primjerna biopolimernih mikrokapsula siguran put ka povećanju kvalitete salate u smislu njene nutritivne vrijednosti, ali bez značajnog utjecaja na fizikalne parametre i prinos. Iako je primjena dvije ili više aktivnih tvari u mikroinkapsulaciji još uvijek novo i nedovoljno istraženo područje, srodni istraživački radovi i pokusi daju nam nadu kako uz nove metode i tehnologije poljoprivredu čeka svijetla budućnost.

6. Popis literature

1. Ahmad, P. *et al*. Calcium and Potassium Supplementation Enhanced Growth, Osmolyte Secondary Metabolite Production, andEnzymatic Antioxidant Machinery in Cadmium-Exposed Chickpea (Cicer arietinum L.). *Front. Plant Sci.* 7, 513, https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00513 (2016).

2. Ali M.A., Uddain J. Hasan M.R., Tahsin A.K.M.M., Islam M.N. (2017). Growth and yield of lettuce (Lactuca Sativa L.) influenced as nitrogen fertilizer and plant spacing. IOSR Journal of agriculture and veterinary science 10(6): 62-71.

3. Bedek M. (2018). Fizikalno-kemijska karakterizacija i mehanizmi otpuštanja Trichoderma viride spora i kalcijevih iona iz mikrosfera kalcijevog alginata. Rad za Rektorovu nagradu. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet.

4. Brand-Williams Cuvelier, M. E. & Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Sci. Techn.* 28, 25–30 (1995).

5. Fan S. (2013). Factors affecting health-beneficial compounds in lettuce. Master Thessis. McGill University, Montreal; Quebec, Canada.

6. Haramija F. (2019). Primjena biopolimernih kapsula u konvencionalnom uzgoju salate. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet.

7. Harman GE. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology. 2006;96:190–194.

8. Haynes, R. J. Ion Exchange Properties of Roots and Ionic Interactions within the Root Apoplasm: Their Role in Ion Accumulation by Plants. *Bot. Rev.* 46, 75–99 (1980).

9. Heimler, D., Vignolini, P., Arfaioli, P., Isolani, L. & Romani, A. Conventional, organic and biodynamic farming: differences in polyphenol content and antioxidant activity of Batavia lettuce. Journal of the Science of Food and Agriculture 92(3): 551-556.

10. Huang, Y., Sheng, J., Yang, F. & Hu, Q. Effect of enzyme inactivation by microwave and oven heating on preservation quality of green tea. *J. Food Eng.* **78**, 687–692 (2007).

11. Jatoi M.A., Jurić S., Vidrih R., Vinceković M., Vuković M., Jemrić T. (2017). The effects of postharvest application of lecithin to improve storage potential and quality of fresh goji (Lycium barbarum L.) berries. Food Chemistry 230: 241249.

12. Jurić, S., Đermić, E., Topolovec-Pintarić, S., Bedek, M. & Vinceković, M. Physicochemical properties and release characteristics of calcium alginate microspheres loaded with Trichoderma viride spores. *J. Integr. Agr.* 18, 3–16 (2019).

13. Kliebenstein, D. J. Secondary Metabolites and Plant/Environment Interactions: A View through Arabidopsis Thaliana TingedGlasses. *Plant Cell Environ.* 27, 675–684 (2004).

14. Krmpotić J. (2012).Hidroponski uzgoj salate u Luxar AG d.d., Zaprešić. Diplomski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku.

15. Latasa, M. Pigment composition of Heterocapsa sp. and Thalassiosira weissflogii growing in batch cultures under differentirradiances. *Sci. Mar.* 59, 25–37 (1995).

16. Lešić R., Borović J., Buturac I., Ćustić M., Poljak M., Romić D. (2016). Povrćarstvo. Zrinski d.d., Čakovec.

17. Oxley J. (2015). Microencapsulation: Guide to industrial applications. U: Bioencapsulation innovations. Bioencapsulation Research Group. 16-17.

18. Parađiković N. (2009). Opće i specijalno povrćarstvo. Poljoprivredni fakultet Osijek.

19. Pascale, A. *et al*. Trichoderma and its secondary metabolites improve yield and quality of grapes. *Crop Prot.* 92, 176–181 (2017).

20. Persoon CH. Disposita methodica fungorum. Römer's Neues Mag Bot. 1794;1:81–128.

21. Pimpini, F., Giannini, M., & Lazzarin, R. Ortaggi da foglia da taglio in Origine, caratteri botanici, biologia e fisiologia (ed. Tadiotto,A. & Lavezzo, I.) 13–15 (Veneto Agricoltura, 2005). polyphenol content and antioxidant activity of Batavia lettuce. *J. Sci. Food Agr.* 92, 551–556 (2012).

22. Radić, S., Vujčić, V., Glogoški, M. & Radić-Stojković, M. Influence of pH and plant growth regulators on secondary metabolite production and antioxidant activity of Stevia rebaudiana (Bert). *Period. Biol.* 118, 9–19 (2016).

23. Rifai MA. A revision of the genus *Trichoderma*. Mycol Pap. 1969;116:1–56.

24. Samuels GJ. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. Phytopathology. 2006;96:195–206.

25. Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method. Enzymol.* 299, 152–178 (1999).

26. Slamet W., Purbajanti E. D., Darmawati A., Fuskhah E. (2017). Leaf area indeks, chlorophyll, photosynthesis rate of lettuce (Lactuca sativa L.) under N-organic fertilizer. Indian Journal of Agricultural Research 51(4): 365-369

27. Swain, T. Secondary Compounds as Protective Agents. *Annu. Rev. Plant Physi.* 28, 479–501 (1977).tea. *J. Food Eng.* 78, 687–692 (2007).

28. Topolovec-Pintarić S., Vinceković M., Jalšenjak N., Martinko K., Žutić I., Đermić E. (2017). Prototype of tomato biofertilizer: Trichoderma viride and calcium based microcapsules. Proceedings of the 52nd Croatian and 12th International symposium on agriculture 100-104.

29. Usmiati S., Richana N., Mangunwidjaja D., Noor E., Prangdimurti E. (2014). The using of ionic gelation method based on polysaccharides for encapsulating the

macromolecules– a review. International conference on food security and nutrition. 67: 79-84.

30. Vinceković M., Jalšenjak N., Topolovec-Pintarić S., Đermić E., Bujan M., Jurić S. (2016). Encapsulation of biological and chemical agents for plant nutrition and protection: Chitosan/Alginate microcapsules loaded with copper cations and Trichoderma viride. Journal of Agricultural and Food Chemistry 64: 8073-8083.

31. Vinceković M., Jurić S., Đermić E., Topolovec-Pintarić S. (2017). Kinetics and mechanisms of chemical and biological agents release from biopolymeric microcapsules. Journal of Agricultural and Food Chemistry 65: 9608-9617

32. Wallace, A. & Mueller, R. T. Calcium uptake and distribution in plants. *J. Plant Nutr.* 2, 247–256 (1980).

Životopis

Katarina Mamić rođena je 22.12.1990. u Sarajevu. Osnovnoškolsko obrazovanje završava u OŠ Pakoštane,a paralelno i glazbenu školu Biograd n/m. Upisuje opću gimnaziju Juraj Baraković i srednju glazbenu školu Blagoje Bersa u Zadru. Nakon srednjoškolskog obrazovanja upisuje smjer Biljne znanosti na Agronomskom fakultetu u Zagrebu, nakon čega za diplomski smjer izabire Hortikulturu – usmjerenje Povrćarstvo. Studentica je i Medicinskog fakulteta u Splitu na engleskom jeziku. Aktivno se služi engleskim, talijanskim i španjolskim jezikom. U slobodno vrijeme voli boraviti s obitelji i u prirodi, te ima iskustva u radu u obiteljskoj firmi. Educira se u području hibridnih sorti sjemena tvrtke Syngenta.