

Универзитет у Београду
Пољопривредни факултет
Београд-Земун
Датум:

НАСТАВНО - НАУЧНОМ ВЕЋУ ФАКУЛТЕТА

ПРЕДМЕТ: Извештај о оцени урађене докторске дисертације Гордане Д. Јовановић

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета, бр.33/7-4.2. од 30.03.2015., именовани смо у Комисију за оцену и одбрану урађене докторске дисертације под називом „**ИСПИТИВАЊЕ АНТИМИКРОБНИХ ОСОБИНА ХИТОЗАНА НА РАСТ *LISTERIA MONOCYTOGENES* У ПОВРЋУ**“, коју је поднела кандидат мр Гордана Д. Јовановић.

Комисија у саставу: др Анита Клаус, доцент Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Миомир Никшић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Драгослава Радин, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Бранислав Златковић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду и др Вера Катић, редовни професор Факултета Ветеринарске медицине Универзитета у Београду, прегледала је и оценила докторску дисертацију и подноси Већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација Гордане Д. Јовановић, под насловом „**ИСПИТИВАЊЕ АНТИМИКРОБНИХ ОСОБИНА ХИТОЗАНА НА РАСТ *LISTERIA MONOCYTOGENES* У ПОВРЋУ**“, написана је према Упутству за обликовање штампане и електронске верзије докторске дисертације Универзитета у Београду, на 189 нумерисаних страна, у оквиру којих се налази 34 табеле, 34 графика и 10 слика. Поред уводних садржаја (*насловне стране на српском и енглеском језику; стране са списком чланова комисије; стране са апстрактном на српском и енглеском језику; садржај*), докторска дисертација има осам нумерисаних поглавља: 1 – *Увод (1-2. стр.)*; 2 – *Преглед литературе (3 – 58. стр.)*; 3 – *Циљеви (59 – 60. стр.)*; 4 – *Материјал и методе (61 – 68. стр.)*; 5 – *Резултати (69 – 141. стр.)*; 6 – *Дискусија (142 – 153. стр.)*; 7 – *Закључци (154 – 156. стр.)*; 8 – *Литература (157 – 189. стр.)*; докторска дисертација садржи и 9 – *страницу са биографијом кандидата; и скениране попуњене и потписане изјаве дате као Прилог 1, 2, и 3.*

2. ПРИКАЗ И АНАЛИЗА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Кандидат **Гордана Д. Јовановић** је у *Уводу* истакла значај свежег, минимално прерађеног поврћа у прехранбеној индустрији и исхрани. Истакнута је могућност контаминације поврћа различитим патогеним микроорганизмима, од којих је за здравствену безбедност нарочито значајна врста *Listeria monocytogenes*. Истакнута је опасност од појаве обољења изазваних конзумирањем хране која је контаминирана овом бактеријском врстом. Такође, истакнута је могућност контаминације поврћа као последица његовог неадекватног гајења или лоших хигијенско санитарних услова приликом прераде поврћа. Кандидат се у уводу такође осврће на значај погодних метода које се могу користити за очување квалитета и продужење рока трајања свеже сеченог поврћа уз употребу јестивих филмова и омотача на бази хитозана. Кандидат је истакла значај јестивих филмова и омотача на бази хитозана за паковање хране, због њихове могућности да штите производ од контаминације као и да носе различите активне компоненте као што су ензими, антиоксиданси, појачивачи укуса и мириса и др. Такође, кандидат узима у обзир и могућност припреме јестивих филмова и омотача од различитих полимерних материјала као што су протеини и полисахариди.

Кандидат је указала на потребу испитивања могућности примене јестивих филмова на бази хитозана и желатина, са или без додатог етарског уља. Пошто се минимално прерађено, свеже сечено поврће конзумира у свежем стању, без било какве претходне термичке обраде, припрема филмова на бази хитозана може имати значајан утицај на очување његовог квалитета. Такође, употреба јестиве амбалаже представља атрактиван и природан начин паковања свеже сеченог поврћа који има низ предности, јер је реч о биоразградивим, природним и јефтним материјалима. Омотачи и филмови на бази хитозана показују добра баријерна својства и могу спречити развиће микроорганизама у свеже сеченом, минимално прерађеном поврћу. Осим тога могу послужити као носачи различитих етарских уља која такође имају потврђену антимикробну активност. Због могућег утицаја етарских уља и састојака из јестиве амбалаже на храну, кандидат је указала на неопходност испитивања у моделима хране који ће највише одговарати саставу будућег производа у коме ће се ови материјали и примењивати.

У поглављу **Преглед литературе**, које се састоји из више делова, изнети су доступни литературни извори из области која је предмет проучавања ове докторске дисертације. Први део прегледа литературе посвећен је **значају воћа и поврћа у исхрани**. Кандидат наводи литературне податке о биолошкој и хранљивој вредности воћа и поврћа. Истакнут је значај биоактивних компонената из свежег поврћа. Наглашава се податак да недовољан унос воћа и поврћа у исхрани представља фактор ризика за настанак хроничних болести као што су рак, коронарне болести и мождани удар. Наводи се да је неопходно да дневни оброк обухвата 400 -500g разноврсног свежег поврћа. У овом делу су представљене основне карактеристике, хемијски састав и значај повртарских врста као

што су купус, ротква и шаргарепа. Истакнут је значај употребе ових врста поврћа у исхрани у циљу превенције различитих обољења.

У следећем подпоглављу, описује се **поврће као извор микроорганизама**. Кандидат је изложила литературне податке о најчешћим узроцима који доводе до контаминације поврћа у току узгоја или прераде. Наглашава се податак да најчешће присутни микроорганизми на свежем поврћу који се могу пренети и до потрошача, обухватају врсте *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* i *Salmonella* spp.

Истакнути су примери епидемија листериоза који су регистровани последњих неколико година а који су настали као последица конзумирања свежег поврћа које је било контаминирано врстом *Listeria monocytogenes*. Изнети су подаци о мишљењу самих потрошача да конзумирање свежег поврћа носи знатан ризик од настанка обољења која изазивају патогени микроорганизми. Наводи се податак да су последњих година учестале епидемије изазване конзумирањем свежег поврћа, пре свега због измењених навика потрошача који су постали свесни значаја свежег поврћа у исхрани, па услед тога конзумирају веће количине поврћа.

У подпоглављу **свеже сечено, минимално прерађено воће и поврће**, кандидат објашњава хипотезе дисертације. Изложени су литературни подаци о минимално прерађеном поврћу осврћући се на његову прву појаву на тржишту, доступност и на индустријски и економски значај производње овог производа. Објашњено је да минимално прерађено поврће представља ољуштене и уситњене плодове поврћа који су одмах спремни за употребу, без било каквог предходног термичког третмана. Истакнуто је да већина потрошача даје предност овим производима у односу на конзервисане производе од поврћа. Услед оштећења ткива која настају као последица прераде и производње минимално прерађеног поврћа, кандидат наглашава да су ови производи веома подложни пропадању. Истакнути су различити типови кварења који се уочавају код ових производа а који најчешће подразумевају ензиматско потамњивање и повећање броја микроорганизама. Наглашено је да се за очување квалитета код ових производа примењују различити поступци, од којих су најчешће у употреби ниске температуре које спречавају развој већег броја микроорганизама. Кандидат се такође осврће на способност врсте *Listeria monocytogenes* да се несметано развија на ниским температурама. Зато је наглашена неопходност примене других погодних поступка за очување квалитета свеже сеченог, минимално прерађеног поврћа, који би ефикасно спречили појаву ових бактерија у прехранбеним производима.

У делу **јестива амбалажа**, кандидат износи литературне податке о значају јестиве амбалаже и њиховој могућој примени у прехранбеној и фармацеутској индустрији. Кандидат наглашава чињеницу да се јестива амбалажа може примењивати у облику јестивих омотача или филмова. Истакнуто је да се омотачи формирају на самој храни, тако што се течни раствори наносе директно на површину хране и на њој полимеризују стварајући пријањајући омотач, док се филмови формирају одвојено од хране и са њом

долазе у контакт као већ формирани полимери. Наглашена је предност јестиве амбалаже за очување квалитета свежег поврћа на тржишту, а огледа се у њиховој способности да делују као баријера за размену гасова, спречавају упијање или отпуштање влаге, контролишу раст микроорганизама, чувају боју, влажност и текстуру производа или могу бити носачи различитих биоактивних састојака – ензима, антимикуробних једињења и антиоксиданаса. Осим тога, јестиви омотачи се могу конзумирати заједно са храном, чиме се значајно смањује појава отпада и проблем загађења животне средине. Кандидат износи податке о бројним полимерним материјалима који се могу користити за припрему јестиве амбалаже. Истакнута је употреба полисахарида, протеина, липида и различитих прехранбених адитива у изради јестивих омотача и филмова. Кандидат наглашава чињеницу да чак 74,9% потрошача користи у исхрани плодове поврћа који су заштићени јестивим филмовима, док мали број потрошача ипак сматра да пре конзумирања плодова треба уклонити заштитне филмове. Истакнуте су бројне механичке и антимикуробне особине јестиве амбалаже, с обзиром на врсту маретијала од кога су припремљени као и њихову способност да делују као баријера за микроорганизме, гасове и влагу.

У делу који се односи на **филмове на бази желатина**, изнети су подаци о добијању желатина као и основна филмогена својства која су битна за формирање јестивих филмова. Истакнути су примери примене желатина у изради композитних филмова који су припремљени комбинацијом желатина и других материја као што су протеини уљане репице, протеини сурутке или различита антимикуробна средства.

У подпоглављу **филмови на бази хитозана**, кандидат износи податке о добијању хитозана из љуштурса ракова, које заостају као нејестиви отпадни материјал приликом индустријске прераде морске хране. Објашњена је структура хитозана, као и његове особине. Изнети су подаци о употреби хитозана у прехранбеној, фармацеутској и текстилној индустрији али и у медицини. Истакнуто је да хитозан може да се користи за чишћење организма од токсина и штетних материја, за регулацију холестерола и крвног притиска, за убрзано зарастање рана и опекотинакао и у третману отпадних вода. Изнет је податак да је хитозан као адитив у храни одобрен у Јапану још од 1983. године.

У подпоглављу **антимикуробна активност хитозана**, кандидат објашњава хипотезе дисертације. Изнети су подаци о могућности хитозана да у облику филмова или омотача спрече развој различитих врста бактерија и плесни. Објашњено је да антимикуробна активност хитозана може да зависи од већег броја чинилаца као што су молекулска маса, степен деацетиловања, рН вредност, температура и др. Објашњено је да су до сада рађена бројна истраживања на великом броју различитих прехранбених производа (говеђе месо, кобасице, риба, сир, јагоде, манго, паприка, авокадо, грожђе итд.) где је утврђено да омотачи или филмови на бази хитозана инхибирају развиће микроорганизама и обезбеђују продужен рок трајања. Осим тога, хитозан је комбинован са различитим додатним материјама (киселине, конзерванси, ензими, етарска уља итд.) како би се побољшала његова антимикуробна својства. Кандидат на основу литературних података објашњава да је до сада рађен велики број истраживања антимикуробних активности хитозана, али нису

рађена испитивања о могућности примене филмова на бази хитозана и желатина са додатком етарских уља у циљу спречавања појаве *Listeria monocytogenes* у свеже сеченој, минимално прерађеној роткви, шаргарепи и купусу. Предпоставка је да ће овакви филмови имати различито изражену активност, с обзиром на употребљену концентрацију хитозана, врсту етарског уља као и врсту поврћа за коју се примењују.

У делу **филмови на бази протеина и полисахарида**, кандидат представља различите композитне филмове који су добијени комбиновањем протеина и пектина, скроба, хитозана или целулозе а који могу наћи примену у паковању прехранбених производа.

У подпоглављу *Listeria monocytogenes*, кандидат представља ову бактеријску врсту. Наводећи литературне податке, објашњене су морфолошке и физиолошке карактеристике ове бактеријске врсте. Такође, објашњена је изолација и идентификација *Listeria monocytogenes* уз употребу различитих бактериолошких подлога.

У следећем подпоглављу описује се **распрострањеност *Listeria monocytogenes*** у природи. Кандидат је изложила литературне податке о распрострањености ове бактеријске врсте у природи, у различитим врстама сирове и прерађене хране као и у прерађивачким погонима. Нарочито се истиче податак да свеже поврће као што су купус, зелена салата, и целер могу бити контаминирани овом врстом бактерија.

У делу који се односи на **патогеност *Listeria monocytogenes*** кандидат се осврнула на појаву листериоза, обољења која настају услед конзумирања хране која је контаминирана овом бактеријском врстом. Истакнути су подаци који се односе на регистроване случајеве листериозе у свету као и на врсту хране која је евидентирана као узрочник овог обољења. Нарочито су истакнути подаци који указују на смртни исход листериоза. Објашњени су општи и специфични симптоми обољења, као и ризичне групе становништва које најчешће обољевају. Због изузетног значаја наглашава се податак да мале количине *Listeria monocytogenes* (< 100 CFU/g) имају веома малу могућност да изазову појаву овог обољења, чак и код ризичне групе потрошача.

У следећем подпоглављу изнети су литературни подаци о различитим чиниоцима који могу утицати на развиће ових бактерија у храни као што су температура, рН и a_w вредност.

У делу који објашњава **утицај етарских уља на раст *Listeria monocytogenes*** кандидат је изложила литературне податке о антимикуробној и антиоксидативној активности етарских уља, осврћући се на њихову распрострањеност у различитим деловима биљака. Затим, представљене су најзначајније физичке и хемијске особине етарских уља. Наглашена је разлика у антимикуробној активности етарских уља с обзиром на врсту, хемијски састав и присуство одређених фенолних материја. Истакнут је комерцијални значај етарских уља која се примењују као природни конзерванси који при том могу значајно допринети и корекцији укуса и мириса. Осим тога, истакнути су подаци који се односе на медицинску примену етарских уља у спречавању кардиоваскуларних обољења, атеросклерозе, холестерола, тромбозе и неких облика рака. Међу компонентама

етарских уља која показују активност у сузбијању различитих типова рака нарочито су истакнути α -бисаболол из камилице, гераниол, d- лимонен из коре цитруса као и диалил сулфид из етарског уља белог лука.

У трећем поглављу – **Циљеви**, кандидат истиче да се минимално прерађено, свеже сечено поврће конзумира у свежем стању, без било какве претходне термичке обраде, због чега се намеће потреба развијања природних поступака за постизање одговарајуће безбедности ових производа. Имајући у виду да омотачи и филмови хитозана имају потенцијалну могућност примене у постизању здравствене безбедности хране, циљеви дисертације су били: 1. Продукција јестивих омотача и композитних филмова хитозана и желатина, са или без додатка етарских уља која су показала најизраженије дејство на раст сојева *Listeria monocytogenes* ATCC 19112 и *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, 2. Проучавање антимикуробне активности припремљених омотача и филмова на различитим врстама свеже сеченог, минимално прерађеног поврћа (ротква, шаргарепа, купус), 3. Праћење промена рН вредности и садржаја суве материје у поврћу које је складиштено у присуству композитних филмова хитозана, 4. Обављање сензорне анализе у циљу испитивања мишљења потрошача о прихватљивости минимално прерађеног поврћа које је третирано одговарајућим филмовима хитозана.

У четвртном поглављу – **Материјал и методе**, кандидат објашњава десет коришћених метода у изради дисертације.

За испитивање су коришћени сојеви бактерија *Listeria monocytogenes* ATCC 19112 и *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, из колекције Катедре за технолошку микробиологију Пољопривредног факултета Универзитета у Београду. За припрему инокулума коришћене су бактеријске културе одгајене на површини Mueller-Hinton агара у току 18 часова, на температури од 37°C. Пет добро изолованих колонија сваке бактеријске културе је пренето стерилном бактериолошком петљом у 10 ml физиолошког раствора. Припремљен инокулум додат је у количини од 1 ml на 100 g припремљеног поврћа тако да је добијен почетни број популације од 10^4 – 10^5 cfu/g.

За **одређивање антимикуробне активности етарских уља и њихових различитих мешавина**, коришћена су комерцијално доступна етарска уља тимијана, менте, босиљка, ловора, першуна, каранфилића и рузмарина (*Herba doo*, Србија). Коришћена је стандардна диск дифузиона метода (CLSI, 2006). Као контролни сој коришћена је *Escherichia coli* ATCC 25922. Основна подлога за одређивање осетљивости испитиваних бактеријских култура је Mueller-Hinton агар (HiMedia, Mumbai, India).

Запраћење раста испитиваних бактеријских сојева у свеже сеченом поврћу и њиховим мешавинама припремљено је поврће (купус, шаргарепа и ротква) и неколико врста њихових мешавина, са различитим односом поврћа (25:75; 50:50 и 75:25). Поврће је инокулисано одговарајућим бактеријским сојевима и чувано у фрижидеру на температури од 4°C током 6 дана. На сваких 24h праћен је пораст или инхибиција сваког бактеријског соја, у односу на контролу (само једна врста поврћа). За сваки сој и за сваку испитивану комбинацију поврћа, рађена су три понављања.

За испитивање антимикробне активности хитозана, коришћен је хитозан (Sigma Aldrich, Germany) средње молекулске масе 190,000-310,000 Da и степена деацетиловања 75-85%. PALCAM агар (HiMedia, Mumbai, India) је коришћен као основни материјал за одређивање бројности испитиваних бактеријских култура.

Припрема и утврђивање антимикробних својстава јестивих омотача на бази хитозана подразумевала је растварање хитозана у 1 % сирћетној или 1 % млечној киселини. Добијени омотачи са различитим концентрацијама хитозана (0,25%; 0,5 и 1%) додати су у припремљено поврће, које је инокулисано одговарајућим бактеријским сојевима. Поврће је чувано у фрижидеру на температури од 4°C током 6 дана. Праћен је пораст или инхибиција сваког бактеријског соја, у односу на контролу (поврће које није третирано хитозаном). За сваки сој рађена су три понављања.

Припрема и утврђивање антимикробних својстава јестивих филмова на бази хитозана подразумевала је растварање хитозана у 1% раствору сирћетне киселине. Раствор 6% желатина припремљен је растварањем желатина у 1% сирћетној киселини, уз мешање на воденом купатилу на 45°C. Раствори желатина и хитозана су помешани у односу 1:1, тако да је добијено укупно 25 ml раствора, Концентрације хитозана у филмовима су износиле 0,5%, 1% и 2%. Једна половина припремљеног раствора је изливена у поклопац, а друга половина на дно Петри шоље. Филмови са додатком етарских уља су припремљени на исти начин, с тим што је за њихову припрему употребљено и етарско уље менте или тимијана у концентрацији од 0,1 и 0,2%. За емулговање етарских уља, сваком филму је додат диметилсулфоксид, у истим концентрацијама као и употребљена етарска уља. Припремљене Петри шоље са филмовима хитозана су чуване до употребе на температури од 4°C. Након прања и резања, поврће је инокулисано одговарајућим бактеријским сојевима и упаковано у количини од 40 g у Петри шоље са припремљеним филмовима. Поврће је чувано у фрижидеру на температури од 4°C током 6 дана. Праћен је пораст или инхибиција сваког бактеријског соја, у односу на контролу (поврће које није третирано хитозаном). За сваки сој и за сваку испитивану концентрацију хитозана, вршена су три понављања.

За **праћење раста испитиваних бактеријских сојева у комерцијалном мајонезу са додатком хитозана** коришћен је инокулисан мајонез у који су додате различите концентрације хитозана (0,25% и 0,5%). Узорци мајонеза су чувани у фрижидеру на температури од 4°C током 6 дана. Праћена је инхибиција сваког бактеријског соја, у односу на контролу (мајонез без додатог хитозана). За сваки сој и за сваку испитивану концентрацију хитозана, вршена су три понављања.

Садржај укупне растворљиве суве материје у поврћу одређен је рефрактометријском методом. Узорци поврћа су чувани у фрижидеру на температури од 4°C током 5 дана. Праћена је промена садржаја шећера у узорцима поврћа који су чувани у присуству филмова хитозана, у односу на контролу (поврће без додатог хитозана). Резултат је изражен у %. Сва мерења су рађена у три понављања.

pH вредност поврћа одређена је рН-метром, у соку који је оцеђен из 40g поврћа. Узорци поврћа су чувани у фрижидеру на температури од 4°C током 5 дана. Праћена је промена рН вредности у узорцима поврћа који су чувани у присуству филмова хитозана, у односу на контролу (поврће без додатог хитозана). Сва мерења су рађена у три понављања.

Сензорна анализа обухватила је оцењивање свежине, боје, укуса и мириса поврћа. За оцењивање је коришћен бод систем дескриптивних тестова са скалом од 1 до 9, где је свака оцена представљала одређени ниво квалитета. Најнижа оцена 1 представљала је производе са видљивим недостацима, оцена 5 производе који су једнаки контроли а оцена 9 представљала је производе изузетног квалитета. Сензорну анализу обавила је петочлана комисија, обучених оцењивача, различитих година. Узорци поврћа чувани су на 4°C, током 5 дана. Узорци поврћа (40g), изнети су појединачно пред оцењиваче, у стакленим Петри посудама. Сваки узорак био је појединачно упакован у ПВЦ врећице и обележен одговарајућим бројевима. Резултати сензорне анализе изражени су као средња вредност сензорних оцена квалитета поврћа

Статистичка анализа података је такође урађена. Сви подаци су представљени као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка. Студентов т тест са 5% вероватноће коришћен је за поређење броја бактерија између контролног узорка поврћа и узорака који су третирани одговарајућим омотачима или филмовима на бази хитозана. Корелациони коефицијент, r , одређен је за различите сојеве бактерија који су третирани хитозаном. За статистичку анализу коришћен је програм MS Excel (Microsoft Office 2007 Professional).

Поглавље **Резултати и дискусија** представља најважнији део докторске дисертације и састоји се од 8 подпоглавља. Кандидат је у овом поглављу на прегледан начин, кроз графиконе и табеле приказала резултате истраживања и вршила и њихово поређење са резултатима других аутора који су радили на истој или сличној проблематици.

У подпоглављу **антимикробна активност етарских уља** мерен је пречник зона инхибиције које се јављају око папирних дискова, на које је нането 10 μ л одговарајућег етарског уља. Етарско уље тимијана испољило је најснажнију антимикробну активност на оба бактеријска соја. Осим тога, етарска уља менте и босиљка показала су снажну антимикробну активност. Најслабији утицај на раст испитиваних сојева *Listeria monocytogenes* испољило је етарско уље першуна. Одређивањем ефикасности мешавина различитих етарских уља, највећи проценат повећања зона инхибиције остварен је за мешавину тимијан-босиљак за сој *L. monocytogenes* ATCC 19112. За исти сој је мешавина тимијан-ловор испољила 93,5% јачу антимикробну активност у односу на чисто уље босиљка. Код *L. monocytogenes* ATCC 19115, највећи проценат повећања зона инхибиције постигнут је са мешавином тимијан-каранфилић (60,3%) у односу на чисто етарско уље каранфилића.

Способност раста сојева *L. monocytogenes* на поврћу мерена је на основу бројности бактеријских популација у различитим врстама поврћа као што су купус, шаргарепа, ротква као и њихове различите мешавине. Снажно инхибиторно дејство примећено је код оба бактеријска соја у присуству роткве и свих мешавина у којима је било додато ово поврће. Потпуна инхибиција почетног броја *L. monocytogenes* ATCC 19115 остварена је након 96 h, док је за *L. monocytogenes* ATCC 19112 потпуна инхибиција остварена након 120h. Доказана је позитивна корелација ($r = 0.95$) за раст испитиваних сојева на свеже сеченој роткви. Осим тога, и шаргарепа је испољила инхибиторни ефекат на раст испитиваних бактеријских сојева. Купус се показао као изузетно повољан супстрат за раст ових бактерија. Уочено повећање почетног броја *L. monocytogenes* ATCC 19115 у току 6 дана, на температури од 4°C, износило је 1,9 \log_{10} CFU/g док је код *L. monocytogenes* ATCC 19112 повећање почетног броја износило 3,1 \log_{10} CFU/g. Доказана је позитивна корелација ($r = 0.99$) за раст испитиваних сојева на купусу. Статистичком анализом, утврђено је постојање значајне разлике између узорака купуса и свих мешавина које су садржале шаргарепу.

Испитивана је **способност раста *L. monocytogenes* у поврћу у присуству омотача хитозана** који су припремљени у концентрацијама од 0,25%; 0,5% и 1%. За припрему омотача употребљене су сирћетна или млечна киселина. Утврђена је статистички значајна разлика између свих употребљених концентрација омотача хитозана и контролних узорака поврћа. Просечан број испитиваних бактеријских врста није се могао детектовати ни у једном узорку роткве који је третиран омотачима хитозана, већ након 24h. Доказана је позитивна корелација ($r = 0.98$) за раст испитиваних сојева на роткви у присуству сирћетне киселине односно позитивна корелација ($r = 0.99$) за раст испитиваних сојева на роткви у присуству млечне киселине. Изложеност испитиваних сојева омотачима хитозана у шаргарепи омогућило је брзу инхибицију микроорганизама већ након 24h чувања поврћа. Међутим, код нижих концентрација употребљеног хитозана уочава се пораст просечног броја испитиваних бактеријских популација, након 96h складиштења. Утврђено је да једино 1% омотачи хитозана могу допринети потпуној инхибицији тестираних бактерија у шаргарепи, током испитиваног времена. Омотачи 1% хитозана припремљени са сирћетном киселином, у купусу изазивају инхибицију почетног бактеријског соја *L. monocytogenes* ATCC 19115 од 3 \log_{10} CFU/g, односно соја *L. monocytogenes* ATCC 19112 од 2,8 \log_{10} CFU/g. И у овом случају, код *L. monocytogenes* ATCC 19115 уочава се пораст након 96h а код врсте *L. monocytogenes* ATCC 19112 након 120 h. Добијени резултати свакако потврђују да се код купуса, не може постићи потпуна инхибиција испитиваних бактеријских сојева, чак на са највећим употребљеним концентрацијама хитозана.

Антимикробна активност омотача хитозана зависи од примењене концентрације хитозана, врсте киселине која је употребљена за припрему омотача као и од врсте поврћа у коме се примењује.

Способност раста сојева *L. monocytogenes* у поврћу у присуству композитних филмова хитозана и желатина са додатком етарских уља утврђена је употребом 0,5%;

1% и 2% филмова хитозана. Одабир етарских уља извршен је на основу добијених резултата о антимикробној активности етарских уља. Филмови су примењени на свеже сеченом купусу, роткви и шаргарепи. 1. Код свеже сечене роткве утврђена је статистички значајна разлика између узорака који су складиштени у присуству 0,5% филма хитозана и контроле. Међутим, примећено је да између 0,5% филма хитозана и самог желатина постоји мала разлика у антимикробној активности. Добијени резултати потврђују да 0,5% филмови хитозана имају слабо изражену антимикробну активност, у свеже сеченој роткви. Додатак етарских уља скраћује време одумирања испитиваних бактеријских сојева на свеже сеченој роткви за 24h, у поређењу са самим филмом хитозана. Утврђена је статистички значајна разлика између 0,5% филма хитозана и свих филмова са додатком етарских уља менте и тимијана. Доказана је позитивна корелација ($r = 0.98$) између испитиваних сојева у присуству 0,5% филма хитозана на роткви.

2. Утврђена је статистички значајна разлика између узорака роткве који су складиштени у присуству 1% филма хитозана и контроле. Такође је утврђена значајна разлика у бројности бактеријских популација између 1% филмова хитозана и филма желатина. Добијени резултати потврђују да 1% филмови хитозана имају јаче изражену антимикробну активност у свеже сеченој роткви, од 0,5% филмова. Утврђена је статистички значајна разлика између свих филмова 1% хитозана и филмова са додатком етарских уља менте и тимијана. Доказана је позитивна корелација ($r = 0.98$) између испитиваних сојева у присуству 1% филма хитозана на свеже сеченој роткви.

3. Код шаргарепе која је складиштена у присуству филмова 0,5% хитозана, утврђена је статистички значајна разлика у бројности обе популације бактерија, између свих узорака који су складиштени у присуству хитозана и контроле. Потпуна инхибиција соја *L. monocytogenes* ATCC 19112, у присуству 0,5% хитозана постигнута је за 144h, док је код соја *L. monocytogenes* ATCC 19115, исти ефекат постигнут за време од 120h. Утврђена је разлика у бројности бактеријских популација мања од $1 \log_{10}$ CFU/g за првих 24h, између узорака хитозана и желатина. Најснажнију активност испољио је филм са додатком 0,2% етарског уља тимијана. Утврђено је да се са овом формулацијом филма укупна инхибиција оба соја постиже након 72 h.

4. Применом 1% филмова хитозана у шаргарепи утврђена је значајна разлика између свих узорака који су чувани у присуству 1% хитозана и контроле. Потпуна инхибиција соја *L. monocytogenes* ATCC 19112, у присуству 1% хитозана постигнута је за 120h, док је код соја *L. monocytogenes* ATCC 19115 исти ефекат постигнут за време од 96h. Између узорака хитозана и желатина, утврђена је разлика у бројности испитиваних сојева већа од $1 \log_{10}$ CFU/g за првих 24h. Добијени резултати потврђују да је антимикробна активност 1% хитозана израженија од 0,5% хитозана. Доказана је позитивна корелација ($r = 0.98$) између испитиваних сојева у присуству 1% филма хитозана у шаргарепи.

5. Филмови 2% хитозана омогућили су статистички значајну разлику у смањењу бројности испитиваних бактеријских популација у шаргарепи. Међутим, разлика у бројности популација између узорака чуваних у присуству желатина и 2% хитозана за

првих 24h није била статистички значајна. Утврђено је да са продужетком времена чувања шаргарепе, смањење бактеријске популације у узорцима желатина је веће од смањења које је остварено са 2% хитозаном. Добијени резултати потврђују да филмови 2% хитозан имају слабије изражену антимикуробну активност од филмова 1% хитозана. Доказана је позитивна корелација ($r = 0.98$) између испитиваних сојева у присуству 2% филма хитозана у шаргарепи.

6. Применом 0,5% филмова хитозана у свеже сеченом купусу утврђена је значајна разлика између свих узорака који су чувани у присуству хитозана и контроле. Потпуна инхибиција *L. monocytogenes* АТСС 19115 у присуству 0,5% филмова хитозана постигнута је за 120h, док потпуна инхибиција соја *L. monocytogenes* АТСС 19112, није постигнута у току испитивања. Код оба бактеријска соја, утврђено је да на купусу 0.5% хитозан филм испољава слабу антимикуробну активност јер је остварена инхибиција била мања од вредности које су добијене са самим филмом желатина. Доказана је позитивна корелација ($r = 0.96$) између испитиваних сојева у присуству 0,5% филма хитозана у купусу.

7. Филмови 1% хитозана омогућили су статистички значајну разлику у смањењу бројности испитиваних бактеријских популација у купусу. Такође, разлика у бројности популација између узорака чуваних у присуству желатина и 1% хитозана била је статистички значајна. Добијени резултати потврђују да је антимикуробна активност 1% хитозана израженија од 0,5% хитозана. Потпуна инхибиција *L. monocytogenes* АТСС 19115 у присуству 0,5% филмова хитозана постигнута је за 96h, док је код *L. monocytogenes* АТСС 19112 потпуна инхибиција бактерија у купусу постигнута за 144h. Утврђено је да додаток етарског уља тимијана у филмове хитозана значајно доприноси бржем одумирању испитиваних сојева у купусу. Доказана је позитивна корелација ($r = 0.94$) између испитиваних сојева у присуству 1% филма хитозана у купусу.

8. Применом 2% филмова хитозана у свеже сеченом купусу утврђена је значајна разлика између свих узорака који су чувани у присуству хитозана и контроле. Потпуна инхибиција оба бактеријска соја у присуству 2% филмова хитозана постигнута је за 144h. Доказана је позитивна корелација ($r = 0.99$) између испитиваних сојева у присуству 2% филма хитозана у купусу. Утврђено је да постоји значајна разлика у бројности популација између узорака чуваних у присуству желатина и 2% хитозана, при чему је желатин припремљен са сирћетном киселином испољио јачу инхибиторну активност. Добијени резултати потврђују да је антимикуробна активност хитозана условљена његовим вискозитетом и да зависи од способности сирћетне киселине да дифундује кроз филм.

Опстанак сојева *L. monocytogenes* у мајонезу са додатком хитозана испитан је с обзиром на то да се мајонез често користи у припреми различитих салата.

Добијени резултати потврђују да обе употребљене концентрације хитозана значајно утичу на смањење просечног броја испитиваних бактерија у поређењу са контролом (мајонез). Такође је доказана позитивна корелација ($r = 0.99$) за раст испитиваних сојева у мајонезу у присуству хитозана.

Урађено је *испитивање промене рН вредности поврћа* које је складиштено у присуству филмова хитозана. Утврђена рН вредност поврћа, одређена рН метром, била је у распону од 6,4 до 6,7. Добијени резултати показују да филмови хитозана значајно утичу на смањење рН вредности поврћа, у поређењу са контролом. Утврђено је укупно смањење рН вредности роткве од 28,2% у односу на почетну вредност код узорака који су складиштени у присуству 0,5% филма. Код 1% и 2% филмова утврђена је укупна промена рН вредности роткве од 26,9% односно 23,4% у односу на почетну вредност. Укупна промена рН вредности шаргарепе која је складиштена у присуству 1% и 2% филмова утврђена је укупна промена рН вредности шаргарепе од 26,9% односно 23,9% у односу на почетну вредност. Највеће смањење рН вредности утврђено је код узорака купуса. Укупна промена рН вредности купуса који је складиштен у присуству 0,5% филма износила је 28,4%, док је за 2% филмова утврђена укупна промена рН вредности од 23,9% у односу на почетну вредност. Добијени резултати потврђују да филмови хитозана значајно утичу на промене рН вредности поврћа. Утврђене промене зависе од концентрације употребљеног хитозана и врсте поврћа.

Утицај филмова хитозана на садржај суве материје поврћа, изражен у % урађен је рефрактометријском методом. Утврђени садржај шећера у свежем поврћу износио је од 6,9 до 8,8%. У свим узорцима поврћа који су чувани у присуству филмова хитозана, утврђено је смањење садржаја суве материје. Утврђена је највећа промена суве материје (43,5%) у узорцима купуса који су чувани у присуству 0,5% филма хитозана, у односу на почетни садржај суве материје. Није утврђена статистички значајна разлика између узорака који су чувани у присуству различитих концентрација хитозана. Присутни филмови хитозана су значајно утицали на промену суве материје у свим врстама поврћа.

Сензорна оцена минимално прерађеног, свеже сеченог поврћа обухватила је оцену укуса, мириса, боје и конзистенције. Укупна промена боје била је најизраженија код купуса док код шаргарепе у току испитивања није уочена значајна промена. Утврђено је да мирис поврћа одговара карактеристикама употребљене врсте поврћа, код свих узорака који су складиштени у присуству филмова хитозана. Додато етарско уље менте омогућило је побољшање мириса и укуса поврћа. Нарочито су високе вредности оцена добили узорци купуса и шаргарепе који су чувани у присуству филмова хитозана са додатком етарског уља менте. Додатак етарског уља тимијана оцењен је најнижим оценама по питању укуса и мириса. Утврђено је да су сви узорци поврћа који су чувани у присуству филмова са додатим етарским уљем тимијана, потпуно неприхватљиви за оцењиваче. Код свих узорака купуса који су складиштени у присуству хитозана, утврђена је значајна промена конзистенције. Код роткве и шаргарепе нису утврђене промене конзистенције.

У поглављу *Закључци* кандидат је у кратким тезама изнела најрелевантније чињенице до којих је дошла на основу својих истраживања. На основу добијених резултата кандидаткиња је извела закључке којима су остварени циљеви и потврђене хипотезе докторске дисертације.

Закључено је да све испитиване врсте етарских уља испољавају антимикуробну активност на оба испитивана бактеријска соја. Најснажније дејство показало је етарско уље тимијана, док је најслабију активност испољило уље першуна. Доказано је да се додатком других етарских уља значајно смањује антимикуробна активност етарског уља тимијана.

Статистичком анализом, утврђено је постојање значајне разлике између испитиваних бактеријских сојева по питању њихових карактеристика пораста на различитим врстама поврћа. Купус је био веома погодна средина за развиће испитиваних бактеријских сојева, док шаргарепа и ротква испољавају инхибиторно дејство. Сама ротква има најснажнију инхибиторну активност изазивајући потпуну инхибицију соја *L. monocytogenes* ATCC 19115 за четири дана, док је код соја *L. monocytogenes* ATCC 19112 инхибиција постигнута за пет дана.

Код испитивања антимикуробних особина омотача хитозана, доказано је да успешност примене омотача хитозана зависи од концентрације хитозана, врсте поврћа и употребљене киселине. Код свеже сечене роткве сви употребљени омотачи су ефикасно инхибирани бактеријске сојеве у току 5 дана складиштења док код свеже сеченог купуса омотачи хитозана нису били ефикасни.

Такође је закључено да све примењене формулације филмова хитозана имају изражену антимикуробну активност која расте са повећањем концентрације хитозана. Утврђено је да постоји статистички значајна разлика између свих филмова хитозана и контролног узорка (нетретирано поврће). Међутим, добијени резултати су показали да 2% филмови хитозана имају слабију активност од 1% филмова. Овим је потврђено да вискозитет филмова може значајно да утиче на антимикуробну активност хитозана у поврћу.

Доказано је да присуство етарских уља у филмовима хитозана значајно утиче на антимикуробне особине филмова. Најизраженију активност показали су филмови са 0,2% етарским уљем тимијана. Додавањем тимијана у концентрацији од 0,2% значајно се скраћује време одумирања испитиваних бактеријских сојева у поврћу, у поређењу са самим филмом хитозана. Такође, утврђено је да постоји статистички значајна разлика између свих филмова хитозана који су припремљени са додатком етарских уља и самог филма хитозана.

Добијени резултати су показали да додаток хитозана мајонезу, спречава развој *Listeria monocytogenes* и значајно повећа његову микробиолошку стабилност, у временском периоду од 5 дана. Такође је закључено да би примена мајонеза са додатком хитозана, као додатка минимално прерађеном, свеже сеченом поврћу, значајно утицала на продужење времена његовог безбедног коришћења.

Добијени резултати потврђују да се применом филмова хитозана значајно утиче и на промену рН вредности поврћа. Највећа промена утврђена је након првих 24 h, у узорцима купуса који су чувани у присуству 0,5% хитозана. Најмање промене рН вредности утврђене су код свих узорака поврћа који су чувани у присуству 2% хитозана.

Такође је закључено да чување поврћа у присуству филмова хитозана може утицати на сензорне карактеристике производа. Утврђено је да укупна промена сензорних карактеристика поврћа зависи од врсте поврћа, употребљене концентracије хитозана и етарских уља. Добијени резултати указују на то да је најмање одступање боје код узорака шаргарепе док је код купуса укупна промена боје знатно одступала од свеже припремљеног узорка.

Утврђено је за све врсте поврћа, да филмови са етарским уљем тимијана утичу на значајне промене сензорних својстава (укус и мирис), услед чега су ови производи били потпуно неприхватљиви за оцењиваче. Код примене етарског уља менте, постигнуте су боље сензорне карактеристике, услед чега су овакви производи били радо прихваћени од стране оцењивача. Доказано је да и сами филмови у концентрацији од 0,5 и 1% хитозана побољшавају сензорна својства свеже сеченог, минимално прерађеног поврћа.

Генерално је закључено да филмови хитозана доприносе постизању здравствене исправности свеже сеченог поврћа. Поред спречавања појаве *L. monocytogenes* у поврћу, филмови хитозана могу побољшати органолептичка својства минимално прерађеног, свеже сеченог поврћа.

У поглављу *Литература*, наведено је 342 референце које представљају избор најзначајнијих радова објављених у овој области. Цитиране референце обухватају широк спектар извора литературе што указује на темељно проучену проблематику од стране кандидата. Избор литературних извора је актуелан, а цитирање је изведено на правилан начин.

3. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Докторска дисертација *мр. Гордане Јовановић* представља самостални научни рад у области могућности примене омотача и филмова хитозана за очување квалитета минимално прерађеног поврћа. Докторанткиња је систематски проучила резултате истраживања других аутора, дефинисала предмет и програм испитивања, поставила циљ, основне хипотезе, прикупила податке, применила адекватне математичко–статистичке методе за анализу и процену добијених резултата.

Резултати целокупног истраживања указују на то да јестиви филмови и омотачи на бази хитозана значајно доприносе хигијенској исправности свеже сеченог, минимално прерађеног поврћа. Добијени резултати указују на то да антимикуробна активност омотача зависи од употребљене концентрације хитозана као и од врсте органске киселине која је употребљена за припрему омотача. Према резултатима експеримената, изражену антимикуробну активност имају и филмови хитозана код којих је такође уочено да веће концентрације хитозана испољавају ефикаснију инхибицију *Listeria monocytogenes*. Међутим, добијени резултати указују на то да високе концентрације хитозана утичу на изражену вискозност хитозана и смањење његове антимикуробне активности.

Осим тога, врста поврћа и њен хемијски састав значајно утичу на ефикасност примене филмова хитозана. Најслабија инхибиција бактеријских сојева је уочена код купуса, док је највећа активност постигнута код роткве и шаргарепе. У овом раду је доказано да филмови хитозана могу значајно утицати и на хемијске карактеристике поврћа. Дифузија киселина из филмова хитозана нарочито се позитивно одржава на укус свеже сеченог поврћа. Највећи допринос антимикуробној активности филмова има етарско уље тимијана које је код 1% филма хитозана у шаргарепи и роткви остварило потпуну инхибицију бактеријских врста већ након 48h.

Методe коришћене у истраживањима омогућиле су кандидату да адекватно и у потпуности провери постављену хипотезу и тако оствари постављени задатак и циљ. Рад је написан јасним стилем, а резултати су коректно објашњени, документовани и дискутовани. Током израде докторске дисертације, на основу добијених резултата, проистекао је рад објављен у часопису међународног значаја категорије М23.

Резултати које је добила кандидаткиња значајни су за примену хитозана и етарских уља у изради јестиве амбалаже, за боље разумевање утицаја различитих фактора чувања на хемијски састав поврћа и разлике међу сојевима. Резултати указују на то да се филмови хитозана са додатком етарског уља менте могу користити као потенцијални природни амбалажни материјали који поред здравствене безбедности могу допринети и побољшању укуса и мириса минимално прерађеног поврћа. Истраживања у овој докторској дисертацији су урађена у сагласности са планом и програмом који је предложен у Пријави докторске дисертације.

На основу свега изнетог, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију *мр. Гордане Јовановић* „**ИСПИТИВАЊЕ АНТИМИКРОБНИХ ОСОБИНА ХИТОЗАНА НА РАСТ *LISTERIA MONOCYTOGENES* У ПОВРЋУ**“, и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета Универзитета у Београду да прихвати позитивну оцену и омогући кандидату јавну одбрану.

Чланови Комисије:

др Анита Клаус, доцент
(област Технолошка микробиологија)
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

др Миомир Никшић, редовни професор
(област Технолошка микробиологија)
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

др Драгослава Радин, редовни професор
(област Технолошка микробиологија)
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

др Бранислав Златковић, редовни професор
(област Наука о конзервисању)
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

др Вера Катић, редовни професор
(област Хигијена и технологија млека)
Универзитет у Београду, Факултет
Ветеринарске медицине

Прилог:

Рад мр Гордане Јовановић објављен у научном часопису на SCI листи

Gordana Jovanović, Anita Klaus and M. Nikšić (2016): Antimicrobial activity of chitosan coatings and films against *Listeria monocytogenes* on black radish, Revista Argentina de Microbiologia, DOI. 10.1016/j.ram.2016.02.003.